

DANIELA DA SILVA OLIVEIRA

**NOVA METODOLOGIA PARA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS
DE VINHO TINTO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DOS EXTRATOS
OBTIDOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

O48n
2014
Oliveira, Daniela da Silva, 1983-
Nova metodologia para extração de compostos fenólicos de
vinho tinto e avaliação da estabilidade dos extratos obtidos /
Daniela da Silva Oliveira. – Viçosa, MG, 2014.
x, 138f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Júlio Maria de Andrade Araújo.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.93-122.

1. Vinho tinto. 2. Extração (Química). 3. Fenóis.
4. Antioxidantes. 5. CLAE. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de
Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 641.2223

DANIELA DA SILVA OLIVEIRA

**NOVA METODOLOGIA PARA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS
DE VINHO TINTO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DOS EXTRATOS
OBTIDOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Aprovada: 09 de junho de 2014.

Prof.^a. Dra. Érica Nascif Rufino Vieira

Prof. Dr. Eduardo Basílio de Oliveira
(Coorientador)

Prof. Dr. Luiz Cláudio de A. Barbosa

Prof.^a. Dra. Astréa F. de Souza Silva

Prof. Dr. Júlio Maria de Andrade Araújo
(Orientador)

TUDO POSSO NAQUELE QUE ME FORTALECE
(Fp 4, 13)

Agradeço à Deus por tudo o que me concede e por ser meu porto seguro.

Dedico a meus pais, Marli e José Tarcísio, aos meus irmãos Luciana, José Tarcísio e Renata, e a minha avó Maria Madalena.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de realização do doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao Prof. Júlio Maria de Andrade Araújo, pela orientação e por todos os ensinamentos.

À Profa. Jane Sélia dos Reis Coimbra, pela disponibilidade, auxílio na aquisição de materiais para a pesquisa e pelas sugestões na redação da tese.

Ao Prof. Eduardo Basílio de Oliveira pela orientação, disponibilidade, e pelas sugestões na idealização e realização da pesquisa.

Ao Prof. José Benício Paes Chaves pelos ensinamentos e auxílio no delineamento experimental e análise estatística dos dados.

À Profa. Helena Maria Pinheiro Sant'Ana, pela amizade e carinho, e pela concessão do Laboratório de Análises de Vitaminas (DNS) e do cromatógrafo líquido e demais equipamentos para a realização da parte experimental da pesquisa.

À Profa. Rita de Cássia Superbi de Souza e ao Prof. Paulo Henrique Alvez da Silva pela participação no exame de qualificação.

A todos os membros da Banca pela disponibilidade para participação e avaliação desse trabalho.

Aos demais professores do Departamento de Tecnologia de Alimentos pelos ensinamentos e eventuais préstimos; ao Prof. Paulo César Stringheta pelo empréstimo do colorímetro, e aos seus orientados pelo auxílio nas análises de cor; ao Prof. Nélio de Andrade pelo empréstimo de BODs para a realização do experimento de estabilidade; e aos demais funcionários, em especial ao Pio e ao Maurício, pelas inúmeras colaborações.

Agradeço à Jackline Brilhante pelo incentivo, amizade, e auxílio na pesquisa.

À Christiane Mileib pela amizade e auxílio no delineamento experimental e análise estatística dos dados.

Aos estudantes do Laboratório de Análises de Vitaminas, e em especial ao Leandro, pela amizade, convivência e auxílio no experimento.

Ao Samuel, pelo amor, paciência, incentivo e apoio em todos os momentos.

Às minhas irmãs e irmão, Luciana, Renata e José Tarcísio, pela torcida e apoio.

À minha avó, Maria Madalena, pelo carinho, cuidado, e pelas orações.

Aos meus queridos pais, Marli e José Tarcísio, pelo amor incondicional, por todos os esforço e incentivos, e principalmente pelo exemplo de dedicação como profissionais e pais.

À Deus, por todas as graças alcançadas, pelo porto seguro e por permitir que eu chegasse até aqui.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA = Atividade Antioxidante
CCD = Cromatografia em Camada Delgada
CECC = Cromatografia Eletrocínética Capilar
CFS = Cromatografia por Fluido Supercrítico
CG = Cromatografia Gasosa
CLAE = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CPG = Cromatografia de Permeação em Gel
DCCR = Delineamento Composto Central Rotativo
DE = Dextrose Equivalente
DPPH = 1,1-diphenil-2-picril-hidrazil
EAD = Detecção de Arranjo Elétrico
EAE = Extração Assistida por Enzimas
EAG = Equivalente do Ácido Gálico
EAM = Extração Assistida por Micro-ondas
EAS = Extração por Água Subcrítica
EAU = Extração Assistida por Ultrassom
EC = Eletroforese Capilar
ECD = Detecção Eletroquímica
EEP = Extração por Campo Elétrico Pulsátil
ELP = Extração por Líquido Pressurizado
EFS = Extração por Fluido Supercrítico
ELL = Extração líquido-líquido
FE = Fase Estacionária
FM = Fase Móvel
CCAV = Cromatografia Contracorrente de Alta velocidade
MS = Espectrometria de Massa
SPE = Extração por Fase Sólida
RMN = Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear
UHPLC = Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
UV-DAD = Detecção por Arranjo de Diodos

SUMÁRIO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. OBJETIVO GERAL.....	3
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1. Compostos fenólicos.....	4
3.1.1. Ação antioxidante dos compostos fenólicos.....	4
3.1.2. Compostos fenólicos e a qualidade dos vinhos.....	8
3.1.3. Composição e estrutura dos compostos fenólicos presentes no vinho...8	
3.1.3.1. Flavonóides.....	10
3.1.3.1.1. Flavanóis.....	10
3.1.3.1.2. Taninos condensados.....	11
3.1.3.1.3. Taninos hidrolisáveis.....	13
3.1.3.1.4. Flavonóis.....	13
3.1.3.1.5. Antocianinas.....	14
3.1.3.2. Não flavonóides.....	15
3.1.3.2.1. Fenólicos ácidos.....	15
3.1.3.2.2. Estilbenos – Resveratrol.....	16
3.2. Extratos de compostos fenólicos: oportunidades de mercado e aplicações.....	18
3.3. Técnicas de extração de compostos fenólicos.....	19
3.3.1. Técnicas de extração convencional.....	19
3.3.2. Técnica de extração não convencional.....	22
3.3.2.1. Extração assistida por ultrassom – EAU.....	22
3.3.2.2. Extração assistida por campo elétrico pulsátil – EEP.....	24
3.3.2.3. Extração assistida por enzimas – EAE.....	25
3.3.2.4. Extração por fluido supercrítico – EFS.....	26
3.3.2.5. Extração por líquido pressurizado – ELP.....	30
3.3.2.6. Extração assistida por micro-ondas – EAM.....	32
3.4. Técnicas de purificação e separação de compostos fenólicos.....	33
3.4.1. Extração em fase sólida – SPE.....	33
3.4.2. Hidrólise ácida e alcalina.....	34
3.4.3. Cromatografia contracorrente de alta velocidade – CCAV.....	34
3.5. Identificação e quantificação de compostos fenólicos.....	35
3.5.1. Métodos espectrofotométricos.....	35
3.5.2. Técnicas cromatográficas.....	36
3.5.2.1. Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE.....	36
3.5.2.2. Cromatografia líquida de ultra eficiência – UHPLC.....	37
3.5.2.3. Cromatografia por fluido supercrítico – CFS.....	38
3.5.2.4. Cromatografia Gasosa – CG.....	39

3.5.2.5. Cromatografia em camada delgada – CCD.....	39
3.5.3. Outros métodos.....	39
3.5.3.1. Eletroforese capilar.....	39
3.6. Métodos espectrais.....	40
3.6.1. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear-RMN.....	40
3.6.2. Espectrometria de massa – MS.....	42
4. MATERIAIS e MÉTODOS.....	46
4.1. Matéria prima.....	46
4.2. Reagentes.....	47
4.3. Ensaios preliminares para determinação das faixas de concentração dos compostos adicionados ao vinho.....	47
4.3.1. 1ª Etapa: Otimização da metodologia alternativa de extração de compostos fenólicos em vinho tinto.....	47
4.3.1.1. Otimização das condições de extração utilizando a metodologia de superfície de resposta.....	49
4.3.1.2. Ajuste e testes do modelo de regressão.....	50
4.3.1.3. Validação do modelo de regressão ajustado.....	50
4.3.2. 2ª Etapa: Determinação do vinho/extrato com maior teor de fenólicos totais.....	50
4.3.3. 3ª Etapa: Avaliação da estabilidade do extrato frente a condições de estocagem e utilização.....	51
4.3.3.1. Delineamento experimental e análise estatística.....	51
4.3.3.2. Efeito da temperatura e tempo de estocagem.....	52
4.3.3.2.1. Efeito do pH durante a estocagem.....	52
4.3.3.3. Obtenção do extrato liofilizado.....	53
4.3.3.4. Estabilidade térmica.....	54
4.4. Análises químicas.....	54
4.4.1. Determinação cromatográfica de ácido gálico, catequina e quercetina.....	54
4.4.1.1. Curva de calibração da quercetina, ácido gálico e catequina.....	55
4.4.2. Estimativa de fenólicos totais.....	56
4.4.3. Avaliação da atividade antioxidante.....	58
4.4.4. Antocianinas monoméricas.....	59
4.4.5. Análises instrumentais de cor.....	59
4.4.5.1. Método espectrofotométrico.....	59
4.4.5.2. Método colorimétrico baseado no sistema CIE L*a*b*.....	60
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
5.1. Efeitos individuais do sal e dos solventes orgânicos na separação de fases do vinho.....	61
5.2. Otimização da extração de compostos fenólicos do vinho tinto.....	64
5.2.1. Ajuste da equação de regressão.....	65
5.3. Interpretação do modelo de superfície de resposta.....	68
5.4. Validação do modelo ajustado.....	68

5.5. Aplicação da metodologia otimizada na extração de compostos fenólicos em vinhos tintos.....	70
5.6. Avaliação da estabilidade do extrato frente a diferentes condições de estocagem e utilização.....	70
5.6.1. Conteúdo de compostos fenólicos, atividade antioxidante e parâmetros de cor.....	71
5.6.1.1. Compostos fenólicos totais.....	73
5.6.1.2. Antocianinas monoméricas.....	75
5.6.1.3. Atividade Antioxidante.....	77
5.6.1.4. Dosagens de ácido gálico, catequina e quercetina.....	79
5.6.1.5. Análises de cor.....	82
5.6.1.5.1. Coordenadas de cor.....	83
5.6.1.5.2. Índice de cor, tonalidade e brilho.....	85
5.6.2. Estabilidade térmica.....	89
6. CONCLUSÕES.....	91
7. PERSPECTIVAS.....	92
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
9. APÊNDICES.....	123

RESUMO

OLIVEIRA, Daniela da Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2014. **Nova metodologia para extração de compostos fenólicos de vinho tinto e avaliação da estabilidade dos extratos obtidos.** Orientador: Júlio Maria de Andrade Araújo. Coorientadores: Paulo César Stringheta e Eduardo Basílio de Oliveira.

A extração líquido-líquido de compostos fenólicos em diferentes tipos de vinho utilizando-se os reagentes, NaH_2PO_4 , acetona e etanol foi estudada. O delineamento composto central rotativo foi empregado na otimização dos constituintes da mistura. O estudo de otimização utilizando a metodologia de superfície de respostas, fixando etanol em 1,5 % (v/v), demonstrou que as condições otimizadas foram 59 % (m/v) de NaH_2PO_4 e 3,4 % (v/v) de acetona. Os efeitos de diversas condições de armazenamento e utilização na estabilidade do extrato (conteúdo de fenólicos e atividade antioxidante), obtido pelo método otimizado, foram investigados durante 90 dias, em quatro diferentes temperaturas (-10 °C, 4°C, 25 °C e 35 °C), três valores de pH (3,0; 3,8 e 6,0) e duas formas de apresentação (líquido e liofilizado). Os extratos obtidos apresentaram teores de fenóis totais, antocianinas monoméricas e compostos fenólicos individuais (catequina, quercetina e ácido gálico) concentrados de 4 a 9 vezes em relação aos teores observados no vinho. O extrato liofilizado apresentou teores mais elevados de fenóis totais, antocianinas, quercetina e intensidade de cor, apesar da menor atividade antioxidante. Os extratos líquidos e liofilizados foram estáveis durante os 90 dias de armazenamento no escuro à temperatura de -10°C e 4°C. Os teores de catequina, ácido gálico e a atividade antioxidante foram estáveis nos diferentes valores de pH (3,0, 3,8 e 6,0) durante 90 dias, enquanto os teores de fenóis totais, antocianinas monoméricas, quercetina e os parâmetros de cor, foram reduzidos nas temperaturas de 25°C e 35°C, principalmente em pH 6,0. Com exceção da catequina, o tratamento térmico (60 segundos/90°C) empregado nos extratos não levou a perdas significativas dos compostos analisados. Conclui-se que a metodologia alternativa foi eficiente na extração de compostos fenólicos, fornecendo extratos fenólicos concentrados, e com excelente estabilidade em temperaturas de congelamento e refrigeração, onde a sua qualidade funcional e sensorial (cor) foram preservadas.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Daniela da Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2014. **New methodology for extraction of phenolic compounds from red wine and evaluation of the stability of the extracts.** Adviser: Júlio Maria de Andrade Araújo. Co-advisers: Paulo César Stringheta and Eduardo Basílio de Oliveira.

The liquid-liquid extraction of phenolic compounds in different types of wine using the reagents, NaH_2PO_4 , acetone and ethanol was studied and experimental data were elaborated according to the different mathematical models applied in literature to recovery of phenols from wine. Central composite rotatable design was employed to optimize the constituents of the mixture. The optimization study using the response surface methodology, fixing ethanol at 1.5 %, demonstrated that the optimized conditions were 59 % NaH_2PO_4 and 3.4 % acetone. The effects of several storage and usage conditions on extract stability (phenolic content and antioxidant activity), obtained by the optimized method, were investigated during 90 days, at four different temperatures (-10°C , 4°C , 25°C and 35°C), pH (3.0, 3.8 and 6.0) and presentations (liquid and lyophilized). The extracts showed levels of total phenols, monomeric anthocyanins and individual phenolic compounds (catechin, quercetin and gallic acid) concentrated 4-9 fold relative to levels observed in wine. The extract that stood out was the lyophilized, with the highest levels of total phenols, anthocyanins, quercetin and color intensity, despite the lower antioxidant activity. The liquid and freeze-dried extracts were stable during 90 days of storage in the dark at -10°C and 4°C . The levels of catechin, gallic acid and antioxidant activity were stable at different pH values (3.0, 3.8 and 6.0) for 90 days, while the levels of total phenol, monomeric anthocyanins, quercetin and color parameters were reduced at temperatures of 25°C and 35°C , mainly at pH 6.0. With the exception of catechin, heat treatment (60 seconds/ 90°C) employed in the extracts did not lead to significant losses of the compounds analyzed. It is concluded that the alternative methodology was efficient in the extraction of phenolic compounds, providing concentrated phenolic extracts, and excellent stability in freezing and cooling temperatures, where its functional and sensory quality (color) were preserved.

1. INTRODUÇÃO

Compostos fenólicos compoem um grupo extenso de substâncias amplamente distribuídas em vegetais (frutos, folhas, caules, sementes), onde ocorrem frequentemente como derivados conjugados, sendo subdivididos em 21 grupos (MANN et al., 1996).

Todos os compostos fenólicos contêm um grupo fenol – função hidroxila em um anel aromático. A presença de estruturas em anel conjugado e de grupos hidroxil possibilita aos compostos fenólicos eliminar e estabilizar radicais livres (SHAHIDI et al., 1992). A presença de grupos ácidos carboxílicos em muitos compostos fenólicos pode atribuir a estes a propriedade de inibir a oxidação de lipídios *in vitro* por mecanismo de complexação de metal (HUDSON e LEWIS, 1983). Dessa forma, têm recebido importância como constituintes da dieta, com grande potencial para apresentarem efeitos protetores contra as doenças relacionadas ao estresse oxidativo (RIBEIRO, 2006).

Grande atenção tem sido dada para a produção de extratos de compostos fenólicos, derivados da uva e de seus produtos. Representam uma oportunidade de negócio atraente por apresentarem valor de mercado elevado como nutracêuticos, aditivos alimentares e farmacêuticos, devido a sua possível atividade biológica (CRESPO e BRAZINHA, 2010; SEBRAE, 2014).

Para a extração de compostos fenólicos de diversas matrizes, diferentes sistemas de solventes são utilizados (CHAVAN et al., 2001). A extração em materiais sólidos ou semi-sólidos tem sido focada na maceração utilizando solventes orgânicos, enquanto a extração em amostra líquida é obtida pela extração líquido-líquido (ELL). Ambos os métodos requerem caros e perigosos solventes orgânicos (metanol, etanol, propanol, acetona, acetato de etila, e suas combinações, com diferentes proporções de água), procedimento analítico longo, temperaturas até 80°C, exposição à luz e ao oxigênio. Isso pode ocasionar degradações, comprometendo a qualidade e o rendimento do extrato final, além do potencial para poluição ambiental devido ao grande volume de solventes utilizados (GARCIA-SALES et al., 2010).

Por essas razões, os tradicionais métodos de extração têm sido substituídos por outras metodologias que são mais sensíveis, seletivas, rápidas e ambientalmente seguras. Técnicas como a extração assistida por micro-ondas, ultrassom, e técnicas baseadas na utilização de fluidos comprimidos, como a extração por água subcrítica e

pelo CO₂ supercrítico tem sido aplicadas na obtenção de compostos fenólicos. Entretanto, devido à aplicação de altas pressões nessas técnicas, os requisitos de instrumentações são elevados, assim como os custos desses métodos em escala industrial, o que frequentemente diminui seus benefícios (DAI e MUMPER, 2010).

Diante do exposto, este trabalho propôs uma metodologia alternativa de extração de compostos fenólicos, sendo inicialmente aplicada em vinho tinto. Apesar de ser considerada uma matéria prima de um custo mais elevado do que a própria uva, optou-se por realizar a pesquisa com o vinho tinto em função do seu teor mais elevado de compostos fenólicos do que o observado na uva. Além do mais o vinho tinto apresenta um perfil de compostos fenólicos diferente e de maior estabilidade do que os compostos fenólicos encontrados na uva. O método proposto consiste em adicionar ao vinho tinto um sal monobásico anidro, acetona e etanol promovendo a separação de fases. É um método rápido, simples, além de não utilizar grandes volumes de solventes tóxicos como ocorre nos métodos tradicionais de extração. No entanto, a extração é influenciada pelas concentrações dos reagentes químicos empregados, que foram otimizadas para fornecer maior teor de compostos fenólicos na fase superior. O presente trabalho é complementado avaliando-se a estabilidade dos extratos obtidos, frente a condições de estocagem.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de nova metodologia para extração de compostos fenólicos em vinho tinto, empregando reduzido teor de solventes orgânicos, em condições compatíveis às utilizadas industrialmente.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a extração de fenólicos totais através da separação de fases do vinho tinto, utilizando os sais NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , KCl , e MgSO_4 , acetona e etanol;
- Otimizar a extração de compostos fenólicos através da separação de fases do vinho tinto utilizando como ferramentas estatísticas a metodologia de superfície de respostas e o delineamento composto central rotativo, para estudar os efeitos das concentrações de sal, acetona e etanol sobre o rendimento da extração de compostos fenólicos;
- Estimar no vinho e extratos líquidos (com pH alterado para pH 3,0 e pH 6,0) e liofilizado o teor de fenólicos totais, pelo método de Folin-Ciocalteu, e antocianinas monoméricas, pelo método do pH diferencial, e avaliar a cor por dois métodos: o método espectrofotométrico e o método colorimétrico baseado no sistema CIE $L^* a^* b^*$; e estimar a atividade antioxidante *in vitro* pelo método do radical DPPH;
- Investigar a influência de 90 dias de estocagem sobre a estabilidade dos compostos fenólicos, atividade antioxidante e parâmetros de cor dos extratos;
- Avaliar a estabilidade dos compostos fenólicos, atividade antioxidante e parâmetros de cor em relação à formulação do extrato (líquido ou liofilizado), quatro temperaturas de estocagem (-10°C , 4°C , 25°C e 35°C), três valores de pH (3,0, 3,8 e 6,0) e tratamento térmico a 90°C por 60 segundos;
- Determinar e avaliar a estabilidade do ácido gálico, catequina e quercetina no vinho e extrato por meio de cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos compreendem mais de 8.000 compostos distribuídos nos vegetais, apresentando diferentes estruturas. São originados do metabolismo secundário das plantas durante o desenvolvimento normal e em resposta a condições de estresse (infecções, radiação UV, entre outros). Possuem funções importantes como a pigmentação, crescimento vegetal, atração de polinizadores, defesa contra agressores, função antioxidante através da remoção de radicais livres formados durante a fotossíntese, entre outras (MONAGAS et al., 2005). Suas estruturas podem variar desde moléculas mais simples, como os fenólicos ácidos, a substâncias altamente polimerizadas, como os taninos (BALASUNDRAM et al., 2006). O vinho tinto é considerado uma das principais fontes de compostos fenólicos, que são extraídos das uvas durante as etapas de maceração e fermentação do processo de fabricação do vinho. O teor de compostos fenólicos totais pode variar de 1 a 4 g/L de vinho tinto (BALASUNDRAM et al., 2006), dependendo da variedade da uva e outros fatores.

3.1.1. Ação antioxidante dos compostos fenólicos

Os compostos fenólicos agem como antioxidantes bloqueando, reações radicalares em cadeia por meio da doação de átomos de hidrogênio, ou ainda complexando íons metálicos que catalizam essas reações (YANG et al., 2009).

Para que a ação antioxidante ocorra, a estrutura química dos compostos fenólicos deve apresentar algumas características: possuir grupos funcionais com propriedades de oxiredução (doar átomos de hidrogênio ou elétrons) (RICE-EVANS et al., 1996; CAO et al., 1997; SANG et al., 2002) (Figura 1a); capacidade de deslocar elétrons no interior do núcleo benzênico, de forma a estabilizar o radical formado (VAN ACKER et al., 1996) (Figura 1b); possuir estrutura orto-difenólica, o que permite a complexação de íons metálicos, além de conferir maior estabilidade à estrutura radical (PIETTA, 2000). A presença e o tamanho das cadeias laterais também podem atuar de forma positiva, auxiliando na estabilização do radical ou de forma negativa causando um impedimento estérico dos grupos hidroxilas ao radical livre. A presença de grupos ácidos carboxílicos em muitos compostos fenólicos pode atribuir a estes a propriedade de inibir a oxidação de lipídios por mecanismo de complexação de metais (HUDSON e LEWIS, 1983) (Figura 1c).

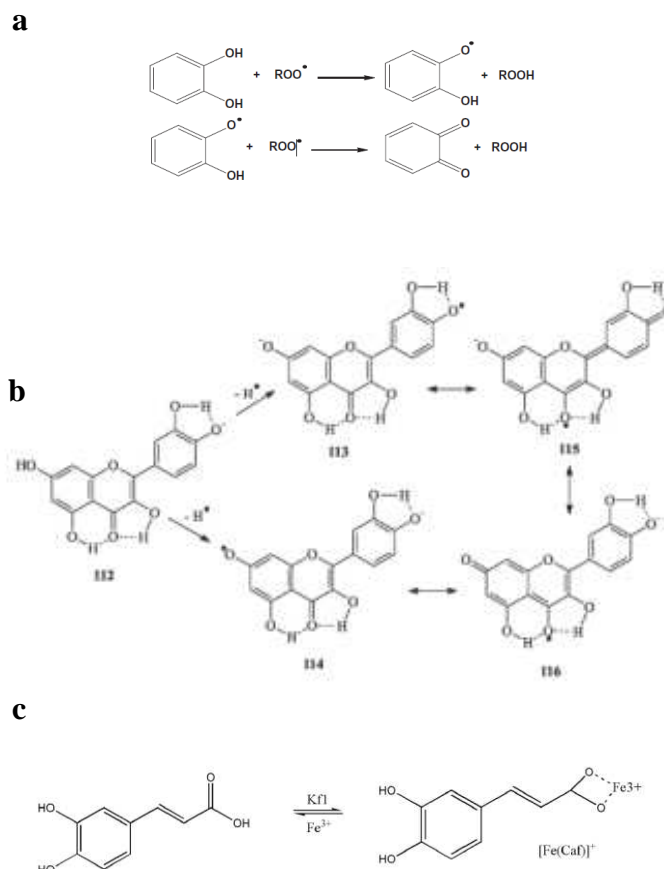


Figura 1. a) Reação de oxidação do fenol por meio do peróxido de hidrogênio. b) Doação do H radicalar para o radical livre nas posições C-4' (**113**) e C-7 (**114**). Ambos os radicais livres formados podem ter seu elétron deslocado pela estrutura, com maior estabilidade para os radicais **113**, **115** e **116**, devido à estabilização resultante das ligações de hidrogênio (BARREIROS et al., 2006). c) Complexação do grupo carboxílico do ácido cafeico com o metal ferro³⁺.

Devido as características antioxidantes dos compostos fenólicos e por estarem presentes em quantidades significativas no vinho estudos foram realizados associando o consumo de vinho, com a redução no risco de doenças cardiovasculares e neoplasias, ação anti-inflamatória, atividade antimicrobiana, auxílio no controle do peso, proteção renal, ação neuroprotetora, entre outras (FRANKEL et al., 1995; TAPIERO et al., 2002; BALASUNDRAM et al., 2006).

Alguns estudos realizados apontaram que o vinho apresenta agentes antibacterianos eficazes contra cepas de *Streptococcus*, infecções de feridas de válvulas cardíacas, da bexiga, do abdômen, do sangue, entre outras (VECHIATTO e PAITNER, 2010). Estudo realizado por Vaquero et al., (2007) mostrou que três diferentes

variedades de vinho tinto Argentino (Cabernet Sauvignon, Malbec e Merlot) apresentam importante ação antibacteriana contra *Listeria monocytogenes*. Por meio deste estudo os autores concluíram que o consumo regular de vinho pode proteger contra possíveis infecções causadas por patógenos presentes em alimentos.

Entre outros benefícios estudados, há a comprovação do seu poder antitumoral, pelo aumento da apoptose e inibição da proliferação de células epiteliais malignas da mama, células de câncer de próstata e tumor de cólon (FREITAS et al., 2010; MUKHERJEE et al., 2010).

O resveratrol tem a capacidade de interferir em alguns tipos de câncer como mama, próstata, pulmão, cólon, estômago, ovário, entre outros. Tem ação antimutagênica, desempenhando atividades contra o crescimento de células neoplásicas, como a regulação dos níveis de p53, uma proteína supressora de tumor (SAUTTER, 2003). Quando administrado em pequenas doses, associado a quimioterápicos, reduz os efeitos tóxicos dos quimioterápicos sobre as células normais melhorando a eficácia do tratamento (PAULO, 2007).

Estudos mostram que o resveratrol diminui as ocitocinas inflamatórias dos macrófagos alveolares, por isso acredita-se que os fumantes que consomem o vinho tinto têm menos chances de desenvolverem câncer de pulmão (RUANO-RAVINA et al., 2004; DONNELLY et al., 2004). Outro estudo mostra que o resveratrol apresenta atividade antagonista contra a dioxina e benzo-[a]-pireno, importantes contaminantes ambientais presentes no cigarro (CASPER et al., 1999). Gao et al., (2002) também mostraram que o resveratrol presente no vinho possui atividade antileucêmica em ensaios *in vitro* e *in vivo*.

Estudo realizado por Silva et al., (2011) mostra que a administração de extrato de vinho em ratos reduz a nefrotoxicidade induzida pelo Tacrolimus, a qual está associada ao aumento da lipoperoxidação renal. O efeito renoprotetor do vinho pode estar relacionado ao sequestro de radicais livres, à inibição da peroxidação lipídica, ou ainda à atuação nessas duas vias.

Em estudo realizado utilizando ratos, o resveratrol apresentou efeitos neuroprotetores tanto *in vitro* quanto *in vivo*, mantendo a função cognitiva durante o envelhecimento e retardando as anormalidades microvasculares. As propriedades antioxidantes são os principais responsáveis pelos benefícios apresentados, prolongando assim a sobrevivência e a saúde em geral do animal (OOMEN et al., 2009).

Queipo-Ortuño et al., (2012) estudaram a ação dos elementos constituintes do vinho: componentes presentes na uva e o álcool. Os resultados demonstraram que, tanto um quanto o outro, são responsáveis por essa melhora à saúde. Participaram desse estudo 67 homens com alto risco para doenças cardíacas. Primeiro, eles passaram duas semanas sem consumir nenhum tipo de bebida alcoólica e, depois, tiveram que ingerir 30 gramas de vinho tinto ao dia, uma quantidade equivalente a dois copos, durante um mês. No mês seguinte, eles continuaram bebendo a mesma quantidade diária, porém, de vinho sem álcool. Durante todo o estudo, os autores aplicaram exames de sangue para medir os níveis de uma série de substâncias químicas relacionadas à formação de placas nas paredes das artérias (placas ateroscleróticas) e que também funcionam como biomarcadores de inflamações. Os resultados obtidos mostraram que, quando os homens consumiam vinho tinto alcoólico diariamente, eles demonstravam um maior nível de interleucina-10, uma substância capaz de diminuir a inflamação nas artérias. Isso, segundo os autores do estudo, sugere que o álcool sozinho é responsável por essa ação anti-inflamatória. Por outro lado, no período em que os homens beberam vinho tinto sem teor alcoólico, os exames de sangue revelaram que houve uma redução nos níveis de certas substâncias responsáveis por estimular a formação de placas nas paredes das artérias. Com isso, foi possível concluir que essa diminuição foi decorrente da ação dos polifenóis vindos das sementes ou da casca da uva, e não ao álcool. Logo, os autores concluíram que tanto as uvas quanto o álcool, desde que consumido moderadamente, são bons para o coração e que, provavelmente, há uma forte vantagem em ingerir os dois juntos.

Segundo Wollin e Jones (2001), o álcool, proveniente do vinho, reduziria o colágeno que induz a agregação de plaquetas (formação de placas nas artérias) e os processos de trombose, enquanto os compostos fenólicos, provenientes da uva, reduziriam a peroxidação lipídica, reações químicas mediadas pelos radicais livres, que podem romper as estruturas celulares e ter como consequência o surgimento de doenças cardiovasculares e de alguns tipos de câncer, e a oxidação do LDL, que está envolvida diretamente com os processos de aterosclerose. Os autores deste estudo concluem que a ingestão moderada de álcool, principalmente na forma de vinho tinto, parece proteger da morte por DCV.

Um outro estudo, *in vivo*, demonstrou que o consumo diário de vinho tinto (400 ml) por duas semanas, reduziu a susceptibilidade do plasma à peroxidação lipídica,

enquanto que o consumo de vinho branco mostrou efeito contrário, o que confirma os benefícios dos compostos fenólicos (FUHRMAN et al., 1995).

No entanto, é importante salientar que a maior parte das pesquisas que avaliam a atividade benéfica dos compostos fenólicos à saúde é realizada *in vitro* e com os compostos provenientes diretamente das plantas. Além disso, estudos têm mostrado que os compostos fenólicos são metabolizados *in vivo* ao atravessarem o intestino delgado, pela ação da microbiota e pela ação do fígado, resultando em alterações na estrutura inicial. Os estudos *in vitro* e com animais tem demonstrado que a ação de alguns compostos provavelmente só seria alcançada apenas em doses muito mais elevadas do que aquelas obtidas a partir do consumo do alimento (MORAES E LOCATELLI, 2010). Dessa forma ainda não se sabe ao certo qual é a ação desses compostos no organismo (DONAVAN e WATERHOUSE, 2003; MORAES E LOCATELLI, 2010).

3.1.2. Compostos fenólicos e a qualidade dos vinhos

Os compostos fenólicos determinam a qualidade geral dos vinhos, principalmente os tintos. Contribuem para as características sensoriais, particularmente para a cor (antocianinas), sensações gustativas, como a adstringência e amargor (fenólicos ácidos e taninos) e o aroma (SANTOS-BUELGA et al., 2010). São os responsáveis pelas principais diferenças entre o vinho branco e o tinto e em especial na cor e no aroma, além de constituírem o principal reservatório de substâncias auto oxidáveis, formando o maior sistema de proteção dos vinhos contra fenômenos de oxidação (DAUDT e POLENTA, 1999). Dessa forma, os compostos fenólicos presentes no vinho constituem um parâmetro para avaliação da qualidade do mesmo.

3.1.3. Composição e estrutura dos compostos fenólicos presentes no vinho

A estrutura química dos compostos fenólicos é caracterizada pela presença do anel benzênico com um ou mais grupos hidroxilas associados diretamente a estrutura cíclica (Figura 2). Podem se encontrar metilados ou glicosilados. Os compostos fenólicos são divididos em dois grandes grupos, os flavonóides e os não flavonóides. No vinho as classes pertencentes aos flavonóides são os flavonóis, os flavanóis e as antocianinas. Os não flavonóides incluem os fenólicos ácidos e os estilbenos, do qual faz parte o resveratrol (JACKSON, 1994).

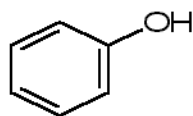


Figura 2. Estrutura básica dos compostos fenólicos

Na Tabela 1, é apresentada a concentração das diferentes classes de compostos fenólicos no vinho. Observa-se que para todas as classes de fenólicos, o vinho tinto apresenta concentrações superiores em relação ao vinho branco, e que para os dois tipos de vinho os flavanóis são os majoritários (MINUSSI et al., 2003). Segundo Balasundram et al., (2006), o teor de compostos fenólicos dos vinhos tintos é estimado em mais de 1000 mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/L, comparado com menos de 500 mg EAG/L para a maioria dos vinhos brancos.

Tabela 1. Concentração de compostos fenólicos no vinho tinto e branco (mg.L⁻¹).

	Classe	Composto	Vinho Branco	Vinho Tinto
Flavonóides	Flavonóis	Miricetina	4,5 - 9,0	8,5 - 15
		Rutina	4,5 - 9,0	3,2 - 9,03
		Quercetina	1,4 - 10,0	7,87 - 12,24
	Flavanóis	Catequina	15 - 35	60 - 201
		Epigallocatequina	21 - 28	36 - 82
	Antocianinas	Cianidina	0	0,5 - 3,0
Malvidina-3-glicosídeo		1	24 - 55,1	
Não Flavonóides	Fenóis	Ácido gálico	7,0 - 10,0	14 - 95
		Ácido caféico	2,8	3,6 - 7,0
		Resveratrol	0 - 1,0	2,0 - 3,8
Teores médios de fenólicos totais*			239	2567

Fonte: FRANKEL et al., (1995).* Expressos em equivalente de ácido gálico em mg/L.

Vários fatores podem influenciar consideravelmente tanto no teor quanto no perfil de compostos fenólicos de um determinado vinho, destacando-se: variedade da uva, safra, região de cultivo, condições climáticas, tipo de solo, localização geográfica, práticas vitícolas, estágio de amadurecimento da uva, técnicas de vinificação (duração e temperatura da maceração, temperatura de fermentação, uso de enzimas), tipo de carvalho e extensão do envelhecimento (SUBRAMANI et al., 2002; CLIFF, 2007; ALÉN-RUIZ et al., 2009; LACHMAN et al., 2007; PUÉRTOLAS et al., 2010).

3.1.3.1. Flavonóides

Os flavonóides são compostos polifenólicos com estrutura molecular formada por dois anéis aromáticos (A e B) ligados por um anel pirano (C) (Figura 3) (HARBORNE et al., 1999). Variações na substituição do anel C resultam nas diferentes classes de flavonóides (HOLLMAN et al., 1999). Na natureza podem se encontrar livres ou condensados a açúcares ou a outros fenóis. Isso aumenta a solubilidade em água; porém, pode causar impedimento estérico, diminuindo a reatividade com os radicais livres (BARREIROS et al., 2006; CAI et al., 2006).

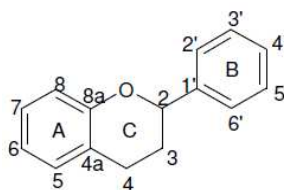


Figura 3. Estrutura básica dos flavonóides.

Os flavonóides são encontrados nas grainhas, na polpa e na película das uvas e são os principais responsáveis pelas sensações gustativas (flavan-3-óis) e pela cor dos vinhos (antocianinas), assumindo ainda um importante papel no envelhecimento dos mesmos (JORDÃO, 1999).

3.1.3.1.1. Flavanóis (Flavan-3-óis)

Um subgrupo dos flavonóides são os flavanóis. São constituídos por dois anéis aromáticos A e B e pelo anel heterocíclico C, ao qual se encontra ligado um grupo hidroxila na posição 3. Diferem entre si pela estereoquímica dos carbonos assimétricos do anel C bem como no grau de hidroxilação dos anéis A e B (FERNANDES, 2007).

No género *Vitis*, encontram-se hidroxilados nas posições 5 e 7 do anel A e de acordo com o número de grupos hidroxilas no anel B e com a estereoquímica do carbono 3 do anel C, podem ser classificados como catequinas e galocatequinas. As catequinas ((+)-catequina e (-)-epicatequina) são hidroxiladas nas posições 3' e 4' do anel B, enquanto que as galocatequinas ((+)-galocatequinas e (-)-epigalocatequinas) são hidroxiladas nas posições 3', 4' e 5' do anel B (Figura 4). Podem ser encontradas na forma livre ou condensadas ao ácido gálico (LEE & JAWORSKI, 1990). São os compostos responsáveis pelo sabor e adstringência do vinho e suco de uva.

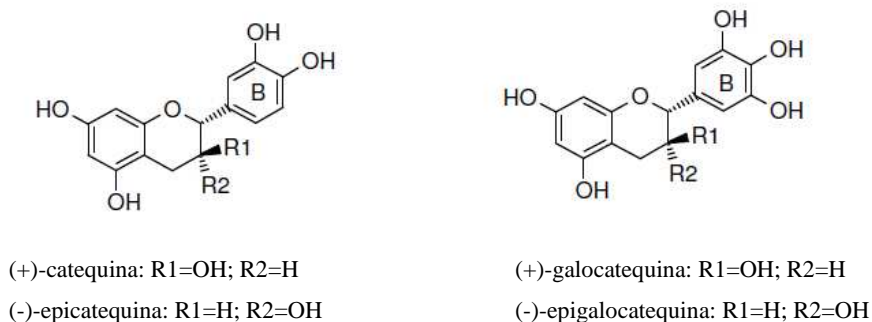


Figura 4. Estrutura das unidades monoméricas de flavanóis (catequina e galocatequinas).

3.1.3.1.2. Taninos Condensados

Os taninos condensados ou proantocianidinas são estruturas derivadas dos flavanóis e, de acordo com o número de vezes que esta unidade se repete, podem ser formadas as proantocianidinas diméricas, triméricas e oligoméricas (com até seis unidades) (Figura 5). No entanto, nas uvas a maioria é polimérica, sendo que o grau médio de polimerização pode variar de 10 a 30 unidades (HASLAM, 1998).

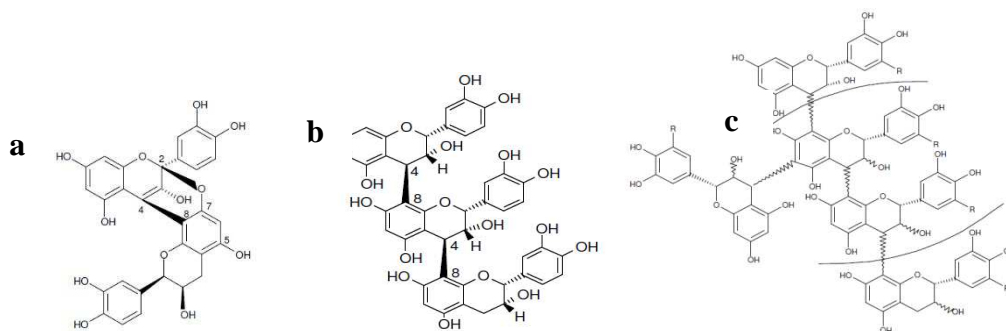


Figura 5. Proantocianidina dimérica (a), trimérica (b) e polimérica (c).

Estes compostos possuem a propriedade de, em meio ácido e alcoólico, se decomporem em antocianidinas (cianidina e delphinidina), mediante a ruptura das ligações entre as unidades monoméricas (Figura 6). As antocianidinas podem ser divididas em procianidinas, que são oligômeros de catequina e epicatequina ou em prodelfinidinas que são constituídas de unidades de galo e epigalocatequinas. Nas uvas e vinhos ocorre a predominância das procianidinas (BATE-SMITH, 1954; RICARDO DA SILVA, 1995).

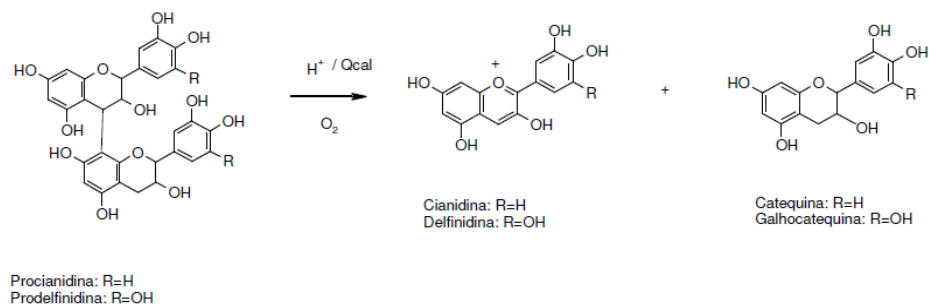


Figura 6. Decomposição das proantocianidinas por aquecimento em meio ácido (BATE-SMITH, 1954).

Os taninos possuem grande importância sensorial na qualidade dos vinhos, pois estão associados ao sabor, principalmente no que se refere à adstringência, que é resultado da interação desses compostos com proteínas salivares ricas em prolina formando complexos insolúveis que precipitam na cavidade oral e impedem a lubrificação da língua, causando uma sensação de secura que é denominada adstringência (BATE-SMITH, 1973). Golebiowski et al., (2011) ao aplicarem técnicas de modelagem molecular para estudar em nível atômico a interação entre taninos e proteínas salivares ricas em prolina, constataram que o processo de interação resulta principalmente em ligações de hidrogênio, que são observadas entre os grupos hidroxilas dos taninos e os átomos hidrofílicos do esqueleto da proteína salivar rica em prolina. Além do mais, constataram que quanto mais polimerizado o tanino, maior é o número de resíduos de proteínas envolvidos no complexo. Scollary et al., (2012) relatam ainda a presença de interações hidrofóbicas entre taninos e proteínas ricas em prolina, sendo os efeitos hidrofóbicos mais prováveis as interações de van der Waals-London. Interações hidrofóbicas e por ligações de hidrogênio entre taninos e proteínas salivares estão apresentadas na Figura 7.

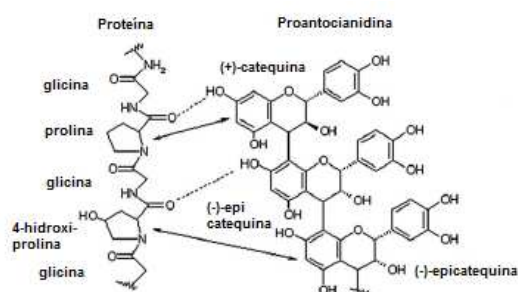


Figura 7. Representação das interações entre proteínas e proantocianidina. Linhas pontilhadas são sugestões de locais onde ocorrem ligações de hidrogênio. Flechas de pontas duplas sugerem regiões de ligações hidrofóbicas (SCOLLARY et al., 2012).

3.1.3.1.3. Taninos Hidrolisáveis

Além dos taninos condensados, nos vinhos são encontrados os taninos hidrolisáveis. Resultam da ligação de um açúcar (geralmente a glicose) a um composto fenólico, principalmente o ácido gálico, formando os galotaninos, ou o ácido elágico, formando os elagitaninos (Figura 8). Esses são muito mais frequentes que os galotaninos (BARQUETTE e TRIONE, 1998). Estes compostos não são originários das uvas, sendo a presença nos vinhos como resultado de certas práticas vinícolas, tais como a utilização de tonéis de carvalho, cuja madeira é rica em taninos hidrossolúveis (PARDO-GARCÍA et al., 2014).

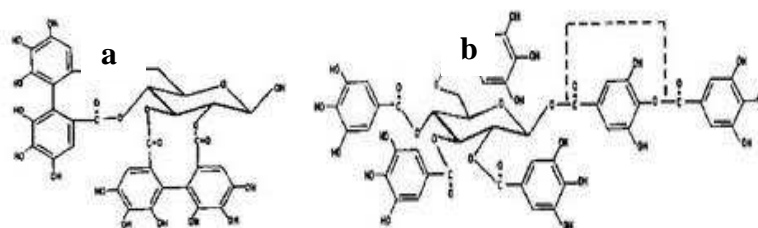


Figura 8. Estrutura dos elagitaninos (a) e galotaninos (b).

3.1.3.1.4. Flavonóis

Fazem parte do grupo dos flavonóis a quercetina, o kaempferol e a miricetina, todos originários da uva (Figura 9). São caracterizados pela presença de uma insaturação entre os carbonos 2 e 3, e pelo grupamento carbonila na posição 4 do anel C, o que aumenta a estabilidade do radical formado (CHEYNIER, 2006). Dentre os flavonóis a quercetina é que possui maior atividade antioxidante *in vitro* (RICE-EVANS et al., 1996).

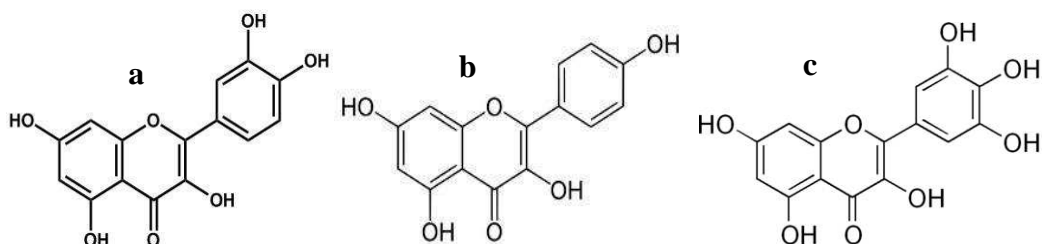


Figura 9. Estrutura da quercetina (a), kaempferol (b) e miricetina (c).

São encontradas nas uvas na forma glicosilada, mas como são facilmente hidrolisáveis, nos vinhos tintos encontram-se na forma livre. Também possuem papel importante na evolução da cor dos vinhos tintos através de processos de copigmentação com as antocianinas (RIBÉREAU-GAYON et al., 1972; ALLEN, 1994).

A copigmentação consiste em uma interação molecular por ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre as antocianinas e outras moléculas não coradas (flavonóides, em particular os flavanóis, fenólicos ácidos, alcalóides, aminoácidos e ácidos orgânicos) que atuam como copigmentos em meio aquoso (DAVIES & MAZZA, 1993). As interações resultam na intensificação da cor (efeito hipercrômico) que poderá ser acompanhada por um deslocamento do comprimento de onda máximo para valores superiores (efeito batocrômico), na faixa visível do espectro do vermelho para o azul (MAZZARACCHIO et al., 2004).

Os complexos são constituídos por agregados moleculares ou empilhamentos moleculares (Figura 10) envolvendo interações p-p, ou alinhamentos perpendiculares baseados em interações CH-p (LEVENGOOD E BOULTON, 2004; LIAO et al., 1992). Forças moleculares fracas também estão envolvidas, incluindo interações hidrofóbicas em que os compostos fenólicos associam-se uns com outros para minimizar as interações com a água (RUSTIONI et al., 2012).

Os flavanóis foram considerados os mais efetivos copigmentos em extratos de uva, sendo a concentração da quercetina 3-O-glicosídeo correlacionada com a intensidade da copigmentação (RUSTIONI et al., 2012).

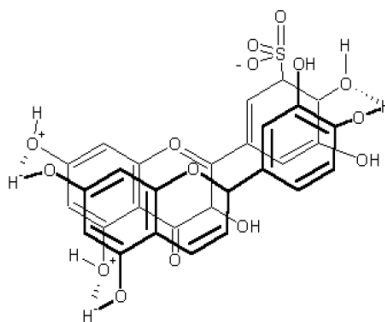
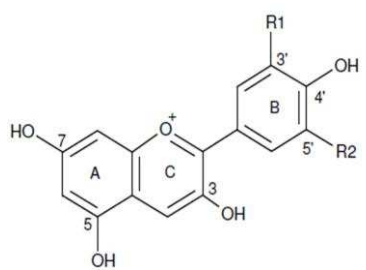


Figura 10. Representação do complexo molecular entre a apigenidina e a quercetina-5'-ácido sulfônico (IACOBUCCI e SWEENY, 1983).

3.1.3.1.5. Antocianinas

As antocianinas são pigmentos naturais responsáveis pela coloração das uvas e vinhos tintos. Consistem de dois anéis aromáticos unidos por unidade de três carbonos condensados por um oxigênio, que é denominado catión flavilium (GUERRA, 1997). Podem se encontrar glicosiladas na posição O-3 o que confere maior solubilidade e estabilidade para a molécula, mas pode causar um impedimento estrutural, diminuindo a atividade antioxidante (TIMBERLAKE e BRIDLE, 1966). Quando encontradas na forma aglicona são denominadas antocianidinas, que diferem entre si pelo número e

posição dos grupos hidroxilas e metoxila ligados ao anel B (RAMOS et al., 2000), conforme demonstrado na Figura 11. No gênero *Vitis* as antocianidinas encontradas são as delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina e malvidina, sendo a última majoritária (JACKSON, 1994; MALACRIDA e MOTTA, 2006).



Antocianidina	R1	R2	Cor
Delfinidina	OH	OH	Azul
Cianidina	OH	H	Vermelho
Petunidina	OCH ₃	OH	Vermelho escuro
Peonidina	OCH ₃	H	Vermelho escuro
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃	Púrpura

Figura 11. Estrutura das agliconas das principais antocianinas presentes nas uvas.

3.1.3.2. Não flavonóides

3.1.3.2.1. Fenólicos ácidos

Uma importante fração dos compostos fenólicos do vinho são os fenólicos ácidos. Caracterizam-se por apresentarem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupos hidroxila e ou metoxila. Podem ser encontrados livres ou como derivados glicosilados ou ésteres de tartarato em vinhos tintos e branco (MONAGAS et al., 2005). Encontram-se distribuídos na epiderme e na polpa da uva e seus teores diminuem com o amadurecimento e também durante a fermentação do vinho (PENNA et al., 2001). São divididos em dois grupos, os derivados do ácido hidroxicinâmico e do ácido hidroxibenzóico (Figura 12).

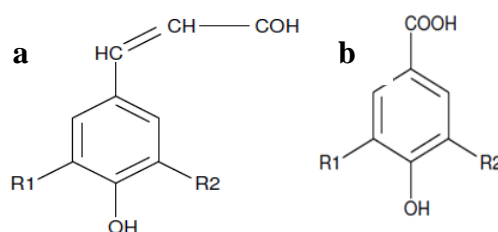


Figura 12. Estrutura do ácido hidroxicinâmico (a) e hidroxibenzóico (b).

Os derivados do ácido hidroxibenzóico possuem estrutura comum de um anel benzênico e um grupamento carboxílico. Os ácidos mais importantes nesse grupo são o

vanílico, sinrígico, salicílico e principalmente o ácido gálico por possuir maior atividade antioxidante *in vitro* (Figura 13). Os demais ácidos ocorrem em menores quantidades. Nas uvas são encontrados na forma de ésteres, mas durante a elaboração e conservação do vinho são lentamente hidrolisados, podendo ser encontrados livres e combinados (RIBÉREAU-GAYON et al., 1972).

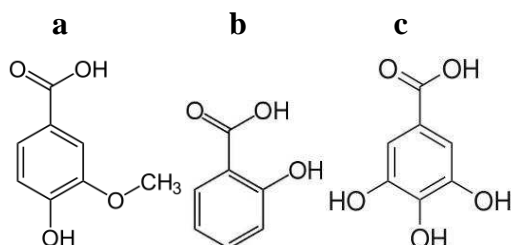


Figura 13. Ácido vanílico (a), salicílico (b) e ácido gálico (c).

Já os derivados do ácido hidroxicinâmicos, são compostos aromáticos que possuem cadeia carbônica formada por 3 carbonos. Esses ácidos são os mais importantes encontrados nas uvas e nos vinhos e se apresentam na forma de monoésteres de tartarato. Dentre os ácidos derivados do hidroxicinâmico, destaca-se o p-coumárico e o ácido ferúlico (Figura 14) (RICE-EVANS et al., 1996).

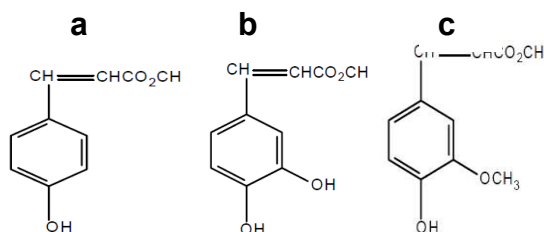


Figura 14. Ácido p-coumárico (a), cafeico (b) e ferúlico (c).

3.1.3.2.2. Estilbenos - Resveratrol

Na classe dos estilbenos encontra-se o resveratrol, uma fitoalexina, que é uma classe de antibióticos naturais produzidos como parte da defesa das plantas quando submetidas a condições de estresse (RODRIGUEZ-DELGADO et al., 2002). O resveratrol é formado por dois anéis benzênicos unidos por uma dupla ligação. Existe em duas isoformas, a trans e a cis-resveratrol, sendo a forma trans a mais estável, e encontrada nas uvas e vinhos tintos. Também podem ocorrer na forma de 3-O-β-D-glicosídeo (Figura 15).

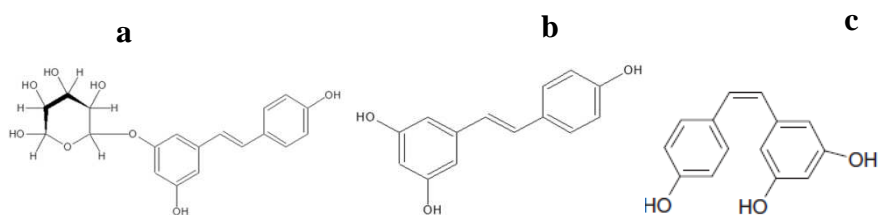


Figura 15. Resveratrol 3-O-D-glicosídeo (a), trans-resveratrol (b) e cis-resveratrol (c).

O trans-resveratrol é o componente do vinho que tem atraído maior atenção nas últimas décadas em decorrência de estudos epidemiológicos que mostram correlação inversa entre o consumo moderado de vinho e a incidência de doenças cardiovasculares. Recentes revisões de estudos pré-clínicos e clínicos sugerem que o resveratrol melhora a função cardio-metabólica através de inúmeros mecanismos (LI et al., 2012; VANG et al., 2011). Por exemplo, o resveratrol reduz a pressão sanguínea diastólica e sistólica e também melhora o controle glicêmico em indivíduos de meia idade com glicemia elevada (BHATT et al., 2012; CRANDALL et al., 2012; TIMMERS et al., 2012). O resveratrol tem apresentado redução nos níveis de triglicerídeos e marcadores inflamatórios em adultos de meia idade com doenças relacionadas a artéria coronária (MILITARU et al., 2013; TOME-CARNEIRO et al., 2012; 2013). O resveratrol exibe ainda atividade antioxidante, anti-inflamatória, e antitumoral (CSISZAR et al., 2009; KUMAR et al., 2013; BOBERMIN et al., 2012; QUINCOZES-SANTOS et al., 2013). Também protege neurônios e astrócitos em vários modelos de doenças neurológicas, tais como epilepsia e derrame, bem como nas doenças de Parkinson e Alzheimer (HUANG et al., 2011; KHAN et al., 2010; SAKATA et al., 2010; WU et al., 2009). Modula importantes funções gliais incluindo o aumento dos níveis de glutamato e de GSH (BOBERMIN et al., 2012; QUINCOZES-SANTOS E GOTTFRIED, 2011; SOUZA et al., 2013). Outras ações do resveratrol incluem os efeitos inibitórios na diferenciação de osteoclastos e seu potencial para induzir a formação óssea (TSENG et al., 2011; LAI et al., 2010). E recentemente o resveratrol demonstrou aliviar sintomas depressivos induzidos por estresse em ratos (OGLE et al., 2013; ACERSON et al., 2013).

3.2. Extratos de compostos fenólicos: oportunidades de mercado e aplicações

A produção de extratos, de compostos biologicamente ativos recuperados de produtos da uva, tem sido apontada como uma oportunidade de negócio promissora que permite às empresas-alvo diferentes mercados. Como exemplo, os compostos fenólicos têm um valor de mercado elevado como nutracêuticos, aditivos alimentares, farmacêuticos e cosméticos, devido à sua atividade biológica (CRESPO e BRAZINHA, 2010). Estudos têm mostrado que os extratos apresentam maior atividade biológica que os compostos purificados, em razão da positiva interação sinérgica entre os diferentes compostos presentes (BASTOS et al., 2009; RIBEIRO, 2012; HUBER et al., 2012).

A crescente consciência da relação entre dieta e saúde converteu extratos naturais em um mercado atraente. Como exemplo, o mercado de alimentos e bebidas ligados à saúde e bem-estar movimentou US\$ 750 bilhões em 2013. Neste universo, a significativa parcela de US\$ 264 bilhões corresponde somente aos produtos funcionais ou fortificados, alimentos e bebidas que contam com ingredientes especiais em suas fórmulas para trazer benefícios para a saúde dos consumidores (SEBRAE, 2014). Esse segmento que desde 2008 cresceu 37,5% representou o maior crescimento dentro da categoria, que cresceu 27,9% no mesmo período. Os dados são da Euromonitor International. A América Latina, sozinha, representa US\$ 45 bilhões ou 17% do mercado de alimentos e bebidas funcionais, sendo o Brasil responsável por movimentar US\$ 14,6 bilhões deste total. A expectativa é de que até 2014 esse mercado cresça mais 39%, e movimente US\$ 21,5 bilhões só no Brasil. Os dados são de uma pesquisa do Euromonitor, que analisou as vendas dos segmentos diet e light, alimentos funcionais, fortificados, orgânicos, naturalmente saudáveis e produtos específicos para algumas intolerâncias alimentares (SEBRAE, 2014).

Esse crescente mercado se deve ao perfil do consumidor que tem se modificado nos últimos anos, e com isso os produtos saudáveis e funcionais têm ganhando cada vez mais espaço na mesa dos brasileiros. Entre os principais motivos que garantiram a alta na venda de produtos saudáveis está a preocupação dos brasileiros em levar uma vida mais saudável; o crescimento do poder aquisitivo da classe média; o aumento na propaganda contra doenças causadas pela má nutrição; avanço científico especializado em alimentos que beneficiem a saúde; além de a população brasileira estar ficando velha e com problemas crescentes de peso (CRESPO e BRAZINHA, 2010). Segundos dados da VIGITEL (BRASIL, 2013), entre 2009 e 2012, a população com sobrepeso com mais de 18 anos de idade, residente nas capitais estaduais brasileiras aumentou de

47% para 51% e a população obesa, aumentou de 14% para 17%. Ou seja, mais da metade da população brasileira tem sobre peso e quase um quinto já é obesa. Estes dados ainda não são tão dramáticos como os relativos à população norte-americana, onde as percentagens de sobrepeso e obesidade em 2012 alcançavam 68% e 35% respectivamente (OGDEN et al., 2014).

Nos Estados Unidos da América estão sendo comercializados produtos derivados da uva com compostos fenólicos concentrados (WIGHTMAN, 1999 a e b). A ingestão de produtos na forma de pó de extrato de antocianina de uva e extrato de uva seca, entre outros, aumentaram os níveis plasmáticos de polifenóis do plasma sanguíneo e diminuíram a peroxidação lipídica (MEYER et al., 1997). A ingestão de 25 a 50 mg de fenol por dia proporcionou menor risco de doenças do coração (JANG et al., 1997).

O desafio continua sendo a produção de extratos com um balanço desejável dos componentes alvo, livre de compostos com atividade prejudicial (pesticidas, metais pesados, resíduos de solventes orgânicos). Esse balanço só será alcançado se solventes biocompatíveis são utilizados e as condições do processo (ou seja, temperatura) não levam a uma perda da atividade biológica dos compostos-alvo (CRESPO e BRAZINHA, 2010).

Diferentes sistemas de solvente têm sido utilizados para a extração de polifenóis de matérias vegetais (CHAVAN et al., 2001). O rendimento da extração é dependente do solvente e do método empregado (GOLI et al., 2005), que deve permitir a extração completa dos compostos de interesse e evitar modificações químicas desses compostos (SUN e HO, 2005).

3.3. Técnicas de extração de compostos fenólicos

3.3.1. Técnicas de extração convencionais (extração por solvente)

Compostos bioativos de materiais vegetais podem ser extraídos por técnicas clássicas de extração. A maioria dessas técnicas é baseada no poder de extração de diferentes solventes utilizados e a aplicação de calor e/ou maceração (AZMIR et al., 2013).

De forma geral, os métodos convencionais de extração de compostos fenólicos se baseiam na difusão dos compostos de uma matriz sólida (amostra de alimento) utilizando uma matriz líquida (solvente). O processo pode ser dividido em dois estágios: 1) Estágio inicial: Tumefação das partículas ou dos fragmentos sólidos devido à sorção

do solvente na fase sólida. Essa sorção é causada por forças osmóticas, por capilaridade e por solvatação dos íons celulares. Neste estágio, certa porcentagem de polifenóis nas células danificadas por cortes e congelamentos prévios é extraída diretamente por lavagem. Ao mesmo tempo, os componentes solúveis são dissolvidos. Em algumas extrações pode ocorrer uma solubilização por hidrólises de uma fração naturalmente insolúvel (AZMIR *et al.*, 2013).

2) Estágio de difusão: A difusão ocorre em duas etapas; uma etapa interna dentro da fase sólida e outra etapa externa através de camadas externas que envolvem as partículas ou os fragmentos sólidos (AZMIR *et al.*, 2013).

Na ELL para extrair compostos fenólicos do vinho, o procedimento normalmente envolve a extração com solvente orgânico (acetato de etila, metanol, etc) em ultra turrax (3 minutos), sendo o processo repetido de 2 a 3 vezes, utilizando um total de aproximadamente 100 mL do solvente. A fase orgânica é separada em funil de separação e evaporada em rota vapor, com temperaturas variando de 28 a 50°C, por 15 a 60 minutos. O resíduo é recuperado em solução de metanol e água (1:1 v/v) até o volume final, que pode variar de 2 a 5 mL (LUCENA *et al.*, 2010; NAVE *et al.*, 2007).

Segundo Cowan, (1999) a eficiência da extração depende principalmente da escolha do solvente. A polaridade do composto alvo é o fator mais importante nessa decisão. Afinidade molecular entre solvente e soluto, transferência de massa, utilização de co-solvente, segurança ambiental, toxicidade para humanos e viabilidade financeira também devem ser considerados na seleção do solvente para extração de compostos bioativos. Metanol e misturas de metanol/água são os solventes mais utilizados para extração de substâncias fenólicas (TSAO, 2010; NOUR *et al.*, 2014). Outros solventes tais como acetona, acetato de etila e misturas de solventes também têm sido utilizados, mas geralmente promovem baixo rendimento. A adição de água ao solvente contribui para criar um meio moderadamente polar, favorecendo a extração de polifenóis (LAPORNIK *et al.*, 2005; LIYANA-PATHIRANA e SHAHIDI, 2005). A presença de um ácido no solvente de extração melhora a degradação do material vegetal e aumenta a taxa de extração de polifenóis da matrix. Além do mais, a acidez do solvente de extração também pode afetar a composição química dos extratos (VIZZOTO e PEREIRA, 2011). De acordo com a literatura, concentrações (1-2 mol.L⁻¹) de ácidos minerais causa hidrólises de flavonóides glicosídeos, enquanto alguns compostos fenólicos lábeis presentes no mesmo material podem ser degradados sob tais condições severas (HAKKINEN *et al.*, 1998).

Além da natureza do solvente, outros fatores também contribuem para a eficiência da extração dos métodos convencionais, sendo eles (XU e CHANG, 2007):

- Temperatura: elevadas temperaturas aumentam a eficiência da extração desde que o calor torne as paredes celulares permeáveis, aumente os coeficientes de solubilidade e a difusão dos compostos a serem extraídos e diminua a viscosidade dos solventes, facilitando dessa forma, a passagem do solvente através da massa do substrato sólido e o processo subsequente de separação (filtração ou sedimentação). No entanto, temperaturas extremas podem degradar os compostos fenólicos.

- Número de etapas da extração e volume de solvente: a eficiência da extração aumenta de acordo com o número de etapas da extração. Neste caso, é mais eficiente, por exemplo, realizar quatro extrações com 50 mL de solvente do que uma única extração com 200 mL. Rendimentos quantitativos são obtidos somente quando 3 a 5 extrações sequenciais da amostra original são realizadas.

- Tempo: longos tempos de extração em elevadas temperaturas podem oxidar os compostos fenólicos da amostra. Entretanto, curtos períodos de extração podem não ser suficientes para a completa transferência dos solutos para a fase orgânica.

- Tamanho das partículas das amostras: em geral, a taxa de extração aumenta com diminuição do tamanho de partícula da matriz sólida, uma vez que ocorre um aumento da área disponível para a transferência de massa (PEREIRA e MEIRELES, 2010).

- Proporção amostra-solvente: quanto menor a proporção amostra-solvente, maior a transferência de massa que ocorre entre a amostra e o solvente, portanto.

- Força iônica: o aumento da força iônica da fase aquosa acarreta na diminuição da solubilidade de inúmeros compostos covalentes, o que favorece a solubilização dos compostos na fase orgânica.

Os maiores desafios da extração convencional são os longos tempos de análises, requerimento de solventes de elevado grau de pureza, e muitas vezes tóxicos, evaporação de grande quantidade do solvente, baixa seletividade da extração, além do emprego de temperaturas elevadas e exposição à luz e ao oxigênio o que possibilita a ocorrência de degradações, comprometendo a qualidade e o rendimento final do extrato (ASPÉ e FERNÁNDEZ, 2011). Além do potencial para poluição ambiental devido ao grande volume de solventes utilizados (SANTOS et al., 2010; GARCIA-SALES *et al.*, 2010). Entretanto, é a técnica mais empregada na extração de compostos fenólicos

devido principalmente a sua simplicidade e relativo baixo custo, uma vez que não necessita de uma instrumentação complexa e de custo elevado (AZIMIR et al., 2013).

Para superar as limitações dos métodos de extração convencionais, novas e promissoras técnicas foram introduzidas. Estas técnicas são referidas como técnicas de extração não convencionais. Algumas das mais promissoras são: extração assistida por ultrassom, extração assistida por enzimas, extração assistida por micro-ondas, extração assistida por campo elétrico pulsátil, extração por fluido pressurizado e extração por fluido supercrítico (SÃO JOSÉ et al., 2014; MAJD et al., 2014). São técnicas mais sensíveis, seletivas e rápidas. Algumas dessas técnicas são consideradas “técnicas limpas”, por serem menos poluidoras do que as técnicas convencionais, além de buscarem a síntese de produtos químicos menos nocivos e mais seguros, utilização de matéria-prima renovável, redução dos derivados, projetos de eficiência energética e redução do tempo de análise (SUN et al., 2012).

3.3.2. Técnicas de extração não convencional

3.3.2.1. Extração assistida por ultrassom – EAU

O ultrassom é uma onda sonora, estabelecida de 20 kHz a 100 MHz, que se propaga em um meio pelo processo de compressão e expansão (PIYASENA et al., 2003). Esse processo gera o fenômeno chamado de cavitação, que significa crescimento e colapso de bolhas. Uma grande quantidade de energia pode ser produzida a partir da conversão da energia cinética do movimento, que irá aquecer o conteúdo das bolhas (KENTISH E ASHOKKUMAR, 2011; COSTA et al., 2013). O colapso das bolhas pode produzir efeitos mecânicos, químicos e físicos, que resulta na ruptura das membranas biológicas facilitando a liberação dos compostos, além de intensificar a penetração do solvente no material celular, aumentando a transferência de massa (CARCEL et al., 2012; COSTA et al., 2013). De acordo com São José et al., (2014), as bolhas podem ter temperatura em torno dos 5500 K, pressão de 1000 MPa.

Somente líquidos puros e líquidos contendo material sólido possuem efeito de cavitação. Nesse método, a amostra macerada é misturada com solventes adequados e colocada no banho ultrassônico, onde a temperatura e o tempo de extração são ajustados (HERRERA e LUQUE DE CASTRO, 2005). O mecanismo conhecido consiste na intensificação da transferência de massa pelo ultrassom, o que acelera o acesso do solvente ao material celular das diferentes partes do vegetal. O mecanismo de extração por ultrassom envolve dois tipos principais de fenômenos físicos: (a) a difusão através

da parede celular e (b) enxague do conteúdo da célula depois da quebra das paredes (TURNE, 2011).

Os fatores mais importantes que podem influenciar no processo de extração são: teor de umidade, tamanho das partículas da amostra, assim como o solvente empregado. Temperatura, pressão, frequência e tempo de sonicação são os fatores controladores do processo de extração por ultrassom (AZMIR et al., 2013).

A EAU também pode ser incorporada a várias técnicas clássicas de extração para aumentar a eficiência de um sistema convencional (JOYCE et al., 2003). A EAU tem sido utilizada na extração de compostos fenólicos de diferentes partes da planta tais como folhas (AHMAD-QASEM et al., 2013), frutas (WANG e ZUO, 2011), sementes (CAI et al., 2011), cereais (IZADIFAR, 2013) e bebidas (ROSTAGNO et al., 2011). Carrera et al., (2012) desenvolveram um método de extração assistida por ultrassom para determinar compostos fenólicos em uvas. As seguintes variáveis de extração foram avaliadas: temperatura de extração, amplitude e duração dos ciclos, quantidades de amostras e tempo total de extração. O método de extração convencional foi utilizado como referência. O método proposto apresentou teores de fenóis totais, antocianinas totais e taninos totais, semelhantes ou superiores ao método de referência. Entretanto, um tempo de extração muito menor foi necessário: 6 minutos para o EAU e 60 minutos para o método de referência. Aybastier et al., (2013) otimizaram por meio da metodologia de superfície de resposta, condições experimentais para a EAU de compostos fenólicos de folhas de amora. Nas condições otimizadas (concentração de HCl = 0,41M; concentração de metanol = 61% (v/v); temperatura de extração = 66°C; e tempo de extração de 105 minutos) os compostos fenólicos presentes nas folhas da amora exibiram significativa atividade antioxidante. Foram identificados os ácidos elágico, cafeico, clorogênico, além da quercetina, miricetina e kaempferol. Khan et al., (2010) otimizaram a extração de compostos fenólicos, especialmente flavonas de peles de laranja, utilizando a EAU. As condições otimizadas foram: temperatura de 40°C; potencia do ultrassom = 150 W, e proporção de etanol:água = 4:1 (v/v). O teor de fenóis totais foi igual a 275,8 mg EAG/100g, concentração de flavanona igual a 70,3 mg de naringina e 275,8 mg de hesperidina/100g.

As vantagens da EAU incluem reduzido tempo de extração e quantidades reduzidas de solventes orgânicos e energia. Além de: extração seletiva, não requer instrumentação complexa, relativo baixo custo, aumento do rendimento da extração,

eliminação das etapas do processo e gradientes térmicos e temperaturas de extração reduzidos (CHEMAT et al., 20011; TAO et al., 2013).

3.3.2.2.Extração por campo elétrico pulsátil – EEP

A aplicação do campo elétrico pulsátil foi reconhecida como útil para melhorar os processos de prensagem, secagem, extração, e difusão durante as últimas décadas (VOROBIEV et al., 2005; VOROBIEV e LEBOYKA, 2006; DONSI et al., 2010). O princípio da EEP consiste em destruir a estrutura da membrana celular para aumentar a extração dos compostos intracelulares da seguinte forma: durante a suspensão de células vivas no campo elétrico, um potencial elétrico passa através da membrana das células. Baseado na natureza dipolo das moléculas da membrana, o potencial elétrico separa as moléculas de acordo com as cargas da membrana celular. Depois de exceder um valor crítico de aproximadamente 1 V de potencial transmembrana, ocorre repulsão entre as moléculas carregadas o que leva a formação de poros em áreas mais fragilizadas da membrana, causando aumento drástico da permeabilidade (BRYANT e WOLFE, 1987; PUERTOLAS et al., 2013).

A eficácia da EEP depende estritamente dos parâmetros do processo, incluindo a intensidade do campo, entrada de energia específica, número de pulsos, temperatura de tratamento e as propriedades dos materiais a serem tratados (HEINZ et al., 2003).

A EEP é aplicada para melhorar a liberação de compostos intracelulares dos tecidos vegetais através do aumento da permeabilidade da membrana celular (PUERTOLAS et al., 2012; DONSI et al., 2010; KNORR et al., 2011). Uma das principais vantagens da EEP é o fato de ser um tratamento não-térmico que não afeta a qualidade dos extratos produzidos (TOEPFL e HEINZ, 2011).

A EEP também é aplicável em materiais vegetais como um pré-tratamento antes da extração convencional, ou de outros métodos de extração, com objetivo de diminuir o tempo, temperatura e quantidade de solventes utilizados na extração (JAEGER et al., 2012).

Alguns exemplos de aplicação em diferentes matérias-primas: Luengo et al., (2013) avaliaram a influencia da EEP na extração por pressão de compostos fenólicos da pele da laranja. O tratamento com EEP a 5 kV/cm aumentou a quantidade extraída de naringina e hesperidina no extrato de 100 g de pele de laranja, de 1,0 para 3,1 mg/100 g de matéria fresca e de 1,3 para 4,6 mg/100g de matéria fresca, respectivamente. Puertolas et al., (2013) investigaram a influencia do tratamento com

EEP no rendimento da extração de antocianinas de batata da polpa roxa, em diferentes tempos e temperaturas de extração, além da utilização de etanol ou água como solventes. O tratamento com EEP aumentou o rendimento da extração de antocianinas (65,8 mg/100g de matéria seca), sendo o efeito maior em temperaturas baixas de extração e quando se utilizava a água como solvente. Dessa forma, é possível a aplicação da EPP com água, que é um solvente não poluente, sem diminuir o rendimento da extração. Boussetta et al., (2014) estudaram o efeito de diferentes parâmetros de operação da EEP para obter extratos com elevados teores de polifenóis de cascas de linhaça. O tratamento EEP permitiu a extração de mais de 80% de polifenóis quando foi aplicado um campo igual a 20 kV/cm por 10 ms. Para campos elétricos inferiores, a eficiência da extração foi menor. A reidratação da amostra antes da aplicação da EPP melhorou a eficiência do tratamento, assim como a adição de etanol, ácido cítrico e hidróxido de sódio.

3.3.2.3. Extração assistida por enzimas – EAE

Alguns compostos fitoquímicos das matrizes vegetais estão dispersos no citoplasma da célula e outros compostos estão retidos na rede de lignina-polissacarídeos (por ligações de hidrogênio ou ligações hidrofóbicas) da parede vegetal, não sendo acessíveis aos solventes empregados em processos de extração convencionais (AZMIR et al., 2013). O tratamento pré-enzimático é considerado um caminho efetivo para liberar os compostos e aumentar o rendimento global da extração, além de reduzir a quantidade de solvente necessária para a extração (PURI et al., 2011; 2012). A adição de enzimas específicas como celulase, α -amilase, e pectinases durante a extração, melhora a recuperação através da ruptura da parede celular e hidrólise dos polissacarídeos e lipídeos (JORDAN et al., 2012; SOWBHAGYA et al., 2010). A seleção da enzima requer o conhecimento do tecido vegetal a ser processado. Tendo em vista que a parede celular é composta de diferentes polissacarídeos ligados a uma proteína estrutural, o extrato enzimático deve conter enzimas com diferentes atividades (celulases, hemicelulases, pectinases, amilases e proteases) (JORDAN et al., 2012). Misturas de enzimas e complexos com atividade múltipla são mais eficientes que as enzimas isoladas (SINERO et al., 1998).

A concentração da enzima também é um fator importante no processo. Quando se aumenta a concentração de enzima aumenta-se o rendimento da extração, porém

compromete-se a viabilidade econômica do processo, uma vez que o custo da enzima ainda é um fator limitante desta tecnologia (LAROZE et al., 2010).

Além da escolha mais adequada do tipo e da concentração da enzima a ser utilizada, deve-se considerar alguns parâmetros como pH, temperatura, tamanho das partículas, agitação, proporção sólido/líquido e tempo de hidrólise pois as condições utilizadas no processo influenciam o rendimento da extração (XU et al., 2014). A EAE é reconhecida como uma tecnologia limpa para extração de óleos e compostos bioativos devido à utilização de água como solvente (PURI et al., 2012).

A aplicação da EAE para liberação de compostos fenólicos da parede vegetal é descrita na literatura. Miron et al., (2013) compararam a EAE com a extração convencional de compostos fenólicos da erva-cidreira. Celulase, pectinase e endo- β -1,4-xilanase foram utilizadas para degradar a parede celular e liberar os compostos fenólicos. Os resultados demonstraram que a EAE apresentou extratos com maiores teores de fenóis totais e atividade antioxidante em comparação ao método tradicional. Entre os compostos identificados destacaram-se o ác. rosmarínico e derivados, e o ácido cafeico. Xu et al., (2014) utilizaram a EAE na extração de compostos fenólicos de cascas e sementes de uva. Segundo os autores, a EAE diminuiu o tempo de extração e modificou a forma dos polifenóis associados ao ácido gálico, para fenólicos de baixo peso molecular, liberando os fenólicos ácidos (principalmente o ácido gálico), e aumentando a atividade antioxidante. Lazore et al., (2010) avaliaram o efeito da hidrólise enzimática na extração de fenólicos antioxidantes dos resíduos derivados do processamento da framboesa. Foram empregadas as enzimas celulase, hemicelulase e pectinase que elevaram o teor de fenólicos extraídos em mais de 35%, assim como a atividade antioxidante em até 50%, quando comparados com o método tradicional de extração com solvente.

3.3.2.4. Extração por fluido supercrítico – EFS

A aplicação de fluido supercrítico para o propósito de extração começou a partir de sua descoberta por Hannay e Hogarth (1879), mas foi Zosel quem apresentou a primeira patente para a descafeinização do café utilizando EFS (ZOSEL, 1964). Desde o seu começo, a técnica de fluido supercrítico tem atraído grande interesse científico e foi utilizado de forma bem sucedida em aplicações farmacêuticas, ambientais e na análise de alimentos (ZOUAGH et al., 2004).

Toda substância terrestre possui três estados físicos básicos nomeados; sólido, líquido e gasoso. O estado supercrítico é um estado distinto e pode somente ser atingido se uma substância é sujeita a temperatura e pressão além do seu ponto crítico. Ponto crítico é definido como temperaturas (T_c) e pressões (P_c) acima do qual a distinção fases gasosa e líquida não existem (INCZEDY et al., 1998). Portanto, o estado supercrítico de fluidos pode ser definido como o estado no qual líquido e gás são indistinguíveis entre si (MENDIOLA et al., 2007).

Os fluidos supercríticos possuem propriedades de difusão, viscosidade e tensão superficial semelhante a dos gases, no entanto, possuem densidade e poder de solvatação semelhante ao dos líquido, permitindo uma melhor penetração do solvente na matriz da amostra (HERRERO et al., 2013). Estas propriedades fazem com que os fluidos supercríticos sejam adequados para extração de compostos em curto tempo, com grande rendimento e baixo consumo de solventes orgânicos (TURNER et al., 2011).

O dióxido de carbono é considerado um solvente ideal para a EFS. A temperatura crítica do CO_2 (31°C) é próxima à temperatura ambiente, e a baixa pressão crítica (74 bars) oferece a possibilidade de operar a moderadas pressões, normalmente entre 100 e 450 bar (SÁNCHEZ-VICENTE et al., 2009; HERRERO et al., 2013). O único inconveniente do dióxido de carbono é sua baixa polaridade que o torna ideal para extração de lipídios e substâncias não polares, mas inadequado para a maioria dos compostos fenólicos. Tal fato é superado com a adição de modificadores químicos, também conhecidos como co-solventes (GHAFOR et al., 2010; HERRERO et al., 2013). Algumas substâncias, como o metanol e o etanol, podem ser utilizadas em pequenas quantidades como co-solventes, melhorando o rendimento e a seletividade dos extratos (POKORNY e KORCZAK, 2001; HERRERO et al., 2013). As propriedades das amostras e dos compostos alvos e os resultados de experimentos prévios são a base principal para a seleção do melhor modificador (AZMIR et al., 2013).

Um sistema básico de EFS (Figura 16) consiste dos seguintes componentes: um tanque de fase móvel, geralmente CO_2 , uma bomba de pressurização do gás, recipiente e bomba para o co-solvente, um forno que contém o recipiente de extração, um controlador para manter a pressão elevada dentro do sistema e uma câmara de separação. Geralmente, diferentes tipos de medidores como o medidor de fluxo e medidor de gás seco/úmido podem ser anexados ao sistema. O CO_2 pressurizado, no estado líquido é fornecido através do compressor, passando então por um pré-aquecedor, onde sua temperatura é elevada, ocorrendo assim a sua passagem do estado

líquido para o estado supercrítico. O CO₂ supercrítico, à medida que flui no sistema, passa pela matriz sólida localizada na câmara de extração. Em seguida, a mistura soluto-solvente é submetida à expansão ao passar pela válvula de expansão. À pressão e temperatura reduzidas o extrato precipita no frasco coletor (CASSEL et al., 2007; ROSA et al., 2009).

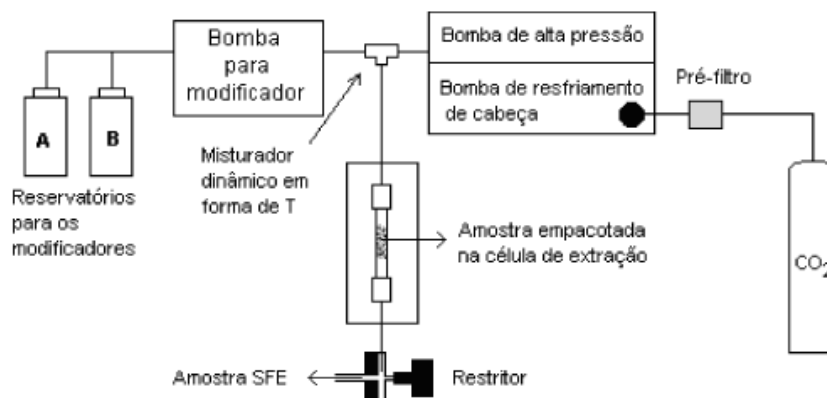


Figura 16. Diagrama esquemático de um sistema de extração em fluido supercrítico.

A eficiência da extração de compostos fenólicos por EFS depende de vários parâmetros, que podem ser ajustáveis (RAVERCHON e MARCO, 2006). Esses parâmetros necessitam ser precisamente controlados para maximizar os benefícios desta técnica. Segundo alguns autores (ROSA et al., 2009; PEREIRA e MEIRELES, 2010; IBANEZ et al., 2012; DE MELO et al., 2014; HERRERO et al., 2013; CAVALCANTI e MEIRELES, 2012) os principais parâmetros que influenciam a eficiência da extração são:

- Densidade: é a propriedade responsável pela capacidade solvente dos fluidos supercríticos, sendo alterada por mudanças na pressão e temperatura do sistema;
- Pressão: em geral, um aumento na pressão a temperatura constante causa um aumento na densidade do fluido supercrítico, elevando o seu poder solvente;
- Temperatura: a pressão constante, um aumento na temperatura leva a uma diminuição na densidade do solvente supercrítico, e influencia também na pressão de vapor e na energia cinética das moléculas do soluto;
- Vazão do solvente: geralmente, um aumento na vazão do solvente supercrítico causa um aumento na capacidade de extração;
- Proporção e tipo de modificador: proporção e tipo de solvente também são fatores chaves responsáveis pela solubilidade do composto alvo na extração

supercrítica. Nesse sentido, os modificadores orgânicos mais comumente empregados para extrair compostos bioativos são etanol numa faixa de 5 a 10% do fluxo de CO₂;

- Propriedades do soluto: em geral, quanto menor a massa molecular, a polaridade e a pressão de vapor do soluto, maior será sua solubilidade no CO₂ supercrítico);

- Tamanho de partícula da amostra: em geral, o rendimento da extração aumenta com diminuição do tamanho de partícula da matriz sólida, uma vez que ocorre um aumento da área disponível para a transferência de massa;

- Umidade da amostra: na maioria dos casos, a água presente na amostra compete com o soluto para interagir com o solvente, diminuindo assim o rendimento do processo. No entanto, em alguns casos, a presença da água é necessária para permitir a interação do solvente com o soluto, como na extração da cafeína de grãos de café verde.

As vantagens da utilização de fluidos supercríticos para extração de compostos fenólicos podem ser compreendidas considerando os seguintes pontos descritos por Lang e Wai, (2001), Nyam et al., (2010), Machida et al., (2011) e Xynos et al., (2012):

1) O fluido supercrítico possui um elevado coeficiente de difusão e menor viscosidade e tensão superficial do que um solvente líquido, promovendo uma maior penetração na matriz da amostra e favorecendo a transferência de massa. Dessa forma, o tempo de extração pode ser reduzido substancialmente por EFS em comparação com os métodos convencionais;

2) O refluxo repetitivo do fluido supercrítico nas amostras promove uma extração completa;

3) A seletividade dos fluidos supercríticos é maior do que dos solventes líquidos uma vez que seu poder de solvatação pode ser modificado por alteração da temperatura e/ou pressão;

4) A EFS é operada em temperatura ambiente, sendo um método ideal para extração de compostos termo sensíveis;

5) Na EFS, pequena quantidade de amostra pode ser extraída, o que economiza tempo em todas as etapas do experimento;

6) A EFS utiliza pequena quantidade de solvente orgânico sendo considerado uma tecnologia limpa. Além disso, o CO₂ é um substrato inerte, não inflamável, que não agride o ambiente, geralmente considerado seguro, e que ao término do processo é volatilizado;

7) É possível o acoplamento “on-line” da EFS com processos cromatográficos, permitindo uma melhor análise de compostos com alta volatilidade;

8) A reciclagem e reutilização do fluido supercrítico é possível e dessa forma minimiza o desperdício;

9) O processo de EFS prove informações sobre processos e mecanismos de extração que podem ser manipulados para otimizar o processo de extração.

O grande inconveniente da extração supercrítica reside na alta pressão necessária para a operação, o que requer equipamentos excessivamente caros, elevando o custo do produto final (DAI e MUMPER, 2010).

A EFS tem sido empregada em diferentes matérias-primas: Veggi et al., (2014) extraíram compostos fenólicos de casca de jatobá utilizando CO₂ supercrítico e diferentes co-solventes (água e etanol). A extração utilizando água como co-solvente apresentou os melhores resultados, com maior teor de fenólicos totais extraídos (335,0 mg EAG/g extrato), atividade antioxidante e teor de taninos igual a 1,8 g/100 g de matéria seca. Espinosa-Pardo et al., (2014) aplicaram a extração por CO₂ supercrítico, com etanol como co-solvente, para extrair compostos fenólicos do bagaço de uva. A extração com CO₂ supercrítico obteve extratos com maior teor de compostos fenólicos, em relação ao extrato obtido pelo método convencional. Os compostos identificados nos extratos foram os ácidos gálico, siríngico, protocateico, valínico, p-hidroxibenzóico e p-cumárico, bem como a quercetina. Castro-Vargas et al., (2010) avaliaram a extração de compostos fenólicos em sementes de goiaba por CO₂ supercrítico, testando dois diferentes co-solventes (etanol e acetato de etila). O potencial antioxidante indicou que a utilização de etanol como co-solvente foi o melhor modificador. A qualidade dos extratos obtidos com etanol como co-solvente variou com as condições de operações da temperatura e pressão, com os maiores teores obtidos a 10 e 20 Mpa para fenóis totais e atividade antioxidante.

3.3.2.5. Extração por líquido pressurizado – ELP

Em 1996, Richter e colaboradores descreveram pela primeira vez a extração por líquido pressurizado. Esse método é conhecido hoje por vários nomes: extração por fluido pressurizado (EFP), extração por fluido acelerado (EFA), extração por solvente aprimorado (ESA) e extração por solvente em elevadas pressões (ESEP) (NIETO et al., 2010). O conceito da ELP consiste na aplicação de elevada pressão para manter o solvente líquido além do seu ponto de ebulição normal (HERRERO et al., 2013). A

elevada temperatura de extração aumenta a solubilidade dos analitos por aumentar tanto a solubilidade quanto a taxa de transferência de massa e, também diminui a viscosidade e a tensão superficial dos solventes, melhorando o rendimento da extração (IBANEZ et al., 2012). A técnica da ELP requer pequenas quantidades de solventes devido a combinação de elevadas pressões e temperaturas que promovem uma rápida extração.

Em comparação a tradicional extração por Soxhlet, a ELP diminui de forma considerável o consumo de tempo e o uso de solventes (PETERSON et al., 2010; HERRERO et al., 2013). A aplicação das técnicas da ELP para obtenção de compostos fenólicos é frequentemente descritas na literatura. Oliveira et al., (2014) aplicaram a ELP, utilizando etanol, na análise compostos fenólicos em pitangas. Após a extração a quantificação e identificação realizadas por CLAE-MS, foram identificados os seguintes compostos: ácido elágico, quercetina e kaempferol. Já Santos et al., (2012) otimizaram a extração de compostos fenólicos de casca de jabuticaba, através da ELP, utilizando etanol como solvente. Nas condições otimizadas o teor de antocianinas e outros compostos fenólicos foi duas vezes superior ao determinado pela extração convencional. Barros et al., (2013) compararam a extração de fenóis totais e a atividade antioxidante de grãos de sorgo utilizando a ELP com mistura de etanol e água, com a extração convencional com metanol acidificado. Apesar de o teor de fenóis totais extraído pelos dois métodos ter sido o mesmo (45 mg EAG/L), a atividade antioxidante foi 12% superior no extrato obtido pela ELP, em relação ao método convencional. A ELP é também útil para a extração de poluentes orgânicos de matrizes ambientais que são estáveis a altas temperaturas (WANG e WELLER, 2006).

A EFP é realizada tanto na ausência de luz quanto de ar, sendo os processos de degradação e oxidação reduzidos significativamente em comparação com outras técnicas de extração (GARCIA-SALES et al., 2010). Adicionalmente, devido a quantidade pequena de solventes orgânicos utilizados na ELP, esta metodologia tem sido amplamente reconhecida com uma “técnica limpa” de extração (IBANEZ et al., 2012; HERRERO et al., 2013).

Entretanto, devido à aplicação de elevadas pressões, os requerimentos de instrumentação são altos e os custos desses métodos em escala industrial são elevados, o que frequentemente diminui os benefícios das técnicas (DAI e MUMPER, 2010).

3.3.2.6. Extração assistida por micro-ondas – EAM

A extração assistida por micro-ondas é um processo que utiliza a energia da micro-onda para facilitar a partição dos analítos da matriz da amostra para o solvente. (PARE et al., 1994). Micro-ondas são campos eletromagnéticos em frequência variando de 300 MHz a 300 GHz. São compostas de dois campos oscilantes perpendiculares, o campo elétrico e o campo magnético. O princípio do aquecimento utilizando micro-ondas é baseado no seu impacto direto em materiais polares (KUBRAKOVA E TOROPCHENOVA, 2008). A energia eletromagnética é convertida em calor seguindo condução iônica e mecanismos de rotação dipolo (JAIN, 2009). Durante o mecanismo de condução iônica é gerado calor devido à resistência do meio ao fluxo dos íons. Por outro lado, os íons mantem sua direção ao longo de sinais do campo que mudam frequentemente. Estas frequentes mudanças de direções resultam em colisões entre moléculas e conseqüentemente geram calor. Supõe-se que o mecanismo da extração por micro-ondas envolve três passos sequenciais descritos por Alupului (2012): primeiro, a separação dos solutos dos locais ativos da matriz da amostra sob temperatura e pressão elevadas; segundo, difusão do solvente através da matriz da amostra; terceiro, a liberação dos solutos da matriz da amostra para o solvente.

Assim como ocorre com os sistemas EFS e ELP, a EAM torna possível realizar extrações na ausência de luz. Compostos fenólicos são muito sensíveis a esse fator, dando a esta técnica uma grande vantagem. A principal vantagem da EAM é a possibilidade de várias amostras serem extraídas simultaneamente de forma mais rápida do que a extração com Soxhlet, e com recuperações similares as alcançadas por EFS (GARCIA-SALES et al., 2010; ROUTRAY e ORSAT, 2012). Além do mais, os curtos tempos de extração que essas técnicas apresentam (menos de uma hora) reduzem os efeitos adversos da atividade enzimática (DAI e MUMPER, 2010; ROUTRAY e ORSAT, 2012). A EAM é também reconhecida como uma “técnica limpa” devido a utilização reduzida de solventes orgânicos (ALUPULUI, 2012). Entretanto, é necessário cuidado ao utilizar solventes inflamáveis ou no caso de amostras que contenham constituintes que absorvam fortemente a radiação micro-ondas causando uma rápida elevação da temperatura e dessa forma levar a situações potencialmente perigosas (PALENZUELA et al., 2004).

Os principais fatores comuns que afetam o processo de extração são propriedades da matriz, solvente, temperatura, pressão e tempo de análises (HERNANDEZ et al., 2009).

A EAM tem sido utilizada em diferentes matérias-primas. Routray e Orsat (2014) compraram a extração de compostos fenólicos de mirtilo pela EAM com a extração convencional por solvente e com a EAU. Os resultados mostraram teores muito maiores de fenóis totais para o extrato obtido por EAM (128,76 mg EAG/g de matéria seca), quando comparado com a extração convencional (89,16 mg EAG/g matéria seca) e com a EAU (97,77 mg EAG/g matéria seca). Rahim et al., (2014) aplicaram a EAM na extração de catequinas e cafeína em três tipos de chá: verde, preto e oolong. Os resultados demonstraram teores relativamente elevados de cafeína no chá preto, mas teores elevados de catequina, especialmente epigallocatequina galato foram encontrados no chá verde. Ballard et al., (2010) otimizaram a EAM para a extração de compostos fenólicos antioxidantes da casca de amendoim. Nas condições otimizadas (90% de potencia da micro-onda, 30 segundos de tempo de irradiação e 1,5 g de casca) o teor máximo de fenóis totais obtido foi 143,6 mg EAG/g de casca. O resveratrol também foi identificado por LC-MS-MS.

3.4. Técnicas de purificação e separação de compostos fenólicos

O isolamento e a purificação dos flavonóides individuais são sempre requeridos, porque as estruturas são desconhecidas ou não estão comercialmente disponíveis. O material puro pode ser também necessário para atividades de mensuramento, por exemplo, atividade antioxidante ou anticarcinogênica, ou para estudos de biodisponibilidade em animais, humanos ou em cultura de células (WOLLGAST e ANKLAM, 2000). As técnicas mais frequentemente aplicadas para isolar e/ou purificar esses compostos são brevemente descritos nas subseções que seguem.

3.4.1. Extração em fase sólida - SPE

A extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction, SPE*) é uma técnica utilizada nos processos de pré-concentração e separação de espécies químicas inorgânicas e orgânicas presentes em solução aquosa, utilizando um material sólido extrator (FRITZ, 1999). Segundo Wang et al., (2010) é uma técnica muito utilizada na purificação de compostos fenólicos, geralmente utilizando os cartuchos C18, constituídas de sílica funcionalizada com grupos octadecilsilano, e Sephadex LH-20, constituído de um gel de ligações cruzadas de dextrose hidroxipropilada. Essa fase possui caráter tanto hidrofílico, quanto lipofílico o que permite empregar uma grande variedade de solventes

orgânicos na eluição dos compostos de interesses de diferentes amostras (DAI e MUMPER, 2010).

A frequente utilização dessa técnica se deve à simplicidade relativa para eliminação das impurezas, tais como substâncias polares e não fenólicas. O procedimento para purificação dos compostos fenólicos envolve a aplicação do extrato fenólico bruto no cartucho contendo o material sorvente, seguido da eluição dos componentes individuais com solventes apropriados. Os compostos fenólicos ficam fortemente ligadas aos adsorventes por seus grupos hidroxil não-substituídos. Desta forma, primeiramente são eluídas as substâncias mais polares tais como açúcares, ácidos e substâncias solúveis, e posteriormente são eluídos os compostos fenólicos (RIJKE et al., 2006; COSTA et al., 2000 e MOLNÁR-PERL, et al., 2005).

3.4.2. Hidrólise ácida e alcalina

Hidrólises ácidas e/ou alcalinas são muitas vezes necessárias devido ao fato de que os fenólicos insolúveis, como os fenólicos ácidos, encontram-se ligados a estruturas da parede celular, esterificados com arabinose ou resíduos de galactose dos componentes pécnicos ou hemicelulósicos (RIVELLI et al., 2011). A hidrólise ácida ou alcalina, geralmente realizada utilizando ácido clorídrico e hidróxido de sódio, respectivamente, são recomendadas para facilitar a extração dos compostos ligados. O tratamento ácido hidrolisa as ligações glicosídicas e solubiliza os açúcares, mas geralmente deixa intacta as ligações ésters (FAZARY & JU, 2007). A hidrólise alcalina quebra a ligação éster que liga os fenólicos ácidos a parede celular (ACOSTA-ESTRADA et al., 2014). No entanto, é necessário cuidado com o tempo e a temperatura do tratamento, caso contrário pode ocorrer perda de até 50% dos compostos fenólicos (VERMA et al., 2009; MOUSSA-AYOUB et al., 2011).

3.4.3. Cromatografia contracorrente de alta velocidade - CCAV

A CCAV é descrita como um processo de separação no qual uma fase líquida é retida no espiral da coluna por força centrífuga, enquanto uma segunda fase líquida imiscível passa continuamente por ela (ITO, 1981). Por se tratar de uma técnica de suporte-livre líquido-líquido, a retenção dos solutos é determinada exclusivamente por seus coeficientes de partição, e o problema de adsorção dos solutos na fase estacionária é eliminado (GRACE et al., 2014). Segundo alguns autores (SUTHERLAND e FISH,

2009; DU et al., 2010; ZANATTA et al., 2005, WEI e GU, 2013) as maiores vantagens desta técnica de separação quando comparadas com a cromatografia em coluna são as menores quantidades de fase móvel requeridas, a não adsorção dos analitos (compostos fenólicos) na fase estacionária e a completa recuperação da amostra. Além de permitir a introdução de extratos brutos diretamente na coluna, a instrumentação ser de baixo custo e os reagentes químicos de grau analítico poder ser utilizados sem serem pré-purificados (WEI e GU, 2013). No entanto, a CLAE apresenta melhor resolução e menor tempo de análise que a técnica de CCAV (IGNAT et al., 2011).

3.5. Identificação e quantificação de compostos fenólicos

3.5.1. Métodos espectrofotométricos utilizados na quantificação de compostos fenólicos totais e suas classes.

Um número considerável de métodos espectrofotométricos é aplicado para quantificar compostos fenólicos em alimentos. Esses ensaios são baseados em diferentes princípios e são utilizados para quantificar fenólicos totais ou uma classe de compostos fenólicos específica. **O ensaio de Folin-Ciocalteu** é amplamente utilizado para determinação de compostos fenólicos totais (AMODIO e COLELLI, 2014; GARCIA-LAFUENTE et al., 2014; SWIECA et al., 2014). O princípio do método consiste na oxidação dos fenóis pelo reagente de Folin-Ciocalteu, formando um complexo de coloração azul, que absorve próximo ao comprimento de onda de 760 nm (SINGLETON et al., 1999). Os **Métodos da Vanilina e das Proantocianidinas** têm sido estudados para estimar proantocianidinas totais (RÊGO JUNIOR et al., 2011; PARK et al., 2014). Esses métodos se baseiam na reação do alcalóide aromático (vanilina) com o anel meta substituído por grupos hidroxilas dos flavanóis, na presença de ácido clorídrico, formando um produto de condensação vermelho. O reagente da vanilina é específico para os flavonóides que apresentam ligação simples na posição 2 e 3, e grupos hidroxilas alternados no anel A (TIITTO-JULKUNEM, 1985).

Para a quantificação de antocianinas totais o **Método do pH diferencial** é empregado e baseia-se no comportamento característico das antocianinas sob condições ácidas. O princípio do método consiste em diminuir o pH do extrato, para valores variando entre 0,5 e 0,8, o que leva a transformação do cátion flavilium das antocianina para a coloração vermelha (LAPORNIK et al., 2005; TÜRKYILMAZ e ÖZKAN, 2014).

O teor de flavonóides totais pode ser determinado utilizando o **método colorimétrico baseado na complexação dos compostos fenólicos com o Al^{3+}** (MARQUES et al., 2012; PARK et al., 2014). O princípio do método consiste na formação de complexos estáveis entre a carbonila (C4) e a hidroxila (C5), ou de grupos catecóis, com o íon Al^{3+} . A formação do complexo provoca um deslocamento batocrômico das bandas de absorção do espectro UV-Vis (POZZI, 2007).

Os métodos espectrofotométricos fornecem informações qualitativas e quantitativas muito úteis; geralmente, a espectroscopia é a técnica principal utilizada para quantificação de diferentes classes de polifenóis devido a sua simplicidade, rapidez e baixo custo. A principal desvantagem dos ensaios espectrofotométricos é que fornecem somente uma estimativa do conteúdo de fenólicos totais. Eles não separam os compostos e não fornecem mensuração quantitativa dos compostos individuais. Além disso, devido à complexidade dos compostos fenólicos nas diversas matrizes alimentares e da reatividade diferente dos fenóis aos reagentes dos ensaios, um amplo espectro de métodos é utilizado para quantificar os constituintes, levando frequentemente a resultados diferentes e não comparáveis. E por fim, os métodos são bastante propensos a interferências (açúcar, aminas aromáticas, dióxido de enxofre, ácido ascórbico e ácidos orgânicos) e conseqüentemente resultam muitas vezes em sub ou superestimação do conteúdo (IGNAT et al., 2011).

3.5.2. Técnicas cromatográficas utilizadas na separação e análises qualitativas e quantitativas de compostos fenólicos

3.5.2.1. Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE ou HPLC

A CLAE representa a mais popular e confiável técnica para análises de compostos fenólicos (NARAYAN e KUMAR, 2013). Vários suportes e fases móveis estão disponíveis para análises de compostos fenólicos incluindo antocianinas, proantocianidinas, taninos hidrolisáveis, flavonóis, flavanonas, flavonas e fenólicos ácidos em diferentes amostras de alimentos. Além do mais, técnicas de CLAE oferecem uma chance única de analisar simultaneamente todos os componentes de interesse juntos com seus possíveis derivados ou produtos de degradação (STALIKAS, 2007).

A introdução de colunas de fase reversa consideravelmente melhorou a separação de diferentes classes de compostos fenólicos por CLAE, sendo as colunas de fase reversa C18 quase exclusivamente empregadas. Acetonitrila e metanol são os modificadores orgânicos mais comumente utilizados. Em muitos casos, a fase móvel é

acidificada com um modificador (ácido acético, fórmico e fosfórico) para minimizar o alongamento do pico. Tanto a eluição isocrática quanto a eluição por gradiente são aplicadas na separação de compostos fenólicos. A escolha depende do número e do tipo de analitos e da natureza da matriz. A detecção é geralmente realizada por detectores de arranjo de diodos (DAD-UV/VIS), fornecendo maior informação dos compostos em misturas complexas. Detectores UV-DAD são muito úteis, pois permitem obter o espectro de absorção característico de cada composto, auxiliando na identificação dos mesmos (MARÇO et al., 2008). Outros métodos empregados para detecção de compostos fenólicos incluem detecção eletroquímica (ECD), detecção de arranjo elétrico (EAD), espectrometria de massa (MS) e detecção por ressonância magnética nuclear (RMN). Os dois últimos com maior aplicação na confirmação da estrutura molecular dos compostos e, por isso, são mais frequentemente utilizados para isso do que em ensaios de quantificação (AZMIR et al., 2013).

A CLAE de fase reversa se tornou a ferramenta analítica dominante para separação e determinação de compostos fenólicos de baixa massa molecular. No entanto, essa técnica é geralmente demorada e pode apresentar pobre resolução a partir do momento em que o comprimento da cadeia polimérica e a diversidade estrutural dos compostos fenólicos aumentam. A detecção de compostos de elevada massa molecular, bem como a determinação da distribuição da massa molecular, permanecem como os maiores desafios nas análises de polifenóis. Técnica de cromatografia líquida de fase reversa quando acopladas a espectrômetro de massas, principalmente espectrômetros de massas sequências, são os melhores métodos para estudar polifenóis de diferentes fontes biológicas, e são as ferramentas mais efetivas no estudo da estrutura dos compostos fenólicos (SANTOS et al., 2013).

3.5.2.2. Cromatografia líquida de ultra eficiência – UHPLC

A cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC) é o avanço mais recente das técnicas de separação e desenvolveu-se a partir da introdução das partículas de fase estacionárias (FE) porosas $\leq 2 \mu\text{m}$, em resposta à busca contínua por análises mais rápidas e eficientes. A UHPLC fundamenta-se nos mesmos princípios de separação da CLAE, tendo como principais diferenças as colunas cromatográficas empregadas que são de diâmetros reduzidas (5 – 10 cm de comprimento e diâmetros internos de 1 – 2,1 mm), recheadas com partículas de FE $\leq 2\mu\text{m}$, as quais, juntamente com as altas velocidades lineares de fase móvel (FM) aumentam a resolução e a detectabilidade,

diminuem o tempo das análises, porém geram um aumento significativo de pressão cromatográfica (GUILLARME e VEUTHEY, 2013; MOLTIVA et al., 2013). Em vista disso, um equipamento adequado, capaz de operar a altas pressões, acima de 1000 bar (~15000 psi), é empregado para extrair um desempenho cromatográfico máximo dessa técnica (MALDANER e JARDIM, 2012).

A UHPLC vem ganhando espaço em todas as áreas de aplicação da CLAE, em decorrência de suas principais vantagens: diminuição considerável no tempo de análise, melhor resolução e detectabilidade, economia de fase estacionária e fase móvel, pequeno volume de amostra, facilidade de transferência de um método desenvolvido por CLAE para UHPLC, grande variedade de colunas e equipamentos disponíveis e menor geração de resíduos (MALDANER e JARDIM, 2012; NARAYAN e KUMAR, 2013). Além do mais, o tempo de equilíbrio para restabelecer a coluna às condições iniciais depois do gradiente de análise é curto (HAGHI et al., 2012). Apesar de todas estas vantagens, poucos estudos foram realizados para avaliar o tempo de vida das colunas que são submetidas a condições extremas de pressão e o custo de manutenção de um equipamento que possui uma série de particularidades e opera em altas pressões. Além disso, a tecnologia das colunas de UHPLC, que sejam capazes de gerar o máximo desempenho cromatográfico, requer novos desenvolvimentos neste campo (MALDANER e JARDIM, 2012).

3.5.2.3. Cromatografia por fluido supercrítico – CFS

A cromatografia por fluido supercrítico é uma técnica cromatográfica relativamente recente utilizada na separação e identificação de compostos fenólicos. O que diferencia a CFS de outras técnicas cromatográficas (cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência) é o uso de fluido supercrítico como fase móvel (PLOTKA et al 2014). Ao contrário da CLAE, a CFS permite a utilização de maiores fluxos com menores pressões através da coluna, devido a baixa viscosidade, alta difusibilidade e elevado poder de solvatação dos fluidos supercríticos, o que leva a uma grande eficiência de separação em tempos curtos de análise e reduzido consumo de solventes orgânicos (TAYLOR, 2009). Isso implica em picos mais definidos, melhor resolução e métodos rápidos devido aos curtos períodos para equilíbrio da coluna. Além do mais, oferece a possibilidade de analisar compostos polares e lábeis que não podem ser analisados por CG sem a derivatização. Todas essas razões têm contribuído para um aumento na utilização da CFS (BERNAL et al., 2013).

3.5.2.4. Cromatografia Gasosa – CG

A Cromatografia gasosa é outra tecnologia empregada para separação e identificação de diferentes compostos fenólicos. A separação baseia-se na diferente distribuição das substâncias da amostra entre uma fase estacionária sólida ou líquida e uma fase móvel gasosa. É uma técnica que possui ótima capacidade de separação e oferece alta sensibilidade e seletividade quando combinada com a espectrometria de massa (GARCIA-VILLALBA et al., 2011). No entanto, devido ao fato dos fenólicos serem termosensíveis e não apresentarem volatilidade existe a necessidade de derivatização dos compostos, processo que dificulta o uso desta técnica (LIU et al., 2008; ZADERNOWSKI et al., 2009).

3.5.2.5. Cromatografia em camada delgada - CCD

A cromatografia em camada delgada (CCD) é utilizada para a análise de antocianinas, flavonóis, taninos condensados e fenólicos ácidos utilizando diferentes sistemas de solventes (BOUDESOCQUE et al., 2013). O princípio da CCD consiste na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial desses componentes quando arrastados pela fase móvel (solvente) sobre uma camada delgada de adsorvente. Oferece separação em breve espaço de tempo, é versátil, econômica, apresenta grande reprodutibilidade, fácil execução e pequeno consumo de solventes (NACZK e SHAHIDI, 2006; SMERK e VOVK, 2013).

A implementação de uma metodologia de padronização moderna leva ao aumento da aceitação e reconhecimento da cromatografia em camada delgada (de alta eficiência) como um método analítico competitivo (AZMIR et al., 2013).

3.5.3. Outros métodos de separação e quantificação de compostos fenólicos

3.5.3.1. Eletroforese capilar – EC

A eletroforese capilar é uma técnica de separação alternativa a CLAE, e é adequada especialmente para separação e quantificação de compostos polares e carregados de baixa a média massa molecular, sendo as separações frequentemente mais rápidas e eficientes do que as correspondentes separações por CLAE (CARIDI et al., 2007). A eletroforese capilar de zona é a técnica mais simples de todas as técnicas de eletroforese capilar. Os compostos são separados dentro de capilares de diâmetros estreitos contendo somente solução tampão, pelo qual uma voltagem é aplicada criando um campo elétrico, e diferentes velocidades de migração dependendo da carga e

tamanho das moléculas (RABANES et al., 2012). Para a análise de compostos fenólicos, a maioria dos métodos utiliza tampões fosfato ou borato. O tampão fosfato pode formar um complexo com os grupos hidroxilas do composto fenólico, alterando a carga e tamanho da molécula, melhorando a separação (BALLUS et al., 2012; BIZZOTO et al., 2012). Normalmente, a detecção é realizada com detectores UV, mas detectores eletroquímicos e de espectrometria de massa também são utilizados (HERRERO et al., 2006).

A eletroforese capilar é uma ferramenta analítica versátil para determinação rotineira de uma ampla variedade de compostos fenólicos em diferentes tipos de amostras devido a sua elevada eficiência de separação, alto poder de resolução, tempo curto de análise e baixo consumo de amostras e reagentes (IGNAT et al., 2011). Por outro lado, uma das maiores limitações da EC, quando comparada com outras técnicas como CG e CLAE, é a sua baixa sensibilidade em termos de concentração do soluto, e reprodutibilidade, que é causada pelo curto percurso óptico do capilar utilizado como célula detectora e também pela pequena quantidade de volume que pode ser introduzido no capilar (normalmente, poucos nanolitros) (MOLINA-MAYO et al., 2007; LIU et al., 2008; HURTADO-FERNANDÉZ et al., 2013).

A cromatografia eletrocínética capilar (CECC) tem estendido a utilidade da eletroforese capilar na separação de analitos neutros sob a influência de um campo elétrico. O fracionamento de pigmentos poliméricos e monoméricos de elevada massa molecular por cromatografia de permeação em gel (CPG) melhora as análises destes compostos por EC (RASTIJA e MEDIC-SARIC, 2009).

3.6. Métodos espectrais utilizados na elucidação e caracterização de compostos fenólicos

3.6.1. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear – RMN

A espectroscopia de RMN esta sendo cada vez mais utilizada para análises de alimentos, sendo considerada a melhor técnica para caracterizar o perfil de compostos dos extratos de alimentos: todos os metabólitos (lipídios, amino e orgânico ácidos, açúcares e compostos aromáticos) podem ser detectados em um único espectro com um mínimo de preparo da amostra (VERPOORT et al., 2007). O espectro da RMM de várias amostras pode atuar como “impressões digitais” que podem ser utilizadas para comparar, discriminar ou classificar as amostras (IGNAT et al., 2011).

A técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) baseia-se no estudo da interação da radiação eletromagnética com a matéria. Especificamente, a RMN estuda a absorção da radiação na frequência das ondas de rádio por parte dos núcleos atômicos de uma molécula, na presença de um forte campo magnético (ALVES, 2010).

Quando sujeitos a um campo magnético intenso, alguns núcleos atômicos como ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P , entre outros, são capazes de absorver a energia de determinada radiação eletromagnética. A espectroscopia de RMN analisa a frequência correspondente a esta energia (frequência de ressonância) e o tempo em que os núcleos (após irradiação) levam para voltar à temperatura ambiente. Este tempo de resfriamento é conhecido como tempo de relaxação (GONSALVES E MELO, 2007).

Os núcleos atômicos que estão sujeitos a ambientes químicos e magnéticos diferentes absorvem energia em uma frequência específica e podem ser diferenciados dentro de uma mesma molécula. Da mesma forma, a movimentação molecular e as interações com ambientes magnéticos distintos fazem com o tempo de relaxação entre os núcleos seja diferente. O tempo de relaxação fornece informações sobre a composição química e as propriedades físico-químicas da amostra (GONSALVES E MELO, 2007).

Um espectrômetro de RMN é constituído basicamente por um magneto, capaz de criar um campo magnético homogêneo na região onde a amostra é introduzida, uma sonda, onde se encontra a amostra, e um sistema de transmissão e recepção de radiofrequências, conforme apresentado na Figura 17.

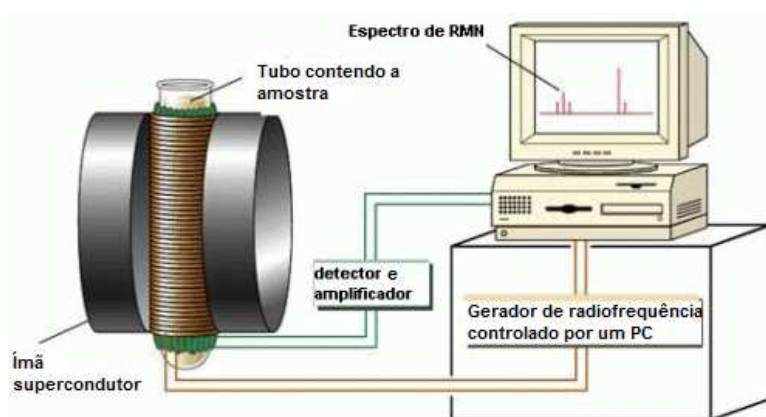


Figura 17. Representação esquemática de um espectrômetro de RMN.

O magneto tem que gerar um campo magnético forte, homogêneo e estável, para que os resultados apresentem melhor resolução e sensibilidade. Os magnetos são

solenóides construídos com diferentes ligas metálicas, que quando imersos em hélio líquido, apresenta propriedades supercondutoras. A sonda é desenhada para acondicionar a amostra, transmitir os sinais de radiofrequência que excitam a amostra e receber as respostas emitidas. O sistema de transmissão gera os impulsos de radiofrequência, de acordo com a amplitude, frequência e fase desejadas e os transfere para a amostra. O sistema de detecção é responsável pela amplificação dos sinais emitidos pela amostra (CLARIDGE, 2009).

A ressonância nuclear magnética com ^1H e ^{13}C tem si tornado a técnica preferida para identificação de antocianinas. A RMN também é útil na identificação de produtos de reação das antocianinas com outros compostos tais como os derivados do ácido cinâmico, radicais peroxil, catequinas e flavonóis (CASTANEDA-OVANDO et al., 2009).

Vantagens como simplicidade na preparação da amostra e nos procedimentos de mensuração, estabilidade instrumental e facilidade de interpretação do espectro têm contribuído para a crescente popularidade desta técnica (IGNAT et al., 2011).

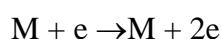
A limitação na utilização da RMN na análise de alimentos é o custo do equipamento. Um novo espectrômetro de RMN 500 MHz pode custar de 7 a 8 vezes mais do que um novo sistema de cromatografia líquida de alta eficiência com detector DAD/UV. Outra limitação é a relativa baixa sensibilidade da RMN quando comparada com outras técnicas, como a CLAE ou a CG (IGNAT et al., 2011).

3.6.2. Espectrometria de Massa – MS

A espectrometria de massa é uma técnica analítica utilizada para elucidação da estrutura química de moléculas, tais como peptídeos, polifenóis e outros compostos químicos. A espectrometria de massa possui papel importante na pesquisa e seu poder analítico é relevante para estudos estruturais de compostos fenólicos (IGNAR et al., 2011).

A espectrometria de massas se constitui numa importante ferramenta de análise orgânica cujo propósito central é converter uma substância em sub-produtos (fragmentos moleculares) mensuráveis que são indicativos da estrutura da molécula original. A reação é iniciada com a ionização da amostra através da remoção de um elétron da camada de valência, formando uma espécie altamente energética que se degrada tal que os produtos formados são cátions, ânions, radicais e pequenas moléculas neutras (ASSIS et al., 2011).

A substância a ser analisada é introduzida na câmara de ionização do espectrômetro de massas onde é vaporizada e as moléculas, no estado gasoso sob baixa pressão (10 atm.), são bombardeadas com um feixe de elétrons de alta energia (70 eV que corresponde a aproximadamente 1600 Kcal/mol). No primeiro momento ocorre a remoção de um elétron da camada de valência produzindo um íon molecular carregado positivamente. Este íon molecular, contendo um número ímpar de elétrons é na verdade um cátion radical (PAVANELLI, 2010; DALMÁZIO, 2007).



Os íons moleculares (M) formados inicialmente contém um excesso de energia que não é igual para todos os íons. Este excesso de energia é suficiente para produzir a quebra de ligações resultando na fragmentação do íon molecular em partículas menores originando vários novos cátions, ânions, radicais livres e pequenas moléculas neutras, todos no estado gasoso. Os íons positivos são separados da mistura resultante com base nas suas razões massa/carga (m/z) e as suas abundâncias relativas são registradas num gráfico de intensidade *versus* m/z, que é o espectro de massas (PAVANELLI, 2010; DALMÁZIO, 2007).

Todos os fragmentos carregados positivamente passam através de uma série de fendas constituídas por placas carregadas negativamente onde são acelerados e enviados para dentro do analisador de íons, onde são separados pela razão massa/carga (m/z). Existem vários tipos de analisadores de íons. O mais simples é o analisador magnético, um tubo curvado (tubo analisador) que está sob a influência de um campo magnético externo variável. Uma partícula movendo-se através de um campo magnético tem sua trajetória definida pelas leis da física. Assim os íons se movem numa trajetória que é parte de um círculo e, dependendo da força deste campo magnético, um íon em particular seguirá a mesma trajetória da curvatura do tubo analisador incidindo finalmente num coletor de íons onde sua intensidade é registrada eletronicamente. A intensidade é a medida da abundância do íon na amostra. O raio da curvatura dessa trajetória circular está relacionado com a razão massa/carga (m/z), força do campo magnético B_0 e com voltagem de aceleração. Assim, cada íon fragmento formado deve ser focalizado para que possa ter a mesma trajetória desenhada pelo tubo analisador. A focalização dos fragmentos iônicos pode ser feita de duas maneiras: a) manter a voltagem de aceleração constante e variar o campo magnético B_0 ; b) manter o campo

magnético B_0 constante e variar a voltagem de aceleração (PAVANELLI, 2010; DALMÁZIO, 2007).

A espectrometria de massas, portanto, analisa espécies iônicas onde quatro etapas básicas estão envolvidas (Figura 18):

- 1) Ionização: o processo de ionização converte as moléculas ou átomos da amostra em espécies iônicas numa fase gasosa.
- 2) Fragmentação: a energia acumulada durante a ionização é dissipada quebrando as moléculas em fragmentos característicos e previsíveis para cada estrutura molecular.
- 3) Separação e análise das massas do íon molecular e seus fragmentos iônicos com base em suas razões massa/carga.
- 4) Detecção: a corrente iônica formada devido as massas iônicas separadas, é medida, amplificada e exibida na forma de um espectro de massas.

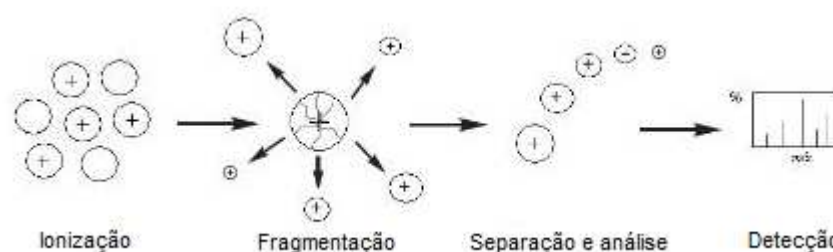


Figura 18. Ilustração das quatro etapas básicas na análise por espectrometria de massas.

A Figura 19 mostra uma visão simplificada de um espectrômetro de massas que está constituído por vários componentes: a) sistema de transferência da amostra a pressão atmosférica para a câmara de ionização que está sob alto vácuo (10 a 10 torr); b) câmara de ionização com uma fonte de íons que converte moléculas neutras em íons na fase gasosa; c) um sistema de aceleração de partículas e focalização; d) analisador de massas que separa e analisa as massas das espécies iônicas conectado a um sistema de alto vácuo que remove as partículas neutras e radicalares. A trajetória dos íons é controlada por um campo elétrico ou magnético variável; e) coletor-detector de íons que mede e amplifica a corrente iônica gerada pelos íons-massa resolvidos; e) sistema de registro, armazenamento e tratamento de dados; f) sistema de alto vácuo que mantém os componentes do espectrômetro de massas a uma baixa pressão (PAVANELLI, 2010; DALMÁZIO, 2007).

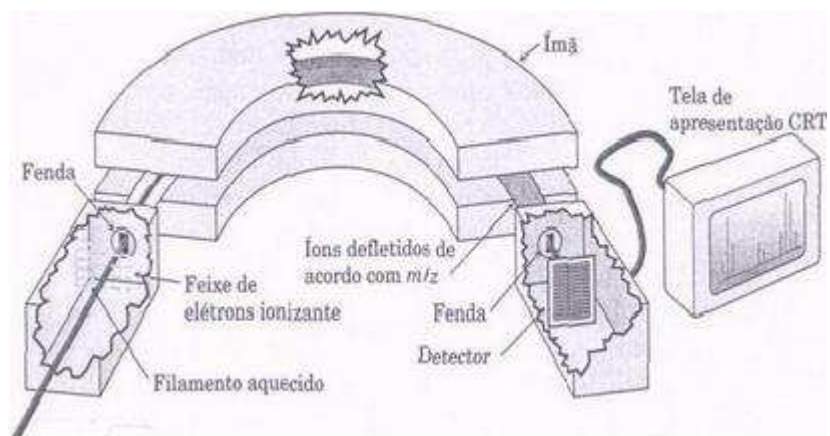


Figura 19. Esquema de um espectrômetro de massas.

A espectrometria de massas (MS) tem se tornado uma ferramenta indispensável em laboratórios analíticos modernos, tanto como instrumento utilizado em processo de separação, ou quanto acoplado a uma técnica de separação, como a CG, CLAE ou CE (SANTOS et al., 2013). Técnicas de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) são hoje em dia o melhor método analítico para estudar compostos fenólicos, e é a ferramenta mais efetiva no estudo da estrutura das antocianidinas, além de permite a caracterização de estruturas complexas tais como procianidinas, proantocianidinas, prodelfinidinas e taninos e fornece evidências experimentais das estruturas que eram previamente somente hipnotizadas (SANTOS et al., 2013; NARAYAN e KUMAR, 2013).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análises de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos e no Laboratório de Análises de Vitaminas do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

4.1. Matéria prima

Para a otimização da metodologia alternativa de extração proposta, foi utilizado inicialmente o vinho tinto Canção seco originário da Serra gaucha, adquirido em comércio local. Para as análises definitivas foram utilizados seis vinhos tintos, sendo cinco deles varietais e adquiridos em comércio local. Na Tabela 1, estão descritas algumas características dos vinhos utilizados na pesquisa.

Tabela 1. Características dos vinhos utilizados na pesquisa.

Vinho	Tipo	Cultivares	Variedade(s)	Safra	Procedência	Teor Alcoólico
<i>Canção</i>	Tinto seco	Rusticas	Uvas Bordô e Isabel	2011	Flores da Cunha - RS	10,4 % vol.
<i>Isabel: Cantina Mattiolo</i>	Tinto semi-seco	Rustica	Isabel	2011	Santa Teresa – ES	11,0 % vol.
<i>Aurora varietal</i>	Tinto seco	Vitis vinifera	Merlot	2009	Bento Gonçalves – RS	12,0 % vol.
<i>Marcus James</i>	Tinto semi-seco	Vitis vinifera	Pinotage	2010	Bento Gonçalves – RS	11,5 % vol.
<i>Almadén</i>	Tinto seco	Vitis vinifera	Cabernet Sauvignon	2011	Santana do Livramento – RS	12,0 % vol.
<i>Miolo Terra Nova</i>	Tinto seco	Vitis vinifera	Shiraz	2010	Vale do São Francisco	13,0 % vol.
<i>Gato Negro</i>	Tinto seco	Vitis vinifera	Carmenére	2010	Chileno	13,5 % vol.

4.2. Reagentes

Reagente de Folin-Ciocalteu, fosfato de sódio monobásico anidro, cloreto de potássio, sulfato de magnésio, fosfato de potássio monobásico anidro, fosfato de sódio e carbonato de sódio anidro foram adquiridos da Vetec (Brasil). Acetona, etanol, ácido clorídrico e hidróxido de sódio foram adquiridos da Merck (EUA). Metanol, acetonitrila e ácido fosfórico, todos grau HPLC, foram adquiridos da Tedia (Tedia, Brasil). O radical 1,1-difenil-picrilhidrazil (DPPH[•]) e os padrões fenólicos (quercetina, catequina e ácido gálico) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Maltodextrina 10 e 20 DE foram cedidas pela Cargil Brasil. Água foi purificada através do sistema de purificação de água Milli-Q, sendo a resistividade elétrica da água igual a 18,2 MΩ-cm (Millipore, São Paulo, SP, Brasil).

4.3. Caracterização da Pesquisa, Delineamento Experimental e Análise Estatística dos Dados.

4.3.1.1. 1ª Etapa: Ensaios preliminares para determinação das faixas de concentrações dos compostos adicionados ao vinho.

A metodologia alternativa de extração de compostos fenólicos proposta consiste em adicionar ao vinho tinto um sal, acetona e etanol. Após a agitação manual ocorre a separação de fases, clara e escura, em aproximadamente 10 minutos. Na fase superior e escura encontram-se concentrados os compostos fenólicos. No entanto, esta extração é influenciada pelas concentrações dos compostos químicos empregados, que devem ser otimizadas para fornecer maior teor de compostos fenólicos na fase superior.

Sendo assim, um estudo analisando inicialmente um reagente de cada vez (Figura 1) foi realizado para determinar a concentração adequada de cada reagente (sal, acetona e etanol), que propicia a melhor separação de fases do vinho e maior teor de compostos fenólicos totais no extrato (fase superior).

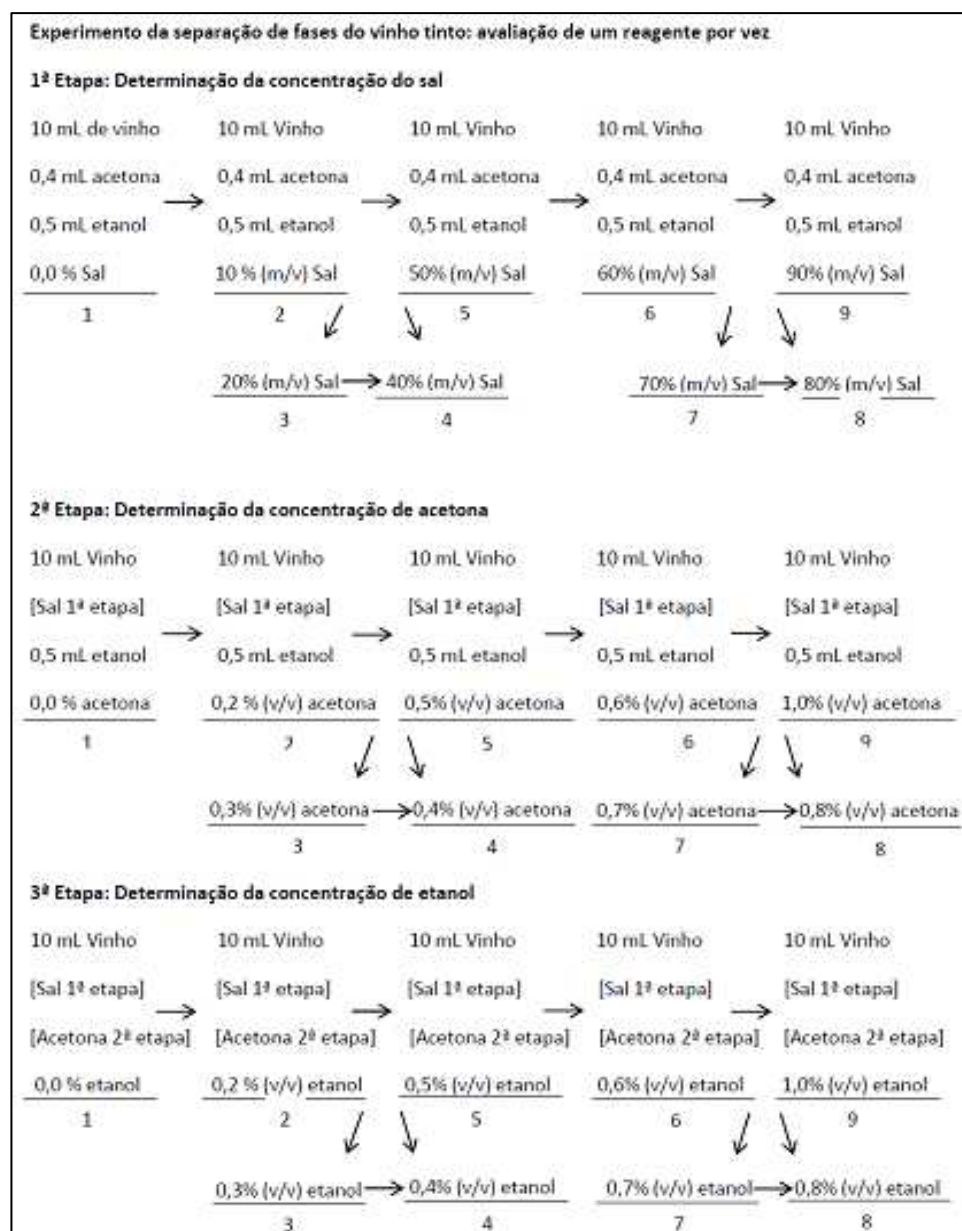


Figura 1. Esquema do experimento para determinação da quantidade de reagentes.

Primeiramente, a influência do sal, nas concentrações: 0,0, 10,0, 20,0, 40,0, 50,0, 60,0, 70,0, 80,0 e 90,0 % (m/v), sob o teor de compostos fenólicos totais foi investigada. Cinco tipos de sais foram testados: NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , KCl , e MgSO_4 .

Depois de determinar a concentração e o tipo de sal, o efeito da concentração de acetona foi estudado nas seguintes concentrações: 0,0, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 e 1,0 % (v/v), assim como o efeito da concentração de etanol (0,0, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 e 1,0 % (v/v)). Após cada etapa os extratos foram avaliados quanto ao teor de fenóis totais, pelo método de Folin-Ciocalteu, conforme descrito no item 4.4.2.

4.3.1.2. Otimização das condições de extração utilizando a metodologia de superfície de respostas

Baseado nos dados obtidos na etapa anterior, a metodologia de superfície de respostas foi aplicada buscando determinar a combinação dos níveis do sal selecionado, acetona e etanol que fornece a melhor separação de fases do vinho e extrato com maior teor de compostos fenólicos totais (Y). Foi utilizado um delineamento composto central rotativo (DCCR) com três variáveis independentes (X_1 : concentração de sal; X_2 : concentração de acetona; X_3 : concentração de etanol) em cinco níveis. O delineamento experimental consistiu de 15 pontos sendo, oito do fatorial básico, seis axiais à distância de $\pm 1,682$ (escala codificada) do centro e quatro repetições no ponto central, totalizando 18 ensaios. Os dezoito ensaios foram realizados de forma aleatória, para minimizar os efeitos de variabilidades inesperadas nas respostas observadas.

As variáveis independentes (concentração do sal selecionado, acetona e etanol) foram codificadas de acordo com a seguinte equação:

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X} \quad i = 1,2,3 \quad (\text{Eq. 1})$$

Em que x_i é o valor codificado da variável; X_i o valor da variável na escala real; X_0 o valor na escala real de X_i no ponto central; e ΔX é o valor de alteração (é o incremento de X_i correspondente a variação de uma unidade na escala codificada). A faixa de valores das variáveis independentes e seus níveis estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Níveis das variáveis independentes, nas escalas codificadas e real, utilizados no delineamento experimental.

Fatores (%)	Símbolo	Escala Codificada				
		-1,682	-1	0	1	1,682
Sal (m/v)	X_1	51,0	55,0	60,0	65,0	68,0
Acetona (v/v)	X_2	2,6	3,0	3,5	4,0	4,3
Etanol (v/v)	X_3	0,7	1,0	1,5	2,0	2,3

O modelo de segundo grau correspondente a esse delineamento composto é:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_1 X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=0}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon_i \quad (\text{Eq. 2})$$

em que Y é a variável resposta; β_0 é a constante do modelo; β_i é o coeficiente linear; β_{ii} é o coeficiente quadrático; e β_{ij} o coeficiente de interação; ϵ_i representa o erro aleatório; k é o número de fatores estudados no experimento; X_i e X_j são os valores das variáveis independentes na escala real ($i \neq j$). A equação polinomial ajustada foi apresentada como gráficos de superfície e de contorno, no intuito de ilustrar a relação entre a resposta e os níveis experimentais de cada fator e para deduzir as condições ótimas.

4.3.1.3. Ajuste e testes do modelo de regressão

As análises estatísticas (ANOVA e de regressão) dos dados experimentais foram realizadas utilizando-se o software SAS (versão 9.2, USA). A adequação do modelo foi determinada pela avaliação da probabilidade de F para a falta de ajuste na análise de variância da regressão. O Teste t de Student foi utilizado para testar a significância das estimativas dos coeficientes da regressão.

4.3.1.4. Validação do modelo de regressão ajustado

Experimentos adicionais de confirmação foram subsequentemente realizados, com 5 repetições, com valores das variáveis independentes nas condições ótimas estimadas, para verificar a validade das estimativas pela equação de regressão.

4.3.2. 2ª Etapa: Determinação do vinho/extrato com maior teor de compostos fenólicos totais.

As concentrações ótimas do sal, acetona e etanol determinadas na 1ª etapa anterior foram utilizadas para promover a separação de fases e obtenção de extratos fenólicos nos vinhos apresentados na Tabela 1 (com exceção do vinho Canção). Os vinhos e os extratos foram analisados quanto ao teor de compostos fenólicos totais, pelo método de Folin-Ciocalteu, conforme descrito no item 4.4.2.

Nesta etapa o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC), com seis tratamentos, representados pelos extratos obtidos de cada vinho, e três repetições para cada tratamento. A análise de variância ($\alpha= 5\%$) e o Teste de Tukey foram aplicados para verificar a existência de diferenças significativas no teor de compostos fenólicos totais entre os extratos.

O extrato que apresentou estatisticamente maior teor de compostos fenólicos foi avaliado quanto a estabilidade na terceira etapa da pesquisa.

4.3.3. 3ª Etapa: Avaliação da estabilidade do extrato frente a condições de estocagem.

O extrato que, na etapa precedente, apresentou maior teor de compostos fenólicos totais foi avaliado quanto a estabilidade em relação ao tempo e temperatura de estocagem, pH, ao processamento térmico e forma de apresentação (líquida e liofilizada). Na Figura 2, é apresentada de forma esquemática a sequência de experimentos que constitui essa avaliação.

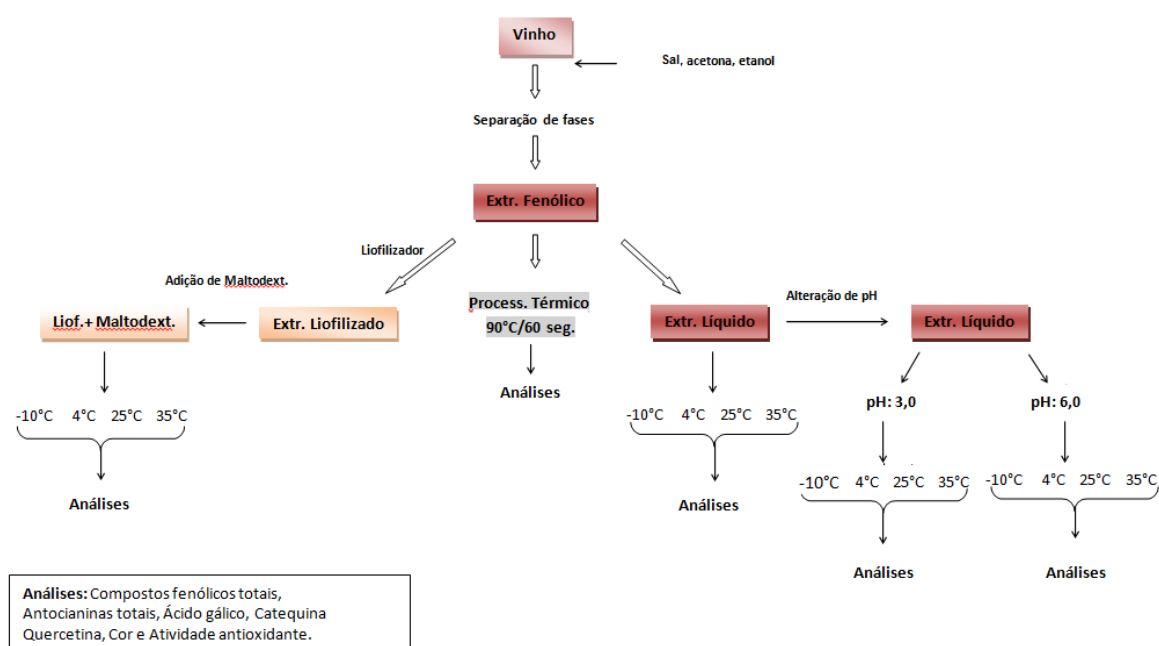


Figura 2. Esquema da caracterização e análises do experimento referente a avaliação da estabilidade dos extratos liofilizado e líquido, esse com pH alterado para 3 e 6, armazenados a -10°C, 4°C, 25°C e 35°C, durante 90 dias, e avaliação da estabilidade em relação ao tratamento térmico (90°C/60s).

4.3.3.1. Delineamento experimental e análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), segundo modelo de delineamento inteiramente casualizado em parcelas subdivididas com 3 repetições, considerando os tipos de extratos as parcelas e, as temperaturas e o tempo de estocagem, as subparcelas.

Foram verificadas as interações Extrato*Temperatura; Extrato*Tempo; Temperatura*Tempo e Extrato*Temperatura*Tempo. Para aquelas variáveis que apresentarem interação significativa a 5 % de probabilidade, foi realizado o

desdobramento dessa interação. Para as interações significativas ($p < 0,05$) relacionadas ao tempo de armazenamento, foram ajustadas equações de regressão sobre os dados obtidos, sendo testados modelos de equação linear e quadrática em função do tempo de armazenamento a 5 % de probabilidade. Nas interações significativas ($p < 0,05$) não relacionadas com o tempo foram verificadas as diferenças entre médias por meio do Teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

As análises estatísticas foram realizadas no programa estatístico SAS (Statistical Analysis System – SAS Institute Inc., North Carolina, USA, 1989) versão 9.2 licenciado pela Universidade Federal de Viçosa em 2013.

4.3.3.2. Efeito da temperatura e tempo de estocagem

O extrato líquido (30 mL) foi estocado em frascos âmbar fechados (Figura 3) no escuro, nas temperaturas de -10°C , 4°C , 25°C e 35°C por 90 dias. Análises de cor, antocianinas monoméricas, compostos fenólicos totais, atividade antioxidante *in vitro* e análises cromatográficas de ácido gálico, catequina e quercetina foram conduzidas de 15 em 15 dias (0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias = 7 tempos de estocagem).



Figura 3. Representação fotográfica dos frascos âmbar utilizada no armazenamento dos extratos.

4.3.3.2.1. Efeito do pH durante a estocagem

O efeito do pH foi estudado em dois diferentes valores de pH (3,0 e 6,0). Ácido tartárico e hidróxido de sódio foram utilizados para ajustar o pH do extrato para pH 3,0 e pH 6,0, respectivamente. As soluções foram preparadas e adicionadas aos extratos, que foram estocados em frascos âmbar fechados a -10°C , 4°C , 25°C e 35°C , no escuro por 90 dias. Análises de cor, antocianinas monoméricas, compostos fenólicos totais,

atividade antioxidante *in vitro* e análises cromatográficas de ácido gálico, catequina e quercetina foram conduzidas de 15 em 15 dias.

4.3.3.3. Obtenção do extrato liofilizado

O extrato em pó foi obtido através de secagem do extrato líquido em liofilizador (Freezone 4.5 Labconco – EUA). Antes da secagem, foram determinados a concentração e o tipo do agente de carga adicionado ao extrato. Foram testadas a maltodextrina 10 DE (dextrose equivalente) e 20 DE nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 25 e 30%. A concentração que forneceu melhor encapsulamento e secagem do material foi 25%, e a maltodextrina selecionada foi a 20 DE por ser mais solúvel em relação a maltodextrina 10 DE.

Dessa forma, antes da secagem foi adicionado ao extrato 25% de maltodextrina 20 DE, sendo a dissolução completa obtida por agitação magnética em temperatura ambiente. Os extratos foram congelados e submetidos às condições de secagem: pressão 4,2 mmHg, temperatura de trabalho $-52 \pm 1^\circ\text{C}$. O tempo de operação foi de aproximadamente 24 horas.

Os extratos foram recolhidos na forma de pó (Figura 4) e acondicionados em frascos fechados de polietileno nas temperaturas de -10°C , 4°C , 25°C e 35°C , no escuro, por 90 dias. Análises de cor, antocianinas monoméricas, compostos fenólicos totais, atividade antioxidante *in vitro* e análises cromatográficas de ácido gálico, catequina e quercetina foram conduzidas de 15 em 15 dias.



Figura 4. Representação fotográfica do extrato fenólico liofilizado.

4.3.3.4. Estabilidade Térmica

Para investigar a estabilidade térmica, o extrato líquido (pH 3,8) e os extratos com pH alterados (pH 3,0 e pH 6,0) foram submetidos ao processo de pasteurização (60 segundos a 90°C), de acordo com o seguinte procedimento: 30 mL do extrato foram colocados em erlenmeyer (capacidade para 50 mL), mensurada a temperatura inicial e aquecido em banho termostático (temperatura ajustada para 90°C) até atingir a temperatura de 90°C, sob a qual permaneceram por 60 segundos. Após esse tempo o extrato foi resfriado utilizando água corrente em temperatura ambiente até atingir a temperatura inicial (temperatura antes do tratamento térmico). Análises de cor, antocianinas monoméricas, compostos fenólicos totais, atividade antioxidante *in vitro* e análises cromatográficas de ácido gálico, catequina e quercetina foram conduzidas antes e após o tratamento térmico.

4.4. Análises Químicas

4.4.1. Determinação Cromatográfica do Ácido Gálico, Catequina e Quercetina

Tais compostos foram selecionados para análise por CLAE, uma vez que a catequina é considerada o fenólico majoritário tanto no vinho tinto quanto no vinho branco (FONTANA e BOTTINI, 2014), a quercetina é o flavonol mais importante no vinho tinto em função de sua elevada atividade antioxidante *in vitro* (GINJOM et al., 2011), e o ácido gálico é o principal e mais abundante fenólico ácido nos vinhos tintos (GARRIDO E BORGES, 2011). A análise simultânea desses compostos foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), segundo metodologia proposta por Torola e Giannetti (2007). Antes das análises, os extratos foram filtrados em filtro de membrana PTFE 0,45 µm.

A análise dos compostos fenólicos seguiram as seguintes condições cromatográficas: cromatógrafo Shimadzu SCL10A VP, equipado com coluna cromatográfica C18, Phenomenex RP-18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) e detector de arranjo de fotodiodos (Shimadzu SOD-M10A VP) com detecção a 370 nm (quercetina) e 280 nm (ácido gálico e catequina); Eluição por gradiente com fase móvel composta de 100% de acetonitrila como solvente A e por solução de ácido fórmico (5 %) como solvente B; condições iniciais: 20% A, 80% B com fluxo de 0,3 mL/minuto. Após 7 minutos a bomba foi ajustada para 30% A, 70% B com fluxo de 0,8 mL/minuto, com gradiente linear em 1 minuto até o término da corrida a 25 minutos, seguido por um

período de reequilíbrio de 10 minutos entre cada corrida; volume de injeção: 10 µL. Os três compostos foram analisados em uma única corrida (análise simultânea)

A identificação dos compostos fenólicos nas amostras foi realizada comparando-se os tempos de retenção obtidos para os padrões (quercetina, ácido gálico e catequina) e para as amostras, analisados sob as mesmas condições. Além disso, foram comparados os espectros de absorção do padrão e dos picos de interesse nas amostras, utilizando-se o detector de arranjos de diodos. A quantificação foi realizada pela construção de curvas de calibração dos padrões fenólicos.

4.4.1.1. Curvas de calibração da quercetina, ácido gálico e catequina

Para a construção das curvas de calibração da quercetina, ácido gálico e catequina, uma solução padrão estoque de concentração 1 mg/mL de cada padrão foi preparada em metanol e soluções de diversas concentrações foram preparadas pela diluição da solução estoque em metanol.

A curva de calibração do ácido gálico foi construída de acordo com a concentração esperada para os componentes nos extratos analisados. Para os todos os extratos utilizou-se injeção em duplicata, de seis concentrações crescentes de soluções padrão entre 3,15 e 100,80 µg/mL. Para construção da curva de calibração da quercetina foi feita injeção, em duplicata, de seis concentrações crescentes de soluções padrão (entre 0,31 e 10,00 µg/mL). A curva de calibração da catequina foi construída com injeção, em duplicata, de cinco concentrações crescentes de soluções padrões (entre 10,50 e 80,02 µg/mL). A concentração real dos padrões fenólicos foi determinada por espectrofotometria e adequadamente corrigida. A equação e coeficientes usados para cálculo das concentrações foram:

$C \text{ (}\mu\text{g/mL)} = \text{ABS} \times 10^4 / E_{1\text{cm}}^{1\%}$, onde C é a concentração real, ABS é a absorvância máxima (lida a 370 nm para a quercetina e a 280 para o ácido gálico e a catequina), em metanol e $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ é o coeficiente de absorvância molar.

As curvas de calibração obtidas para o ácido gálico, quercetina e catequina, são apresentadas na Figura 5.

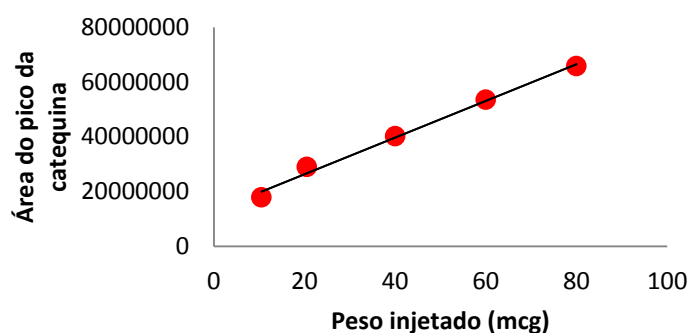
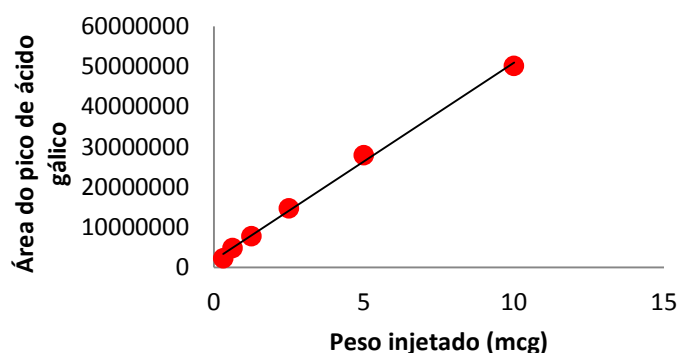
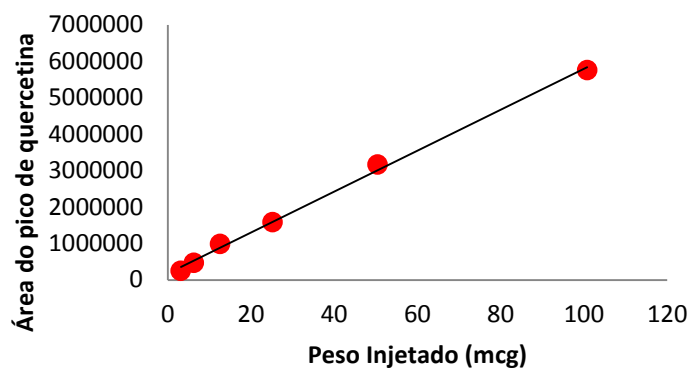


Figura 5. Correlação linear entre a concentração de ácido gálico (1), quercetina (2) e catequina (3) e a área dos picos correspondentes.

4.4.2. Estimativa de Fenólicos Totais

O método utilizado emprega o reagente proposto por Otto Folin e Vintila Ciocalteu (1927). Os diferentes compostos reagem com o reagente de Folin-Ciocalteu gerando produtos de cor azul resultantes da redução do fosfomolibdato, os quais absorvem em comprimento de onda numa faixa de 720 a 765 nm. O que ocorre é uma reação redox, em temperatura ambiente na qual os fenóis são oxidados, em meio

alcalino, embora a química de tungstatos e molibidatos seja muito complexa, segundo Singleton et al., (1999).

Primeiramente, os vinhos e extratos foram diluídos com água destilada em 50 e 400 vezes, respectivamente. Frações de 4,0 mL do extrato diluído foram utilizadas para a análise de fenólicos totais, de acordo com a metodologia proposta por Singleton et al., (1999), conforme descrito a seguir:

- 4,0 ml de extrato diluído foram pipetados em tubo de ensaio com tampa;
- Foram adicionados ao extrato 4,0 mL de reagente de Folin-Ciocalteu;
- Foi realizada a agitação em vórtex e após 3 minutos foi adicionado ao tubo de ensaio 4,0 mL de solução de carbonato de sódio a 10,0 % em água;
- Foi realizada novamente a agitação em vórtex e em seguida deixou reagir por 1 hora, em temperatura ambiente com agitação.

A absorvância em 760,0 nm foi lida em espectrofotômetro Shimadzu UV-VIS (Kyoto, Japão). Uma curva analítica de ácido gálico, em concentrações variando de 50 a 750 mg/L, foi elaborada, por meio da equação de regressão linear ($R^2 = 0,9923$) para expressar os resultados em gramas de equivalentes de ácido gálico (EAG) por litro de vinho ou extrato, de acordo com as etapas a seguir:

- Foi preparada uma solução inicial de ácido gálico na concentração de 1000 mg/L, pesando 50 mg de ácido gálico em béquer protegido de luz por papel alumínio;
- Foi adicionado 2 mL de etanol para dissolver o ácido gálico;
- A solução foi transferida para um balão de 50 mL (envolvido com papel alumínio) e o volume completado com água destilada;
- Foram feitas diluições da solução de 1000 mg/L, obtendo-se as seguintes concentrações de soluções padrão: 50; 100; 200; 300; 400; 500 e 750 mg/L;
- Foi realizada a reação de uma alíquota de 4,0 mL de cada solução padrão com o 4,0 mL do reagente de Folin-Ciocalteu e 4,0 mL de carbonato de sódio a 10,0%;
- Foi agitada em vórtex e reagiu por 1 hora.
- A leitura da absorvância a 760 nm foi realizada em espectrofotômetro.

Foi realizada a análise de regressão e obtida a equação da reta para a obtenção da estimativa dos fenólicos totais. A curva de calibração do ácido gálico está representada na figura 6.

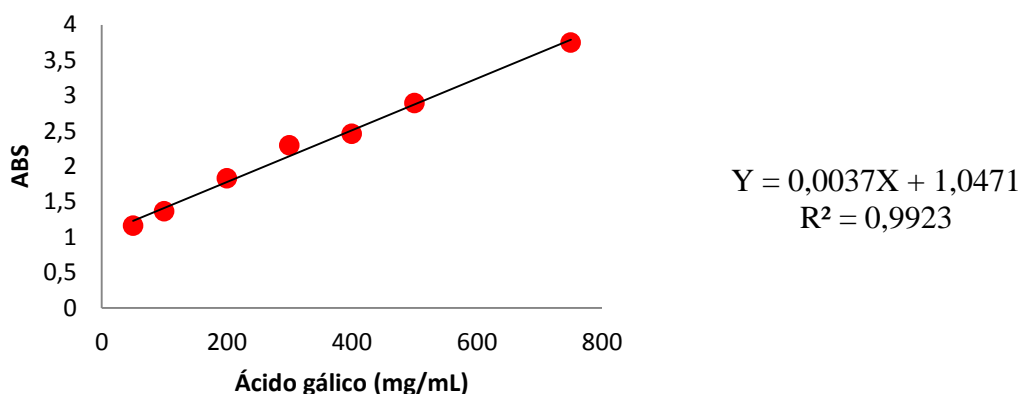


Figura 6. Correlação linear entre a concentração de ácido gálico e a absorvância correspondente a 760 nm.

4.4.3. Avaliação da Atividade Antioxidante

Teste do 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH')

A atividade antioxidante *in vitro* foi determinada de acordo com o método de neutralização do radical DPPH, conforme descrito por Brand-Williams et al., (1995):

- 200 µL de extrato (diluído 40 vezes) foram pipetados em tubo de ensaio;
- Adicionou-se ao extrato 3,8 mL de solução metanólica de DPPH' (70 mg/L);
- Após agitação em vórtex, a mistura foi mantida em temperatura ambiente, por 30 minutos, ao abrigo da luz.
- A absorvância foi lida a 517 nm.
- Em paralelo, foram preparados o sistema branco, que continha todos os reagentes, menos o DPPH' e foi utilizado para zerar o equipamento.

Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição do radical DPPH', calculado de acordo com a equação seguinte:

$$\text{Atividade de retirada de radical (\%)} = \{(A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}}/A_{\text{controle}})\} \times 100$$

em que A_{controle} é a absorvância do controle (solução de DPPH sem a amostra); A_{amostra} é a absorvância da amostra-teste (solução de DPPH mais a amostra-teste); e $A_{\text{branco da amostra}}$ é a absorvância da amostra apenas (amostra sem a solução de DPPH).

4.4.4. Antocianinas Monoméricas

O teor de antocianinas monoméricas foi estimado pelo método do pH diferencial, que tem a vantagem de considerar as transformações estruturais do cromóforo antocianina em função do pH. Por este método, a absorvância da amostra é medida a pH 1,0 (antocianinas como sais de oxônio coloridas), bem como a pH 4,5 (antocianinas como hemiacetais incolores). Os pigmentos degradados de antocianina não exibem comportamento reversível com o pH, e são assim excluídas do cálculo da absorvância (FULEKI e FRANCIS, 1968).

Inicialmente foi determinado o fator de diluição das amostras, através da diluição com tampão cloreto de potássio, pH 1,0, até a absorvância da amostra no λ vis-max (510 nm) estar na faixa de linearidade do espectrofotômetro. Foram preparadas duas diluições da amostra, uma com o tampão cloreto de potássio 0,025M, pH 1,0 (ajustado com ácido clorídrico concentrado), e outra com o tampão acetato de sódio, 0,4M, pH 4,5. Foram feitas leituras a 510 nm e 700 nm, tanto no tampão pH 1,0 quanto no tampão de pH 4,5. A leitura a 700 nm foi realizada para descontar a turbidez da amostra (WROLSTAD, 1976).

As absorvâncias das diluições foram calculadas através da seguinte equação:

$$A = (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 1,0} - (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 4,5}$$

A concentração de antocianinas monoméricas na amostra original foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{Antocianinas monoméricas (mg/Litro)} = (A \times PM \times FD \times 1000) / (\epsilon \times l)$$

Onde: PM é o peso molecular referente a cianidina-3-glicosídeo = 449,2 g/mol, FD é o fator de diluição, e ϵ é a coeficiente de absorvância molar = 26900 L.cm⁻¹ mol⁻¹.

4.4.5. Análises instrumentais de cor

A análise de cor foi avaliada por dois métodos: o método espectrofotométrico para análise de cor do vinho, definido por Glories em 1984 (intensidade de cor e tonalidade) e o método colorimétrico (sistema CIE L*a*b*).

4.4.5.1. Método espectrofotométrico

A metodologia descrita por Glories (1984) considera que os vinhos novos apresentam um máximo de absorvância a 520 nm (característico da cor vermelha), que diminui com o envelhecimento e passa a absorver aos 420 nm, na região dos amarelo-castanhos. A componente azul, devido às formas quinonas das antocianinas livres e

combinadas também deve ser considerada. Por este motivo, a absorvância a 620 nm também contribui para o índice de cor. Dessa forma, o índice de cor (IC) é realizado através das medidas de absorvância a 420, 520 e a 620 nm, utilizando células de quartzo de percurso óptico de 1 cm.

As amostras de vinho e extratos foram diluídas em água destilada, permaneceram em repouso durante quinze minutos, ao abrigo da luz, e foram mensuradas as absorvâncias. O IC foi calculado a partir da soma das absorvâncias nos comprimentos de onda de 420 nm, 520 nm e 620 nm ($IC = Ab. 420 \text{ nm} + Ab. 520 \text{ nm} + Ab. 620 \text{ nm}$). A medida de tonalidade (T) foi obtida através do quociente das absorvâncias de 420 e 520 nm ($T = Ab. 420 / Ab. 520$). A medida do brilho do vinho e extratos (B) foi calculada pela seguinte fórmula: $B = \left(1 - \frac{A_{420} + A_{620}}{2 \times A_{520}}\right) \times 100$.

4.4.5.2. Método colorimétrico baseado no sistema CIE L*a*b*

O cálculo das coordenadas cromáticas utiliza um método definido pela Comissão Internacional de Iluminação (CIE), descrito em ZAMORA (2003) e recomendado pela OIV (2010). A cor das amostras foi mensurada através dos valores de CIE L*, a*, b* utilizando colorímetro Color Quest II Spera (Hunter Lab, Reston, VA) com leituras diretas dos valores de L* (luminosidade), a* (verde-vermelho) e b* (azul-amarelo). Os índices de tonalidade (T*) e saturação (C*) foram calculados a partir dos valores de a* e b*, conforme as equações 1 e 2. Para efetuar a leitura, foi empregado uma cubeta de quartzo com capacidade de 50 mL.

$$T^* = \arctang(b^*/a^*) \quad (\text{Eq. 1})$$

$$C^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2} \quad (\text{Eq. 2})$$

A tonalidade representa a cor propriamente dita, grandeza que caracteriza a qualidade da cor (vermelho, verde, azul etc.) e a saturação expressa a pureza da cor, sua maior ou menor intensidade.

5. RESULTADOS E DICUSSÃO

5.1. Efeitos individuais do sal e dos solventes orgânicos na separação de fases do vinho.

O método proposto é uma extração líquido-líquido, constituído de duas fases: aquosa (90% do vinho utilizado é composto por água) e orgânica constituída pela acetona e etanol adicionados ao vinho. O processo consiste na transferência dos compostos fenólicos da fase aquosa para a fase orgânica. Provavelmente os compostos fenólicos do vinho possuem um coeficiente de distribuição muito baixo entre as fases, o que impede a transferência da maior parte dos compostos para a fase orgânica apenas pela simples agitação do sistema.

No entanto, o coeficiente de distribuição dos compostos pode ser alterado pela adição de um sal inorgânico ao vinho uma vez que os compostos orgânicos são menos solúveis em água com sal do que em água pura (PRAUSNITZ et al., 1999).

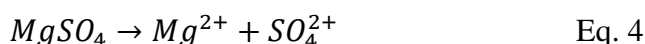
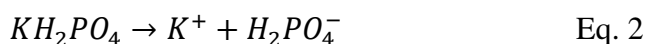
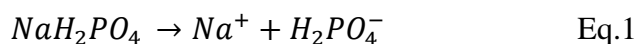
Ao adicionar grande quantidade de sal no vinho, ocorre um grande aumento da força iônica do sistema. A água, que apresenta um grande poder de solvatação, passa a interagir tanto com os compostos fenólicos quanto com os íons provenientes da dissociação do sal. No entanto, como as moléculas de água apresentam maior tendência de solvatação de partículas menores (íons) e foi adicionada uma grande quantidade de sal ao sistema, ocorre uma menor solvatação dos compostos fenólicos pelas moléculas de água, diminuindo a solubilidade em água (SGARBIERI, 1996). Os compostos passam então, a interagir com o solvente orgânico (acetona e etanol). Como estes solventes possuem densidade menor do que a água ocorre a formação de duas fases no sistema, sendo a fase superior e escura (devido aos pigmentos fenólicos) constituída pelos compostos fenólicos concentrados na fase orgânica.

Os resultados dos efeitos individuais do sal e dos solventes orgânicos na separação de fases do vinho mostram que a separação de fases e a quantidade extraída de compostos fenólicos foram influenciadas pelo tipo e concentração do sal testado, assim como pela concentração da acetona e do etanol, conforme a discussão seguinte.

O teor alcoólico do vinho tinto (Canção) utilizado na análise da separação de fases é igual a 10,4% vol. Ou seja, o vinho é constituído de aproximadamente 10% de álcool (etanol) e 90% de água, sendo, portanto, o solvente majoritário no qual os compostos fenólicos estão dissolvidos. As interações entre a água e os compostos fenólicos podem ocorrer por interações dipolo-dipolo e por ligações de hidrogênio. O

etanol presente no vinho também pode solvatar os compostos fenólicos, no entanto, sua contribuição deve ser menor, em razão do seu baixo volume no vinho tinto (10%).

Quando se adiciona um eletrólito inerte (sal muito solúvel) em um meio aquoso, ocorre a dissociação em seus cátions e ânions (Equações 1 a 5), que passam a exercer interações íon-dipolo com a água, aumentando a força iônica do meio.



Sabendo que a água solvata melhor os cátions e ânions, que os compostos covalentes polares, como os compostos fenólicos presentes no vinho, ocorre uma remoção da água de solvatação dos compostos covalentes polares (compostos fenólicos), que passam a se solvatar no etanol. Uma vez que o etanol se encontra em menor concentração que a água, os compostos fenólicos são concentrados no pequeno volume de etanol presente no vinho.

Nesse estudo foram avaliados cinco tipos de sais nas seguintes concentrações: 0,0, a 90,0 % (m/v). No entanto, foi observado separação de fases apenas quando foi adicionado ao vinho o NaH_2PO_4 . Esse sal é um eletrólito muito solúvel, sendo a sua solubilidade em água igual a 850 g/L ou 85% m/v. Ao avaliarmos a força iônica provocado por esse sal ao adiciona-lo no vinho, observa-se que se trata de um eletrólito 1:1, e portanto a sua concentração será igual a sua força iônica. Logo, a força iônica do sal é igual a 7 mol/L, correspondente a solubilidade do sal (85% m/v).

O resultado do efeito individual do NaH_2PO_4 é apresentado e discutido pelo Figura 1, que mostra o efeito da força iônica do sal sobre o teor de fenóis totais da fase superior. Observa-se que o NaH_2PO_4 promoveu a separação de fases somente após ao atingir a força iônica de aproximadamente 4 mol/L, correspondente a 50% da concentração de sal. Ou seja, abaixo dessa concentração a força iônica não foi suficiente para diminuir a solvatação da água aos compostos fenólicos. No entanto, na concentração de 60% ou 5 mol/L de força iônica, foi observado o maior teor de fenólicos totais na fase superior (56,8 g EAG/L). Acima dessa concentração, o teor de

fenóis totais diminuiu. Provavelmente acima do limite de solubilidade do sal os íons devem competir pelo etanol, o que diminuiu a separação de fases. Dessa forma, a concentração de 60 % (m/v) ou 5 mol/L de força iônica do NaH_2PO_4 foi selecionada como ponto central para o experimento com a metodologia de superfície de resposta.

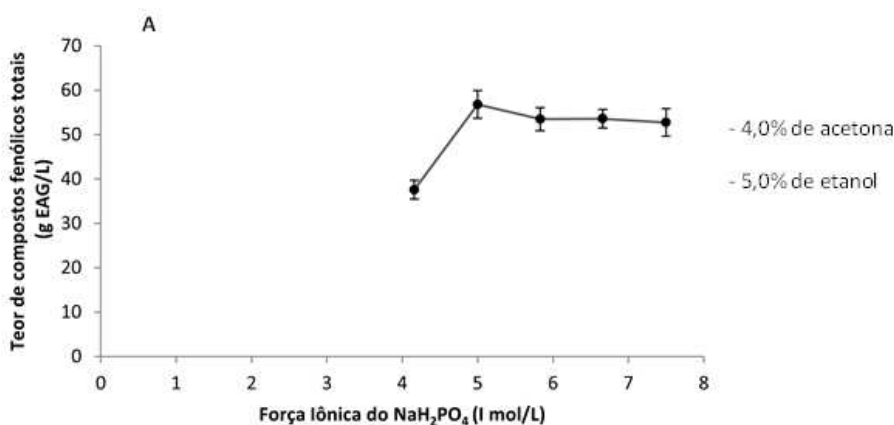


Figura 1. Separação de fases e variação do teor de fenólicos totais na fase superior (escura) em função da concentração (força iônica) individual de NaH_2PO_4 adicionado no meio extrator, nas concentrações constantes de acetona (4,0%) e etanol (5,0%).

Com relação aos efeitos das concentrações individuais de acetona e etanol, a Figura 2 A mostra que o maior teor observado de compostos fenólicos (47,8 g EAG/L) na fase superior (escura), quando se testou a concentração de acetona, ocorreu na concentração de 4,0%, acima dessa concentração o teor de fenólicos extraídos diminuiu. O teor de compostos fenólicos no extrato diminuiu com o aumento da concentração de etanol (Figura 2B), sendo o maior teor amostral (53,6 g EAG/L), obtido na concentração de 2,0%. Acima dessa concentração o teor de compostos fenólicos extraídos diminuiu. As concentrações de 4,0 % (v/v) e 2,0 % (v/v) foram utilizados como ponto de partida para a otimização da extração de compostos fenólicos através da metodologia de superfície de resposta.

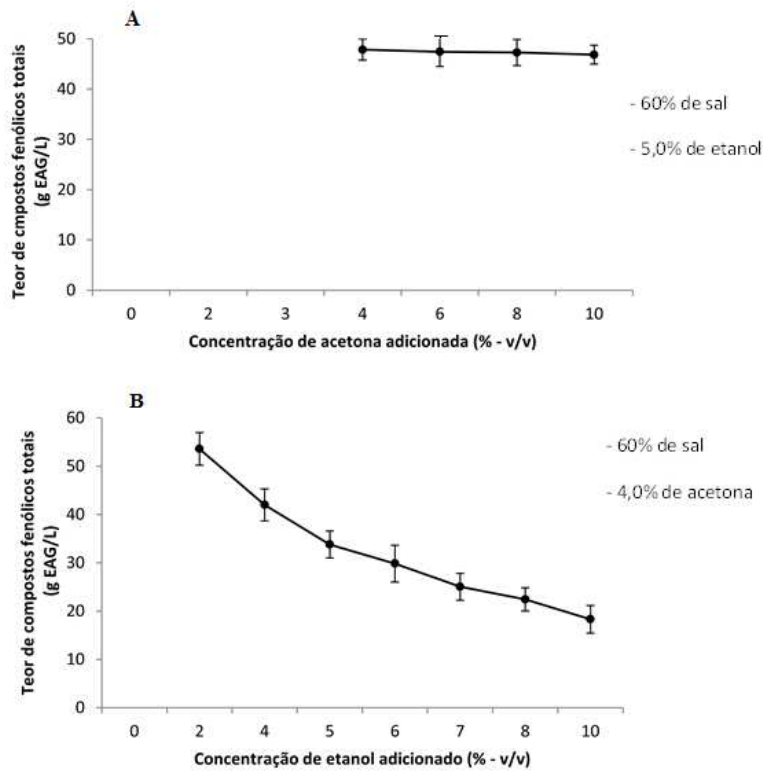


Figura 2. Separação de fases e variação do teor de fenólicos totais na fase superior (escura) em função das concentrações individuais de acetona (A) e etanol (B) adicionados no meio extrator.

5.2. Otimização da extração de compostos fenólicos do vinho tinto

O efeito das concentrações de NaH_2PO_4 (X_1), de acetona (X_2) e de etanol (X_3), sobre o teor de compostos fenólicos (variável resposta) foi investigado. Os resultados de 18 ensaios utilizando o delineamento composto central rotativo estão apresentados na Tabela 1, que inclui também os valores das variáveis independentes, as respostas observadas e os valores estimados pela equação de regressão ajustada. Não ocorreu separação de fases nos ensaios experimentais 1 e 13. Há concordância entre valores experimentais e os estimados pela equação de regressão ajustada para a maioria dos ensaios experimentais. Os resultados também mostraram que o teor de compostos fenólicos totais observados variou de 45,15 a 66,78 g EAG/L e, os valores preditos, variaram de 47,55 a 63,63 g EAG/L, respectivamente.

Tabela 1. Delineamento composto central rotativo das variáveis independentes (NaH_2PO_4 , acetona e etanol) e respostas observadas e valores preditos do teor de compostos fenólicos totais.

Ensaio Experimentais	NaH_2PO_4 (%) (X_1)	Acetona (%) (X_2)	Etanol (%) (X_3)	Teor de Compostos Fenólicos Totais (g EAG/L)	
				Valor observado	Valor Predito
1	55,0	3,0	1,0	--	--
2	55,0	3,0	2,0	60,47	59,15
3	55,0	4,0	1,0	51,57	54,76
4	55,0	4,0	2,0	55,79	54,76
5	65,0	3,0	1,0	46,47	53,98
6	65,0	3,0	2,0	55,82	53,98
7	65,0	4,0	1,0	56,05	49,59
8	65,0	4,0	2,0	45,15	49,59
9	60,0	3,5	0,7	65,21	63,63
10	60,0	3,5	2,3	53,79	63,63
11	60,0	2,6	2,0	54,52	52,69
12	60,0	4,3	2,0	47,79	48,35
13	51,0	3,5	2,0	--	--
14	68,0	3,5	2,0	49,31	47,55
15	60,0	3,5	1,5	65,37	63,63
16	60,0	3,5	1,5	65,73	63,63
17	60,0	3,5	1,5	66,37	63,63
18	60,0	3,5	1,5	66,78	63,63

Legenda: -- : não ocorreu separação de fases.

5.2.1. Ajuste da equação de regressão

A Tabela 2 apresenta os resultados da análise do modelo quadrático. A análise de variância da regressão indica contribuição significativa das variáveis experimentais NaH_2PO_4 e acetona sobre o teor de fenólicos totais extraídos ($p < 0,07$). A significância de cada efeito foi determinada utilizando o teste t e o valor de p(F) na Tabela 2.

Tabela 2. Análise de variância para o modelo de superfície de resposta e valores de P(t) para as estimativas dos coeficientes da regressão de segundo grau da variável resposta (fenólicos totais) em função das variáveis independentes (X_1 , X_2 , X_3).

Efeitos	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valor de P(t)
<i>Modelo</i>	9	70,90	
X_1 (NaH_2PO_4)	1	117,02	0,1079
X_2 (acetona)	1	50,42	0,1699
X_3 (etanol)	1	78,22	0,2538
$X_1.X_2$	1	109,65	0,7325
$X_1.X_3$	1	249,43	0,6483
$X_2.X_3$	1	58,75	0,2545
X_1^2	1	24,71	0,0618
X_2^2	1	0,17	0,0170
X_3^2	1	35,89	0,1584
<i>Resíduo da Regressão</i>	6	22,62	
<i>Falta de ajuste</i>	3	44,84	P(F)=0,0014
<i>Erro puro</i>	3	0,40	

O modelo quadrático em X_1 (Fosfato), X_2 (Acetona) e X_3 (Etanol) apresentou falta de ajuste significativa, com $P(F) = 0,0014$ (Tabela 2). Ao se analisar as estimativas dos coeficientes desta regressão verificou-se que apenas as dos efeitos quadráticos de X_1 (Fosfato), com valor de $P(t) = 0,0618$ e de X_2 (Acetona), com $P(t) = 0,0170$ (Tabela 2), são significativas. Nenhuma das estimativas de coeficientes da regressão envolvendo a variável X_3 (Etanol) foi significativa ($P > 0,10$). Conclui-se desta forma, que, na faixa estudada, o etanol não apresentou efeito sobre a extração de compostos fenólicos totais. Provavelmente, isto ocorre em razão de o etanol já fazer parte da composição do vinho. O teor alcoólico médio do vinho utilizado no experimento foi de 10,4%.

Os resultados da análise anterior sugerem testar o modelo quadrático em X_1 (Fosfato), X_2 (Acetona). Ao se analisar o modelo quadrático completo, a $P(t)$ para a estimativa do coeficiente da regressão para a interação X_1 (Fosfato) e X_2 (Acetona) foi de 0,3992, portanto, não significativa. Desta forma, decidiu-se testar o modelo quadrático em X_1 (Fosfato) e X_2 (Acetona) sem a interação, (Tabela 3).

Tabela 3. Análise de variância para o modelo de superfície de resposta e valores de P(t) para as estimativas dos coeficientes da regressão de segundo grau da variável resposta (fenólicos totais) em função das variáveis independentes X_1 e X_2 , sem a interação.

Efeitos	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valor de P(t)
<i>Modelo</i>	4	146,72	
X_1	1	117,02	0,0415
X_2	1	50,42	0,0066
X_1^2	1	134,23	0,0351
X_2^2	1	285,19	0,0055
<i>Resíduo da Regressão</i>	11	24,10	
<i>Falta de ajuste</i>	8	32,99	P(F)=0,0020
<i>Erro puro</i>	3	0,40	

$R^2 = 0,6888$

A análise de variância desta regressão indica falta de ajuste significativa, com $P(F) = 0,0020$. Entretanto, ela pode ser considerada desprezível, sendo sua soma de quadrados menor do que 30 % da soma de quadrados do modelo. As estimativas dos coeficientes da regressão em X_1 (Fosfato) e X_2 (Acetona) foram significativas ($P < 0,05$), (Tabela 3). Assim, o modelo quadrático ajustado explicando a variação do teor de compostos fenólicos totais em função das variáveis independentes é dado pela Equação 6.

$$Y = -786,77 + 218,6865.X_1 + 1243,0277.X_2 - 18,6547.X_1^2 - 1838,4329.X_2^2 \quad (\text{Eq. 6}).$$

Os resultados também mostram que a variável independente X_2 (concentração de acetona) tende a ter maior efeito do que a variável X_1 (fosfato) na extração de compostos fenólicos, Equação 6. Dessa forma, os resultados apresentados nas Tabelas 2 e 3 sugerem que as alterações nas concentrações do sal fosfato e acetona apresentaram efeitos significativos ($p < 0,05$) sobre o teor de compostos fenólicos. O coeficiente de determinação (R^2) do modelo ajustado foi de 0,6888, o que implica que cerca de 69% das variações podem ser explicadas pelo modelo ajustado. O coeficiente de correlação entre os valores observados e os estimados pela Equação 6 é de 0,8299. Este coeficiente indica boa correlação entre estes valores.

5.3. Interpretação do modelo de superfície de resposta

O gráfico da superfície de respostas e de contorno para o teor de compostos fenólicos totais no vinho em função das concentrações de NaH_2PO_4 e de acetona, com base na equação 6, está apresentado na Figura 3. Ele mostra o efeito das concentrações de NaH_2PO_4 e acetona sobre o teor de compostos fenólicos.

A região intermediária da concentração de NaH_2PO_4 (5,9 g) e de acetona (0,34 mL) fornece o maior teor estimado de compostos fenólicos (64,22 g EAG/L), comparado com as regiões de concentrações extremas que possuem efeito negativo na resposta.

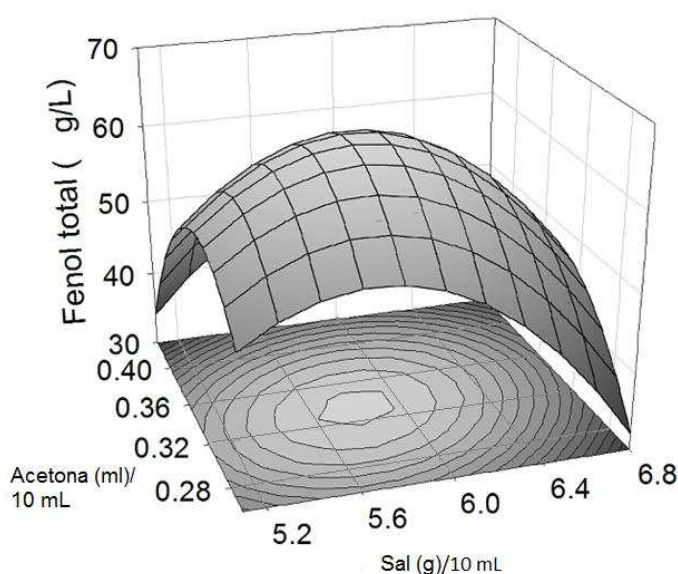


Figura 3. Gráfico de superfície de resposta e de contorno do teor de compostos fenólicos totais em vinho tinto Canção em função da concentração de NaH_2PO_4 (sal) e de acetona (mL) em 10 mL de vinho.

5.4. Validação do modelo ajustado

As condições otimizadas obtidas pela metodologia de superfície de resposta foram utilizadas para validar o modelo preditivo de extração de compostos fenólicos do vinho tinto. A Tabela 4 apresenta as condições ótimas para a resposta e os valores estimados e experimentais. Apesar de o etanol não apresentar efeito significativo na resposta, a concentração de 1,5% (nível zero na escala codificada) foi considerada como uma condição ótima, uma vez que a sua ausência não permite que a separação de fases ocorra. Na concentração de 59% de NaH_2PO_4 , 3,4% de acetona e 1,5% de etanol, o valor experimental médio do teor de compostos fenólicos totais foi de 64,19 g EAG/L

(n=5). O valor estimado pela equação de regressão foi 64,22 g EAG/L. Os resultados indicam que os valores estimados estão em concordância com os experimentais, e também sugerem que o modelo de regressão foi adequado para estimar a extração de compostos fenólicos do vinho tinto.

Tabela 4. Valores observados e estimados nas condições otimizadas, utilizando o vinho tinto Canção.

NaH ₂ PO ₄ (%)	Acetona (%)	Etanol (%)	Teor de Compostos Fenólicos Totais (g EAG/L)	
			Observado (n = 5)	Estimado
59,0	3,4	1,5	64,19±1,22	64,22

A Figura 4 mostra a separação do vinho em fase clara e escura (Figura 3b e 3c), utilizando as concentrações otimizadas dos reagentes. Observa-se pela Figura 3 e pelos resultados da Tabela 4 que as concentrações otimizadas dos reagentes promoveram uma eficiente separação de fases e obtenção de extrato fenólico concentrado.

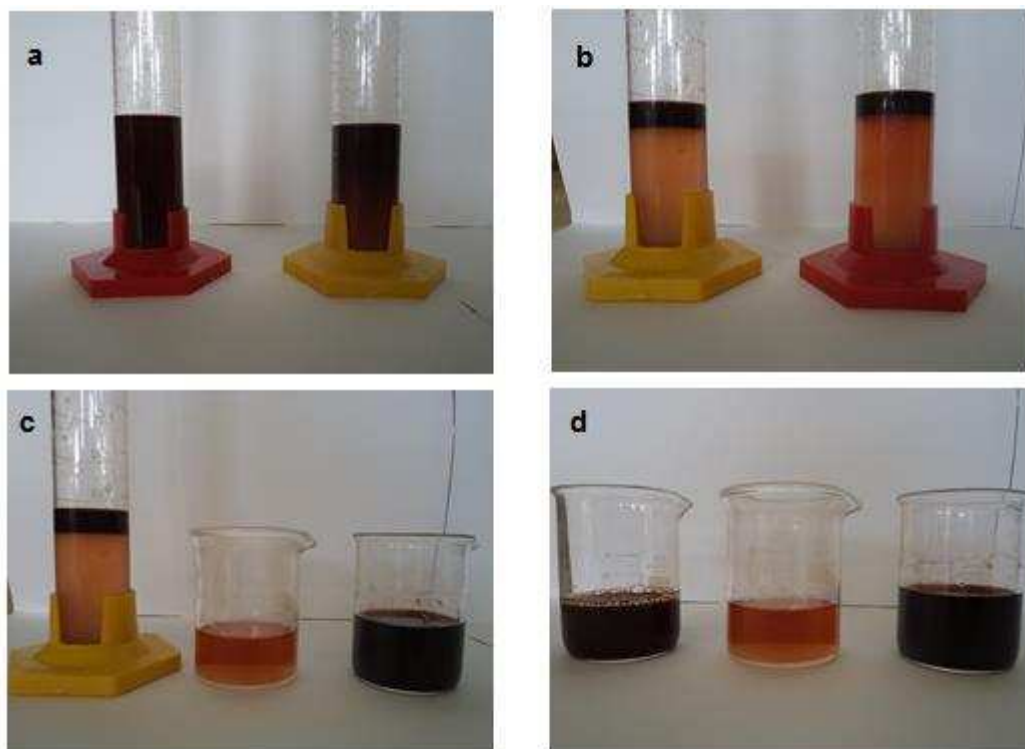


Figura 4. Representação fotográfica da separação de fases do vinho. (a) Antes da separação de fases, e após a separação de fases (b e c). Vinho, fase clara e fase escura (extrato fenólico) (d).

5.5. Aplicação da metodologia otimizada na extração de compostos fenólicos em vinhos tintos

As concentrações otimizadas de NaH_2PO_4 , acetona e etanol foram testadas em seis vinhos tintos, obtendo-se seis extratos fenólicos, que foram avaliados em relação ao teor de compostos fenólicos totais, conforme apresentado na Tabela 5.

Tabela 5. Estimativa média* do teor de fenóis totais em vinhos e extratos.

Vinho	Teor de fenóis totais (g EAG/L) no vinho	Teor de fenóis totais (g EAG/L) no extrato	Fator de concentração
Aurora (Merlot)	15,08 ± 1,08 a	95,31 ± 5,51 a	6,32
Terra Nova (Vale S. Francisco)	14,44 ± 1,52 a	70,33 ± 8,22 b	4,87
Gato Negro (Carmenere) Chileno	13,36 ± 2,52 a	60,71 ± 5,87 b c	4,54
Almadén (Cabernet Sauvignon)	13,50 ± 1,44 a	65,14 ± 3,34 b c	4,82
V. Marcus James (Pinotage)	13,87 ± 1,27 a	66,45 ± 5,09 c	4,79
Isabel: Cantina Mattiello	7,83 ± 0,73 b	46,74 ± 4,62 c	5,96

*Média de 3 repetições ± desvio padrão. Médias nas colunas seguidas pela mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey. EAG : Equivalentes de Ácido Gálico.

Segundo a Tabela 5, apenas o vinho Isabel diferiu estatisticamente no teor de compostos fenólicos em relação aos demais vinhos, sendo o seu teor considerado inferior.

Os extratos apresentaram teores de compostos fenólicos totais de 4,54 a 6,32 vezes superiores aos encontrados nos vinhos, sugerindo que a metodologia apresentada neste trabalho é realmente efetiva. O teor de compostos fenólicos totais no extrato proveniente do vinho Aurora foi estatisticamente superior em relação aos demais extratos, sendo utilizado no estudo da avaliação da estabilidade.

5.6. Avaliação da estabilidade do extrato frente a diferentes condições de estocagem e utilização

Para avaliar a influência das condições de estocagem sobre a estabilidade do extrato, foi utilizado o vinho tinto Aurora para obter o extrato fenólico, em função do

seu elevado teor de compostos fenólicos totais conforme apresentado na Tabela 5. O extrato obtido foi estocado na forma líquida, em três diferentes valores de pH (3,0, 3,8 e 6,0), e também na forma liofilizada, durante 90 dias de estocagem em quatro diferentes temperaturas (-10°C, 4°C, 25°C e 35°C). Os extratos foram mantidos ao abrigo da luz e em frascos fechados, mas o oxigênio não foi removido dos frascos no intuito de simular condições pró-oxidantes. Amostras do vinho tinto Aurora utilizado na obtenção dos extratos também foram avaliadas quanto ao teor de fenóis totais, antocianinas monoméricas, atividade antioxidante, cor e teores de ácido gálico, catequina e quercetina.

5.6.1. Conteúdo e estabilidade de compostos fenólicos, atividade antioxidante e parâmetros de cor

Os conteúdos médios de fenóis totais, antocianinas monoméricas, atividade antioxidante, parâmetros de cor e compostos fenólicos individuais, nos extratos liofilizado, líquido (pH 3,8), pH 3,0 e pH 6,0, assim como no vinho tinto Aurora estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Teores médios* de fenóis totais, antocianinas monoméricas, quercetina, catequina, ácido gálico, parâmetros de cor e atividade antioxidante *in vitro* dos extratos e vinho.

Parâmetros	Vinho Aurora	Extratos			
		Líquido (pH = 3,8)	pH 3,0	PH 6,0	Liofilizado
Fenóis totais (g/L)	14,29 ± 1,53	101,38 ± 25,78a	70,94 ± 19,99a	94,72 ± 22,09a	100,03 ± 24,34a
Ativ. Antiox. (%IR)	89,01 ± 0,65	81,26 ± 5,59a	81,03 ± 5,01a	81,14 ± 4,44a	78,60 ± 4,98b
Antocianinas Monoméricas (mg/L)	185,33 ± 4,93	1553,61 ± 261,43c	1951,3 ± 299,49b	1263,64 ± 196,27c	2424,64 ± 596,66a
Quercetina (mg/L)	9,05 ± 0,09	45,62 ± 0,16a	33,13 ± 0,13b	45,68 ± 0,17a	49,46 ± 0,04a
Catequina (mg/L)	62,56 ± 0,89	343,51 ± 0,83a	218,50 ± 0,86c	285,08 ± 0,96b	210,85 ± 0,52c
Ácido gálico (mg/L)	34,02 ± 0,76	273,83 ± 1,30a	176,54 ± 0,75c	187,47 ± 0,68c	198,65 ± 0,33b
Índice de Cor	1,31 ± 0,01	0,81 ± 0,08c	0,95 ± 0,15b	0,77 ± 0,12c	1,28 ± 0,34a
Tonalidade	0,77 ± 0,23	1,08 ± 0,12b	0,96 ± 0,16c	1,26 ± 0,16a	0,94 ± 0,04c
Brilho	47,12 ± 11,82	33,73 ± 7,73b	43,28 ± 10,67a	17,71 ± 4,01c	35,89 ± 4,09b
a*	49,12 ± 6,08	0,17 ± 0,09a	0,27 ± 0,03a	0,11 ± 0,05a	-
b*	21,76 ± 4,21	-0,47 ± 0,18a	-0,48 ± 0,12a	-0,50 ± 0,03a	-
L*	34,98 ± 3,89	23,83 ± 1,733 ^a	23,87 ± 1,79 ^a	23,71 ± 2,11 ^a	-
Tonalidade (H*)	35,08 ± 4,67	-1,03 ± 0,15 ^a	-1,03 ± 0,24 ^a	-0,89 ± 0,37 ^a	-
Saturação (C*)	60,61 ± 5,89	0,57 ± 0,12a	0,46 ± 0,13b	0,62 ± 0,13a	-

*Média de 84 repetições ± desvio-padrão. Médias nas linhas seguidas pela mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

5.6.1.1. Compostos Fenólicos Totais

O teor médio de compostos fenólicos totais nos extratos variou de 70,94 a 101,38 g/L. O vinho tinto Aurora apresentou teor médio igual a 14,29 g/L, sendo os extratos concentrados de 5 a 7 vezes em relação ao teor de compostos fenólicos do vinho. O teor de fenóis totais no vinho Aurora foi superior ao encontrado por Santin et al., (2009), em vinhos da variedade Merlot, cujo teor variou de 3,34 g/L a 4,06 g/L em função de diferentes safras, assim como no estudo de Cadahía e colaboradores (2009) (2,92 g/L a 3,03 g/L). Lucena et al., (2010) encontraram concentração média de 4,7 g/L de fenóis totais em vinhos Merlot da região do Vale do São Francisco. Teores inferiores foram observados por Gállice et al.,(2011) ao avaliarem 47 vinhos tintos fabricados na região sul do Brasil, os quais apresentaram teor médio de 1,91 g/L.

A concentração de polifenóis em vinhos depende de vários fatores, entre eles a variedade da uva, condições climáticas, técnicas de cultivo das uvas e vinificação (RASTIJA et al., 2009). Tais fatores podem justificar a variação no teor de fenóis totais observadas nos estudos.

Com relação a estabilidade (Apêndice A) dos extratos avaliados, o conteúdo de compostos fenólicos totais exibiu diferença significativa durante os 90 dias de estocagem, apresentando interações significativas ($p < 0,05$) para as fontes de variação relacionadas com o tempo. Tanto a temperatura quanto o tipo de extrato influenciaram no teor de fenóis totais durante o tempo de armazenamento, exibindo interação tripla significativa (Extrato*Temperatura*Tempo = 0,0040).

Diante desses resultados, as interações significativas foram desdobradas a fim de avaliar em cada temperatura a influencia do tempo de estocagem em cada tipo de extrato ($p < 0,05$).

Para o extrato líquido e o extrato com pH 3,0, com exceção da temperatura de -10°C, as demais temperaturas sofreram influencia do tempo de estocagem no teor de fenóis totais dos extratos, entretanto apenas a temperatura de 35°C permitiu ajustar um modelo de equação de primeiro grau para os dois extratos, mostrando a relação entre o teor de fenóis totais e o tempo de estocagem (Tabela 7). Nos extratos pH 6,0 e liofilizado todas as temperaturas sofreram influencia do tempo de estocagem no teor de fenóis totais. No entanto, para extrato pH 6,0 nenhum modelo de equação permitiu ser ajustado para todas as temperaturas avaliadas. Já para o extrato liofilizado foi possível

ajustar um modelo de equação de primeiro grau somente para a temperatura de 35°C, conforme apresentado na Tabela 7.

Tabela 7. Modelos de equação de regressão da variação de fenóis totais em função do tempo de estocagem (X) e seus respectivos coeficientes de determinação (R²) e níveis de probabilidade (p) para as temperaturas analisadas nos extrato líquido, pH 3,0, pH 6,0 e liofilizado.

Parâmetro	Extrato	Temperatura	Modelo de Regressão	R ²	P > F	
Fenóis totais	Líquido	4 °C	192,0088	---	0,0091*	
		25 °C	188,7586	---	0,0021*	
		35 °C	164,40 – 1,3640X	0,9789	0,0014*	
	pH 3,0	4 °C	122,2594	---	0,0024*	
		25 °C	131,8673	---	0,0089*	
		35 °C	121,31 – 0,0897X	0,9834	<0,0001*	
	pH 6,0	-10 °C	156,0828	---	<0,0001*	
		4 °C	170,5391	---	<0,0001*	
		25 °C	160,9674	---	<0,0001*	
		35 °C	171,8887	---	<0,0001*	
		Liofilizado	-10 °C	166,1872	---	0,0065*
			4 °C	173,7702	---	<0,0001*
	25 °C		150,8268	---	0,0003*	
			35 °C	179,86 – 0,5578X	0,8298	<0,0001*

X = tempo de armazenamento; * significativo a 5 % de probabilidade, ns – não significativo.

As equações ajustadas para os extratos líquido, pH 3,0 e liofilizado, armazenados na temperatura de 35°C, demonstram uma relação inversa entre a tempo de estocagem e o teor de compostos fenólicos totais, ou seja, quanto maior a tempo de armazenamento menor o teor de fenóis totais. Logo, recomenda-se que os extratos sejam armazenamento sob congelamento ou refrigeração para a manutenção dos compostos fenólicos totais.

Os resultados também foram representados em gráfico para se observar a variação ao longo do tempo, do teor de fenóis totais, conforme apresentado na figura 5.

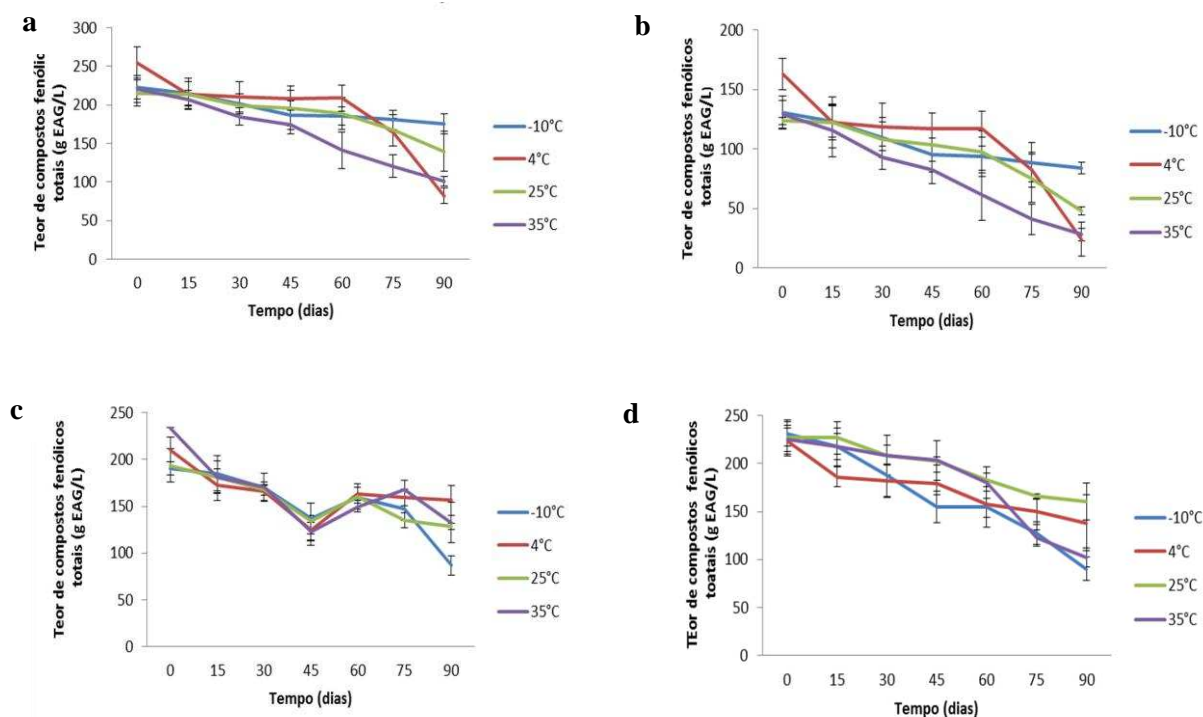


Figura 5. Variação da concentração de fenólicos totais no extrato líquido (pH 3,89) (a), pH 3,0 (b), pH 6,0 (c), e liofilizado (d), em função do tempo de armazenamento para cada temperatura avaliada. Média \pm desvio padrão, n=3.

Os gráficos mostram a variação significativa do teor de fenóis totais em função do tempo, em todas as temperaturas de armazenamento avaliadas. Pela análise da figura 5 observa-se que para todos os extratos avaliados, durante os 90 dias de estocagem houve redução significativa no teor de compostos fenólicos em todas as temperaturas avaliadas (com exceção da temperatura de -10°C , nos extratos líquido e pH 3,0).

Resultados semelhantes foram observados por Srivastava e colaboradores (2007), ao avaliarem a estabilidade de extrato de mirtilo armazenados em garrafas de vidros, durante 60 dias de estocagem a -20°C , 6°C , 23°C e 35°C . Segundo os autores o teor de fenólicos totais do extrato se manteve constante na temperatura de -20°C , durante os 60 dias de estocagem. No entanto nas temperaturas de 6°C , 23°C e 35°C os autores observaram reduções significativas no teor de fenóis totais durante os 60 dias de estocagem.

5.6.1.2. Antocianinas Monoméricas

O conteúdo de antocianinas monoméricas variou entre 1263,64 a 2424,64 mg/L. Dentre os extratos avaliados o liofilizado apresentou o maior conteúdo. Segundo

George et al., (2011) e Ratti (2001), a liofilização é uma técnica que resulta em produtos desidratados de alta qualidade devido à minimização da atividade de água e as baixas temperaturas exigidas no processo. A baixa mobilidade da água durante a secagem por liofilização também protege a estrutura primária e minimiza mudanças na forma do produto, contribuindo para preservar componentes como os pigmentos naturais (GEORGE e DATTA, 2002; GEORGE et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2012). Como consequência, o extrato liofilizado apresentou uma concentração de antocianinas 35% superior ao conteúdo observado no extrato líquido.

O vinho tinto Aurora apresentou conteúdo médio de antocianinas em torno de 185,33 mg/L, sendo de 7 a 14 vezes inferior ao conteúdo de antocianinas monoméricas nos extratos. Esse resultado afirma o extrato como uma boa fonte de antocianinas. Na literatura valores inferiores de antocianinas foram encontrados em vinhos Merlot (5,2 mg/L) no estudo de Lucena et al., (2010). No entanto, nos estudos de Arbuseri (2010) e Mulero et al., (2010), os teores observados foram superiores (296,6 mg/L e 309,5 mg/L, respectivamente) aos observados nesse trabalho.

A ANOVA (Apêndice B) indicou que o conteúdo de antocianinas monoméricas permaneceu constante em relação ao tempo de estocagem para todas as temperaturas avaliadas ($p > 0,05$). No entanto, muitos estudos na literatura têm relatado uma cinética de degradação de primeira ordem em estudos avaliando a estabilidade tanto por longos ou curtos períodos. No estudo de Amendola et al., (2010) a degradação de antocianinas de extrato do bagaço de uva armazenado a 25°C pareceu seguir uma cinética de primeira ordem durante os primeiros 47 dias de estocagem. Tonon et al., (2010) observaram que a degradação de antocianinas em suco de açaí atomizado exibiu duas cinéticas de primeira ordem: a primeira e mais acentuada durante os primeiros 45 – 60 dias de armazenamento, e a segunda após esse período, exibindo uma taxa de degradação mais lenta. Na literatura são encontrados estudos relacionados a investigação dos fatores que podem influenciar na degradação de antocianinas tais como a exposição a luz, disponibilidade de oxigênio, estrutura química e concentração de antocianinas, além da presença de outros compostos fenólicos (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009; JIMÉNEZ et al., 2010; JING et al., 2012; HELLSTROM et al., 2013; SUI et al., 2014).

No entanto, a análise dos resultados apresentou variação significativa para a interação Extrato*Temperatura ($p = 0,0021$), permitindo fazer o desdobramento dessa

interação. A ANOVA para a interação Extrato*Temperatura foi conclusiva, indicando que a temperatura influencia de forma significativa no teor de antocianinas dos extratos avaliados, com exceção do extrato com pH 3,0 ($p > 0,05$).

Apesar de comprovada a influência da temperatura nos três extratos, não foi possível determinar uma equação que demonstrasse a relação da temperatura no teor de antocianinas. No entanto, Tonon et al., (2010) afirmam que o aumento da temperatura leva a uma rápida degradação das antocianinas, o que já seria esperado, uma vez que as antocianinas são compostos termo sensíveis. Relatam ainda que muitos pesquisadores têm observado a influência negativa da temperatura na estabilidade das antocianinas. Segundo Schwartz et al., (2010), os mecanismos de degradação térmica estão relacionados com a clivagem do anel heterocíclico da pseudo-base com formação de chalcona, e posterior formação de derivados de coloração marrom (Figura 6). Pacheco-Palencia et al., (2007) avaliaram a estabilidade de polpa de açaí, e verificaram uma taxa de degradação 3,5 vezes maior quando as amostras foram estocadas a 20°C do que quando estocadas a 4°C.

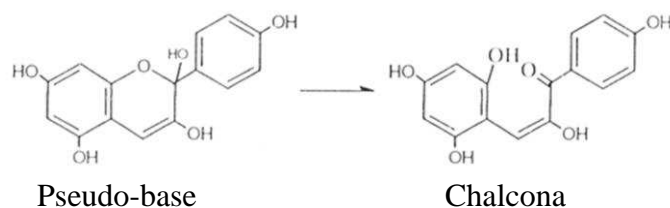


Figura 6. Mecanismo de degradação térmica das antocianinas.

5.6.1.3. Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante *in vitro* avaliada pela porcentagem de inibição do radical DPPH (%IR) variou de 78,60 a 81,26% nos extratos avaliados, enquanto no vinho tinto Aurora a % IR foi de 89,01%, sendo maior que a atividade antioxidante dos extratos. Granato et al., (2010) ao avaliarem 73 amostras de vinhos de diferentes variedades, produzidos no Brasil, Argentina e Chile encontraram uma porcentagem de inibição variando entre 47,93 a 66,70% IR. Tais resultados evidenciam a boa atividade antioxidante exibida pelo vinho e pelos extratos analisados nesse trabalho.

A análise estatística da estabilidade (Apêndice C) indicou que a atividade antioxidante se manteve estável durante os 90 dias e não sofreu influência das temperaturas de estocagem, sendo as fontes de variações relacionadas com o tempo,

além do fator temperatura e suas interações não significativas ($p > 0,05$). Amendola et al., (2010), apresentaram resultados semelhantes ao avaliar a atividade antioxidante de extrato fenólico obtido do bagaço de uva. Foi observada constante atividade antioxidante em extratos armazenados a 4°C e a 25°C por mais de 100 dias de estocagem. Já Tonon et al., (2010), relataram redução significativa na atividade antioxidante de suco de açaí, principalmente nos primeiros 45-60 dias de um total de 120 dias de armazenamento tanto na temperatura de 25°C quanto de 35°C.

A atividade antioxidante de cada extrato é uma propriedade que resulta da presença de diversas espécies antioxidantes que podem apresentar diferentes características estruturais e diferentes mecanismos de ação (RODRIGUES, 2011). Foi comparada a atividade antioxidante, o teor de fenóis totais e o teor de antocianinas monoméricas dos extratos, e testada a existência de relações lineares entre estes parâmetros. Assim, determinaram-se os coeficientes de correlação de Pearson correspondentes a estes parâmetros (Tabela 8).

Tabela 8. Coeficientes de correlação de Pearson entre parâmetros descritivos da atividade antioxidante dos extratos fenólicos e os teores de compostos fenólicos totais e antocianinas monoméricas.

	Atividade Antioxidante - DPPH			
	Líquido	pH 3,0	pH 6,0	Liofilizado
Fenóis totais	0,6647	0,7452	0,6014	0,8150
Antocianinas	0,6463	0,6700	0,6380	0,6888

Segundo Rodrigues (2011), quando o coeficiente de Pearson se situa entre 0,5 e 0,8, considera-se que os parâmetros envolvidos estão moderadamente correlacionados através de uma função linear; quando o coeficiente é superior a 0,8 considera-se existir uma correlação linear forte entre os parâmetros. Logo, para todos os extratos avaliados foi observada uma correlação linear positiva entre o teor de antocianinas monoméricas e a atividade antioxidante, indicando influencia positiva das moléculas de antocianinas na atividade antioxidante dos extratos.

Correlação linear moderada positiva também foi observada entre o teor de fenóis totais e a atividade antioxidante para os extratos líquido, pH 3,0 e pH 6,0. Enquanto para o extrato liofilizado foi encontrada uma forte correlação positiva, demonstrando grande influencia dos compostos fenólicos na atividade antioxidante desse extrato.

Estudos anteriores (MORAES-DE-SOUZA et al., 2011; RODRIGUES, 2011; BERTOLDI et al., 2012; CHIRINOS et al., 2013; WANG et al.; 2014) relataram a elevada correlação entre a atividade antioxidante e a composição de antocianinas e polifenóis presentes em alimentos.

Logo, os extratos avaliados apresentaram estabilidade em relação ao tempo para o teor de antocianinas, o que provavelmente contribuiu para a estabilidade da atividade antioxidante observada ao longo dos 90 dias.

No entanto, a análise da variação da atividade antioxidante pela ANOVA foi dependente apenas do tipo de extrato avaliado ($p = 0,0069$). Deste modo, avaliou-se as médias pelo teste Tukey à 5 % de probabilidade, como exposto na Tabela 9.

Tabela 9. Resultados médios da atividade antioxidante dos extratos avaliados.

Extrato	Média
Líquido	81,26 ^a
pH 3,0	81,14 ^a
pH 6,0	81,03 ^a
Liofilizado	78,60 ^b

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si, a 5 % de probabilidade, pelo Teste Tukey.

O extrato liofilizado apresentou a menor média, sugerindo que o processo de secagem por liofilização favoreceu a perda da atividade antioxidante, apesar de o teor de fenólicos totais e antocianinas monoméricas que provavelmente contribuem para a atividade antioxidante, não terem sofrido influência do tipo de extrato. A grande maioria dos estudos encontrados na literatura relata a manutenção ou maior atividade antioxidante de extratos liofilizados em relação aos extratos líquidos de diferentes amostras de alimentos (TABART et al., 2007; SILVA et al., 2012; CESÁRIO et al., 2014).

5.6.1.4. Dosagens de ácido gálico, catequina e quercetina

A figura 7 apresenta o perfil cromatográfico típico dos extratos analisados neste estudo. Ácido gálico, catequina e quercetina foram identificados em todos os extratos (líquido, pH 3,0, pH 6,0 e liofilizado) avaliados. O método de análise permitiu uma boa resolução dos picos, o que assegurou uma quantificação adequada dos compostos. O tempo de corrida para a análise cromatográfica foi de 35 minutos. O tempo de retenção para o ácido gálico, catequina e quercetina foi, aproximadamente, 7,0, 7,5 e 24,0 minutos, respectivamente.

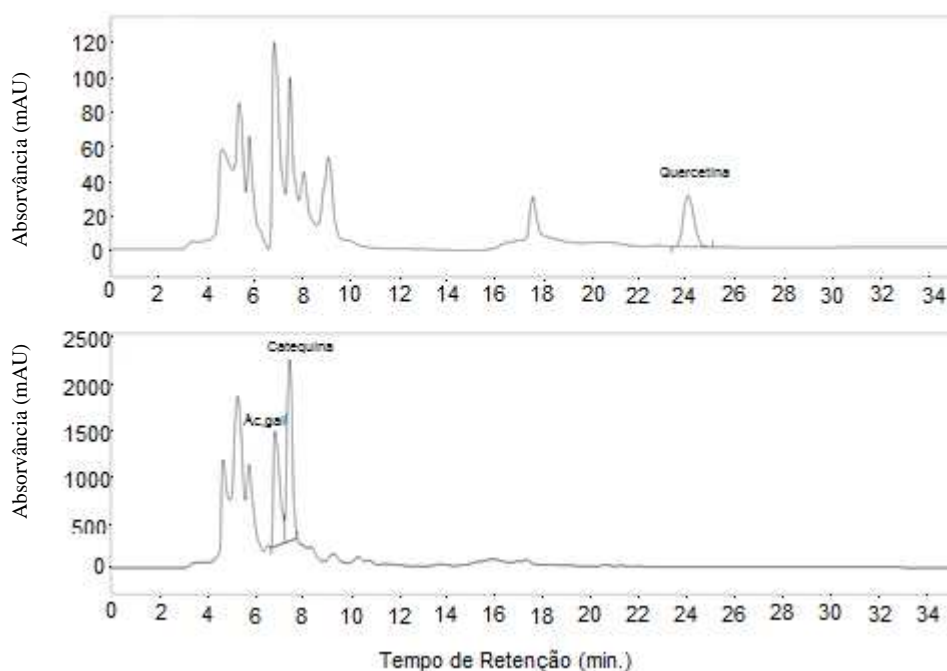


Figura 7. Análise por CLAE de ácido gálico (Ác. gal.), catequina e quercetina em extrato fenólico líquido (pH 3,89).

Condições cromatográficas: Fase Móvel: Acetonitrila (100%) (solvente A), e sol. aquosa de ácido fórmico (5%) (solvente B). Eluição gradiente: iniciando com 20% A e 80%B com fluxo de 0,3 mL/min. Após 7 min a bomba foi ajustada para 30% A, 70% B com fluxo de 0,8 mL/min, com gradiente linear em 1 min até o término da corrida a 25 min, seguido por um período de reequilíbrio de 10 min entre cada corrida; Coluna Phenomenex, C18, 5 μ m, 150 X 4.6 mm; Detector UV-Visível (arranjos de diodos: detecção a 280nm: ác. gálico e catequina; 370 nm: quercetina); Volume de Injeção 10 μ L.

Segundo a Tabela 6, dentre os três compostos analisados a catequina foi o composto que apresentou o maior teor tanto no vinho tinto Aurora (62,56 mg/L) quanto nos extratos (variou de 210,85 a 343,51 mg/L), seguido pelo ácido gálico (vinho: 34,02 mg/L; extrato:176,54 a 273,83 mg/L) e pela quercetina (vinho: 9,05 mg/L; extrato: 33,13 a 49,46 mg/L).

Com relação ao conteúdo médio de cada composto, observa-se que os teores quantificados nos extratos são superiores ao teor dos compostos encontrados no vinho tinto Aurora. Os extratos concentraram em torno de 5,0 vezes o teor de catequina em relação ao conteúdo apresentado no vinho. Para a quercetina e ácido gálico, os teores foram superiores em torno de 5,0 a 8,0 vezes e de 3,5 a 5,5 vezes, respectivamente.

Segundo Fontana e Bottini (2014), Ginjom et al., (2011) e Ribéreau-Gayon, et al., (2006), a catequina é o composto fenólico majoritário nos vinhos tintos. O teor de catequina avaliado no vinho tinto Aurora foi semelhante ao encontrado por Rodrigues (2011) (59,15–149,14 mg/L) em vinhos da variedade Merlot fabricados em diferentes

regiões de Portugal. Já o estudo de Gris (2010) encontrou teores inferiores (25,03–34,71 mg/L) em vinhos tintos de diferentes variedades de uva.

Segundo Ginjom et al., (2011) e Moreno-Arribas e Polo (2009), os principais flavonóis do vinho são a quercetina e a miricetina e podem ser encontrados na forma livre ou conjugada. No estudo de Gris (2010) a quercetina apresentou conteúdo que variou entre 7,49 e 27,44 mg/L em diversos vinhos tintos. No estudo de Rodrigues (2011) (5-10 mg/L) e Granato et al., (2010) (5,18 - 21,81 mg/L) os teores foram semelhantes.

Segundo Silva et al., (2005), Ginjom et al., (2011) e Garrido e Borges (2011), em vinhos tintos o ácido gálico é um dos compostos monoméricos mais abundantes. Os teores de ácido gálico no vinho tinto Aurora analisado neste trabalho corroboram com estudos citados na literatura: Regalado et al., (2010) (13,88–69,87 mg/L); Rodrigues (2011) (30,0 – 129,0 mg/L) e Gris (2010) (32,85 - 54,44 mg/L).

Com relação a estabilidade dos extratos, a análise estatística (Apêndice D) indicou que o conteúdo dos compostos analisados não alterou durante o período de estocagem, apresentando interações não significativas ($p > 0,05$) para as fontes de variação relacionadas com o tempo (Extrato*Tempo; Temperatura*Tempo; Extrato*Temperatura*Tempo). No entanto, a análise dos resultados apresentou variação significativa para a interação Extrato*Temperatura ($p < 0,05$), indicando que tanto o tipo de extrato quanto a temperatura influenciaram no conteúdo dos compostos analisados.

Diante desses resultados, a interação significativa foi desdobrada a fim de identificar quais os extratos analisados teve o conteúdo de catequina, ácido gálico e quercetina alterados com a temperatura ($p < 0,05$). Dessa forma, seria possível tentar ajustar modelos de regressão para prever sobre o conteúdo dos compostos analisados em função da temperatura, conforme as condições adotadas no presente estudo.

Ao avaliar o desdobramento da interação para o ácido gálico e quercetina, observou-se que com exceção do extrato liofilizado, os demais extratos apresentam influência da temperatura ($p < 0,0001$) no teor dos dois compostos avaliados. Já o teor de catequina sofreu influência da temperatura apenas no extrato líquido. Entretanto nenhum modelo de equação permitiu ser ajustado para os extratos analisados.

A quercetina também apresentou interação significativa para a interação Extrato*Tempo, para todos os extratos avaliados conforme demonstrado na Tabela 10. Apenas o extrato pH 6,0 permitiu ajustar um modelo de equação de primeiro grau.

Segundo essa equação, quanto maior o tempo de estocagem em que o extrato pH 6,0 é submetido, menor é o teor de quercetina encontrado.

Tabela 10. Modelos de equação de regressão da variação da quercetina em função do tempo de estocagem (X) e seus respectivos coeficientes de determinação (R²) e níveis de probabilidade (p) para os extratos analisados.

Compostos	Extrato	Modelo de Regressão	R ²	P > F
Quercetina	Líquido	2,738390	---	<0,0001*
	pH 3,0	1,765425	---	<0,0001*
	pH 6,0	2,4804 – 0,1922X	0,8192	<0,0001*
	Liofilizado	1,900369	---	<0,0001*

X = tempo de armazenamento; * significativo a 5 % de probabilidade, ns – não significativo.

Resultados semelhantes foram observados por Srivastava et al., 2007 ao avaliarem a estabilidade de ácidos fenólicos e flavonóides de duas variedades de mirtilo em quatro diferentes temperaturas (-20°C, 6°C, 23°C e 35°C) por 60 dia de estocagem. Os autores encontraram perdas significativas para todos os compostos fenólicos analisados, sendo os compostos mais degradados a quercetina, seguida do ácido gálico e da catequina, na temperatura de 35°C.

Logo, para uma maior estabilidade dos compostos fenólicos presente nos extratos avaliados recomenda-se armazenamento sob refrigeração ou congelamento.

5.6.1.5. Análises de cor

As análises de cor foram realizadas por duas metodologias consideradas complementares e aceitas na análise de cor em vinhos: o método espectrofotométrico definido por Glories em 1984 (intensidade de cor, tonalidade e brilho) e o método colorimétrico baseado no sistema CIE L*a*b*. Dentre todos os parâmetros descritos por uma e outra metodologia, a intensidade de cor de Glories é universalmente considerada como o melhor parâmetro colorimétrico de controle de qualidade, sendo a medida mais utilizada nas adegas. Por outro lado, as coordenadas cromáticas do sistema CIE L*a*b* permitem uma definição de cor muito mais precisa do que os parâmetros propostos por Glories (PÉREZ-MAGARIÑO e GONZÁLEZ-SAN JOSÉ, 2006).

5.6.1.5.1. Coordenadas de cor

Conforme a Tabela 6, os valores da coordenada a^* foram todos positivos (0,11 a 0,27), enquanto os de b^* foram negativos (-0,50 a -0,47), indicando que a todos os extratos apresentaram cor variando entre o azul e vermelho. Contudo, a coordenada que variou significativamente ($p=0,0065$) com a temperatura foi somente a^* , conforme discutido posteriormente.

Dentre os valores de a^* , evidencia-se maior intensidade da cor vermelha para o extrato pH 3,0, seguido pelo extrato líquido (pH 3,89), em função da presença das antocianinas predominantemente na forma de cátion flavílium, que exibem coloração vermelha intensa em pHs inferiores. Já para os valores de b^* , foi observado o contrário, a maior intensidade da cor azul foi identificada no extrato pH 6,0, em função do início da formação base quinona (violeta), predominante em soluções com valores de pH próximos a neutralidade e alcalinidade (FERNANDES, 2007).

Luminosidade (L^*) é a qualidade que caracteriza o grau de claridade da cor, indicando se as cores são claras ou escuras ($L=0$: preto, a 100: branco). Os valores da coordenada L^* foram semelhantes para todos os extratos avaliados, com valor médio igual a 23,80 (Tabela 6), o que permite classificar os extratos como escuros.

A Saturação (C^*) refere-se à intensidade ou pureza da cor em relação ao cinza. Valores menores correspondem ao padrão de cor mais fraco (“aspectos fosco do objeto”) e valores mais altos ao padrão de cor mais forte (“cores vivas”) (PONTES, 2004; RAMOS E GOMIDE, 2007). Nos extratos avaliados, os valores do índice saturação (C^*) variaram de 0,46 a 0,62 (Tabela 6), sendo o maior valor referente ao pH 6,0, demonstrando que as formas quinonas das antocianinas determinam cores mais intensas, quando comparada com as antocianinas na forma de cátion flavilium, presentes no extrato pH 3,0.

Tonalidade (H^*) é o parâmetro mais importante com respeito à classificação de cor de vinhos tintos, sendo a medição instrumental que melhor reproduz a classificação em categorias de cor tal como realizadas pelos provadores (PONTES, 2004; RAMOS E GOMIDE, 2007). A tonalidade representa a cor propriamente dita, grandeza que caracteriza a qualidade da cor (vermelho, verde, azul etc.). De acordo com a Tabela 6, o maior valor de tonalidade foi observado no extrato pH 6,0 (-0,89), seguido dos extrato líquido e pH 3,0, que apresentaram o mesmo valor de tonalidade (-1,03). Esses valores de H^* indicam que os extratos se encontram na faixa de cor entre o vermelho e azul.

Com relação a estabilidade da cor, para a coordenada b^* e para Tonalidade (H^*) e Saturação (C^*) não foi observado significância para nenhuma das fontes de variação testadas e suas interações ($p > 0,05$) (Apêndice E). Portanto, a pureza (C^*) e a intensidade (H^*) das cores dos extratos permaneceram estáveis, independente do tempo e da temperatura de estocagem, assim como do tipo de extrato testado. Nesse sentido, os resultados foram apenas representados em gráfico para observar a tendência ao longo do tempo, da tonalidade e saturação, conforme apresentado na Figura 8.

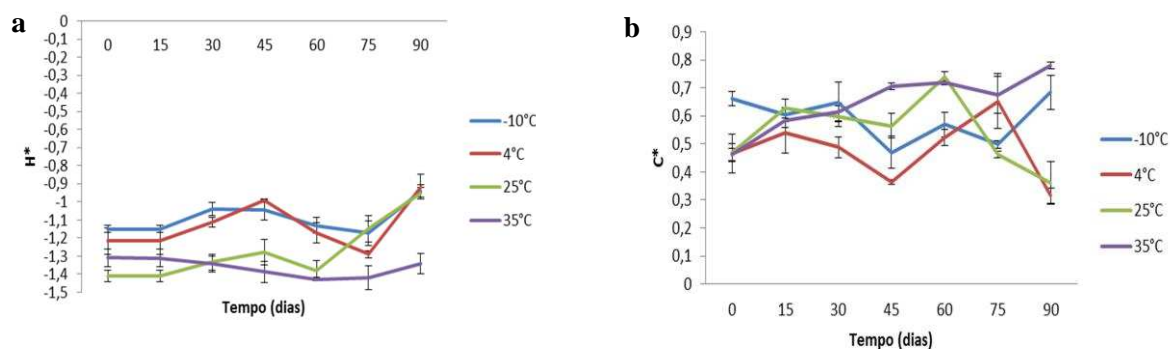


Figura 8. Variação na Tonalidade (H^*) (a) e Saturação (C^*) (b) no extrato líquido (pH 3,89) em função do tempo de armazenamento para cada temperatura avaliada. Média \pm desvio padrão, $n=3$.

A análise estatística para os valores da coordenada L^* (Apêndice E), indicou que os parâmetros analisados alteraram durante os 90 dias de estocagem, apresentando interações significativas ($p < 0,05$) para as fontes de variação relacionadas com o tempo. Tanto a temperatura quanto o tipo de extrato influenciaram nos valores de L^* durante o tempo de armazenamento, exibindo interação tripla significativa (Extrato*Temperatura*Tempo = 0,0003). Diante desses resultados, as interações significativas foram desdobradas a fim de avaliar em cada temperatura a influência do tempo de estocagem em cada tipo de extrato ($p < 0,05$).

Para o extrato líquido, com exceção da temperatura de 35°C, as demais temperaturas sofreram influência do tempo de estocagem na luminosidade do extrato, entretanto não foi possível ajustar nenhuma modelo de equação que expressasse essa relação. Para o extrato pH 3,0, com exceção da temperatura de 4°C, todas as temperaturas sofreram influência do tempo de estocagem nos valores da coordenada L^* , no entanto, nenhum modelo de equação de foi ajustado. Por fim, no extrato pH 6,0,

todas as temperaturas sofreram influencia do tempo de estocagem na luminosidade do extrato, mas nenhum modelo de equação permitiu ser ajustado.

Para a coordenada a^* , tanto o tipo de extrato quanto a temperatura influenciaram em seu valor durante o período de estocagem, exibindo interação dupla significativa (Extrato*Temperatura = 0,0012) (Apêndice E). Diante desse resultado, a interação significativa foi desdobrada a fim de identificar quais os extratos que realmente apresentaram valores de a^* alterados pela temperatura ($p < 0,05$). Assim, seria possível tentar ajustar modelos de regressão para predizer sobre a intensidade de cor dos extratos em função da temperatura, conforme as condições adotadas no presente estudo. Na Tabela 11, são apresentadas as variações e os modelos de regressão que permitiram ser ajustados para a variável a^* .

Tabela 11. Modelos de equação de regressão da variação da coordenada de cor a^* em função da temperatura de estocagem (X) e seus respectivos coeficientes de determinação (R^2) e níveis de probabilidade (p) para os extratos analisados.

Cor	Extrato	Modelo de Regressão	R^2	P > F
a^*	Líquido	$0,2235 - 0,0037X$	0,8867	<0,0001*
	pH 3,0	$0,3453 - 0,0033X$	0,8906	0,0069*

X = temperatura de armazenamento; * significativo a 5 % de probabilidade, ns – não significativo.

Ao avaliar o desdobramento da interação para a coordenada a^* , observa-se que com exceção do extrato pH 6,0, os demais extratos apresentam influencia da temperatura na coordenada cromática a^* . As equações ajustadas para ambos os extratos demonstram uma relação inversa entre a temperatura e o valor da coordenada a^* , ou seja, quanto maior a temperatura de armazenamento menor o valor de a^* , ou menor a intensidade da cor vermelha no extrato. Logo, recomenda-se que os extratos sejam armazenamento sob congelamento ou refrigeração para a manutenção da cor.

5.6.1.5.2. Índice de Cor, Tonalidade e Brilho

A metodologia descrita por Glories (1984) considera que os vinhos novos apresentam um máximo de absorvância a 520 nm (característico da cor vermelha), que diminui durante o envelhecimento dos vinhos, e a absorvância passa a prevalecer aos 420 nm, na região dos amarelo-castanhos. A componente azul, devido às formas quinonas das antocianinas livres e

combinadas também deve ser considerada. Por este motivo, a absorvância a 620 nm também contribui para o índice de cor. Dessa forma, o índice de cor (IC) é realizado através das medidas de absorvância a 420, 520 e a 620 nm.

O IC nos extratos avaliados variou de 0,77 a 1,28 (Tabela 6), sendo o extrato liofilizado o de cor mais intensa, devido provavelmente ao maior teor de antocianinas monoméricas quantificadas nesse extrato. O vinho tinto Aurora exibiu um IC médio de 1,31, valor superior aos encontrados por Rodrigues (2011), ao analisar três amostras de vinho Merlot e identificar IC variando de 0,70 a 1,0. Esses resultados indicam que o vinho utilizado nesse trabalho possui coloração mais intensa. No entanto nos estudos de Gallice et al., (2011) e Arbugeri (2010) os vinhos analisados apresentaram cores mais intensa (1,73 e 12,40, respectivamente).

O parâmetro Tonalidade (T) nos vinhos tintos é indicativo do desenvolvimento da cor para tons laranja, sendo calculado através da razão entre as absorvâncias medidas nos comprimentos de onda de 420 e 520 nm; este parâmetro é indicativo da idade do vinho pois ao longo do tempo, as antocianinas responsáveis pela cor vermelha reagem com outros compostos, diminuindo a quantidade de antocianinas livres (PÉREZ-MARGARIÑO e GONZÁLEZ-SAN JOSÉ, 2006), fazendo com que ocorra um desvio da absorvância do vinho do comprimento de onda característico do vermelho para o característico do amarelo. Segundo a Tabela 6, nos extratos avaliados a tonalidade variou entre 0,94 a 1,27, já o vinho tinto Aurora apresentou uma tonalidade menor, 0,77. O estudo de Rodrigues (2011) avaliou vinhos com tonalidades variando de 0,60 a 0,90. Já o estudo de Gallice et al.,(2011) avaliou vinhos com tonalidade superior (0,86) ao observado nesse estudo. Arbugeri (2010) por sua vez encontrou valores de tonalidade reduzidos em vinho Merlot (0,56).

O Brilho é um parâmetro que indica a dominância da coloração vermelha, ou seja, quanto mais elevada for a absorvância ao comprimento de onda correspondente ao vermelho, mais elevado será o brilho (RODRIGUES, 2011). Desta forma, quanto mais elevada for a tonalidade e menor for o brilho, maior é o desvio para o amarelo. O parâmetro Brilho dos extratos variou de 17,71 a 43,28 (Tabela 6), sendo o extrato pH 3,0 com maior brilho. O vinho tinto Aurora apresentou valor para o parâmetro brilho intermediário (47,12) aos valores observados (45,8 a 61,8) por Rodriguez (2011).

A análise estatística para os valores de Tonalidade, Brilho e Índice de Cor (Apêndice F), indicou que os parâmetros analisados alteraram durante os 90 dias de estocagem, apresentando interações significativas ($p < 0,05$) para as fontes de variação

relacionadas com o tempo. Tanto a temperatura quanto o tipo de extrato influenciaram os valores do IC, T e Brilho durante o tempo de armazenamento, exibindo interação tripla significativa (Extrato*Temperatura*Tempo = 0,0089; 0,0016; 0,0479, respectivamente).

Diante desses resultados, as interações significativas foram desdobradas a fim de avaliar em cada temperatura a influência do tempo de estocagem em cada tipo de extrato ($p < 0,05$).

Na temperatura de -10°C , o Índice de Cor, a tonalidade e o Brilho não apresentaram variações significativas ($p > 0,05$), em relação ao tempo de estocagem, sendo dependente apenas do tipo de extrato analisado ($p < 0,0001$). Deste modo, avaliou-se as médias pelo teste Tukey à 5 % de probabilidade, como exposto na Tabela 12.

Tabela 12. Médias dos parâmetros de cor dos extratos avaliados por temperatura.

Temperatura	Parâmetro	Extrato	Média
-10°C	Tonalidade	Líquido	0,97 ^b
		pH 3,0	0,79 ^d
		pH 6,0	1,03 ^a
		Liofilizado	0,9127 ^c
	Brilho	Líquido	40,45 ^b
		pH 3,0	52,95 ^a
		pH 6,0	35,72 ^d
		Liofilizado	38,33 ^c
	Índice de Cor	Líquido	0,85 ^c
		pH 3,0	1,01 ^b
		pH 6,0	0,79 ^c
		Liofilizado	1,11 ^a
4°C	Índice de Cor	Líquido	0,78 ^c
		pH 3,0	0,93 ^b
		pH 6,0	0,76 ^c
		Liofilizado	1,18 ^a
	Brilho	Líquido	36,68 ^c
		pH 3,0	48,39 ^a
		pH 6,0	20,87 ^d
		Liofilizado	38,49 ^b
	Brilho	Líquido	33,09 ^c
		pH 3,0	41,52 ^a
		pH 6,0	19,40 ^d
		Liofilizado	34,30 ^b

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si, a 5 % de probabilidade, pelo Teste Tukey.

Os extratos que apresentaram maiores valores do parâmetro Brilho foram os extratos com menor valor de pH, (pH 3,0 e extrato líquido (pH=3,89)). Próximo ao pH

3,0 as antocianinas se encontram predominantemente na forma de cátion flavílium, que exibe coloração vermelha e absorve no comprimento de onda de 520 nm. Uma vez que o cálculo do parâmetro Brilho (ver fórmula no item 4.4.5.1) prioriza a absorvância a 520 nm, os extratos com menor valor de pH apresentam brilho maior.

Já para o parâmetro Tonalidade foi observado o contrário, o extrato com maior valor de pH (pH=6,0) apresentou tonalidade maior. Em função do aumento do pH, as antocianinas que antes exibiam coloração vermelha intensa e máximo de absorção a 520 nm, passam a exibir coloração mais castanha/amarelada, e exibem maior absorvância no comprimento de onda de 420 nm, devido a modificações estruturais na molécula de antocianina, mais precisamente na estrutura do cátion flavílium. Uma vez que a tonalidade é o quociente da absorvância em 420 nm pela absorvância em 520 nm e indica a importância relativa do amarelo sobre o vermelho, o extrato pH 6,0 exibe maior tonalidade.

O Índice de cor (IC) representa a soma das absorvâncias referentes as cores vermelha (520 nm), amarelo (420 nm) e azul (620 nm), representando as possíveis estruturas que as antocianinas podem exibir em função do pH e avalia a cor geral das amostras. O extrato liofilizado apresentou o maior IC, devido a maior concentração de antocianinas monoméricas quantificadas nesse extrato.

Na temperatura de 4°C, o Índice de Cor e o parâmetro Brilho foram dependentes apenas do tipo de extrato analisado ($p < 0,0001$). Sendo as médias avaliadas pelo teste Tukey à 5 % de probabilidade, como exposto na Tabela 12.

Da mesma forma que observado para a temperatura de -10°C, o parâmetro Brilho foi maior para o extrato com pH 3,0 em virtude da predominância do cátion flavílium e maior absorvância a 520 nm. O extrato liofilizado também permaneceu com o maior IC entre os extratos avaliados.

Já o parâmetro tonalidade exibiu diferença significativa ($p < 0,05$), para as fontes de variações relacionadas ao Tempo e Extrato (Extrato e Tempo*Extrato), indicando variação na tonalidade em função do tempo para cada extrato testado. No entanto, não foi possível ajustar um modelo de equação tanto de primeiro quanto de segundo grau, para nenhum dos extratos avaliados.

Com relação a temperatura de 25°C, o Índice de Cor não exibiu diferença significativa ($p > 0,05$), para as duas fontes de variações testadas, Tempo e Extrato, sendo portanto constante ao longo do tempo de estocagem para todos os extratos avaliados, que por sua vez não diferiram entre si. O parâmetro Brilho apresentou

diferença significativa apenas em relação ao tipo de extrato testado, sendo assim, as médias foram avaliadas pelo teste de Tukey à 5 % de probabilidade, como exposto na Tabela 12. Da mesma forma que para as temperaturas de -10°C e 4°C, o extrato pH 3,0 exibiu maior brilho na temperatura de 25°C.

O parâmetro tonalidade, na temperatura de 25°C, não se manteve constante durante o período de 90 dias de estocagem, em todos os extratos analisados (Extrato; Tempo*Extrato $p = <0,0001$ e $p=0,0258$, respectivamente). No entanto, não foi possível ajustar um modelo de equação para o parâmetro Tonalidade demonstrando a influência do tempo.

Por fim, na temperatura de 35°C, com exceção do parâmetro Brilho, que não apresentou variação para as fontes de variação testadas, o Índice de cor e a Tonalidade exibiram diferença significativa para todas as fontes de variação testadas (Extrato; Extrato*Tempo), no entanto, não foi possível ajustar um modelo de equação para nenhum dos extratos avaliados.

O estudo de Amendola et al., (2010) encontrou resultados semelhantes ao do presente trabalho. Segundo esse autor o extrato fenólico do bagaço de uva demonstrou IC e Tonalidade constante durante o período de estocagem a 4°C, enquanto na temperatura de 25°C houve redução no IC e aumento na Tonalidade. Garcia-Puentes et al., (2006) justificam o aumento da tonalidade como consequência de uma parcial degradação térmica das antocianinas, diminuindo a absorvância a 520 nm. Em outro estudo, o aumento da tonalidade (de 0,67 para 1,09) de pigmentos extraídos do bagaço de uva, quando submetidos ao armazenamento por 72 horas a 50°C, foi justificado por Malien-Aubert et al., (2001), como sendo devido a falta de antocianinas aciladas, já que as antocianina não aciladas são menos estáveis e exibem valores de Tonalidade > 1 , exibindo assim tons amarelados no extrato.

Diante dos resultados observados recomenda-se que os extratos sejam armazenamento sob congelamento ou refrigeração para manutenção da cor.

5.6.2. Estabilidade Térmica

A estabilidade térmica dos extratos nos diferentes valores de pH foi investigado através da simulação de um processo de pasteurização com binômio tempo/temperatura igual a 60s/90°C. A tabela 13 demonstra o efeito do processamento térmico em diversos parâmetros avaliados nos extratos.

Tabela 13. Efeito do tratamento térmico no conteúdo de fenóis totais, atividade antioxidante *in vitro*, antocianinas, catequina, quercetina e ácido gálico e nos parâmetros de cor do extrato líquido (pH 3,89).

Parâmetro	Média antes	Média depois	Valor de t	Pr > t
IC	1,6426	1,7346	-0,31	0,7884 ^{ns}
Tonalidade	0,9858	0,9995	-1,51	0,2706 ^{ns}
Brilho	25,9909	34,5939	2,72	0,1127 ^{ns}
Saturação	0,2223	-0,3733	1,80	0,2141 ^{ns}
Tonalidade	0,4069	-1,3443	1,64	0,2429 ^{ns}
a*	0,065	0,1176	-0,64	0,5887 ^{ns}
b*	0,1573	-0,491	2,58	0,1228 ^{ns}
L*	0,86	1,2886	-3,89	0,0603 ^{ns}
Antocianinas (mg/L)	3447,33	3502,00	0,20	0,8632 ^{ns}
Fenóis totais (g/L)	134,07	156,12	1,46	0,2812 ^{ns}
DPPH (%)	82,4455	82,3953	0,15	0,8944 ^{ns}
Ác. gálico(g/L)	223,97	240,38	-2,56	0,1244 ^{ns}
Catequina(g/L)	240,57	182,24	4,38	0,0484*
Quercetina(g/L)	50,36	50,24	0,03	0,9815 ^{ns}

* significativo a 5 % de probabilidade pelo teste t de Student; ns – não significativo.

Optou-se pela simulação de processo de pasteurização similar aos utilizados em sucos e bebidas a base de frutas, uma vez que estes também possuem em sua composição os compostos fenólicos. Para o extrato líquido, todos os parâmetros avaliados mantiveram-se estatisticamente constantes após o tratamento térmico, com exceção do teor de catequina que apresentou uma redução estatisticamente significativa de aproximadamente 41%. Amendola et al., (2010) relataram aumento no conteúdo de compostos fenólicos totais, assim como aumento nos parâmetros de cor, principalmente a tonalidade após o processamento térmico (15 minutos a 121°C), em função da condensação, polimerização ou modificações estruturais das moléculas nas correspondentes formas quinonas. No entanto, o mesmo autor observou atividade antioxidante constante após a esterilização para todos os extratos avaliados, da mesma forma que encontrado em nosso estudo.

A estabilidade térmica evidenciada nos extratos, provavelmente se deve ao tratamento mais brando (menor binômio tempo/temperatura) não ser suficiente para causar degradações nos compostos analisados. Nenhuma diferença estatística foi observado em relação aos parâmetros avaliados nos extratos pH 3,0 e pH 6,0 após o tratamento térmico (dados não mostrados) e conclui-se que os extratos avaliados apresentaram boa estabilidade ao tratamento térmico proposto.

6. CONCLUSÕES

Uma nova metodologia de extração de compostos fenólicos do vinho tinto foi proposta e avaliada. As concentrações do sal (NaH_2PO_4) e de acetona adicionados ao vinho apresentaram efeitos significativos no teor de compostos fenólicos totais na fase em que esses compostos se concentram. Já a concentração de etanol, na faixa de 0,7 a 2,3% (v/v), não apresentou efeito significativo. O modelo polinomial de segundo grau utilizado na predição da resposta, e as condições ótimas estimadas foram: 59% (m/v) de NaH_2PO_4 ; 3,4% (v/v) de acetona, e a quantidade de etanol foi fixada em 1,5% (v/v). O método mostrou ser eficiente em seu propósito, concentrando o teor de fenóis totais de 5 a 7 vezes em relação ao conteúdo presente no vinho. O método ainda precisa ser aprimorado e avaliado para outras matérias-primas, mas os resultados aqui obtidos são promissores e podem torná-lo competitivo com alguns métodos existentes.

Os extratos avaliados quanto a estabilidade apresentaram teores elevados de fenóis totais, antocianinas monoméricas, catequina, quercetina e ácido gálico, além de elevada atividade antioxidante *in vitro*. A liofilização (extrato em pó) deve ser considerada como forma de apresentação do extrato, uma vez que o extrato liofilizado apresentou os teores elevados dos compostos mencionados acima, em comparação com os extratos líquidos armazenados sob as mesmas condições, pelo mesmo período de tempo.

Durante o período de 90 dias de estocagem não foram observadas diferenças significativas no teor de antocianinas, catequina, ácido gálico e na atividade antioxidante. Entretanto, o teor de fenóis totais, quercetina e as variáveis de cor foram afetados de forma negativa pelo tempo de estocagem, principalmente nas temperaturas de 25°C e 35°C e no extrato com pH 6,0. Dessa forma, sugere-se que para a maior conservação da qualidade dos extratos fenólicos que estes sejam refrigerados ou mesmo congelados, em valores de pH próximos a 3,0.

O tratamento térmico empregado nos extratos não levou a perdas significativas da maioria dos compostos analisados. Esses resultados permitem a aplicação dos extratos fenólicos em sucos e bebidas láctea, cuja pasteurização tenha parâmetros de tempo/temperatura equivalentes ao utilizado nesse estudo.

7. PERSPECTIVAS

Sugere-se a realização de um estudo mais aprofundado do princípio de separação empregado no método proposto, assim como do papel e a influencia exata de cada reagente empregado, uma vez que algumas dúvidas ainda permanecem:

- Por que o etanol, na faixa estudada, não influencia (estatisticamente) na eficiência da separação e extração de compostos fenólicos em vinhos?;

- Por que a não adição de etanol não permite que ocorra a separação de fases do vinho?;

- O etanol apresentará alguma influência se outra amostra além do vinho, e que não apresente etanol em sua composição for analisada?

Sugere-se ainda que outros estudos sejam realizados aplicando a metodologia otimizada em outras amostras consideradas fontes de compostos fenólicos e que uma análise mais detalhada da composição fenólica e físico-química dos extratos obtidos sejam realizada. Além disso, estudos que avaliem a estabilidade dos extratos fenólicos por longos períodos de estocagem (6 a 12 meses) são raros na literatura e se fazem necessários, assim como estudos que avaliem a estabilidade térmica em diferentes binômios de tempo/temperatura.

E para pesquisas futuras sugere-se a formulação de um produto (suco, bebida láctea) que empregue o extrato fenólico obtido pelo método otimizado nesta pesquisa, e avalie a sua estabilidade nutricional, funcional e sensorial, assim como as possíveis interações com os demais ingredientes do produto.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACERSON, M.J.; FABICK, K.M.; WONG, Y.; BLAKE, C.; LEPHART, E.D.; ANDRUS, M.B. A new synthesis of 4'-resveratrol esters and evaluation of the potential for anti-depressant activity. **Bioorg Med Chem Lett**, v.23, p. 2941–2944, 3013
- ACOSTA-ESTRADA, B. A.; GUTIÉRREZ-URIBE, J. A.; SERNA-SALDÍVAR, S. O. Bound phenolics in foods, a review. **Food Chemistry**, v.152, p. 46-55, 2014.
- AHMAD-QASEM, M., H.; CÁNOVAS, J.; BARRAJÓN-CATALÁN, E.; MICOL, V.; CÁRCEL, J. A.; GARCÍA-PÉRE, J. V. Kinetic and compositional study of phenolic extraction from olive leaves (var. Serrana) by using power ultrasound. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 17, p.120-129, 2013.
- ALÉN-RUIZ, F., GARCÍA-FALCÓN, M. S., PÉREZ-LAMELA, M. C., MARTÍNEZ-CARBALLO, E., & SIMAL-GÁNDARA, J. Influence of major polyphenols on antioxidant activity in Mencía and Brancellao red wines. **Food Chemistry**, v.113, p.53–60, 2009.
- ALLEN, M. **Advanced Oenology**. Charles Sturt University, 1994.
- ALUPULUI, A. Microwave extraction of active principles from medicinal plants. **U.P.B. Science Bulletin**, Series B v.74, n.2, 2012.
- ALVES, J. **Aplicação de técnicas de RMN em solução ao estudo de sistemas químicos e biológicos**. Dissertação Mestrado em Química. 85p. Universidade de Lisboa, 2010.
- AMENDOLA, D.; DE FAVERI, D.M.; SPIGNO, G. Grape marc phenolics: Extraction kinetics, quality and stability of extracts. **Journal of Food Engineering**, v.97, p.384–392, 2010.
- AMODIO, M.L.; DEROSI, A.; COLELLI, G. Modeling phenolic content during storage of cut fruit and vegetables: A consecutive reaction mechanism. **Journal of Food Engineering**, v. 140, p. 1-8, 2014.
- ARBUGERI, EDUARDO. **Influência da aplicação de clarificantes protéicos nas características físico químicas e sensoriais do Vinho Merlot da Serra Gaúcha**. Dissertação. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Março, 2010, 141p.
- ASPÉ, E.; FERNÁNDEZ, K. The effect of different extraction techniques on extraction yield, total phenolic, and anti-radical capacity of extracts from *Pinus rodiata* Bark. **Industrial Crops and Products**, v.34, p.838-844, 2011.

ASSIS, D.M.; JULIANO, L., JULIANO, M. A. Espectrometria de massas aplicada na classificação e identificação de micro-organismos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações**, v. 9, n. 2, p. 344-355, 2011.

AYBASTIER, O.; IŞIK, E.; ŞAHIN, S.; DEMI, C. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant compounds from blackberry leaves using response surface methodology. **Industrial Crops and Products**, v.44, p. 558-565, 2013.

AZMIR, J., ZAIDUL, I. S. M., RAHMAN, M. M., SHARIF, K. M., MOHAMED, A., SAHENA, F., JAHURUL, M. A., GHAFUOR, K., NORULAINI, N. A. N., OMAR, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, p.426 – 36, 2013.

BALASUNDRAM, N., SUNDRAM, K., SAMMAN, S. Phenolic Compounds in plant and agri-industrial by products: Antioxidant Activity, and potential uses. **Food Chemistry**, v.99, p.191 – 203, 2006.

BALLARDA, T. S.; MALLIKARJUNANA, P.; ZHOUB, K.; O'KEEFE, S. Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins. **Food Chemistry**, v.120, p.1185–1192, 2010.

BALLUS, C. A.; MEINHART, A. D.; OLIVEIRA, R. G.; GODOY, H. T. Optimization of capillary zone electrophoresis separation and on-line preconcentration of 16 phenolic compounds from wines produced in South America. **Food Research International**, v.45, n.1, p.136–144, 2012.

BARQUETTE, B., TRIONE, D. Les tanins. In: **Actas do 4º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo**, Vol II, 255-261, 1998.

BARREIROS, A. L. B. S., DAVID, J. M., DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n.1, p.113-123, 2006.

BARROS, F.; DYKES, L.; AWIKA, J.N.; ROONEY, L.W. Accelerated solvent extraction of phenolic compounds from sorghum brans. **Journal of Cereal Science**, v.58, p. 305-312, 2013.

BASTOS, D. H. M.; ROGERO, M. M.; AREAS, J. A. G. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v.53, n.5, p. 646-656, 2009.

BATE-SMITH, E. C. Adstringency in foods. **Food Chemistry**, v.23, p.124, 1954.

BATE-SMITH, E. C. Haemanalysis of tannins: the concept of relative astringency. **Phytochemistry**, v.12, p.907-912, 1973.

BERTOLDI, F. C.; GONZAGA, L.V.; FETT, R; dos REIS, V.D.A. Avaliação Da Atividade Antioxidante E Determinação De Compostos Fenólicos Totais De Méis Produzidos No Pantanal. **Evidência**, v. 12, n. 2, p. 155-164, 2012.

BHARDWAJ, L.; SHARMA, P.K.; VISHT, S.; GARG, V.K.; KUMAR, N. A review on methodology and application of supercritical fluid technology in pharmaceutical industry. **Der Pharmacia Sinica**, v.1, p.183-194, 2010.

BHATT, J.K.; THOMAS, S.; NANJAN, M.J. Resveratrol supplementation improves glycemic control in type 2 diabetes mellitus. **Nutrition Research**., v.32, p. 537–541, 2012.

BIZZOTTO, C. S.; MEINHART, A. D.; RYBKA, A. C. P.; ROBERTO SOBRINHO, M.; BOGUSZ, S. JUNIOR., et al. Quantification of phenolic compounds by capillary zone electrophoresis in extracts of four commercial types of mate herb before and after hydrolysis. **Food Research International**, v.48, n.2, p.763–768, 2012.

BOBERMIN, L.D.; QUINCOZES-SANTOS, A.; GUERRA, M.C.; LEITE, M.C. BOUDESOCQUE, L.; DORAT, J.; POTHIER, J.; GUEIFFIER, A.; ENGUEHARD-GUEIFFIER, C. High performance thin layer chromatography-densitometry: a step further for quality control of cranberry extracts. **Food Chemistry**, v.139, n.1-4, p.866-71, 2013.

BOUSSETTA, N.; SOICHI, E.; LANOISELLÉ, J-L.; VOROBIEV, E. Valorization of oilseed residues: Extraction of polyphenols from flaxseed hulls by pulsed electric fields. **Industrial Crops and Products**, v.52, p. 347-353, 2014.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E., BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm-Wiss u-Technol**, v. 28, p.25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Vigitel Brasil 2013: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico/ Ministério da Saúde, Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa- Brasília: Ministério da Saúde, 2013.

BRYANT, G., WOLFE, J. Electromechanical stress produced in the plasma membranes of suspended cells by applied electrical fields. **Journal of Membrane Biology**, v.96, n.2, 129–139, 1987.

CADAHÍA, E. et al. Chemical and chromatic characteristics of Tempranillo, Cabernet Sauvignon and Merlot wines from do Navarra aged in Spanish and French oak barrels. **Food Chemistry**, n. 115, p. 639-649, 2009.

CAI, Y., SUN, M., XING, J., LUO, Q., CORKE, H. Structure-radical scavenging activity relationships of phenoli compounds from traditional Chinese medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p.2872-2888, 2006.

CAI, Y.; YU, Y.; DUAN, G.; LI Y. Study on infrared-assisted extraction coupled with high performance liquid chromatography (HPLC) for determination of catechin, epicatechin, and procyanidin B2 in grape seeds. **Food Chemistry**, v.127, .4, p. 1872-1877, 2011.

CAO, G., SOFIC, E., AND PRIOR, R. L. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radical Biology and Medicine.**, v.22, p. 749–760, 1997.

CÁRCEL, J.A.; GARCÍA-PÉREZ, J.V.; BENEDITO, J.; MULET, A. Food process inovation through new technologies: use of ultrasound. **Journal of Food Engineering**, v.110, n.2, p. 200–207, 2012.

CARIDI, D., TRENERRY, V. C., ROCHFORT, S., DUONG, S., LAUGHER, D., & JONES, R. Profiling and quantifying quercetin glucosides in onion (*Allium cepa* L.) varieties using capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v.105, 691–699, 2007.

CARRERA, C.; RUIZ-RODRÍGUEZ, A.; PALMA, M.; BARROSO, C.G. Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. **Analytica Chimica Acta**, v.732, p.100-104, 2012.

CASPER, R. F. et al. Resveratrol has antagonist activity on the aryl hydrocarbon receptor: implications for prevention of dioxin toxicity. **Molecular Pharmacology**, v. 56, n. 4, p. 784-790, 1999.

CASSEL, E.; VARGAS, R.M.F.; BEDINOT, C. Unidad pilato de extracción supercrítica automatizada. In: CASSEL, E.; VARGAS, R.M.F. (Org.). **Aplicaciones Industriales de los Taninos Vegetales**. Porto Alegre: EDIPUCRS, v.1, p. 95-102, 2007.

CASTANEDA-OVANDO, A., DE LOURDES PACHECO-HERNANDEZ, MA, ELENA, MA, PAEZ- HERNANDEZ, J. A., RODRIGUEZGALAN-VIDAL, J. A., & GALAN-VIDAL, C. A. Chemical studies of anthocyanins: A review. **Food Chemistry**, v.113, p.859–871, 2009.

CASTRO-VARGAS, H.I. RODRI'GUEZ-VARELA, L.I. FERREIRA, S.R.S. PARADA-ALFONSO, F. Extraction of phenolic fraction from guava seeds (*Psidium guajava* L.) using supercritical carbon dioxide and co-solvents **Journal of Supercritical Fluids**, v. 51, p.319, 2010.

CAVALCANTI, R.N.; MEIRELES, M.A.A. Fundamentals of supercritical fluid extraction. In: Janusz, P. (Ed.), **Comprehensive Sampling and Sample Preparation**. Academic Press, Oxford, pp. 117–133, 2012.

CESÁRIO, C.C.; SILVA, P.H.A.S.; OLIVEIRA, C.A.; REIS, R.C.; CASTRO, V.C.; ALVES, R.B.T. Efeito do processamento sobre o teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante de Pimenta Cumari do Pará (*Capsicum Chinese Jacqui*). **Nutrição em Pauta**, edição eletrônica, n.18, 2014.

CHAVAN, U. D.; SHAHIDI, F.; NACZK, M. Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents. **Food Chemistry**, v. 75, n. 4, p. 509-512, 2001.

CHEMAT, F.; ZILL-E-HUMA; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. **Ultrasonic Sonochemistry**, v.18, n.4, p.813-835, 2011.

CHEYNIER, V. **Flavonoids in wine**. In O. M. Anderson & K. R. Markham (Eds.), *Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications* (pp. 263–370). New York: Boca Raton, 2006.

CHIRINOS, R.; PEDRESCHIB, R.; ROGEZC,H.; LARONDELLED, Y.; CAMPOSA, D. Phenolic compound contents and antioxidant activity in plants with nutritional and/or medicinal properties from the Peruvian Andean region. **Industrial Crops and Products**, v.47, p. 145–152, 2013.

CLARIDGE, T. D.W. **High-Resolution NMR Techinques in Organic Chemistry**. 2a. Oxford : Elsevier, 2009.

CLIFF, M.A.; KING, M.C.; SCHLOSSER, I. Anthocyanin, phenolic composition, colour measurement and sensory analysis of BC commercial red wines. **Food Research International**, v.4, p.92-100, 2007.

COSTA, C. T.; HORTON, D.; MARGOLIS, S. A. Analysis of anthocyanins in food by liquid chromatography, liquid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 881, p. 403, 2000.

COSTA, M., G., M.; FONTELES, T., V.; JESUS, A., L., T.; ALMEIDA, F., D., L.; MIRANDA, M., R., A.; FERNANDES, F., A., N.; RODRIGUES, S. High-intensity

ultrasound processing of pineapple juice, **Food Bioprocess. Technology**, v.6, p.997–1006, 2013.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.4, p.564–582, 1999.

CRANDALL, P.; ORAM, V.; TRANDAFIRESCU, G.; REID, M.; KISHORE, P.; HAWKINS, M.; COHEN, H.W. Barzilai Pilot study of resveratrol in older adults with impaired glucose tolerance **J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.**, v.67, p. 1307–1312, 2012.

CRESPO, J. G., BRAZINHA, C. Membrane processing: Natural antioxidants from winemaking by-products. **Filtration + Separation**, v.2, p.32 – 35, 2010.

CSISZAR, A.; LABINSKY, N.; JIMENEZ, R.; PINTO, J.T.; BALLABH, P.; LOSONCZY, G.; PEARSON, K.J.; DE CABO, R.; UNGVARI, Z. Anti-oxidative and anti-inflammatory vasoprotective effects of caloric restriction in aging: role of circulating factors and SIRT1. **Mech Ageing Dev**, v.130, p. 518–527, 2009.

DAI, J., MUMPER, R.J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. **Molecules**, v.15, p. 7313-7352, 2010.

DALMÁZIO, I. **Aplicação da Espectrometria de Massas com Ionização Electrospray no Monitoramento de Processos Oxidativos Avançados de Interesse Ambiental: Degradação de Fármacos, Avaliação de Sistemas Oxidativos e Oxidação do Isopreno**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, 2007.

DAUDT, C. E. & POLENTA, G. Phenols from Cabernet sauvignon and Isabel musts submitted to several treatments. **Journal of Science and Technology Tonnellerie**, v.5, p.57-64, 1999.

DAVIES, A. J., & MAZZA, G. Copigmentation of simple and acylated anthocyanins with colorless phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.41, p.716-720, 1993.

DE MELO, M.M.R.; SILVESTRE, A.J.D.; SILVA, C.M. Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. **Journal of Supercritical Fluids**, v.92, p. 115–176, 2014.

DONNELLY, L. E. et al. Anti-inflammatory effects of resveratrol in lung epithelial cells: molecular mechanisms. **American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 278, n. 4, p. 774-783, 2004.

DONSI, F.; FERRARI, G.; PATARO, G. Applications of pulsed electric field treatments for the enhancement of mass transfer from vegetable tissue. **Food Engineering Reviews**, v.2, n.2, p.109–130, 2010.

DU, F.Y.; XIAO, X.H.; LI, G.K. Application of ionic liquids in the microwave-assisted extraction of trans-resveratrol from *Rhizma Polygoni Cuspidati*. **Journal of Chromatography A**, v.1140, p.56-62, 2007.

DU, Q.; CHEN, H. The methoxyflavones in *Citrus reticulata* Blanco cv. Ponkan and their antiproliferative activity against cancer cells. **Food Chemistry**, v.119, p.567–572, 2010.

ESPINOSA-PARDOA, F. A.; MARTINEZB, J.; MARTINEZ-CORREA, H. A. Extraction of bioactive compounds from peach palm pulp (*Bactris gasipaes*) using supercritical CO₂. **Journal of of Supercritical Fluids**, artigo aceito, 2014.

FAZARY, A. E.; JU, Y.-H. Feruloyl esterases as biotechnological tools: Current and future perspectives. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v.39, n.11, p.811–828, 2007.

FERNANDES, A. L. M. A. P. **Impacto da rolha de cortiça na composição polifenólica de vinhos tintos engarrafados**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ciência e Segurança Alimentar). 192 p. Universidade do Porto, Portugal, 2007.

FONTANA, A. R.; BOTTINI, R. High-throughput method based on quick, easy, cheap, effective, rugged and safe followed by liquid chromatography-multi-wavelength detection for the quantification of multiclass polyphenols in wines. **Journal of Chromatography A**, v.1342, p. 44–53, 2014.

FRANKEL, E. N.; WATERHOUSE, A. L. & TEISSEDRE, P. L. Principal phenolic phytochemical in selected California Wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low density lipoproteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 890-894, 1995.

FREITAS, A. A. et al. Determinação de resveratrol e características químicas em sucos de uvas produzidos em sistemas orgânicos e convencional. **Revista Ceres**, v. 57, n. 1, p. 1-5, 2010.

FRITZ, J.S. **Analytical solid-phase extraction**. John Wiley-VCH, 1999.

FUHRMAN, B.; LAVY, A.; AVIRAM, M. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 61, p. 549-54, 1995.

FULEKI, T.; FRANCIS, F.J. Quantitative methods for anthocyanins.II. Determination of total anthocyanin and degradation index for cranberry juice. **Journal of Food Science**, v. 33, p.78-83, 1968.

GALLICE, W. C.; MESSERSCHMIDT, I.; PERALTA-ZAMORA, P. Caracterização espectroscópica multivariada fazer potencial antioxidante de vinhos . **Química Nova**, v.34, n.3, p. 397-403, 2011.

GAO, R. Y. et al. Resveratrol attenuates azidothymidine-induced cardiotoxicity by decreasing mitochondrial reactive oxygen species generation in human cardiomyocytes. **Molecular Medicine Reports**, v. 4, n. 1, p. 151-155, 2011.

GARCÍA-LAFUENTE, A.; MORO, C.; MANCHÓN, N.; GONZALO-RUIZ, A.; VILLARES, A.; GUILLAMÓN, E.; ROSTAGNO, M.; MATEO-VIVARACHO, L. In vitro anti-inflammatory activity of phenolic rich extracts from white and red common beans. **Food Chemistry**, v. 161, p. 216-223, 2014.

GARCIA-PUENTE R., E., ALCADE-EON, C., SANTOS-BUELGA, C., RIVAS-GONZALO, J.C., ESCRIBANO-BAILON, M.T. Behaviour and characterisation of the colour during red wine making and maturation. **Analytica Chimica Acta**, v.563, p.215–222, 2006.

GARCIA-SALAS, P., MORALES-SOTO, A., SEGURA-CARRETERO, A., FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ. Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. **Molecules**, v. 15, p. 8813-8826, 2010.

GARCÍA-VILLALBA, R.; PACCHIAROTTA, T.; CARRASCO-PANCORBO, A.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; DEELDER, A.M.; MAYBORODA, O.A. Gas chromatography –atmospheric pressure chemical ionization-time of flight mass spectrometry for profiling of phenolic compounds in extra virgin olive oil. **Journal of Chromatography A**, v.1218, n.7, p.959-971, 2011.

GARRIDO, J.; BORGES, F. Wine and grape polyphenols—a chemical perspective. **Food Research International**, v. 44, p. 3134–3148, 2011.

GEORGE, J.P.; DATTA, A.K. Development and validation of heat and mass transfer models for freeze-drying of vegetables slices. **Journal of Food Engineering**, n.52, p.89-93, 2002.

GEORGE, S.; TOURNIAIRE, F.; GAUTIER, H.; GOUPT, P.; ROCK, E.; CARIS-VEYRAT, C. Changes in the contents of carotenoids, phenolic compounds and vitamin C during technical processing and lyophilization of red and yellow tomatoes. **Food Chemistry**, v.124, p.1603-1611, 2011.

GHAFOOR, K., PARK, J., CHOI, Y.H. Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of bioactive compounds from grape peel (*Vitis labrusca* B.) by using response surface methodology. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.11, n.3, 485–490, 2010.

GINJOM, I.; D'ARCYA, B.; CAFFINA, N.; GIDLEY, M. Phenolic compound profiles in selected Queensland red wines at all stages of the wine-making process. **Food Chemistry**, v.125, p. 823–834, 2011.

GLORIES, Y. La couleur des vins rouges. Mesure, origine et interprétation. Partie II. **Connaissances de la Vigne et du Vin**, v. 18, p. 253–271, 1984.

GOLEBIOWSKI, J.; FIORUCCI, S.; ADRIAN-SCOTTO, FERNANDEZ-CARMONA, J.; ANTONCZAK, S. Molecular features underlying the perception of astringency as probe by molecular modeling. **Molecular Informatics**, v.30, p. 410-414, 2011.

GOLI, A. H., BARZEGAR, M., & SAHARI, M. A. Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. **Food Chemistry**, v.92, p.521–525, 2005.

GOMEZ-GARCIA, R., MARTINEZ-AVILA, G.C.G., AGUILAR, C.N. Enzyme-assisted extraction of antioxidative phenolics from grape (*Vitis vinifera* L.) residues. **3 Biotech**, v.2, n.4, p.297 – 300, 2012.

GONSALVES, A.; MELO, T. **Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear**. Coimbra : Imprensa da Universidade de Coimbra, 2007.

GRACE, M. H.; WARLICK, C. W.; NEFF, S. A.; LILA, M. A. Efficient preparative isolation and identification of walnut bioactive components using high-speed counter-current chromatography and LC-ESI-IT-TOF-MS. **Food Chemistry**, v.158, p.229–238, 2014.

GRANATO, D.; KATAYAMA, F.C.U.; DE CASTRO, I.A. Phenolic composition of South American red wines classified according to their antioxidant activity, retail price and sensory quality. **Food Chemistry**, v.129, p.366-373, 2011.

GRIS, E. F. **Perfil fenólico e atividades antioxidante e hipolipemiante de vinhos de variedades *Vitis vinifera* cultivadas em São Joaquim - SC - Brasil**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina; Florianópolis, SC, 2010. 157 p.

GUDERJAN, M., TOPFL, S., ANGERSBACH, A., KNORR, D. Impact of pulsed electric field treatment on the recovery and quality of plant oils. **Journal of Food Engineering**, v.67, n.3, 281–287, 2005.

GUERRA, C. C. **Recherches sur les interactions anthocyanes-flavanols: application à l'interprétation chimique de la couleur des vins rouges.** These de Doctorat, University Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux, France, 1997.

GUILLARME, D.; VEUTHEY, J.-L. State-of-the art of (UHP)LC–MS(–MS) techniques and their practical application. **Journal of Chromatography A**, v.1292, p.1, 2013.

HAGHI, G.; HATAMI, A.; SAFAEI, A.; MEHRAN, M. Analysis of phenolic compounds in *Matricaria chamomilla* and its extracts by UPLC-UV. **Research in Pharmaceutical Science**, v.9, p.31, 2012.

HAKKINEN, S.H.; KARENLAMPI, S.O.; HEINONEN, I.M.; MYKKANEN, H.M.; TORRONEN, A.R. HPLC method for screening of flavonoids and phenolic acids in berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 77, p.543-551, 1998.

HANNAY, J.B., HOGARTH, J. On the solubility of solid in gases. **Proceeding of the Royal Society of London**, v.29, p. 324–326, 1879.

HARBORNE J.B.; BAXER, H.; MOSS, G.P. **Phytochemical dictionary: A handbook of bioactive compounds from plants.** 2nd ed. Padstow: TJ International, pp. 976, 1999.

HASLAM, E. **Practical Polyphenolics.** From structure to molecular recognition and physiological action. Cambridge University Press, Cambridge, 1998.

HEINZ, V., TOEPFL, S., KNORR, D. Impact of temperature on lethality and energy efficiency of apple juice pasteurization by pulsed electric fields treatment. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.4, n.2, p.167–175, 2003.

HELLSTROMA, J.; MATTILAA, P.; KARJALAINEN, R. Stability of anthocyanins in berry juices stored at different temperatures. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 31, p. 12–19, 2013.

HERNANDEZ, Y., LOBO, M.G., GONZALEZ, M. Factors affecting sample extraction in the liquid chromatographic determination of organic acids in papaya and pineapple. **Food Chemistry**, v.114, n.2), p.734–741, 2009.

HERRERA, M. C.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from strawberries prior to liquid chromatographic separation and photodiode array ultraviolet detection. **Journal of Chromatography A**, v.1100, n.1, p. 1-7, 2005.

HERRERO, M., CIFUENTES, A., IBANEZ, E. *Dunaliella salina* microalga Pressurized liquid extracts as potential antimicrobials. **Journal of Food Protection.**, v, 69, n.10, p.2471-2477, 2006.

HERRERO, M.; CASTRO-PUYANA, M.; MENDIOLA, J. A.; IBANEZ, E. Compressed fluids for the extraction of bioactive compounds. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p.1-9, 2013.

HOLLMAN, P.C.H., KATAN, M.B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. **Food and Chemical Toxicology**, v.37, n.9/10, p. 937-42, 1999HOWARD e PANDJAITAN, 2008.

HUANG, T.C.; LU, K.T.; WO, Y.Y.; WU, Y.J.; YANG, Y.L. Resveratrol protects rats from Abeta-induced neurotoxicity by the reduction of iNOS expression and lipid peroxidation. **PLoS One**, v.6, p. e29102, 2011.

HUBER, K.; QUEIROZ, J. H.; MOREIRA, A. V. B.; RIBEIRO, S.M.R. Caracterização química do resíduo agroindustrial da manga ubá (*Mangifera Indica L.*): uma perspectiva para a obtenção de antioxidantes naturais. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 06, n. 01: p. 640-654, 2012.

HUDSON, B. J. F.; LEWIS, J. I. Polyhydroxy flavonoid antioxidants for edible oils: structural criteria for activity. **Food Chemistry**, v. 10, p. 47-51, 1983.

HURTADO-FERNÁNDEZ, E.; CONTRERAS-GUTIÉRREZ, P. K.; CUADROS-RODRÍGUEZ, L.; CARRASCO-PANCORBO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Merging a sensitive capillary electrophoresis–ultraviolet detection method with chemometric exploratory data analysis for the determination of phenolic acids and subsequent characterization of avocado fruit. **Food Chemistry**, v. 141, n.4, p. 3492-3503, 2013.

IACOBUCCI, G.A.; SWEENEY, J.G. The chemistry of anthocyanins,anthocyanidins and related flavilium salts. **Tetrahedron**, v.39, n.19, p.3005-38, 1983.

IBANEZ, E., HERRERO, M., MENDIOLA, J.A., CASTRO-PUYANA, M. Extraction and characterization of bioactive compounds with health benefits from marine resources: macro and micro algae, cyanobacteria, and invertebrates. In: Hayes, M. (Ed.), **Marine Bioactive Compounds: Sources, Characterization and Applications**. Springer, pp. 55–98, 2012.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. A critical review of methods for characterization of phenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v.126, n.4, p.1821–1835, 2011.

INCZEDY, J., LENGYEL, T., URE, A.M. Supercritical Fluid Chromatography and Extraction. **Compendium of Analytical Nomenclature** (Definitive Rules 1997), third ed. Blackwell Science, 1998.

ITO, Y. Countercurrent chromatography. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v.5, p.105–129, 1981.

IZADIFAR, Z. Ultrasound pretreatment of wheat dried distiller's grain (DDG) for extraction of phenolic compounds. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n.6, p.1359-1369, 2013.

JACKSON, R. **Chemical Constituents of grapes**. In: WINE science: principles and applications. p. 178-219. London: Academic Press, 1994.

JAEGER, H.; SCHULZ, M.; LU, P.; KNORR, D. Adjustment of milling, mash electroporation and pressing for the development of a PEF assisted juice production in industrial scale. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.14, p.46–60, 2012.

JAIN, T. Microwave assisted extraction for phytoconstituents – an overview. **Asian Journal of Research in Chemistry**, v.2, n.1, p.19–25, 2009.

JANG, M.; CAI, L.; UDEANI, G. O.; SLOWING, K. V.; THOMAS, C. F.; BEECHER, C. W. W.; FONG, H. H. S.; FARNSWORTH, N. R.; DOUGLAS-KINHORN, A.; METHA, R. G.; MOON, R. C.; PEZZUTO, J. M. . Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **Science**, v.257, p.218- 220, 1997.

JIMENEZ, N.; BOHUON, P.; LIMA, J.; DORNIER, M.; VAILLANT, F.; PEREZ, A. M. Kinetics of anthocyanin degradation and browning in reconstituted blackberryjuice treated at high temperatures (100–180 C). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p.2314–2322, 2010.

JING, P.; ZHAO, S. J.; RUAN, S. Y.; XIE, Z. H.; DONG, Y.; YU, L. Anthocyanin and glucosinolate occurrences in the roots of Chinese red radish (*Raphanus sativus* L.), and their stability to heat and pH. **Food Chemistry**, v.133, p.1569–1576, 2012.

JORDAN, D.B.; BOWMAN, M.J.; BRAKER, J.D.; DIEN, B.S.; HECTOR, R.E.; LEE, C.C.; MERTENS, J.A.; WAGSCHAL, K. Plant cell walls to ethanol. **Biochemistry Journal**, v.442, n.1, p. 241-52, 2012.

JORDÃO, A. M. **Estrutura e composição das proantocinidinas da uva. Evolução ao longo da maturação**, 1999.

JOSÉ L. BERNAL, J. L.; MARTÍN, M., T.; TORIBIO, L. Supercritical fluid chromatography in food analysis. **Journal Chromatography A**, v.1313, n.25, p.24-36, 2013.

JOYCE, E.; PHULL, S. S.; LORIMER, J. P.; MASON, T. J. The development and evaluation of ultrasound for the treatment of bacterial suspensions. A study of frequency, power and sonication time on cultured *Bacillus* species. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.10, n.6, p.315-318, 2003.

KENTISH, S. ASHOKKUMAR M. The physical and chemical effects of ultrasound H. Feng, G.V. Barbosa-Cánovas, J. Weiss (Eds.), **Ultrasound technologies for food and bioprocessing**, Springer, New York (2011), p. 1–12.

KHAN, M.K.; ABERT-VIAN, M.; FABIANO-TIXIER, A-S.; DANGLES, O.; CHEMA, F. Ultrasound-assisted extraction of Polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. **Food Chemistry**, v.119, n.2, p. 851-858, 2010.

KHAN, M.M.; AHMAD, A.; ISHRAT, T.; KHAN, M.B.; HODA, M.N.; KHUWAJA, G.; RAZA, S.S.; KHAN, A.; JAVED, H.; VAIBHAV, K.; ISLAM F. Resveratrol attenuates 6-hydroxydopamine-induced oxidative damage and dopamine depletion in rat model of Parkinson's disease. **Brain Research**. v.1328, p. 139–151, 2010.

KNORR, D.; FROEHLING, A.; JAEGER, H.; REINEKE, K.; SCHLUETER, O.; SCHOESSLER, K. Emerging technologies in food processing. **Annual Review of Food Science and Technology**, v.2, p.203–235, 2011.

KUBRAKOVA, I.V.; TOROPCHENOVA, E.S. Microwave heating for enhancing efficiency of analytical operations (review). **Inorg. Mater.** v.44, n.14, p.1509–1519, 2008.

KUMAR, A.; NEGI, G.; SHARMA, S. S. Neuroprotection by resveratrol in diabetic neuropathy: concepts & mechanisms. **Curr. Med. Chem.**, v.20, p. 4640–4645, 2013.

LACHMAN, J., SULC, M., & SCHILLA, M. Comparison of the total antioxidant status of Bohemian wines during the wine-making process. **Food Chemistry**, v.103, p.802–807, 2007.

LAI, C.Y.; YANG, J.Y.; RAYALAM, S.; DELLA-FERA, M.A.; AMBATI, S.; LEWIS, R.D. Preventing bone loss and weight gain with combinations of vitamin D and phytochemicals. **J Med Food**, v.14,p. 1352–1362, 2011.

LANG, Q., WAI, C.M. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies - a practical review. **Talanta**, v.53, n.4, p.771–782, 2001.

LAPORNIK, B.; PROSEK, M.; WONDRA, A. G. Comparison of extraction prepared from plants by- products using different solvent and extraction time. **Journal of Food Engineering**, v. 71, p. 214-501, 2005.

LAROZE, L., SOTO, C., ZUNIGA, M.E. Phenolic antioxidants extraction from raspberry wastes assisted by-enzymes. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 6, p. 2-11, 2010.

LE GALL, G.; COLQUHOUN, I. J. NMR spectroscopy in food authentication in food authenticity and traceability. In Michele Lees (Ed.), **Food science and technology** (pp. 131–156), 2003. North America: Woodhead Publishing.

LEE, C., JAWORSKI, A. Identification of some phenolics in White grapes. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.1, p.43-46, 1990.

LEVENGOOD, J.; BOULTON, R. The variation in the colour due to copigmentation in young Cabernet Sauvignon wines. **American Chemical Society**, v.35, p.52, 2004.

LI, H.; XIA, N. Forstermann Cardiovascular effects and molecular targets of resveratrol **Nitric Oxide**, v.26, p. 102–110, 2012.

LIAO, H.; CAI, Y.; HASLAM, E. Polyphenol interactions. Anthocyanins: copigmentation and colour changes in red wines. **Journal of. Science and Food Agriculture**, v.59, p.299-305, 1992.

LIU, Q., CAI, W., & SHAO, X. Determination of seven polyphenols in water by high performance liquid chromatography combined with preconcentration. **Talanta**, v.77, p.679–683, 2008.

LIYANA-PATHIRANA, C.; SHAHIDI, F. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. **Food Chemistry**, v.93, n.1, p.47-56, 2005.

LUCENA, A.P.S., NASCIMENTO, R.J.B., MACIEL, J.A.C., TAVARES, J.X., BARBOSA-FILHO, J.M.; OLIVEIRA, E.J. Antioxidant activity and phenolics content of selected Brazilian wines. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.23, p.30-36, 2010.

LUENGO, E.; ÁLVAREZ, I.; RAS, J. Improving the pressing extraction of polyphenols of orange peel by pulsed electric fields. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.17, p. 79-84, 2013.

MACHIDA, H.; TAKESUE, M.; SMITH, R.L. Green chemical processes with supercritical fluids: properties, materials, separations and energy. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.60, p.2–15, 2011.

MAJDA, M. H.; RAJAEIC, A.; BASHID, D.S.; MORTAZAVIF, S. A.; BOLOURIAN, S. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from bovine

pennyroyal (*Phlomischema parviflorum*) leaves using response surface methodology. **Industrial Crops and Products**, v.57, p.195–202, 2014.

MALACRIDA, C. R., MOTTA, S. DA. Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade. **Boletim do Ceppa**, v.24, p.59, 2006.

MALDANER, L. JARDIM, I. C. S. F. UHPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimento e desafios recentes. **Scientia Chromatographica**, v.4, n.3, p.197-207, 2012.

MALIEN-AUBERT, C., DANGLES, O., AMIOT, M.J. Color stability of commercial anthocyanins-based extracts in relation to the phenolic composition. Protective effects by intra- and intermolecular copigmentation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.170–176, 2001.

MANN, J.; DAVIDSON, R. S.; HOBBS, J. B.; BANTHORPE, D. V.; HARBORNE, J. B. **Natural products**. Their chemistry and biological significance. 3.ed. Harlow: Addison Wesley Longman Limited, 1996. p. 362-363.

MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. procedimentos Analíticos parágrafo identificação de antocianinas presentes los Extratos naturais. **Química Nova**, v. 31, n.5, p. 1218-1223, 2008.

MARQUES et al. Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata*. **Química Nova**, v. 35, n. 3, 517-p.522, 2012.

MAZZARACCHIO, P.; PIFFERI, P.; KINDT, M.; MUNYANEZA, A.; BARBIROLI, G. Interactions between anthocyanins and organic food molecules in model systems. **International Journal of Food Science and Technology**, v.39, n.1, p.53–59, 2004.

MEYER, A.S.; YI, O.; PEARSON, D. A.; WATERHOUSE, A.; FRANKEL, E. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation in relation to phenolic antioxidants in grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.1638-1643, 1997.

MILITARU, C.; DONOIU, I.; CRACIUN, A.; SCOREI, I.D.; BULEARCA, A.M.; SCOREI, R.I. Oral resveratrol and calcium fructoborate supplementation in subjects with stable angina pectoris: effects on lipid profiles, inflammation markers, and quality of life. **Nutrition**, v.29, p. 178–183, 2013.

MINUSSI, R. C., ROSSI, M., BOLOGNA, L., CORDI, L., ROTILIO, D., PASTORE, G. M., et al. Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. **Food Chemistry**, v.82, p.409–416, 2003.

MIRONA, T.L. HERREROB, M. IBÁÑEZ, E. Enrichment of antioxidant compounds from lemon balm (*Melissa officinalis*) by pressurized liquid extraction and enzyme-assisted extraction. **Journal of Chromatography A**, v.1288, p. 1–9, 2013.

MOLINA-MAYO, C., HERNANDEZ-BORGES, J., BORGES-MIQUEL, T. M., & RODRIGUEZ-DELGADO, M. A. Determination of pesticides in wine using micellar electrokinetic chromatography with UV detection and sample stacking. **Journal of Chromatography A**, v.1150, p.348–355, 2007.

MOLNÁR-PERL, I.; FÜZFAI, Z. Chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrochromatographic techniques in the analysis of flavonoids. **Journal of Chromatography A**, v.1073, p.201-227, 2005.

MONAGAS, M., BARTOLOME, B., & GOMEZ-CORDOVES, C. Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.45, n.2, p.85–118, 2005.

MORAES, V.; LOCATELLI, C. Vinho: uma revisão sobre a composição química e benefícios à saúde. **Evidência**, v. 10 n. 1-2, p. 57-68, 2010.

MORAES-DE-SOUZA, R.A.; OLDONI, T.L.C.; CABRAL., I.S.R.; ALENCAR, S.M. compostos fenólicos totais e atividade antioxidante de chás comercializados no Brasil. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos – CEPPA**, v.29, p.229-236, 2011.

MORENO-ARRIBAS, M. V.; POLO, M. C. (Ed.). **Wine Chemistry and Biochemistry**. Madrid: Springer, 2009. 735 p.

MOTILVA, M-J.; SERRA, A.; MACIÀ, A. Analysis of food polyphenols by ultra high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry: An overview. **Journal of Chromatography A**, v.1292, p.66-82, 2013.

MOUSSA-AYOUB, T. E.; EL-SAMAHY, S. K.; KROH, L. W.; ROHN, S. Identification and quantification of flavonol aglycons in cactus pear (*Opuntia ficus indica*) fruit using a commercial pectinase and cellulase preparation. **Food Chemistry**, v.124, n.3, p.1177–1184, 2011.

MUKHERJEE, S.; DUDLEY, J. I.; DAS, D. K. Dose-dependency of resveratrol in providing health benefits. **Dose Response**, v. 18, n. 8, p. 478-500, 2010.

MULERO, J.; PARDO, F.; ZAFRILLA, P. Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant activity in conventional and organic red wines during storage. **European Food Research Technology**, v.229, p.807-812, 2010.

NACZK, M., & SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.41, p.1523–1542, 2006.

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

NARAYAN, C.; KUMAR, A. Antineoplastic and immunomodulatory effect of polyphenolic components of *Achyranthes aspera* (PCA) extract on urethane induced lung cancer in vivo. **Oriental Pharmaceutical Exp Med**, v.13, p.51-59, 2013.

NIETO, A.; BORRULL, F.; POCURULL, E.; MARCE, R.M. Pressurized liquid extraction: a useful technique to extract pharmaceuticals and personal-care products from sewage sludge. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v.29, n.7, p.752–764, 2010.

NOUR, V.; TRANDAFIR, I.; COSMULESCU, S. Antioxidant capacity, phenolic compounds and minerals content of blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) leaves as influenced by harvesting date and extraction method. **Industrial Crops and Products**, v.53, p.133-139, 2014.

NYAM, K.; TAN, C.P.; LAI, O.M.; LONG, K.; CHE MAN, Y. Optimization of supercritical fluid extraction of phytosterol from roselle seeds with a central composite design model. **Food and Bioproducts Processing**, v.88, n.2, p.239–246, 2010.

OGDEN, C. L.; CARROL, M. D.; KIT, B.K.; FLEGAL, K. M. Prevalence of childhood and adult obesity in the United States, 2011-2012. **Journal of the American Medical Association**, v. 311, n.8, p.806-814, 2014.

OGLE, W.O.; SPEISMAN, R.B.; ORMEROD B.K. POTENTIAL of treating age-related depression and cognitive decline with nutraceutical approaches: a mini-review **Gerontology**, v.59,p. 23–31, 2013.

OIV, Organização Internacional de Vinhas e Vinhos. **Compendium of International Methods of Analysis - International Organisation of Vine and Wine**. Edition 2011, v. 1. Disponível em: http://news.reseauconcept.net/pls/news/pk_recherche3.article?i_sid=&i_article_id=20851&i_app_id=20753&i_modele=http://www.oiv.int/es/recherche/modele.php. Acesso em junho de 2012.

OLIVEIRA, A. L.; DESTANDAUB, E.; FOUGÈRE, L.; LAFOSSE, M. Isolation by pressurised fluid extraction (PFE) and identification using CPC and HPLC/ESI/MS of phenolic compounds from Brazilian cherry seeds (*Eugenia uniflora* L.) **Food Chemistry**, v.145, p. 522–529, 2014.

OLIVEIRA, G., R.; SANTOS, J. T. S.; CAMPOS, A. F. P.; NUNES, T. P.; RUSSO, S. L.; OLIVEIRA JUNIOR, A.M. Prospecção Tecnológica: Processo de liofilização na indústria de alimentos. **Revista GEINTEC**, v.3, n.1, p.92-102, 2012.

OOMEN, C. A. et al. Resveratrol preserves cerebrovascular density and cognitive function in aging mice. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 1, p. 1-9, 2009.

PACHECO-PALENCIA, L.A., HAWKEN, P., TALCOTT, S.T. Phytochemical, antioxidant and pigment stability of acai (*Euterpe oleracea:art*) as affected by clarification, ascorbic acid fortification and storage. **Food Research International**, v.40, p.620–628, 2007.

PALENZUELA, B.; ARCE, L.; MACHO, A.; MUNOZ, E.; RIOS, A.; VALCARCEL, M. Bioguided extraction of polyphenols from grape marc by using an alternative supercritical-fluid extraction method based on a liquid solvent trap. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.378, p.2021-2027, 2004.

PAN, X., NIU, G., LIU, H. Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. **Chemical Engineering and Processing**, v.42, n.2, p.129–133, 2003.

PARDO-GARCÍA, A.I.; MARTÍNEZ-GIL, A.M.; CADAHÍA, E.; PARDO, F.; ALONSO, G.L.; SALINAS. M.R. Oak extract application to grapevines as a plant biostimulant to increase wine polyphenols. **Food Research International**, v. 55, p. 150-160, 2014.

PARE, J.J.R.; BELANGER, J.M.R.; STAFFORD, S.S. Microwave-assisted process (MAP™): a new tool for the analytical laboratory. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v.13, n.4, p.176–184, 1994.

PARK, Y.; NAMIESNIK, J.; VEARASILP, K.; LEONTOWICZ, H.; LEONTOWICZ, M.; BARASCH, D.; NEMIROVSKI, A.; TRAKHTENBERG, S.; GORINSTEIN, S. Bioactive compounds and the antioxidant capacity in new kiwi fruit cultivars. **Food Chemistry**, v. 165, p. 354-361, 2014.

PAULO, G. A. Vinho e câncer. **Revista Wine Style**. 11. ed. 2007.

PAVANELLi, S.P. **Degradação de Corantes da Indústria Alimentícia por Processos Oxidativos e Redutivos: Monitoramento por Espectrometria de Massas com Ionização Electrospray (ESI-MS)**. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, 2010.

PENNA, N.G.; DAUDT, C. E.; HENRIQUES, J. A. P. Comportamento de ésteres hidrocínâmicos durante a vinificação de vinhos brancos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n.7, p.983-989, 2001.

PEREIRA, C.G.; MEIRELES, M.A.A. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: fundamentals, applications and economic perspectives. **Food and Bioprocess Technology**, v.3, p. 340-372, 2010.

PEREZ-MAGALÃES, S.; M.L. GONZALEZ-SAN JOSE. Polyphenols and colour variability of red wines made from grapes harvested at different ripeness grade. **Food Chemistry**, v.96, p.197-208,2006.

PETERSSON, E.V.; LIU, J.; SJÖBERG, P.J.R.; DANIELSSON, R.; TURNER, C. Pressurized hotwater extraction of anthocyanins from red onion: a study on extraction and degradation rates. **Analytica Chimica Acta**, v.663, p.27–32, 2010.

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

PIYASENA, P.; MOHAREB, E.; MCKELLAR, R. C. Inactivation of microbes using ultrasound: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.87, n.3, p.207-216, 2003.

PŁOTKA, J. M.; BIZIUK, M.; MORRISON, C.; NAMIEŚNIK, J. Pharmaceutical and forensic drug applications of chiral supercritical fluid chromatography TrAC. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 56, p. 74-89, 2014.

POKORNY, J., KORCZAK, J. Preparation of natural antioxidants. In: POKORNY, J. et al. **Antioxidants in food: practical applications**. New York: CRC. p.311-330, 2001.

PONTES, L. V. **Avaliação sensorial e instrumental da cor de misturas em pó para refresco, bebida isotônica e gelatina utilizando corantes naturais**. Dissertação de Mestrado. Programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, DTA/UFV, 2004.

POZZI, A. C. S. **Desenvolvimento de métodos de análise espectrofotométrica de flavonóides do "Maracujá": *Passiflora alata* e *Passiflora edulis***. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências, USP, São Carlos, 2007.

PRAUSNITZ, J. M., LICHTENTHALER, R. N., AZEVEDO, E. G. **Molecular Thermodynamics of fluid-Phase Equilibria**, 3rd ed., Prentice Hall, NJ, 1999.

PUÉRTOLAS, E. et al. Improvement of winemaking process using pulsed electric fields at pilot-plant scale. Evolution of chromatic parameters and phenolic content of Cabernet Sauvignon red wines. **Food Research International**, v.43, p.761–766, 2010.

PUÉRTOLAS, E.; CREGENZÁN, O.; LUENGO, E.; ÁLVAREZ, I.; RASO, J. Pulsed-electric-field-assisted extraction of anthocyanins from purple-fleshed potato. **Food Chemistry**, v.136, p.1330–1336, 2013.

PUERTOLAS, E.; LUENGO, E.; ALVAREZ, I.; RASO, J. Improving mass transfer to soften tissues by pulsed electric fields: Fundamentals and applications. In M. P. Doyle, & T. R. Klaenhammer (Eds.), **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 3, p.263–282. Palo Alto: Annual Reviews, 2012.

PURI, M. et al. Molecular characterization and enzymatic hydrolysis of naringin extracted from kinnow peel waste. **International Journal of Biology Macromolecular**, v.48, p.58–62, 2011.

PURI, M., SHARMA, D., BARROW, C.J. Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. **Trends in Biotechnology**, v.30, n.1, p.37–44, 2012.

QUEIPO-ORTUÑO, M.I.; BOTO-ORDÓÑEZ, M.; MURRI, M.; GOMEZ-ZUMAQUERO, J.M.; CLEMENTE-POSTIGO, M.; ESTRUCH, R.; CARDONA DIAZ, F.; ANDRÉS-LACUEVA, C.; TINAHONES, FJ. Influence of red wine polyphenols and ethanol on the gut microbiota ecology and biochemical biomarkers. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.95, n.6, p.1323-34, 2012.

QUINCOZES-SANTOS, A.; BOBERMIN, L.D.; LATINI, A.; WAJNER, M.; SOUZA, D.O.; GONCALVES, C.A.; GOTTFRIED, C. Resveratrol protects C6 astrocyte cell line against hydrogen peroxide-induced oxidative stress through heme oxygenase 1. **PLoS One**, v.8, p. e64372, 2013.

QUINCOZES-SANTOS, A.; GOTTFRIED, C. Resveratrol modulates astroglial functions: neuroprotective hypothesis. **Ann. NY Acad. Sci.**, v.1215, p. 72–78, 2011.

RABANES, H., R.; GUIDOTE, A.M.; QUIRINO, J. P. Micellar electrokinetic chromatography of the constituents in Philippine lagundi (*Vitex negundo*) herbal products. **Microchemical Journal**, v.112, p.153-158, 2014.

RAHIMA, A.A.; NOFRIZAL, S.; BAHRUDDIN SAAD. Rapid tea catechins and caffeine determination by HPLC using microwave-assisted extraction and silica monolithic column. **Food Chemistry**, v.147, p. 262–268, 2014.

RAMOS, E. M.; GOMIDE, L. A.M. Avaliação Objetiva da Cor. In: **Avaliação da qualidade de carnes: fundamentos e metodologias**. Cap.7, ed. UFV, Viçosa-MG, p.287-379, 2007.

RAMOS, L. A., et al. Utilização do extrato bruto de frutos de *solanum nigrum l* no ensino de química. **Eclética Química**, v.25, p.229, 2000.

RASTIJA, V., & MEDIC'-ŠARIC', M. Chromatographic methods for the analysis of polyphenols in wines. **Chemistry in Industry**, v.58, p.121–128, 2009.

RASTIJA, V.; SRECNIK, G.; SARIC, Marica-Medic. Polyphenolic composition of Croatian wines with different geographical origins. **Food Chemistry**, n. 115, p. 54-60, 2009.

RATTI, C. Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review. **Journal of Food Engineering**, v.49, p.311-319, 2001.

RAVERCHON, E., MARCO, I.D. Review: supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **Journal of Supercritical Fluids**, v.38, n.2, p.146–166, 2006.

RÊGO JÚNIOR, N. O.; FERNANDEZ, L. G.; CASTRO, R.D.; SILVA, L.C.; GUALBERTO, S. A.; PEREIRA, M.L.A.; SILVA, M. V. Compostos bioativos e atividade antioxidante de extratos brutos de espécies vegetais da caatinga. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n. 1, p. 50-57, 2011.

RIBEIRO, S. M. R. **Caracterização e avaliação do potencial antioxidante de mangas (*Magifera indica L.*) cultivadas no Estado de Minas Gerais**. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola e Biologia Molecular). Universidade Federal de Viçosa (MG), 2006.

RIBEIRO, V.L.M.C. **Estudo de Compostos Bioativos Presentes em *Adansonia Digitata* e o seu Potencial Fitoquímico na Indústria Farmacêutica**. Dissertação de mestrado - Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade Fernando Pessoa. Porto, 2012.

RIBÉREAU-GAYON, et al., **Handbook of Enology: the microbiology of wine and vinifications**. 2. ed. Nova Jersey: Wiley & Sons, 2006.

RIBÉREAU-GAYON, P. Evolution des composés phénoliques au cours de la maturation du raisin. II. Discussion des resultants obtenus en 1969, 1970 et 1971. **International Sciences de la Vigne et du Vin**, v.2, p.161–175, 1972.

RICARDO DA SILVA, J. M. **Estrutura e composição das procianidinas da uva e do vinho: efeitos potenciais na saúde.** In: 3º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo, Évora, Portugal, 1995, v.2, p.343-355.

RICE-EVANS, C. A., MILLER, N. J., & PAGANGA, G. Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v.20, p.933–956, 1996.

RICHTER, B.E.; JONES, B.A.; EZZELL, J.L.; PORTER, N.L.; AVDALOVIC, N.; POHL, C. Accelerated Solvent extraction: A Technique for Sample Preparation. **Analytical Chemistry**, v.68, p.1033-1039, 1996.

RIJKE, E.; OUT, P.; NIESSEN, W.M.A.; ARIESE, F.; GOOIJER, C.; BRINKMAN, U.A.T. Analytical separation and detection methods for flavonoids. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, p. 31-63, 2006.

RIVELLI, D. P., ALMEIDA, R. L., ROPKE, C. D., & BARROS, S. B. M. Hydrolysis influence on phytochemical composition, antioxidant activity, plasma concentration, and tissue distribution of hydroethanolic *Ilex paraguariensis* extract components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59,p. 8901–8907, 2011.

RODRIGUES, J. A. **Determinação da actividade antioxidante e composição fenólica de vinhos portugueses e correlação com parâmetros de cor.** Dissertação (Faculdade de Ciências e Tecnologia). Universidade Nova de Lisboa. Setembro 2011, 161p.

RODRIGUEZ-DELGADO, M. A.; GONZALEZ, G.; PEREZ-TRUJILLO, J. P.; GARCIAMONTELONGO, F. J. Trans-resveratrol in wines from the Canary Islands (Spain). Analysis by high performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 76, n. 3, p. 371-375, 2002.

ROSA, P.T.V.; PARAJÓ, J.C.; DOMINGUEZ, H.; MOURE, A.; DÍAZ-REINOSO, B.; SMITH Jr., R.L.; TOYOMIZU, M.; FLORUSSE, L.J.; PETERS, C.J.; GOTO, M.; LUCAS, S.; MEIRELES, M.A.A. Supercritical and pressurized fluid extraction applied to the food industry. In: MEIRELES, M.A.A. (Ed.). **Extracting Bioactive Compounds for Food Products: Theory and Applications.** Boca Raton: CRC Press, p. 269-401, 2009.

ROSTAGNO, M.A.; MANCHÓN, N.; D'ARRIGO, M.; GUILLAMÓN, E.; VILLARES, A.; GARCÍA-LAFUENTE, A.; RAMOS, A.; MARTÍNEZ, J.A. Fast and simultaneous determination of phenolic compounds and caffeine in teas, mate, instant coffee, soft drink and energetic drink by high-performance liquid chromatography using a fused-core column. **Analytica Chimica Acta**, v. 685, p.204-211, 2011.

ROUTRAY, W.; ORSAT, V. Microwave-assisted extraction of flavonoids: a review. **Food Bioprocess Technology**, v.5, n.2, p.409–424, 2012.

ROWLAND, I. Optimal nutrition: fibre and phytochemicals. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.58, p.415 – 420, 1999SALAS et al., 2005.

RUANO-RAVINA, A.; FIGUEIRAS, A.; BARROS-DIOS, J. M. Type of wine and risk of lung cancer: a case-control study in Spain. **Thorax**, v. 59, n. 11, p. 981-985, 2004.

RUSTIONI, L.; BEDGOOD J. R. D. R.; FAILLA, O.; PRENZLER, P. D.; ROBARDS, K. Copigmentation and anti-copigmentation in grape extracts studied by spectrophotometry and post-column-reaction HPLC. **Food Chemistry**, v.132, p.2194-2201, 2012.

SAKATA, Y.; ZHUANG, H.; KWANSA, H.; KOEHLER, R.C.; DORE, S. Resveratrol protects against experimental stroke: putative neuroprotective role of heme oxygenase 1. **Exp. Neurol.**, v.224,p. 325–329, 2010.

SÁNCHEZ-VICENTE, Y.; CABANAS, A.; RENUNCIO, J.A.R.; PANDO, C.C. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) seed oil using carbon dioxide and ethanol. **Journal Supercritical Fluids**, v.49, p.167–173, 2009.

SANG, S., LAPSLEY, K., JEONG, W. S., LACHANCE, P. A., HO, C. T., ROSEN, R. T. J. Antioxidative phenolic compounds isolated from almond skins (*Prunus amygdalus* Batsch). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.2459–2463, 2002.

SANTIN, N. C.; BORDIGNON, L. S.; MORAES, G. K. D. Polifenóis totais e outras características físico-químicas de amostras de vinhos Merlot produzidos na região Meio-Oeste de Santa Catarina. **Evidência**, v. 9 n. 1-2, p. 43-49, 2009.

SANTOS, D.T.; VEGGI, P. C.; ANGELA, M.; MEIRELES, A. Optimization and economic evaluation of pressurized liquid extraction of phenolic compounds from jabuticaba skins. **Journal of Food Engineering**, v.108, p.444–452, 2012.

SANTOS, D.T.; VEGGI, P.C.; MEIRELES, M.A.A., Extraction of antioxidant compounds from jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins: yield, composition and economical evaluation. **Journal of Food Engineering**, v.101, p.23–31, 2010.

SANTOS, S.A., O.; VILELA, C.; CARMEN S.R. Ultra-high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry applied to the identification of valuable phenolic compounds from Eucalyptus wood. **Journal of Chromatography B**, v.938, p. 65– 74, 2013.

SANTOS-BUELGA, C.; ESCRIBANO-BAILÓN, M. T.; LATTANZIO, V. **Recent advances in polyphenol research**, v. 2, (1 ed). UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2010.

SÃO JOSÉ, J. B.F.; ANDRADE, N.J.; RAMOS, A.M.; VANETTI, M.C.D.; STRINGHETA, P.C.; CHAVES, J. B.P. Decontamination by ultrasound application in fresh fruits and vegetables. **Food Control**, v. 45, p.36-50, 2014.

SAUTTER, C. K. **Avaliação da presença de resvetrarol em suco de uva**. 2003. 135 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)–Universidade Federal de Santa Maria, 2003.

SCHWARTZ, S.J.; VON HELBE, J.; GIUSTI, M.M. Corants. In: FENNEMA, O.R. **Química de Alimentos**, Porto Alegre, cap.8, p.445-498, 2010.

SCOLLARY, G. R.; PÁSTI, G.; KÁLLAY, M.; BLACKMAN, J.; CLARK, A. C. Astringency response of red wines: Potential role of molecular assembly. **Trends in Food Science & Technology**, v. 27, n.1, p.25-36, 2012.

SEBRAE. - Serviço Brasileiro de Apoio a Micro e Pequena Empresa (2014). Alimentos funcionais: crescimento Brasil acima da média mundial. Boletins SEBRAE 2014 - 06 de março de 2014. Disponível em: <http://www.sebraemercados.com.br/alimentos-funcionais-crescimento-brasil-acima-da-media-mundial/>. Acesso em 10 de julho de 2014.

SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos**. São Paulo : Varela, 1996. 517p.

SHAHIDI F, JANITHA P.K.; WANASUNDARA P. D. Phenolic antioxidants. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v.32, n.1, p.67-103, 1992.

SILVA, C. M. G.; BRAGA, M. A.; SOBRAL, V. R. V.; MARTINEZ, C. A. R.; CARVALHO, P. O. Atividade antioxidante de chás biotransformados. **Alimentos e Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 661-669, 2012.

SILVA, L.R., ANDRADE, P. B., VALENTÃO, P., SEABRA, R.M., TRUJILLO, M. E.; VELÁZQUEZ, E. Analysis of non-coloured phenolics in red wine: Effect of *Dekkera bruxellensis* yeast. **Food Chemistry**, v.89, p.185-189, 2005.

SILVA, W. T. et al. Efeito renoprotetor dos flavonoides do vinho na nefrotoxicidade do imunossupressor Tacrolimus. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 24, n. 3, p. 388-392, 2011.

SINERO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M.J. Influencia del tratamiento enzimático em la calidad de aceites vegetales. **Grasas y Aceites**, v. 49, n.2, p. 191-202, 1998.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-177, 1999.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-177, 1999.

SOUZA, D.G.; BELLAVER, B.; SOUZA, D.O.; QUINCOZES-SANTOS, A. Characterization of adult rat astrocyte cultures. **PLoS One**, v.8, p. e60282, 2013.

SOUZA, D.O.; GONCALVES, C.A.; GOTTFRIED, C. Resveratrol prevents ammonia toxicity in astroglial cells. **PLoS One**, v.7, p. e52164, 2012.

SOWBHAGYA, H.B.; CHITRA, V.N. Enzyme-assisted extraction of flavorings and colorants from plant materials. **Critical Review of Food Science and Nutrition**, v.50, p.146–61, 2010.

SRIVASTAVA, A.; AKOH, C.C.; YI, W. F.; KREWER, G. GERARD. Effect of Storage Conditions on the Biological Activity of Phenolic Compounds of Blueberry Extract Packed in Glass Bottles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n.7, p. 2705-2713, 2007.

STALIKAS, C. D. Etraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal Separation Science**, v. 30, p. 3268 – 3295, 2007. STEVENSON *et al.*, 2008.

STATISTICAL ANALYSIS SOFTWARE (SAS), versão 9.2, 2013.

SUBRAMANI, S., CASIMIR, C.A., KREWER, G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.2432–2438, 2002.

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

SUN, H.; GE, X.; LY, Y.; WANG A. Application of accelerated solvent extraction in the analysis of organic contaminants, bioactive and nutritional compounds in food and feed. **Journal of Chromatography A**, v.1237, p.1-23, 2012.

SUN, T., HO, C. Antioxidant activities of buckwheat extracts. **Food Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 743-749, 2005.

SUTHERLAND, I.A.; FISHER, D. Role of counter-current chromatography in the modernisation of Chinese herbal medicines. **Journal of Chromatography A** v.1216, p.740–753, 2009.

ŚWIECA, M.; SĘCZYK, L.; GAWLIK-DZIKI, U.; DZIK, D. Bread enriched with quinoa leaves – The influence of protein–phenolics interactions on the nutritional and antioxidant quality. **Food Chemistry**, v. 162, n.1, p.54-62, 2014.

TABART, J., KEVERS, C., SIPEL, A., PINCEMAIL, J., DEFRAIGNE, J.-O., DOMMES, J. Optimisation of extraction of phenolics and antioxidants from black currant leaves and buds and of stability during storage. **Food Chemistry**, v.105, p.1268–1275, 2007.

TAO, Y. SUN, D.-W. Enhancement of food processes by ultrasound: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2013.

TAPIERO, H.; TEW, K. D.; BA, G. N.; MATHÉ, G. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? **Biomedical Pharmacotherapy**, v.56, n.4, p. 200-207, 2002.

TAYLOR, L. T. Supercritical fluid chromatography for the 21st century. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.47, p.566–573, 2009.

TIITTO-JULKUNEM, R. Phenolic constituents in the leaves of Northern Willows: methods for the analysis of certain phenolics. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 33, n. 2, p. 213-217, 1985.

TIMBERLAKE, C. F., BRIDLE, P. Spectral studies of anthocyanins and anthocyanidin equilibrium in aqueous solution. **Nature**, v. 212, p.158-162, 1966.

TIMMERS, S.; KONINGS, E.; BILET, L.; HOUTKOOPER, R.H.; VAN DE WEIJER, T.; OOSSENS, G.H.; HOEKS, J.; VAN DER KRIEKEN, S.; RYU, D.; KERSTEN, S.; MOONEN-KORNIPS, E.; HESSELINK, M.K.; KUNZ, I.; SCHRAUWEN-HINDERLING, V.B.; BLAAK, E.E.; AUWERX, J.; SCHRAUWEN P. Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. **Cell Metab.**, v.14, p. 612–622, 2011.

TOEPFL, S.; HEINZ, V. **Pulsed electric field assisted extraction – A case study**. In: BARBOSA-CANOVAS, G.; ZHANG, H. (Eds.). *Textbook Food Preservation*.

TOME-CARNEIRO, J.; GONZALVEZ, M.; LARROSA, M.; YANEZ-GASCON, M.J.; GARCIA-ALMAGRO, F.J.; RUIZ-ROS, J.A.; GARCIA-CONESA, M.T.; TOMAS-BARBERAN, F.A. ESPIN, J.C. ONE-year consumption of a grape nutraceutical containing resveratrol improves the inflammatory and fibrinolytic status of patients in

primary prevention of cardiovascular disease. **American Journal of Cardiology**, v.110, p. 356–363, 2012.

TOME-CARNEIRO, J.; GONZALVEZ, M.; LARROSA, M.; YANEZ-GASCON, M.J.; GARCIA-ALMAGRO, F.J.; RUIZ-ROS, J.A.; TOMAS-BARBERAN, F.A.; GARCIA-CONESA, M.T.; ESPIN J.C. Grape resveratrol increases serum adiponectin and downregulates inflammatory genes in peripheral blood mononuclear cells: a triple-blind, placebo-controlled, one-year clinical trial in patients with stable coronary artery disease. **Cardiovasc. Drugs Ther.**, v.27, p. 37–48, 2013.

TONON, R. V.; BRABET, C.; HUBINGER, M. D. Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpeoleraceae* Mart.) juice produced with different carrier agents. **Food Research International**, Amsterdam, v. 43, p. 907-914, 2010.

TOROLA, A., M.; GIANNETTI, V. Determination by LC of Polyphenols in Italian Red Wine. **Cromatographia**, v. 65, p. 367 – 371, 2007.

TSAO, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. **Nutrients**, v.2, n.12, p.1231-1246, 2010.

TSENG, P.; HOU, T.; CHEN, R.; PENG, H.; HSIEH, C.; KUO, M.; YEN, M. Resveratrol promotes osteogenesis of human mesenchymal stem cells by upregulating *RUNX2* gene expression via the SIRT1/FOXO3A axis. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.26, n.10, p. 2552–2563, 2011.

TÜRKYILMAZ, M.; ÖZKA, M. Effects of condensed tannins on anthocyanins and colour of authentic pomegranate (*Punica granatum* L.) juices. **Food Chemistry**, v.164, p. 324-331, 2014.

TURNER, C. IBANEZ, E. IN: LEBOVKA, N. VOROBIEV, E. CHEMAT, F. (Editors), Enhancing Extraction Processes in the Food Industry – **Contemporary Food Engineering**, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2011.

VAN ACKER, S. A. B. E., VAN DEN BERG, D.-J., TROMP, M. N. J. L., GRIFFIOEN, D. H., VAN BENNEKOM, W. P., VAN DER VIJGH, W. J. F., et al. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology & Medicine**, v.20, p.331–342, 1996. VINATORU *et al.*, 1998.

VANG, O.; AHMAD, N.; BAILE, C.A.; BAUR, J.A.; BROWN, K.; CSISZAR, A.; DAS, D.K.; DELMAS, D.; GOTTFRIED, C.; LIN, H.Y.; MA, Q.Y.; MUKHOPADHYAY, P.; NALINI, N.; PEZZUTO, J.M.; RICHARD, T.; SHUKLA, Y.; SURH, Y.J.; SZEKERES, T.; SZKUDELSKI, T.; WALLE, T.; WU J.M. What is new

for an old molecule? Systematic review and recommendations on the use of resveratrol. **PLoS One**, v.6, p. e19881, 2011.

VAQUERO, M. J. R.; ALBERTO, A. R.; NADRA, M. C. M. Influence of phenolic compounds from wines on the growth of *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 587-593, 2007.

VECHIATTO, C. D.; PAITNER, J. R. T. Efeito dos flavonoides presentes no vinho tinto na redução do peso corpóreo, gordura peritoneal, ingestão alimentar e colesterol em ratos da raça *Wistar*. 2010. Disponível em: <www.fag.edu.br/graduacao/nutricao/.../CIbele%20Vechiato.pdf>. Acesso em: 15 junho. 2014.

VEGGIA, P. C.; PRADO, J. M.; BATAGLIONC, G. A.; EBERLINC, M. N.; MEIRELES, M. A. A. Obtaining phenolic compounds from jatoba (*Hymenaea courbaril* L.) bark by supercritical fluid extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v.89, p.68–77, 2014.

VERMA, B.; HUCL, P.; CHIBBAR, R. N. Phenolic acid composition and antioxidant capacity of acid and alkali hydrolysed wheat bran fractions. **Food Chemistry**, v.116, n.4, p.947–954, 2009.

VERPOORTE, R.; CHOI, Y.H.; KIM, H.K. NMR-based metabolomics at work in phytochemistry. **Phytochemistry Review**, v. 6, p. 3–14, 2007.

VISSOTO, M.; PEREIRA, M. C. Amora-preta (*Rubus* sp.): otimização do processo de extração para determinação de compostos fenólicos antioxidantes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 4, p. 1209-1214, 2011.

VOROBIEV, E., JEMAI, A.B., BOUZRARA, H., LEBOVKA, N.I., BAZHAL, M.I. Pulsed electric field assisted extraction of juice from food plants. In: BARBOSA-CANOVAS, G., TAPIA, M.S., CANO, M.P (Eds.), **Novel food processing technologies**, CRC Press, New York, p, 105-130, 2005.

VOROBIEV, E., LEBOVKA, N.I. Extraction of intercellular components by pulsed electric fields. In: Raso, J., Heinz, V. (Eds.), **Pulsed Electric Field Technology for the Food Industry: Fundamentals and Applications**. Springer, New York, pp.153–194, 2006.

WANG, C., ZUO, Y. Ultrasound- assisted hydrolysis and gas chromatography–mass spectrometric determination of phenolic compounds in cranberry products. **Food Chemistry**, v.128, n.2, p. 562-568, 2011.

WANG, L., WELLER, C.L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science & Technology**, v.17, n.6, p.300–312, 2006.

WANG, T.; CHEN, G.; HSU, C.; VIED, S.; CONTE, E.D.; SUEN, S. Octadecyltrimethylammonium surfactant-immobilized cation exchange membranes for solid-phase extraction of phenolic compounds. **Microchemical Journal**, v. 96, n.2, p.290-295, 2010.

WANG, X.; LI, C.; LIANG, D.; ZOU, Y.; LI, P.; MA, F. Phenolic compounds and antioxidant activity in red-fleshed apples. **Journal of functional foods**, artigo aceito, 2014.

WEI, Y.; HUANG, W.; GU, Y. Online isolation and purification of four phthalide compounds from Chuanxiong rhizoma using high-speed counter-current chromatography coupled with semi-preparative liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1284, p.53–58, 2013.

WIGHTMAN, J.D. **Analytical phenolic profiles of commercial grape seed extracts**. 1999a. Disponível em: <<http://www.confex2.com/ift/99annual/99program/s48.htm>>. Acesso em out. 2012.

WIGHTMAN, J.D. **Number of industrial grape products of health relevance in US supply chain**. 1999b. Disponível em: <<http://www.confex2.com/ift/99annual/99program/s54.htm>>. Acesso em out. 2012.

WOLLGAST, J.; ANKLAM, E. Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. **Food Research International**, v. 33, p. 423-447, 2000.

WOLLIN S.D.; JONES P.J.H. Alcohol, Red Wine and Cardiovascular Disease. **The Journal of Nutrition**, v. 1, p. 1401-1404, 2001.

WROLSTAD, R., E. **Color and pigment analysis in fruit products**. Corvallis: Oregon Agricultural Experimental Station, 17 p., 1976.

WU, Z.; XU, Q.; ZHANG, L.; KONG, D.; MA, R.; WANG L. Protective effect of resveratrol against kainate-induced temporal lobe epilepsy in rats. **Neurochem. Res.**, v.34, p. 1393–1400, 2009.

XU, B.J.; CHANG, S.K. A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. **Journal of Food Science**, v.72, S159-166, 2007.

XUA, C.; YAGIZ, Y.; BOREJSZA-WYSOCKI, W.; LUB, J.; GUA, L.; RAMÍREZ-RODRIGUES, M.; MARSHALL, M. R. Enzyme release of phenolics from muscadine grape (*Vitis rotundifolia Michx.*) skins and seeds. **Food Chemistry**, v.157, p. 20–29, 2014.

XYNOS, N.; PAPAEFSTATHIOU, G.; PSYCHIS, M.; AGYROPOULOU, A.; ALIGIANNIS, N.; SKALTSOUNIS, A-L. Development of a green extraction procedure with super/subcritical fluids to produce extracts enriched in oleuropein from olive leaves. **Journal of Supercritical Fluids**, v.67, p.89-93, 2012.

YANG, J., LIU, B., LIANG, G., NING, Z. Structure-activity relationship of flavonoids active against lard oil oxidation based on quantum chemical analysis. **Journal Molecules**, v. 14, p.46-52, 2009.

ZADERNOWSKI, R., CZAPLICKI, S., & NACZK, M. Phenolic acid profiles of mangosteen fruits (*Garcinia mangostana*). **Food Chemistry**, v.112, p.685–689, 2009.

ZAMORA, F. **Elaboración y crianza del vino tinto: aspectos científicos y prácticos**. AMV Ediciones. Madrid, 229 p., 2003.

ZANATTA, C. F.; CUEVAS, E.; BOBBIO, F. O.; WINTERHALTER, P.; MERCADANTE, A. Z. Determination of Anthocyanins from Camu-Camu (*Myrciaria dubia*) by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53. p. 9531-9535, 2005.

ZOSEL, K., 1964. German Patent: 1493,190.

ZOUGAGH M, VALCARCEL M, RIOS A. Supercritical fluid extraction: a critical review of its analytical usefulness. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v.23, n.5, p.399-405, 2004.

9. APÊNDICES

APÊNDICE A (Resultados e Discussão) – Resultados da Análise de Variância (ANOVA) para **Compostos fenólicos Totais**.

Tabela 1. Resumo da ANOVA para o teor de fenóis totais dos diferentes extratos armazenados por 90 dias em diferentes temperaturas.

Parâmetro	Fonte de variação	GL	QM	Prob > F
Compostos fenólicos totais	Extrato	3	3636,5414	0,7518 ^{ns}
	Tempo	6	3239,0879	0,0078*
	Temperatura	3	2201,8611	0,0141*
	Resíduo (a)	4	8754,7811	
	Extrato*Tempo	18	520,3222	0,0045*
	Extrato*Temperatura	9	612,7933	0,0067*
	Tempo*Temperatura	18	1219,0091	0,0037*
	Extrato*tempo*Temp	54	1050,3634	0,0040*
	Resíduo (b)	108	1046,9423	

* significativo a 5 % de probabilidade, ns – não significativo

Tabela 2. Desdobramento da interação Extrato*Temperatura*Tempo para Fenóis totais.

Parâmetro	Extrato	Temperatura	DF	QM	Pr > F
Fenóis Totais	Líquido	-10 °C	6	1067,5834	0,9765 ^{ns}
		4 °C	6	1234,7865	0,0003*
		25 °C	6	1010,4390	<0,0001*
		35 °C	6	1567,8357	<0,0001*
	pH 3,0	-10 °C	6	1876,9567	0,8546 ^{ns}
		4 °C	6	2095,5643	0,0078*
		25 °C	6	1872,6954	<0,0001*
		35 °C	6	1684,8342	<0,0001*
	pH 6,0	-10 °C	6	1232,3985	<0,0001*
		4 °C	6	1378,0984	<0,0001*
		25 °C	6	1785,7620	<0,0001*
		35 °C	6	1650,9867	<0,0001*
	Liofilizado	-10 °C	6	2019,5634	<0,0001*
		4 °C	6	1998,6345	0,0071*
		25 °C	6	1087,4876	<0,0067*
		35 °C	6	1598,0954	<0,0001*

* significativo a 5 % de probabilidade, ns – não significativo.

Tabela 3. Modelos de equação de regressão da variação de fenóis totais em função do tempo de estocagem (X) e seus respectivos coeficientes de determinação (R²) e níveis de probabilidade (p) para as temperaturas analisadas no extrato líquido.

Parâmetro	Temperatura	Modelo de Regressão	R ²	P > F
Fenóis totais	4 °C	192,0088	---	0,0091*
	25 °C	188,7586	---	0,0021*
	35 °C	164,4063 – 1,364X	0,9789	0,0014*

X = tempo de armazenamento; * significativo a 5 % de probabilidade, ns – não significativo.

Tabela 4. Modelos de equação de regressão da variação de fenóis totais em função do tempo de estocagem (X) e seus respectivos coeficientes de determinação (R²) e níveis de probabilidade (p) para as temperaturas analisadas no extrato pH 3,0.

Parâmetro	Temperatura	Modelo de Regressão	R ²	P > F
Fenóis totais	4 °C	122,2594	---	0,0024*
	25 °C	131,8673	---	0,0089*
	35 °C	121,31 – 0,0897X	0,9834	<0,0001*

X = tempo de armazenamento; * significativo a 5 % de probabilidade, ns – não significativo.

Tabela 5. Modelos de equação de regressão da variação de fenóis totais em função do tempo de estocagem (X) e seus respectivos coeficientes de determinação (R²) e níveis de probabilidade (p) para as temperaturas analisadas no extrato pH 6,0.

Parâmetro	Temperatura	Modelo de Regressão	R ²	P > F
Fenóis totais	-10 °C	156,0828	---	<0,0001*
	4 °C	170,5391	---	<0,0001*
	25 °C	160,9674	---	<0,0001*
	35 °C	171,8887	---	<0,0001*

X = tempo de armazenamento; * significativo a 5 % de probabilidade, ns – não significativo.

Tabela 6. Modelos de equação de regressão da variação de fenóis totais em função do tempo de estocagem (X) e seus respectivos coeficientes de determinação (R²) e níveis de probabilidade (p) para as temperaturas analisadas no extrato Liofilizado.

Parâmetro	Temperatura	Modelo de Regressão	R ²	P > F
Fenóis totais	-10 °C	166,1872	---	0,0065*
	4 °C	173,7702	---	<0,0001*
	25 °C	150,8268	---	0,0003*
	35 °C	179,86 – 0,5578X	0,8298	<0,0001*

X = tempo de armazenamento; * significativo a 5 % de probabilidade, ns – não significativo.

APÊNDICE B (Resultados e Discussão) – Resultados da Análise de Variância (ANOVA) para **Antocianinas Monoméricas**.

Tabela 1. Resumo da ANOVA para o teor de antocianinas monoméricas dos extratos líquido, pH 3,0, pH 6,0 e liofilizada armazenados por 90 dias em diferentes temperaturas.

Parâmetro	Fonte de variação	GL	QM	Prob > F
Antocianinas Monoméricas	Extrato	3	3225718,788	0,0139*
	Tempo	6	436500,725	<0,0001*
	Temperatura	3	139605,808	0,0202*
	Resíduo (a)	4	231875,817	
	Extrato*Tempo	18	63795,712	0,0847 ^{ns}
	Extrato*Temperatura	9	128610,320	0,0021*
	Tempo*Temperatura	18	57241,054	0,1476 ^{ns}
	Extrato*tempo*Temp	54	47361,187	0,2596 ^{ns}
	Resíduo (b)	108	40964,798	

* significativo a 5 % de probabilidade, ns – não significativo

Tabela 2. Desdobramento da interação Extrato*Temperatura para antocianinas monoméricas, independente do tempo.

Composto	Extrato	DF	QM	Pr > F
Antocianinas Monoméricas	Liofilizado	3	3196327	<0,0001*
	Líquido	3	184225	0,0005*
	pH 3,0	3	9748,932540	0,7995 ^{ns}
	pH 6,0	3	208010	0,0002*

* significativo a 5 % de probabilidade, ns – não significativo

Tabela 3. Modelos de equação de regressão da variação do conteúdo de antocianinas monoméricas em função do da temperatura de estocagem (X) e seus respectivos coeficientes de determinação (R²) e níveis de probabilidade (p) para os extratos líquido, liofilizado e pH 6,0,

Composto	Aditivo	Modelo de Regressão	R ²	P > F
Antocianinas Monoméricas	Liofilizado	2424,643	---	<0,0001
	Líquido	1533,607	---	<0,0001
	pH 6,0	1389,405	---	<0,0001

X = temperatura de armazenamento; * significativo a 5 % de probabilidade, ns – não significativo

APÊNDICE C (Resultados e Discussão) – Resultados da Análise de Variância (ANOVA) para **Atividade Antioxidante**.

Tabela 1. Resumo da ANOVA a atividade antioxidante dos extratos líquido, pH 3,0, pH 6,0 e liofilizado, armazenados por 90 dias em diferentes temperaturas.

Parâmetro	Fonte de variação	GL	QM	Prob > F
Atividade Antioxidante	Extrato	3	25,514364	0,0069*
	Tempo	6	192,396330	<0,0001*
	Temperatura	3	0,9111301	0,6825 ^{ns}
	Resíduo (a)	4	1,249282	
	Extrato*Tempo	18	2,500813	0,1593 ^{ns}
	Extrato*Temperatura	9	2,145721	0,3157 ^{ns}
	Tempo*Temperatura	18	1,347672	0,7624 ^{ns}
	Extrato*tempo*Temp,	54	2,414532	0,1076 ^{ns}
	Resíduo (b)	108	1,819776	

* significativo a 5 % de probabilidade, ns – não significativo

Tabela 2. Média da atividade antioxidante por extrato

Extrato	Média
Líquido	81,2660 ^a
pH 3,0	81,1480 ^a
pH 6,0	81,0342 ^a
Liofilizado	78,6068 ^b

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si, a 5 % de probabilidade, pelo Teste Tukey.

APÊNDICE D (Resultados e Discussão) – Resultados da Análise de Variância (ANOVA) para **Catequina, Quercetina e Ácido Gálico**

Tabela 1. Resumo da ANOVA para os teores de ácido gálico, catequina e quercetina para os extratos líquido, pH 3,0, pH 6,0 e liofilizado, armazenados por 90 dias em quatro temperaturas diferentes.

Composto	Fonte de variação	GL	QM	Prob > F
Ácido Gálico	Extrato	3	0,05503998	0,0574 ^{ns}
	Tempo	6	0,06861433	<0,0001*
	Temperatura	3	0,00756494	0,4975 ^{ns}
	Resíduo (a)	4	0,01008456	
	Extrato*Tempo	18	0,01025323	0,3801 ^{ns}
	Extrato*Temperatura	9	0,03319013	0,0008*
	Tempo*Temperatura	18	0,01035140	0,3699 ^{ns}
	Extrato*tempo*Temp	54	0,00881450	0,6100 ^{ns}
	Resíduo (b)	108	0,00947798	
Catequina	Extrato	3	2,84196679	0,1894 ^{ns}
	Tempo	6	2,28712750	<0,0001*
	Temperatura	3	0,47236786	0,3249 ^{ns}
	Resíduo (a)	4	1,09331423	
	Extrato*Tempo	18	0,39507498	0,4901 ^{ns}
	Extrato*Temperatura	9	0,92536925	0,0215*
	Tempo*Temperatura	18	0,26027049	0,8567 ^{ns}
	Extrato*tempo*Temp	54	0,42875435	0,3902 ^{ns}
	Resíduo (b)	108	0,40397049	
Quercetina	Extrato	3	2,19989949	0,0590 ^{ns}
	Tempo	6	3,57127897	<0,0001*
	Temperatura	3	0,25730701	0,2704 ^{ns}
	Resíduo (a)	4	0,37016767	
	Extrato*Tempo	18	0,50602735	0,0012*
	Extrato*Temperatura	9	0,34876783	0,0773*
	Tempo*Temperatura	18	0,10825121	0,9223 ^{ns}
	Extrato*tempo*Temp	54	0,20904092	0,3684 ^{ns}
	Resíduo (b)	108	0,19432520	

* significativo a 5 % de probabilidade, ns – não significativo

Tabela 2. Decomposição da interação Extrato*Temperatura para ácido gálico, catequina e quercetina, independente do tempo.

Composto	Extrato	DF	QM	Pr > F
Ácido Gálico	Liofilizado	3	0,000238	0,9950 ^{ns}
	Líquido	3	0,056923	0,0012*
	pH 3,0	3	0,113956	0,0124*
	pH 6,0	3	0,084766	<0,0001*
Catequina	Liofilizado	3	0,127648	0,8333 ^{ns}
	Líquido	3	1,462593	0,0227*
	pH 3,0	3	0,799415	0,1495 ^{ns}
	pH 6,0	3	1,0264772	0,0788 ^{ns}
Quercetina	Liofilizado	3	0,063761	0,7128 ^{ns}
	Líquido	3	1,578192	<0,0001*
	pH 3,0	3	1,593364	<0,0001*
	pH 6,0	3	0,779736	0,0013*

* significativo a 5 % de probabilidade, ns – não significativo

Tabela 3. Modelos de equação de regressão da variação do ácido gálico, catequina e quercetina em função da temperatura de estocagem (X) e seus respectivos coeficientes de determinação (R²) e níveis de probabilidade (p) para os extratos analisados.

Compostos	Extrato	Modelo de Regressão	R ²	P > F
Ácido gálico	Líquido	2,738390	---	<0,0001*
	pH 3,0	1,765425	---	<0,0001*
	pH 6,0	1,900369	---	<0,0001*
Catequina	Líquido	3,435101	---	<0,0001*
Quercetina	Líquido	0,456257	---	<0,0001*
	pH 3,0	0,335132	---	<0,0001*
	pH 6,0	0,456888	---	<0,0001*

X = temperatura de armazenamento; * significativo a 5 % de probabilidade, ns – não significativo

Tabela 4. Decomposição da interação Extrato*Tempo para Quercetina.

Composto	Extrato	DF	QM	Pr > F
Quercetina	Liofilizada	3	1,216127	<0,0001*
	Líquido	3	18,219899	<0,0001*
	pH 3,0	3	2,945297	<0,0001*
	pH 6,0	3	2,555686	<0,0001*

* significativo a 5 % de probabilidade, ns – não significativo

Tabela 5. Modelos de equação de regressão da variação da quercetina em função do tempo de estocagem (X) e seus respectivos coeficientes de determinação (R²) e níveis de probabilidade (p) para os extratos analisados.

Compostos	Extrato	Modelo de Regressão	R²	P > F
Quercetina	Líquido	2,738390	---	<0,0001*
	pH 3,0	1,765425	---	<0,0001*
	pH 6,0	2,4804 – 0,1922X	0,8192	<0,0001*
	Liofilizado	1,900369	---	<0,0001*

X = tempo de armazenamento; * significativo a 5 % de probabilidade, ns – não significativo

APÊNDICE E (Resultados e Discussão) – Resultados da Análise de Variância (ANOVA) para **Coordenadas de Cor do Sistema CIE L*a*b***.

Tabela 1. Resumo da ANOVA para as coordenadas cromáticas L*, a* e b* e os valores calculados de Saturação (C*) e Tonalidade (H*) para os extratos líquido, pH 3,0 e pH 6,0, armazenados em diferentes temperaturas.

Parâmetros	Fonte de variação	GL	QM	Prob > F	
Coordenadas de cor	a*	Extrato	2	0,2208441	0,0430*
		Tempo	6	0,02083437	0,0649 ^{ns}
		Temperatura	3	0,03115985	0,0310*
		Resíduo (a)	3	0,02054881	
		Extrato*Tempo	12	0,00907343	0,5461 ^{ns}
		Extrato*Temperatura	6	0,04136710	0,0012*
		Tempo*Temperatura	18	0,01239177	0,2543 ^{ns}
		Extrato*tempo*Temp	36	0,0085103	0,7029 ^{ns}
		Resíduo (b)	81	0,01003029	
	b*	Extrato	2	0,07235625	0,6132 ^{ns}
		Tempo	6	0,05668001	0,4545 ^{ns}
		Temperatura	3	0,00810317	0,9371 ^{ns}
		Resíduo (a)	3	0,12511548	
		Extrato*Tempo	12	0,01289375	0,9971 ^{ns}
		Extrato*Temperatura	6	0,04667239	0,5770 ^{ns}
		Tempo*Temperatura	18	0,01931825	0,9950 ^{ns}
		Extrato*tempo*Temp	36	0,03082656	0,9833 ^{ns}
		Resíduo (b)	81	0,05875622	
	L*	Extrato	2	0,058811	0,7707 ^{ns}
		Tempo	6	333,429169	<0,0001*
		Temperatura	3	19,639226	<0,0001*
		Resíduo (a)	3	0,206783	
		Extrato*Tempo	12	0,542616	0,0050*
		Extrato*Temperatura	6	0,896510	0,0007*
		Tempo*Temperatura	18	4,60532	<0,0001*
		Extrato*tempo*Temp	36	0,524737	0,0003*
		Resíduo (b)	81	0,205807	
	C*	Extrato	2	0,11768798	0,3592 ^{ns}
Tempo		6	0,08232876	0,1235 ^{ns}	
Temperatura		3	0,03892492	0,4866 ^{ns}	
Resíduo (a)		3	0,08013333		
Extrato*Tempo		12	0,01357581	0,9901 ^{ns}	
Extrato*Temperatura		6	0,02235299	0,8280 ^{ns}	
Tempo*Temperatura		18	0,02601359	0,9251 ^{ns}	
Extrato*tempo*Temp		36	0,01257195	1,0000 ^{ns}	
Resíduo (b)		81	0,04747037		
H*	Extrato	2	0,30339258	0,1142 ^{ns}	
	Tempo	6	0,25033884	0,2763 ^{ns}	
	Temperatura	3	0,73310132	0,1142 ^{ns}	

Resíduo (a)	3	0,06225047	
Extrato*Tempo	12	0,17364320	0,5631 ^{ns}
Extrato*Temperatura	6	0,11460066	0,7409 ^{ns}
Tempo*Temperatura	18	0,24580696	0,2397 ^{ns}
Extrato*tempo*Temp	36	0,15367202	0,7882 ^{ns}
Resíduo (b)	81	0,19573990	

* significativo a 5 % de probabilidade, ns – não significativo

Tabela 2. Desdobramento da interação Extrato*Temperatura para a coordenada de cor a*, independente do tempo.

Parâmetro	Extrato	DF	QM	Pr > F
a*	Líquido	3	0,121997	<0,0001*
	pH 3,0	3	0,277584	<0,0001*
	pH 6,0	3	0,006668	0,9951 ^{ns}

* significativo a 5 % de probabilidade, ns – não significativo

Tabela 3. Modelos de equação de regressão da variação da coordenada de cor a* em função da temperatura de estocagem (X) e seus respectivos coeficientes de determinação (R²) e níveis de probabilidade (p) para os extratos analisados.

Cor	Extrato	Modelo de Regressão	R ²	P > F
a*	Líquido	0,2235 – 0,0037X	0,9873	<0,0001*
	pH 3,0	0,3453 – 0,0033X	0,8644	<0,0001*

X = temperatura de armazenamento; * significativo a 5 % de probabilidade, ns – não significativo.

Tabela 4. Desdobramento da interação Extrato*Temperatura*Tempo para a coordenada L*.

Parâmetro	Extrato	Temperatura	DF	QM	Pr > F
L*	Líquido	-10 °C	6	7,583474	<0,0001*
		4 °C	6	4,156352	0,0003*
		25 °C	6	0,153198	<0,0001*
		35 °C	6	0,064226	0,3332 ^{ns}
	pH 3,0	-10 °C	6	1,484553	<0,0001*
		4 °C	6	0,255963	0,1184 ^{ns}
		25 °C	6	0,381642	<0,0001*
		35 °C	6	0,168342	<0,0001*
	pH 6,0	-10 °C	6	2,410526	<0,0001*
		4 °C	6	1,083520	<0,0001*
		25 °C	6	0,291498	<0,0001*
		35 °C	6	0,026288	<0,0001*

* significativo a 5 % de probabilidade, ns – não significativo.

Tabela 5. Modelos de equação de regressão da variação da coordenada de cor L* em função do tempo de estocagem (X) e seus respectivos coeficientes de determinação (R²) e níveis de probabilidade (p) para as temperaturas analisadas no extrato líquido.

Parâmetro	Temperatura	Modelo de Regressão	R ²	P > F
L*	-10 °C	21,59905	---	<0,0001*
	4 °C	24,06238	---	0,0031*
	25 °C	24,85524	---	0,0013*

X = tempo de armazenamento; * significativo a 5 % de probabilidade, ns – não significativo.

Tabela 6. Modelos de equação de regressão da variação da coordenada de cor L* em função do tempo de estocagem (X) e seus respectivos coeficientes de determinação (R²) e níveis de probabilidade (p) para as temperaturas analisadas no extrato pH 3,0.

Parâmetro	Temperatura	Modelo de Regressão	R ²	P > F
L*	-10 °C	20,99381	---	<0,0001*
	25 °C	24,83524	---	<0,0001*
	35 °C	24,87190	---	<0,0001*

X = tempo de armazenamento; * significativo a 5 % de probabilidade, ns – não significativo.

Tabela 7. Modelos de equação de regressão da variação da coordenada de cor L* em função do tempo de estocagem (X) e seus respectivos coeficientes de determinação (R²) e níveis de probabilidade (p) para as temperaturas analisadas no extrato pH 6,0.

Parâmetro	Temperatura	Modelo de Regressão	R ²	P > F
L*	-10 °C	20,37619	---	0,0051*
	4 °C	24,69524	---	<0,0001*
	25 °C	24,94190	---	0,0002*
	35 °C	24,98000	---	<0,0001*

X = tempo de armazenamento; * significativo a 5 % de probabilidade, ns – não significativo.

APÊNDICE F (Resultados e Discussão) – Resultados da Análise de Variância (ANOVA) para os **Parâmetros de Cor – Índice d Cor, Tonalidade e Brilho.**

Tabela 1. Resumo da ANOVA para as medidas instrumentais de cor: Índice de Cor (IC), Tonalidade (T) e Brilho para os extratos líquido, pH 3,0, pH 6,0 e liofilizado armazenados em diferentes temperaturas.

Parâmetros	Fonte de variação	GL	QM	Prob > F
IC	Extrato	3	0,4525898	0,0236*
	Tempo	6	0,04121901	0,0809 ^{ns}
	Temperatura	3	0,08416657	0,0101*
	Resíduo (a)	4	0,04387133	
	Extrato*Tempo	18	0,03117333	0,1165 ^{ns}
	Extrato*Temperatura	9	0,05163258	0,0148*
	Tempo*Temperatura	18	0,05163258	0,1106 ^{ns}
	Extrato*tempo*Temp	54	0,03650427	0,0089*
	Resíduo (b)	108	0,02125233	
TONALIDADE	Extrato	3	0,20108514	0,0001*
	Tempo	6	0,01989056	0,0001*
	Temperatura	3	0,17021244	0,0001*
	Resíduo (a)	4	0,00042543	
	Extrato*Tempo	18	0,00160143	0,0001*
	Extrato*Temperatura	9	0,01419039	0,0001*
	Tempo*Temperatura	18	0,00418033	0,0001*
	Extrato*tempo*Temp	54	0,00077706	0,0016*
	Resíduo (b)	108	0,00039691	
BRILHO	Extrato	3	1627,2851	0,0085*
	Tempo	6	310,19242	0,0087*
	Temperatura	3	1415,31116	0,0011*
	Resíduo (a)	4	89,16630	
	Extrato*Tempo	18	152,68520	0,1047 ^{ns}
	Extrato*Temperatura	9	222,79120	0,0284*
	Tempo*Temperatura	18	185,81877	0,0313 ^{ns}
	Extrato*tempo*Temp	54	149,16563	0,0479 ^{ns}
	Resíduo (b)	108	101,96044	

* significativo a 5 % de probabilidade, ns – não significativo

Tabela 2. Resumo da ANOVA para as medidas instrumentais de cor: Índice de Cor (IC), Tonalidade (T) e Brilho para os extratos líquido, pH 3,0, pH 6,0 e liofilizado armazenados na temperatura de -10° C.

Parâmetros	Fonte de variação	GL	QM	Prob > F
IC	Extrato	3	0,07879056	<0,0001*
	Resíduo (a)	4	0,03220493	
	Tempo	6	0,03082957	0,2381 ^{ns}
	Extrato*Tempo	18	0,03669530	0,1059 ^{ns}
	Resíduo (b)	24	0,02129555	
TONALIDADE	Extrato	3	0,02559329	0,0157*
	Resíduo (a)	4	0,00196697	
	Tempo	6	0,00070193	0,6363 ^{ns}
	Extrato*Tempo	18	0,00049293	0,9285 ^{ns}
	Resíduo (b)	24	0,00097280	
BRILHO	Extrato	3	164,3842013	<0,0001*
	Resíduo (a)	4	8,9638090	
	Tempo	6	6,39889046	0,5938 ^{ns}
	Extrato*Tempo	18	4,23412208	0,9231 ^{ns}
	Resíduo (b)	24	8,2042524	

* significativo a 5 % de probabilidade, ns – não significativo

Tabela 3. Resumo da ANOVA para as medidas instrumentais de cor: Índice de Cor (IC), Tonalidade (T) e Brilho para os extratos líquido, pH 3,0, pH 6,0 e liofilizado armazenados na temperatura de 4° C.

Parâmetros	Fonte de variação	GL	QM	Prob > F
IC	Extrato	3	0,12301734	0,0048*
	Resíduo (a)	4	0,00497918	
	Tempo	6	0,00301388	0,6283 ^{ns}
	Extrato*Tempo	18	0,00487325	0,3441 ^{ns}
	Resíduo (b)	24	0,00411522	
TONALIDADE	Extrato	3	0,07836498	<0,0001*
	Resíduo (a)	4	0,00003067	
	Tempo	6	0,00051701	0,0002*
	Extrato*Tempo	18	0,00067330	<0,0001*
	Resíduo (b)	24	0,00007291	
BRILHO	Extrato	3	378,675822	<0,0001*
	Resíduo (a)	4	0,65457800	
	Tempo	6	3,18984868	0,0502 ^{ns}
	Extrato*Tempo	18	1,58098301	0,3057 ^{ns}
	Resíduo (b)	24	1,27341600	

* significativo a 5 % de probabilidade, ns – não significativo

Tabela 4. Desdobramento da interação Extrato*Tempo para o parâmetro Tonalidade (T), na temperatura de 4°C.

Parâmetro	Extrato	DF	QM	Pr > F
T	Liofilizado	6	0,005695	<0,0001*
	Líquido	6	0,005695	<0,0001*
	pH 3,0	6	0,005695	<0,0001*
	pH 6,0	6	0,005695	<0,0001*

* significativo a 5 % de probabilidade, ns – não significativo

Tabela 5. Modelos de equação de regressão da variação da Tonalidade (T) em função do tempo de estocagem (X) e seus respectivos coeficientes de determinação (R²) e níveis de probabilidade (p) para os extratos líquido, liofilizado, pH 3,0 e pH 6,0.

Parâmetro	Extrato	Modelo de Regressão	R ²	P > F
T	Liofilizado	0,916666	---	<0,0001*
	Líquido	1,029474	---	<0,0001*
	pH 3,0	0,878809	---	0,0422*
	pH 6,0	1,241965	---	<0,0001*

X = tempo de armazenamento; * significativo a 5 % de probabilidade, ns – não significativo

Tabela 6. Resumo da ANOVA para as medidas instrumentais de cor: Índice de Cor (IC), Tonalidade (T) e Brilho para os extratos líquido, pH3,0, pH6,0 e liofilizado armazenados na temperatura de 25° C.

Parâmetros	Fonte de variação	GL	QM	Prob > F
IC	Extrato	3	0,10204949	0,2298 ^{ns}
	Resíduo (a)	4	0,04625155	
	Tempo	6	0,04637506	0,2155 ^{ns}
	Extrato*Tempo	18	0,03981082	0,2696 ^{ns}
	Resíduo (b)	24	0,03059297	
TONALIDADE	Extrato	3	0,06101309	<0,0001*
	Resíduo (a)	4	0,00015487	
	Tempo	6	0,00886568	<0,0001*
	Extrato*Tempo	18	0,00039466	0,0258*
	Resíduo (b)	24	0,00016792	
BRILHO	Extrato	3	274,7123715	<0,0001*
	Resíduo (a)	4	1,052052600	
	Tempo	6	44,2469338	0,1264 ^{ns}
	Extrato*Tempo	18	3,62202060	0,6497 ^{ns}
	Resíduo (b)	24	4,3447886	

* significativo a 5 % de probabilidade, ns – não significativo

Tabela 7. Desdobramento da interação Extrato*Tempo para o parâmetro Tonalidade (T), na temperatura de 25°C.

Parâmetro	Extrato	DF	QM	Pr > F
T	Liofilizado	6	0,006913	<0,0001*
	Líquido	6	0,010575	<0,0001*
	pH 3,0	6	0,029299	<0,0001*
	pH 6,0	6	0,020166	<0,0001*

* significativo a 5 % de probabilidade, ns – não significativo

Tabela 8. Modelos de equação de regressão da variação da Tonalidade (T) em função do tempo de estocagem (X) e seus respectivos coeficientes de determinação (R²) e níveis de probabilidade (p) para os extratos líquido, liofilizado, pH 3,0 e pH 6,0.

Parâmetro	Extrato	Modelo de Regressão	R ²	P > F
T	Liofilizado	0,964450	---	<0,0001*
	Líquido	1,084704	---	<0,0001*
	pH 3,0	0,990372	---	
	pH 6,0	1,270638	---	<0,0001*

X = tempo de armazenamento; * significativo a 5 % de probabilidade, ns – não significativo

Tabela 9. Médias dos parâmetros de cor dos extratos avaliados por temperatura.

Temperatura	Parâmetro	Extrato	Média
-10°C	Tonalidade	Líquido	0,9683 ^b
		pH 3,0	0,7936 ^d
		pH 6,0	1,0278 ^a
		Liofilizado	0,9127 ^c
	Brilho	Líquido	40,4549 ^b
		pH 3,0	52,9461 ^a
		pH 6,0	35,7213 ^d
		Liofilizado	38,3351 ^c
	Índice de Cor	Líquido	0,8477 ^c
		pH 3,0	1,0109 ^b
		pH 6,0	0,7893 ^c
		Liofilizado	1,1075 ^a
4°C	Índice de Cor	Líquido	0,7792 ^c
		pH 3,0	0,9341 ^b
		pH 6,0	0,7634 ^c
		Liofilizado	1,1808 ^a
	Brilho	Líquido	36,6779 ^c
		pH 3,0	48,3864 ^a
		pH 6,0	20,8708 ^d
		Liofilizado	38,4901 ^b
	Brilho	Líquido	33,0929 ^c
		pH 3,0	41,5240 ^a
		pH 6,0	19,4020 ^d
		Liofilizado	34,2989 ^b

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si, a 5 % de probabilidade, pelo Teste Tukey,

Tabela 10. Resumo da ANOVA para as medidas instrumentais de cor: Índice de Cor (IC), Tonalidade (T) e Brilho para os extratos líquido, pH 3,0, pH 6,0 e liofilizado armazenados na temperatura de 35° C.

Parâmetros	Fonte de variação	GL	QM	Prob > F
IC	Extrato	3	0,30363017	0,0181*
	Resíduo (a)	4	0,02525761	
	Tempo	6	0,05548355	0,1178 ^{ns}
	Extrato*Tempo	18	0,05930679	0,0497*
	Resíduo (b)	24	0,02882807	
TONALIDADE	Extrato	3	0,07868495	0,0002*
	Resíduo (a)	4	0,00058987	
	Tempo	6	0,02234692	<0,0001*
	Extrato*Tempo	18	0,00237172	<0,0001*
	Resíduo (b)	24	0,00018630	
BRILHO	Extrato	3	1477,888706	0,1300 ^{ns}
	Resíduo (a)	4	425,10954	
	Tempo	6	813,81306	0,0906 ^{ns}
	Extrato*Tempo	18	590,74498	0,1651 ^{ns}
	Resíduo (b)	24	387,23056	

* significativo a 5 % de probabilidade, ns – não significativo

Tabela 11. Desdobramento da interação Extrato*Tempo para os parâmetros índice de Cor (IC) e Tonalidade (T), na temperatura de 35°C

Parâmetro	Extrato	DF	QM	Pr > F
IC	Liofilizado	6	0,326597	<0,0001*
	Líquido	6	0,024633	0,1755 ^{ns}
	pH 3,0	6	0,088312	0,0005*
	pH 6,0	6	0,052608	0,0106*
T	Liofilizado	6	0,004870	<0,0001*
	Líquido	6	0,061965	<0,0001*
	pH 3,0	6	0,078292	<0,0001*
	pH 6,0	6	0,067884	<0,0001*

* significativo a 5 % de probabilidade, ns – não significativo

Tabela 12. Modelos de equação de regressão da variação do Índice de Cor (IC) e Tonalidade (T) em função do tempo de estocagem (X) e seus respectivos coeficientes de determinação (R^2) e níveis de probabilidade (p) para os extratos líquido, liofilizado, pH 3,0 e pH 6,0.

Parâmetro	Extrato	Modelo de Regressão	R^2	P > F
IC	Liofilizado	1,513905	---	<0,0001*
	Líquido	0,816238	---	<0,0001*
	pH 6,0	0,815238	---	<0,0001*
T	Liofilizado	0,991250	---	<0,0001*
	Líquido	1,232219	---	<0,0001*
	pH 3,0	1,162756	---	<0,0001*
	pH 6,0	1,398473	---	<0,0001*

X = tempo de armazenamento; * significativo a 5 % de probabilidade, ns – não significativo