



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA  
QUÍMICA**

**LUCILE CECÍLIA PERUZZO**

**EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E  
ENCAPSULAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS  
PROVENIENTES DO RESÍDUO DO PROCESSAMENTO DA  
INDÚSTRIA VINÍCOLA**

**FLORIANÓPOLIS - SC  
2014**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA  
QUÍMICA**

Lucile Cecília Peruzzo

**EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E  
ENCAPSULAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS  
PROVENIENTES DO RESÍDUO DO PROCESSAMENTO DA  
INDÚSTRIA VINÍCOLA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Selene Maria de Arruda Guelli Ulson de Souza

Coorientadores: Prof. Dr. Antônio Augusto Ulson de Souza  
Prof. Dr. José Alexandre Borges Valle

**FLORIANÓPOLIS - SC  
2014**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Peruzzo, Lucile Cecília

Extração, Purificação, Identificação e Encapsulação de Compostos Bioativos Provenientes do Resíduo do Processamento da Indústria Vinícola / Lucile Cecilia Peruzzo; orientadora, Selene M. A. Guelli Ulson de Souza / coorientadores, Antônio Augusto Ulson de Souza e José Alexandre Borges Valle – Florianópolis, SC; 2014.

231 pg.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programade Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Compostos fenólicos. 3. Atividade antioxidante. 4. Encapsulação. 5. Corantes naturais. I. De Souza, Selene M. A. Guelli. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

**Extração, Purificação, Identificação e Encapsulação de Compostos Bioativos Provenientes do Resíduo do Processamento da Indústria Vinícola**

Por

**Lucile Cecilia Peruzzo**

Tese julgada para obtenção do título de **Doutor em Engenharia Química**, área de Concentração de **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos** e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Selene Maria de Arruda Guelli Ulson de Souza  
Orientadora

---

Prof. Dr. Antônio Augusto Ulson de Souza  
Coorientador

---

Prof. Dr. José Alexandre Borges Valle  
Coorientador

---

Prof. Dr. Ricardo Antonio Francisco Machado  
Coordenador

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. Pedro Henrique Hermes de Araújo

---

Prof. Dr. José Antonio Ribeiro de Souza

---

Prof. Dr. Marco Di Luccio

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lorena Benathar Ballod Tavares

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tirzhá Lins Porto Dantas

**Florianópolis, 19 de setembro de 2014.**



*“Filho, sou teu pai, sou teu amigo,  
por isso escuta o que eu digo,  
minha experiência é quem fala.  
Melhor aprende o que cala, e ouve com atenção.  
Este destino de peão, não te vou deixar de herança,  
porque me sobra esperança, de ver-te um dia patrão.  
Filho, meu velho também foi peão, e acostumou-se ao patrão,  
polítiquero e caudilho,  
por sinal, pai de um filho que a força se fez doutor.  
E eu na solidão do meu rancho,  
só aprendi a fazer garrancho pra votar neste senhor.  
Filho, agora é chegada a hora, de saíres campo afora,  
rumo à estância do saber.  
Que este teu velho peão pobre, há muito que junta os cobres,  
pra te mandar aprender.  
Anda, vai e doma a leitura, te amansa em literatura,  
e prende no laço a ciência,  
que ao longo de tua ausência,  
hei de rezar ao senhor,  
pra que voltes à querência,  
um verdadeiro doutor.”*

*(Canção Conselhos, de Marco A. Vasconcelos  
e Kenelmo A. Alves, interpretada por Wilson Paim)*

***Este trabalho é dedicado ao meu pai  
Olívar João Peruzzo (in memoriam)***



## AGRADECIMENTOS

*Agradeço a Deus por me permitir acordar todas as manhãs e vislumbrar dois imensos olhos verdes me chamando de mamãe. A  **você Miguel todo o meu amor.***

*Meus agradecimentos a UFSC, seus professores, funcionários e, em especial ao **Programa de Pós-graduação em Engenharia Química**, por viabilizar o desenvolvimento desta tese.*

*À minha orientadora **Prof<sup>ª</sup>. Dra. Selene Maria de Arruda Guelli Ulson de Souza** e ao meu coorientador **Prof. Dr. Antônio Augusto de Souza** pela amizade, apoio e por acreditar em mim. Muito obrigada!*

*Meus agradecimentos a FURB, seus professores, funcionários e em especial ao **Departamento de Engenharia Química**, por permitir a realização deste trabalho nas suas instalações. Foi bom voltar onde tudo começou.*

*Ao meu amigo e coorientador **Prof. Dr. José Alexandre Borges Valle**, por me receber na FURB de braços abertos e, acreditar neste trabalho acima de tudo. Muito obrigada. Seu entusiasmo me contagiou...*

*A **Prof<sup>ª</sup>. Dra. Rita de Cássia Curto Siqueira Valle**, pela ajuda nas análises estatísticas e, também por me receber sempre com um sorriso nos momentos em que não sabia o que fazer. Sua praticidade foi primordial.*

*Meus agradecimentos ao LABMASSA, por disponibilizar toda a infraestrutura necessária para o desenvolvimento deste trabalho de doutorado.*

*Ao Arthur, bolsista do **Laboratório de Verificação e Validação (LVV)**, por sua disponibilidade na realização das análises de determinação de tamanho de partícula.*

*Ao **Laboratório de Química Ambiental da FURB**, por realizar as análises de cromatografia líquida de alta eficiência, em especial ao **Wander e ao Thiago**. Fica aqui registrada a minha gratidão.*

*Ao Prof. Dr. Jurgen Andreus do Departamento de Química da FURB,  
por sua cordialidade e ajuda na realização das análises de  
espectroscopia de infravermelho.*

*A CAPES, pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa de  
estudos.*

*A FAPESC, pelo apoio financeiro.*

*A minha mãe, Dorvaci, por todo seu amor, e por me ensinar que nas  
coisas mais simples se encontra o verdadeiro amor.*

*Ao meu pai, in memoriam, sempre foi um exemplo de honestidade,  
gratidão, amor, retidão e perseverança. Saudades...*

*Ao meu esposo Edson, por cuidar do nosso filho na minha ausência. Sei  
que falhei.  
Perdoe-me...*

*Queria agradecer em especial aos meus amigos e companheiros de  
trabalho: Luis Lourenço, Jaqueline Jensen e Rayane Amaral, por  
dividir comigo este trabalho, por serem parceiros em todas as nossas  
dificuldades e alegrias no decorrer destes 4 anos juntos.*

*A todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a  
realização deste trabalho.  
Os meus sinceros agradecimentos.*

**MUITO OBRIGADA!**

## RESUMO

O Brasil com sua economia fortemente baseada no agronegócio contribui para a geração de uma grande quantidade de resíduos agroindustriais resultante das etapas de processamento. Estes resíduos, representam um grave problema, pois aparentemente sem aplicação viável, são descartados diretamente ao meio ambiente. Muitos destes são ricos em compostos bioativos, amplamente reconhecidos pelos benefícios a saúde humana e aplicações tecnológicas, tais como as antocianinas reconhecidas pela atividade antioxidante e sua capacidade de coloração quando adicionada a alimentos e/ou produtos farmacêuticos. Neste trabalho investigou-se dois interesses distintos: o reaproveitamento do resíduo da indústria vinícola (borra do vinho tinto) através de tecnologias que sejam ambientalmente seguras e que garantam a qualidade dos produtos; e a utilização de produtos compostos por ingredientes naturais que ofereçam benefícios à saúde humana. Diante do exposto, o objetivo foi a obtenção de extratos de alto valor agregado obtidos através da otimização da técnica de extração sólido-líquido, de uma metodologia proposta para a purificação que aliou eficácia a baixo custo, da identificação dos compostos biológicos presentes e seu encapsulamento através de emulsões do tipo água/óleo e água/óleo/água que são amplamente utilizadas em uma variedade de aplicações na indústria. A borra do vinho tinto foi primeiramente caracterizada quanto as suas propriedades físico-químicas. A quantidade de compostos fenólicos totais presentes na borra do vinho tinto foi de 87,4 mg EAG.g<sup>-1</sup>. O valor médio encontrado para reduzir em 50 % a concentração inicial do radical DPPH foi de 2314 g de extrato/g de DPPH a 25 °C e 322,6 g de extrato/g de DPPH a 80 °C. As melhores condições de extração foram: concentração de HCl 1,75 N, extrato hidroalcoólico 70 % e temperatura de 35 °C, obtendo uma quantidade de antocianinas totais de 341,11 mg cyn-3-glu/100 g de amostra. A mistura de antocianinas obtida após a etapa de extração foi isolada através de uma combinação de extração líquido-líquido e cromatografia em coluna. A identificação das antocianidinas presentes no extrato e nas frações purificadas foi realizada por CLAE. A etapa de purificação permitiu obter uma antocianidina com um elevado grau de pureza (76,5 %). A fim de preservar as antocianinas destes extratos, foi utilizado o método de encapsulação por emulsificação/gelificação térmica com proteínas do soro do leite. As melhores condições encontradas foram concentração de proteína de 30 % (m/v), e a fração de volume da fase aquosa:fase oleosa de 15:85 (m:m). A eficiência de encapsulação foi de 73,1 %. A

encapsulação de antocianinas através de um sistema de emulsões múltiplas do tipo água/óleo/água foi testada. As frações volumétricas da fase dispersa e da fase contínua que se mostraram mais estáveis foram: 50:50 para a emulsão primária A/O e, para a emulsão secundária A/O/A, 60:40. Para as emulsões A/O obtidas, a concentração de span que apresentou emulsões primárias estáveis está na faixa de 3 a 5 % (m/m) e o diâmetro de Sauter para as gotículas da emulsão primária está na faixa de 3-8,6  $\mu\text{m}$ . A desestabilização da emulsão múltipla A/O/A, após a adição do encapsulante, foi a principal dificuldade encontrada neste estudo. Os resultados sugerem que o pH baixo na fase aquosa interna pode ter sido uma das causas da instabilidade das emulsões que, com o passar do tempo, leva à desestabilização do sistema.

**PALAVRAS-CHAVE:** Compostos fenólicos. Atividade antioxidante. Encapsulação. Corantes naturais.

## ABSTRACT

Brazil, with its strong economy based on agribusiness contributes to the generation of a large amount of organic residues resulting from the processing steps. These wastes pose a serious problem as seemingly viable application, are discarded directly to the environment. Much of this is rich in bioactive compounds, widely recognized by the benefits to human health and technological applications, such as anthocyanins and antioxidant activity recognized by its coloring ability when added to foods and / or pharmaceuticals. This work investigated whether two distinct interests: the reuse of the residue of the wine industry (red wine lees) through technologies that are environmentally safe and to ensure product quality; and use of products made from natural ingredients that provide benefits to human health. The objective was to obtain extracts with high added value obtained by optimizing the technique of solid-liquid extraction, a proposed methodology for the purification which combined effectiveness at low cost , the identification of organic compounds and their encapsulation using emulsions of oil / water and water / oil / water which are widely used in a variety of applications in industry type. The dregs of red wine were first characterized as their physicochemical properties. The quantity of total phenolic compounds present in the red wine dreg was 87.4 mg EAG.g<sup>-1</sup>. The antioxidant capacity was determined by the DPPH method. The average value found in order to reduce in 50 % the initial concentration of the DPPH radical was 2314 g of extract/g of DPPH at 25 °C, and 322.6 g of extract/g of DPPH at 80 °C. The best extraction conditions were HCl concentration 1.75 N, hydro alcoholic extract 70 % and temperature 35 °C, obtaining a total quantity of anthocyanins of 341.11 mg cyn-3-glu/100 g of sample. The anthocyanins mixture obtained after the extraction phase was isolated through a combination of extract liquid-liquid and open column chromatography. The identification of anthocyanidins present in the extract and in the purified fractions was performed by HPLC. The purification phase permitted to obtain an anthocyanidin with a high purity level (76.5 %). In order to preserve the anthocyanins of these extracts it was used the encapsulation method through emulsification/thermic gelation with proteins from the milk whey. The best conditions found were protein concentration of 30 % (m/v) and the mass fraction in the aqueous phase: oily phase 15:85 (m:m). The encapsulation efficiency was 73.1 %. The encapsulation of anthocyanins through a system of multiple emulsions W/O/W was tested. The volumetric fractions of the disperse phase and of the continuous phase

that showed to be more stable were 50:50 for the primary emulsion W/O and 60:40 for the secondary emulsion W/O/W. For the W/O emulsions obtained the span concentration that showed stable primary emulsions is in between 3-8.6  $\mu\text{m}$ . The multiple emulsion destabilization W/O/W after the encapsulant addition was the main difficulty found in this study. The results suggest that the low pH in the intern aqueous phase can have been one of the emulsions instability causes that, in the course of time, would lead to the destabilization of the system.

**KEY WORDS:** Phenolic compounds. Antioxidant activity. Encapsulation. Natural dyes.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1</b> - Diagrama da produção de vinhos tintos e branco com indicação dos pontos de geração de resíduos durante o processo.....	39
<b>Figura 2.2</b> - Aspecto visual do resíduo da borra do vinho tinto.....	41
<b>Figura 2.3</b> – Curva de calibração do ácido gálico para a quantificação dos compostos fenólicos totais.....	46
<b>Figura 2.4</b> - Curva de calibração do DPPH.....	48
<b>Figura 2.5</b> - Diagrama da determinação da capacidade antioxidante dos extratos orgânicos aquosos.....	49
<b>Figura 2.6</b> - Cinética do potencial antioxidante do extrato a 25 °C.....	53
<b>Figura 2.7</b> - Cinética do potencial antioxidante do extrato do resíduo da borra do vinho tinto pelo método do DPPH em temperatura de 80 °C..	55
<b>Figura 3.1</b> - Estrutura genérica das antocianinas .....	61
<b>Figura 3.2</b> - Antocianidinas naturais mais importantes.....	62
<b>Figura 3.3</b> - Estrutura química básica de uma antocianidina comum..	62
<b>Figura 3.4</b> -Transformações estruturais da cyn-3-glu em solução aquosa variando-se o PH.....	64
<b>Figura 3.5</b> - (A) Exemplo de copigmentação intermolecular entre uma antocianina e um copigmento (não antociânico). (B) Exemplo de copigmentação intramolecular.....	65
<b>Figura 3.6</b> - Degradação térmica da antocianina monoglicosídeo a pH 3,7 acelerada pela temperatura.....	66
<b>Figura 3.7</b> - Matérias-primas utilizadas neste trabalho: a) extrato bruto (borra do vinho tinto); b) extrato etanólico acidificado.....	71
<b>Figura 3.8</b> - Espectro de absorvância entre os comprimentos de onda de 350 e 700 nm para a amostra do resíduo da borra do vinho tinto.....	71
<b>Figura 3.9</b> – Antocianinas totais extraídas utilizando etanol acidificado em função do tempo para diferentes razões de soluto/solvente a uma temperatura de 10 °C.....	78
<b>Figura 3.10</b> - Comparação dos dados experimentais com o modelo de Amendola <i>et al.</i> (2010).....	79
<b>Figura 3.11</b> - Comparação dos dados experimentais com o modelo de Minchev e Minkov (1999).....	80
<b>Figura 3.12</b> - Comparação dos dados experimentais com o modelo proposto por Cacace e Mazza (2003).....	80
<b>Figura 3.13</b> - Comparação dos dados experimentais com o modelo proposto por Spiro e Jago (1982).....	81
<b>Figura 3.14</b> - Superfície de contorno para as variáveis testadas na otimização do processo de extração de ACYS.....	85

<b>Figura 3.15</b> - Superfície de contorno para os efeitos de concentração de HCl e concentração de solvente no teor de antocianinas extraídas.....	86
<b>Figura 3.16</b> – Superfície de contorno para os efeitos de concentração de HCl e concentração de solvente no teor de antocianinas extraídas.....	87
<b>Figura 3.17</b> - Valores preditos <i>versus</i> resíduos.....	88
<b>Figura 3.18</b> - Distribuição dos resíduos em torno da reta normal.....	89
<b>Figura 4.1</b> - Representação esquemática mostrando a separação de uma mistura de componentes A e B através de uma coluna cromatográfica, porelução.....	93
<b>Figura 4.2</b> - Esquema da purificação das antocianinas.....	95
<b>Figura 4.3</b> - Esquema do processo de purificação de antocianinas utilizando extração líquido-líquido e cromatografia em coluna aberta..	96
<b>Figura 4.4</b> - Espectro dos extratos bruto (A) e do extrato após a ELL(B).....	97
<b>Figura 4.5</b> - Cromatografia por coluna com sílica gel.....	99
<b>Figura 4.6</b> - Frações obtidas após a etapa de extração em fase sólida (EFS).....	99
<b>Figura 5.1</b> - Perfil cromatográfico obtido por CLAE dos padrões de antocianidina cloreto de cianidina e cloreto de malvidina.....	106
<b>Figura 5.2</b> - Perfil cromatográfico obtido por CLAE das antocianidinas presentes no extrato bruto concentrado.....	107
<b>Figura 5.3</b> - Perfil cromatográfico obtido por CLAE das antocianidinas presentes na fração purificada (F12) do extrato da borra do vinho. Condições cromatográficas: as mesmas descritas na Tabela 5.1.....	108
<b>Figura 5.4</b> - Perfil cromatográfico obtido por CLAE das antocianidinas presentes na fração purificada (F6) do extrato da borra do vinho. Condições cromatográficas: As mesmas descritas na Tabela 5.1.....	109
<b>Figura 5.5</b> - Perfil cromatográfico obtido por CLAE das antocianidinas presentes na fração purificada (F7) .....	110
<b>Figura 6.1</b> – Ilustração das várias funcionalidades das proteínas do leite úteis para tarefas de entrega de compostos bioativos.....	118
<b>Figura 6.2</b> - Método da Emulsão - Templates para formação de partículas de biopolímero (emulsão A/O).....	120
<b>Figura 6.3</b> - Método da emulsão - Templates para a formação de partículas de biopolímero preenchidas.....	122
<b>Figura 6.4</b> – Representação das proteínas globulares migrando na interface água/óleo (Figura A) seguida por reorientação (Figura B) e formação de filmes viscoelásticos (Figura C).....	123
<b>Figura 6.5</b> – Diagrama da metodologia de análise das micropartículas formadas pelo método da emulsificação/gelificação térmica utilizando proteínas do soro do leite.....	126

<b>Figura 6.6</b> - Representação esquemática das microcápsulas obtidas pelo método da emulsificação/gelificação térmica.....	129
<b>Figura 6.7</b> - Imagem do agitador mecânico utilizado para produzir as emulsões A/O.....	130
<b>Figura 6.8</b> - Espectro de absorvância da borra do vinho tinto em tampão de pH 2 .....	134
<b>Figura 6.9</b> - Aparência óptica das emulsões A/O variando-se a concentração de proteína pelo método da emulsificação/gelificação térmica.....	135
<b>Figura 6.10.</b> - Representação esquemática da formação de complexos insolúveis com base na relação molar proteína/polifenol.....	136
<b>Figura 6.11</b> - Representação esquemática da desnaturação e agregação da $\beta$ – lactoglobulina no soro do leite.....	137
<b>Figura 6.12.</b> - Representação esquemática do processo para a preparação de partículas de proteína.....	138
<b>Figura 6.13</b> - Micrografias do complexo formado proteína do soro do leite (30 % m/v) – ACYS (antocianinas) sem a adição de span 80. Aumento de 40X.....	140
<b>Figura 6.14</b> - Distribuição de tamanho das gotículas para emulsões A/O em diferentes velocidades de agitação. (A1 – 300 rpm; A2 - 800 rpm; A3 – 1200 rpm e A4 – 1750 rpm).....	142
<b>Figura 6.15.</b> - Imagens da microscopia óptica das gotículas de proteínas + ACYS preparadas em diferentes velocidades de agitação: A1 – 300 rpm, A2 – 800 rpm.....	144
<b>Figura 6.16</b> - Imagens da microscopia óptica das partículas de proteínas + ACYS preparadas em diferentes velocidades de agitação: A3 – 1200 rpm, A4 – 1750 rpm.....	145
<b>Figura 6.17</b> - Diâmetro médio superficial $D_{32}$ e diâmetro médio volumétrico $D_{43}$ para as emulsões A/O: B1 – 300 rpm; B2 – 800 rpm; B3 – 1200 rpm e B4 – 1750 rpm.....	146
<b>Figura 6.18.</b> - Imagens da microscopia óptica das partículas de proteínas + ACYS preparadas em diferentes velocidades de agitação e com a adição de emulsificante lipofílico span 80 (2,5 % m/m): B1 – 300 rpm, B2 – 800 rpm.....	147
<b>Figura 6.19.</b> - Imagem da microscopia óptica das gotículas de proteínas + ACYS preparadas com velocidade de agitação de 1750 rpm e com a adição de emulsificante lipofílico span 80 (2,5 % m/m): B4 – 1750 rpm. da luz.....	149
<b>Figura 6.20</b> - Microscopia da emulsão B2 obtida com proteínas do soro do leite e 2,5 % m:m de emulsificante lipofílico (span 80).....	151

<b>Figura 6.21</b> - Micrografias da emulsão B2 obtida com proteínas do soro do leite e 2,5 % m:m de emulsificante lipofílico (span 80).....	152
<b>Figura 6.22</b> - Micrografia da emulsão B4 obtida com proteínas do soro do leite e 2,5 % m:m de emulsificante lipofílico (span 80).....	153
<b>Figura 6.23</b> - Micrografia da emulsão A2 obtida com proteínas do soro do leite sem a presença de emulsificante lipofílico (span 80).....	154
<b>Figura 6.24</b> .- Imagem das formulações testadas com diferentes frações da fase oleosa. B1- Solução de proteína 30 % e fase oleosa 70 %; B2 – Solução de proteína 20 % e fase oleosa 80 % - B3 – Solução de proteína 50 % e fase oleosa 50 %; B4 – Solução de proteína 70 % e fase oleosa 30 %; B5 – Solução de proteína 80% e fase oleosa 20%.....	155
<b>Figura 6.25</b> - Espectroscopia no infravermelho do corante de antocianinas liofilizado.....	156
<b>Figura 6.26</b> .- Espectroscopia no infravermelho das proteínas do soro do leite.....	157
<b>Figura 6.27</b> .- Espectroscopia no infravermelho para as micropartículas obtidas por emulsificação/gelificação térmica utilizando proteínas do soro do leite.....	158
<b>Figura 7.1</b> .- Tipos de emulsão segundo os seus componentes.....	165
<b>Figura 7.2</b> .- Representação esquemática da morfologia dos glóbulos.....	166
<b>Figura 7.3</b> .- Processo de emulsificação em duas etapas - emulsão A/O/A.....	167
<b>Figura 7.4</b> .- Diagrama da obtenção das emulsões simples A/O que serviram como base para a formulação das emulsões múltiplas (A/O/A).....	173
<b>Figura 7.5</b> .- Diagrama de obtenção das emulsões múltiplas A/O/A pelo método da inversão de fases.....	174
<b>Figura 7.6</b> .- Estrutura molecular do mono-oleato de sorbitan – Span 80.....	175
<b>Figura 7.7</b> .- Estrutura molecular do tween 80.....	176
<b>Figura 7.8</b> - Estrutura molecular do polioxietileno sorbitano – Tween 80 e do mono-oleato de sorbitano - Span 80.....	177
<b>Figura 7.9</b> . Representação esquemática da preparação da emulsão simples A/O.....	178
<b>Figura 7.10</b> .- Representação esquemática da Emulsão Múltipla obtida através do método da emulsificação por re-dispersão.....	181
<b>Figura 7.11</b> .- Imagens das emulsões primárias A/O preparadas com diferentes concentrações de emulsificante lipofílico: (1) 20:80 com 3 % (m/m) de span 80, (2) 30:70 com 3 % (m/m) de span 80, (3) 40:60 com 3 % (m/m) de span 80, (4) 50:50 com 3 % (m/m) de span 80, (5) 20:80 com 5 % (m/m) de span 80, (6) 30:70 com 5 % (m/m) de span 80, (7)	

40:60 com 5 % (m/m) de span 80, (8) 50:50 com 5 % (m/m) de span 80.....	183
<b>Figura 7.12</b> - Imagens das emulsões primárias A/O preparadas com diferentes concentrações de emulsificante lipofílico: (9) 20:80 com 7 % de span 80, (10) 30:70 com 7 % de span 80, (11) 40:60 com 7 % de span 80 (12) 50:50 com 7 % de span 80.....	184
<b>Figura 7.13</b> - Micrografia da emulsão simples A/O formulação A4 – 600 rpm.....	188
<b>Figura 7.14.</b> - Micrografia das emulsões simples A/O formulação A8 – 1200 rpm.....	189
<b>Figura 7.15.</b> - Formulações testadas com diferentes concentrações de span 80 e tween 80: amostras A4-1; A4-2 ;A4-3 e A4-4.....	190
<b>Figura 7.16</b> - Formulações testadas com diferentes concentrações de span 80 e tween 80 para amostra A8. A8-1; A8-2; A8-3 e A8-4.....	191
<b>Figura 7.17.</b> - Influência do pH na fase aquosa interna.....	192
<b>Figura 7.18.</b> - Micrografias da emulsão múltipla A8-2A pH 4,5. (A) – barra de escala: 50 µm; (B) – Barra de escala: 20 µm. Aumento de 400 vezes.....	194
<b>Figura 7.19.</b> - Distribuição de tamanho das gotículas para as formulações testadas A8-1A e A8-2 <sup>a</sup> .....	196
<b>Figura 7.20.</b> - Distribuição de tamanho das gotículas para a formulação A8-3A.....	196



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2.1</b> - Tratamento dos subprodutos da produção vinícola, características físico-químicas e seu uso.....	40
<b>Tabela 2.2</b> - Características médias da borra do vinho tinto.....	41
<b>Tabela 2.3</b> - Caracterização físico - química da amostra de borra do vinho tinto da espécie Niágara Bordô.....	51
<b>Tabela 3.1</b> - Modelos cinéticos de extração de compostos bioativos....	73
<b>Tabela 3.2</b> - Valores experimentais e níveis codificados das variáveis independentes usadas no planejamento fatorial $2^3$ .....	75
<b>Tabela 3.3</b> - Níveis codificados para cada ponto individual do planejamento $2^3$ .....	75
<b>Tabela 3.4</b> - Parâmetros cinéticos obtidos através dos modelos matemáticos testados.....	82
<b>Tabela 3.5</b> - Valores medidos e preditos do teor de antocianinas totais (AT) determinado para cada ponto individual.....	83
<b>Tabela 3.6</b> - Análise de Variância ANOVA.....	84
<b>Tabela 5.1</b> - Gradiente de eluição e tempo para a separação das antocianidinas.....	104
<b>Tabela 5.2</b> - Concentração de antocianinas no extrato bruto e nas frações obtidas após a etapa de purificação.....	111
<b>Tabela 6.1</b> - Diferentes concentrações da solução de proteína.....	127
<b>Tabela 6.2</b> - Efeito da fração volumétrica da fase oleosa na estabilidade das emulsões A/O.....	132
<b>Tabela 6.3</b> - Valores do diâmetro de Sauter $D_{32}$ e do diâmetro de Broucker $D_{43}$ para as emulsões A/O testadas com diferentes velocidades de agitação.....	143
<b>Tabela 7.1.</b> -Macro-emulsões versus micro-emulsões.....	166
<b>Tabela 7.2.</b> - Concentração em % (m/m) dos componentes das formulações (1 a 12).....	179
<b>Tabela 7.3.</b> - Formulações testadas com diferentes concentrações de span 80 e tween 80.....	182
<b>Tabela 7.4.</b> - Formulações selecionadas para os testes de estabilidade.....	184
<b>Tabela 7.5.</b> - Análise macroscópica das formulações após centrifugação e estresse térmico.....	185
<b>Tabela 7.6</b> - Influência da velocidade de agitação sobre a estabilidade da emulsão A/O.....	186
<b>Tabela 7.7</b> - Diâmetro de Sauter ( $D_{32}$ ) e diâmetro de Broucker ( $D_{43}$ ) obtidos para as formulações A4 e A8 em diferentes velocidades de agitação.....	187



## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AAT = Atividade Antioxidante Total  
Abs = absorbância/*absorbance*  
Abs<sub>λ<sup>máx</sup></sub> = Absorbância no comprimento de onda máximo  
ABTS = 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)  
ACYS = Antocianinas  
ANOVA = Análise de variância/analysis of variance  
AH<sup>+</sup> = Cátion flavílico  
A/O = Água/Óleo  
A/O/A = Água/Óleo/Água  
AT = Antocianinas Totais  
ATT = Acidez total titulável (meq/L)  
aw = Atividade de água  
BHA = Butil-hidroxianisol/ *butylated hydroxytoluene*  
BHT = Butil-hidroxitolueno/ *butylated hydroxyanisole*  
BSA = *Bovine Serum Albumin*  
CCA = Cromatografia em coluna aberta  
CLAE = Cromatografia líquida de alta eficiência  
Cm - Mv3G = Antocianina monomérica derivada do p-coumarol  
C/ÓLEO = Com óleo  
COOH = Grupo funcional dos ácidos carboxílicos  
DQO - Demanda química de oxigênio (g.L<sup>-1</sup>)  
Cy = Cianidina  
cyn-3-glu = Cianidina-3-glicosídeo  
DPPH = 2,2 difenil, 1-picrihidrazil  
DCCR = Delineamento composto central rotacional  
Df = Delfinidina  
DMV= diâmetro mediano volumétrico  
DTG = Distribuição do tamanho das gotículas  
D<sub>32</sub> = Diâmetro médio de volume-superfície ou diâmetro de Sauter (µm)  
D<sub>43</sub> = Diâmetro médio de volume ou diâmetro equivalente de Broucker (µm)  
E = Coeficiente de extinção molar (L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>)  
EC<sub>50</sub> = Amostra necessária para reduzir em 50 % a concentração inicial do radical DPPH  
EE = Eficiência de encapsulamento (%)  
EGA/g = Equivalente ácido gálico por grama  
EHL = Equilíbrio hidrofílico-lipofílico  
ELL = Extração líquido-líquido

EM = Espectroscopia de massa  
ES = Emulsão secundária  
EM = Espectrofotometria de massas  
F12 = Fração purificada 12  
F6 = Fração purificada 6  
FTIR = Espectroscopia no IR com transformada de Fourier/*mid-Fourier transform infrared spectroscopy*  
GL = Grau de liberdade  
HPLC = *High-performance liquid chromatography*  
HPLC - DAD = *High-performance liquid chromatography Diode Array Detector*  
HCl = Ácido clorídrico  
IAL = Instituto Adolfo Lutz  
L = Termo linear  
m = Massa de material (g)  
MAE = Extração assistida por microondas/ *Microwave-assisted extraction*  
mgGAE = mg equivalente de ácido gálico/*mg equivalent of gallic acid*  
mM Trolox/g = Milimolar de trolox por grama  
m/m = *Percentual em massa (%)*  
MSR = *Metodologia de superfície de resposta*  
Mv = *Malvidina*  
Mv3G = *Malvidina - 3 - glicosídeo*  
nd = *não detectada*  
N-H = *Grupo funcional das aminas*  
NaOH = *Hidróxido de sódio*  
NTU = *Unidades Nefelométricas de Turbidez*  
O/A = *Óleo/Água*  
O-H = *Hidroxila*  
O/A/O = *Emulsão múltipla do tipo óleo/água/óleo*  
p = *Probabilidade*  
PCDL = *Fostatildicolina*  
pH = *Potencial hidrogeniônico*  
pI = *Ponto isoelétrico*  
Pg = *Pelargonidina*  
Pn = *Peonidina*  
Pt = *Petunidina*  
Q = *Termo quadrático*  
RMN = *Ressonância magnética nuclear*  
Rpm = *Rotações por minuto*  
R<sup>2</sup> = *Coefficiente de determinação*

S-H = Grupos sulfídrico ou tiol  
S/Óleo = Sem a presença de óleo  
SPE = *Solid-phase extraction*  
SPAN = *Amplitude relativa*  
Span 80 = *Mono-oleato de sorbitan*  
Q = Soma dos quadrados  
SST = Sólidos solúveis totais ( $\text{g.L}^{-1}$ )  
TBHQ = terc-butilhidroquinona  
TEAC = Capacidade antioxidante equivalente Trolox  
Teor de ACYS<sub>inicial</sub> = Teor de antocianinas inicial  
Teor de ACYS<sub>livre</sub> = Teor de antocianinas presente na fase aquosa após a centrifugação  
TFA = Ácido trifluoroacético  
 $t_R$  = Tempo de retenção  
TR = Ultra turrax  
Tween 80 = Mono-oleato de polioxietileno sorbitano  
 $V_{dil}$  = Volume diluído (mL)  
 $V_{ext}$  = Volume do extrato (mL)  
 $V_{aliq}$  = Volume de alíquota (mL)  
Y = Resposta do teor de antocianinas no extrato  
k = Número de fatores analisados  
 $x_i$  e  $x_j$  = Níveis das variáveis independentes  
 $\beta_{ii}$  = Coeficiente quadrático  
 $\beta_i$  = Coeficiente do produto de interação  
 $\beta_0$  = Constante  
WPI = Proteínas isoladas do soro do leite/ *whey protein isolate*  
 $\alpha$ -la = *Alfa lactalbumina*  
 $\alpha$ -TOC =  *$\alpha$ -tocoferol*  
 $\beta$ -lg =  *$\beta$ -lactoglobulina*



## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO .....</b>	<b>33</b>
1.1. Objetivo Geral .....	34
1.2. Objetivos Específicos .....	35
1.3. Estrutura do documento.....	35
<b>CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO BORRA DO VINHO TINTO .....</b>	<b>37</b>
2.1 - Introdução.....	37
2.1.1 – Objetivo geral.....	38
2.2 – Uva e os subprodutos da produção vinícola.....	38
2.3 - Compostos fenólicos.....	42
2.4 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
2.4.1 - Matéria-prima .....	44
2.4.2 - Caracterização físico - química .....	44
2.4.3 - Compostos fenólicos totais.....	45
2.4.4 - Determinação da capacidade antioxidante do extrato da borra do vinho tinto.....	47
2.5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
2.5.1 - Caracterização - química da amostra de borra do vinho tinto.....	51
2.5.2 - Compostos fenólicos totais .....	52
2.5.3 - Determinação da capacidade antioxidante utilizando o método do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) para o extrato puro.....	53
2.6- CONCLUSÕES.....	57
<b>CAPÍTULO 3 - EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS ANTOCIANINAS TOTAIS DO EXTRATO DA BORRA DO VINHO TINTO.....</b>	<b>59</b>
3.1 - Introdução.....	59
3.1.1 - Objetivo geral .....	60

3.2 - Antocianinas.....	60
3.2.1 - Fatores que afetam a estabilidade das antocianinas.....	62
3.3 - Extração.....	67
3.4 – MATERIAS E MÉTODOS .....	70
3.4.1 - Extração e quantificação das antocianinas (ACYS) – Método do pH único.....	70
3.4.2 Cinética de extração de antocianinas.....	72
3.4.3 - Otimização do processo de extração de ACYS – Delineamento experimental.....	74
3.5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	77
3.5.1 - Cinética de extração de antocianinas e razão soluto/solvente.....	77
3.5.2 - Otimização do processo de extração de ACYS - Determinação do teor de antocianinas no resíduo da borra do vinho tinto.....	82
3.6 – CONCLUSÕES .....	89
<b>CAPÍTULO 4 - PURIFICAÇÃO DO EXTRATO CONCENTRADO DA BORRA DO VINHO TINTO.....</b>	<b>91</b>
4.1 - Introdução.....	91
4.1.1 – Objetivo Geral .....	92
4.2 - Purificação de antocianinas .....	92
4.2.2 – Purificação em duas etapas extração líquido-líquido (ELL) e cromatografia em coluna aberta (CCA).....	92
4.3 – MATERIAIS E MÉTODOS .....	94
4.3.1 - Extração líquido – líquido .....	94
4.3.2 - Cromatografia em coluna aberta (CCA).....	94
4.4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	97
4.4.1 - Purificação dos extratos antociânicos através da combinação de extração líquido-líquido (ELL) e cromatografia em coluna aberta (CCA).....	97
4.5 – CONCLUSÕES .....	100

**CAPÍTULO 5 - SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA DAS ANTOCIANIDINAS PRESENTES NO EXTRATO CONCENTRADO E PURIFICADO.....101**

5.1 - Introdução ..... 101

    5.1.1 – Objetivo geral..... 102

5.2 - Separação e identificação de antocianinas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ..... 102

5.3 - MATERIAIS E MÉTODOS ..... 104

    5.3.1 - Preparação das curvas de calibração dos padrões de antocianidinas ..... 104

    5.3.2 - Separação das antocianidinas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ..... 104

5.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO ..... 105

    5.4.1 - Curva de calibração com padrões de antocianidinas ..... 105

    5.4.2 - Identificação das antocianidinas por cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE do extrato bruto e das frações obtidas após a etapa de purificação ..... 105

5.5 – CONCLUSÕES ..... 112

**CAPÍTULO 6 – MICROPARTÍCULAS EM ANTOCIANINAS EXTRAÍDAS DA BORRA DO VINHO TINTO UTILIZANDO O MÉTODO DA EMULSIFICAÇÃO/GELIFICAÇÃO TÉRMICA COM PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE ..... 113**

6.1 – Introdução ..... 114

    6.1.1 - Objetivos..... 115

6.2 - Proteínas: uma abordagem de sua estrutura e função ..... 116

    6.2.2 - Método da Emulsão - Templates para formação de partículas de biopolímero..... 120

    6.2.3 - Processos físico-químicos envolvidos no preparo de emulsões..... 124

6.3 - MATERIAIS E MÉTODOS ..... 125

6.3.1 - Obtenção de micropartículas de ACYS pelo método da emulsificação/gelificação térmica utilizando proteínas do soro do leite.....	127
6.3.3 - Microscopia óptica das microcápsulas de proteínas do soro do leite .....	130
6.3.4 - Determinação da distribuição de tamanho de partícula...	131
6.3.5 - Efeito da fração oleosa na estabilidade das emulsões A/O.....	131
6.3.6 - Influência da concentração de emulsificante lipofílico na preparação de microcápsulas de proteínas do soro do leite .....	132
6.3.7 - Análise do complexo formado proteínas do soro do leite - ACYS por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) .....	132
6.3.8 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das partículas formadas por antocianinas e proteínas do soro do leite .....	133
6.3.9 - Eficiência de Encapsulamento (EE %).....	133
6.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	135
6.4.1 - Efeito da concentração de proteína na estabilidade das emulsões água/óleo (A/O) .....	135
6.4.2 - A formação de partículas de proteínas-ACYS .....	138
6.4.3 - Influência da velocidade de agitação sobre a distribuição do tamanho das gotículas.....	142
6.4.4 - Influência da adição do emulsificante lipofílico na distribuição do tamanho de partícula.....	145
6.4.5 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das partículas formadas por proteínas do soro do leite – ACYS .....	150
6.4.6 - Influência da fração oleosa na estabilidade dos complexos formados por proteína – ACYS .....	155
6.4.7 - Caracterização das micropartículas obtidas por emulsificação/gelificação térmica por Espectroscopia de Infravermelho (FTIR) .....	156
6.4.8 - Eficiência de encapsulação.....	159
6.5 – CONCLUSÕES .....	159

6.6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	160
<b>CAPÍTULO 7 - FORMULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EMULSÕES MÚLTIPLAS DO TIPO A/O/A CONTENDO O EXTRATO CONCENTRADO DA BORRA DO VINHO TINTO RICO EM ANTOCIANINAS E COMPOSTOS FENÓLICOS.</b>	<b>163</b>
7.1 - Introdução.....	163
7.1.1 - Objetivo geral .....	164
7.2 - Emulsões.....	164
7.2.1 - Estabilidade das emulsões .....	168
7.2.2 - Emulsificantes .....	168
7.2.3 - Aplicações das emulsões múltiplas.....	169
7.2.4 – Emulsificação: Metodo da Redispersão de fases .....	171
7.3 – MATERIAIS E MÉTODOS .....	172
7.3.1 – Materiais .....	174
7.3.2 - Métodos .....	178
7.3.3 - Emulsões Múltiplas água/óleo/água(A/O/A).....	180
7.4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	182
7.4.1 - Efeito da variação da fração volumétrica e da adição de emulsificante lipofílico na estabilidade das emulsões A/O.....	182
7.4.2 - Testes de estabilidade das emulsões simples A/O (água/óleo).....	184
7.4.3 - Influência da temperatura do estresse gravitacional e análise macroscópica .....	185
7.4.4 - Efeito da velocidade de agitação e da distribuição do tamanho dos glóbulos sobre a estabilidade das emulsões A/O ...	186
7.4.5 - Efeito da concentração de emulsificante hidrofílico (tween 80) e lipofílico (span 80) sobre a estabilidade das emulsões múltiplas A/O/A.....	190
7.4.6 - Influência do pH na estabilidade das emulsões múltiplas contendo o extrato de antocianinas .....	191
7.4.7 - Análise microscópica das emulsões múltiplas A/O/A.....	193

7.4.8 - Determinação do tamanho das gotículas para as emulsões múltiplas testadas em diferentes pHs para a fase aquosa interna	195
7.5 - CONCLUSÕES.....	199
7.6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	200
<b>CAPÍTULO 8 - CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>203</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>205</b>
<b>APÊNDICE A. ....</b>	<b>227</b>
<b>APÊNDICE B. – TRABALHOS PUBLICADOS/ENVIADOS.....</b>	<b>231</b>

## CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

A uva é a cultura frutífera mais abundante do planeta, estima-se que anualmente sejam produzidas, em todo o mundo, cerca de 61 milhões de toneladas, das quais 80 % são destinadas à produção de vinho. Aproximadamente 20 % deste total são representados pela massa do bagaço resultante do processamento, de modo que são produzidas todo ano mais de 9 milhões de toneladas de resíduos vinícolas (MELO, 2010).

A indústria de produção do vinho gera grande quantidade de resíduos sólidos, incluindo bagaço de uvas e borras de vinho (PORTO *et al.*, 2014). Os subprodutos e resíduos podem conter substâncias de elevado valor agregado, cuja recuperação vem despertando interesse econômico e ambiental.

A borra de vinho é definida como o resíduo que fica depositado nos recipientes que contenham vinho após a fermentação, durante a armazenagem, e também os resíduos obtidos a partir da centrifugação e filtração. É formada por substâncias tartáricas, leveduras de fermentação, compostos inorgânicos e compostos fenólicos (SILVA, 2003). Os compostos fenólicos possuem propriedades benéficas para a saúde, atribuídas a sua ação antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e vasodilatadora.

Em uvas tintas, as antocianinas constituem a maior porcentagem de compostos fenólicos (ABE *et al.*, 2007) e se acumulam principalmente na casca. De acordo com Narayan et al (1999), esses compostos considerados como um potente antioxidante comparado com antioxidantes clássicos como butilato hidroxil anisol, butilato hidroxil tolueno e alfa tocoferol (vitamina E). Este agente natural, quando adicionado a alimentos, confere além de coloração intensa, propicia a prevenção contra a auto-oxidação e peroxidação de lipídios em sistemas biológicos.

O método de extração destes pigmentos depende principalmente da finalidade para o qual está sendo extraído o material, da natureza dos compostos e da fonte ou matriz utilizada (RODRIGUEZ-SAONA *et al.*, 2001). Diferentes tecnologias podem ser empregadas para a extração de compostos fenólicos de materiais sólidos, incluindo extração sólido-líquido, extração Soxhlet, extração assistida por micro-ondas, por ultrassom e extração por impulso elétrico (JAMPANI, 2014).

A extração sólido-líquido é uma das técnicas mais usadas e envolve a remoção de um ou mais compostos de um alimento, empregando-se um líquido que é capaz de dissolver o soluto

(FELLOWS, 2006). Para a remoção das antocianinas, em diferentes matrizes, este método de extração é o mais empregado.

A maioria das pesquisas sobre a extração de compostos fenólicos, que utilizam subprodutos da vinificação para explorar comercialmente estes extratos, empregam como matéria - prima as sementes e/ou as cascas de uva (PÉREZ – SERRADILHA *et al.*, 2011). Poucas pesquisas são realizadas com as borras do vinho.

Os corantes naturais provenientes deste subproduto podem ser incorporados a alimentos ou cosméticos, tornando-os mais funcionais. Dependendo da capacidade antioxidante dos extratos, é possível utilizá-los em formulações de bebidas, na produção de cremes e fitoterápicos ou ainda, no estudo da sua biodisponibilidade em modelos celulares.

Em relação à aplicação desse extrato em alimentos ou como constituinte de formulações farmacêuticas, o principal problema a ser enfrentado é a sensibilidade das antocianinas frente a fatores como luz, temperatura, presença de oxigênio, pH e aqueles associados à composição inicial da fruta, tal como o tipo de antocianina e estrutura química (KECHINSKI, 2011).

O microencapsulamento é um processo físico no qual um filme fino ou camada polimérica é aplicada para envolver sólidos ou líquidos, isolando-os e protegendo-os de fatores ambientais como luz, ar e umidade. Na última década, houve um grande progresso no desenvolvimento de compostos microencapsulados, mas os dados presentes na literatura ainda são limitados para o encapsulamento efetivo de compostos corantes e antioxidantes (MEZZOMO, 2012). Assim, visto que as antocianinas sofrem degradação rapidamente quando expostas ao ar, luz e calor, perdendo valor nutritivo, propriedades biológicas e tecnológicas, torna-se necessário o estudo de sua estabilização como, por exemplo, através de seu encapsulamento em emulsões do tipo A/O (água/ óleo) ou A/O/A (água/óleo/água) visando a sua utilização comercial.

## **1.1. Objetivo Geral**

O objetivo geral deste trabalho foi estudar o aproveitamento do resíduo do processamento da indústria vinícola ainda pouco explorado (borra do vinho tinto), na obtenção de um produto com alto valor agregado, aproveitando suas potencialidades seja como corante natural ou como fonte de compostos antioxidantes.

## 1.2. Objetivos Específicos

- ✓ Caracterizar o resíduo da borra do vinho tinto quanto às suas propriedades físico-químicas;
- ✓ Avaliar a capacidade antioxidante do resíduo através da técnica do radical DPPH em duas temperaturas diferentes;
- ✓ Otimizar o método de extração utilizando a metodologia de superfície de resposta para quantificar o teor de antocianinas totais presentes no extrato;
- ✓ Propor uma metodologia de purificação do extrato bruto utilizando extração líquido- líquido seguida de cromatografia em coluna aberta;
- ✓ Identificar e quantificar as antocianidinas presentes no extrato bruto e nas frações purificadas por cromatografia líquida de alta eficiência;
- ✓ Realizar estudos preliminares de estabilidade e viabilidade da utilização da técnica de emulsificação/gelificação térmica utilizando proteínas isoladas do soro do leite para a obtenção de micropartículas ricas em compostos antociânicos;
- ✓ Caracterizar as micropartículas obtidas pela técnica da emulsificação/gelificação pela análise de tamanho de partícula;
- ✓ Avaliar o complexo formado por proteínas do soro do leite – antocianinas por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR);
- ✓ Avaliar a utilização de emulsões múltiplas do tipo A/O/A para encapsular componentes solúveis em água (extrato de antocianinas).

## 1.3. Estrutura do documento

Este trabalho encontra-se organizado da seguinte forma: O Capítulo 1, como já visto, apresenta a introdução e objetivos da presente tese de doutorado. No Capítulo 2, são apresentados alguns aspectos referente a uva, os resíduos provenientes da produção vinícola e as características físico-químicas da borra do vinho tinto. No Capítulo 3, é apresentado um estudo referente a cinética de extração das antocianinas visando determinar a melhor proporção massa soluto:volume de solvente bem como o tempo necessário para atingir o equilíbrio de extração. O processo de extração foi otimizado utilizando a metodologia de superfície de resposta. No Capítulo 4, é apresentada uma

metodologia de purificação dos extratos utilizando extração líquido-líquido seguida de cromatografia em coluna aberta. No Capítulo 5, as antocianidinas presentes no extrato bruto e nas frações obtidas após a etapa de purificação foram identificadas por CLAE utilizando dois padrões de elevado teor de pureza. No Capítulo 6, é apresentada uma técnica para encapsulação de antocianinas utilizando o método da emulsificação/gelificação térmica com proteínas isoladas do soro do leite. No Capítulo 7, um estudo de estabilidade de emulsões múltiplas do tipo A/O/A para encapsulação dos compostos antociânicos foi proposto. Por fim o Capítulo 8 apresenta as conclusões gerais e, ao final deste documento, estão apresentadas as curvas de calibração dos padrões de antocianidinas e os cromatogramas das frações purificadas (Apêndice A). No Apêndice B estão apresentados os artigos submetidos para publicação e, também os trabalhos completos publicados em congressos, de acordo com os resultados obtidos neste trabalho.

## CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO BORRA DO VINHO TINTO

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Processos de Transferência do Departamento de Engenharia Química da Universidade Regional de Blumenau – FURB, em parceria com o Laboratório de Transferência de Massa do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC.

### 2.1 - Introdução

O Brasil, por ser um país de grande atividade agrícola, é um dos que mais produzem resíduos agroindustriais e a busca de alternativas para utilização da matéria orgânica gerada vem crescendo dentro de vários centros de pesquisa. Produtores e indústrias da área vinícola enfrentam o problema de descarte da biomassa residual que embora seja biodegradável, necessita de um tempo mínimo para ser mineralizada, constituindo-se numa fonte de poluentes ambientais (CATANEO, 2008).

Devido a extração insuficiente durante o processamento, os resíduos gerados pela indústria vinícola destacam-se por serem fontes de compostos fenólicos (RUBILAR *et al.*, 2007). Além disto, a soma do bagaço (cascas e sementes), engaço e a borra do processo fermentativo representam cerca de 30 % do volume de uvas utilizadas para a produção vinícola (MAKRIS *et al.*, 2007). Sendo assim, é uma fonte promissora de substâncias bioativas naturais (LOPES, 2007).

Os compostos fenólicos despertam interesse devido as suas propriedades benéficas para a saúde, atribuídas a sua atividade antioxidante, anticancerígena e antiviral.

A maioria dos compostos fenólicos podem ser classificados em dois principais grupos: os ácidos carboxílicos fenólicos e os flavonoides. Os flavonoides derivados do 2-fenil-benzopireno são classificados como o grupo mais importante. Os principais subgrupos são as catequinas e proantocianidinas, as antocianidinas e os flavonóis ou flavonas (HERRMANN, 1994; CATANEO, 2008).

Em uvas tintas, as antocianinas constituem a maior porcentagem de compostos fenólicos (ABE *et al.*, 2007) e se acumulam principalmente na casca. As antocianinas são um potente oxidante comparado com antioxidantes clássicos. Já foram comprovados

cientificamente seus efeitos anticarcinogênico, antioxidante e antiviral (MALACRIDA e MOTTA, 2006).

Neste contexto, o objetivo deste capítulo foi avaliar quantitativamente os compostos fenólicos e o potencial antioxidante do resíduo agroindustrial da produção de vinhos, da variedade Niágara Bordô, visando a possibilidade de sua utilização, como fonte de compostos de interesse para as indústrias de alimentos, fitoterápicos e cosméticos.

### **2.1.1 – Objetivo geral**

O objetivo deste capítulo foi caracterizar o resíduo do processamento do vinho tinto (borra) quanto as suas características físico-químicas, compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante, visando a sua utilização como fonte de compostos bioativos.

## **2.2 – Uva e os subprodutos da produção vinícola**

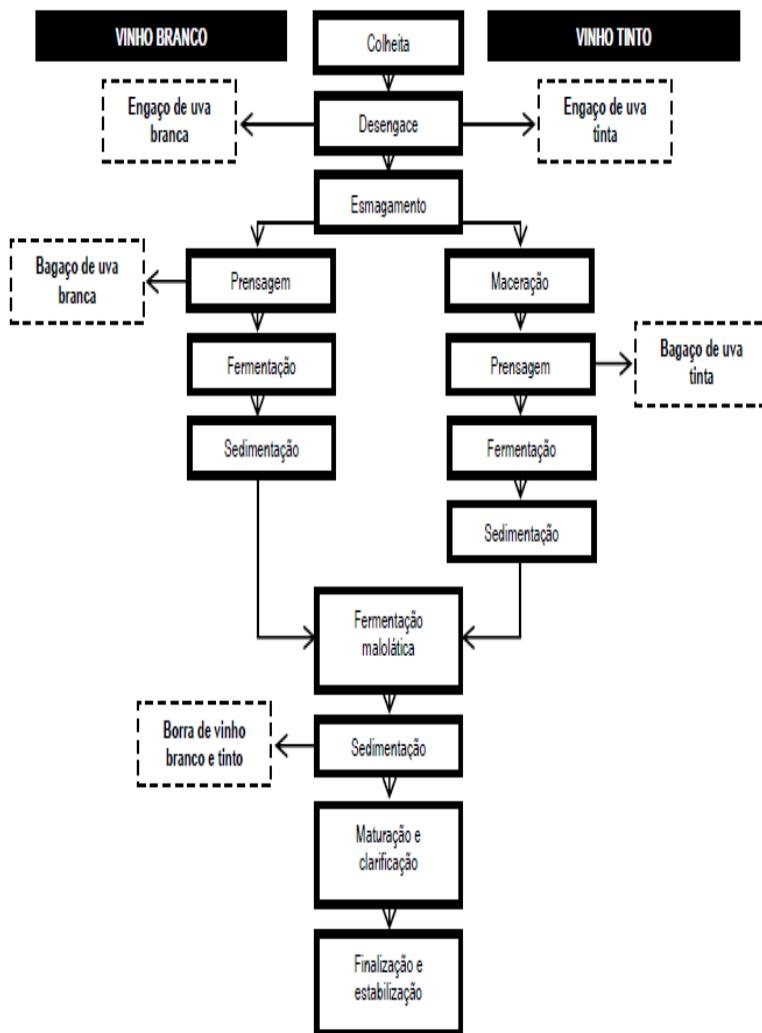
A uva é a cultura frutífera mais abundante do planeta, onde se estima que anualmente sejam produzidas, em todo o mundo, cerca de 61 milhões de toneladas, das quais 80 % são destinadas a produção de vinho. Aproximadamente 20 % deste total é representado pela massa do bagaço resultante do processamento. Deste modo são produzidos todo ano, mais de 9 milhões de toneladas de resíduos vinícolas (MELO, 2010).

Os subprodutos da vinificação caracterizam-se como sendo o bagaço, as grainhas, o folhedeo, o engaço e as borras. As borras, constituem um valioso subproduto a considerar na tecnologia da vinificação. É uma massa heterogênea, que fica depositada após a fermentação (Figura 2.1), podendo-se destacar o seu aproveitamento ao nível de recuperação do ácido tartárico, álcool e substâncias corantes, como as antocianinas (SILVA, 2003). Os subprodutos obtidos após exploração da vinificação, constituem uma fonte promissora e, relativamente barata para a extração de flavonoides e antioxidantes (ROCKENBACH *et al.*, 2008).

Levando-se em consideração as questões ambientais e sendo esse resíduo uma fonte potencial de compostos bioativos, é necessário que se realizem estudos acerca do aproveitamento desse material, para a produção de ingredientes com valor agregado e que possam ser aplicados nas indústrias farmacêuticas, de cosméticos ou de alimentos (BONILLA *et al.*, 1999; HOGAN *et al.*, 2010).

A Figura 2.1, a seguir, apresenta o diagrama simplificado da produção de vinhos tintos e brancos e indica os pontos de geração de resíduos durante o processo (Figura 2.1).

**Figura 2.1** - Diagrama da produção de vinhos tintos e branco com indicação dos pontos de geração de resíduos durante o processo.



Fonte: MELO, (2010).

A Tabela 2.1 apresenta alguns exemplos de subprodutos da produção vinícola, com suas características físico-químicas e seu uso na indústria.

**Tabela 2.1** - Tratamento dos subprodutos da produção vinícola, características físico-químicas e seu uso.

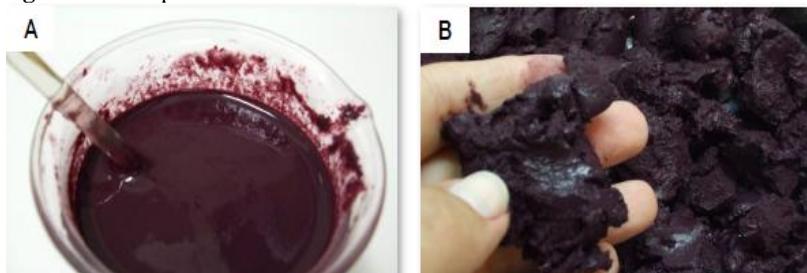
<b>Produto final</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Características físico - químicas</b>	<b>Uso</b>	<b>Referências</b>
Resíduo da uva	Compostagem do resíduo da uva	Conteúdo de matéria orgânica	Fertilizante para plantas	Ferrer <i>et al.</i> , (2001)
Extrato de sementes e pele de uva	Fracionamento das sementes e casca do resíduo da uva	Teor de fenólicos	Suplementos dietéticos para a prevenção de doenças	Shrikhande, (2000)
Resíduo da uva	Gaseificação dos resíduos da uva	Concentração para utilização dos resíduos	Produção de gás para aquecimento	Blasi <i>et al.</i> , (1999)
Bagaço de uva	Compostagem de resíduos sólidos e efluentes	Teor de matéria orgânica	Fertilizante para plantas	Ingelmo <i>et al.</i> , (1998)
Bagaço de uva	Liofilização e extração de flavonoides	Teor de flavonoides	Suplementos dietéticos e fitoquímicos	Gonzales-Paramas <i>et al.</i> , (2004)
Bagaço de uva, talos e borras	Liofilização e extração de polifenóis	Teor de polifenóis	Suplementos dietéticos	Alonso <i>et al.</i> , (2002)
Cascas de uva, sementes e caules	Fração de proantocianidinas poliméricas do bagaço de uva	Teor de flavonoides	Fonte de flavonoides	Torres e Bobet, (2001)
Resíduo	Eletrodialíse	Teor de ácido tartárico	Aditivo em medicamentos e cosméticos.	Andres <i>et al.</i> , (1997)

Fonte: Arvanitoyannis, 2006.

✓ Borrás do vinho tinto

As borras são formadas por 70 a 90 % de vinho, 2,5 a 4 % de substâncias tartáricas cristais de bitartarato de potássio e tartarato de cálcio, 6,5 a 7,5 % de substâncias diversas que incluem os detritos vegetais (grainhas, películas e engaços), partículas de terra, mucilagens e 4 a 5 % de leveduras da fermentação, sílica, ácido pécico e pectato de cálcio, substâncias albuminoides livres e combinadas com tanino, fosfato de cálcio e de bário, ácido fosfórico, sulfatos, etc. (PATO, 1988). Na Figura 2.2 é apresentado o aspecto visual da borra do vinho tinto.

**Figura 2.2** - Aspecto visual do resíduo da borra do vinho tinto.



Fonte Melo, (2010).

Na Tabela 2.2 são apresentados alguns parâmetros das borras.

**Tabela 2.2-** Características médias da borra do vinho tinto.

Parâmetro	Valor médio
pH	3,1-3,8
Grau alcoólico (%)	11,1
Turbidez (NTU)	342
DQO (g.L <sup>-1</sup> )	280(190-420)
SST (g.L <sup>-1</sup> )	46 (20-240)
Polifenóis (mg.L <sup>-1</sup> )	200-3500

DQO - carência química de oxigênio; SST - sólidos solúveis totais.

Fonte: Pirra, (2005).

### 2.3 - Compostos fenólicos

A maior parte dos compostos fenólicos encontrados em uvas e vinhos pertence a dois grupos: os difenilpropanoides (flavonoides) ou os fenilpropanoides (não flavonoides). Os flavonoides são um grupo de metabólitos secundários derivados da via do fenilpropanoide. Há fortes evidências com base em estudos epidemiológicos que correlaciona o consumo de frutas e legumes com risco reduzido em termos de desenvolvimento de câncer. Enquanto medicamentos à base de plantas que contêm componentes ativos derivados de fenilpropanoides têm sido muito utilizados por seres humanos, os benefícios dos flavonoides específicos e outros compostos derivados de fenilpropanoides para a saúde humana têm sido reconhecidos apenas recentemente.

Os flavonoides mais comuns encontrados em uvas e vinhos são os flavonóis, catequinas e antocianinas principalmente em uvas tintas (SOUZA, 2013).

Sementes e cascas de uvas são onde a maior parte dos compostos fenólicos se acumulam. Por esta razão, o extrato obtido do resíduo da uva tem se tornado popular recentemente para a obtenção de ingredientes funcionais, tais como antioxidantes naturais e suplementos alimentares (XU *et al.*, 2010).

Os antioxidantes agem retardando ou prevenindo a oxidação de substratos, uma vez que se envolvem nos processos oxidativos impedindo a formação de radicais livres (RIBEIRO, 2011).

Os antioxidantes naturais podem ser extraídos de muitas espécies de plantas, normalmente daquelas utilizadas como condimentos, por serem excelentes fontes de compostos fenólicos (BENELLI, 2010). Os derivados de uva estão entre os produtos com maior apelo funcional.

Mello (2010), estudou a composição química e atividade biológica de resíduos agroindustriais. Entre os extratos aquosos provenientes da produção vinícola; destacam-se os bagaços de Petit Verdot, Cabernet Sauvignon, Moscato, Verdejo, borra tinta, com percentuais superiores a 90 % de atividade antioxidante.

Mulero *et al.* (2010) investigaram a atividade antioxidante e os compostos fenólicos de uvas da variedade *Monastrell* obtidas pelos métodos de agricultura convencional e orgânico. A atividade antioxidante das amostras obtidas pelo método convencional foi de  $5,7 \pm 0,03$  mM Trolox/g e pelo método convencional foi de  $4,40 \pm 0,05$  mM Trolox/g. Similarmente a quantidade de compostos fenólicos para as amostras de uvas orgânicas apresentaram uma quantidade de

compostos fenólicos de  $974,2 \pm 54,4$  mg/kg e pelo método convencional de  $447,7 \pm 27,8$  mg/kg.

Rockenbach *et al.* (2011) avaliaram a capacidade antioxidante de uvas vermelhas (*Vitis vinifera L.* e *Vitis labrusca L.*) produzidas no Brasil. A atividade antioxidante foi determinada utilizando os métodos ABTS e DPPH. Os valores encontrados foram de 485,42 e 505,52  $\mu\text{Mol/g}$  de TEAC (capacidade antioxidante equivalente Trolox), respectivamente.

Rockenbach *et al.* (2012) caracterizaram os subprodutos da produção vinícola de acordo com o teor de fenólicos e sua atividade antioxidante. Os teores de compostos fenólicos foram maiores nas sementes do que nas cascas. Os maiores valores de atividade antioxidante foram encontrados para as sementes da variedade Pinot Noir (16925  $\mu\text{mol}$  (TEAC)/100 g. O bagaço de uva da variedade Bordeaux apresentou o maior poder de inibição da oxidação (41,13 %), assim como o maior conteúdo de antocianinas (HPLC; 29,17 mg/g). Os dados obtidos sugerem que os subprodutos da vinificação, especialmente as sementes de uva da variedade Pinot Noir, apresentam grande potencial como fonte de compostos fenólicos antioxidantes.

Segundo Oliveira *et al.* (2009) diversos estudos estão sendo desenvolvidos com produtos alimentícios obtidos de resíduos da agroindústria que representam antioxidantes naturais, com destaque para o bagaço da uva que apresenta 17 tipos de compostos fenólicos diferentes, entre eles, ácido gálico, catequina, epicatequina e quercetina, representando um ótimo produto a ser explorado pela indústria.

Pesquisas envolvendo resíduos do processamento de uvas são mais recentes e representam um campo científico a ser explorado. Os primeiros estudos envolvendo subprodutos da vinificação atrelam-se quase que exclusivamente na composição polifenólica das sementes e mais atualmente tem se dado grande importância também ao bagaço gerado. Entretanto, os demais resíduos provenientes do processo, tais como engaço e a borra da fermentação ainda têm recebido pouca atenção (MELLO, 2010).

Pesquisas envolvendo resíduos do processamento de uvas são mais recentes e representam um campo científico a ser explorado. Os primeiros estudos envolvendo subprodutos da vinificação atrelam-se quase que exclusivamente na composição polifenólica das sementes e mais atualmente tem sido dada grande importância também ao bagaço gerado. Entretanto, os demais resíduos provenientes do processo, tais como engaço e a borra da fermentação ainda têm recebido pouca atenção (MELO, 2010).

Melo (2010) estudou a composição química e atividade biológica de resíduos agroindustriais. Entre os extratos aquosos, provenientes da produção vinícola destacam-se os de bagaço de Petit Verdot, Cabernet Sauvignon, Moscato, Verdejo, borra tinta e engaços de uva branca, com percentuais superiores a 90 % de atividade antioxidante.

Chaussier *et al.* (1998) extraíram 0,2 - 0,4 g de polifenóis por litro de borra filtrada, correspondendo a uma extração de 80 % dos polifenóis presentes.

Rockenbach *et al.* (2011) caracterizou os subprodutos da produção vinícola de acordo com o teor de fenólicos e sua atividade antioxidante. Os teores de compostos fenólicos foram maiores nas sementes do que nas cascas. Os maiores valores de atividade antioxidante foram encontrados para as sementes da variedade Pinot Noir 16925  $\mu\text{mol}$  equivalentes ao Trolox (TEAC)/100 g. O bagaço de uva da variedade Bordeaux apresentou o maior poder de inibição da oxidação (41,13 %), assim como o maior conteúdo de antocianinas (HPLC; 29,17 mg/g). Os dados obtidos sugerem que os subprodutos da vinificação, especialmente as sementes de uva da variedade Pinot Noir, apresentam grande potencial como fonte de compostos fenólicos antioxidantes.

## **2.4 - MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.4.1 - Matéria-prima**

A matéria - prima utilizada neste trabalho foi a borra do vinho tinto da espécie de uva Niágara Bordô, cedido pela Vinícola Mondini (Ascurra – SC). As amostras foram coletadas no mês de fevereiro de 2012, representando o período de máxima produção.

A matéria - prima foi separada em pequenas frações utilizando embalagens plásticas revestidas com papel laminado. As amostras foram acondicionadas em freezer (-10 °C) até sua utilização para os procedimentos experimentais.

### **2.4.2 - Caracterização físico - química**

As características físico - químicas da amostra foram determinadas de acordo com as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008). Foram avaliadas as seguintes características: potencial hidrogeniônico (pH), atividade de água ( $a_w$ ), sólidos solúveis totais

(SST), acidez total titulável (ATT), teor de cinzas, açúcares redutores totais, compostos fenólicos e avaliação da atividade antioxidante.

Para a determinação da atividade de água ( $a_w$ ) foi utilizado o equipamento AquaLab série 3 TE (Degacon Devices). Para a realização das análises de pH, SST e ATT as amostras foram diluídas com água destilada na proporção de 1:10 agitadas por 30 min e filtradas a vácuo. O potencial Hidrogeniônico (pH) foi determinado por processo eletrométrico com pHmetro digital Gehaka série PG 1800.

A acidez total titulável foi estabelecida em conformidade com as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008). A amostra do resíduo de 6,50 g foi colocada em um Erlenmeyer de 500 mL contendo 50 mL de água destilada. Estes foram mantidos sob agitação até que as partículas ficassem uniformemente suspensas. Depois filtrados e, titulados com solução de hidróxido de sódio (NaOH 0,1 M) até o ponto de viragem (pH 8,2-8,4) que foi determinado utilizando um pHmetro digital. Os sólidos solúveis totais foram obtidos por um refratômetro de bancada tipo ABBE-BioBrix, com leitura direta no equipamento.

A umidade do resíduo foi obtida por aquecimento em estufa a vácuo a  $70\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 6 h, sob pressão reduzida (100 mmHg). Após este período, as amostras foram acondicionadas em dessecador a temperatura ambiente. O teor de cinzas foi obtido por incineração do material o qual foi previamente carbonizado em chapa elétrica, e colocado em uma mufla a  $550\text{ }^{\circ}\text{C}$ , até a eliminação total do carvão. Os açúcares redutores totais foram determinados pelo Laboratório de Ensaio de Química, do Instituto FURB de Serviços, Pesquisa e Inovação.

Os compostos fenólicos totais foram determinados segundo o método de Singleton e Rossi (1965). A avaliação da atividade antioxidante foi realizada utilizando o método fotocolorimétrico do DPPH (2,2 difenil, 1-picrihidrazil) de acordo com Brand-Williams (1995) com algumas modificações (RUFINO *et al.*, 2007).

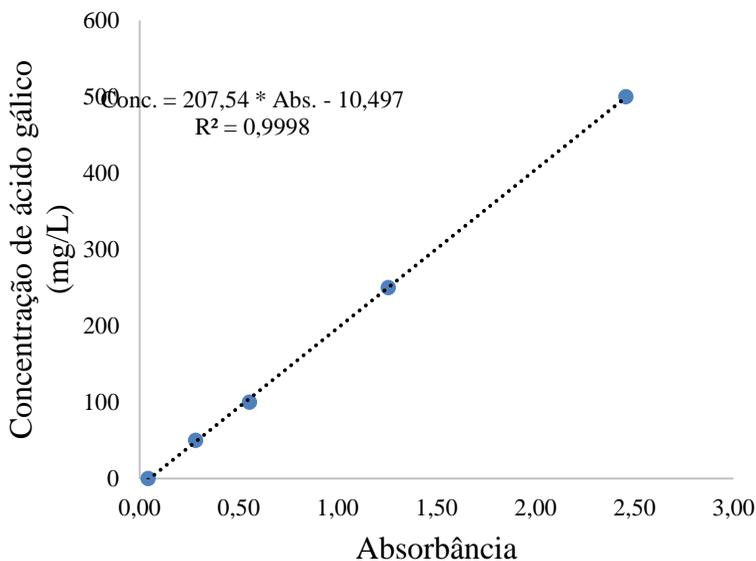
### **2.4.3 - Compostos fenólicos totais**

A determinação dos compostos fenólicos totais do extrato foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, descrito por Singleton e Rossi (1965), com pequenas modificações. A reação com o reagente de Folin-Ciocalteu baseia-se no princípio que em meio alcalino os compostos fenólicos presentes na amostra reduzem a mistura dos ácidos fosfotungsticos e

fosfomolibdicos, do reagente de Folin, em óxidos de tungstênio e molibdênio de cor azul, tornando possível realizar leituras de absorbância na faixa do visível do espectro a 765 nm (BENELLI, 2010).

O teor de compostos fenólicos totais foi obtido pesando-se 1 mL da amostra ao qual foi adicionado 10 mL de água destilada e 1 mL do reagente Folin-Ciocalteu em um balão volumétrico de 25 mL. A amostra foi homogeneizada e deixada em repouso por 3 a 5 min a temperatura de 22 °C. Em seguida, foram adicionados 10 mL de uma solução de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  7,5 %) e água ultrapura até completar o volume, deixando-se reagir por mais 2 h. Alíquotas das amostras foram filtradas e realizou-se a leitura em espectrofotômetro UV-VIS, no comprimento de onda de 765 nm. Água destilada foi utilizada como padrão de branco. Uma curva padrão de ácido gálico nas concentrações de 50 a 500  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  foi feita para quantificar o conteúdo de compostos fenólicos nas mesmas condições descritas acima (Figura 2.3).

**Figura 2.3** – Curva de calibração do ácido gálico para a quantificação dos compostos fenólicos totais.



Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato (EAG/g de extrato).

#### 2.4.4 - Determinação da capacidade antioxidante do extrato da borra do vinho tinto

A determinação da capacidade antioxidante do extrato foi baseada nas adaptações propostas por Rufino et al. (2007). O método baseia-se na transferência de elétrons onde, por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar, o DPPH que possui cor púrpura é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância (NASCIMENTO *et al.*, 2011).

Atualmente, não existe um método oficial para determinação da atividade antioxidante em alimentos de origem vegetal e seus subprodutos, tendo em vista os vários mecanismos antioxidantes que podem ocorrer, bem como a diversidade de compostos bioativos. A literatura descreve vários métodos para a determinação de compostos antioxidantes, cada um com um princípio distinto que utilizam radicais livres e/ ou padrões diversos (SOUSA e VIEIRA, 2011).

Os métodos FRAP e o ABTS são geralmente indicados para compostos hidrofílicos, enquanto que o método de branqueamento do  $\beta$ -caroteno é adequado para compostos lipofílicos. O método do DPPH pode ser utilizado rotineiramente em extratos orgânicos-aquosos para compostos hidrofílicos e lipofílicos (RUFINO *et al.*, 2010).

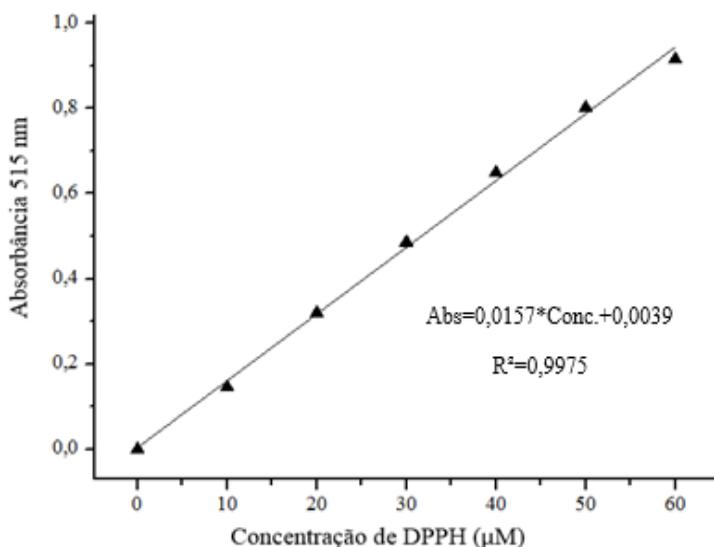
Neste estudo a capacidade antioxidante do extrato foi determinada pelo método do DPPH. Na avaliação da atividade antioxidante por este método, o radical livre DPPH reage com o antioxidante, convertendo-se à sua forma reduzida. Nessa reação, a solução metanólica de DPPH inicialmente de coloração violeta, torna-se amarela; e o grau deste descoramento monitorado através do espectrofotômetro, indica a habilidade do antioxidante em sequestrar o radical livre. Uma forma usual de expressar os resultados nesse ensaio é calcular a quantidade de antioxidante capaz de sequestrar metade dos radicais livres DPPH presentes na solução. Esse índice denomina-se EC<sub>50</sub>. Quanto menor o valor do EC<sub>50</sub> apresentado pelo extrato, menor quantidade do extrato será necessária para reduzir em 50 % do radical livre DPPH e, maior será sua atividade antioxidante (LIMA, 2008).

Foram preparadas duas soluções: álcool metílico (P.A.) a 50 % e acetona (P.A.) 70 % as quais foram homogeneizadas e armazenadas em temperatura ambiente para a extração dos compostos bioativos da amostra utilizada. A solução controle foi preparada utilizando-se 40 mL da solução de álcool metílico 50 % e 40 mL da solução de acetona 70 %

o volume foi completado para 100 mL com água destilada. A solução foi homogeneizada e armazenada a temperatura ambiente até o momento das análises.

Uma solução mãe de DPPH 0,06 mM foi preparada dissolvendo-se 2,4 mg de DPPH em álcool metílico e completado o volume para 100 mL. A solução foi homogeneizada e transferida para um frasco âmbar. Esta solução era preparada apenas no dia da análise. A partir da solução mãe de DPPH foram preparadas diluições variando-se a concentração de 10  $\mu\text{M}$  a 60  $\mu\text{M}$  para obter a curva de calibração do DPPH. As leituras das absorbâncias foram efetuadas no comprimento de onda de 515 nm. A Figura 2.4 apresenta a curva de calibração do DPPH obtida.

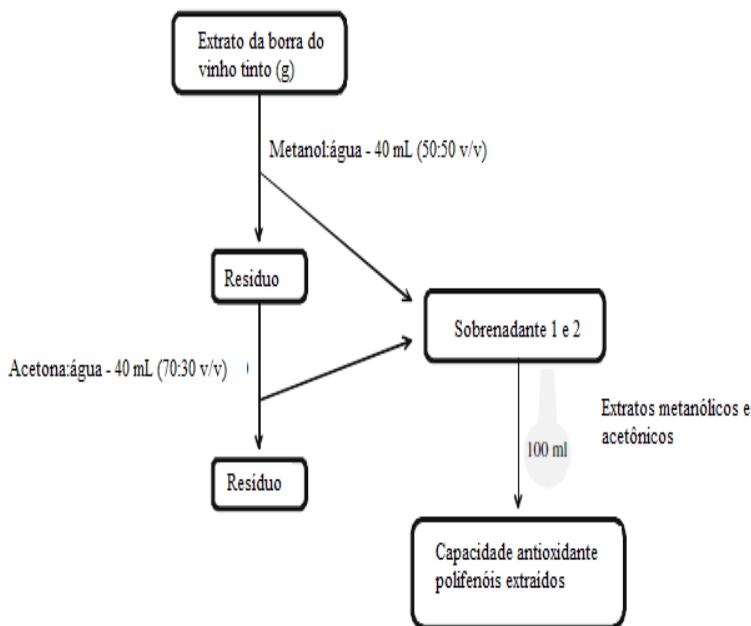
**Figura 2.4** - Curva de calibração do DPPH.



Para determinar a capacidade antioxidante do extrato da borra do vinho tinto foi utilizado 0,5 g de amostra e adicionados 40 mL de metanol 50 %. A amostra foi homogeneizada e deixada em repouso por 60 min à temperatura ambiente. Após este período a amostra foi centrifugada (Hermle Z 300K, Labortechnik GmbH) a 5750 rpm durante 15 min e o sobrenadante foi transferido para um balão volumétrico do resíduo da primeira extração; eram adicionados 40 mL de acetona 70 %,

homogeneizado e deixado em repouso por 60 min à temperatura ambiente. Centrifugado novamente a 5750 rpm durante 15 min, o sobrenadante foi transferido para o balão volumétrico contendo o primeiro sobrenadante e completado o volume para 100 mL com água destilada. A Figura 2.5 apresenta o diagrama da determinação da capacidade antioxidante de extratos orgânicos aquosos.

**Figura 2.5** - Diagrama da determinação da capacidade antioxidante dos



extratos orgânicos aquosos.

Fonte: Adaptado de Rufino *et al.*, (2010).

A partir do extrato obtido foram preparadas três diluições diferentes utilizando-se o sobrenadante (1:5, 1:10 e 1:15). Em ambiente escuro foi transferida uma alíquota de 0,1 mL de cada diluição do extrato para tubos de ensaio com 3,9 mL do radical DPPH (0,06 mM). Foi utilizado 0,1 mL de uma solução controle (álcool metílico, acetona e

água) com 3,9 mL do radical DPPH. Álcool metílico, foi utilizado como branco, para calibrar o espectrofotômetro. As leituras a 515 nm foram realizadas a cada 5 min observando-se a redução da absorbância até sua estabilização.

Após a leitura, o valor correspondente à metade da absorbância inicial do controle foi substituído pelo y da equação da curva do DPPH (Figura 2.4) para encontrar o consumo em  $\mu\text{M}$  DPPH e, em seguida, transformado para g de DPPH. A partir das absorbâncias obtidas das diferentes diluições dos extratos, foi plotado a absorbância no eixo Y e a diluição (mg/L) no eixo X para obter a equação da reta. Para o cálculo da atividade antioxidante total (AAT) foi substituído o valor da absorbância equivalente a 50 % da concentração do DPPH pelo y das curvas obtidas das diferentes diluições para encontrar o resultado que corresponde à amostra necessária para reduzir em 50 % a concentração inicial do radical DPPH ( $\text{EC}_{50}$ ).

Para avaliar o efeito da temperatura na capacidade antioxidante do extrato duas temperaturas de extração foram avaliadas: 25 °C e 80 °C. Estas temperaturas foram escolhidas porque as antocianinas são termicamente estáveis até 60 °C (TERCI, 2004) depois disto há degradação dos compostos. Para avaliar a influência dos compostos de degradação sobre a capacidade antioxidante total o extrato foi submetido ao aquecimento de 80 °C por 10 min.

Outro motivo de se ter escolhido a temperatura de 80 °C é que nos capítulos 6 e 7 será utilizada a técnica de encapsulação com proteínas do soro do leite e, o método da emulsificação por inversão de fases para obtenção de emulsões A/O e emulsões múltiplas A/O/A obtidas por aquecimento de 78 °C  $\pm$  2 °C. Para poder avaliar se este método pode ser utilizado para encapsulação de antocianinas sem que se tenha perdas na capacidade antioxidante do extrato, esta informação se faz necessária. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

## 2.5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nos ensaios realizados de acordo com o item 2.3 - MATERIAL E MÉTODOS são descritos a seguir. A matéria-prima utilizada neste estudo foi caracterizada quanto aos aspectos físico-químicos, compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante.

### 2.5.1 - Caracterização - química da amostra de borra do vinho tinto

Na Tabela 2.3 são apresentados os resultados da caracterização físico-química do extrato (borra do processamento do vinho tinto).

O valor do pH encontrado (3,1) é característico de uvas, este valor está próximo ao encontrado por Santana *et al.*, (2008) e Rizzon e Miele (2002), os quais obtiveram valores próximos ao 3,69 para a uva “Patrícia”, e valores na faixa de 2,9 a 3,5 aproximadamente para as uvas Isabel, Cabernet Sauvignon e Cabernet Franc, respectivamente.

O conteúdo de sólidos solúveis obtido para este estudo foi de 10 °Brix, que de acordo com Chim (2008) os valores ideais para a colheita do fruto devem ficar entre 8 °Brix a 10 °Brix, para garantir a manutenção da qualidade do fruto tanto nos aspectos sensoriais como nutricionais (ponto de maturação).

A acidez total titulável encontrada neste trabalho foi 262,60 meq/L. Em seu trabalho, Allebrandt (2012) obteve 120,54 (meq/L) de acidez para a variedade de uva Merlot (*Vitis vinifera L.*). Zornan (2006) encontrou valores de  $147 \pm 12,7$  a  $120 \pm 8,5$  para o mosto dos cultivares Ancellotta e Tannat da safra de 2006. O resíduo da vinificação da uva Niágara Bordô, apresentou valor de acidez total titulável acima dos valores obtidos pelos autores citados, isto pode ser explicado devido ao fato de que a amostra utilizada neste estudo, passou pelo processo de fermentação, o que pode influenciar na elevação da sua acidez.

**Tabela 2.3** - Caracterização físico - química da amostra de borra do vinho tinto da espécie Niágara Bordô.

Análise	Média ± desvio padrão
Umidade (%)	43,7 ± 3,07
Atividade de água ( $a_w$ )	0,994 ± 0,003
Potencial Hidrogeniônico – pH	3,1 ± 0,16
Acidez Total Titulável – ATT (meq/L)	262,60
Sólidos Solúveis Totais – SST (°Brix)	10 ± 0,23
Açúcares Redutores Totais (%)	< 0,7
Cinzas (%)	12,09 ± 0,17

## 2.5.2 - Compostos fenólicos totais

A quantificação de compostos fenólicos totais é uma estimativa do conteúdo de todos os compostos pertencentes às subclasses de compostos fenólicos.

A quantidade de compostos fenólicos totais da borra do vinho tinto analisadas neste trabalho foi de 87,39 mg EAG.g<sup>-1</sup>.

Devido à escassez de dados na literatura referentes ao conteúdo de compostos fenólicos totais na borra do vinho tinto, os resultados obtidos no presente trabalho foram comparados aos encontrados por vários autores para diferentes resíduos do processamento do vinho tinto.

O conteúdo de compostos fenólicos totais obtidos por Melo (2010) para amostras de borras de vinho tinto foi de 20,55 mg EAG/g inferior ao encontrado neste trabalho porém, as amostras foram submetidas a um processo de secagem, o que pode ter proporcionado degradação destes compostos diminuindo assim o teor de fenólicos totais na amostra. Rockenbach *et al.* (2008) avaliaram a quantidade de compostos fenólicos totais obtidas nos extratos dos resíduos do processo de vinificação das variedades Regente e Pinot Noir (*Vitis vinifera*). O valor encontrado em massa seca foi de 5334mg EAG/100g, na variedade Regente, e de 7852 mg EAG/100g, na variedade Pinot Noir. O valor obtido para a variedade Pinot Noir está próximo do valor obtido neste estudo para a borra do vinho tinto (8739 mg EGA/100 g).

Cataneo *et.al.* (2008) avaliaram o teor de compostos fenólicos do resíduo do processamento de uvas das variedades COUDERC 13 e PINOT GRIS, como fonte natural de polifenóis e outros agentes profiláticos (antioxidantes) para aplicação nas indústrias alimentícia e de fitoterápicos. O valor encontrado para o teor de compostos fenólicos totais foi de 109,64 mg EAG/100g para uva COUDERC 13 e entre 370,17 e 420,61 mg EAG/100g nos extratos do bagaço seco de uva PINOT GRIS. Quando comparado o resultado obtido para o resíduo da borra do vinho tinto (8739 mg EAG/100g) aos valores encontrados por Cataneo *et. al.*, (2008), pode-se perceber que a borra do vinho tinto apresenta um maior teor de compostos fenólicos. Esta diferença pode ser explicada pelo fato de que o resíduo utilizado neste estudo (borra do processamento do vinho tinto) ainda contém uma quantidade apreciável de vinho na sua composição (borra é composta por 70 a 90 % de vinho) o que pode contribuir para o maior teor de compostos fenólicos totais na amostra estudada.

Os resultados obtidos neste estudo com a borra do vinho tinto e o extrato fenólico extraído a partir deste têm grande potencial para

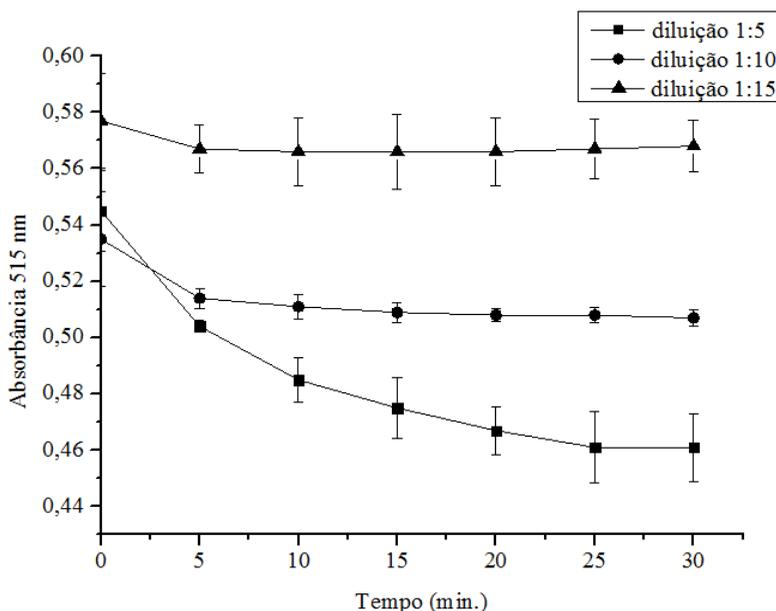
serem utilizados como componentes funcionais tanto para a indústria de alimentos como para a indústria cosmética.

### 2.5.3 - Determinação da capacidade antioxidante utilizando o método do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) para o extrato puro

A capacidade antioxidante do extrato da borra do vinho tinto em sequestrar os radicais DPPH em diferentes concentrações foi avaliada, de forma a obter uma curva linear entre a concentração do antioxidante e o sequestro do radical. A partir da curva obtida calcula-se o  $EC_{50}$ .

A Figura 2.6 apresenta as curvas cinéticas do potencial antioxidante do extrato em diferentes concentrações a temperatura ambiente, até atingir a estabilização para o cálculo do  $EC_{50}$ .

Figura 2.6 - Cinética do potencial antioxidante do extrato a 25 °C.



De acordo com os resultados obtidos (Figura 2.6) o tempo de reação foi de aproximadamente 30 min no qual observou a estabilização nos valores da absorbância. Estes valores da absorbância serão

utilizados para calcular a quantidade de amostra necessária para reduzir em 50 % a concentração inicial do radical DPPH ( $EC_{50}$ ).

O valor médio encontrado para reduzir em 50 % a concentração inicial do radical DPPH ( $EC_{50}$ ) para extrato da borra do vinho tinto foi de 2314 g de extrato/g de DPPH. Valores próximos foram encontrados por Vasco *et al.* (2008) para morango (2395 g de fruta/g DPPH) e para a polpa de cereja capulí (2055 g de fruta/g DPPH), usando o mesmo método. Neste estudo, os autores justificaram os valores relativamente altos encontrados para o  $EC_{50}$  pelo morango e polpa de cereja capulí devido ao fato destes compostos terem uma elevada absorvância em 520 nm, o que interfere com a absorvância do DPPH em 515 nm levando a uma subestimação da capacidade antioxidante destes frutos.

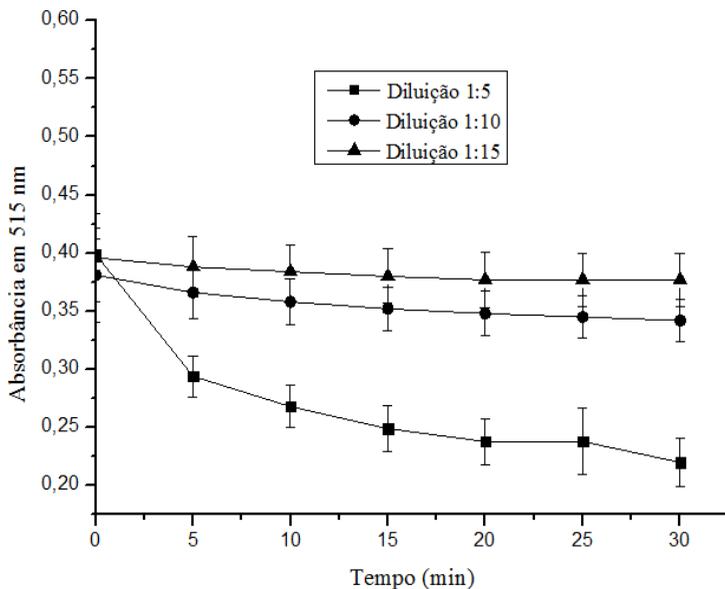
Rufino *et al.* (2010) estudaram a capacidade antioxidante de 18 frutas tropicais não tradicionais do Brasil empregando os métodos DPPH, FRAP e  $\beta$ -caroteno. Os valores encontrados para o  $EC_{50}$  em g de fruta/g de DPPH para o açaí, jambolão e jabuticaba foram de 4264, 3025 e 1472 g de fruta /g DPPH respectivamente.

Reque *et al.* (2014) estudaram a capacidade antioxidante do mirtilo (*Vaccinium sp.*) considerada uma das melhores fontes potenciais de antioxidantes na dieta. Os valores médios encontrados nas frutas “in natura” para a atividade antioxidante foram de 29,20  $\mu$ M TE / g de frutas pelo método ABTS, e 3322,98 g de fruta / g de DPPH através do método de DPPH.

O resultado obtido para o extrato da borra do vinho tinto quando comparado aos valores encontrados por outros autores (VASCO *et al.*, 2008; RUFINO *et al.* 2010 e REQUE *et al.*, 2014) indicam perspectivas promissoras para a exploração deste subproduto com considerável capacidade antioxidante.

A Figura 2.7 apresenta as curvas cinéticas do potencial antioxidante do extrato da borra do vinho tinto pelo método do DPPH em temperatura de 80 °C por 10 min.

**Figura 2.7** - Cinética do potencial antioxidante do extrato do resíduo da borra do vinho tinto pelo método do DPPH em temperatura de 80 °C.



Os valores da absorbância após ser atingida a estabilidade nas curvas cinéticas do potencial antioxidante a 80 °C (Figura 2.7) foram utilizados para calcular a quantidade de amostra necessária para reduzir em 50 % a concentração inicial do radical DPPH ( $EC_{50}$ ) a 80 °C. O valor médio encontrado para reduzir em 50 % a concentração inicial do radical DPPH ( $EC_{50}$ ) para extrato da borra do vinho tinto aquecido foi de 322,6 g de extrato/g de DPPH. Ou seja, quando a amostra foi aquecida o valor diminuiu em aproximadamente 7 vezes quando comparado ao valor obtido na temperatura de 25 °C, o que significa que é preciso uma menor quantidade de extrato para reduzir em 50 % a concentração inicial do DPPH. Como a amostra analisada é rica em componentes antocianicos e estes são instáveis termicamente, era de se esperar que a capacidade antioxidante da amostra também fosse reduzida frente ao aquecimento térmico, no entanto não foi observado. Isto pode ser explicado pelo fato de que em solução aquosa, as antocianinas se encontram comumente na forma de uma mistura de diferentes estruturas químicas em equilíbrio: cátion *flavilium* (vermelho), base anidra quinoidal (azul), pseudo-base carbitol (incolor) e chalcona (incolor ou levemente amarela). A pH abaixo de 2, as

antocianinas apresentam-se basicamente na forma catiônica; com o aumento do pH, ocorre uma rápida desprotonação para formar a base quinoidal. Em meio aquoso, a hidratação do cátion *flavilium* leva ao equilíbrio entre a forma carbitol e chalcona. À temperatura ambiente e em meio levemente acidificado, o equilíbrio entre as formas carbitol e chalcona é muito lento e leva horas para ser atingido. O aumento da temperatura desloca o equilíbrio na direção da formação da base chalcona que é incolor (HEREDIA *et al.*, 1998). A temperatura de 80 °C utilizada para determinar a capacidade antioxidante do extrato pode ter deslocado o equilíbrio formando produtos de degradação incolores com capacidade antioxidante superior ao cátion *flavilium* (vermelho).

Yue e Xu (2008) avaliaram a estabilidade térmica de 10 antocianinas encontradas no extrato de mirtilo em diferentes temperaturas de aquecimento (80, 100 e 125 °C). A capacidade antioxidante dos extratos aquecidos foi estimada utilizando mesmo método adotado neste estudo. Os extratos aquecidos a 80 °C durante 30 min, 100 °C durante 10 min e 20 min, e 125 °C por 10 min teve capacidade de eliminação de radicais livres superior ao do extrato sem aquecimento.

Seeram *et al.* (2001) identificaram que alguns produtos de degradação de antocianinas apresentam capacidade antioxidante. Estes produtos de degradação foram ácidos fenólicos, e a sua atividade antioxidante pode ser comparável a um antioxidante comercial, tal como hidroxitolueno butilado (BHT).

Nayak *et al.* (2011) estudaram a degradação térmica de antocianinas da polpa da batata roxa (*Cv. Roxo Majesty*) e o impacto sobre a capacidade antioxidante. Os parâmetros de degradação das antocianinas purificadas da polpa da batata roxa aquecidas em altas temperaturas (100 °C e 150 °C) foram determinados. A purificação das antocianinas do extrato bruto promoveu a remoção de sais, açúcares, compostos fenólicos não antocianínicos incolores e os produtos da degradação térmica foram monitorados e quantificados por HPLC. A separação de compostos fenólicos incolores a partir das antocianinas foi confirmada por HPLC em dois comprimentos de onda, 280 e 520 nm. A capacidade antioxidante nas antocianinas purificadas, medida pelos ensaios de DPPH e ABTS, aumentou após o tratamento térmico, o que indica que os produtos de degradação nas amostras possuem altas atividades antioxidantes. A proporção entre a quantidade de antocianinas totais (AT) e da atividade antioxidante total (AAT) das amostras de antocianinas purificadas não aquecidas foi de 2,54 e 3,17 vezes utilizando os ensaios de DPPH e ABTS respectivamente, e 1316

(DPPH) e 1581 (ensaio ABTS) depois do aquecimento a 150 °C. A hipótese levantada pelos autores para o aumento da capacidade antioxidante dos extratos é que em altas temperaturas, os produtos de degradação das antocianinas poderiam ser responsáveis pela atividade antioxidante global das amostras.

Wang *et al.* (1997) atribuíram a glicosilação a diminuição significativa da atividade antioxidante da cianidina-3-glicósídeo e da perlagornidina-3-glicósídeo, e um aumento da atividade da malvidina-3-glicósídeo. Os açúcares combinados com as antocianidinas desempenham um papel importante na bioatividade das antocianinas. No entanto, a glicosilação pode influenciar a capacidade antioxidante dependendo das agliconas.

## **2.6- CONCLUSÕES**

Os ensaios de DPPH confirmaram a capacidade antioxidante destes extratos principalmente sob temperaturas elevadas (80 °C). A hipótese levantada por diversos autores de que os compostos de degradação das antocianinas poderiam ser responsáveis pela atividade antioxidante global foi também confirmada neste estudo. Estudos posteriores com padrão de degradação de antocianinas (Chalcona) deverão ser realizado utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de massas para confirmar esta hipótese.



## CÁPITULO 3 - EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS ANTOCIANINAS TOTAIS DO EXTRATO DA BORRA DO VINHO TINTO

### 3.1 - Introdução

Entre as frutas, a uva é uma das maiores fontes de compostos fenólicos. Os principais fenólicos presentes na uva são os flavonoides (antocianinas, flavanóis e flavonóis), os estilbenos (resveratrol), os ácidos fenólicos (derivados dos ácidos cinâmicos e benzoicos) e uma larga variedade de taninos (MALACRIDA e MOTTA, 2005).

As antocianinas são flavonoides que se encontram largamente distribuídos na natureza e são responsáveis pela maioria das cores azul, violeta e todas as tonalidades de vermelho que aparecem em flores, frutos, algumas folhas, caules e raízes de plantas (CONSTANT, 2003).

Vários segmentos industriais têm interesse no uso de antocianinas devido a sua capacidade corante e sua atividade antioxidante.

Estudos referentes aos efeitos benéficos das antocianinas à saúde humana, devido a sua ação antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena, contra riscos de doenças coronárias, vem sendo abordados recentemente (SAMPAIO, 2008).

Augusta (2011) cita diversos trabalhos que demonstram que esses corantes apresentam atividades anticarcinogênicas, antioxidantes e antivirais que promovem associação dessas propriedades aos alimentos que os contém.

Entretanto, não só a partir de alimentos “*in natura*” é possível obter estes compostos. Diversos autores vêm estudando o uso de subprodutos visando sua aplicação industrial, principalmente os da produção vinícola que são ricos em compostos fenólicos (GONZÁLES-PARAMÁS *et al.*, 2004).

Arvanitoyannes *et al.* (2006) estudaram o potencial do uso de subprodutos da indústria vinícola. Os resíduos apresentaram elevada capacidade antioxidante que têm sido utilizados pela indústria alimentícia. Além disso, os resíduos de vinho podem ser potencialmente utilizados como condicionadores de solo, como adsorvente de metais pesados, como fertilizante, entre outros.

Makris, Boskou e Andrikopoulos (2007) investigaram os subprodutos sólidos da indústria de vinho branco e tinto, os quais foram submetidos a avaliação como fontes potenciais de antioxidantes. Os resultados mostraram que extratos de sementes de uva (branco ou tinto)

têm quantidades elevadas de polifenóis totais (10,3-11,1 % em base seca), uma grande parte da qual é composta de flavonoides. O bagaço da uva vermelha e as grânhas continham quantidades apreciáveis de polifenóis, enquanto as cascas de uva branca tinham menor teor de polifenóis. A atividade anti-radicalar mostra-se altamente dependente do teor de flavonoides totais.

Assim, a extração e purificação de compostos bioativos, tais como as antocianinas de fontes naturais torna-se muito importante para que estes, possam ser utilizados em fitoquímicos, na preparação de suplementos alimentares ou nutracêuticos, ingredientes para alimentos funcionais e aditivos de alimentos, produtos farmacêuticos e cosméticos (CISSÉ *et al.*, 2012).

A extração sólido-líquido de antocianinas é comumente realizada considerando vários parâmetros, tais como temperatura, pH, solvente, etc. Metanol e etanol contendo uma pequena quantidade de ácido são os solventes mais utilizados (Mantell *et al.*, 2002; Pinelo *et al.*, 2005).

### 3.1.1 - Objetivo geral

Neste capítulo, o objetivo é estudar a influência das variáveis razão de soluto:solvente, temperatura, concentração de HCl e concentração de solvente sobre a eficiência da extração de antocianinas totais utilizando como matriz vegetal a borra do vinho tinto.

## 3.2 - Antocianinas

As antocianinas pertencem à classe dos flavonoides. São pigmentos solúveis em água, intensamente coloridos e amplamente distribuídos na natureza. O termo antocianina é derivado das palavras gregas *anthos* = flor e *kianos*=azul, são pigmentos de fácil incorporação em meio aquoso, não são tóxicos, o que os torna interessantes para sua utilização como corantes.

Apesar de existirem aproximadamente 400 tipos de antocianinas presentes em diversas plantas como uva, cereja, morango, amora, maçã, azeitona, figo, marmelo, jabuticaba, cacau, repolho roxo, rabanete, berinjela, feijão, entre outras (MALACRIDA e MOTTA, 2006) poucas delas apresentam-se como fonte comercial desse pigmento, porém apenas a uva e o repolho roxo são empregados comercialmente (CONSTANT, 2003).

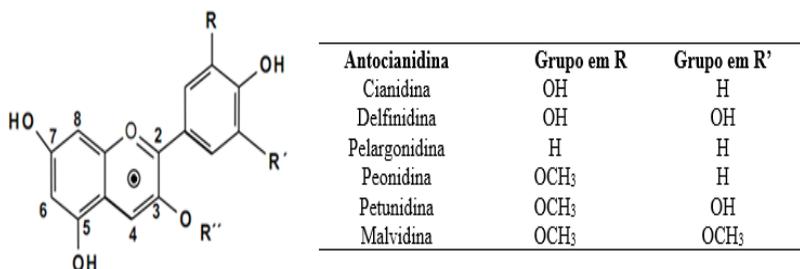
A diferença entre as antocianinas está relacionada ao número de hidroxilas, a natureza e o número de açúcares ligados à molécula, a posição deste açúcar, bem como a natureza e o número de ácidos alifáticos ou aromáticos ligados aos açúcares na molécula (KONG *et al.*, 2003). O açúcar presente na estrutura das antocianinas confere maior solubilidade e estabilidade a estes pigmentos quando comparados com suas agliconas (JACKMAN *et al.*, 1987; TERCÍ e ROSSI, 2002; OKUMURA *et al.*, 2002, CAMPOS, 2006).

A molécula de antocianina não glicosilada (aglicona) é denominada antocianidina e raramente ocorre na natureza, em geral, é resultante do processo de isolamento das antocianinas.

Estruturalmente, as antocianinas são derivados glicosilados do cátion 2-fenil benzopirílium, também denominado de cátion flavílico.

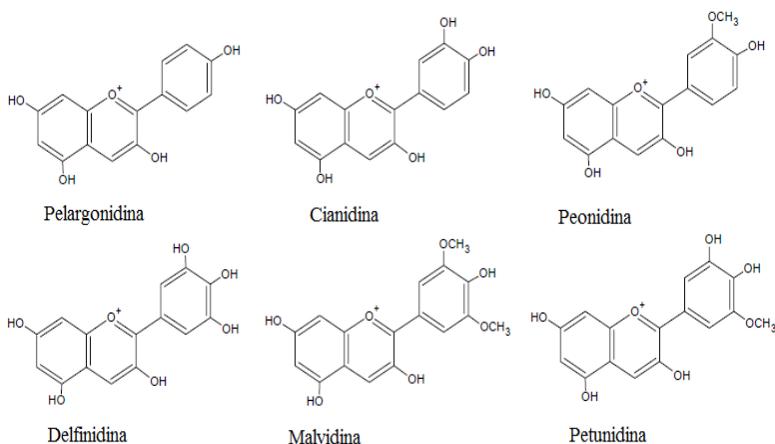
A Figura 3.1 apresenta a estrutura genérica das antocianinas a partir do esqueleto das antocianidinas (agliconas). A substituição de “R” por uma ou mais unidades de açúcar na antocianidina resulta em uma antocianina. Outras unidades de açúcares também podem ser ligadas pelos grupos nas posições 3, 5, e 7.

**Figura 3.1** - Estrutura genérica das antocianinas a partir do esqueleto das antocianidinas (agliconas).



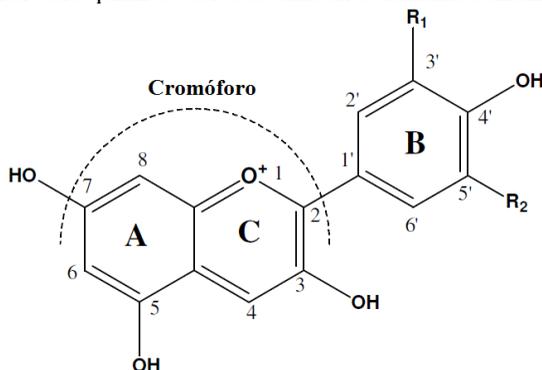
(Fonte: Rein, 2005).

As antocianidinas mais importantes são a pelargonidina, cianidina, delfinidina, petunidina, malvidina e peonidina (Figura 3.2). A distribuição das seis antocianidinas mais comuns nas plantas é cianidina (50 %), pelargonidina (12 %), peonidina (12 %), delfinidina (12 %), petunidina (7 %) e a malvidina (7 %) (KONG, 2003).

**Figura 3.2** - Antocianidinas naturais mais importantes.

(Fonte: Rein, 2005).

As diferenças na estrutura química dessas seis antocianidinas mais comuns (Figura 3.2) ocorre nas posições 3' e 5' (Figura 3.3), devido ao longo cromóforo de oito ligações duplas conjugadas que transportam a carga positiva.

**Figura 3.3** - Estrutura química básica de uma antocianidina comum.

(Fonte: He, 2011).

### 3.2.1 - Fatores que afetam a estabilidade das antocianinas

Os fatores mais importantes relacionados com a cor e estabilidade das antocianinas são pH, enzimas, copigmentação, presença

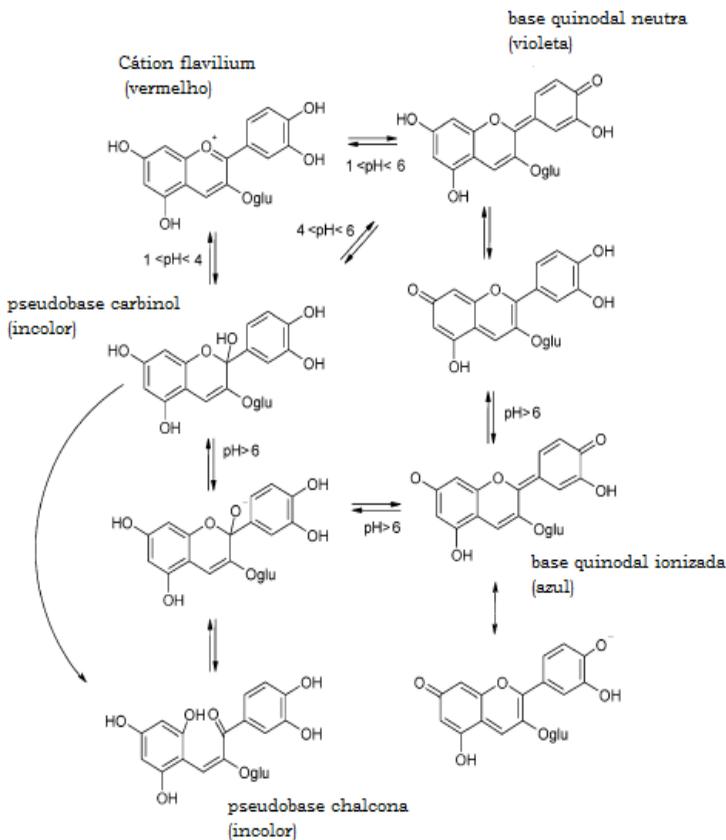
de oxigênio, temperatura entre outros. Existem também outros fatores importantes como a presença de íons metálicos, enzimas e ácido ascórbico ou açúcares (DELGADO-VARGAS e PAREDES-LÓPEZ, 2003; JING, 2006; CERRO-QUINTANA, 2009).

**1° pH.** Uma característica marcante das antocianinas está no fato de que em soluções aquosas, apresentam diferentes estruturas em função do pH. De um modo geral, em meio extremamente ácido (pH entre 1–2), as antocianinas apresentam coloração intensamente avermelhada devido ao predomínio da forma cátion flavílico ( $AH^+$ ). Para um meio com pH maior que 2, é observado o equilíbrio entre o cátion flavílico e uma estrutura conhecida como pseudobase carbinol (B).

Com o aumento do pH, as antocianinas perdem a cor até se tornarem praticamente incolores em pH 6, aproximadamente, devido a predominância da espécie pseudobase carbinol.

Em valores de pH acima de 6 tanto a estrutura pseudobase carbinol quanto a anidrobases quinoidal (A) podem formar a espécie cis-chalcona (Cc). A formação desta ocorre pela ruptura do anel heterocíclico o que, dependendo do tipo de antocianina, pode tornar a reação irreversível (MARÇO *et al.*, 2008). A interconversão de uma espécie a outra está representada na Figura 3.4.

**Figura 3.4** - Transformações estruturais da cyn-3-glu em solução aquosa variando-se o pH.



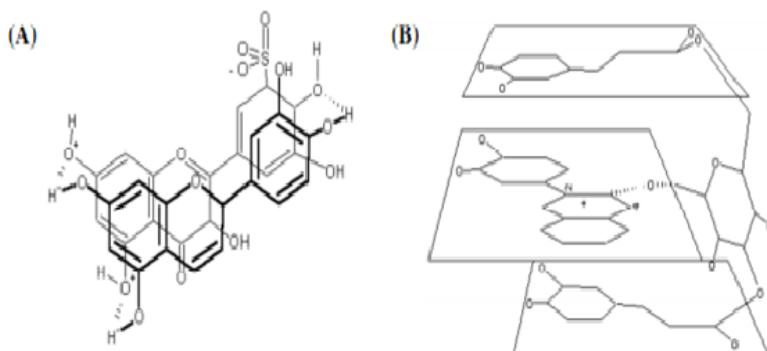
Fonte: SCORDINO *et al.* (2004).

**2° Enzimas.** As antocianinas também podem ser degradadas por enzimas endógenas presentes nos tecidos das plantas, tais como glicosidases, polifenol oxidases e peroxidases. As glicosidases, também denominadas antocianases, hidrolisam as ligações glicosídicas com a liberação do açúcar e da aglicona. Essa última é instável e degrada-se espontaneamente formando a chalcona incolor (ARÉVALO, 2007).

**3° Copigmentação.** Na natureza, as moléculas de antocianinas estão frequentemente associadas com outras moléculas chamadas de copigmentos, que exercem uma influência determinante sobre a cor dos vegetais (GOUVÊA, 2010). A copigmentação é o fenômeno que gera

uma mudança ou um incremento na intensidade da cor (BOULTON, 2001). Os copigmentos são geralmente incolores, mas quando misturados com uma solução antociânica uma interação é realizada produzindo um deslocamento no espectro de absorção máximo (efeito batocrômico). Os copigmentos podem ser flavonoides não antociânicos, alcaloides, aminoácidos e nucleosídeos, entre outros, podem atuar como copigmentos e a própria antocianina pode agir copigmentando outra antocianina (BROUILLARD, 1981). A Figura 3.5 apresenta um exemplo de copigmentação intermolecular entre uma antocianina e um pigmento não antociânico.

**Figura 3.5** - (A) Exemplo de copigmentação intermolecular entre uma antocianina e um pigmento (não antociânico). (B) Exemplo de copigmentação intramolecular.



Fonte: IACOBUCCI e SWEENY (1983).

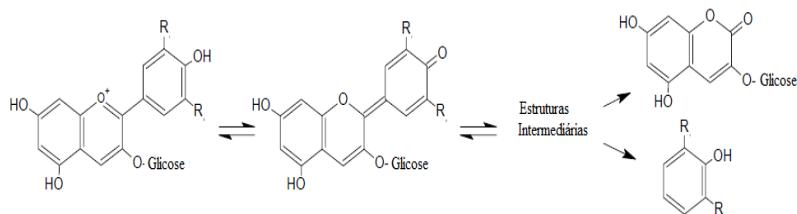
**4° Luz.** A luz exerce efeito duplo sobre as antocianinas: favorece sua biossíntese, mas acelera sua degradação. PALAMIDIS e MARKAKIS (1975) observaram que a presença de luz acelerou a destruição das antocianinas em bebidas carbonatadas, coloridas com antocianinas extraídas da polpa da uva. O tempo de meia-vida das antocianinas a 20 °C no escuro foi, de 416 dias, diminuindo para 197 dias quando as bebidas foram expostas à luz ambiente nas mesmas condições de temperatura.

**5° Presença de oxigênio.** A presença de oxigênio no meio também é um fator significativo na degradação de antocianinas, mesmo na ausência de luz, em todos os valores de pH. Esta degradação ocorre através de um mecanismo de oxidação direta ou indireta dos constituintes do meio que

reagem com as antocianinas. Precipitados e desenvolvimento de turbidez em sucos de frutas podem ser resultado da oxidação direta da base carbinol de antocianinas (JACKMAN e SMITH, 1992).

**6° Temperatura.** A estabilidade das antocianinas é afetada pela temperatura. A taxa de degradação das antocianinas aumenta durante o processamento e armazenamento de acordo com o aumento da temperatura. O aumento da temperatura em valores de pH na faixa entre 2 e 4 induz a perda de uma das porções glicosil das antocianinas, por hidrólise da ligação glicosídica. Isto leva a uma maior perda da coloração da antocianina, uma vez que as agliconas são muito menos estáveis do que as suas formas glicosídicas. Postula-se que a formação de uma chalcona é o primeiro passo para a degradação térmica de antocianinas (REIN, 2005). Eventualmente, a degradação térmica conduz a produtos castanhos, especialmente na presença de oxigênio. Cumarina 3,5- diglicosídeos também são produtos de degradação térmica comuns de antocianinas 3,5- diglicosídeos (REIN, 2005). A Figura 3.6 mostra uma proposta das vias de degradação térmica da antocianina.

**Figura 3.6** - Degradação térmica da antocianina monoglicosídeo a pH 3,7 acelerada pela temperatura.



A temperatura de extração é uma variável que deve ser controlada, pois se sabe que as antocianinas são termicamente estáveis até 60 °C (TERCI, 2004). Por serem sensíveis ao aquecimento, altas temperaturas pode afetar a concentração de antocianinas nos extratos por favorecer a extração conjunta de ácidos fenólicos e taninos, além de complexações com proteínas, o que compromete a estabilidade dos extratos (JING *et al.*, 2006).

### 3.3 - Extração

O método de extração do pigmento depende principalmente da finalidade para o qual está sendo extraído o material, da natureza dos compostos e da fonte ou matriz utilizada (RODRIGUEZ-SAONA e WROLSTAD, 2001).

O caráter polar da molécula de antocianina permite a sua solubilidade em muitos solventes diferentes, tais como álcoois, acetona, dimetil sulfóxido e água. A escolha do método de extração deve maximizar a recuperação de pigmento com uma quantidade mínima de auxiliares e assim obter uma degradação mínima do estado natural (RODRIGUEZ – SAONA, 2001).

A extração sólido-líquido é uma das técnicas mais usadas e envolve a remoção de um ou mais compostos de um alimento, empregando-se um líquido que é capaz de dissolver o soluto. O processo pode ser realizado em um ou múltiplos estágios, por um tempo predeterminado, para então, separar o solvente (FELLOWS, 2006). Para a remoção das antocianinas, em diferentes matrizes, este método de extração é o mais empregado. Apesar de bastante consolidada existem outras técnicas de extração sendo pesquisadas na obtenção de compostos bioativos de matrizes vegetais com o objetivo de aumentar o rendimento com a utilização de uma menor quantidade de solventes.

Tao *et al.* (2014) utilizaram o processo de extração assistida por ultrassom para extrair compostos fenólicos, incluindo antocianinas da borra do vinho. Os efeitos de tempo de extração, temperatura, proporção de sólido:solvente foram avaliados sobre rendimento do conteúdo de compostos fenólicos totais e antocianinas totais. O processo de extração foi simulado e otimizado por meio de rede neural artificial (RNA) e algoritmo genético (GA). Sob condições ótimas de extração, os rendimentos experimentais do conteúdo de compostos fenólicos totais e antocianinas totais foram 58,76 e 6,69 mg/g, respectivamente, que concordou com os valores previstos pelo modelo. Além disso, uma maior quantidade de compostos fenólicos totais e antocianinas totais foram extraídos por ultrassom nas condições ideais do que por maceração convencional.

Pérez-Serradilla *et al.* (2011) investigaram os compostos fenólicos totais da borra do vinho utilizando extração assistida por micro-ondas (MAE). O método proposto MAE sob condições otimizadas proporciona melhor eficiência de extração em um tempo muito mais curto (17 min) do que o método convencional para compostos fenólicos (24 h). O extrato líquido obtido pelo MAE foi seco

por pulverização. O tipo e a quantidade de ingredientes utilizados assim como a temperatura de secagem, foram otimizados de modo a minimizar a oxidação dos compostos fenólicos e maximizar o rendimento do processo de secagem por pulverização. O índice de compostos fenólicos totais no extrato seco obtido foi de 36,8 % (expresso em ácido gálico). Além disso, Mv3G, Cm - Mv3G, miricetina, quercetina, quercetina - 3 -  $\beta$  - glicosídeo, ácido cafeico e p-cumárico foram quantificados em relação ao extrato seco por meio de HPLC -DAD. Os resultados indicam que as borras do vinho podem ser uma alternativa adequada e barata para obtenção de extratos antioxidantes.

Os métodos para quantificação das antocianinas encontram-se bem elucidados na literatura (TEIXEIRA *et al.*, 2008). O teor de antocianinas totais depende de vários fatores como: espécie, variedade, crescimento, estado fisiológico das plantas, aplicação de produtos químicos, etc. (FULEKI e FRANCIS, 1968).

Uma maneira usual de se expressar os resultados da determinação de antocianinas é em termos da quantidade absoluta total de antocianinas presentes num extrato particular estimando dessa maneira, o teor de antocianina expresso em mg de antocianinas/100 gramas de amostra.

As análises quantitativas das antocianinas podem ser divididas em análises espectrofotométricas e cromatográficas (CRUZ, 2008). Diferentemente da grande parte dos flavonoides, que absorvem luz na região entre 350 e 380 nm, as antocianinas são capazes de absorver fortemente luz na região do visível, compreendida entre 496 e 550 nm (BROUILLARD, 1981). Essa característica particular permite a quantificação das antocianinas por métodos colorimétricos (WROLSTAD, 1999).

As análises espectrofotométricas baseiam-se no comportamento espectral desta classe de flavonoides em função do pH (CRUZ, 2008).

O método proposto por Fuleki e Francis (1968a) para a quantificação das antocianinas totais emprega uma extração prévia de 12 h sob refrigeração em etanol acidificado e, filtração em funil de Buchner para obtenção de um extrato isento de sólidos em suspensão. O extrato obtido tem sua absorbância lida em espectrofotômetro em comprimento de onda de máxima absorbância ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) em pH único, sendo utilizado o coeficiente de extinção molar ( $E$ ) da antocianina majoritária para o cálculo das antocianinas totais (CRUZ, 2008). No entanto, este método promove uma superestimação dos teores de antocianinas totais, por empregar leitura da absorbância em um único comprimento de onda, o

de máxima absorvência para as antocianinas, quantificando desta forma compostos de degradação que também absorvem luz nesta região.

Outro método utilizado na quantificação é o de pH diferencial, proposto inicialmente por Fuleki e Francis (1968b). Este método permite a quantificação das antocianinas totais e monoméricas em função do comportamento espectral diferenciado das monoméricas em relação às poliméricas em condições de pH distintas. Em função dos comprimentos de onda empregados é possível eliminar a interferência de compostos de degradação (CRUZ, 2008). A amostra é submetida a dois tampões aquosos distintos, pH 1,0 e 4,5, e as soluções obtidas têm a absorvência medida em dois comprimentos de onda, 700 nm e comprimento de máxima absorção ( $\lambda_{\text{máx}}$ ), que pode variar de 510 a 550 nm em função das antocianinas presentes na amostra (FULEKI e FRANCIS, 1968a).

As antocianinas têm sua cor intensificada em pH 1,0 e não são capazes de absorver a 700 nm, onde somente os compostos de degradação, interferentes, absorvem. Portanto, a diferença entre a leitura obtida no  $\lambda_{\text{máx}}$  e a 700 nm da solução de pH 1,0 indicam a concentração das antocianinas totais. No entanto, em pH 4,5, somente as antocianinas monoméricas assumem a forma hemiquetal, a qual é incolor, e a diferença entre as leituras nos dois comprimentos de onda a pH 1,0 é subtraída da diferença entre as leituras nos dois comprimentos de onda a pH 4,5, correspondendo às antocianinas monoméricas (CRUZ, 2008).

Fuleki e Francis (1968a) compararam os métodos de pH diferencial (1,0 e 4,5) e pH Único (1,0) na quantificação de antocianinas em de suco de *cranberry* e concluíram haver diferença entre os métodos, mas não o suficiente para tornar um deles menos recomendável. Esses autores sugeriram que, de fato, ambos os métodos podem ser empregados com sucesso desde que não existam interferentes no meio (TEIXEIRA, 2008)

Cissé *et al.* (2012) investigaram a influência dos parâmetros de operação na extração de antocianinas de cálices do *Hibiscus sabdariffa L.* A proporção sólido:solvente e o tamanho de partícula foram os parâmetros que tiveram maior influência na eficiência da extração de antocianinas. O rendimento máximo de antocianinas (88 %) foi obtido a 25 °C com uma proporção sólido:solvente de 1:25. Um modelo cinético de termo-degradação das antocianinas foi proposto apresentando uma boa concordância entre os resultados previstos pelo modelo e os dados experimentais. A partir de uma relação de sólido:solvente de 1:5, o

rendimento da extração foi de 63 % e a concentração de antocianina encontrada foi de 0,3 g /L obtida em menos de 10 min de extração.

Amendola *et al.* (2010) estudaram a extração sólido - líquido de compostos fenólicos de diferentes espécies de uva utilizando como solvente extrator etanol 60 %. Diferentes modelos matemáticos da literatura referente a recuperação de compostos bioativos obtidos a partir de plantas foram testados com os dados experimentais obtidos. O modelo matemático de cinética de primeira ordem foi o que melhor se ajustou com os dados experimentais.

Sant'Anna *et al.* (2011) estudaram a cinética de extração de compostos fenólicos totais e de antocianinas monoméricas do bagaço da uva. A melhor concentração de etanol a ser utilizada na extração foi de 50 % com uma proporção sólido:solvente de 1 g de bagaço de uva por 50 mL de solvente. O modelo de pseudo-primeira ordem foi o que melhor se adequou aos dados experimentais com valores de taxa de extração para os compostos fenólicos variando entre 0,1302 e 0,0398  $\text{min}^{-1}$  e entre 0,1574 e 0,0336  $\text{min}^{-1}$  para antocianinas na faixa de temperatura entre 60 – 25 °C. Os resultados mostraram que o extrato apresenta boa capacidade antioxidante tendo grande potencial para ser utilizado como componente funcional na indústria de alimentos.

### 3.4 – MATERIAS E MÉTODOS

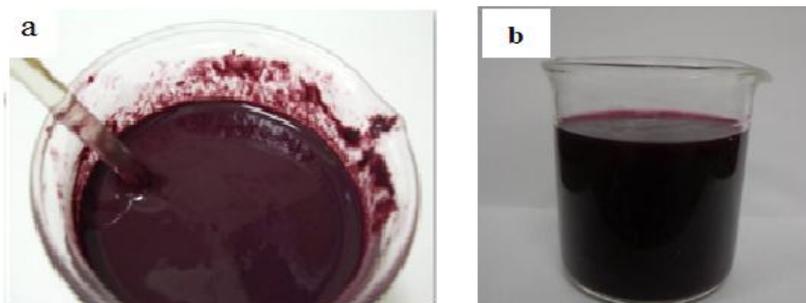
#### 3.4.1 - Extração e quantificação das antocianinas (ACYS) – Método do pH único

O método de extração e quantificação adotado neste estudo foi o do pH único proposto por Fuleki e Francis (1968a). Baseado no método proposto, a amostra foi submetida à extração utilizando como solvente extrator etanol-água (70:30) e ácido clorídrico (HCl 1,5 M) suficiente para ajustar o valor do pH do meio para 1,5, utilizando uma proporção de soluto:solvente de 1:1,5 (m:v).

O tempo de extração foi de 24 h mantendo-se as amostras ao abrigo da luz. Após o período de extração, as amostras foram filtradas a vácuo e, o extrato bruto foi diluído com etanol acidificado. As amostras foram armazenadas no escuro durante 2 h e, o teor de antocianinas foi quantificado por método espectrofotométrico.

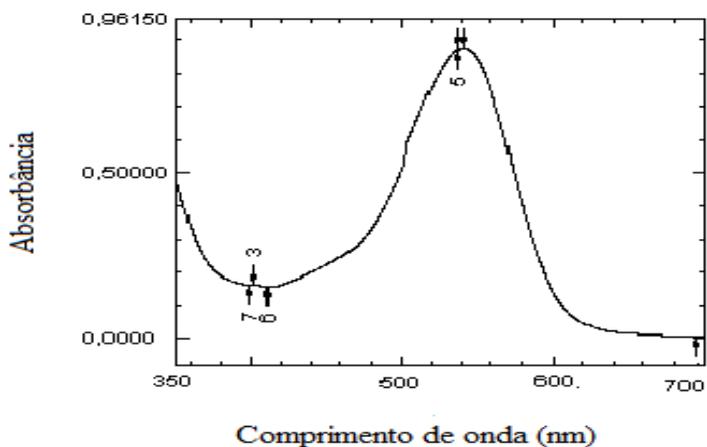
Na Figura 3.7 é possível observar o extrato bruto (borra do vinho tinto) e o extrato etanólico acidificado.

**Figura 3.7** - Matérias-primas utilizadas neste trabalho: a) extrato bruto (borra do vinho tinto Niágara Bordô); b) extrato etanólico acidificado.



Para a quantificação das antocianinas foi determinado o comprimento de onda de máxima absorção e foi realizada uma varredura no comprimento de onda de 350 a 700 nm em espectrofotômetro UV-Visível. O espectro obtido está apresentado na Figura 3.8. Na curva apresentada observa-se que o pico de maior absorção se deu em 520 nm e, este foi o comprimento de onda adotado para a análise das antocianinas totais (AT).

**Figura 3.8** - Espectro de absorbância entre os comprimentos de onda de 350 e 700 nm para a amostra do resíduo da borra do vinho tinto.



O teor de antocianinas foi determinado utilizando a Equação 1 (TEIXEIRA, STRINGHETA e OLIVEIRA, 2008):

$$\text{Teor de ACYS} = \frac{\text{Abs}_{\lambda\text{máx}} * V_{\text{dil.}} * V_{\text{ext.}} * 100}{V_{\text{alíq.}} * m * \frac{E}{10}} \quad (1)$$

Onde:

$\text{Abs}_{\lambda\text{máx}}$  = Absorbância da amostra diluída no comprimento de onda máximo,

$V_{\text{dil.}}$  = Volume final após a diluição [mL],

$V_{\text{ext.}}$  = Volume total do extrato concentrado [mL],

$V_{\text{alíq.}}$  = Volume da alíquota [mL],

$m$  = Massa de amostra utilizada na extração [g],

$E$  = Coeficiente de extinção molar da antocianina majoritária [ $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ].

As constantes 100 e 10 que aparecem na Equação 1 são fatores de correção para que a resposta seja expressa com base em 100 g de amostra.

O conteúdo total de antocianinas foi expresso em mg de cianidina -3-glicosídeo /100g da fração da amostra analisada. De acordo com Francis (1982), quando se desconhece as antocianinas presentes na amostra, é sugerido que se expresse o teor de antocianinas em termos de cianidina-3-glicosídeo que é a antocianina mais abundante da natureza. Foi utilizado o coeficiente de extinção molar ( $E$ ) da cianidina- 3-glicosídeo adotando-se para o método de pH único (pH 1,5) o valor de  $26900 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (JURD e ASEN, 1966). O coeficiente de extinção molar depende não somente da estrutura química do pigmento, mas também do solvente utilizado, preferencialmente o valor utilizado deve ser selecionado de acordo com o sistema de solventes do experimento.

### 3.4.2 Cinética de extração de antocianinas

O objetivo desta etapa é contribuir para uma melhor utilização de energia, tempo e solvente (AMENDOLA *et al.*, 2010). A fim de investigar qual a melhor proporção (massa soluto:volume de solvente) as amostras foram submetidas a extração pelo método do pH único utilizando como solvente extrator etanol-água (70:30) e ácido clorídrico (HCl) suficiente para ajustar o valor do pH do meio em 1,5 na

temperatura de 10 °C. Alíquotas dos extratos submetidos à extração foram retiradas em diferentes intervalos de tempo por 24 h para garantir que todos os compostos de interesse tenham se difundido para a fase aquosa. Após 24 h de extração, o extrato líquido foi filtrado a vácuo. As antocianinas totais foram quantificadas por diluição em solvente etanólico acidificado e submetidas à leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 520 nm.

Os dados experimentais obtidos foram adequados a diferentes modelos cinéticos da literatura para a extração de compostos bioativos (Tabela 3.1) por regressão não linear utilizando o *software Origin 8.5*.

**Tabela 3.1** - Modelos cinéticos de extração de compostos bioativos

Equação	Modelo	Referência *
(2)	$C = C_0 \exp(kt^n)$	Amendola <i>et al.</i> (2010)
(3)	$C = A[1 - \exp(-Bt)] + C[1 - \exp(-Dt)]$	Cacace e Mazza (2003)
(4)	$C = C_\infty - \frac{C_\infty}{\exp(kt + a)}$	Spiro e Jago (1982)
(5)	$C = A - B \exp(-kt)$	Minchev e Minkov (1999)

Fonte: Sant'Anna *et al.* (2011)

\*Estas referências foram citadas por Sant'Anna *et al.* (2011)

Na equação (2)  $C_0$  e  $C$  representam a quantidade de antocianinas totais extraídas (AT) em mg de cyn-3-glu/100 g de amostra no tempo zero e  $t$  (em min), respectivamente, e  $k$  (em min) é a constante de velocidade de extração a uma dada temperatura. A equação (2) é empírica, assumindo que a extração ocorre em uma etapa contínua e  $n$  é um fator de escala da curva da extração. Na Equação 3, a extração dos

compostos acontece em dois períodos diferentes, relacionadas com acessibilidade e inacessibilidade (dentro e fora das células da planta), respectivamente. Os parâmetros B e D são as taxas de extração de duas classes diferentes de compostos A e C são constantes. No modelo proposto por Cacace e Mazza (Equação 3) assume-se que a extração ocorre indefinidamente. Cacace e Mazza (2003) utilizaram esta equação para adequar dados de extração de compostos fenólicos e antocianinas de frutas vermelhas trituradas. O modelo de pseudo-primeira ordem (Equação 4), considera que a concentração do composto nos extratos tende a “plateau” e  $a$  é uma constante de integração do modelo. O modelo proposto por Minchev e Minkov (1999) é uma equação analítica (Equação 5) que tem  $k$  como a taxa constante de extração e  $A$  e  $B$  como constantes (SANT’ANNA *et al.*, 2013).

A escolha do melhor modelo foi baseada na análise do maior coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

### **3.4.3 - Otimização do processo de extração de ACYS – Delineamento experimental**

Para determinar as melhores condições para a extração das antocianinas foi efetuado um planeamento experimental. Primeiramente foram determinados os objetivos do experimento e a seleção das variáveis independentes a serem estudadas e suas respectivas faixas experimentais.

Para o delineamento experimental, foi utilizado o planeamento fatorial completo com pontos centrais. Um planeamento fatorial  $2^3$  com 3 repetições no ponto central foi realizado para avaliar o impacto dos fatores sobre as respostas e posteriormente, definir estratégias futuras de modo a se obter a máxima eficiência no processo de extração.

A matriz do planeamento experimental fatorial com pontos centrais está apresentada na Tabela 3.2. O planeamento fatorial é completo ( $p=0$ ) constituído de  $2^k$  experimentos, sendo,  $k=3$  (variáveis) com três repetições no ponto central e seis pontos axiais ( $\alpha=0$ ), totalizando 17 experimentos.

As condições experimentais selecionadas para este estudo foram: temperatura, concentração de solvente e concentração de HCl. Estas condições foram selecionadas através de estudos prévios (não demonstrados). A faixa de temperatura utilizada foi de 5 a 35 °C, devido à sensibilidade térmica das antocianinas a temperatura máxima de

extração foi de 35 °C. A seleção do solvente foi efetuada com base em uma análise estatística prévia em que foram utilizados como solventes extratores etanol e acetona em diferentes concentrações, sendo que estes apresentaram um efeito negativo em relação aos outros efeitos avaliados, portanto optou-se por utilizar etanol acidificado em diferentes concentrações (LOURENÇO, 2013). Os ensaios foram realizados de forma aleatória, porém, na Tabela 3.3 os ensaios são apresentados de forma ordenada.

O planejamento fatorial 2<sup>3</sup> foi realizado para identificar a relação existente entre a função resposta (teor de antocianinas em mg Cyn-3-glu/100 g de amostra) e as variáveis utilizadas para otimizar o processo de extração. As variáveis independentes temperatura, concentração de solvente e concentração de HCl foram codificadas em três níveis -1, 0 e 1 (Tabela 3.2). Na Tabela 3.3 são apresentados os níveis codificados para cada ponto do planejamento utilizado neste estudo.

**Tabela 3.2** - Valores experimentais e níveis codificados das variáveis independentes usadas no planejamento fatorial 2<sup>3</sup>.

<b>Fator</b>	<b>Símbolo</b>	<b>-<math>\alpha</math></b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>+1</b>	<b>+<math>\alpha</math></b>
Temperatura (°C)	$x_1$	5	5	20	35	35
Concentração de solvente (%)	$x_2$	70	50	70	90	70
Concentração de HCl (N)	$x_3$	1,75	1,0	1,75	2,5	1,75

**Tabela 3.3** - Níveis codificados para cada ponto individual do planejamento 2<sup>3</sup>.

#### **Variáveis Independentes**

<b>Ensaio</b>	<b><math>x_1</math></b>	<b><math>x_2</math></b>	<b><math>x_3</math></b>
1	+1	-1	+1
2	+1	+1	-1
3	+1	+1	+1
4	0	0	0

**Tabela 3.3** - Níveis codificados para cada ponto individual do planejamento 2<sup>3</sup> (continuação).

<b>Variáveis Independentes</b>			
<b>Ensaio</b>	$x_1$	$x_2$	$x_3$
5	-1	-1	+1
6	-1	-1	1,0
7	-1	+1	+1
8	-1	+1	-1
9	+1	-1	-1
10	0	0	0
11	0	0	0
12	-1	0	0
13	+1	0	0
14	0	0	+1
15	0	0	-1
16	0	-1	0
17	0	+1	0

Após a realização dos experimentos descritos na Tabela 3.3 foram selecionados os fatores a serem ajustados a fim de maximizar o teor de antocianinas.

A metodologia de superfície de resposta (MSR) foi utilizada para determinar as condições ótimas de extração de antocianinas da borra do vinho tinto, utilizando delineamento composto central rotacional (DCCR), com os tratamentos realizados em duplicatas, com 3 repetições no ponto central.

O desenho experimental e a análise estatística foram realizados com o auxílio do software Statistica 7.0, Stat Soft, Inc. Tulsa, OK, EUA (licença número 1.02.01.032/6718) (STATISTICA, 2008).

A função resposta obtida foi particionada em componentes lineares, quadráticos e de interação sendo os dados experimentais ajustados num modelo polinomial de segunda ordem (Equação 2):

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j \quad (6)$$

onde:  $Y$  - Resposta do teor de antocianinas no extrato,  $\beta_0$  - é definido como uma constante,  $\beta_i$  - é o coeficiente linear,  $\beta_{ii}$  - é o coeficiente quadrático e  $\beta_{ij}$  - é o coeficiente do produto de interação,  $x_i$  e  $x_j$  - são os níveis das variáveis independentes (fatores),  $k$  - é o número de fatores estudados.

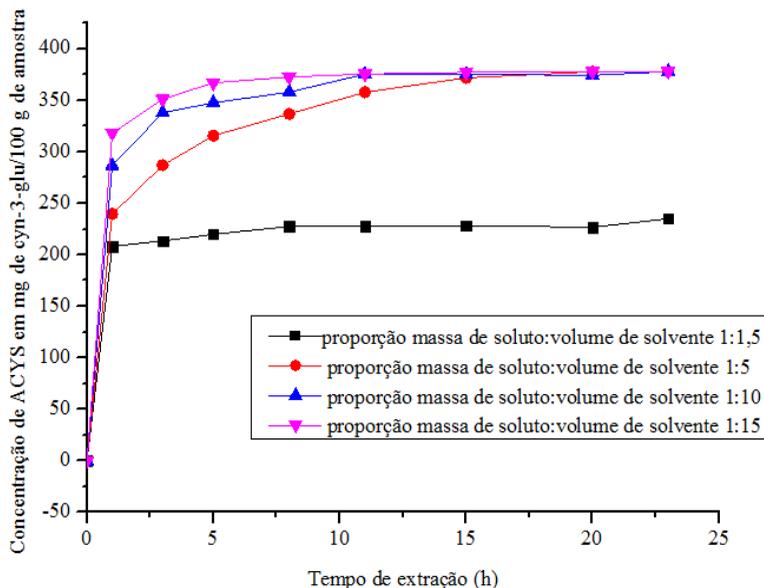
A análise de variância (ANOVA) e os efeitos dos coeficientes de regressão foram determinados a um nível de significância de 5 %. Os dados experimentais foram confrontados com os valores preditos pelo modelo.

### 3.5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.5.1 - Cinética de extração de antocianinas e razão soluto/solvente

O total de antocianinas extraídas utilizando etanol acidificado foi graficado em função do tempo para diferentes razões de soluto/solvente a uma temperatura de 10 °C (Figura 3.9).

**Figura 3.9** – Antocianinas totais extraídas utilizando etanol acidificado em função do tempo para diferentes razões de soluto/solvente a uma temperatura de 10 °C.



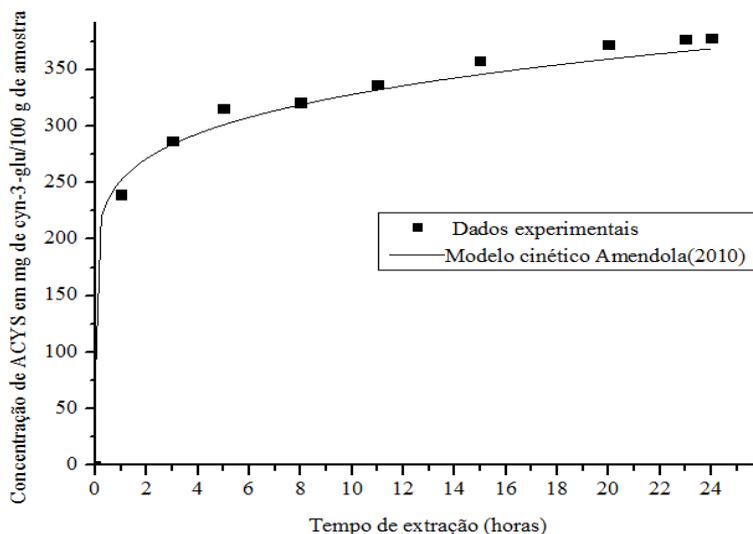
Na Figura 3.9 são apresentadas as curvas de extração obtidas após um tempo de extração de 24 h onde foram retiradas alíquotas em diferentes intervalos de tempo, até atingir uma concentração de equilíbrio. Os tempos para atingir a concentração máxima de ACYS (antocianinas) foram tomados como tempos de equilíbrio.

O principal objetivo para esta cinética de extração de antocianinas foi determinar o tempo de extração e a melhor proporção de massa de soluto:volume de solvente aumentando assim a rendimento de antocianinas totais. Pode-se perceber que após 10 h de extração, o tempo de equilíbrio foi atingindo e o aumento da concentração de antocianinas na solução não foi mais significativa. As razões de soluto/solvente 1/5, 1/10 e 1/15 não apresentaram diferenças significativas na concentração de antocianinas, portanto a razão soluto/solvente escolhida para a otimização do processo de extração foi de 1/5 por ser mais viável quanto ao consumo de solvente e espera-se facilitar o passo seguinte (purificação).

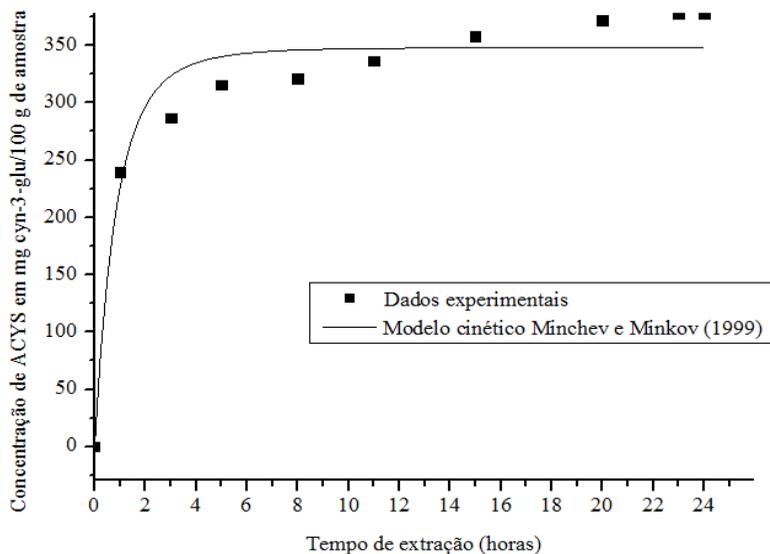
### 3.5.1.1 - Modelagem da cinética de extração

Os dados experimentais obtidos foram ajustados a diferentes modelos cinéticos de extração (item 3.3.2) utilizando o software Origin 8.5. A escolha do melhor modelo foi baseada na análise do maior coeficiente de determinação ( $R^2$ ). As Figuras 3.10 a 3.13 apresentam os dados experimentais comparados com os modelos cinéticos de Amendola (Equação 2), Caccace e Mazza (Equação 3), Spiro e Jago (Equação 4) e Minchev e Minkov (Equação 5).

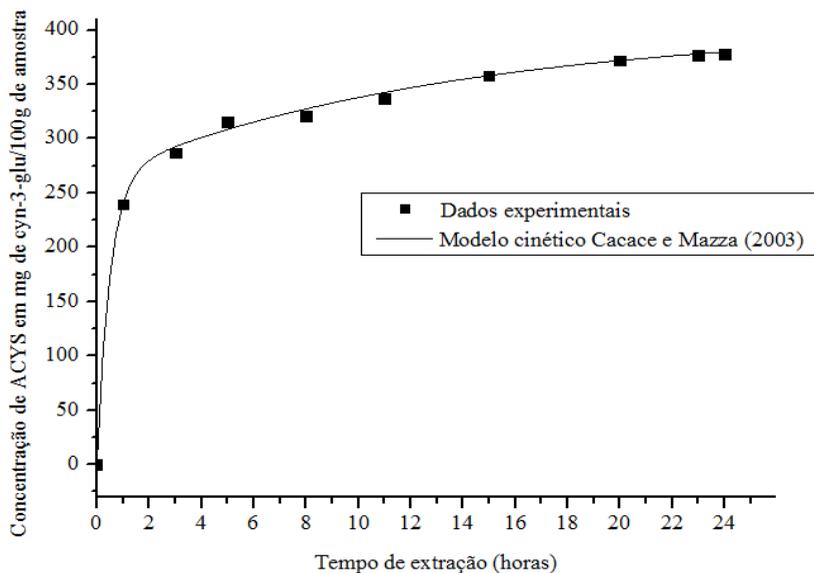
**Figura 3.10** - Comparação dos dados experimentais com o modelo de Amendola.



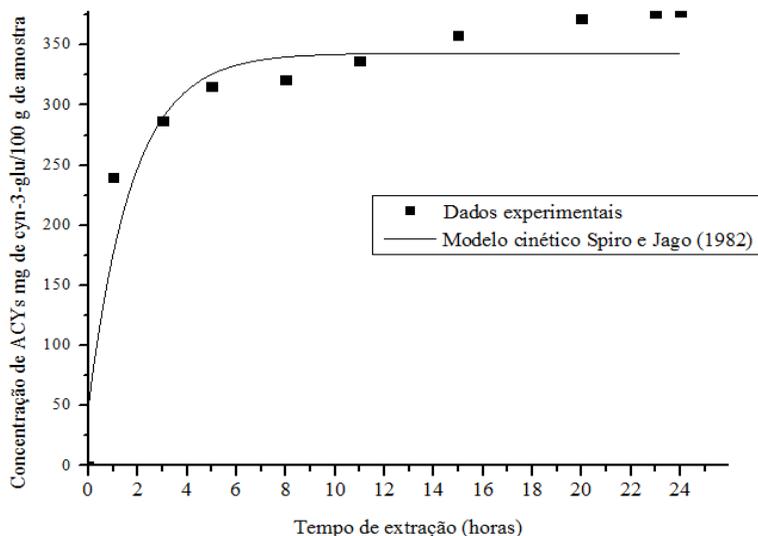
**Figura 3.11** - Comparação dos dados experimentais com o modelo de Minchev e Minkov.



**Figura 3.12** - Comparação dos dados experimentais com o modelo proposto por Cacace e Mazza.



**Figura 3.13** - Comparação dos dados experimentais com o modelo proposto por Spiro e Jago



O modelo cinético de Cacace e Mazza (Figura 3.12) apresentou melhor ajuste aos dados experimentais (Tabela 3.4). Neste modelo proposto a extração acontece em duas taxas, sendo este um modelo exponencial, assintoticamente crescente com o tempo, para um valor máximo, sendo esta uma condição de equilíbrio. Este modelo também considera que a extração ocorre indefinidamente. Como a extração foi realizada em um reator em batelada quanto maior o tempo de residência maior é conversão em produtos o que justifica também a cinética obtida. As constantes dos modelos cinéticos testados são apresentadas na Tabela 3.4.

**Tabela 3.4** - Parâmetros cinéticos obtidos através dos modelos matemáticos estados.

<b>Modelo Cinético</b>	<b>Parâmetros (valor ± erro padrão)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>Amendola et al. (2010)</b> $C = C_0 \exp(k * t^n)$	$C_0 = 219,66 \pm 10,66$ $k = 0,176 \pm 0,046$ $n = 0,363 \pm 0,063$	0,930
<b>Cacace e Mazza (2003)</b> $C = A(1 - \exp(-B * t)) + C(1 - \exp(-D * t))$	$A = 265,55 \pm 10,80$ $B = 2,00 \pm 0,25;$ $C = 136,62 \pm 10,53;$ $D = 0,075 \pm 0,023$	0,998
<b>Minchev e Minkov (1999)</b> $C = A - B \exp(-K * t)$	$A = 349,26 \pm 10,46$ $B = 350,83 \pm 28,83$ $K = 0,196 \pm 0,048$	0,942
<b>Spiro e Jago (1982)</b> $C = C_\infty - \frac{C_\infty}{\exp(k*t+a)}$	$C_\infty = 343,20 \pm 15,70;$ $k = 0,56 \pm 0,20;$ $a = 0,15 \pm 0,12$	0,890

### 3.5.2 - Otimização do processo de extração de ACYS - Determinação do teor de antocianinas no resíduo da borra do vinho tinto

Os valores das variáveis independentes do processo ( $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$ ) considerados bem, como os valores obtidos experimentalmente e, os preditos pelo modelo são apresentados na Tabela 3.5. Os valores experimentais da função resposta foram ajustados a um modelo polinomial de segunda ordem (Equação 7), com as variáveis codificadas, para a predição da resposta:

$$y = 321,93 + 24,00x_1 + 4,23x_2 + 3,56x_3 + 18,39x_1^2 - 32,52x_2^2 - 10,86x_3^2 - 7,94x_1x_2 - 2,43x_1x_3 - 11,29x_2x_3 \quad (7)$$

**Tabela 3.5.-** Valores medidos e preditos do teor de antocianinas totais (AT) determinado para cada ponto individual

Ensaio	Variáveis Independentes			ACYS Totais, em mg de Cianidina-3-glicosídeo/100 g de amostra	
	$x_1$	$x_2$	$x_3$	Valor experimental	Valor predito
1	35 (+1)	50 (-1)	2,5 (+1)	334,98	336,98
2	35 (+1)	90 (+1)	1,0 (-1)	339,80	349,20
3	35 (+1)	90 (+1)	2,5 (+1)	318,92	307,16
4	20 (0)	70 (0)	1,75 (0)	325,76	321,93
5	5 (-1)	50 (-1)	2,5 (+1)	266,78	277,96
6	5 (-1)	50 (-1)	1,0 (-1)	232,31	265,12
7	5 (-1)	90 (+1)	2,5 (+1)	279,94	279,90
8	5 (-1)	90 (+1)	1,0 (-1)	293,20	312,22
9	35 (+1)	50 (-1)	1,0 (-1)	313,23	333,86
10	20 (0)	70 (0)	1,75 (0)	322,60	321,93
11	20 (0)	70 (0)	1,75 (0)	324,60	321,93
12	5 (-1)	70 (0)	1,75 (0)	335,88	316,32
13	35 (+1)	70 (0)	1,75 (0)	341,11	364,32
14	20 (0)	70 (0)	2,5 (+1)	315,60	325,50
15	20 (0)	70 (0)	1,0 (-1)	302,97	329,23
16	20 (0)	50 (-1)	1,75 (0)	308,302	317,61
17	20 (0)	90 (+1)	1,75 (0)	266,931	293,73

Na Tabela 3.5 está apresentada a resposta do planeamento fatorial experimental realizado em termos de mg Cyn-3-glu/100 g de amostra pela Tabela 3.5 verifica-se que a menor concentração de antocianinas foi de 232,3 mg de Cianidina-3-glicosídeo/100 g de amostra obtida no ensaio 6 (pH 1,0, temperatura de 5 °C e concentração de etanol de 50 %). A maior quantidade de antocianinas extraídas foi de 341,1 mg de Cyn-3-glu/100 g de amostra nas condições de pH 1,75, temperatura de 35 °C e concentração de etanol de 70 % obtidas no ensaio 13.

Os ensaios 12 e 13 apresentam uma quantidade de antocianinas muito próxima de 335,8 e 341,1 respectivamente. A diferença entre os dois ensaios está na temperatura de extração que foi de 5 °C e 35 °C para os ensaios 12 e 13 respectivamente. Isto pode ser explicado devido

ao fato de que a quantidade de solvente utilizada e a concentração de ácido favoreceram o processo de extração para a faixa de temperatura avaliada. A temperatura máxima utilizada para a extração das antocianinas no extrato da borra do vinho tinto foi de 35 °C por razões econômicas ou seja, uma extração a 5 °C aumentaria o custo do processo de extração (gastos energéticos).

Na Tabela 3.6 estão apresentadas as Análises de Variância (ANOVA) dos resultados experimentais para as diferentes combinações de temperatura, concentração de solvente e concentração de HCl na quantidade de antocianinas totais extraídas do resíduo da borra do vinho tinto. Nesta Tabela é possível observar que as variáveis independentes (concentração de HCl, concentração de etanol e temperatura) são estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) durante o processo de extração de antocianinas do resíduo da borra do vinho tinto.

**Tabela 3.6.-** Análise de Variância ANOVA

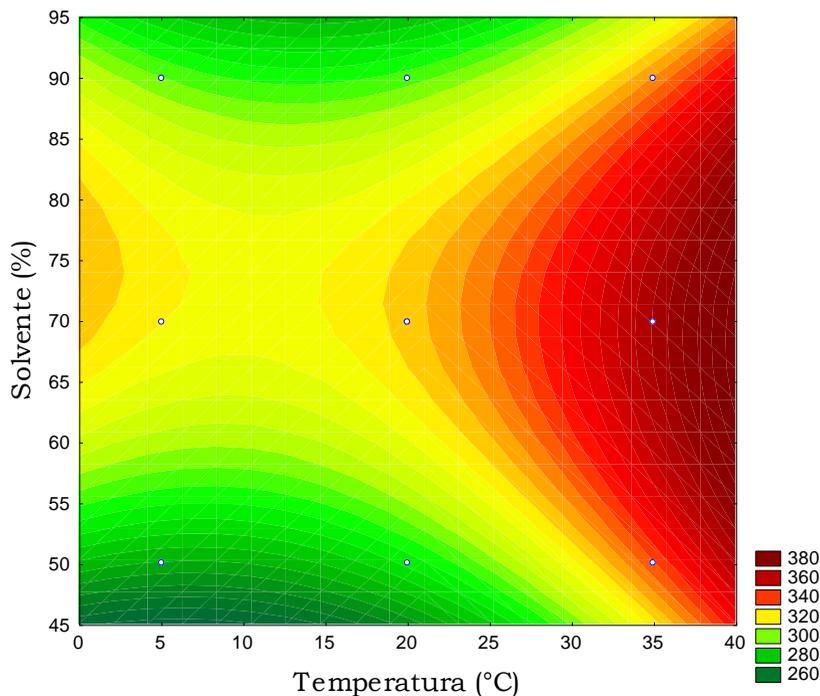
Fator	SQ	GL	Valor de p
(1) temperatura (L)	5756,86	1	0,000446
temperatura (Q)	904,16	1	0,002829
(2) solvente (L)	186,59	1	0,013488
solvente (Q)	2831,69	1	0,000906
(3) HCl (L)	120,33	1	0,020687
HCl (Q)	314,72	1	0,008063
1L com 2L	504,71	1	0,005051
1L com 3L	51,76	1	0,046214
2L com 3L	1020,23	1	0,002508
Total	14758,10	16	-

$$R^2=0,81212$$

SQ – soma dos quadrados; GL – graus de liberdade; L – termo linear; Q - termo quadrático, p – probabilidade.

A superfície de contorno (Figura 3.14) mostra o efeito das variáveis temperatura de extração e concentração de solvente no rendimento de antocianinas totais em mg de cyn-3-glu/100 g de extrato.

**Figura 3.14** - Superfície de contorno para as variáveis testadas na otimização do processo de extração de ACYS.



A superfície de contorno (Figura 3.14) mostra claramente o efeito da temperatura na extração total de ACYS (mg cyn-3-glu/100g de amostra). A temperatura é um fator importante na extração de compostos sensíveis ao calor como é o caso das antocianinas. Com aumento de temperatura, há um aumento na taxa de difusão do solvente intensificando a transferência de massa e auxiliando a extração das antocianinas. Um aumento na temperatura de extração aumenta a cinética de transferência de massa, diminuindo assim o tempo necessário para que se atinja o equilíbrio entre a amostra e a fase extratora (MARTENDAL, 2007).

Neste estudo, a temperatura de extração foi variada de 5 a 35 °C. O efeito da temperatura sobre o rendimento de extração das

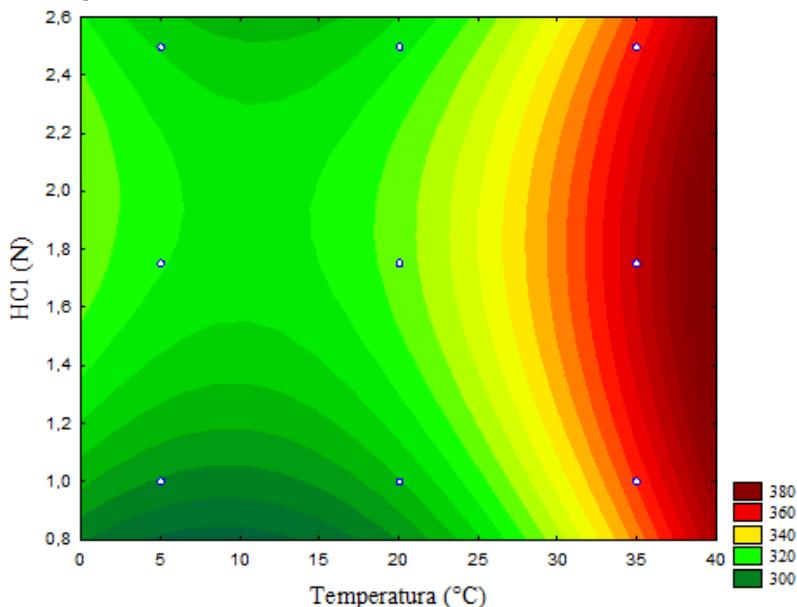
antocianinas aumentou significativamente 232,3 - 339,8 mg cyn-3-glu /100 g de amostra quando a temperatura aumentou de 5 para 35 °C.

Pode-se perceber através da análise estatística que a temperatura aumenta significativamente a extração de antocianinas totais (Figura 3.14), sendo que a temperatura de 35 °C é favorável a extração na faixa de concentração de solvente de 45 a 90 %.

Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com os resultados reportados por Cacace e Mazza (2003) que extraíram antocianinas a partir de groselha preta e observaram que a extração de antocianinas era favorecida pelo aumento de temperatura de 30 à 35 °C, a partir disso, houve degradação dos compostos.

A superfície de contorno (Figura 3.15) mostra a influência da temperatura e da concentração de HCl no rendimento de antocianinas totais.

**Figura 3.15** - Superfície de contorno para os efeitos de concentração de HCl e concentração de solvente no teor de antocianinas extraídas.

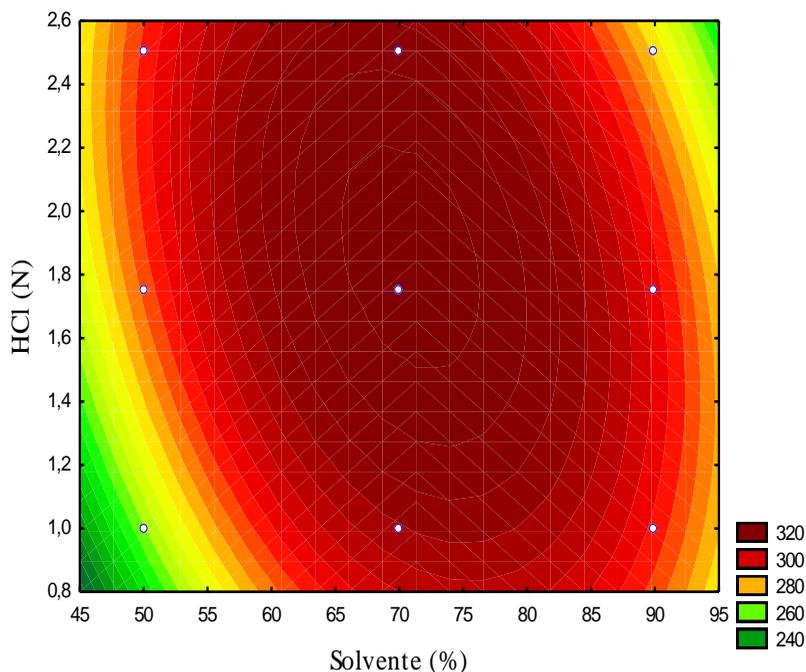


De acordo com a Figura 3.15, a temperatura de 35 °C favorece a extração de ACYS em toda a faixa de concentração de HCl testada.

Na Figura 3.16 os efeitos da concentração de HCl e concentração de solvente são avaliados. De acordo com a superfície de contorno a faixa de concentração de solvente entre 60 e 85 % em

qualquer concentração de HCl é a que apresenta os maiores teores de antocianinas. Esta maior eficiência na extração justifica a utilização, em diversos trabalhos, de solventes hidroalcoólicos metanol e etanol em meio acidificado para a extração de antocianinas de resíduos do processo de vinificação (ROCKENBACH *et al.*, 2008).

**Figura 3.16** – Superfície de contorno para os efeitos de concentração de HCl e concentração de solvente no teor de antocianinas extraídas.



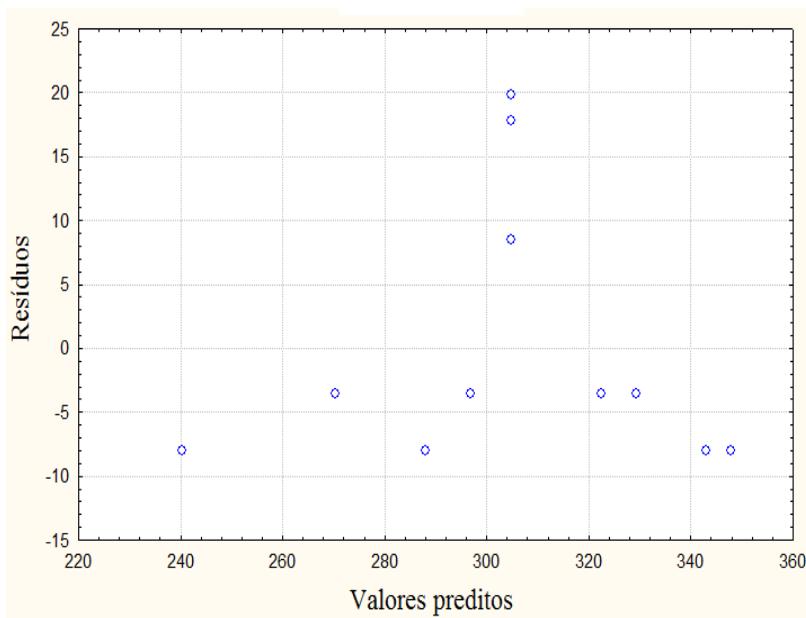
A combinação de água e solventes orgânicos é geralmente a melhor opção para a extração de compostos bioativos. O aumento da concentração de etanol reduz a constante dielétrica do solvente, diminuindo a solvatação das moléculas e com isso, o aumento da sua difusão através da redução da interação com o solvente (CACACE e MAZZA, 2003; SANT'ANNA *et al.*, 2011).

Neste estudo o solvente hidroalcoólico em meio acidificado que apresentou a maior concentração de antocianinas totais expressas em mg de cyn-3-glu/100g de amostra foi de 70 % de etanol e concentração de HCl 1,75 M.

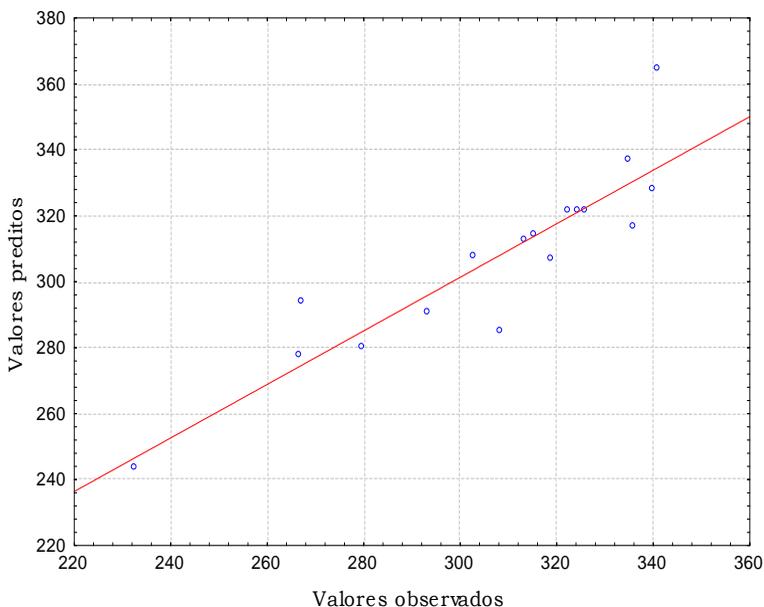
Diversos autores concluíram que não é uma tarefa fácil encontrar um método único que seja adequado para a análise de um grupo diverso de fenólicos devido à diversidade das estruturas químicas e variação de sensibilidade dos compostos às condições de extração (ANTOLOVICH *et al.*, 2000; ROCKENBACK *et al.*, 2008). Portanto, as melhores condições de extração dependem do sistema de solventes empregado, da temperatura de extração utilizada e, principalmente do tipo de amostra que foi empregada e qual a finalidade a que se destina os compostos bioativos extraídos.

A Figura 3.17 mostra a análise dos resíduos; pode-se observar que os dados experimentais seguem uma distribuição normal (Figura 3.18) e que os erros são de natureza aleatória, não havendo tendência alguma.

**Figura 3.17** - Valores preditos *versus* resíduos.



**Figura 3.18** Distribuição dos resíduos em torno da reta normal.



### 3.6 – CONCLUSÕES

O estudo da cinética de extração permitiu identificar a melhor razão massa de soluto/volume de solvente e, o tempo de residência necessário para se atingir a condição de equilíbrio. As melhores condições foram: massa de soluto/volume de solvente de 1/5 e, o tempo necessário para se atingir a condição de equilíbrio foi de 10 h de extração e a razão soluto:solvente escolhida para a otimização do processo de extração foi de 1/5 por ser mais viável quanto ao consumo de solventes. O modelo cinético que melhor se ajustou aos dados experimentais foi o modelo proposto por Cacace e Mazza.

Para a otimização do processo de extração de antocianinas totais as melhores condições dependem do sistema de solventes empregado, da temperatura de extração utilizada e, principalmente do tipo de amostra que foi empregada e, qual a finalidade a que se destina os compostos bioativos extraídos.

Neste estudo foram investigados a influência do pH, concentração de etanol, e a influência da temperatura durante a extração de antocianinas da borra do vinho tinto. Os resultados mostraram que a

temperatura é o fator que mais influência no processo de extração. As melhores condições de extração de antocianinas foram concentração de HCl 1,75 N, extrato hidroalcoólico 70 % e temperatura de 35 °C.

## **CAPÍTULO 4 - PURIFICAÇÃO DO EXTRATO CONCENTRADO DA BORRA DO VINHO TINTO**

Pesquisas sobre o isolamento e preparação de antocianinas se intensificou nos últimos anos por causa das exigências de análises quantitativas de bioativos. Entretanto, métodos simples e eficazes para a purificação em escala de antocianinas de produtos naturais são raramente relatados. Neste estudo, a mistura de antocianinas foi isolada a partir da borra do vinho tinto utilizando uma combinação de extração líquido-líquido e cromatografia em coluna aberta (CCA) estabelecendo um sistema de eluição eficaz para separar as antocianinas. Os resultados deste estudo podem ajudar a promover a purificação de antocianinas da maioria das variedades de uva, bem como de outros materiais vegetais.

### **4.1 - Introdução**

Os baixos percentuais de extração, a instabilidade das antocianinas e as dificuldades na obtenção de padrões dificultam a exploração potencial sobre a bioatividade das antocianinas.

A maioria das pesquisas se limita ao uso de extratos de antocianinas brutos de legumes ou frutas. No entanto, a presença de compostos fenólicos não antociânicos e as impurezas inevitavelmente interferem na avaliação das atividades biológicas dos extratos de antocianinas brutos. Considerando estas questões, o isolamento e preparação de padrões de antocianinas puros de origem vegetal são necessários para quantificações mais precisas. Diversos autores já investigaram as propriedades benéficas das antocianinas. Apesar de seu significativo potencial ativo, no entanto, as antocianinas não têm sido amplamente utilizadas pela indústria alimentícia. (WANG *et al.*, 2014)

Antocianinas são produtos de alto valor agregado (por exemplo, extratos de antocianinas de alta pureza) mas ainda não estão disponíveis no mercado. Assim a preparação de antocianinas puras é um desafio promissor. A purificação das antocianinas foi estudada utilizando uma combinação sistemática de extração líquido-líquido e cromatografia em coluna (CCA).

De um modo geral, pode-se dizer que, a cromatografia líquida e a cromatografia em coluna aberta são as técnicas mais aplicadas, quando os compostos em estudo são moléculas complexas e susceptíveis a degradação por outros procedimentos que envolvam processos de aquecimento (OLIVEIRA, 2005).

A cromatografia em coluna aberta (CCA) tem sido amplamente utilizada para isolar flavonoides, taninos, antocianinas. No entanto, a maior parte dos processos de extração envolvem solventes orgânicos tóxicos, incluindo metanol, acetona, ácido fórmico, ácido acético, ácido trifluoroacético (TFA) e acetonitrila. O presente estudo foi realizado em resposta a questões referentes aos benefícios nutricionais e de saúde dos produtos ricos em compostos bioativos como os da produção vinícola (WANG *et al.*, 2014).

#### **4.1.1 – Objetivo Geral**

O objetivo deste estudo foi desenvolver um método natural e de baixo custo para a purificação de antocianinas usando as técnicas de cromatografia em coluna aberta e extração líquido-líquido.

#### **4.2 - Purificação de antocianinas**

Frequentemente, os aspectos qualitativos e quantitativos na análise de antocianinas são complicados devido à presença de outros compostos. A purificação de antocianinas é necessária porque os solventes utilizados para extração não são específicos para as antocianinas e quantidades consideráveis de outros compostos podem ser extraídas e concentradas nos extratos coloridos influenciando a estabilidade e/ou análise destes pigmentos (JACKMAN e SMITH, 1992).

A variedade e a quantidade de outros compostos dependerão do solvente e das metodologias utilizadas para a sua extração. Portanto, é necessário um pré-fracionamento destes extratos. Quando quantidades apreciáveis de lipídios, clorofilas, ou polifenóis indesejados são suspeitos de estarem presentes nos extratos, estes materiais podem ser removidos por lavagem com éter de petróleo, éter etílico ou acetato de etila (JACKMAN e SMITH, 1992).

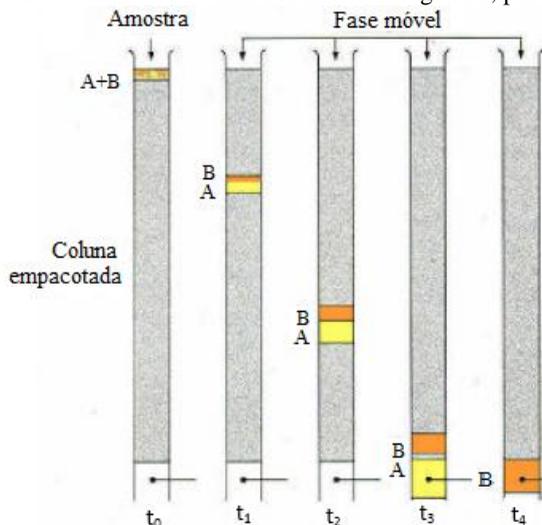
#### **4.2.2 – Purificação em duas etapas extração líquido-líquido (ELL) e cromatografia em coluna aberta (CCA)**

A extração líquido-líquido é uma operação de transferência de massa, em que uma solução líquida (“feed”) inicialmente contendo um ou mais solutos é completamente misturada com um líquido imiscível ou quase imiscível (solvente). O solvente apresenta afinidade

preferencial ou seletividade com um ou mais componentes do alimento (IGNAT *et al.*, 2011).

Normalmente, esse método procede com um fluxo contínuo da fase móvel, que permanece até que todos os componentes da mistura em análise tenham saído da coluna e tenham sido detectados. A Figura 4.1 mostra esquematicamente como duas substâncias A e B podem ser separadas numa coluna por eluição.

**Figura 4.1** Representação esquemática mostrando a separação de uma mistura de componentes A e B através de uma coluna cromatográfica, por eluição.



Fonte: See e Hawkes, 1983.

A eluição envolve o transporte das espécies através da coluna pela adição contínua de fase móvel fresca (fluido de arraste). No instante inicial da análise ( $t = t_0$ ), uma pequena quantidade da amostra, que pode inclusive estar diluída na fase móvel, é introduzida na coluna, no menor intervalo de tempo possível. Conforme são transportados pela fase móvel, que entra de forma contínua na coluna, os componentes A e B da mistura vão se distribuindo ao longo das duas fases, e começa a se acentuar a separação entre os componentes ao longo das fases estacionária e móvel. Com o decorrer do tempo que implica na adição de maiores quantidades de fase móvel, o componente que interage mais fracamente com a fase estacionária vai sendo preferencialmente arrastado pela fase móvel. Isso ocorre porque a velocidade de arraste de

um componente ao longo da coluna depende da fração de tempo que esse componente passa em cada fase: um componente que interage fracamente com a fase fixa, passa pouco tempo ligado à ela, permanecendo a maior parte do tempo na fase móvel. Idealmente, as diferenças entre velocidades de arraste leva à separação dos componentes da mistura em análise em bandas ou zonas da coluna. Com a continuação da passagem de fase móvel, as diferentes bandas vão se movendo ao longo da coluna, até atingir o seu final, onde são coletadas e/ou detectadas (HAWKES, 1983).

### **4.3 – MATERIAIS E MÉTODOS**

Primeiramente o extrato bruto obtido após a etapa de extração foi concentrado em evaporador rotativo a uma temperatura de 37 °C por um período de 5 h e foi utilizado como matéria - prima nesta etapa de purificação.

#### **4.3.1 - Extração líquido – líquido**

Do extrato bruto concentrado, foi retirada uma alíquota que foi diluída em água acidificada (0,02 % HCl v/v) na proporção de 1:2. Depois de diluída, a amostra foi filtrada a vácuo em papel de filtro. O filtrado foi colocado em um funil de separação com 30 mL de acetato de etila e agitado por 2 min. Com a agitação, o soluto passa a fase na qual está o solvente com maior afinidade (fase aquosa). Após este período, a amostra foi deixada em repouso por 10 min para a separação das fases, procedendo com a drenagem da fase aquosa, de modo a remover do extrato aquoso os compostos fenólicos indesejáveis.

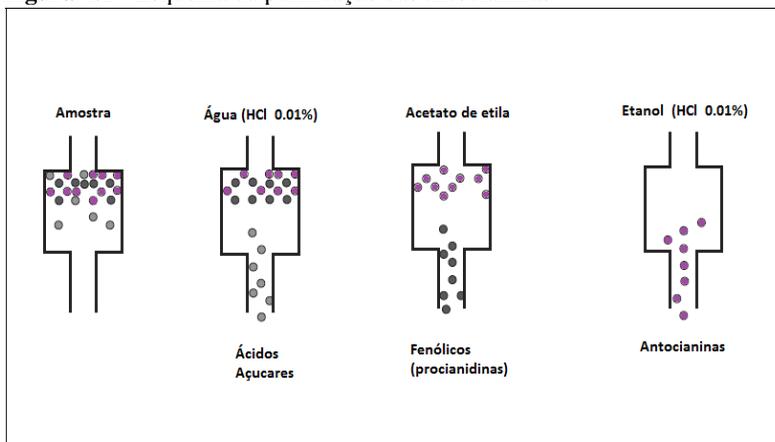
Foram executadas mais extrações a fim de remover maior quantidade dos interferentes. Entretanto percebeu-se que a partir da segunda extração não houve diferenças significativas nos espectros, definindo que apenas uma extração é suficiente para esta etapa.

#### **4.3.2 - Cromatografia em coluna aberta (CCA)**

A fase aquosa foi então eluída em uma coluna cromatográfica contendo sílica gel de tamanho de partícula entre 0,063 – 0,200 mm, (VETEC Química Fina, Brasil) como fase estacionária. Duas fases móveis foram utilizadas: água acidificada (0,02 % HCl v/v) e posteriormente etanol acidificado (0,02 % HCl v/v). As substâncias mais polares que as antocianinas, como açúcares e ácidos orgânicos, são

primeiramente, eluídas quando a fase móvel é água acidificada. Em seguida, as antocianinas são eluídas com solvente alcoólico acidificado (GOUVÊA, 2010). A Figura 4.2 mostra a ordem de eluição dos compostos presentes no extrato bruto.

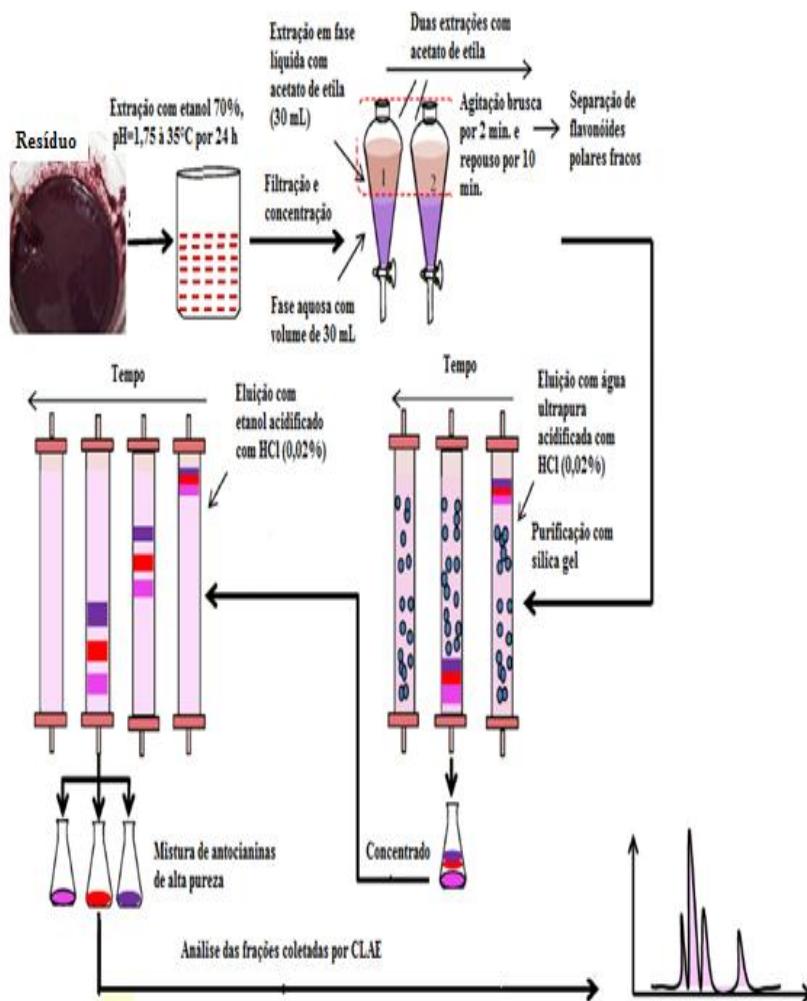
**Figura 4.2** - Esquema da purificação das antocianinas



(Fonte: Rodriguez-Saona e Wrolstad, 2001)

As frações purificadas foram coletadas em frascos de aproximadamente 10 mL e, lidas em espectrofotômetro UV-VIS de modo a ter uma análise prévia da eficiência da purificação. As frações coletadas que apresentaram picos de absorção característicos das antocianinas (496 a 550 nm) foram submetidas às técnicas cromatográficas especiais (cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE) para identificação das suas antocianidinas majoritárias. A Figura 4.3 apresenta um esquema do processo de purificação das antocianinas utilizando a extração em fase líquida combinada com a cromatografia em coluna aberta (CC).

**Figura 4.3** - Esquema do processo de purificação de antocianinas utilizando extração líquido-líquido e cromatografia em coluna aberta.

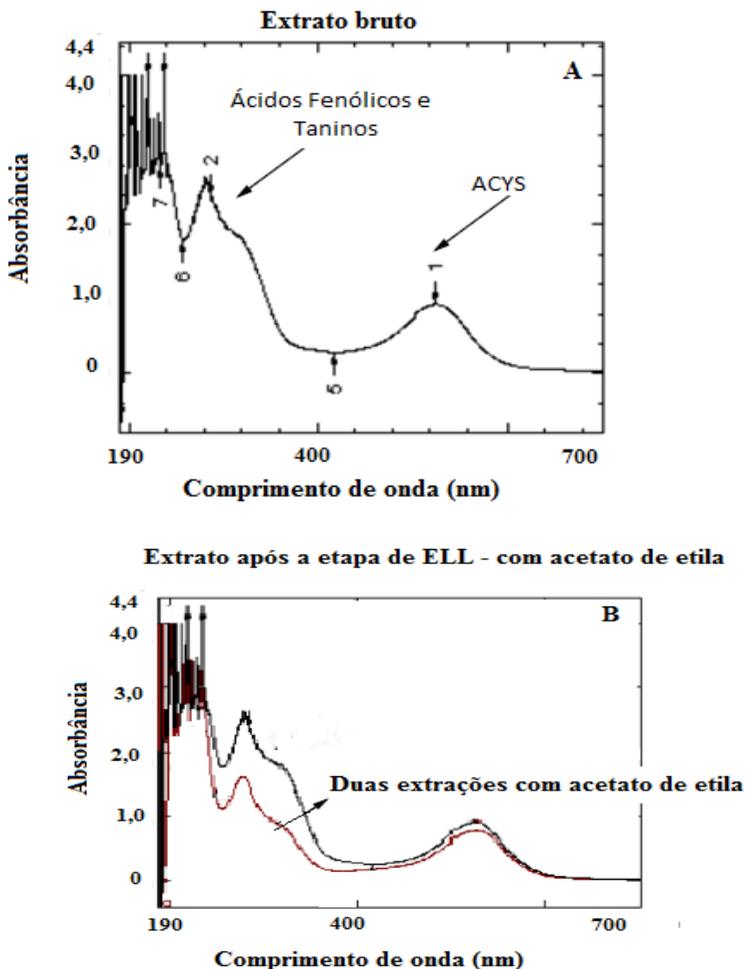


## 4.4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.4.1 - Purificação dos extratos antociânicos através da combinação de extração líquido-líquido (ELL) e cromatografia em coluna aberta (CCA)

A Figura 4.4 apresenta o perfil espectrofotométrico do extrato bruto e do extrato obtido após a etapa de extração líquido-líquido.

Figura 4.4 Espectro dos extratos bruto (A) e do extrato após a extração líquido líquido (B).



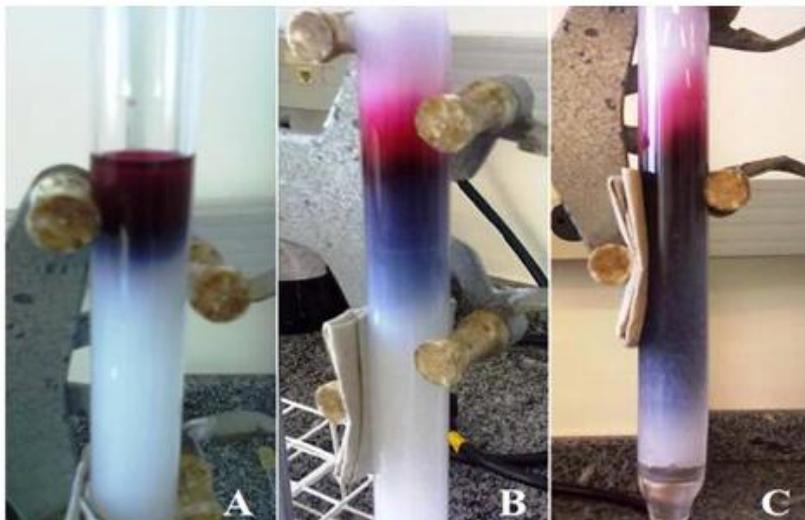
Observa-se pelo comportamento do espectro (Figura 4.4 A), duas regiões distintas, uma na faixa do visível (700 – 350 nm) e outra na faixa UV (350 nm – 190 nm). Na primeira faixa, há um pico bem definido no comprimento de onda de 525 nm correspondendo a região de máxima absorção do cátion flavilium (ponto 1) característico das antocianinas (GIUSTI e WROLSTAD, 2001). Na outra faixa observada, os picos visualizados no espectro são referentes aos compostos de degradação e demais substâncias interferentes (ponto 2). De acordo com Bobbio e Bobbio (1992), as antocianinas e antocianidinas mostram uma absorbância intensa na região compreendida entre os comprimentos de onda de 465 a 550 nm (banda I) e uma absorbância menos intensa na região entre 270 e 280 nm (banda II), sendo os espectros bastante característicos para identificar esses pigmentos, quando puros.

Depois de realizada a extração líquido-líquido utilizando acetato de etila (Figura 4.4 B) pode-se perceber que houve uma diminuição significativa da absorbância na região de 400 nm a 250 nm. Ao mesmo tempo, a região característica das antocianinas (525 nm) não sofreu diminuição significativa de sua banda, sendo que a diferença observada provavelmente é decorrente a erros de manipulação durante a diluição das alíquotas.

A segunda etapa do processo de isolamento de compostos antociânicos foi a purificação com sílica gel. A aplicação da fase aquosa resultante da etapa de extração líquido-líquido foi realizada em uma coluna de vidro de 2 cm de diâmetro interno com suporte poroso na base, contendo sílica gel como fase estacionária, obtendo uma altura de leito equivalente a 10 vezes o seu diâmetro (Figura 4.5 A). Na sequência, foi feita a lavagem da coluna com água acidificada e, nesta etapa os compostos com menor afinidade pela fase estacionária, ou menos adsorvidos, são eluídos (Figura 4.5 B). As antocianinas são fortemente adsorvidas na fase estacionária por suas hidroxilas não substituídas (Costa et al., 2000). Por fim, a eluição da fração das antocianinas, foi realizada com etanol acidificado (Figura 4.5 C).

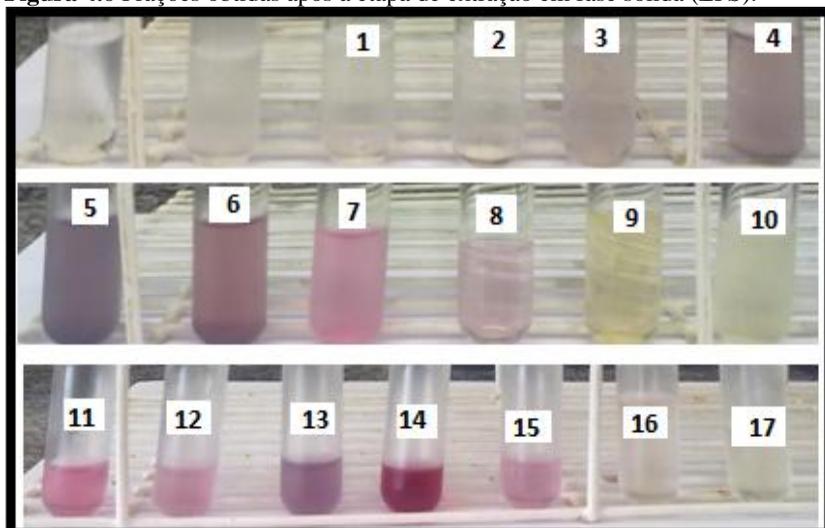
A Figura 4.5 apresenta o perfil da eluição da amostra com solventes de diferentes polaridades descritos no item 4.3.2.

**Figura 4.5** Cromatografia por coluna com sílica gel. A: momento de aplicação do extrato obtido após a extração líquido-líquido; B: eluição do extrato através da coluna com água acidificada; C: desenvolvimento da eluição com etanol acidificado.



As frações obtidas após a etapa de purificação em coluna cromatográfica aberta (CCA) são apresentadas na Figura 4.6.

**Figura 4.6** Frações obtidas após a etapa de extração em fase sólida (EFS).



Muita informação pode ser conseguida pela simples observação da cor do pigmento em meio aquoso. As antocianinas e antocianidinas existem em fase aquosa como uma mistura de 4 espécies moleculares; a concentração de cada uma delas depende do pH do meio. Em soluções em que o pH varia de 1 a 3, o cátion flavílio é a espécie dominante responsável pela coloração vermelha (Figura 4.6; frações 7, 11, 12, 14 e 15) em valores de pH de 4 a 5, as espécies principais são a chalcona e o hemiacetal, formas geralmente menos coloridas (Figura 4.6, frações 9 e 10), e de 6 a 7, a forma predominante é a base quinoidal, cuja coloração varia do azul ao violeta (Figura 4.6; frações 4,5 e 6 e 13).

A cor geralmente muda do vermelho para o azulado (violeta), enquanto segue a ordem das estruturas pelargonidina, cianidina, peonidina, malvidina, petunidina e delphinidina.

A presença de antocianidinas nas frações purificadas será determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

#### **4.5 – CONCLUSÕES**

No presente estudo, a combinação sistemática de extração líquido-líquido e cromatografia em coluna aberta (CCA) utilizando água ultrapura acidificada (HCl 0,02 %) e etanol acidificado (HCl 0,02 %) mostrou-se um método simples e efetivo no fracionamento de antocianinas.

Foram coletadas 17 frações após a etapa de purificação. A identificação destes compostos será confirmada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Etanol, acetato de etila e HCl mostraram-se adequados para a extração e purificação de antocianinas e, podem servir como substitutos para o metanol, que é um solvente tóxico, acetona e ácido trifluoroacético (TFA).

# **CAPÍTULO 5 - SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO POR Cromatografia líquida de alta eficiência das ANTOCIANIDINAS PRESENTES NO EXTRATO CONCENTRADO E PURIFICADO**

## **5.1 - Introdução**

Dois métodos são utilizados para a quantificação das antocianinas: pH diferencial e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O primeiro é um método espectrofotométrico mais simples rápido e barato, porém com pouca sensibilidade para baixas concentrações. A cromatografia, apesar de ser uma técnica mais precisa e cara é o método mais utilizado devido a sua facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação das espécies químicas presentes em uma amostra, mesmo em misturas mais complexas (KECHINSKI, 2011).

Na literatura dois métodos existem basicamente para a separação e identificação de antocianinas das próprias antocianinas e das antocianidinas. Existem mais de 600 antocianinas identificadas na natureza e, para uma razoável caracterização, seria necessária a aquisição de um grande número de padrões. As antocianidinas são as agliconas obtidas a partir do isolamento das antocianinas, ou seja, as antocianinas sem a ligação com os açúcares; dentre as encontradas na natureza, apenas seis estão presentes em alimentos: pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina. Elas diferem entre si quanto ao número de hidroxilas e grau de metilação, presentes no anel B. Desta forma, o número de antocianinas para a análise pode ser reduzido.

O interesse por esses pigmentos se intensificou uma vez que pesquisas têm demonstrado que as antocianinas e suas respectivas agliconas são compostos bioativos e que, entre os vários outros efeitos fisiológicos, possuem capacidade antioxidante. Zhang, Vareed e Nair (2005) constataram o efeito inibitório da cianidina, da delphinidina, da pelargonidina, da petunidina e malvidina na proliferação de células humanas cancerígenas, originadas em diferentes partes do corpo: estômago, cólon, mama, pulmão e sistema nervoso central (LIMA, 2006). Conforme apresentado nos capítulos anteriores, o resíduo da borra do vinho tinto é uma fonte alternativa de compostos antocianínicos; portanto é importante conhecer a distribuição e a estrutura química das antocianidinas presentes neste extrato ainda pouco explorado.

### 5.1.1 – Objetivo geral

O objetivo deste capítulo é identificar as antocianinas presentes no extrato bruto da borra do vinho tinto e das frações purificadas do extrato através cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando padrões externos de alta pureza.

## 5.2 - Separação e identificação de antocianinas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Perfis de antocianinas são distintos para diferentes frutas, com alguma variação que também depende da espécie da amostra analisada. Cromatografia líquida de fase reversa associada a detecção de arranjo de diodos tem sido a ferramenta mais utilizada para a identificação e quantificação de antocianinas.

A identificação de antocianinas em alimentos e plantas pode ser realizada utilizando procedimentos de comparação direta, quando há disponibilidade de padrões, e de comparação indireta, quando não for possível utilizar padrões (MARÇO, POPPI e SCARMINIO, 2008).

As antocianinas podem ser separadas por sua polaridade, o que as confere tempos de retenção diferentes.

A quantificação das antocianinas pode ser realizada pela comparação com um padrão externo. Contudo, quando se usa somente um padrão analítico para quantificar diferentes antocianinas presentes na amostra, normalmente a cianidina-3-glicosídeo, as concentrações reportadas podem ser inferiores às reais (HONG e WROLSTAD, 1990; FRANCIS, 1982). No entanto, a CLAE pode resultar em uma subestimação da quantidade de antocianinas presentes em amostras que contêm diferentes antocianinas glicosídeos quando se utiliza um padrão para quantificação.

A soma da área do pico em um determinado comprimento de onda (por exemplo 520 nm) é usado ao quantificar antocianinas por CLAE, que é geralmente próximo dos comprimentos de onda máximos das antocianinas individuais.

Numerosos estudos têm demonstrado que o comprimento de onda máximo se desloca dependendo dos cromóforos das antocianinas (LEE *et al.*, 2008).

Dois métodos analíticos para separação de antocianinas por cromatografia líquida de alta eficiência são usualmente utilizados: um método básico e outro alternativo. O método básico tem um tempo de

análise mais curta e é apropriado para matrizes contendo antocianinas glicosiladas, enquanto o alternativo é mais longo e mais apropriado para matrizes mais complexas, antocianinas aciladas. Além disto, alguns processos auxiliares são úteis para caracterização dos picos de antocianinas desconhecidas. O primeiro destes simplifica o cromatograma através de uma hidrólise ácida removendo, assim, o grupo (s) de açúcares acilados ligados a antocianina para formar uma antocianidina (aglicona). Existem apenas seis antocianidinas que ocorrem na natureza, de modo que o cromatograma pode ser simplificado por este tratamento. A hidrólise ácida também pode ajudar a confirmar a identidade dos compostos de origem por identificação da sua aglicona (antocianidina). Também se pode utilizar a saponificação por base para remover os grupos acilados que podem estar ligados a algumas antocianinas. Este procedimento pode ser frequentemente utilizado antes ou em conjunto com hidrólise ácida para caracterizar mais completamente um determinado composto (DURST e WROLSTAD, 1994).

Para uma identificação mais completa pode-se utilizar técnicas adicionais como a espectroscopia de massa (EM) e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) para a determinação da massa molecular, a natureza das ligações glicosídicas, os sítios de acilação e de substituição do açúcar (GIUSTI *et al.*, 1999). Os perfis obtidos são úteis para a identificação das espécies, variedades e para a avaliação de produtos comerciais de qualidade.

Rosso *et al.* (2008) utilizaram a técnica de CLAE acoplada ao detector de arranjo de diodos e a EM, para determinar o perfil antociânico de amostras de acerola e açaí, conseguindo identificar suas ACYS majoritárias.

Revilla *et al.* (2001) identificaram as ACYS presentes em extratos de bagaço de uvas e em vinhos tintos, onde a combinação das técnicas de CLAE acopladas a EM demonstraram ser essenciais para a identificação destes compostos.

Nos casos em que não há a possibilidade de se empregar padrões de ACYS, sugere-se substituí-los por sucos ou extratos de frutas, para servirem como referência para os tempos de retenção. Um bom exemplo é o suco de uva Concord, onde há a presença de sete diferentes ACYS, que cobrem a gama de tempos de retenção para a maioria das faixas de interesse (DURST e WROLSTAD, 1994).

Devido à dificuldade de obtenção e ao elevado preço de padrões de antocianinas, Goiffon e colaboradores (1999), descreveram um método utilizando HPLC para identificar estes pigmentos.

Tal método consiste na comparação de fatores de retardamento das antocianinas que se deseja identificar com àquele referente à cianidina 3-glicosídeo, pigmento presente em praticamente todas as frutas vermelhas (CAMPOS, 2006).

### 5.3 - MATERIAIS E MÉTODOS

#### 5.3.1 - Preparação das curvas de calibração dos padrões de antocianidinas

Para a construção das curvas de calibração foram adquiridos dois padrões de antocianidinas - o cloreto de cianidina e cloreto de malvidina (empresa Sigma Aldrich) com 99 % de pureza. Os padrões foram solubilizados em etanol acidificado com 0,1 % HCl v/v em diferentes concentrações (10, 25, 50, 75 e 100 mg.L<sup>-1</sup>) e lidos em espectrofotômetro no comprimento de onda de 190 a 700 nm.

#### 5.3.2 - Separação das antocianidinas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O extrato bruto e as frações obtidas na etapa de purificação foram analisadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) segundo o método descrito por Durst e Wrolstad (1994), utilizando um cromatógrafo modelo Ultimate 3000 (Dionex) com detector de arranjo de diodo (*Diode Array Detector*). A separação foi realizada através de uma coluna C<sub>18</sub> de 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno com partículas de 5 µm de diâmetro médio.

O comprimento de onda foi ajustado para 520 nm. A temperatura foi de 25 °C e a vazão foi ajustada para 1 mL.min<sup>-1</sup>. Para a eluição, foi utilizada uma alimentação em gradiente. As soluções utilizadas e as suas composições são apresentadas na Tabela 5.1.

**Tabela 5.1.-** Gradiente de eluição e tempo para a separação das antocianidinas.

Tempo (min)	Solvente A* (%)	Solvente B** (%)
0	5	95
20	20	80
25	5	95

\*Solvente A é acetonitrila (CH<sub>3</sub>CN, grau HPLC); \*\*Solvente B é ácido acético (10 %), acetonitrila (5 % v/v) e ácido fosfórico (1 %) em água Mili Q.

Os padrões de antocianidinas foram injetados no cromatógrafo nas mesmas condições de eluição das frações obtidas do extrato.

As antocianidinas foram identificadas a partir da comparação dos tempos de retenção dos padrões e quantificadas através de curvas de calibração do padrão externo de cloreto de malvidina e cloreto de cianidina.

## **5.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.4.1 - Curva de calibração com padrões de antocianidinas**

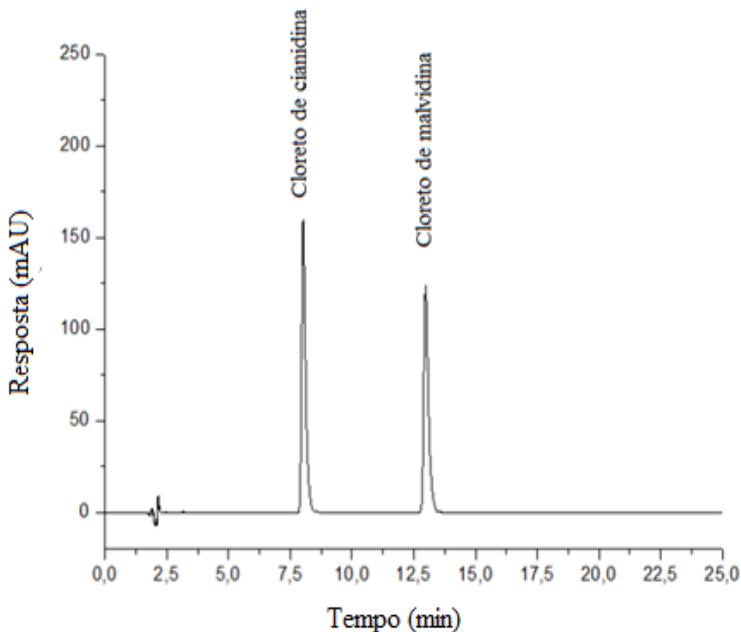
Após a preparação das curvas de calibração dos padrões de cloreto de cianidina e cloreto de malvidina as soluções foram injetadas separadamente no cromatógrafo líquido de alta eficiência sob as condições descritas no item 5.3.1.

As curvas de calibração apresentaram comportamento linear com um coeficiente de determinação  $R^2$  de 0,999 e 0,995 para o cloreto de cianidina e cloreto de malvidina, respectivamente (Apêndice A).

### **5.4.2 - Identificação das antocianidinas por cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE do extrato bruto e das frações obtidas após a etapa de purificação**

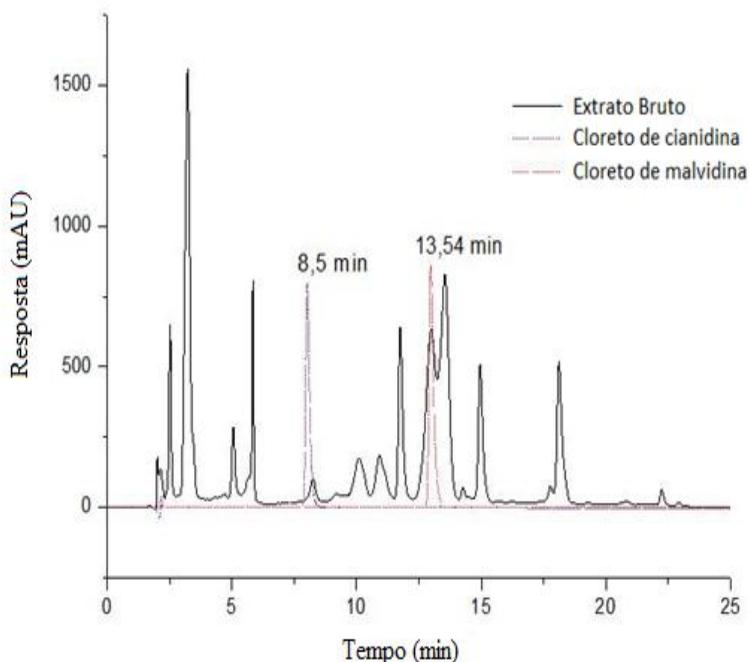
Os perfis cromatográficos de cada padrão bem como os seus tempos de retenção são apresentados na Figura 5.1. Através do cromatograma, é possível confirmar a pureza dos padrões, uma vez que não foi observada nenhuma alteração em suas bandas

**Figura 5.1** - Perfil cromatográfico obtido por CLAE dos padrões de antocianidina cloreto de cianidina e cloreto de malvidina.



Os tempos de retenção do cloreto de cianidina e cloreto de malvidina são de 8,5 e 13,54 min, respectivamente. Valores muito próximos aos encontrados neste trabalho foram reportados por Kechinski (2011) que foram de 9,56 min para o cloreto de cianidina e 15,28 min para o cloreto de malvidina. Esta diferença no tempo de retenção dos padrões pode ser justificada devido ao fato que derivados de antocianidinas individuais respondem de forma diferente dependendo das condições utilizadas na análise, do grau de acilação, grau de glicosilação, diferentes ácidos, comprimento de absorção máximo e do efeito do solvente. Estes parâmetros podem influenciar no gradiente de eluição promovendo a variação da resposta das antocianidinas individuais (DURST e WROLSTAD, 2005; FRANCIS, 1982; GIUSTI e WROLSTAD, 2005; HONG e WROLSTAD, 1990, LEE, 2008). A Figura 5.2 apresenta o cromatograma do extrato bruto concentrado.

**Figura 5.2** - Perfil cromatográfico obtido por CLAE das antocianidinas presentes no extrato bruto concentrado.



A partir do cromatograma obtido pode-se observar que foram identificadas na amostra do extrato bruto duas antocianidinas: o cloreto de malvidina ( $t_R=13,54$  min) e o cloreto de cianidina ( $t_R=8,5$  min). Segundo Takedoa e Dao (2008), a ordem de eluição deve ser do composto mais simples, a pelargonidina que apresenta hidrogênio nos radicais  $R_1$  e  $R_2$  para o composto mais complexo a malvidina que apresenta o radical metoxi ( $OCH_3$ ) nas mesmas posições  $R_1$  e  $R_2$ .

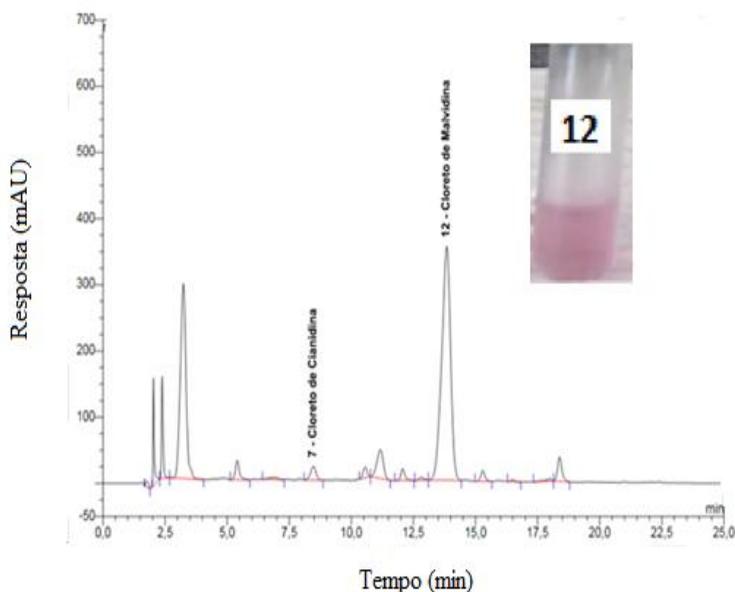
De acordo com Lee *et al* (2008) as amostras de uvas contêm sempre malvidina.

Pesquisas realizadas por Longo e Vasapollo (2005) e por Kallithraka *et al.* (2005), em uvas mostraram que os picos referentes às antocianinas aciladas foram os últimos a serem eluídos e que os picos referentes aos glicosídeos de delphinidina, cianidina, petunidina e malvidina foram eluídos antes de 13 min, o que está de acordo com o obtido neste estudo que obteve para o cloreto de malvidina um tempo de retenção de 13,54 min.

Os resultados encontrados por POMAR, NOVO e MASA, (2005) estão de acordo com os encontrados neste estudo. Os autores observaram que a malvidina foi a antocianina encontrada em maior proporção ao avaliarem 50 variedades de *Vitis vinifera*. Da mesma forma, em outro estudo de cultivares de *Vitis vinifera*, a malvidina representou cerca de 67 % do total de antocianinas, seguida pela peonidina, petunidina e delfinidina, sendo a cianidina a menos abundante. Em nosso estudo as antocianidinas identificadas através de padrões primários no extrato bruto foram: o cloreto de cianidina e cloreto de malvidina. A proporção presente de cloreto de malvidina:cloreto de cianidina foi de 7:1, sendo que o cloreto de malvidina representou 22,6 % do total de antocianidinas presentes no extrato.

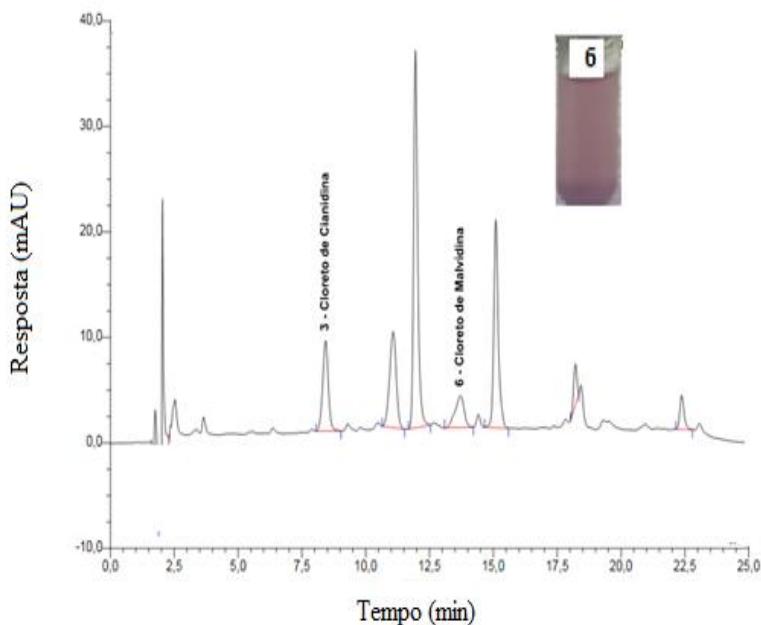
As Figuras 5.3, 5.4 e 5.5 apresentam alguns dos perfis cromatográficos mais representativos das 17 frações obtidas após a etapa de purificação por extração líquido-líquido (ELL) e cromatografia em coluna aberta (CCA). O restante destes perfis está anexado ao Apêndice A.

**Figura 5.3** - Perfil cromatográfico obtido por CLAE das antocianidinas presentes na fração purificada (F12) do extrato da borra do vinho. Condições cromatográficas: as mesmas descritas na Tabela 5.1.



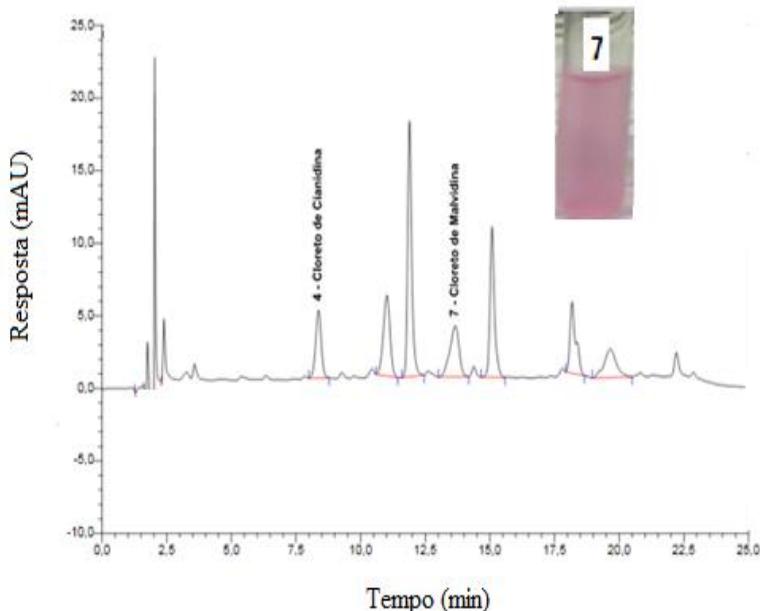
A fração F12 obtida após a etapa de purificação descrita no item 4.3.2 apresentou um percentual em área de cloreto de malvidina de 76,47 % e de 10,85 % de cloreto de cianidina. Comparando os cromatogramas, antes da purificação (extrato bruto) e da fração F12, obtida após a purificação, pode-se constatar que, para o extrato em estudo, o tempo utilizado foi efetivo para obter apenas as antocianidinas. Também confirmou-se a presença de pigmentos glicosilados na medida em que os picos presentes nos cromatogramas das antocianinas desapareceram após a purificação.

**Figura 5.4** - Perfil cromatográfico obtido por CLAE das antocianidinas presentes na fração purificada (F6) do extrato da borra do vinho. Condições cromatográficas: As mesmas descritas na Tabela 5.1.



Na Figura 5.4 foi uma das primeiras a ser eluída (F6) pode-se constatar um maior percentual em área do cloreto de cianidina 56,5 % e de 31,7 % de cloreto de malvidina, confirmando que a ordem de eluição das antocianidinas que é primeiramente a delphinidina, seguida de cianidina, petunidina, pelargonidina, peonidina e malvidina.

**Figura 5.5** - Perfil cromatográfico obtido por CLAE das antocianidinas presentes na fração purificada (F7) do extrato da borra do vinho. Condições cromatográficas: As mesmas descritas na Tabela 5.1



Na Figura 5.5 pode-se perceber que o pico referente ao cloreto de cianidina começa a desaparecer e o pico do cloreto de malvidina começa a se tornar mais acentuado.

De acordo com o cromatograma do extrato bruto (Figura 5.2) e das frações obtidas após a etapa de purificação pode-se perceber que a extração líquido-líquido seguida da purificação por cromatografia em coluna aberta contribuiu para a obtenção de frações com um teor de pureza satisfatório.

A separação das antocianidinas nas frações obtidas poderia ser melhorada se fossem efetuadas modificações na coluna cromatográfica aberta, utilizada na etapa de purificação, como: aumento da altura do leito, tempo de análise maior, e se as frações obtidas na primeira eluição com água acidificada 0,02 % de HCl tivessem sido coletadas e repassadas na coluna com etanol acidificado 0,02 %. Na Tabela 5.2 são apresentadas as concentrações em mg/L do cloreto de cianidina e cloreto de malvidina presentes no extrato concentrado e nas frações obtidas após a etapa de purificação.

**Tabela 5.2** - Concentração de antocianinas no extrato bruto e nas frações obtidas após a etapa de purificação.

<b>Amostra</b>	<b>Concentração em mg/L de cloreto de cianidina</b>	<b>Concentração em mg/L de cloreto de malvidina</b>
Extrato concentrado	0,0015	2,165
F5	0,0001	0,0013
F6	0,0003	0,0041
F7	0,0001	0,0049
F8	0,0001	0,011
F9	0,0001	0,0255
F10	0,0001	0,0614
F11	0,0001	0,2471
F12	0,0005	0,4923
F13	0,0008	0,488
F14	0,0004	0,2941
F15	0,0002	0,1506
F16	0,0001	0,0642
F17	0,0001	0,0298

Pode-se perceber que no extrato bruto e no extrato purificado (Tabela 5.2) foram identificadas quantidades de antocianidinas sendo que a que se apresenta em maior quantidade é o cloreto de malvidina. De acordo com Cabrita *et al.* (2003), as antocianinas do gênero *Vitis* são a cianidina, a delfinidina, a peonidina, a petunidina e a malvidina. As suas quantidades relativas variam com a casta, mas a malvidina é sempre majoritária o que é corroborado pelos resultados obtidos.

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 5.2) o extrato bruto apresenta 2,165 mg/L de cloreto de malvidina e a fração F12, a concentração de cloreto de malvidina foi de 0,492 mg/L (que corresponde a aproximadamente 22,78 % do total encontrado no extrato bruto) comparando estes resultados com o custo de 1 mg do padrão primário cloreto de malvidina (R\$ 567,00; Nota Fiscal: 8202142833) o extrato da borra do vinho tinto é uma fonte promissora na exploração de compostos bioativos como as antocianidinas. Também se pode concluir que a etapa de purificação auxiliou na obtenção de compostos com elevado grau de pureza.

## 5.5 – CONCLUSÕES

Neste trabalho foi utilizado um método analítico para a caracterização do extrato etanólico rico em antocianidinas obtido a partir da borra do vinho tinto.

A metodologia analítica proposta para a separação e identificação das antocianidinas por CLAE juntamente com a prévia purificação do extrato por extração líquido-líquido e cromatografia em coluna aberta mostrou-se sensível e precisa na faixa de concentrações estudada, sendo adequada para a avaliação de antocianidinas em extratos vegetais.

Além disto as condições de extração utilizadas promoveram a hidrólise ácida das antocianinas reduzindo assim o número de compostos a serem identificados para apenas seis (antocianidinas), facilitando assim a caracterização do extrato.

Os picos referentes às agliconas testadas apresentaram-se bem definidos, separados, e com um tempo de análise relativamente curto (25 min) sendo que a ordem de eluição encontrada foi cloreto de cianidina e cloreto de malvidina.

No geral, observa-se que uma das maiores dificuldades na identificação das antocianinas individuais é a falta de padrões e que a escolha do método a ser utilizado depende do objetivo da análise. Para a detecção da presença de antocianinas em um vegetal, um simples teste utilizando-se cromatografia em papel pode ser suficiente. Métodos ópticos como UV-Vis são ferramentas complementares muito úteis para a caracterização de antocianinas. Identificações de antocianinas individuais exigem métodos mais avançados como espectroscopia RMN e espectrometria de massas. A combinação destas técnicas pode trazer informações suficientes para a completa elucidação da estrutura de uma antocianina.

## **CAPÍTULO 6 – MICROPARTÍCULAS EM ANTOCIANINAS EXTRAÍDAS DA BORRA DO VINHO TINTO UTILIZANDO O MÉTODO DA EMULSIFICAÇÃO/GELIFICAÇÃO TÉRMICA COM PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE**

No Capítulo 3 obteve-se o extrato etanólico a partir da borra do vinho tinto rico em antocianinas e compostos antioxidantes. A utilização deste extrato na indústria farmacêutica, alimentos e de cosméticos, é limitada devido a baixa estabilidade das antocianinas frente a fatores como pH, temperatura, luz, presença de oxigênio, degradação enzimática, ácido ascórbico, íons metálicos, açúcares e copigmentos. A microencapsulação é uma possibilidade promissora para a estabilização de antocianinas. A fim de preservar as antocianinas destes extratos foi utilizado o método de microencapsulação por emulsificação/gelificação térmica utilizando proteínas do soro do leite.

A microencapsulação/gelificação térmica foi realizada a temperatura de 80 °C. A capacidade antioxidante determinada no Capítulo 2 permitiu utilizar este método para a microencapsulação sem que se tenha perda da capacidade antioxidante do extrato.

Outro fator que deve ser considerado é que o extrato bruto concentrado utilizado na encapsulação foi obtido através de solvente hidroalcoólico acidificado. O pH final da solução foi de 1,75. Uma característica marcante das antocianinas está no fato de que em soluções aquosas, elas apresentam diferentes estruturas em função do pH. De um modo geral, em meio extremamente ácido (pH entre 1-2), as antocianinas apresentam coloração intensamente avermelhada devido ao predomínio da forma cátion flavílico ( $AH^+$ ) que é mais estável que as outras estruturas.

A antocianina encapsulada pode apresentar aplicabilidade em diferentes áreas da indústria, podendo atuar como aditivo e corante natural, substância funcional, preservar ou mascarar a cor, melhorar a qualidade nutricional entre outras aplicações (KECHINISKI, 2011).

Neste capítulo é apresentado um procedimento para preparar micropartículas de proteínas isoladas do soro do leite em diferentes concentrações. Partículas de proteína foram formadas pela emulsificação das proteínas isoladas do soro do leite (WPI) em óleo de girassol com e sem a presença de span 80 como emulsificante solúvel na fase oleosa. Esta emulsão (A/O) foi aquecida para induzir a gelificação das proteínas isoladas do soro do leite, o óleo foi removido por centrifugação. O diâmetro médio das partículas foi da ordem de 37,04 µm. As micrografias das partículas revelaram que a proteína está

distribuída por todas as partículas e que há óleo associado com as partículas, ou em torno das partículas e/ou distribuída nas partículas.

## 6.1 – Introdução

Um grande número de compostos fenólicos de origem natural são interessantes quanto às suas propriedades. No entanto, na sua forma livre, eles podem apresentar solubilidade e estabilidade limitada. Além disso, muitos destes compostos têm um gosto desagradável que deve ser mascarado antes de sua incorporação em alimentos ou medicamentos orais. Assim, a administração de compostos fenólicos requer a formulação de um produto acabado protegendo o produto e sendo capaz de manter a integridade estrutural do polifenol até o consumo ou a administração. Entre os métodos de estabilização existentes, a encapsulação é um meio interessante. Várias técnicas de microencapsulação estão disponíveis, e os produtos microencapsulados são largamente utilizados nas indústrias alimentar, farmacêutica e cosmética, mas também em vários outros domínios, como cuidados pessoais, produtos agrícolas, medicamentos veterinários, produtos químicos industriais, biotecnologia, indústrias biomédicas (LÉVY, 2011).

As antocianinas são compostos fenólicos e são conhecidas pela sua capacidade antioxidante, como corante natural (aditivo), propriedades anti-inflamatórias, anti-carcinogênicas (MAZZA, 2007). Devido à instabilidade das antocianinas o seu uso é limitado. A microencapsulação é uma das alternativas para proteger estes compostos e, viabilizar a sua utilização em diversas áreas da indústria.

O método mais comumente utilizado para a encapsulação de antocianinas é o “*spray drying*”. Os materiais de matrizes usados principalmente são polissacarídeos como a maltodextrina, goma arábica, proteínas isoladas de soja entre outros. A encapsulação protege o composto contra fatores externos como oxigênio, luz, durante o armazenamento e secagem. No entanto, em ambientes aquosos, como prevalece em muitos alimentos ou do trato digestivo, as micropartículas solúveis em água obtidas em geral desintegram-se e perdem o seu efeito de estabilização. Assim, sistemas alternativos de encapsulação de materiais insolúveis em água parecem promissores para que se mantenha sua estrutura e função de estabilização do material do núcleo, depois da imersão em água. Poucos estudos têm sido realizados com o foco no encapsulamento das antocianinas em matrizes insolúveis em água. Este fato pode ser explicado porque as antocianinas são

principalmente estáveis em condições muito ácidas (pH abaixo de 3). Por esta razão, a quantidade de materiais de matriz utilizáveis, e assim métodos de encapsulação, são limitados (BELTZ *et al.*, 2011).

Proteínas do soro do leite têm sido utilizadas em diversos processos de microencapsulação devido as suas propriedades de gelificação, emulsificação e inibição de espumas. As proteínas podem ser utilizadas como uma alternativa razoável porque, mesmo em soluções altamente concentradas (>10 %), estas podem ser utilizadas devido à sua baixa viscosidade. Por conseguinte, após a gelificação do hidrocoloide em altas concentrações, esta se transforma em um gel denso, o que pode favorecer a retenção do material do núcleo. A maior fração das proteínas do soro de leite,  $\beta$  - lactoglobulina, é conhecida por ser capaz de formar géis térmicos insolúveis em água em condições fortemente ácidas para a estabilização de antocianina (pH  $\geq$  1.5) (LIU, 1994).

Beltz e Kulozik (2011) estudaram a microencapsulação de antocianinas do extrato de mirtilo rico em antocianinas utilizando hidrogéis de proteínas do soro do leite. A influência da velocidade de agitação e adição de emulsificante, nas propriedades morfológicas das microcápsulas, a pH 1,5 e pH 3, foram avaliadas. Dois emulsificantes foram testados: a fosfatildicolina (PCDL) e o Span 80. O emulsificante Span 80 quando utilizado durante o processo de microencapsulação, causa agregação das gotículas.

Lee e Rosenberg (2000) obtiveram microcápsulas à base de proteína de soro de leite. As microcápsulas foram preparadas através de um processo que consiste em dupla emulsificação e posterior gelificação térmica. As microcápsulas esféricas obtidas tinham um diâmetro de 10 - 100  $\mu$ m. A morfologia das microcápsulas foi influenciada pelo pH da emulsão. A eficiência da encapsulação foi superior a 90 % e as perdas do material do núcleo foram atribuídas a difusão do material do núcleo para a superfície externa e também aos solventes utilizados para lavar as microcápsulas.

### **6.1.1 - Objetivos**

#### *Objetivo Geral*

O objetivo deste estudo é produzir e caracterizar micropartículas formadas por proteínas isoladas do soro do leite (WPI) utilizando método da emulsificação/gelificação térmica com óleo de girassol.

### *Objetivos Específicos*

- Preparar diferentes sistemas variando as concentrações relativas dos componentes para obtenção de micropartículas;
- Estudar a estabilidade das emulsões A/O estabilizadas por proteínas isoladas do soro do leite por medidas de distribuição de tamanho de partículas;
- Analisar a presença da substância encapsulada nas micropartículas por meio da técnica de espectroscopia de infravermelho (FTIR).

### **6.2 - Proteínas: uma abordagem de sua estrutura e função**

As proteínas do soro são constituídas por duas frações principais,  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg) que representa 54 % da massa de proteínas do soro de leite e  $\alpha$ -lactalbumina ( $\alpha$ -la) contribuindo com 21 % da massa (KINSELLA, 1984). A  $\beta$ -lg é uma proteína globular que consiste em 162 resíduos de aminoácidos com uma massa molar de cerca de  $18.400 \text{ g mol}^{-1}$ . Esta proteína contém duas pontes dissulfeto e um grupo tiol livre que é o principal responsável por sua agregação térmica irreversível e as propriedades gelificantes (SHIMADA e CHEFTEL, 1989). A  $\alpha$ -lactalbumina é também globular, mas apresenta principalmente uma estrutura secundária helicoidal. É composta por 123 aminoácidos que conduzem a uma massa molar de  $14.200 \text{ g mol}^{-1}$  e tem um ponto isoelétrico entre 4,2 e 4,5.

As duas principais proteínas,  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina, respondem por 80 % das proteínas totais e são responsáveis pelas propriedades funcionais dos isolados de proteína do soro de leite de comerciais (WPI).

As proteínas são de grande interesse, devido à sua natureza anfifílica, o que lhes permite reduzir a tensão superficial na interface óleo-água. A incorporação de proteínas na interface óleo-água, permitiu aos cientistas utilizá-la para formar emulsões (O/A ou A/O), o qual pode ser usado em formulações de alimentos, de drogas e a entrega de nutrientes. O estudo sistemático das proteínas na interface e os fatores que afetam a sua estabilidade (por exemplo: conformação, pH, condições do solvente e tratamento térmico) permitiu um uso mais amplo destas emulsões adaptados para várias aplicações (LAM e NICKERSON, 2013).

As dispersões de proteína são usadas para estabilizar emulsões óleo em água ou para formar géis após serem submetidas a aquecimento. Em temperaturas superiores a 65 °C, a estrutura globular das principais proteínas do soro do leite se desdobram e expõe os grupos hidrofóbicos e sulfídricos. Ao mesmo tempo, a agregação da proteína, promovida pelas interações atrativas e pontes de dissulfeto, cria uma rede tridimensional (TWOMEY, KEOGH, MEHRA, e KENNEDY, 1997). A aparência, textura e microestrutura dos géis de proteína do soro de leite expostas ao calor dependem da concentração da proteína, sais e pH durante o tratamento térmico (BOUTIN, 2007).

Na preparação de emulsões, a energia mecânica é utilizada para dividir os glóbulos de gordura em pequenas gotículas. A adsorção de moléculas anfifílicas na interface óleo - em - água cria uma membrana que reduz a energia interfacial e previne as gotas da coalescência. Sob condições ideais, proteínas do soro de leite produzem emulsões finamente dispersas com tamanho médio de gota menores que 250 nm (KARLESKIND *et al.*, 1996a).

### **6.2.1.1 Propriedades das proteínas do leite**

As proteínas do leite são amplamente disponíveis, naturais e geralmente reconhecidas como seguras. Matéria-prima de alto valor nutricional e com boas propriedades sensoriais, e possuem muitas propriedades estruturais e funcionalidades que as tornam altamente adequadas como veículos, ou como componentes de veículos para entrega de vários bioativos. A seguir são apresentadas algumas das propriedades das proteínas do leite.

A Figura 6.1 apresenta as várias funcionalidades das proteínas do leite para tarefas de entrega de compostos bioativos.

#### **a) Ligação com bioativos**

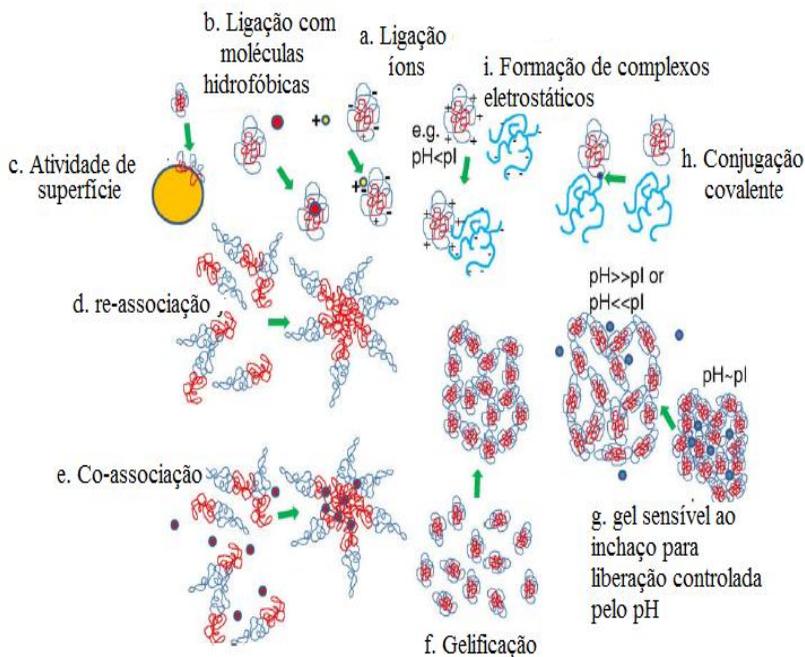
As proteínas do leite podem fazer ligações com uma variedade de moléculas e íons em diferentes graus de afinidade e especificidade (Figura 6.1-a e 6.1-b). Liang *et al.* (2008) investigaram as interações entre a  $\beta$ -lg e compostos polifenólicos (resveratrol) a partir de uvas. A interação do resveratrol e a  $\beta$ -lg foi investigada através de fluorescência e absorção no UV-visível. De acordo com os autores a auto-associação da  $\beta$ -lg e do resveratrol, possivelmente ocorre em altas concentrações.

#### **b) Atividade de superfície**

A estrutura anfifílica da maior parte das proteínas do leite confere excelente propriedade de superfície (Figura 6.1c). A sua capacidade de absorver na interface água-óleo e estabilizar emulsões é

influenciada pela sua estrutura, flexibilidade, estado de agregação, pH e força iônica (especialmente íons de cálcio) e temperatura. Em emulsões O / A, por exemplo, o caseinato (DAY *et al.*, 2007; NIELSEN *et al.*, 2009; LIVNEY *et al.*, 2010), e -  $\beta$  lg (HONG *et al.*, 2007; SANDRA *et al.*, 2008) foi utilizado como estabilizador de superfície e agente encapsulante. Em emulsões múltiplas A/O/A, o caseinato e as proteínas isoladas do leite (BONNET *et al.*, 2009; BENICHOU *et al.*, 2007, LIVNEY *et al.*, 2010) foram usados como agentes emulsificantes externos /revestidores. Em emulsões O/A/O, proteínas isoladas do soro do leite têm sido utilizadas principalmente como emulsificante, para ambas as interfaces da fase aquosa.

**Figura 6.1** – Ilustração das várias funcionalidades das proteínas do leite úteis para tarefas de entrega de compostos bioativos.



Fonte: LIVNEY, (2010).

### c) Coassociação e reassociação

A auto-associação molecular (Figura 6.1-d) e a reassociação (Figura 6.1-e) estão entre os fundamentos da nanotecnologia. Algumas

das principais proteínas do leite são auto-associadores naturais. As caseínas são naturalmente organizadas em micelas que são aglomerados esféricos de 50-500 nm realizada em conjunto principalmente por interações hidrofóbicas. Recentemente pesquisadores aproveitaram este processo de coassociação para nanoencapsulação de nutracêuticos hidrofóbicos (SEMO *et al.*, 2007, LIVNEY *et al.*, 2010).

#### d) Gelificação

As proteínas do leite têm excelentes propriedades de gelificação (Figura 6.1-f). Ambos processos de gelificação a frio e induzidas pelo calor são vantajosos para bioativos lábeis. Gelificação induzida pelo calor envolvendo proteínas do leite resultam no desdobramento e consequentes interações hidrofóbicas. A gelificação é aumentada por ligações dissulfeto e sulfídrico,  $\beta$ -lg ou BSA (albumina do soro bovino), têm grupos S-H livres.

Bioativos sensíveis ao calor podem ser adicionados antes da gelificação, o que é feito pela a adição de sais de cálcio, de preferência, ou por diminuição do pH até o ponto isoelétrico da proteína, ou ambos. Este processo tem se mostrado, por exemplo, aplicável para encapsular riboflavina. Nesse estudo, microgotas de gel foram formadas por uma emulsificação /gelificação interna a frio, as proteínas do soro do leite foram pré aquecidas, com e sem a adição de alginato na solução contendo riboflavina e  $\text{CaCO}_3$ , para formar uma emulsão do tipo água em óleo. A gelificação foi induzida pela adição de ácido acético glacial ao óleo para dissolver o cálcio e baixar o pH da fase aquosa. Os grânulos formados de 100-900 nm foram separados da fase oleosa, lavados e secos. A adição do emulsificante span 80 reduziu o tamanho das gotas de óleo para 30 nm - 50 nm (CHEN, 2006 e 2007).

#### e) Propriedades de proteção e aprisionamento do composto bioativo

Por adsorção na interface óleo-água, ou através de ligação, aprisionamento ou revestimento de um bioativo, as proteínas formam uma barreira, que é essencial para proteger os bioativos encapsulados. As proteínas podem formar uma barreira contra a oxidação ou a deterioração dos compostos (NIELSON e JACOBESSEN, 2009), em cujo caso, as propriedades antioxidantes e quelantes de algumas proteínas do soro do leite podem ser altamente benéficas. Tem-se mostrado que a  $\beta$ -lg atua como um antioxidante suave, principalmente devido ao seu grupo tiol livre. Aquecimentos prolongados diminuem o número de tióis livres, e consequentemente, a capacidade antioxidante da  $\beta$ -lg (LIU *et al.*, 2007).

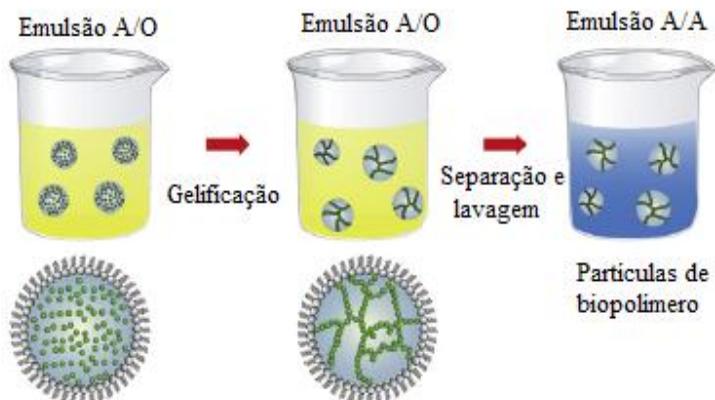
#### f) Biodisponibilidade do composto encapsulado

Um aspecto importante da encapsulação é o controle do conteúdo, acessibilidade e consequente biodisponibilidade. A estrutura ou matriz formada pelas proteínas do leite, com ou sem componentes adicionais, podem formar uma barreira contra a difusão e aprisionam os compostos bioativos. A barreira contra a difusão pode ser criada através do aprisionamento do composto a ser encapsulado em uma matriz de gel com ligações cruzadas ou pela formação de um filme de proteína em torno do núcleo (BONNET *et al.*, 2009), ou através do aumento da viscosidade da fase aquosa (BENICHOU *et al.*, 2007). A ambos podem ser reforçadas através da mistura ou formação de complexos com outros biopolímeros (SAHU *et al.*, 2008; BENICHOU *et al.*, 2007; LIVNEY, 2010).

### 6.2.2 - Método da Emulsão - Templates para formação de partículas de biopolímero

Este método baseia-se na utilização de emulsões A/ O como modelos para a produção de partículas de biopolímero com dimensões específicas (Fig. 6.2).

**Figura 6.2** - Método da Emulsão - Templates para formação de partículas de biopolímero (emulsão A/O).



Fonte: Matalanis *et al.*, 2011.

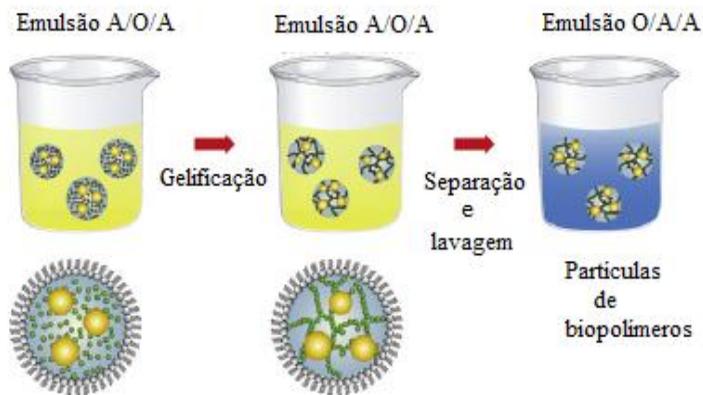
Uma solução aquosa do biopolímero é homogeneizada com uma fase oleosa contendo um emulsificante solúvel em óleo para formar uma emulsão de água - em - óleo (A / O). O tamanho das gotas de água

pode ser controlado pela variação tanto pelas condições de homogeneização (pressão e número de passagens) como pela composição da solução (proporção de óleo-água, proporção emulsificante-água). A fase aquosa interna é em seguida gelificada usando um mecanismo adequado para o biopolímero utilizado, por exemplo, mudança de temperatura, a adição de um agente de ligação cruzada, ou mudança da força iônica/pH. Finalmente, as partículas de biopolímero podem ser obtidas por centrifugação/ filtração da emulsão A/ O, recuperação das partículas e, em seguida, lavagem com um solvente orgânico para remover qualquer óleo residual. As partículas de biopolímero resultantes podem então ser redispersas em uma solução aquosa ou secas (MATALANIS *et al.*, 2011).

Este método tem sido utilizado com êxito para formar microesferas de proteína do soro do leite/ alginato para o encapsulamento de riboflavina (CHEN e SUBIRADE, 2006). Também tem sido utilizado para encapsular bactérias probióticas no interior de partículas de proteína de leite. Neste estudo, uma solução de bactérias probióticas e proteína de leite foram incubadas a uma temperatura de 5 °C e, em seguida, a mistura foi adicionado óleo vegetal para formar uma emulsão A/O. A temperatura do óleo foi posteriormente aumentada para 18 e 20 °C, uma temperatura na qual as micelas de caseína tratadas com o coalho formarão um gel, de modo a formar microcápsulas esféricas.

Uma abordagem semelhante pode ser usada para formar partículas de biopolímero preenchidas, ou seja, partículas de biopolímero contendo por exemplo gotículas lipídicas (Fig. 6.3). Neste caso, uma emulsão O / A é formada, e em seguida esta emulsão é homogeneizada com uma fase oleosa contendo um emulsificante solúvel na fase oleosa para formar uma emulsão de óleo - em - água - em - óleo (O /A / O). A fase aquosa pode então ser gelificada, e as partículas de biopolímeros preenchidas podem então ser removidas por centrifugação e lavagem como descrito anteriormente (MATALANIS *et al.*, 2011).

**Figura 6.3** - Método da emulsão - Templates para a formação de partículas de biopolímero preenchidas. Uma emulsão O/A/O é formada pela homogeneização de uma emulsão O/A com uma fase aquosa (água+emulsificante solúvel na fase oleosa). A fase aquosa interna é em seguida gelificada alterando-se as condições ambientais (tal como temperatura) ou a adição de um agente de gelificação.

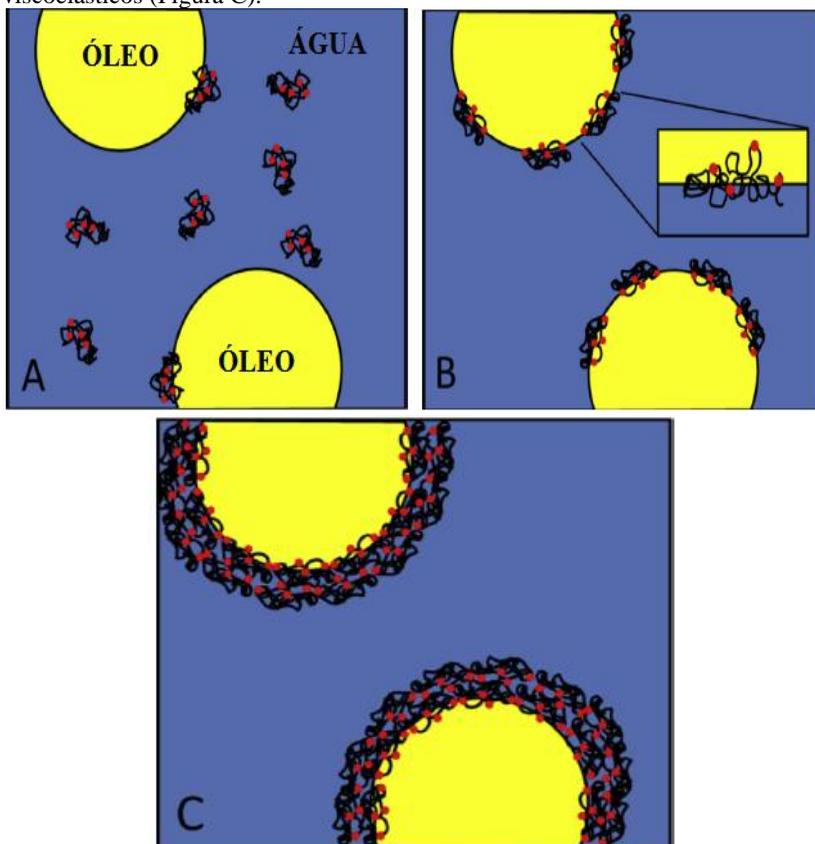


Fonte: Matalanis *et al.*, 2011.

### 6.2.2.1 Emulsões estabilizadas por proteínas

Diferente dos emulsificantes de baixa massa molecular que se difundem rapidamente para a interface apresentando excelentes capacidade de formar emulsões, as proteínas tendem a ser mais volumosas e se difundem em um ritmo muito mais lento (Figura 6.4) (McCLEMENTS, 2005).

**Figura 6.4** – Representação das proteínas globulares migrando na interface água/óleo (Figura A) seguida por reorientação (Figura B) e formação de filmes viscoelásticos (Figura C).



Uma vez na interface, uma desnaturação parcial (ou desdobração) é muitas vezes necessária, a fim de expor os aminoácidos hidrofóbicos para a superfície (Fig. 6.4 B). As proteínas então se realinham e posicionam os aminoácidos hidrofóbicos das suas superfícies dentro dos ácidos aminados da fase oleosa e os grupos hidrofílicos dentro da fase aquosa (WALSTRA, 2003). No entanto, uma vez na interface, filmes viscoelásticos fortes podem ser desenvolvidos (Figura 6.4 C), que resistem às tensões mecânicas (dependendo das condições do solvente).

### 6.2.3 - Processos físico-químicos envolvidos no preparo de emulsões

Para formar uma emulsão fina, gotículas maiores devem ser quebradas pela aplicação vigorosa de energia mecânica (DICKINSON,1994 e 2009; WALSTRA, 1993; WALSTRA e SMULDERS,1997). Em processamento de alimentos isto pode ser conseguido tradicionalmente utilizando um misturador de alta velocidade ou um homogeneizador de válvula de alta pressão. Termodinamicamente falando, o processo é extremamente ineficiente.

Para uma taxa fixa de dissipação de energia durante a emulsificação, a distribuição de tamanho das gotas é determinada pelo tempo necessário para que a interface seja coberta com emulsificante, em comparação com o intervalo de tempo médio entre colisões de gotas. Quando o agente emulsificante adsorve muito lentamente, ou está presente em uma concentração demasiadamente baixa, a maior parte das gotículas individuais formadas durante a intensa dissipação de energia no processo de emulsificação não são retidas no final da emulsão. Isto pode ser devido à quebra da película fina nas gotas devido a colisão (coalescência) ou compartilhamento da camada adsorvida entre duas gotas (floculação). O último fenômeno prevalece em emulsões concentradas (por exemplo, creme), que tem uma proporção relativamente baixa de emulsificante/óleo, e em sistemas menos concentrados contendo emulsificantes poliméricos mistos de atividade superficial diferente (DICKINSON e GALAZKA, 1991a, DICKINSON, 2009). Para sistemas em que a proporção de emulsificante/óleo é alta e são homogeneizados em equipamentos eficientes, as gotículas produzidas não floculam e são polidispersas. O tamanho médio da gota não é dependente da concentração de emulsificante, mas é controlado principalmente por processos hidrodinâmicos de ruptura das gotas (JAFARI *et al.*, 2008).

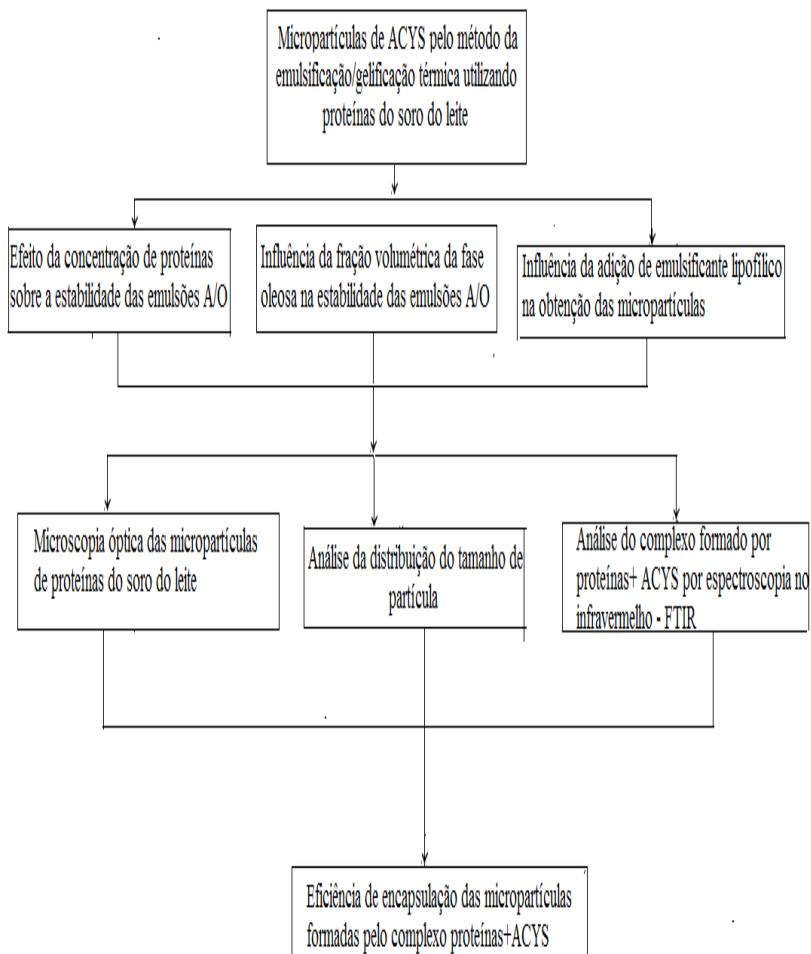
Um emulsificante eficaz é aquele que: (i) reduz rapidamente a tensão interfacial na interface óleo-água recém- formada, (ii) liga-se fortemente à interface e (iii) protege as gotículas recém-formadas contra a floculação ou coalescência. Ao escolher uma proteína como o agente emulsificante em qualquer aplicação em alimentos, deve-se considerar as condições da natureza do meio ambiente em que o sistema será submetido. Estas condições incluem fatores tais como temperatura, pH, força iônica (íons de cálcio). Quando as condições são favoráveis, as proteínas tendem a ser mais eficientes que os polissacarídeos. Estes fatores fazem com que, em comparação com um hidrocoloide, uma concentração muito menor de proteína (caseinato de sódio,  $\beta$ -

lactoglobulina, etc.) pode ser utilizada para estabilizar uma emulsão óleo em água (O/A) (DICKINSON *et al.*, 2009). O problema de desempenho em emulsões estabilizadas com proteína, no entanto, relaciona-se com a maior contribuição de interações eletrostáticas na camada adsorvida. Combinado com a baixa cobertura de superfície, o que torna as emulsões suscetíveis à desestabilização sob condições ambientais desfavoráveis. Por exemplo, emulsões a base de proteínas do soro do leite, são bastante sensíveis ao calor (DICKINSON e PARCKINSON, 2004).

### **6.3 - MATERIAIS E MÉTODOS**

A seguir é apresentado o método de análise das micropartículas de ACYS (antocianinas) formadas por emulsificação gelificação térmica conforme a Figura 6.5.

**Figura 6.5** – Diagrama da metodologia de análise das micropartículas formadas pelo método da emulsificação/gelificação térmica utilizando proteínas do soro do leite.



### **6.3.1 - Obtenção de micropartículas de ACYS pelo método da emulsificação/gelificação térmica utilizando proteínas do soro do leite**

#### **6.3.1.1 - Matéria - Prima**

O concentrado proteico do soro do leite foi obtido a partir de uma fonte comercial (JSE Alimentos Ltda.). Este pó contém 75 % de proteína, 6,25 % de gorduras totais e 6,25 % de carboidratos. O emulsificante lipofílico Span 80 foi adquirido da Sigma Aldrich. O óleo de girassol foi adquirido em um supermercado local e usado sem processamento adicional. A massa específica do óleo de girassol utilizado foi de  $915,8 \text{ kg/m}^3$  e o pH 5,73.

#### **6.3.1.2 - Solução de proteínas**

Diferentes concentrações de proteínas isoladas do soro do leite (WPI) foram preparadas dissolvendo-se o pó das proteínas isoladas do soro do leite em água deionizada. As soluções foram agitadas (300 rpm agitação suave) a temperatura ambiente ( $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ) durante 12 h para permitir a hidratação completa. O pH das soluções de WPI foi ajustado para 1,5 com HCl 3M.

Para avaliar o efeito da concentração da solução de proteína na estabilidade das emulsões A/O foram preparadas diferentes soluções de proteína conforme descrito no item 6.3.1.2. A Tabela 6.1 apresenta as diferentes concentrações da solução de proteína testadas.

**Tabela 6.1 - Diferentes concentrações da solução de proteína**

Formulação	Concentração da solução de proteína (massa de proteína g /volume de água mL)
1	2
2	5
3	10
4	15
5	30

O extrato de ACYS (antocianinas) concentrado (0,063 g) foi adicionado às soluções de proteína, o pH desta solução foi ajustado para 1,5. A solução de proteína mais o concentrado de ACYS foi emulsionada na fase oleosa (óleo de girassol) durante 10 min. A composição final destas emulsões foi de 15 % em massa da solução de proteína mais o concentrado de ACYS emulsionada em óleo de girassol 85 % em massa.

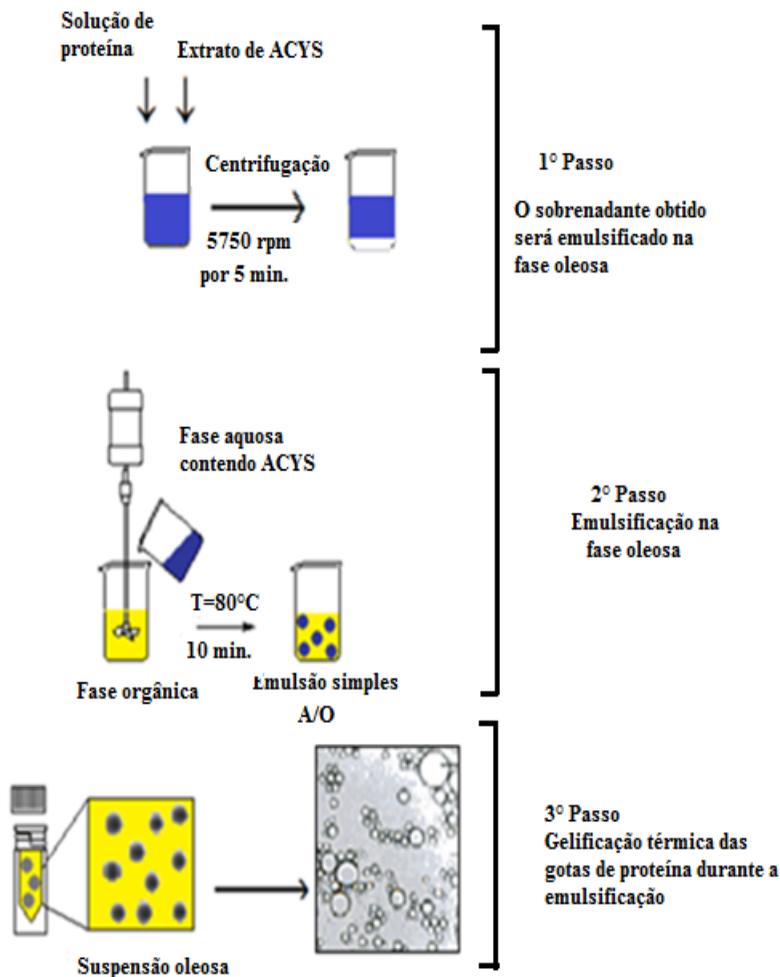
### ***6.3.1.3 - Geração das microcápsulas utilizando proteínas isoladas do soro do leite***

Foi preparado uma solução de proteína (30 % m/v) conforme descrito no item 6.3.1.2. Ao concentrado proteico foi adicionado o extrato concentrado de antocianinas. Ácido clorídrico (3M) foi adicionado na solução para obter um pH de 1,5.

A solução de proteínas-antocianinas foi centrifugada a 5750 rpm por 5 min para remover possíveis frações insolúveis. O sobrenadante obtido foi utilizado para a produção das microcápsulas pelo método da emulsificação/gelificação térmica.

Na Figura 6.6 é apresentada uma representação esquemática do método da emulsificação/gelificação térmica para a produção de microcápsulas de proteínas do soro do leite.

**Figura 6.6** - Representação esquemática das microcápsulas obtidas pelo método da emulsificação/gelificação térmica (adaptado BELTZ *et al.*, 2011).



A produção das microcápsulas pelo método da emulsificação/gelificação térmica foi baseada no método proposto por Beltz *et al.* (2011). Aproximadamente 15 % (m:m) sobrenadante ACYS-proteínas (25 °C) foi adicionada em 85 % de óleo de girassol em diferentes velocidades de agitação, seguido de imediato aquecimento da emulsão a partir de 50 °C até 80 °C por 6 min. A temperatura foi mantida

a 80°C durante 10 min para facilitar a gelificação, em seguida, a suspensão foi arrefecida até 20 °C. A suspensão de microcápsulas obtida foi centrifugada a 2574 rpm durante 30 min e o sobrenadante (óleo) foi descartado.

Todos os experimentos foram realizados utilizando-se agitador mecânico, vaso de agitação de fundo arredondado encamisado com dimensões internas de 8 cm de diâmetro por 15 cm de altura e banho termostático com circulação de fluido modelo TE-2005, Tecnal.

**Figura 6.7** - Imagem do agitador mecânico utilizado para produzir as emulsões A/O



As microcápsulas sedimentadas foram lavadas duas vezes, suspendendo-as em ácido clorídrico diluído (0,2 M KCl, pH 1,5).

### **6.3.3 - Microscopia óptica das microcápsulas de proteínas do soro do leite**

As micropartículas de proteínas foram analisadas por meio de um microscópio óptico (Marca Quimis Q720AD) equipado com uma câmera de vídeo Motic Image Plus 2.0. Para obter as imagens microscópicas, as amostras foram diluídas em sua fase contínua. Uma gota da amostra diluída foi transferida para o microscópio.

Através de uma grande quantidade de imagens ou de um vídeo contínuo, é possível obter informações tais como o estado da amostra, geometria e dispersão das partículas, além das possíveis interações entre

as gotas e a cinética de importantes processos que ocorrem em uma emulsão, como a floculação e a coalescência, pois o conhecimento destes fatores é de fundamental importância para o entendimento do comportamento e da estabilidade das emulsões. Sabe-se também que o tamanho de gota médio e a concentração são propriedades importantes, pois definem as características de cada emulsão (SJÖBLOM *et al.*, 2003).

#### **6.3.4 - Determinação da distribuição de tamanho de partícula**

A determinação do tamanho das partículas foi realizada no equipamento (Mastersizer 2000 - Hydro 2000MU, da Malvern Instruments Ltda.), disponibilizado pelo Laboratório de Verificação e Validação (LVV) da Universidade Regional de Blumenau - FURB.

Os diâmetros das partículas formados pelo sistema proteína – ACYS foram determinados na faixa de medição de 0,1 a 2000  $\mu\text{m}$ . A distribuição de tamanho de partícula para as emulsões A/O testadas com diferentes velocidades de agitação foi determinada utilizando a técnica de espalhamento da luz. As amostras das emulsões A/O foram diluídas em água deionizada (800 mL) até atingir no máximo 5 % de turbidez ( $\pm 2$  a 3 gotas), homogeneizadas até à completa dispersão e, submetidas à análise para a determinação da distribuição do tamanho das partículas.

O tamanho de partícula foi determinado através do diâmetro médio de volume-superfície ou diâmetro de Sauter e pelo diâmetro médio de volume ou diâmetro equivalente de Broucker. O diâmetro médio de Sauter  $D_{32}$  proporciona uma medida do diâmetro médio, onde estão a maioria das partículas. O diâmetro  $D_{43}$  está relacionada com alterações no tamanho de partícula que envolvem processos de desestabilização (por exemplo, floculação). Os parâmetros referidos são a média de três medições.

#### **6.3.5 - Efeito da fração oleosa na estabilidade das emulsões A/O**

Para avaliar o efeito da fração volumétrica da fase oleosa, cinco formulações foram preparadas. A concentração da solução de proteína foi mantida em 30 % (m:v). A composição final da emulsão A/O é apresentada na Tabela 6.2.

**Tabela 6.2** - Efeito da fração volumétrica da fase oleosa na estabilidade das emulsões A/O.

Formulação	Solução de concentrado proteico (g)	Óleo de Girassol (g)	Composição final da emulsão A/O
B1	90	210	30:70
B2	60	240	20:80
B3	150	150	50:50
B4	210	90	70:30
B5	240	60	80:20

### 6.3.6 - Influência da concentração de emulsificante lipofílico na preparação de microcápsulas de proteínas do soro do leite

Para avaliar a estabilidade das microcápsulas, o tensoativo lipofílico mono-oleato de sorbitan (nome comercial span 80) foi adicionado à fase oleosa na concentração de 2,5 % (m/m). O emulsificante foi adicionado à fase oleosa em temperatura de 50 °C com agitação para que ocorresse a completa dispersão.

### 6.3.7 - Análise do complexo formado proteínas do soro do leite - ACYS por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Foram realizados estudos relativos à interação eletrostática entre as proteínas do soro do leite e as ACYS utilizando a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) no equipamento da marca SHIMADZU (IRPrestige-21) do Laboratório de Análises Têxteis do Departamento de Química da Universidade Regional de Blumenau - FURB, empregando-se o método de pastilhas de KBr.

As análises foram realizadas nas amostras das micropartículas obtidas por emulsificação/gelificação térmica após serem secas a temperatura ambiente e do concentrado proteico as quais serão comparadas com a espectroscopia do corante de antocianinas liofilizado na região de 400–4000  $\text{cm}^{-1}$ .

### **6.3.8 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das partículas formadas por antocianinas e proteínas do soro do leite**

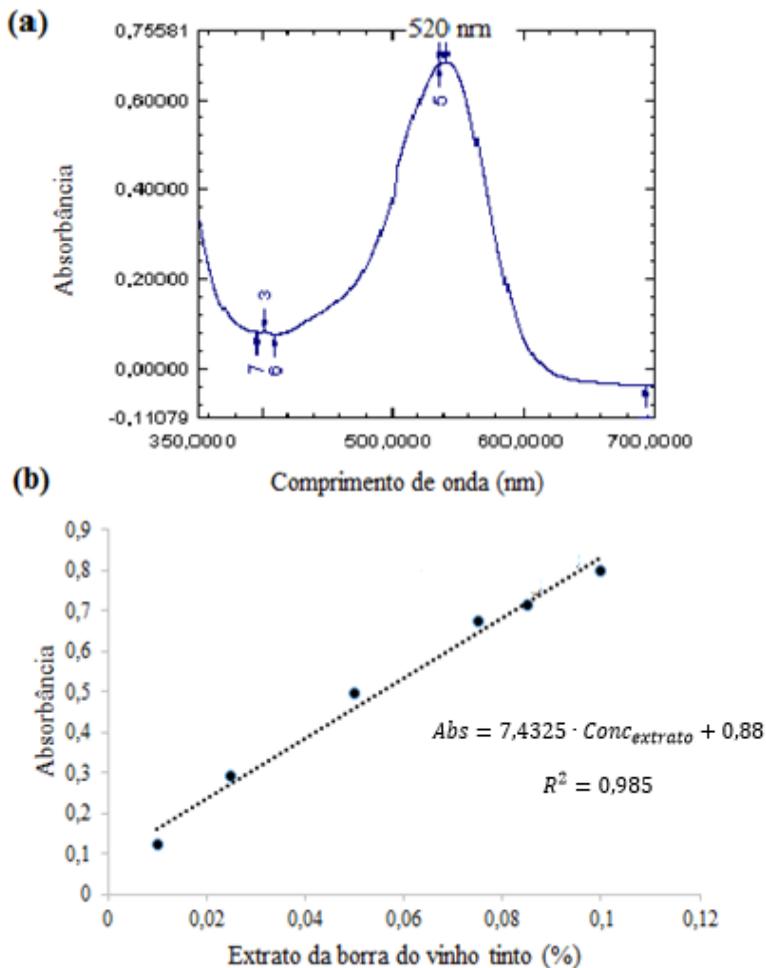
A microestrutura das partículas liofilizadas foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura. As partículas foram aderidas adequadamente nos “stubs” com fita carbono de dupla face. Após condicionamento em alto vácuo, as amostras foram fixadas com ouro (camada de 30 nm de espessura) e submetidas à análise no Microscópio Eletrônico de Varredura (Modelo JEOL/JSM –6390LV, Jeol). As análises foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica – LCME da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

### **6.3.9 - Eficiência de Encapsulamento (EE %)**

A eficiência de encapsulamento consiste na quantificação de antocianinas presentes nas partículas.

Para o cálculo da eficiência da encapsulação as partículas obtidas de proteínas do soro do leite + ACYS foram lavadas com HCl 0,2 M e KCl 0,2 M. Após a etapa de lavagem a solução resultante foi acondicionada em tubos de centrifuga (volume de 45 mL) e centrifugadas (centrifuga modelo Hermle Z 300K; marca Labortechnik GmbH) a 3000 rpm durante 15 min. Amostras da fase aquosa foram retiradas cuidadosamente com uma seringa e sua absorbância foi lida no comprimento de onda de 520 nm, utilizando um espectrofotômetro. A absorbância foi lida em triplicata e a concentração de antocianinas foi determinada a partir da curva padrão de calibração apresentada na Figura 6.8.

**Figura 6.8** Espectro de absorvância da borra do vinho tinto em tampão de pH=2 (a); curva de calibração do extrato da borra do vinho tinto, absorvância medida no comprimento de onda de 520 nm.



A eficiência de encapsulamento (EE %) foi determinada como sendo a diferença entre o teor de antocianinas inicial e do teor de antocianinas presente na fase aquosa após a centrifugação. A equação 8 foi utilizada para calcular a eficiência da encapsulação.

$$EE \% = \left( \frac{\text{Teor de ACYS}_{\text{inicial}} - \text{Teor de ACYS}_{\text{livre}}}{\text{Teor de ACYS}_{\text{inicial}}} \right) \cdot 100 \quad (8)$$

Onde:

*Teor de ACYS<sub>livre</sub>*

= quantidade de antocianinas presente na fase aquosa (%)

*Teor de ACYS<sub>inicial</sub>*

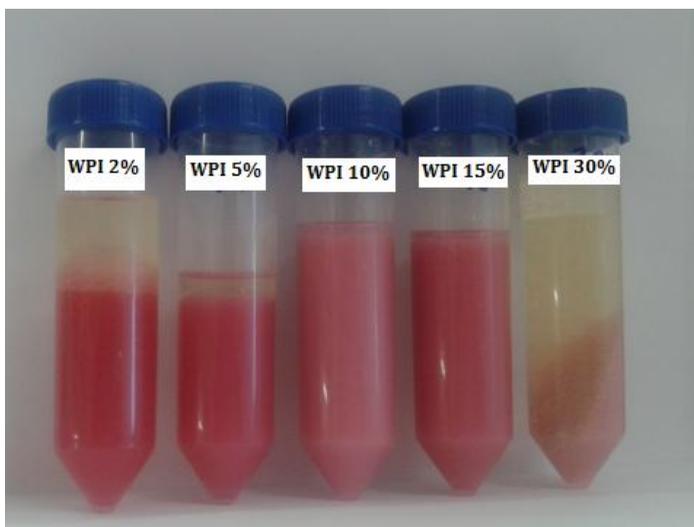
= quantidade de antocianinas inicial utilizada na emulsão (%)

## 6.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.4.1 - Efeito da concentração de proteína na estabilidade das emulsões água/óleo (A/O)

Para avaliar o efeito da concentração de proteínas nas emulsões A/O diferentes soluções de proteínas isoladas do soro do leite foram preparadas de acordo com o item 6.3.1.2. As concentrações das soluções de proteínas do soro do leite foram: 2 %, 5 %, 10 %, 15 % e 30 % m/v. A aparência óptica das emulsões é apresentada na Figura 6.9.

**Figura 6.9** Aparência óptica das emulsões A/O variando-se a concentração de proteína pelo método da emulsificação/gelificação térmica.

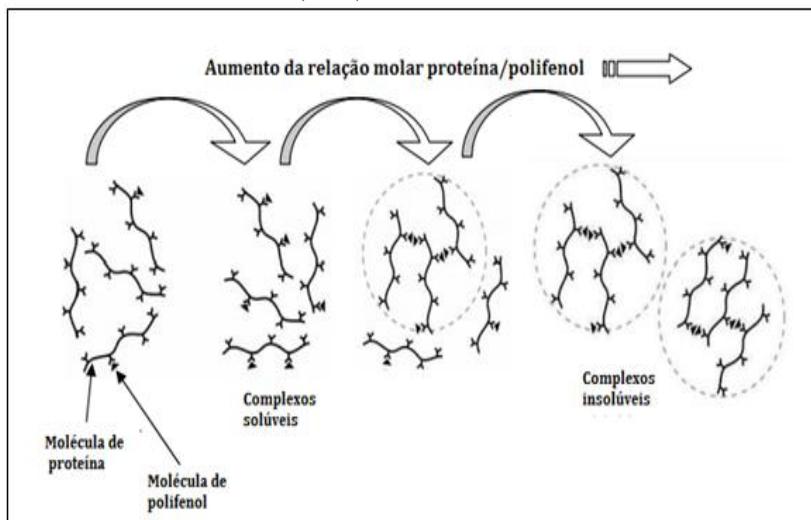


De acordo com a Figura 6.9, a emulsão com 30 % de proteína foi a que apresentou uma maior separação de fases. Pelo método proposto por Beltz *et al.*, (2011) a emulsão A/O obtida foi submetida à centrifugação a 2574 rpm durante 30 min, para que ocorresse a separação da fase oleosa e, as microcápsulas sedimentadas (parte inferior) fossem então recuperadas.

Segundo Schmidt (1981) e Damodaran (1989), a macroestrutura dos géis de proteínas são dependentes da concentração de proteína e, a qualquer temperatura, existe uma concentração crítica em que a gelificação pode ser observada.

Nos modelos propostos por Siebert *et al.* (1996) e Poncet-Legrand *et al.* (2006), o processo de precipitação das proteínas em presença de polifenóis (antocianinas) ocorre em três etapas. Na primeira, os polifenóis se associam de maneira reversível com as proteínas para formar agregados solúveis. Em uma segunda etapa, cada proteína recoberta de polifenóis começa a unir-se a outros complexos solúveis em que as interações intermoleculares fracas também são realizadas pelos polifenóis. Isto induz a insolubilidade dos complexos. Finalmente, a agregação espontânea leva à separação de fases. A Figura 6.10 apresenta um esquema da formação de complexos insolúveis com base na relação molar proteína/polifenol.

**Figura 6.10** Representação esquemática da formação de complexos insolúveis com base na relação molar proteína/polifenol. Fonte: SIEBERT *et al.* (1996) e PONCET-LEGRAND *et al.* (2006).

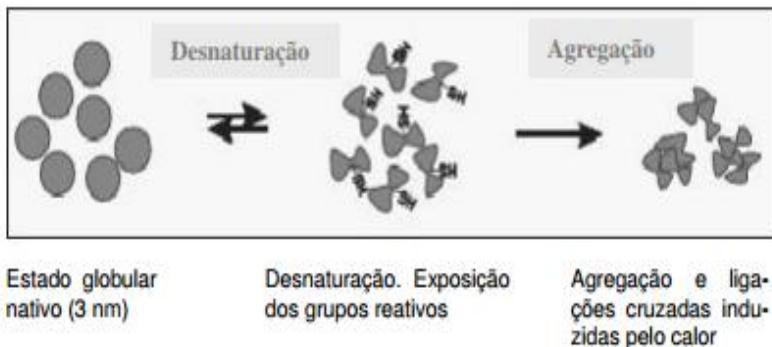


De acordo com Siebert *et al.* (1996), as proteínas podem ter um número de locais de ligação para os polifenóis, e que, quando a concentração de polifenóis atinge um nível desejado, as proteínas são unidas em conjunto com os polifenóis e formam grandes agregados que são propensos à sedimentação.

Nacz, Oickle, Pink e Shahidi (1996) encontraram que o pH óptimo para a precipitação das proteínas foi de 0,3-3,1 unidades de pH abaixo dos pontos isoelétricos de proteínas. Como as proteínas isoladas do soro do leite tem em sua composição a  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg) e esta, está presente em maior quantidade (54 %) em massa, (ponto isoelétrico em torno de 5,2) o pH ácido utilizado para encapsular as antocianinas contribuiu para que ocorresse a precipitação do complexo formado por proteínas-polifenóis. Além disto a  $\beta$  - lactoglobulina ( $\beta$  - lg) contém duas pontes dissulfeto e um grupo tiol livre que é o principal responsável por sua agregação térmica irreversível e as propriedades gelificantes.

A Figura 6.11 apresenta uma representação esquemática da desnaturação e agregação da  $\beta$ -lactoglobulina no soro do leite sob a influência da temperatura e agitação.

**Figura 6.11** - Representação esquemática da desnaturação e agregação da  $\beta$  - lactoglobulina no soro do leite.



Fonte: Von Staszewski, 2011.

Portanto, neste estudo a concentração ideal da solução de proteínas isoladas do soro do leite selecionada para a preparação das emulsões A/O foi de 30 % (m/v).

A formação do complexo de proteína - polifenol (Figura 6.10) pode levar a partículas solúveis ou insolúveis, este último tendo por

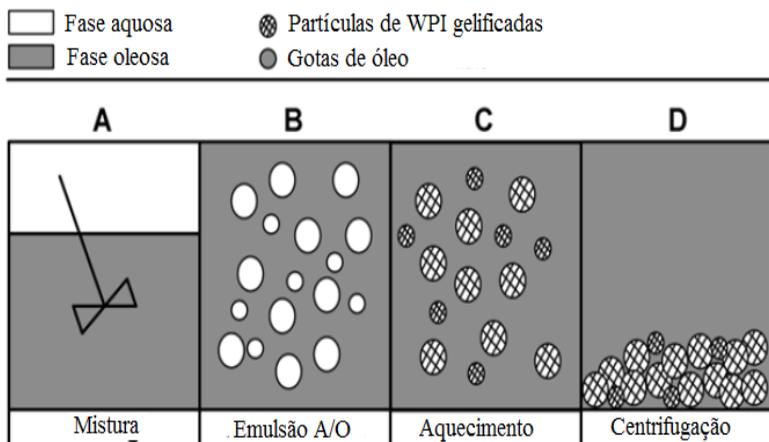
resultado a formação de sedimento (VON STASZEWSKI, 2011). A maioria dos modelos propostos por vários autores para explicar a formação de complexos proteína-polifenóis propõe que estes são formados por interações fracas (principalmente hidrofóbica) entre as cadeias laterais dos aminoácidos e dos anéis aromáticos dos polifenóis, que indicam que a associação proteínas-polifenóis é apenas um fenômeno de superfície.

A capacidade de formação de complexos de polifenol-proteína é influenciada pela natureza da proteína, a hidrofobicidade do polifenol (que aumenta com o número de anéis aromáticos) e a temperatura (PRIGENT *et al.*, 2003).

#### 6.4.2 - A formação de partículas de proteínas-ACYS

Partículas de proteína-ACYS foram preparadas utilizando o método da emulsificação/gelificação térmica. Um esquema do processo de preparação é apresentado na Figura 6.12.

**Figura 6.12** Representação esquemática do processo para a preparação de partículas de proteína. Fase aquosa: proteína isolada do soro do leite (WPI, 30 % m/v), fase oleosa: óleo de girassol, aquecimento: 10 min a 80 °C, centrifugação: 30 min em 2574 rpm.



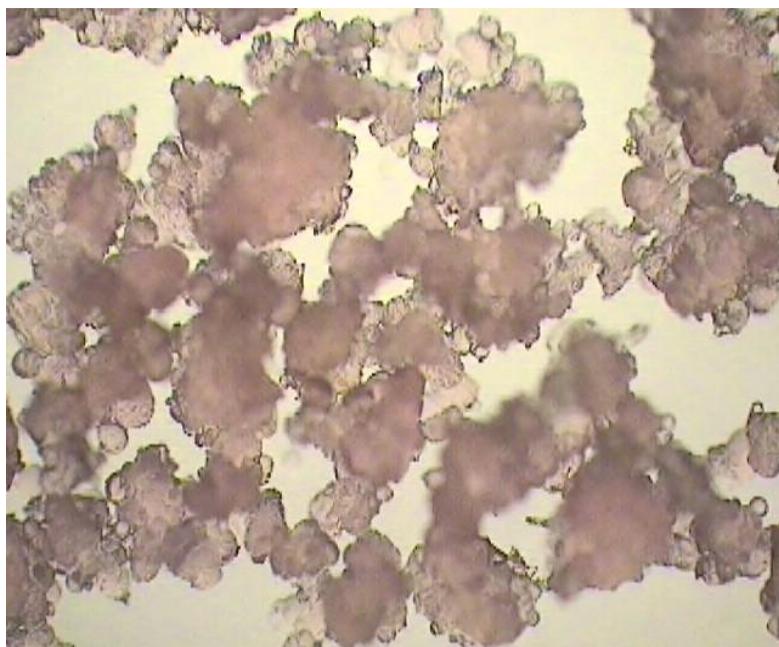
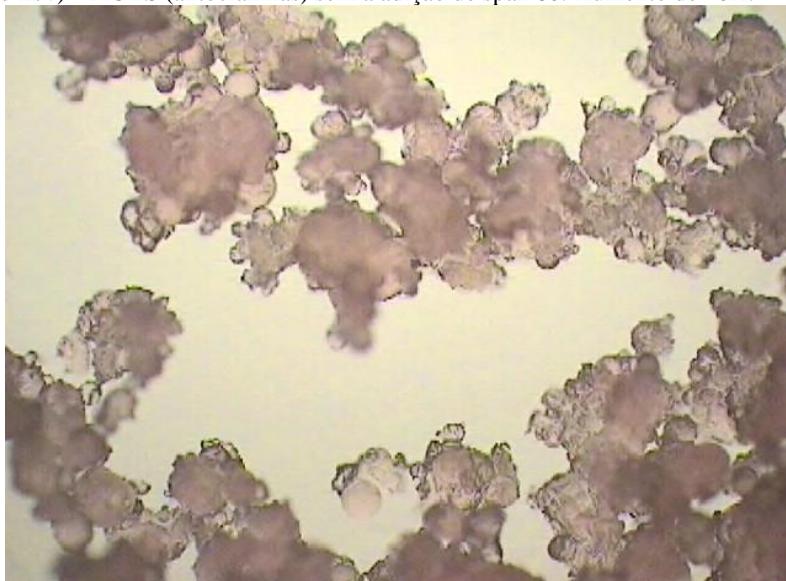
Fonte: SAGLAM, 2012.

Uma inversão da emulsão A/O em O/A, durante esta etapa é indesejável. Esta sensibilidade depende de variáveis, tais como a fração

de volume das fases e as concentrações dos emulsificantes. A fração de volume da solução de proteínas do soro do leite + corante de ACYS foi de aproximadamente 15 % (m/m) dispersas em 85 % (m/m) de óleo de girassol. Nesta etapa da emulsificação obteve-se emulsões estáveis A/O.

A distribuição das partículas apresentou formação de agregados (aparência de couve-flor) entre as proteínas do soro do leite e o corante de antocianinas, como pode ser visto pelas micrografias (Figura 6.13).

**Figura 6.13** - Micrografias do complexo formado proteína do soro do leite (30 % m/v) – ACYS (antocianinas) sem a adição de span 80. Aumento de 40X.



Pode-se perceber pelas micrografias que há formação de agregados de proteínas do soro do leite – ACYS, isto pode ser explicado devido ao pH utilizado para a encapsulação do corante de ACYS foi de 1,5 e, este meio ácido pode ter contribuído na agregação das partículas, levando estas a sedimentação.

Outros estudos em que a gelificação de proteínas de soro de leite é usada para formação de microcápsulas também relataram os efeitos do pH sobre a microestrutura das partículas.

Segundo Je Lee e Rosenberg (2000), Doherty *et al.* (2011) e Saglam (2012) que estudaram a formação de microcápsulas de proteínas do soro do leite também relataram a formação de microesferas de proteínas do soro de leite com com aparência de couve-flor, as quais, exibiram grandes poros em pH ácidos.

As partículas de proteínas são formadas quando a emulsão primária é aquecida em um banho de água em temperatura controlada a 80 °C durante 10 min. Estas condições revelaram-se suficientes para induzir a gelificação das proteínas do soro do leite + ACYS dentro das partículas. Para obter um aquecimento mais homogêneo e minimizar a agregação das partículas, ligeira agitação da emulsão durante o aquecimento pode ser útil.

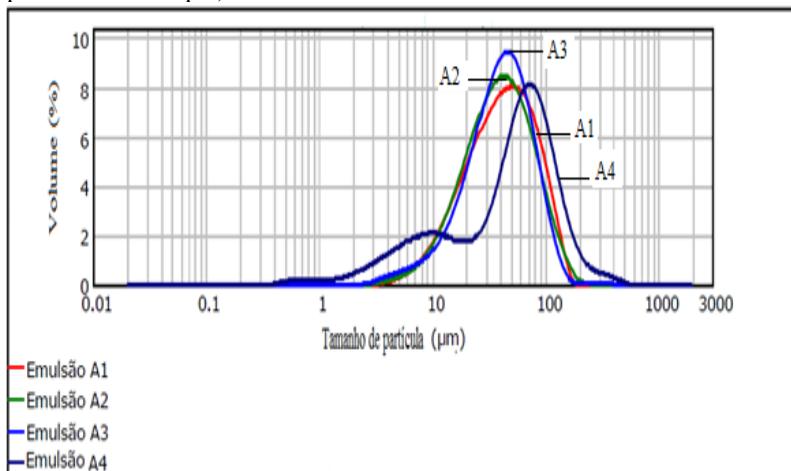
Para isolar as partículas de proteína, a emulsão A/O foi centrifugada ( 30 min a 2750 rpm), após o aquecimento. Isto resultou na formação de partículas densas e coloridas (corante de ACYS), que consistem em partículas de proteína gelificadas . O sobrenadante obtido após o primeiro passo de centrifugação consistia principalmente de óleo de girassol e tinha uma aparência turva. Isto sugere que algumas partículas de proteínas também estão presentes no sobrenadante. O teor de proteína do sobrenadante não foi determinado.

Aparentemente, as condições que foram usadas são tais que nem todas as partículas de proteína podem ter sedimentado durante o primeiro passo de centrifugação. No primeiro passo de centrifugação cerca de 91,6 % (m/m ) do total de óleo foi separado das partículas de proteínas, o que significa que ainda há uma quantidade significativa de óleo presente no sedimento, distribuída entre e/ou no interior das partículas (Figura 6.13).

### 6.4.3 - Influência da velocidade de agitação sobre a distribuição do tamanho das gotículas

Durante a preparação das emulsões A/O (água/óleo), foram testadas diferentes velocidades de agitação para verificar a influência sobre a distribuição do tamanho das gotículas formadas durante a gelificação. As velocidades de agitação testadas foram: A1 - 300 rpm, A2 - 800 rpm, A3 - 1200 rpm e A4 - 1750 rpm. Na Figura 6.14 são apresentadas as curvas de distribuição de tamanho das gotículas para as emulsões A/O em diferentes velocidades de agitação.

**Figura 6.14** Distribuição de tamanho das gotículas para emulsões A/O em diferentes velocidades de agitação. (A1 - 300 rpm; A2 - 800 rpm; A3 - 1200 rpm e A4 - 1750 rpm).



A Tabela 6.3 apresenta os valores do diâmetro de Sauter  $D_{32}$  e do diâmetro de Broucker  $D_{43}$  para as emulsões A/O testadas com diferentes velocidades de agitação.

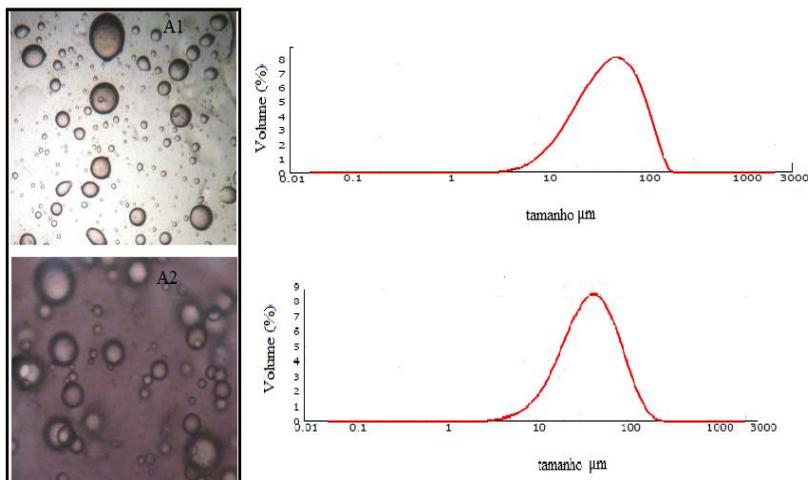
**Tabela 6.3.-** Valores do diâmetro de Sauter  $D_{32}$  e do diâmetro de Broucker  $D_{43}$  para as emulsões A/O testadas com diferentes velocidades de agitação.

<b>Emulsão A/O</b>	<b><math>D_{32}</math> <math>\mu\text{m}</math></b>	<b><math>D_{43}</math> <math>\mu\text{m}</math></b>	<b>Velocidade de agitação</b>
A1	29,64	49,51	300 rpm
A2	28,67	47,42	800 rpm
A3	28,02	46,32	1200 rpm
A4	14,25	65,75	1750 rpm

A partir da Figura 6.14 e dos valores obtidos para o diâmetro médio de área superficial  $D_{32}$  e diâmetro médio volumétrico  $D_{43}$  apresentados na Tabela 6.3, fica claro que o tamanho das partículas finais pode ser diminuído aumentando a velocidade de agitação. Para as emulsões A1, A2 e A3 a distribuição de tamanho de partícula foi monomodal indicando que neste tipo de distribuição, existe uma simetria, em relação às partículas de tamanho médio, quer para o lado das partículas mais finas, quer para o lado das partículas de maior dimensão, obtendo-se uma dispersão mais homogênea. Para a emulsão A4 a curva apresentou comportamento bimodal com uma diminuição e um pequeno deslocamento para menores valores de diâmetro de partícula, do segundo pico, à medida que aumentamos a velocidade de agitação.

As Figuras 6.15 e 6.16 mostram as micrografias das emulsões formadas com diferentes velocidades de agitação depois da etapa de centrifugação.

**Figura 6.15** Imagens da microscopia óptica das gotículas de proteínas + ACYS preparadas em diferentes velocidades de agitação: A1 – 300 rpm, A2 – 800 rpm. Partículas de proteínas + ACYS obtidas após a etapa de centrifugação. Aumento de 40 X para a amostra A1 e de 100 X para a amostra A2.

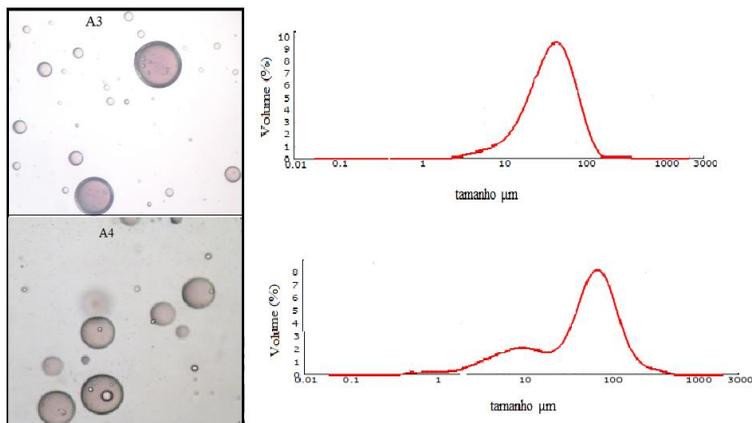


Para a preparação de partículas de proteína, utilizaram-se emulsões primárias, nas quais a fração da solução de proteínas do soro do leite em óleo não excedeu a 30 % (m/m). A presença de sedimentos coloridos após a centrifugação sugere que ligações entre proteínas e ACYS (antocianinas) é possível (FLORES *et al.*, 2014). Isto pode ser melhor evidenciado na micrografia A1 em que se percebe claramente partículas de formato esférico e com coloração característica do corante de antocianinas.

As gotículas formadas possuem um diâmetro médio de Sauter de 30 μm (ver tabela 6.3). Este diâmetro pode ter sido superestimado porque as partículas obtidas com proteínas do soro do leite não foram lavadas antes das análises e, as gotículas de óleo ainda presentes na amostra, após a centrifugação, podem ter contribuído com o aumento do diâmetro das gotículas em todas as amostras analisadas.

Na micrografia A2 é possível perceber também que uma quantidade da fase aquosa, composta de proteínas do soro do leite + ACYS, ficou dispersa na fase oleosa sem que se tenham formado gotículas. Isto sugere que na fase oleosa há presença de uma quantidade de corante que não foi encapsulado.

**Figura 6.16** - Imagens da microscopia óptica das partículas de proteínas + ACYS preparadas em diferentes velocidades de agitação: A3 – 1200 rpm, A4 – 1750 rpm. Partículas de proteínas + ACYS obtidas após a etapa de centrifugação. Aumento de 400X para a amostra A3 e de 40X para a amostra A4.



Nas micrografias A3 e A4 pode-se perceber que as partículas formadas são esféricas mas com tamanhos bastante distintos. Na micrografia A4 a velocidade de agitação foi aumentada para 1750 rpm houve uma diminuição no tamanho das partículas mas aumentou também o índice de polidispersão. Isto pode ser melhor evidenciado na curva de distribuição de partícula (formulação A4) que apresenta uma distribuição bimodal na qual 10 % das partículas formadas apresentam tamanho igual ou menor do que 6,08  $\mu\text{m}$ .

Na micrografia A4 algumas gotas menores (possivelmente de óleo) parece estar se formando dentro das gotas da fase aquosa composta de proteínas + ACYS.

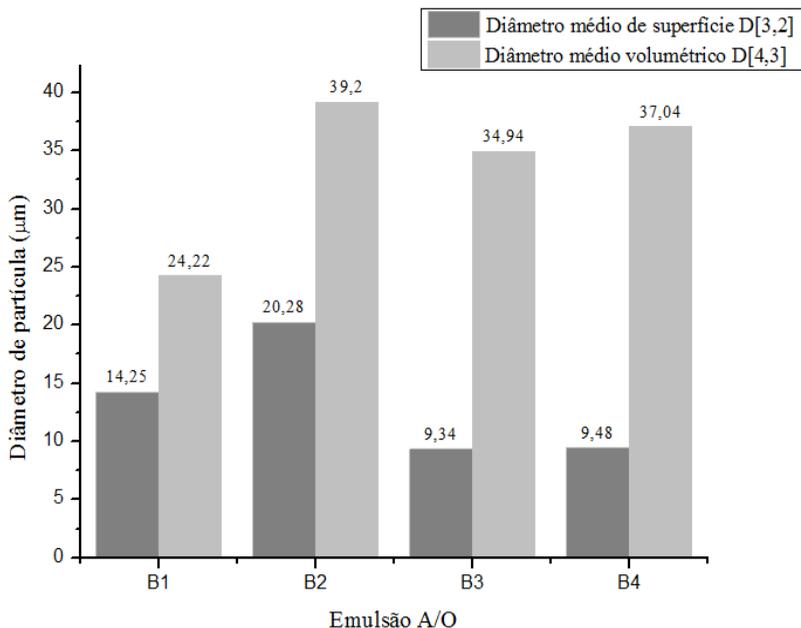
#### 6.4.4 - Influência da adição do emulsificante lipofílico na distribuição do tamanho de partícula

Para avaliar a influência da adição de emulsificante lipofílico na formação e na distribuição do tamanho das partículas formadas, 2,5 % (m/m) de span 80 foram adicionados a fase oleosa. O emulsificante foi disperso na fase oleosa em temperatura de 50 °C sob agitação.

A Figura 6.17 apresenta os valores dos diâmetros médios de superfície  $D_{32}$  e o diâmetro médio volumétrico  $D_{43}$  para as diferentes

emulsões A/O testadas com diferentes velocidades de agitação (300, 800, 1200 e 1750 rpm). As formulações foram testadas com uma fração de solução de proteína de 15 % m/m dispersa em 85 % (m/m) da fase oleosa (óleo de girassol).

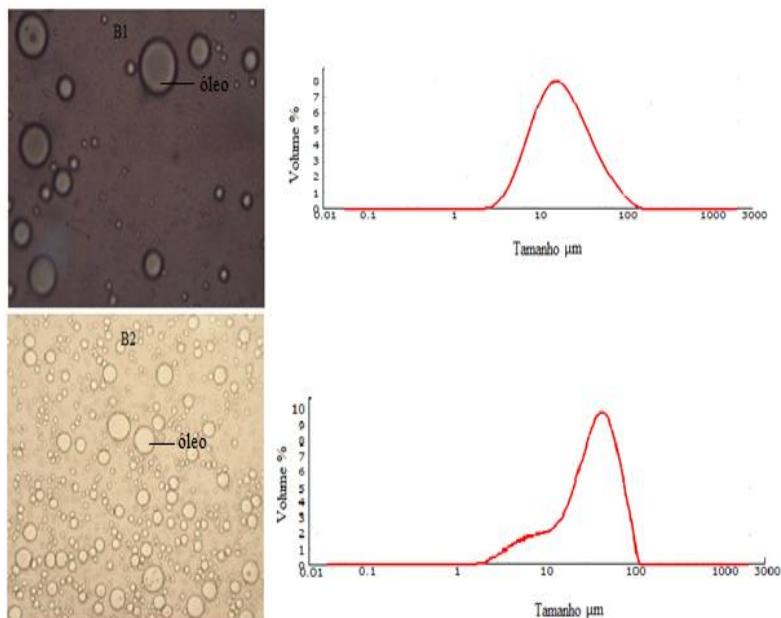
**Figura 6.17** - Diâmetro médio superficial  $D_{32}$  e diâmetro médio volumétrico  $D_{43}$  para as emulsões A/O: B1 – 300 rpm; B2 – 800 rpm; B3 – 1200 rpm e B4 – 1750 rpm utilizando na fase oleosa o emulsificante lipofílico span 80 (2,5 % m/m). A fração volumétrica da solução de proteínas foi de 15 % (m/m) dispersa em uma fração volumétrica oleosa de 85 % (m/m).



O diâmetro de Sauter  $D_{32}$  e o diâmetro médio equivalente de Broucker,  $D_{43}$  obtidos para as formulações testadas com a adição do emulsificante lipofílico span 80, 2,5 % (m/m), foram menores do que as formulações testadas sem a adição do emulsificante (ver tabela 6.3), além disto, o emulsificante é utilizado para impedir a agregação e a coalescência das partículas durante o aquecimento. Neste estudo foi utilizado um éster de sorbitano (span 80) que é tipicamente empregado para a produção de micropartículas induzidas pelo calor de proteínas de soro de leite (BELTZ *et al.*, 2011).

As partículas das emulsões foram observadas por microscopia ótica e são apresentadas nas Figuras 6.18 e 6.19.

**Figura 6.18** Imagens da microscopia ótica das partículas de proteínas + ACYS preparadas em diferentes velocidades de agitação e com a adição de emulsificante lipofílico span 80 (2,5 % m/m): B1 – 300 rpm, B2 – 800 rpm. Gotículas de proteínas + ACYS obtidas após a etapa de centrifugação. Aumento de 40X para a amostra B1 e B2.



Após a distribuição de tamanho de partícula as emulsões A/O foram visualizadas por microscopia ótica (Figura 6.18). Observando as micrografias B1 e B2 pode-se perceber que pode ter ocorrido inversão de fases da emulsão após a adição do span na fase oleosa. As gotículas formadas são de óleo em água ao invés de água em óleo.

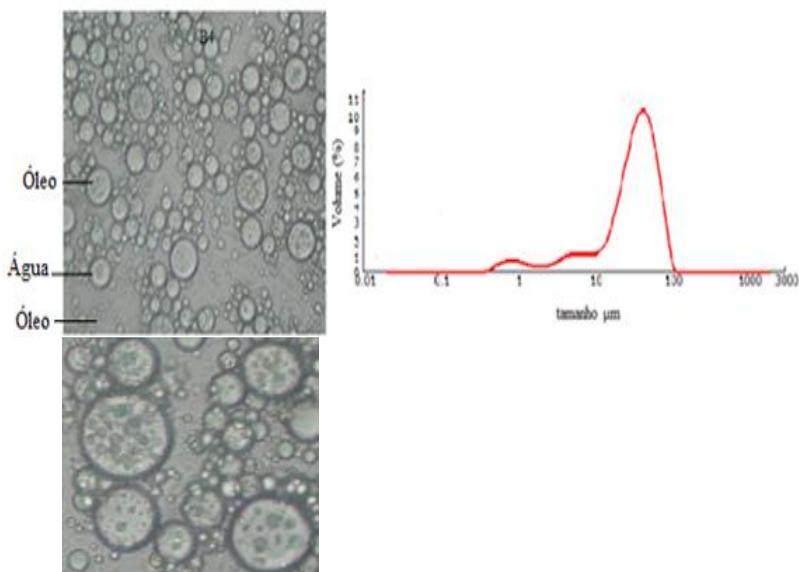
De acordo com Zügen (2012), as interações das cadeias dos emulsificantes com o óleo ou a água são alteradas com a temperatura. As forças de hidratação entre o emulsificante não iônico e a água são maiores em temperaturas mais baixas. Quando aumentada a temperatura estas forças vão diminuindo. Desta forma, as moléculas de emulsificante que apresentam maior afinidade com a água apresentam a temperatura de inversão de fases (PIT) mais elevada, pois como possuem maior número de interações, demoram mais para igualar as

afinidades entre as duas fases. Moléculas com pouca afinidade com a água, como é o caso do Span 80, com um pequeno aumento da temperatura já apresentam afinidade igual entre os dois constituintes da emulsão, resultando na inversão de fases. Para o Span 80, a inversão inicia-se em aproximadamente 38 °C, estendendo-se até 60 °C. Nesta região a tensão interfacial diminui significativamente. Por exemplo, em produtos que são submetidos a temperaturas acima de 50 C, não pode ser utilizado o Span 80, pois acarretaria na inversão ou quebra da emulsão (ZÜGEN, 2012). O span 80 foi solubilizado na fase oleosa na temperatura de 50 °C o que pode ter ocasionado a inversão da emulsão A/O para O/A. A temperatura de inversão de fases do span 80 deveria ter sido determinada pois este fato deve ser levado em conta na formulação de emulsões que precisam ser aquecidas sem perda da estabilidade.

Vários estudos têm sido realizados para explicar o papel do emulsificante adicionado em emulsões estabilizadas com proteína. Tornou-se claro que muitos emulsificantes são capazes de deslocar a proteína adsorvida a partir da superfície da gota. Esse deslocamento ocorre de forma gradual e é uma função da proporção de emulsificante para proteína, conduzindo a uma mudança gradual da composição da camada interfacial bem como das propriedades coloidais das emulsões com mudança de proteína estabilizada para emulsificante estabilizado. A razão ótima de proteínas e concentração de agente emulsificante em um produto formulado é estritamente dependente do conhecimento das características físico-químicas da interface e da cinética da sua formação (Di MATTIA *et al.*, 2009).

De fato, em contraste com os sistemas modelos, sistemas alimentares emulsionados em tempo real (ou seja, maionese, sorvete, suco de frutas) de outras moléculas, naturalmente presentes como ingredientes ou intencionalmente adicionado, podem exercer atividade superficial e tornar mais complicada a funcionalidade dos agentes emulsificantes na superfície pela competição no domínio da interface. Além disso, a presença e papel de todos os componentes hidrofílicos e lipofílicos do sistema (açúcares, solutos, gorduras ou compostos funcionais) devem ser considerados pois ambos podem modificar a composição e propriedades das fases aquosa e oleosa as propriedades superficiais, influenciando, assim, a estabilidade físico-química da emulsão (Di MATTIA *et al.*, 2009).

**Figura 6.19** Imagem da microscopia óptica das gotículas de proteínas + ACYS preparadas com velocidade de agitação de 1750 rpm e com a adição de emulsificante lipofílico span 80 (2,5 % m/m): B4 – 1750 rpm. da luz. Partículas de proteínas + ACYS obtidas após a etapa de centrifugação. Aumento de 400X para a amostra B4.



Obs.: A imagem acima foi ampliada para melhor visualização

Nesta micrografia percebe-se pequenas partículas encapsuladas dentro de gotículas maiores, sugerindo que houve a formação de uma emulsão múltipla do tipo O/A/O.

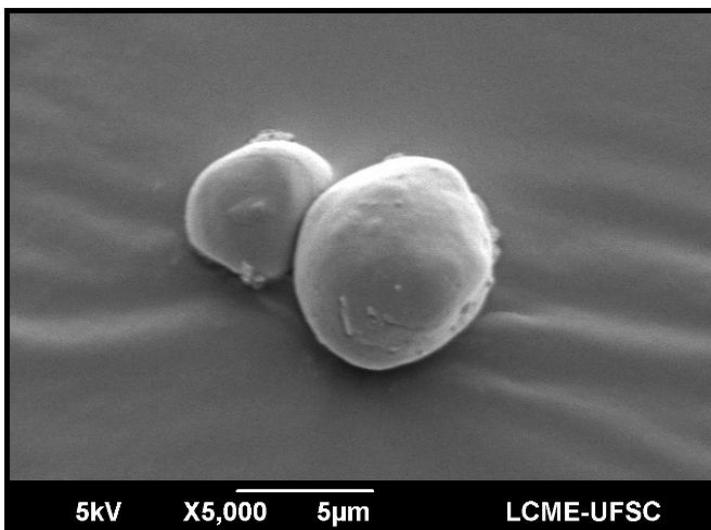
A temperatura utilizada para solubilizar o span 80 e a velocidade de agitação podem ter contribuído para a formação desta emulsão múltipla.

Outra hipótese levantada por Saglam (2012), que investigou a formação de partículas densas de proteínas do soro do leite, diz que o primeiro passo da formação das partículas é crucial, sendo que as partículas devem ser formadas pela adição lenta da fase aquosa seguida de agitação, para que se formem apenas gotículas de água em óleo A/O e não gotas de ordem superior, tais como O/A/O (óleo/água/óleo) o que pode ter ocorrido no preparo desta emulsão. Portanto um melhor controle na adição da fase aquosa, da velocidade de agitação, da concentração das fases e do volume deve ser investigado.

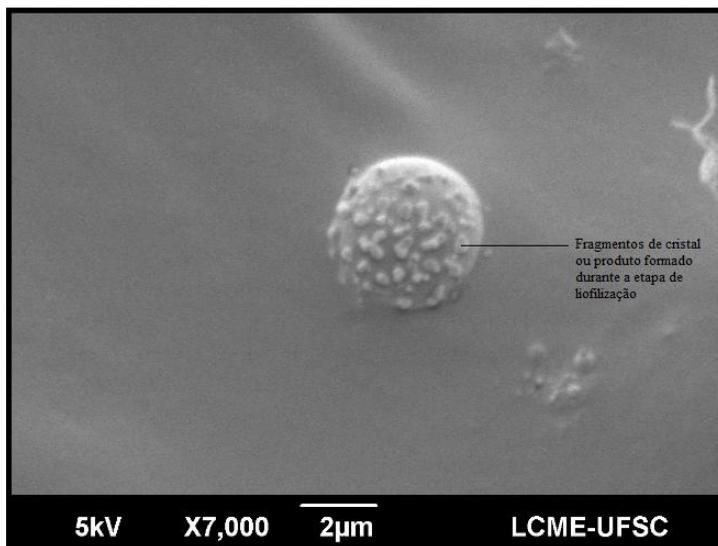
#### 6.4.5 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das partículas formadas por proteínas do soro do leite – ACYS

Nas Figuras 6.20 a 6.23 são apresentados os resultados da microscopia eletrônica de varredura (MEV) de algumas partículas produzidas pelo método da gelificação térmica com proteínas do soro do leite. As amostras das emulsões produzidas foram liofilizadas após 5 dias de armazenamento o que pode ter influenciado no resultado final das análises.

**Figura 6.20** - Microscopia da emulsão B2 obtida com proteínas do soro do leite e 2,5 % m:m de emulsificante lipofílico (span 80).

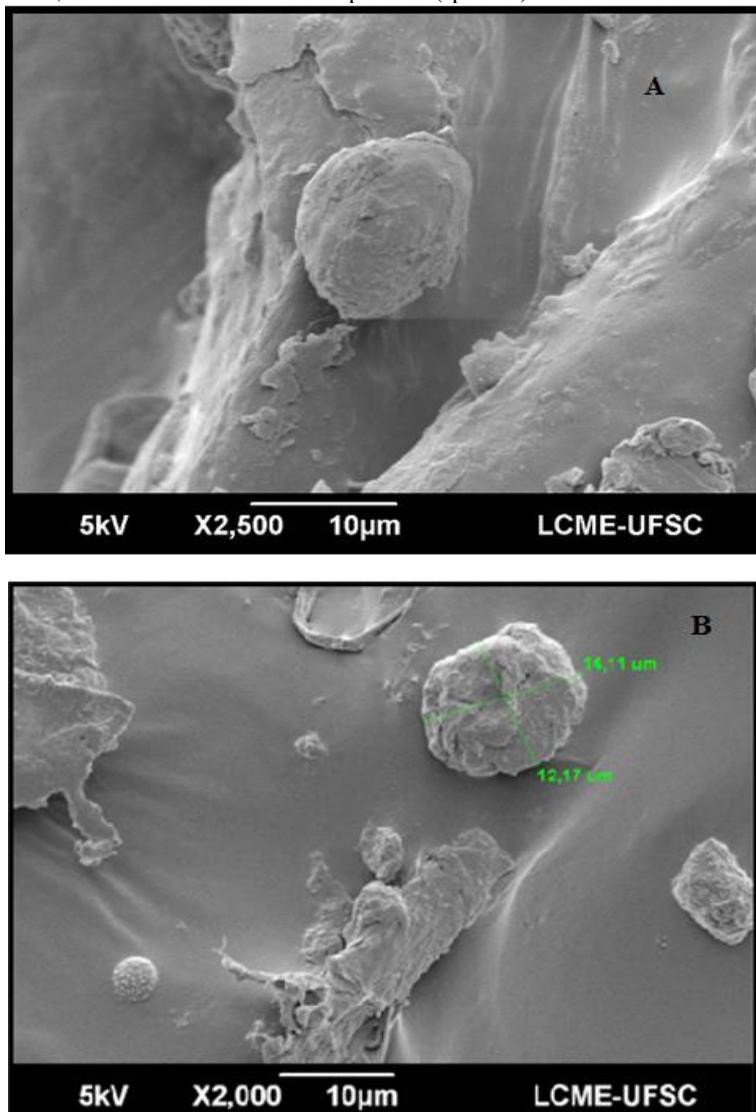


**Figura 6.20** - Microscopia da emulsão B2 obtida com proteínas do soro do leite e 2,5 % m:m de emulsificante lipofílico (span 80) (continuação).



Na Figura 6.20 observa-se que a superfície da gotícula da emulsão parece ser composta por fragmentos cristalinos que não formam uma camada contínua. É possível que estes fragmentos cristalinos, indicados na Figura por uma seta, seja algum material insolúvel presente na amostra ou algum produto que possa ter se desenvolvido devido ao método de preparação da amostra (liofilização).

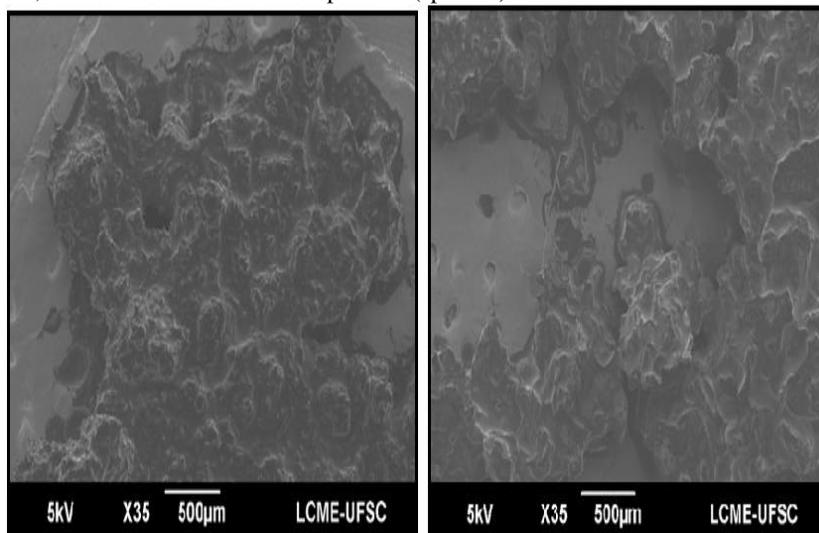
**Figura 6.21** - Micrografias da emulsão B2 obtida com proteínas do soro do leite e 2,5 % m:m de emulsificante lipofílico (span 80).



Nas micrografias 6.21 A e 6.21 B (amostra B2) a hipótese levantada, para a morfologia da emulsão, é que esta possivelmente a emulsão inverteu de fases pois há presença somente de algumas partículas que parecem ser um aglomerado de proteínas formados após a

retirada da água por liofilização. Como a fase oleosa foi retirada por centrifugação formou-se uma massa heterogênea composta de proteínas e o corante de ACYS com a presença de algumas poucas partículas.

**Figura 6.22** - Micrografia da emulsão B4 obtida com proteínas do soro do leite e 2,5 % m:m de emulsificante lipofílico (span 80).

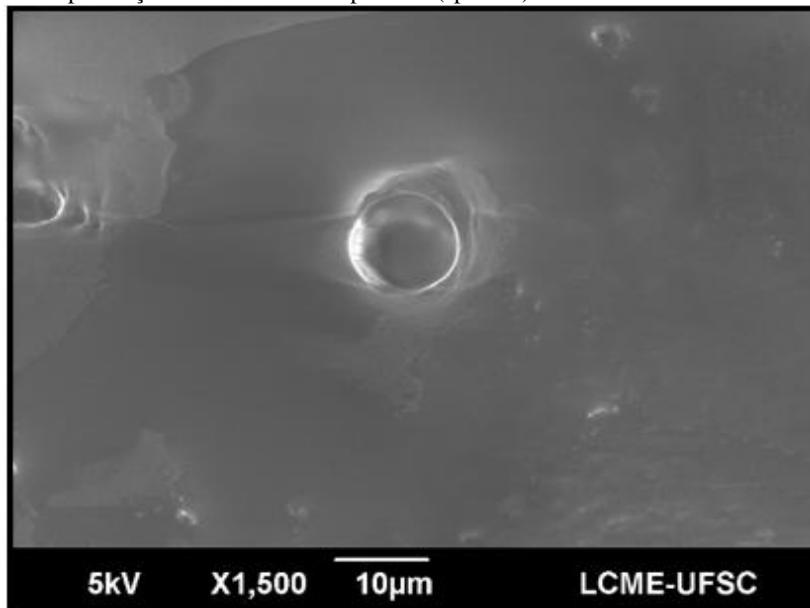


Segundo os resultados da microscopia eletrônica de varredura (MEV) para a amostra B4, as partículas de proteínas + ACYS liofilizadas aparecem como um conjunto desordenado de partículas (agregados). De acordo com Beltz et al. (2011), que encapsularam extratos de *billberry* utilizando proteínas do soro do leite em pH 3, houve um alargamento na distribuição do tamanho de partícula quando o extrato de “*billberry*” foi adicionado na fase aquosa em um percentual maior que 10 % (m:m) devido aos fenômenos de precipitação e agregação. As microcápsulas obtidas não eram esféricas e sim agregados irregulares. A agregação e a precipitação induzida durante o processo de microencapsulação são provavelmente atribuídas às interações entre as proteínas do soro do leite e os componentes fenólicos dos extratos. Estas interações dependem, entre outros fatores, das forças eletrostáticas e são portanto fortemente influenciadas pelo pH.

Essa heterogeneidade da amostra (agregados irregulares) é típica de pós preparados por liofilização (FANG e BHANDARI, 2010). Righetto e Neto (2006) ao encapsular suco de acerola verde em matrizes

de goma arábica e maltodextrina, observaram diferenças consideráveis entre as microcápsulas obtidas por atomização e liofilização, visto que as cápsulas atomizadas mostraram formas globosas, e as liofilizadas, formas totalmente indefinidas. Man *et al.* (1999) também concluíram que o tipo de processo de secagem influencia na estrutura das partículas, encontrando estruturas mais esféricas ao utilizar a atomização e irregulares com a liofilização. Essas diferenças nas estruturas podem estar relacionadas as condições de operação do processo, visto que a liofilização utiliza vácuo e baixas temperaturas, de modo que pressiona as partículas dos produtos produzindo assim partículas de menor teor de umidade e maior tamanho (SPADA, 2011).

**Figura 6.23** - Micrografia da emulsão A2 obtida com proteínas do soro do leite sem a presença de emulsificante lipofílico (span 80).



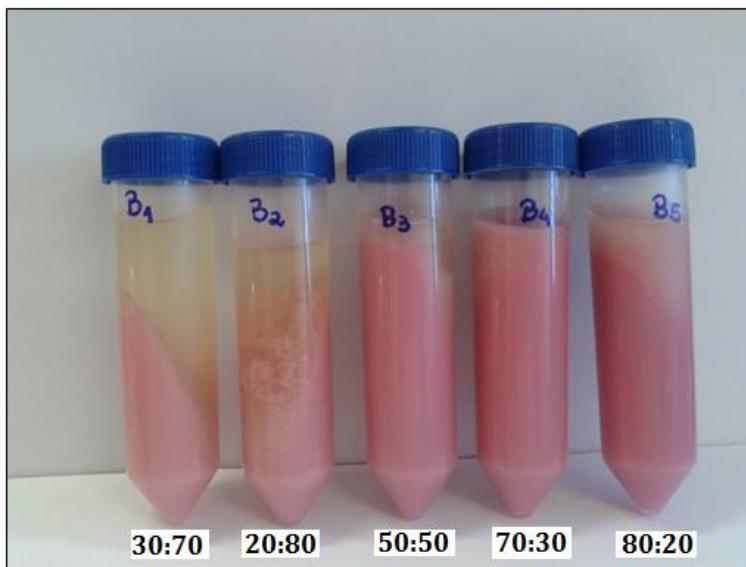
Esta micrografia corrobora com os resultados obtidos por microscopia óptica (ver figura 6.15), onde pode-se observar que uma grande quantidade de corante permaneceu na fase oleosa e poucas partículas foram formadas.

#### 6.4.6 - Influência da fração oleosa na estabilidade dos complexos formados por proteína – ACYS

Diferentes frações da fase oleosa foram testadas para avaliar a influência desta sobre a estabilidade das micropartículas formadas pelo complexo proteína–ACYS. A concentração da solução de proteínas foi mantida em 30 % (m/v).

A Figura 6.24 apresenta a aparência das formulações testadas com diferentes frações da fase oleosa.

**Figura 6.24** Imagem das formulações testadas com diferentes frações da fase oleosa. B1- Solução de proteína 30 % e fase oleosa 70 %; B2 – Solução de proteína 20 % e fase oleosa 80 % - B3 – Solução de proteína 50 % e fase oleosa 50 %; B4 – Solução de proteína 70 % e fase oleosa 30 %; B5 – Solução de proteína 80 % e fase oleosa 20%.

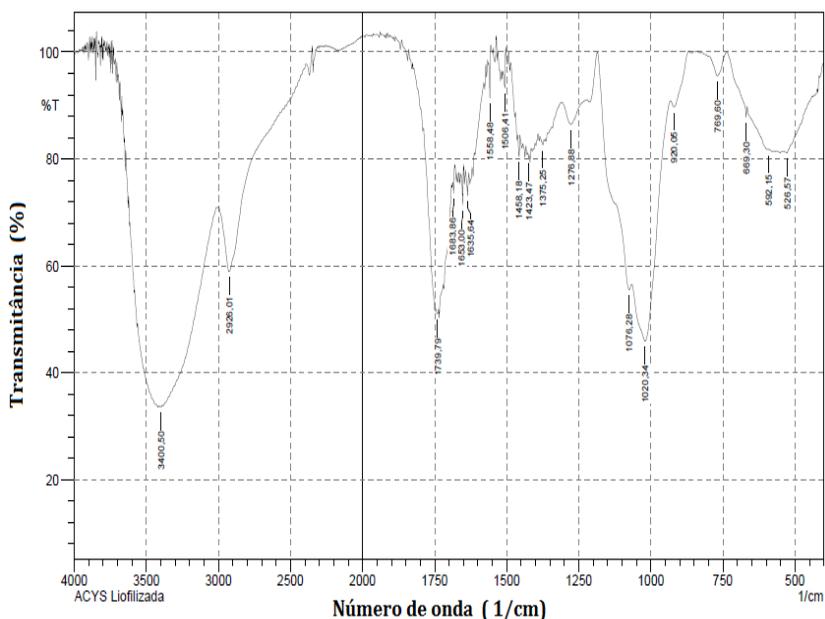


De acordo com a avaliação macroscópica as formulações que apresentaram partículas sedimentadas foram as formulações B1 e B2. Com base neste resultado, para a formação de partículas de proteínas – ACYS sedimentadas a fração da fase oleosa deve estar na faixa de 70 – 85 % (m/m) e a fração da fase aquosa (que consiste da solução de proteínas + corante de ACYS não deve ser superior a 30 % (m/m).

### 6.4.7 - Caracterização das micropartículas obtidas por emulsificação/gelificação térmica por Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

Espectros FTIR para as amostras do extrato de antocianinas liofilizado das partículas obtidas pelo método da emulsificação/gelificação térmica e para as proteínas isoladas do soro do leite foram obtidos e são apresentados nas Figuras 6.25, 6.26 e 6.27.

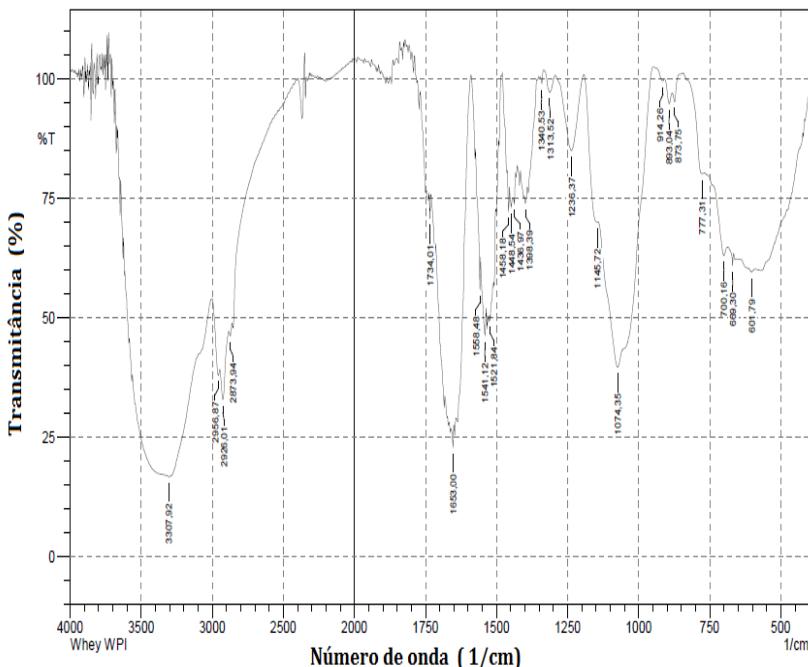
**Figura 6.25** Espectroscopia no infravermelho do corante de antocianinas liofilizado.



A banda em  $3400\text{ cm}^{-1}$  para o extrato de antocianinas liofilizado pode ser atribuída ao estiramento do grupo hidroxila O-H dos ácidos carboxílicos (COOH) do anel benzênico dos compostos fenólicos. Os picos observados em  $1683$ ,  $1558$  e  $1458\text{ cm}^{-1}$  são atribuídos ao estiramento do grupo C=O dos anéis aromáticos que são grupos típicos dos compostos fenólicos (BAGHERI *et al.*, 2013). Pico observado em  $1276\text{ cm}^{-1}$  atribuído ao C-O dos flavonoides do extrato. Pico observado em  $1076\text{ cm}^{-1}$  atribuído a deformação axial do C-O. Os picos que apareceram em  $769$  e  $669\text{ cm}^{-1}$  foram atribuídos deformação angular

pela mudança do ângulo entre as ligações C-H nos anéis benzênicos ocorridas fora do plano da molécula (SILVERSTEIN, WEBSTER, e KIEMLE, 1991).

**Figura 6.26** Espectroscopia no infravermelho das proteínas do soro do leite.

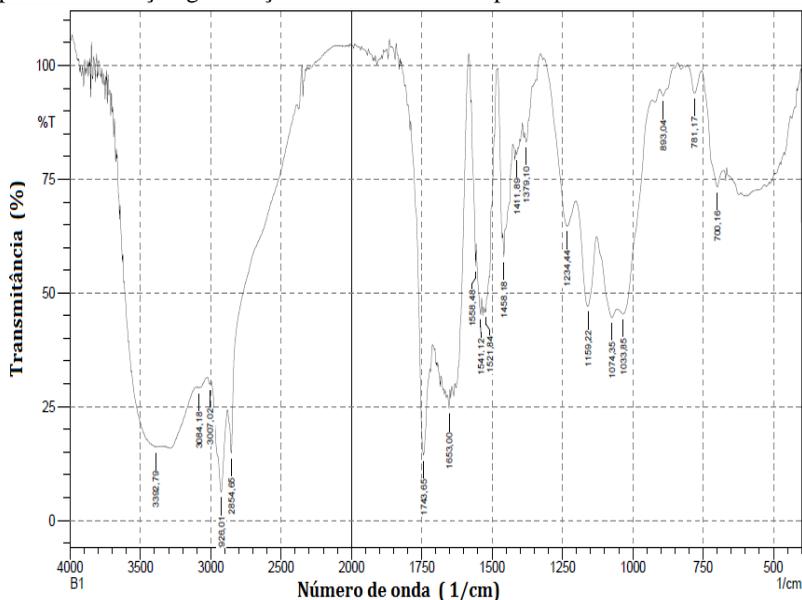


De acordo com o espectro obtido para a proteína do soro do leite observa-se um pico em  $3307,92$  e  $2956,87$   $\text{cm}^{-1}$  com intensidades médias que são responsáveis pelas vibrações causadas pela presença de amins N-H e deformação axial dos ácidos carboxílicos os quais são indicativos da presença de proteínas e gordura. Picos nas regiões entre  $1340$  a  $1074$   $\text{cm}^{-1}$  são responsáveis pelas vibrações causadas por amins aromáticas e alifáticas (deformação axial). Um pico em  $914$   $\text{cm}^{-1}$  relativo à deformação angular de alcenos marcando a presença de compostos saturados. Picos de absorção em torno de  $700 - 900$   $\text{cm}^{-1}$  são atribuídos à deformação angular de aromáticos.

No caso das proteínas, as diferentes combinações de vibrações das ligações peptídicas resultam em bandas de absorção características desse componente, conhecidas como amida I e amida II. A primeira se

encontra na faixa entre  $1600\text{ cm}^{-1}$  e  $1700\text{ cm}^{-1}$  (característico da estrutura secundária da  $\alpha$  - lactalbumina e  $\beta$  – lactoglobulina), enquanto a segunda se encontra na faixa entre  $1550\text{ cm}^{-1}$  e  $1570\text{ cm}^{-1}$  correspondente a deformação angular dos grupos do C-N e do C-N-H pela mudança do ângulo entre duas ligações ocorridas no plano de flexão da molécula (ETZION *et al.*, 2004).

**Figura 6.27** Espectroscopia no infravermelho para as micropartículas obtidas por emulsificação/gelificação térmica utilizando proteínas do soro do leite.



A análise por FTIR permitiu constatar diferenças espectrais entre as micropartículas obtidas por emulsificação/gelificação térmica do corante de antocianinas liofilizado quando comparados com o espectro das proteínas isoladas do leite.

No espectro de FTIR das micropartículas produzidas pelo método da emulsificação/gelificação térmica, o pico do grupo hidroxila das proteínas do soro do leite  $3307\text{ cm}^{-1}$  funde-se com a dos grupos hidroxílicos dos fenólicos ( $3400\text{ cm}^{-1}$ ). Os três picos  $1683$ ,  $1558$  e  $1458\text{ cm}^{-1}$  específicos dos compostos fenólicos desaparecem com a sobreposição da amida I e amida II e com a deformação angular do C-H da proteína isolada do leite (Figura 6.27). Picos devido à deformação angular fora do plano de ligações C-H, em  $769$  e  $669\text{ cm}^{-1}$  dos anéis

benzênicos (extrato) desapareceram pelo efeito da sobreposição fora do plano das ligações N-H das proteínas e reapareceram em posições semelhantes ( $896$  e  $781\text{ cm}^{-1}$ ) nas micropartículas (BAGHERI, 2013).

Todas as informações obtidas refletem que as antocianinas obtidas do extrato da borra do vinho tinto foram aprisionadas fisicamente nas micropartículas.

#### **6.4.8 - Eficiência de encapsulação**

A eficiência de incorporação das antocianinas nas partículas de proteínas do soro do leite foi avaliada pela razão entre a quantidade de corante de antocianinas efetivamente encapsulado e a quantidade inicial empregada na formação das micropartículas.

Utilizando a técnica de UV-Vis descrita na metodologia (6.3.8) foram obtidos os valores para a eficiência de encapsulamento (EE). Para as amostras testadas sem a adição de span a eficiência média de encapsulamento foi de  $73,1\%$ .

### **6.5 – CONCLUSÕES**

Elementos de estrutura pré-fabricadas (ex.: proteínas do soro do leite) podem ser um caminho possível para criar produtos com propriedades desejadas. Neste estudo, mostrou-se que as partículas de proteínas do soro do leite, podem ser utilizadas como um possível elemento de estrutura.

Para a formação de partículas de proteínas do soro do leite +ACYS a concentração da solução de proteínas não deve ser superior a  $30\%$  (m/v).

A fração da fase aquosa, constituída da solução de proteínas mais o corante de antocianinas concentrado, ideal para a formação das partículas foi de  $15\%$  (m/m) e da fase oleosa  $85\%$  (m/m).

Após a etapa de centrifugação as partículas foram secas a temperatura ambiente porém, estas não foram lavadas para a retirada do óleo residual e uma quantidade significativa de óleo ainda estava presente nas partículas o que pode ter contribuído para o aumento no diâmetro da partícula. Sugere-se a utilização de um protocolo para a lavagem com uma combinação de solventes que possa remover o óleo sem que ocorram perdas do material encapsulado.

As partículas de proteína do soro do leite – ACYS preparadas pelo presente método tinham formato esférico mas não eram uniformes. A adição de span 80 na fase oleosa possivelmente alterou as

características da emulsão de A/O para O/A devido a temperatura utilizada no processo de emulsificação (80 °C) com isto, as interações das cadeias do emulsificante com o óleo podem ter sido alteradas com a temperatura. Moléculas com pouca afinidade com a água, como é o caso do Span 80, com um pequeno aumento da temperatura já apresentam afinidade igual entre os dois constituintes da emulsão, resultando na inversão de fases.

Em resumo, partículas de proteínas do soro do leite +ACYS têm um enorme potencial para melhorar a qualidade de alimentos, bebidas ou na incorporação destes em formulações cosméticas o desafio está em desenvolver os métodos e as técnicas que podem ser utilizados para fabricar esses sistemas.

## 6.6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Pesquisa futura em sistemas utilizando elementos de estrutura pré-fabricadas (por exemplo, proteínas do soro do leite) deve se concentrar no desenvolvimento e/ou refino dos métodos utilizados para a preparação das partículas ou, adaptação do método atual para que estes possam ser utilizados por exemplo na indústria alimentícia. Avanços nesta área chegarão a partir de uma compreensão maior da estrutura e das interações destes elementos com os polifenóis (ACYS).

- ✓ Investigar a estabilidade térmica e, as propriedades reológicas das emulsões formadas pelas partículas de proteínas do soro do leite – ACYS em diferentes meios de dispersão ou seja, a emulsão A/O obtida pode ser dispersa em meio aquoso contendo caseinato de sódio ou goma arábica como estabilizantes.
- ✓ Utilizar velocidades de agitação superiores as utilizadas neste estudo durante a emulsificação primária (emulsão A/O);
- ✓ Testar outros solventes para lavar as partículas de proteína de soro de leite após serem separadas da fase oleosa;
- ✓ Testar outros emulsificantes lipofílicos;
- ✓ Em relação à metodologia experimental, seria interessante determinar a temperatura de inversão de fases para os emulsificantes utilizados nas formulações, neste caso span 80, pois este fato, deve ser levado em conta na formulação de emulsões que precisam ser aquecidas

sem perda da estabilidade.

✓ Testar diferentes faixas de pH para avaliar a capacidade das partículas de proteínas do soro do leite incharem em função do meio ácido ou alcalino, para viabilizar a sua utilização na entrega de bioativos.

✓ Quantificar o teor de proteínas presentes no sobrenadante (fase oleosa).

✓ Também se sugere a redispersão das partículas obtidas em meio aquoso obtendo assim emulsões do tipo A/A que podem ser incorporadas em produtos alimentícios.



## **CAPÍTULO 7 - FORMULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EMULSÕES MÚLTIPLAS DO TIPO A/O/A CONTENDO O EXTRATO CONCENTRADO DA BORRA DO VINHO TINTO RICO EM ANTOCIANINAS E COMPOSTOS FENÓLICOS**

No cenário mundial, inúmeras indústrias de cosméticos, alimentos e fitoterápicos buscam a inovação, utilizando-se de matérias-primas de origens diversificadas, principalmente oriundas de vegetais, representando uma alternativa de substituição de materiais sintéticos por naturais (SOUZA e FERREIRA, 2010). No presente estudo, realizou-se o desenvolvimento e a avaliação da estabilidade de emulsões múltiplas do tipo (A/O/A) contendo extratos da borra do vinho tinto da espécie Niágara Bordô. De acordo com os resultados obtidos nas etapas de extração, purificação e identificação este resíduo é rico compostos fenólicos e flavonoides com alta capacidade antioxidante principalmente em temperaturas elevadas. As emulsões do tipo Água/Óleo foram submetidas a testes de estabilidade acelerada para evidenciar as condições em que estas mantiveram suas características físico-químicas sem grandes alterações.

### **7.1 - Introdução**

Atualmente, os produtos formulados com componentes naturais vêm ganhando cada vez mais espaço no mercado externo e nas grandes companhias. Assim, cada vez mais, incorporam-se extratos vegetais, insumos, matérias-primas e ativos naturais em diversas formulações. Entretanto, é necessária a comprovação científica desses efeitos para cada extrato vegetal, em função das composições diversificadas que possuem, tanto qualitativamente como quantitativamente (BALOGH, 2011).

Na utilização de produtos de origem vegetal, destaca-se a uva (*Vitis vinifera* L) que é uma das maiores fontes de compostos fenólicos. Os principais fenólicos presentes na uva são os flavonoides (antocianinas, flavanois e flavonois), os estilbenos (resveratrol), os ácidos fenólicos (derivados dos ácidos cinâmicos e benzoicos) e uma larga variedade de taninos (MALACRIDA e MOTTA, 2005).

A incorporação dos extratos vegetais para fins cosméticos, alimentícios e/ou farmacêuticos é uma prática bastante difundida, sendo de fundamental importância à escolha adequada do método a qual os princípios ativos de uso tópico serão incorporados, garantindo assim, a

estabilidade e absorção dos princípios ativos (SOUZA e FERREIRA, 2010).

Emulsões são amplamente empregadas como veículos pela indústria cosmética e farmacêutica. Estes sistemas permitem o transporte de ativos e/ou fármacos lipofílicos e hidrofílicos em uma mesma formulação e dependendo de suas características microestruturais possibilitam um perfil sustentado de liberação do ativo e/ou fármaco encapsulado.

### **7.1.1 - Objetivo geral**

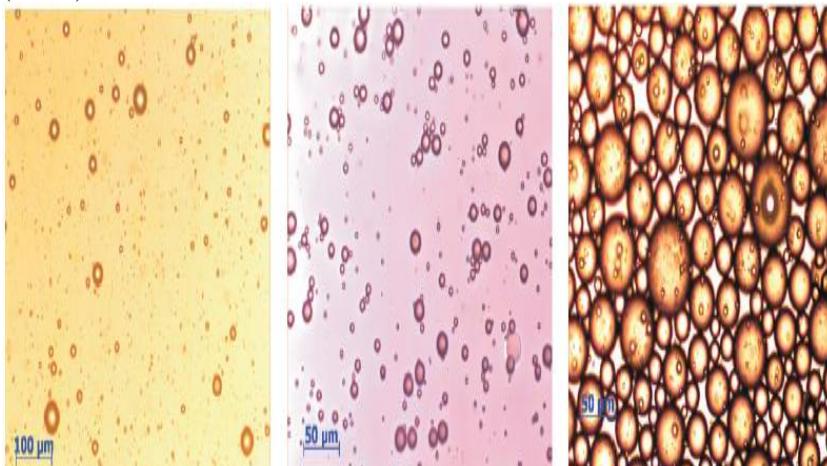
O objetivo deste estudo foi encapsular as antocianinas para aumentar a estabilidade destes compostos. Neste estudo a encapsulação foi feita utilizando emulsões múltiplas do tipo A/O/A.

## **7.2 - Emulsões**

Uma emulsão é um sistema disperso no qual as fases são líquidos imiscíveis ou parcialmente miscíveis, onde um líquido encontra-se finamente disperso no outro, na forma de gotículas (MYERS, 1999). São formadas por processos mecânicos, como agitação, resultando em sistemas de baixa estabilidade, a qual pode ser aumentada com o uso de aditivos, tais como os emulsificantes.

Em quase todas as emulsões, uma das fases é a água e a outra é um líquido oleoso. Se o óleo for a fase dispersa, a emulsão é chamada de óleo em água (O/A); se o meio aquoso for a fase dispersa é chamada de emulsão água em óleo (A/O). Há também as emulsões múltiplas, onde as gotículas da fase dispersa também contêm gotículas menores dispersas dentro delas, podendo ser classificadas em dois tipos: (1) emulsões água em óleo em água (A/O/A), onde a fase interna oleosa possui gotículas de água dispersas em seu interior e (2) emulsões óleo em água em óleo (O/A/O), em que a fase interna aquosa apresenta gotículas de óleo dispersas em seu interior (ANSEL *et al.*, 2000). A Figura 7.1 apresenta os tipos de emulsão segundo as fases que as compõem.

**Figura 7.1** Tipos de emulsão segundo os seus componentes: emulsão água em óleo (esquerda), emulsão óleo em água (centro) e emulsão múltipla a/o/a (direita).



Fonte: Robles Castilho (2011).

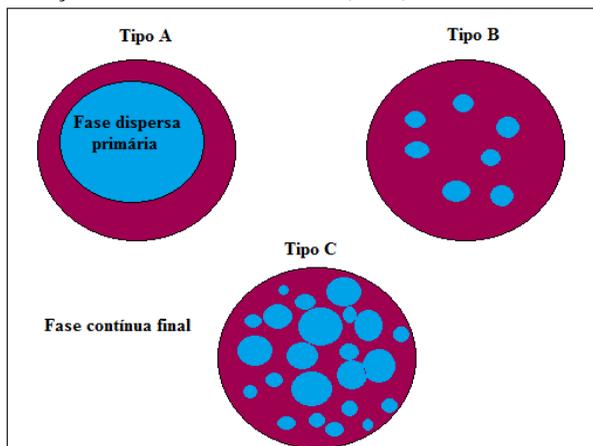
Segundo o tamanho das gotas da fase dispersa as emulsões podem ser consideradas como macroemulsões ou microemulsões. Nas macroemulsões, as gotas da fase dispersa têm diâmetros maiores a  $0,01 \mu\text{m}$ . Estes sistemas heterogêneos possuem estabilidade mínima, precisando de agentes emulsionantes ou surfactantes para serem estabilizados, evitando a coalescência das gotas. Já nas microemulsões, as gotas da fase dispersa são menores do que o comprimento de onda de luz visível (380 a 780 nm), o que faz com que sejam misturas transparentes ou translúcidas (ROBLES CASTILHO, 2011). A Tabela 7.1 apresenta as semelhanças e diferenças entre macro-emulsões e micro-emulsões.

**Tabela 7.1** - Macro-emulsões versus micro-emulsões (Fonte: ROBLES, 2011)

<b>Propriedade</b>	<b>Macroemulsão</b>	<b>Microemulsão</b>
Componentes	Óleo-água- emulsificante	Óleo-água- emulsificante
Número de emulsificantes	Um ou mais de um	Um ou mais de um
Tipo de emulsificante	Todos	Todos
Concentração de emulsificante	Muito baixo	Muito alto
Tamanho de gota	Micrômetros	0,01 – 0,001 $\mu$ m
Estabilidade termodinâmica	Instável	Estável
Estabilidade de armazenamento	Função da formulação	Infinito

Florence e Whitehill (1982) classificaram as emulsões de acordo com sua morfologia em: (a) tipo A, glóbulos múltiplos que apresentam um único glóbulo grande interno; (b) tipo B, glóbulos múltiplos que apresentam quantidade razoável de glóbulos pequenos internos e (c) tipo C, glóbulos múltiplos que apresentam grande quantidade de glóbulos pequenos internos. O tipo C é o mais útil para o emprego como veículos cosméticos e/ou farmacêuticos (Figura 7.2)

**Figura 7.2** Representação esquemática da morfologia dos glóbulos de acordo com a classificação de Florence e Whitehill (1982).

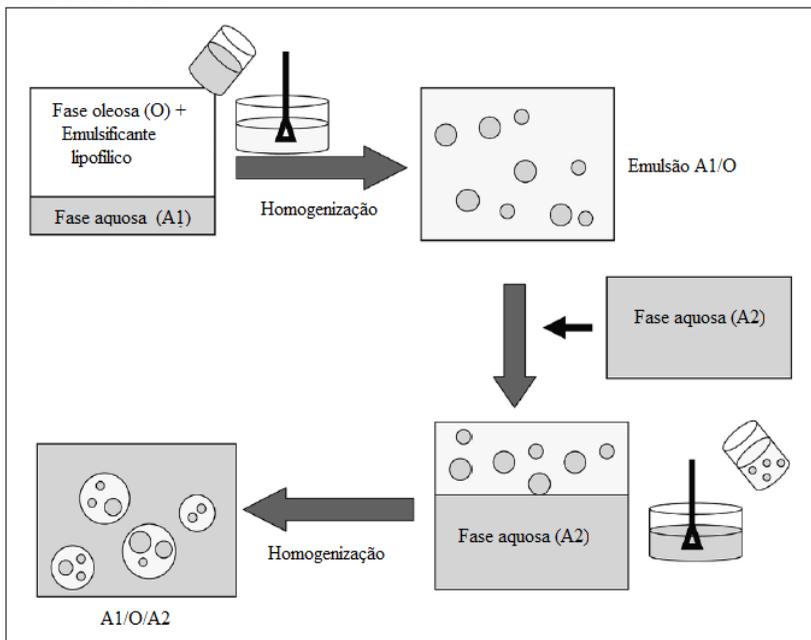


Emulsões múltiplas podem ser preparadas de dois modos: emulsificação em uma etapa ou em duas etapas. A emulsificação em uma etapa é o modo mais espontâneo e consiste na preparação de uma emulsão A/O utilizando um excesso de emulsificante hidrofóbico e uma pequena quantidade de emulsificante hidrofílico. A emulsão é aquecida até ser parcialmente invertida. Na temperatura adequada e dependendo do equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) dos emulsificantes, uma emulsão A/O/A pode ser encontrada no sistema. No entanto, este método não apresenta boa reprodutibilidade (McCLEMENTS, 2005).

O método mais utilizado na preparação de emulsões múltiplas é o da emulsificação em duas etapas (Figura 7.3), no qual são utilizados dois emulsificantes de solubilidades opostas:

- a) Emulsificante I. hidrofóbico, para a preparação da emulsão a/o.
- b) Emulsificante II. hidrofílico, para a preparação da emulsão o/a.

**Figura 7.3** Processo de emulsificação em duas etapas para a obtenção de uma emulsão A/O/A.



Fonte: COLMENERO (2012)

Na primeira fase forma-se uma emulsão água-em-óleo (A1/O) mediante a homogeneização de uma fase aquosa (A1) em outra oleosa (O), na presença de um emulsificante lipofílico capaz de produzir uma

interface A1/O. Em uma segunda etapa ocorre a homogeneização da emulsão A1/O em uma nova fase aquosa (A2) com um emulsificante hidrofílico (interface O/A2), obtendo-se assim a emulsão múltipla (A1/O/A2). A emulsão primária (A1/O) é preparada em condições de homogeneização mais enérgicas que a segunda etapa, assim a aplicação de processos de homogeneização mais suaves evita a ruptura dos glóbulos internos (A1/O). Porém, processos de homogeneização menos intensos levam a formação de sistemas polidispersos e, processos de homogeneização muito intensos reduzem a eficiência da encapsulação (COLMENERO, 2012).

### **7.2.1 - Estabilidade das emulsões**

Uma emulsão é considerada estável quando acontece pequena ou nenhuma mudança no tamanho de gota da fase dispersa num determinado intervalo de tempo. As emulsões apresentam uma tendência natural para se separarem em suas fases constitutivas diminuindo a área interfacial e conseqüentemente a energia interfacial.

A propriedade física mais importante de uma emulsão é provavelmente sua estabilidade. O termo estabilidade da emulsão pode ser empregado com relação a três fenômenos essencialmente diferentes sedimentação, floculação e quebra ou rompimento da emulsão por causa da coalescência das gotículas dispersas (MEZADRI, 2010).

A estabilidade de uma emulsão é muito importante para vários processos industriais e produtos emulsionados, mas a avaliação de sua estabilidade não é simples. Diferentes métodos para determinar a estabilidade da emulsão têm sido propostos, tais como análises de tamanho das gotas, medição das propriedades físicas de emulsão, testes acelerados e espalhamento de luz. Entre os métodos, os mais comuns são a análise de tamanho de gota e a microscopia (KIM, 2002).

Para preparar emulsões razoavelmente estáveis é necessária a presença de um terceiro componente - um agente emulsificante.

### **7.2.2 - Emulsificantes**

Os emulsificantes em geral apresentam um segmento de sua molécula com propriedades hidrofílicas e outro segmento lipofílico, servindo por isso, para compatibilizar a mistura de água com óleos, fazendo pontes entre esses componentes, formando emulsões. Estes compostos também são conhecidos como “surfactantes” (do inglês surfactant), “tensoativos”, “hipotensores” ou “emulsificantes.

A regra Bancroft dá um primeiro guia empírico para formular emulsões: quando o emulsificante é essencialmente solúvel em uma fase, essa fase tende a ser a fase contínua, sendo o outro a fase dispersa. Como consequência, uma emulsão O/A será preferencialmente obtida com um tensoativo solúvel em água enquanto que uma emulsão A/O será mais facilmente formada com um tensoativo mais solúvel em óleo (MEZADRI, 2010).

O grupo dos tensoativos não iônicos é o mais importante por diversas razões. Em primeiro lugar, a sua baixa toxicidade permite a sua utilização por via tópica, via oral e parental. Além da baixa toxicidade, apresenta menos problemas de compatibilidade e é menos sensível a mudanças de pH ou à adição de eletrólitos. Trata-se de um grupo bastante numeroso e integra compostos tanto hidrossolúveis como lipossolúveis, o que permite obter emulsões A/O ou O/A. É possível utilizar uma combinação de ambos com o objetivo de obter uma película interfacial densa. Como principal desvantagem podemos referir o seu maior custo (JATO, 1997; PRISTA, *et al.* 1995; SANTOS, 2011).

Entre os principais tipos de tensoativos não iônicos, destacam-se os ésteres de glicol e de glicerol, os ésteres de sorbitano, os polissorbatos, os ésteres de álcoois graxos e poliglicóis, e alguns álcoois graxos (JATO, 1997).

Os ésteres de sorbitano também conhecidos como a série Span®, nome com o qual são comercializados, são de caráter lipofílico, e por este motivo formam emulsões A/O. Na prática, o mais frequente é utilizá-lo em combinação com polissorbatos para obter emulsões O/A e A/O.

Os polissorbatos são derivados dos ésteres de sorbitano e do polietilenoglicol correspondendo comercialmente a série dos tween®. Além de apresentarem baixa toxicidade, são compatíveis com praticamente todos os outros tipos de tensoativos, sendo também solúveis em água. Possuem por outro lado, um pH neutro e são estáveis ao calor, às variações de pH e às elevadas concentrações de eletrólitos. Como principais desvantagens apresentam um sabor desagradável e a possibilidade de inativar alguns conservantes com os quais podem formar complexos (JATO, 1997; PRISTA *et al.*, 1995; SANTOS, 2011).

### **7.2.3 - Aplicações das emulsões múltiplas**

Numerosos estudos têm mostrado que as emulsões múltiplas A/O/A podem ser empregadas para encapsular ingredientes funcionais

(principalmente na fase aquosa interna), para a aplicação posterior como um ingrediente no processo de reformulação alimentos (MUSCHIOLIK, 2007).

As vantagens deste sistema são: (a) capacidade de encapsulamento de ativos cosméticos ou fármacos; (b) proteção da substância encapsulada quanto ao processo de oxidação; (c) habilidade de veicular substâncias incompatíveis, por exemplo, com características hidrofílicas/lipofílicas/hidrofílicas para emulsões A/O/A, respectivamente, em um mesmo sistema e (d) liberação prolongada do ativo ou fármaco encapsulado (BONNET *et al.*, 2010).

A seguir são apresentados alguns das aplicações das emulsões múltiplas no encapsulamento ingredientes funcionais.

✓ Vitaminas - Dependendo da sua natureza, as vitaminas podem ser incorporadas nas emulsões múltiplas de forma diferente. Vitaminas solúveis em água (C e grupo B) foram encapsuladas em emulsões A/O/A, o tipo O/A/O pode ser mais adequada no caso de vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K). Vitamina C é um nutriente envolvido em numerosas funções fisiológicas, cuja estabilidade é protegida por encapsulação em emulsões múltiplas (CARRILHO-NAVAS 2012).

✓ Os carotenoides - Compostos são ( $\alpha$  -,  $\beta$  -, e  $\gamma$  - caroteno, licopeno, luteína, etc.) comumente encontrados nos produtos de origem vegetal, que foram atribuídos efeitos da diminuição do risco de câncer, doenças do coração, envelhecimento, etc., e cuja incorporação em alimentos apresentam problemas de estabilidade e coloração. As emulsões múltiplas foram utilizadas para minimizar estes problemas. Microcápsulas contendo tanto carotenoides hidro e lipossolúveis foram preparados por secagem por pulverização das emulsões múltiplas. Em tal sistema os carotenoides hidrossolúveis foram incorporados na fase aquosa interna, e os lipofílicos na fase lipídica (RODRÍGUEZ-HUEZO, 2004).

✓ Resveratrol - É um composto fenólico natural, que tem despertado recentemente enorme interesse por seus efeitos benéficos (incluindo a sua capacidade antioxidante, atividade anticancerígena, etc.). No entanto, pelas características (solubilidade e estabilidade) são necessárias estratégias de encapsulamento para facilitar a sua aplicação nos alimentos. Neste contexto, têm sido formuladas

emulsões múltiplas com resveratrol em diferentes fases aquosas da emulsão primária (HEMAR, 2010).

✓ As antocianinas - Pertencem ao grupo mais importante de pigmentos hidrofílicos de plantas e têm forte capacidade antioxidante, anticancerígena e efeitos de modulação do sistema imunológico. Fora do seu ambiente natural, estas moléculas são extremamente instáveis. Extratos de “Blueberry” ricos em antocianinas podem ser estabilizados na fase aquosa interna da emulsão múltipla e liberados durante a digestão gastrointestinal (FRANK, 2012).

#### **7.2.4 – Emulsificação: Metodo da Redispersão de fases**

Existem dois métodos principais de emulsificação: o de emulsificação direta e o de *wash-out*. Para o primeiro método, frações volumétricas de fases aquosa e oleosa pré-determinadas são diretamente homogeneizadas. Durante este processo despende-se de grande quantidade de tensoativos, energia térmica e mecânica. No segundo método, o recipiente de preparo é preenchido com a fase oleosa e esta submetida à agitação constante. Na fase aquosa, que será inicialmente dispersa, é então adicionada sob velocidade constante à fase oleosa (MORAIS, 2008).

Podem ocorrer dois tipos de inversão de fases em emulsões: (a) inversão transicional e (b) inversão catastrófica.

A inversão transicional pode ocorrer com mudanças na afinidade dos tensoativos não iônicos etoxilados pelas fases aquosa e/ou oleosa e pode ser induzida por fatores como temperatura, valores de EHL (equilíbrio hidrofílico-lipofílico) salinidade da fase aquosa e polaridade da fase oleosa (SALAGER *et al.*, 2004; MORAIS, 2008).

A inversão de fases catastrófica pode ocorrer quando há um aumento do volume da fase dispersa ou variações na razão dos volumes da fase aquosa e oleosa. Este tipo de inversão é irreversível e pode ocorrer em ampla faixa de frações volumétricas.

A influência da velocidade e do tempo de adição da emulsão primária à fase externa sobre o tamanho dos glóbulos formados deve ser considerada para o processo de reemulsificação. Um período de tempo insuficiente pode produzir glóbulos muito grandes, inaceitáveis para a estabilidade do sistema, enquanto períodos prolongados podem formar emulsões com glóbulos consideravelmente pequenos, porém não múltiplos. Luca *et al.* (1990) e Fox (1986) concluíram que o processo de reemulsificação é crítico para a estabilidade da emulsão múltipla.

Fatores como a adição das fases aquosa ou oleosa e o valor da temperatura de manipulação também são relevantes.

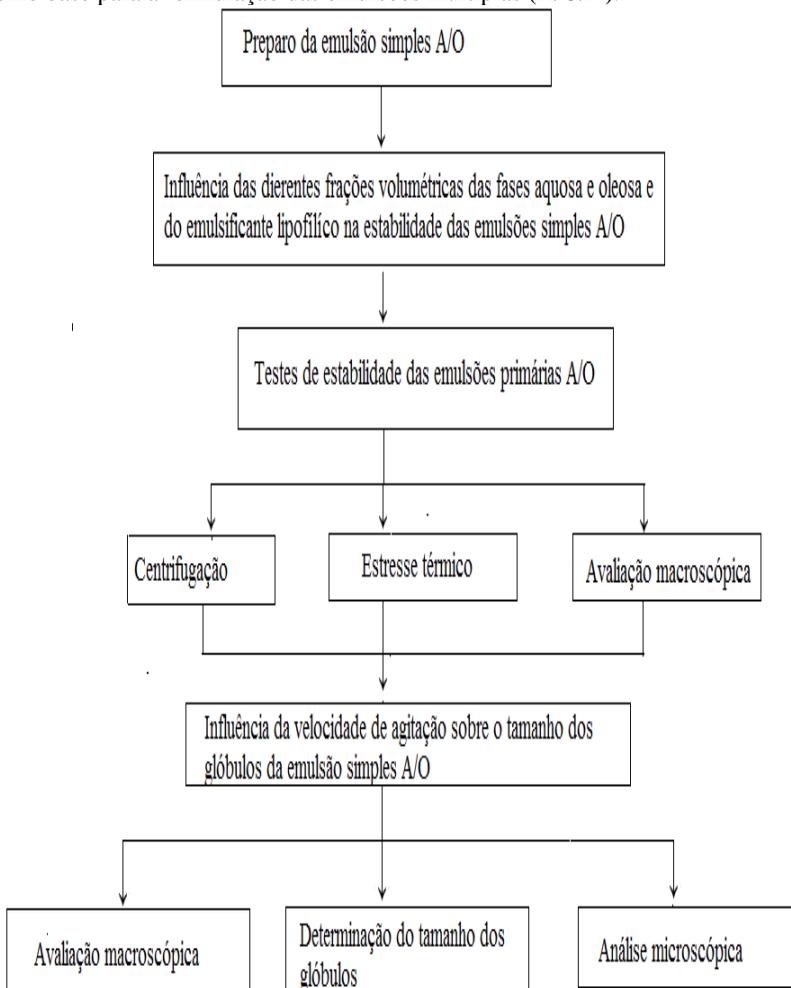
Florence e Whitehill (1982) afirmaram que a natureza da fase oleosa pode ter grande influência na estabilidade de um sistema múltiplo. Como regra geral sabe-se que os óleos minerais produzem sistemas mais estáveis que os óleos vegetais (DAVIS; WALKER, 1983). Quanto aos tensoativos utilizados Laugel *et al.* (1998) verificaram que concentrações muito baixas do tensoativo hidrofílico utilizado no processo de reemulsificação para sistemas (A/O/A) podem não ser suficientes para produzir uma emulsão estável.

Alterações na estabilidade podem ser mensuradas através da quantificação dos glóbulos múltiplos durante um período de tempo determinado e as análises microscópicas podem monitorar mudanças significativas na morfologia dos glóbulos (BURGESS, 2003).

### **7.3 – MATERIAIS E MÉTODOS**

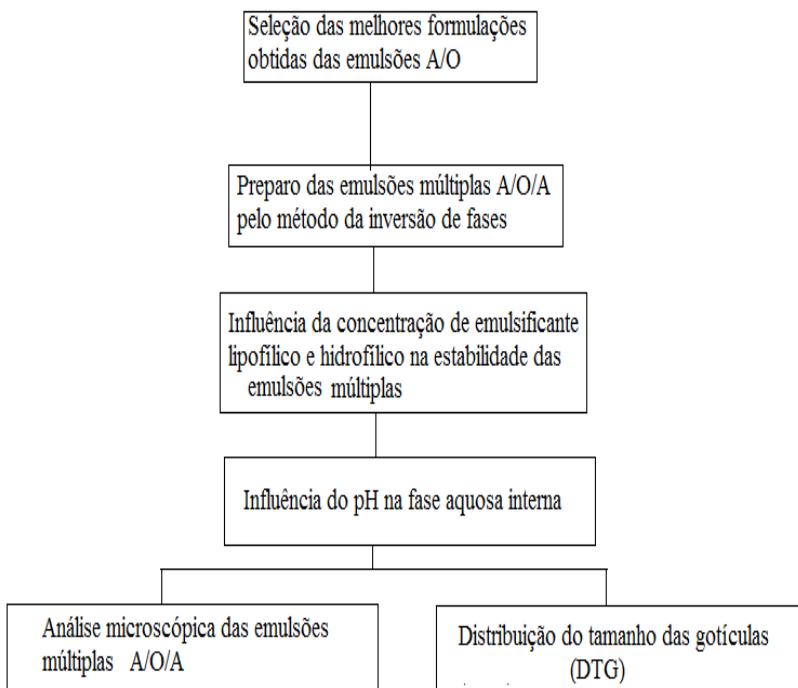
A seguir é apresentada a metodologia utilizada na preparação das emulsões múltiplas A/O/A. Na Figura 7.4 é apresentada primeiramente a formulação das emulsões simples A/O das quais, foram selecionadas as formulações que apresentaram maior estabilidade para servir como base na formulação das emulsões múltiplas A/O/A.

**Figura 7.4** – Diagrama da obtenção das emulsões simples A/O que serviram como base para a formulação das emulsões múltiplas (A/O/A).



O Diagrama (Figura 7.5) a seguir mostra como foram obtidas as emulsões múltiplas A/O/A a partir da seleção das melhores formulações obtidas no fluxograma 7.4.

**Figura 7.5** – Diagrama de obtenção das emulsões múltiplas A/O/A pelo método da inversão de fases.



Nos itens a seguir são apresentados os materiais e os métodos utilizados para a obtenção das emulsões múltiplas A/O/A contendo o extrato concentrado de ACYS (antocianinas).

### 7.3.1 – Materiais

#### ✓ Fase aquosa interna e externa

A fase aquosa interna e externa das emulsões A/O e das emulsões múltiplas A/O/A foram inicialmente preparadas com água recém destilada sem a adição do corante de antocianinas. Quando o corante de antocianinas foi adicionado na fase aquosa interna esta solução foi tamponada com KCl 2M e HCl 2 M para obter uma solução de pH 3,0.

### ✓ Fase oleosa

Como fase oleosa foi utilizado óleo mineral. Segundo Florence e Whitehill (1989) a natureza da fase oleosa pode ter grande influência na estabilidade de um sistema múltiplo.

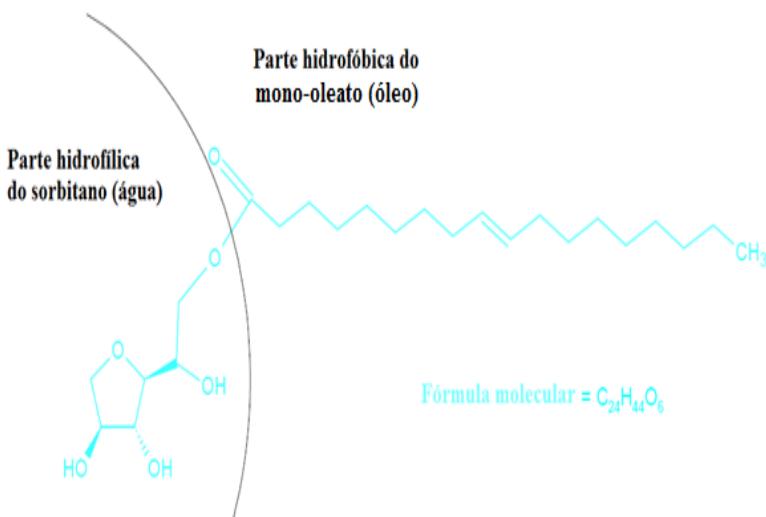
Como regra geral sabe-se que os óleos minerais produzem sistemas mais estáveis do que os óleos vegetais (DAVIS e WALKER, 1983). Vasudevan e Naser (2002) observaram que a eficiência na produção de sistemas múltiplos é maior quando óleo mineral é utilizado ao invés de óleos vegetais, que apresentam composição mais complexa (MORAIS, 2008).

Esta fase oleosa foi selecionada devido ao fato de que, como emulsificante lipofílico foi utilizado span 80 e, de acordo com Su (2008), span 80 pode formar emulsões A/O e A/O /A estáveis quando utilizado com óleo mineral como fase orgânica.

### ✓ Emulsificantes

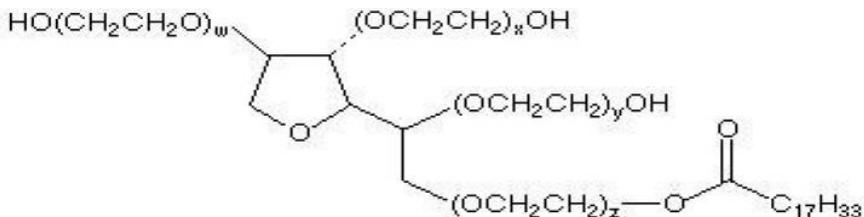
**Span 80 (Figura 7.6):** Mono-oleato de sorbitano. Utilizado como emulsificante hidrofóbico da emulsão múltipla. É um emulsificante não iônico. O emulsificante hidrofóbico mono-oleato de sorbitan (span 80) foi obtido da Sigma Aldrich.

**Figura 7.6** Estrutura molecular do mono-oleato de sorbitan – Span 80.

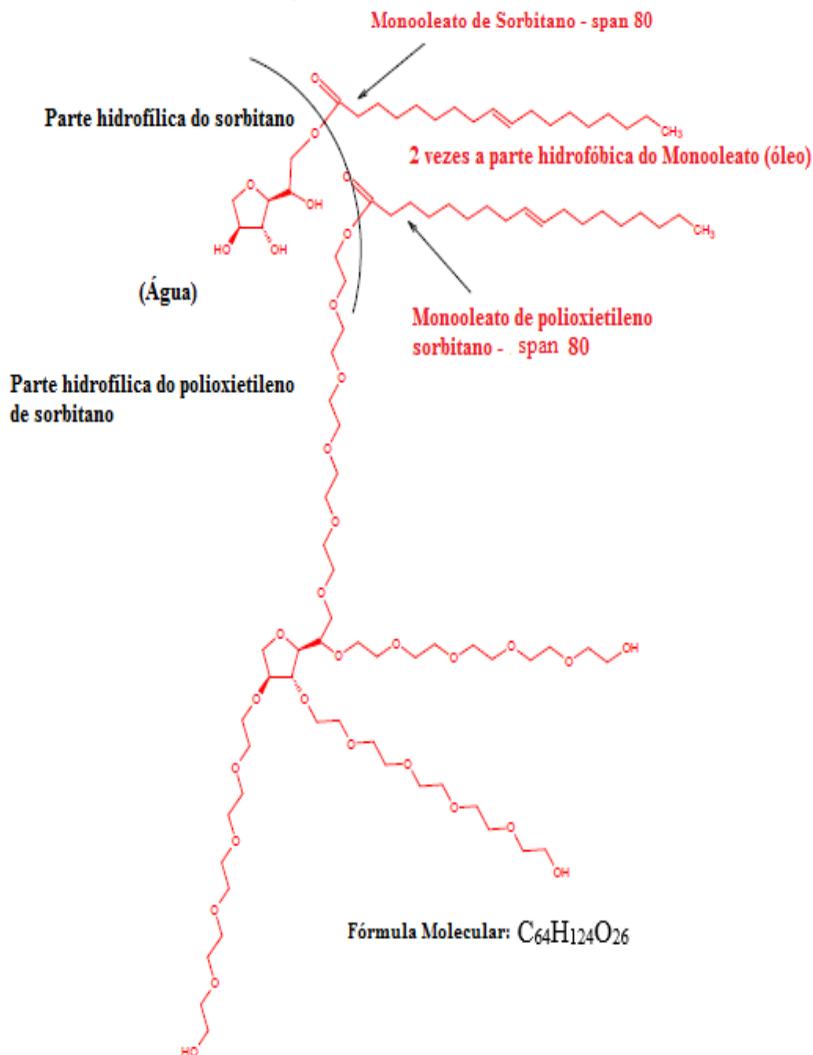


**Tween 80 (Figura. 7.7):** Mono-oleato de polioxietileno sorbitano. Utilizado como emulsificante hidrofílico da emulsão múltipla. É um emulsificante não iônico amplamente utilizado em formulações farmacêuticas parenterais. O emulsificante hidrofílico (tween 80) foi obtido da Sigma Aldrich.

**Figura 7.7** Estrutura molecular do tween 80



**Figura 7.8** - Estrutura molecular do polioxietileno sorbitano – Tween 80 e do mono-oleato de sorbitano - Span 80.



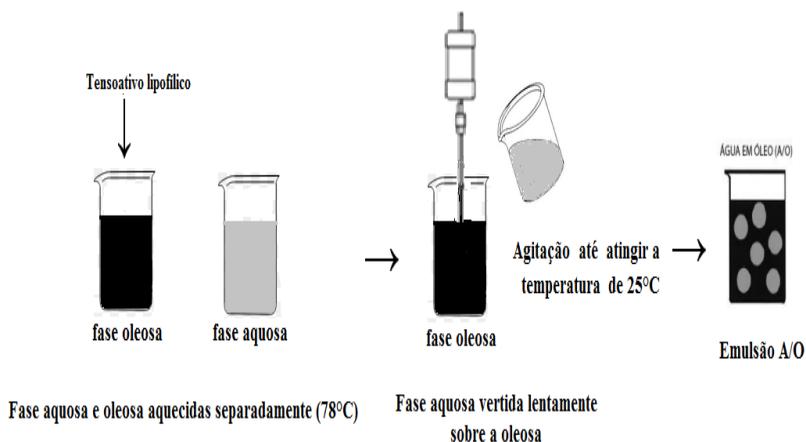
Fonte: Taylor, 2011

## 7.3.2 - Métodos

### 7.3.2.1 - Preparo da emulsão simples A/O

As emulsões simples foram obtidas pelo método da emulsificação por inversão de fases com aquecimento. O tensoativo mono-oleato de sorbitano foi solubilizado na fase oleosa (óleo mineral). As fases aquosa e oleosa foram aquecidas separadamente à temperatura de  $78\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A fase aquosa foi vertida sobre a oleosa sob diferentes velocidades de agitação (agitador mecânico) até que a emulsão adquirisse a temperatura ambiente ( $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), de acordo com a metodologia descrita por Gonçalves (2000). A Figura 7.9 apresenta uma representação esquemática dos passos do preparo da emulsão simples A/O.

**Figura 7.9** Representação esquemática da preparação da emulsão simples A/O.



### 7.3.2.2 - Influência das diferentes frações volumétricas das fases aquosa e oleosa e do emulsificante lipofílico na estabilidade das emulsões simples A/O

Para avaliar a influência de diferentes proporções dos volumes das fases aquosa e oleosa e da adição do emulsificante lipofílico na estabilidade da emulsão primária A/O, foram preparadas diferentes quantidades das três matérias-primas base desta formulação: emulsificante, óleo mineral e água destilada (Tabela 7.2).

**Tabela 7.2.-** Concentração em % (m/m) dos componentes das formulações (1 a 12)

Formulações	Fase aquosa % (m/m)	Fase oleosa % (m/m)	Emulsificante lipofílico % (m/m)
1	20	80	3
2	30	70	3
3	40	60	3
4	50	50	3
5	20	80	5
6	30	70	5
7	40	60	5
8	50	50	5
9	20	80	7
10	30	70	7
11	40	60	7
12	50	50	7

### 7.3.2.3 - Testes de estabilidade das emulsões primárias A/O (Água/Óleo)

Para os testes de estabilidade foram selecionadas as formulações (Tabela 7.2) que não apresentaram separação de fases. A concentração de emulsificante lipofílico foi de 5 % (m/m) em relação ao volume da fase oleosa.

#### *a) Centrifugação*

Uma amostra de 15 g das formulações testadas foi adicionada em tubos eppendorf e submetida a uma velocidade de agitação de 3000 rpm por 30 min em centrífuga, modelo Hermle Labortechnik GmbH, Tipo:Z 300K. Em seguida, o material foi analisado macroscopicamente quanto à separação de fases de acordo com a metodologia descrita por (MEZADRI, 2010).

#### *b) Estresse térmico*

As emulsões preparadas foram submetidas a aquecimento em banho Maria na faixa de 40 °C a 80 °C, sendo que o aumento de temperatura de 5 °C em 5 °C, mantendo a temperatura por 20 min.

Estas emulsões foram macroscopicamente analisadas quanto à ocorrência de separação de fases após cada aumento de temperatura de acordo com a metodologia descrita por Mezadri (2010).

### ***c) Avaliação macroscópica***

Após a realização dos testes de variação da fração volumétrica da fase aquosa e oleosa as formulações testadas foram colocadas em tubos eppendorf e submetidas à avaliação macroscópica realizada 24 h após a manipulação da emulsão. Foram avaliados os sinais de instabilidade macroscópica, como separação de fases. Nos testes de estabilidade foram adotadas as seguintes nomenclaturas: **N** = Normal sem alteração, **SF**: separação de fases, **LS**: levemente separado.

#### ***7.3.2.4 - Influência da velocidade de agitação sobre o tamanho dos glóbulos das emulsões simples A/O***

Após a realização dos testes de estabilidade acelerada as formulações que não apresentaram separação de fases foram submetidas a variação da velocidade de agitação para verificar a influência da velocidade sobre o tamanho dos glóbulos. As amostras foram submetidas à agitação constante e contínua de 300, 600 e 1200 rpm até que a amostra adquirisse a temperatura ambiente ( $\pm 25$  °C). As formulações foram analisadas macroscopicamente além da análise tamanho das gotículas, a fim de estabelecer a melhor velocidade de agitação.

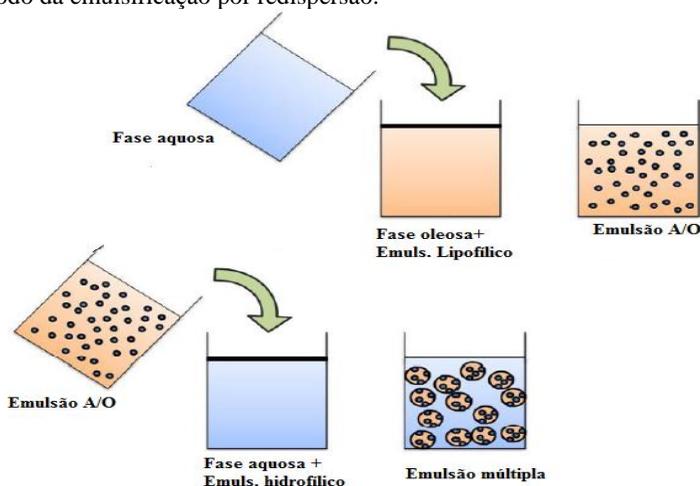
O diâmetro dos glóbulos foi determinado pelo diâmetro médio de volume-superfície ou diâmetro de Sauter  $D_{32}$  e pelo diâmetro médio de volume ou diâmetro equivalente de Broucker  $D_{43}$  utilizando o equipamento Mastersizer 2000 - Hydro 2000MU (Malvern Instruments Ltda.). A faixa de medição utilizada foi de 0,1 a 2000  $\mu\text{m}$ . Os parâmetros referidos são a média de três medições.

### **7.3.3 - Emulsões Múltiplas água/óleo/água(A/O/A)**

As emulsões múltiplas foram obtidas pelo método de emulsificação por inversão de fases. Os emulsificantes mono-oleato de sorbitano (span 80) e Polietileno 20 sorbitano mono-oleato (Tween 80) foram empregados. As fases aquosa e oleosa da emulsão primária (A/O) foram aquecidas separadamente à temperatura de  $78 \pm 2$  °C e, em seguida a fase aquosa foi vertida lentamente sobre a fase oleosa sob agitação contínua até que a emulsão adquirisse a temperatura ambiente ( $\pm 25$  °C).

A emulsão primária produzida foi reemulsionada em uma fase aquosa externa contendo emulsificante hidrofílico, sob agitação mais baixa, para evitar o rompimento dos glóbulos recém formados. Na figura 7.10 é apresentado um esquema de obtenção das emulsões múltiplas.

**Figura 7.10** Representação esquemática da Emulsão Múltipla obtida através do método da emulsificação por redispersão.



Fonte: Araújo (2012).

### ***7.3.3.1 - Influência da concentração de emulsificante hidrofílico e lipofílico nas emulsões múltiplas A/O/A***

Para avaliar a estabilidade das emulsões múltiplas, diferentes concentrações de emulsificante hidrofílico e lipofílico foram testadas. A quantidade de tensoativos foi mantida em 5 % m/m. A Tabela 7.3 apresenta as formulações testadas com diferentes concentrações de span 80 e tween 80.

**Tabela 7.3** - Formulações testadas com diferentes concentrações de span 80 e tween 80.

<b>Formulação</b>	<b>Span 80 %(m/m)</b>	<b>Tween 80 % (m/m)</b>	<b>Fração volumétrica da EP:ES (%m/m)</b>
A4-1	4,9	0,1	40:60
A8-1	4,9	0,1	60:40
A4-2	4	1	40:60
A8-2	4	1	60:40
A4-3	4,5	0,5	40:60
A8-3	4,5	0,5	60:40
A4-4	3	2	40:60
A8-4	3	2	60:40

EP: emulsão primária, ES: emulsão secundária

### **7.3.3.2 - Análise da influência do pH na fase aquosa interna**

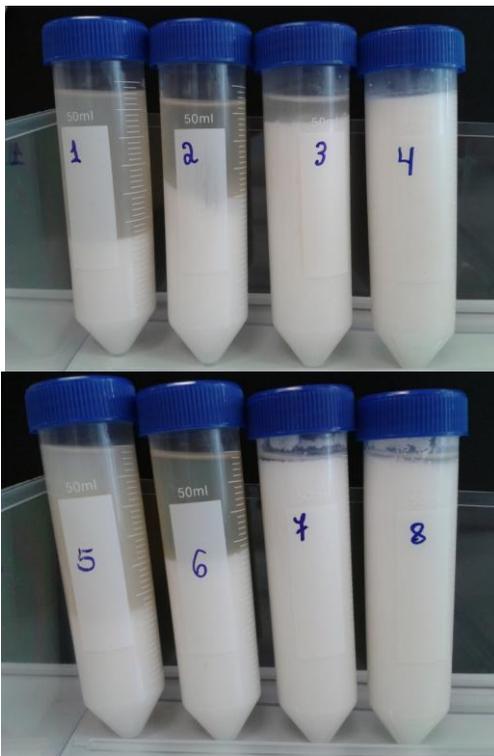
A avaliação do pH na fase aquosa interna é importante quando se pretende incorporar compostos ativos, como as antocianinas, pois estes têm um pH ótimo (pH=2,0) para realizar e manter a sua atividade biológica. Também se pretende avaliar a influência que a variação do pH terá na estabilidade das emulsões e na distribuição do tamanho das gotículas das emulsões A/O/A. Desta forma, a fase aquosa interna foi substituída por soluções com pH ajustados de 3 a 7 com KCl 0,2 M e HCl 0,2 M.

## **7.4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO**

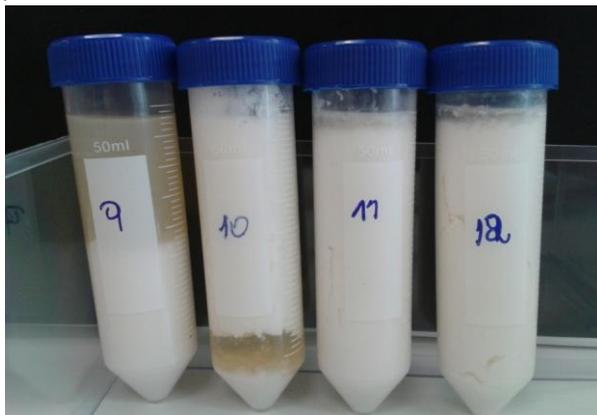
### **7.4.1 - Efeito da variação da fração volumétrica e da adição de emulsificante lipofílico na estabilidade das emulsões A/O**

No que diz respeito às emulsões múltiplas, o volume da fase primária (A/O) não tem efeito significativo sobre o rendimento das emulsões A/O/A. Portanto, uma vasta gama de volumes de fase primária pode ser usada para a formulação das emulsões múltiplas. Um volume ótimo de fase interna (25-50 %) pode ser utilizado para a formulação da emulsão (SANTOS, 2011). A observação visual das emulsões primárias A/O preparadas com diferentes frações volumétricas da fase aquosa e oleosa com diferentes concentrações de emulsificante lipofílico são apresentadas nas Figuras 7.11 e 7.12.

**Figura 7.11** Imagens das emulsões primárias A/O preparadas com diferentes concentrações de emulsificante lipofílico: (1) 20:80 com 3 % (m/m) de span 80, (2) 30:70 com 3 % (m/m) de span 80, (3) 40:60 com 3 % (m/m) de span 80, (4) 50:50 com 3 % (m/m) de span 80, (5) 20:80 com 5 % (m/m) de span 80, (6) 30:70 com 5 % (m/m) de span 80, (7) 40:60 com 5 % (m/m) de span 80, (8) 50:50 com 5 % (m/m) de span 80.



**Figura 7.12** Imagens das emulsões primárias A/O preparadas com diferentes concentrações de emulsificante lipofílico: (9) 20:80 com 7 % de span 80, (10) 30:70 com 7 % de span 80, (11) 40:60 com 7 % de span 80 (12) 50:50 com 7 % de span 80.



De acordo com os resultados experimentais obtidos (avaliação visual: amostras de 1 à 12) a concentração de span 80 ideal está na faixa de 3-5 % sendo o suficiente para estabilizar as gotas de água da coalescência. As frações volumétricas que apresentaram maior estabilidade foram de 50:50, 40:60.

#### 7.4.2 - Testes de estabilidade das emulsões simples A/O (água/óleo)

Para os testes de estabilidade das emulsões simples A/O foram selecionadas as formulações 4, 7 e 8 que não apresentaram separação de fases logo após a sua manipulação (Figuras 7.11 e 7.12). A concentração de emulsificante lipofílico foi mantida em 5 % em massa relação a fração volumétrica da fase oleosa. A Tabela 7.4 apresenta as formulações selecionadas para os testes de estabilidade.

**Tabela 7.4** - Formulações selecionadas para os testes de estabilidade.

Formulação	Fase aquosa %(m/m)	Fase oleosa %(m/m)	% de span 80 (m/m)
A4	50	50	3
A7	40	60	5
A8	50	50	5

### 7.4.3 - Influência da temperatura do estresse gravitacional e análise macroscópica

O teste de centrifugação aumenta os efeitos da força da gravidade sobre os glóbulos dispersos nas emulsões, aumentando conseqüentemente o número de colisões entre eles, ocasionando fenômenos de instabilidade no sistema como cremeação e sedimentação, permitindo a visualização destes processos na dispersão.

A Tabela 7.5 mostra os resultados da avaliação macroscópica das emulsões testadas.

**Tabela 7.5** - Análise macroscópica das formulações após a centrifugação e estresse térmico.

Formulação	Avaliação macroscópica	Centrifugação	Estresse Térmico Temperatura °C					
			40	45	50	60	65	70
A4	N	N	N	N	N	N	LS	LS
A7	N	LS	SF	SF	SF	SF	SF	SF
A8	N	N	LS	LS	LS	LS	LS	LS

Legenda: N: Normal, SF: separação de fases, LS: levemente separado.

Para avaliação do teste de centrifugação sobre a estabilidade das formulações foram estabelecidas condições padrões para a realização deste ensaio. Considera-se uma emulsão estável quando depois de centrifugada não se observam separação de fases. De acordo com a Tabela 7.5 as formulações testadas que apresentaram maior estabilidade foram às formulações A4 e A8. Segundo Jato (1997), este teste é utilizado para avaliar a estabilidade das emulsões durante a etapa de pré-formulação e pode conduzir a três fases: uma oleosa, uma intermediária e uma aquosa.

#### 7.4.4 - Efeito da velocidade de agitação e da distribuição do tamanho dos glóbulos sobre a estabilidade das emulsões A/O

##### 7.4.4.1 - Avaliação macroscópica

Para as formulações A4 e A8 que apresentaram maior estabilidade variou-se a velocidade de agitação e as características macroscópicas foram avaliadas imediatamente após a sua preparação (Tabela 7.6).

**Tabela 7.6** - Influência da velocidade de agitação sobre a estabilidade da emulsão A/O.

Formulação	Velocidade de agitação (rpm)	Características Macroscópicas
A4	300	N
	600	N
	1200	LS (Não foi avaliado porque separou de fase; parte superior)
A8	300	SF (Não foi avaliado porque separou de fase; parte inferior)
	600	N
	1200	N

Nota: N: Normal; LS: Levemente separado; SF: Separação de fases.

De acordo com Santos (2011), a agitação tal como a variação da temperatura tem uma influência profunda e complexa sobre o processo de emulsificação. Durante o período de agitação inicial requerida para a emulsificação formam-se gotículas, no entanto, à medida que a agitação continua, a probabilidade de colisão das gotículas aumenta e pode ocorrer a coalescência.

##### 7.4.4.2 - Influência da velocidade de agitação sobre o tamanho das gotículas

As emulsões simples foram manipuladas em diferentes velocidades de agitação, com o intuito de verificar a influência deste parâmetro no tamanho das gotículas.

A Tabela 7.7 apresenta os resultados obtidos para as formulações A4 e A8 em diferentes velocidades de agitação.

**Tabela 7.7** - Diâmetro de Sauter ( $D_{32}$ ) e diâmetro de Broucker ( $D_{43}$ ) obtidos para as formulações A4 e A8 em diferentes velocidades de agitação.

Amostra	Velocidade de agitação (rpm)	$D_{32}(\mu\text{m})$	$D_{43}(\mu\text{m})$	Span
A4	300	8,622	24,696	0,958
	600	6,741	17,838	1,718
A8	600	7,567	17,932	1,257
	1200	3,235	6,509	3,052

Na tabela 7.7 também é apresentado o valor span que é a medida da largura da distribuição das gotículas. Quanto menor for o valor mais estreita é a distribuição. O valor da distribuição (span) é calculado de acordo com a equação 9:

$$\text{SPAN} = \frac{Dv_{0,9} - Dv_{0,1}}{Dv_{0,5}} \quad (9)$$

Os seguintes parâmetros foram avaliados:  $Dv_{0,1}$  - diâmetro de gota tal que 10% do volume da emulsão é constituído de gotas de tamanho menor que esse valor -  $Dv_{0,5}$  - diâmetro de gota tal que 50% da emulsão é constituído de gotas de tamanho menor que esse valor, também conhecido como diâmetro mediano volumétrico (DMV) -  $Dv_{0,9}$  - diâmetro de gota tal que 90% do volume da emulsão é constituído de gotas de tamanho menor que esse valor -, SPAN (amplitude relativa).

Pode-se perceber através dos valores obtidos (Tabela 7.7) que os tamanhos das gotículas estão dentro da faixa de 3 e 25  $\mu\text{m}$ . Um aumento na velocidade de agitação diminui o tamanho médio  $D_{32}$  e  $D_{43}$  das partículas. Para as velocidades de agitação de 300 rpm e 600 rpm os gráficos apresentaram uma distribuição de tamanho de partícula monomodal com uma distribuição de tamanho das gotículas mais uniforme.

A formulação A8 (1200rpm) apresentou um diâmetro médio superficial e volumétrico ( $D_{32}$  e  $D_{43}$ ) menor que as outras formulações, mas com um valor de span de 3,052 o que caracteriza uma distribuição de tamanho de partículas bimodal onde 90 % das partículas apresentam um diâmetro menor ou igual a 14,9  $\mu\text{m}$ , 50 % das partículas apresentam um diâmetro de menor ou igual 4,4  $\mu\text{m}$  e, 10 % das partículas apresentam um diâmetro de 1,53  $\mu\text{m}$ .

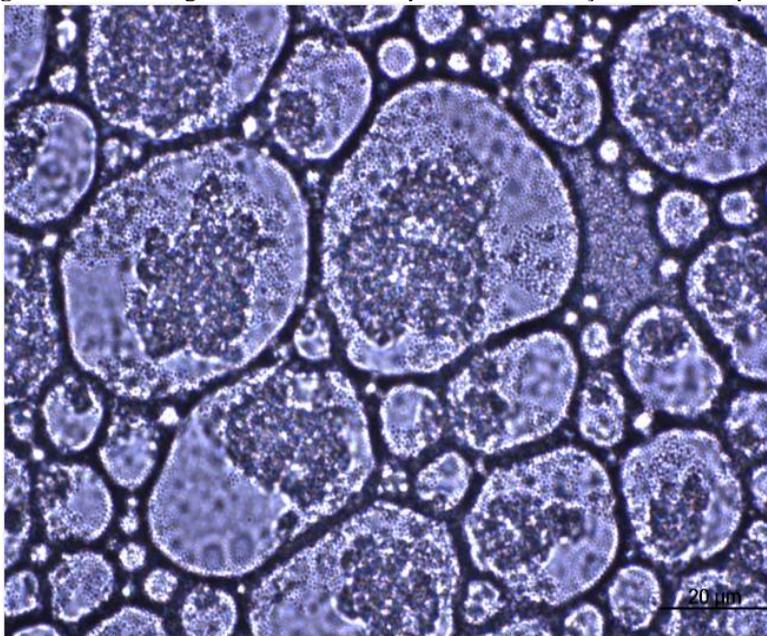
A estabilidade da emulsão primária é essencial para se obter uma emulsão múltipla estável e, é determinada diretamente pelos tipos de componentes que formam a emulsão primária A/O, estão incluídos a natureza do óleo, o tipo de emulsificante, a natureza do encapsulante da fase aquosa interna, especialmente se o encapsulante contém eletrólitos (DICKINSON *et al.*, 1994b; SU, 2008).

#### 7.4.4.3 - Análise microscópica

Quanto aos aspectos microscópicos, os seguintes parâmetros foram avaliados: (a) morfologia do glóbulo, esférica ou não; (b) distribuição de tamanhos.

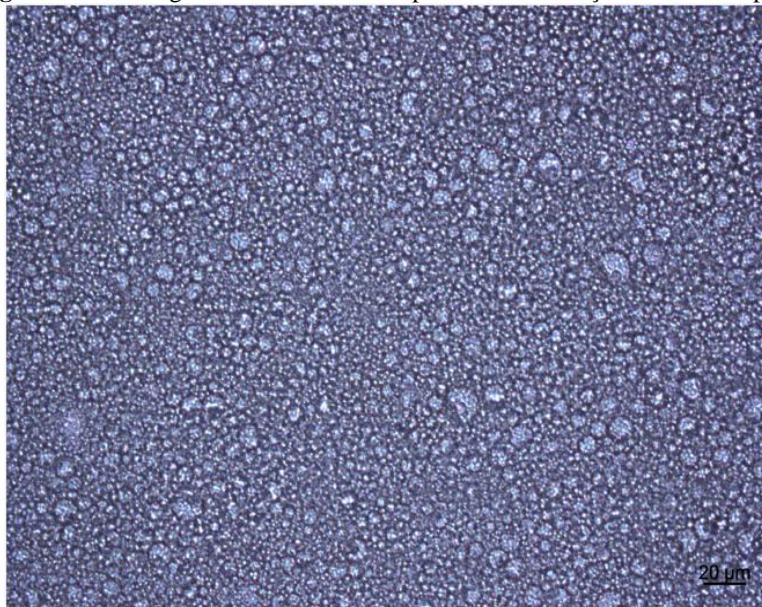
As figuras 7.13 e 7.14 apresentam as micrografias das emulsões simples A/O em diferentes velocidades de agitação.

**Figura 7.13** - Micrografia da emulsão simples A/O formulação A4 – 600 rpm



Amostra A4 – 600 rpm – 1000x

**Figura 7.14** Micrografia das emulsões simples A/O formulação A8 – 1200 rpm



Amostra A8 – 600 rpm – 1000 x

De acordo com as micrografias, o diâmetro das gotículas (20  $\mu\text{m}$ ) está coerente com o encontrado pela distribuição de tamanho de partícula medido pelo mastersize ( $\pm 17,932 \mu\text{m}$ ). Também fica evidente na micrografia da emulsão A4 que a morfologia das gotas parece não ser esféricas (apenas algumas em formato esférico) isto pode ter ocorrido devido ao fato de que estas micrografias foram obtidas sem a diluição da amostra na sua fase contínua. O que provavelmente dificultou a análise da morfologia das emulsões.

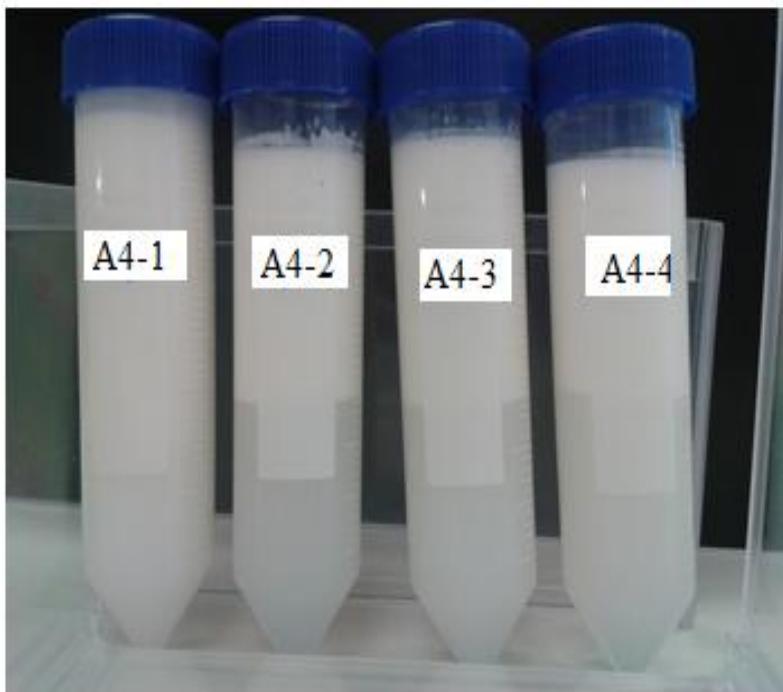
Observando a micrografia da emulsão A8 pode-se perceber que as gotículas formadas são esféricas. Também fica evidente os diferentes tamanhos de partícula (avaliação visual da micrografia). Esta micrografia também foi obtida sem a diluição da emulsão em sua fase contínua).

As emulsões primárias A4 e A8 com velocidades de agitação de 600 rpm foram utilizadas como base para a formulação da emulsão múltipla A/O/A.

#### 7.4.5 - Efeito da concentração de emulsificante hidrofílico (tween 80) e lipofílico (span 80) sobre a estabilidade das emulsões múltiplas A/O/A

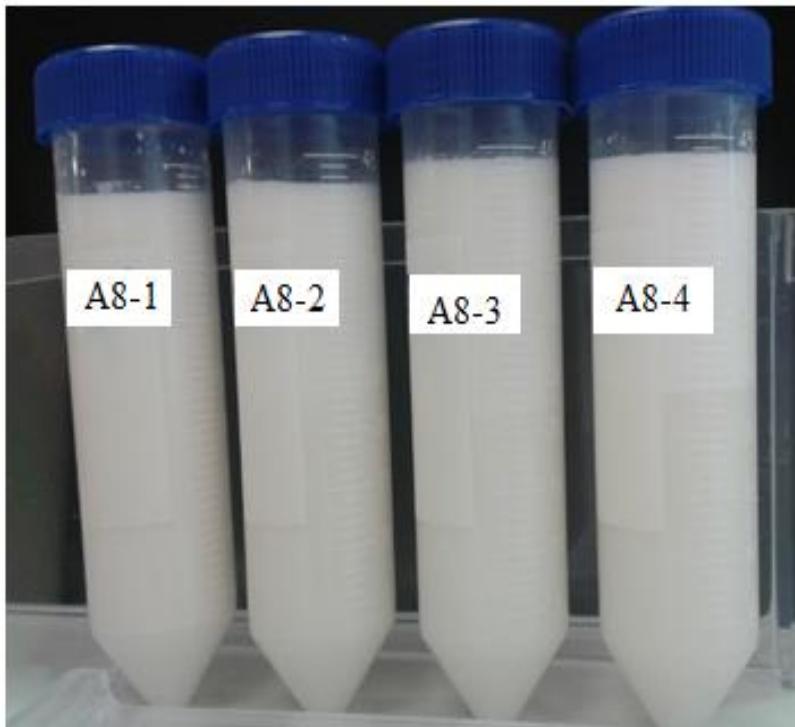
Diferentes concentrações de emulsificantes tween 80 e span 80 foram testados. A concentração de tween 80 foi variada de 0,1 a 2 % e a de span de 3 a 4,9 %, conforme descrito no item 7.3.3.1. A Figura 7.15 apresenta a aparência visual das formulações testadas com diferentes concentrações de span 80 e tween 80.

**Figura 7.15** Formulações testadas com diferentes concentrações de span 80 e tween 80: amostras A4-1 (span 80 4,9 % m/m; tween 0,1 % m/m); A4-2 (span 80 4 % m/m; tween 1 % m/m); A4-3 (span 80 4,5 % m/m; tween 0,5 % m/m); A4-4 (span 80 3 % m/m; tween 2 % m/m).



Na Figura 7.15 são apresentadas as formulações testadas com diferentes quantidades de span e tween para a formulação A4. Através da avaliação visual pode-se perceber que para a formulação A4, todas as formulações testadas apresentaram separação de fases.

**Figura 7.16** Formulações testadas com diferentes concentrações de span 80 e tween 80 para amostra A8. A8-1 (span 80 4,9 % m/m; tween 0,1 % m/m); A8-2 (span 80 4 % m/m; tween 1 % m/m); A8-3 (span 80 4,5 % m/m; tween 0,5 % m/m); A8-4 (span 80 3 % m/m; tween 2 % m/m)



As formulações A8-3 e A8-4 testadas separaram de fases após 24 h de sua manipulação. A formulação que apresentou maior estabilidade durante um período de 48 h em temperatura ambiente foi a formulação A8-1. Portanto para a emulsão múltipla testada a concentração de emulsificante lipofílico e hidrofílico que conferiu maior estabilidade para os sistemas foi 4,9 % (m/m) e 0,1 % (m/m), respectivamente.

#### **7.4.6 - Influência do pH na estabilidade das emulsões múltiplas contendo o extrato de antocianinas**

A avaliação do pH é um dos parâmetros utilizados para monitorar alterações na estrutura da formulação que nem sempre são

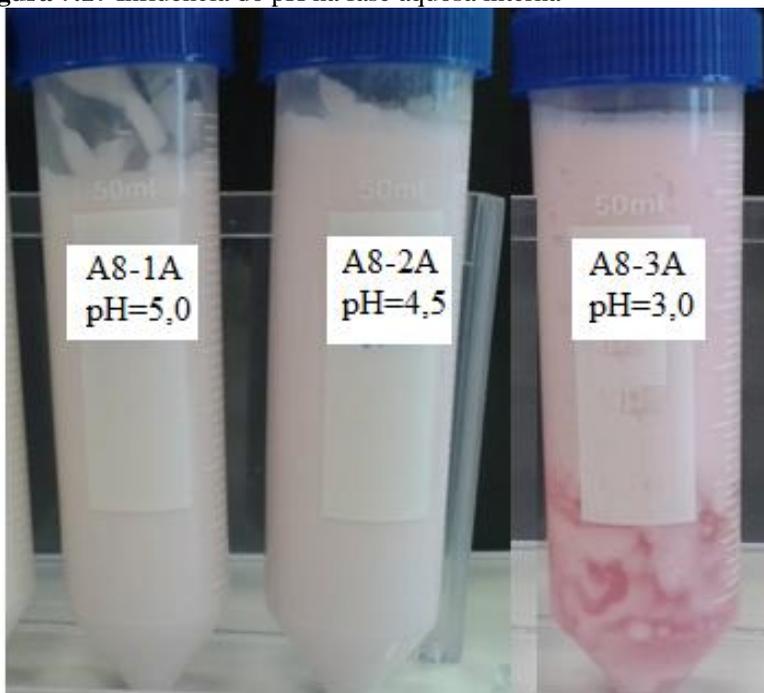
perceptíveis visualmente. Esta análise físico - química pode indicar problemas de estabilidade entre os ingredientes da formulação podendo ser reações de hidrólise e oxidação.

Para formulação A8-1 optou-se por trabalhar com diferentes pHs durante o estudo a fim de avaliar o mais apropriado para garantir estabilidade à formulação, pois os extratos de antocianinas são instáveis quimicamente dependendo do pH. As antocianinas são mais estáveis em pH baixos (entre 1 e 3). Portanto, para minimizar a degradação das antocianinas foi testado diferentes valores de pH. A faixa de pH testada para a fase aquosa interna foi de 3 a 7.

Para a formulação testada com pH 7,0 houve degradação do composto e separação de fases da emulsão múltipla (dados não mostrados), diante disto a faixa de pH testada limitou-se à faixa de 3,0 a 5,6.

A avaliação macroscópica das emulsões testadas utilizando o extrato de antocianinas concentrado são apresentadas na Figura.7.17.

**Figura 7.17** Influência do pH na fase aquosa interna



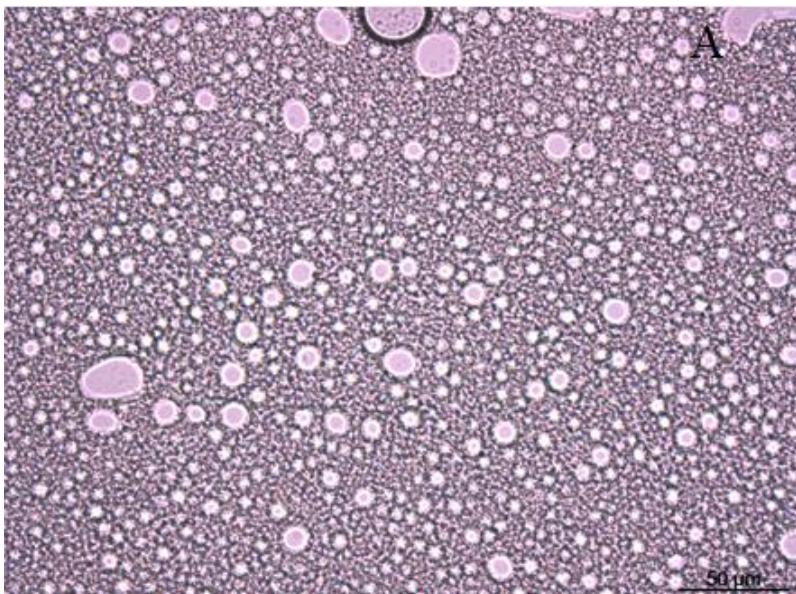
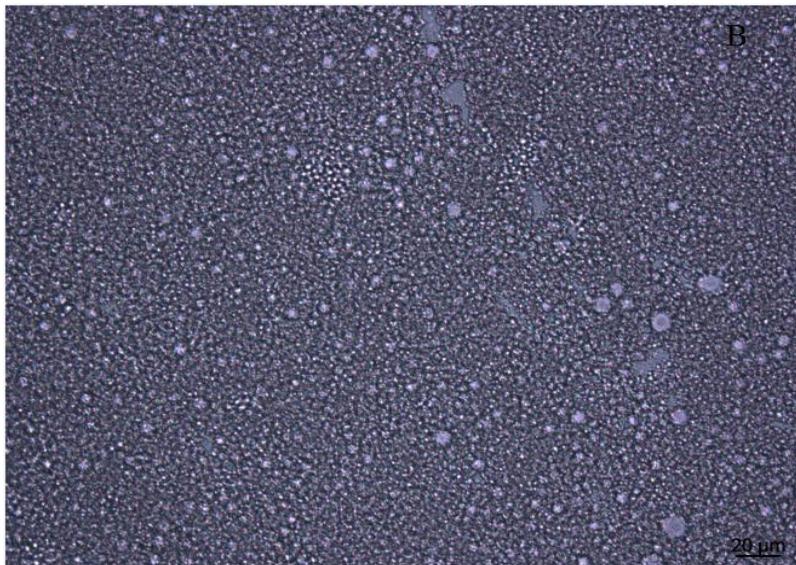
Quando o extrato de antocianinas foi adicionado na emulsão múltipla com pH 7,0 houve mudança na coloração característica do extrato. A emulsão adquiriu coloração azulada (imagem não mostrada). Isto se deve ao fato de que, as antocianinas são suscetíveis a variações de pH ou seja, as antocianinas apresentam coloração vermelha intensa apenas em uma faixa limitada de pH (1,0 a 3,0) que corresponde a um equilíbrio entre o cátion flavilium e a pseudobase carbinol. Se houver um aumento de pH ocorre competição entre a reação de adição de água e a desprotonação do cátion flavilium. Ao sofrer desprotonação, há a formação da base quinoidal, de coloração característica azul (RIBEIRO e SERAVALLI, 2004, LOPES *et al.*, 2007). A observação visual da formulação A8-3A, a qual o pH da fase aquosa primária é de 3,0 e que seria o mais adequado para a encapsulação de antocianinas, mostra que houve quebra da emulsão na parte inferior (Figura 7.17). Isto indica que o ambiente iônico criado através da diminuição do pH da fase aquosa interna pode ter reduzido a capacidade emulsificante do tween 80 e provavelmente pode ter influenciado a quebra da emulsão. Estudos anteriores de emulsões A/O/A estabilizadas por emulsificantes não iônicos monoméricos (span e tween) têm indicado que o gradiente de pressão osmótica entre as duas fases aquosas é uma força motriz forte para a migração mútua de água e encapsulantes de uma fase através da outra (SU, 2008). Como somente a fase aquosa interna foi tamponada isto pode ter influenciado a instabilidade do sistema. Akhtar *et al.* (2014) encapsularam de flavonoides utilizando emulsões múltiplas, neste estudo a fase aquosa interna foi tamponada com KCl 0,2 M e HCl 0,2 M, obtendo um pH=2,0 e a fase aquosa externa foi tamponada com NaHPO<sub>4</sub> e NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH=7,0. A eficiência da encapsulação foi maior que 80 %. Isto pode ter favorecido a encapsulação de flavonoides evitando assim a migração do encapsulante e da água de uma fase para outra.

#### **7.4.7 - Análise microscópica das emulsões múltiplas A/O/A**

As micrografias (Figura 7.18) são das amostras das emulsões múltiplas obtidas com valor de pH 4,5. Foram manipuladas conforme descrito no item 7.2.5.

Quanto aos aspectos microscópicos, os seguintes parâmetros foram avaliados: (a) características morfológicas, quantidade de glóbulos simples e/ou múltiplos dentro dos glóbulos múltiplos; (b) morfologia do glóbulo, esférica ou não; (b) distribuição de tamanhos.

**Figura 7.18** Micrografias da emulsão múltipla A8-2A pH 4,5. (A) – barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ ; (B) – Barra de escala: 20  $\mu\text{m}$ . Aumento de 400 vezes.



Pode-se perceber pelas micrografias que as emulsões múltiplas obtidas apresentam glóbulos esféricos (alguns poucos disformes) porém com distribuição granulométrica variada.

Não foi possível observar a formação de glóbulos internos dentro dos glóbulos múltiplos. Isto pode ser atribuído ao fato de que as emulsões analisadas não foram diluídas.

De acordo com Morais (2008) que também estudou emulsões múltiplas A/O/A pelo método da inversão de fases, este sugere que a temperatura é um fator relevante na formação/morfologia/granulometria. A faixa de temperatura considerada ótima foi de  $78\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Amostras manipuladas com  $\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  deste intervalo apresentam glóbulos com morfologia disforme e, diferenças microestruturais foram observadas para temperaturas de emulsificação distintas em apenas  $\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , o que sem dúvida dificulta a reprodutibilidade do aspecto microscópico da amostra.

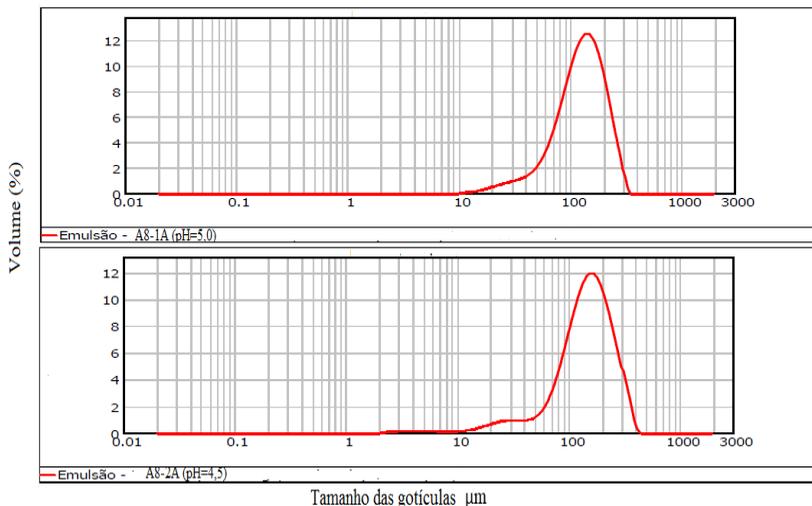
Os resultados sugerem que a temperatura é um fator relevante para a formação/morfologia/granulometria. Isto pode ter acontecido com as amostras analisadas neste estudo, para trabalhos futuros sugere-se trabalhar com banho termostático com temperatura controlada (neste estudo utilizou-se chapas aquecedoras e controle por termômetro).

#### **7.4.8 - Determinação do tamanho das gotículas para as emulsões múltiplas testadas em diferentes pHs para a fase aquosa interna**

O pH é um parâmetro bastante importante que influencia na estabilidade da emulsão múltipla. Este sistema não é só útil para a incorporação de moléculas hidrofílicas, mas também para peptídeos e proteínas com essas mesmas propriedades. Como tal, o pH da fase onde estará o composto ativo deverá assegurar a atividade biológica do mesmo, por exemplo, não deverá desnaturar ou de alguma forma inativar a sua atividade fisiológica. Por este motivo, realizou-se o estudo da influência de vários valores de pH na fase aquosa interna, uma vez que a força iônica é fortemente dependente do pH e pode levar a agregação das partículas (ZIMMERMANN e MULLER, 2001; FANGEIRO, 2012).

Nas Figuras 7.19 e 7.20 são apresentadas as distribuições de tamanho das gotículas para as emulsões múltiplas A8-1A (pH 5,0); A8-2A (pH 4,5) e A8-3A (pH 3,0) testadas variando-se o pH. Na formulação A8-3A (pH 3,0) a fase aquosa externa foi tamponada com fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,0).

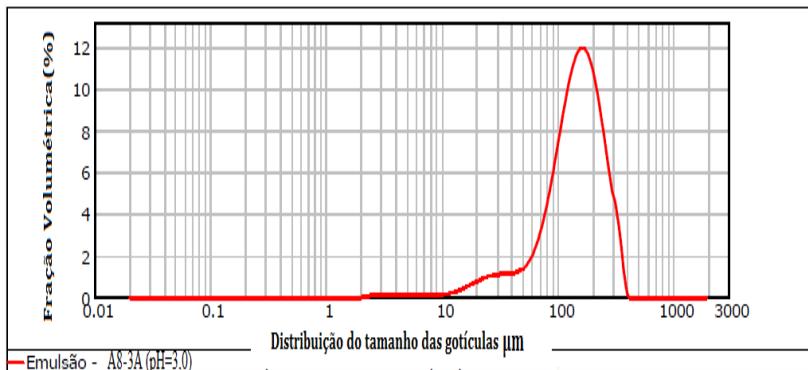
**Figura 7.19** Distribuição de tamanho das gotículas para as formulações testadas A8-1A e A8-2A.



De acordo com os dados obtidos na distribuição do tamanho das gotículas os valores de diâmetro médio de superfície ( $D_{32}$ ) e diâmetro médio volumétrico ( $D_{43}$ ) para a emulsão múltipla A8-1A é de  $D_{32}=99\mu\text{m}$  e  $D_{43}=136,2\mu\text{m}$ , respectivamente. Para a emulsão múltipla A8-2A  $D_{32}=80,6\mu\text{m}$  e  $D_{43}=156,6\mu\text{m}$ .

A figura 7.20 apresenta a distribuição do tamanho das gotículas para a emulsão múltipla A8-3A ( $\text{pH}=3,0$ ).

**Figura 7.20** Distribuição de tamanho das gotículas para a formulação A8-3A.



O valor do diâmetro médio de Sauter ( $D_{32}$ ) para a formulação A8-3A foi de 84,7  $\mu\text{m}$  e do diâmetro médio volumétrico ( $D_{43}$ ) de 155,4  $\mu\text{m}$ . Comparando-se os valores obtidos para a emulsão múltipla A8-2A com os valores obtidos para a formulação A8-3A pode-se perceber um ligeiro aumento no diâmetro médio de superfície das partículas ( $D_{32}$ ).

De acordo com o estudo de Luo *et al.* (2012), deve-se tomar cuidado na interpretação destes tamanhos de gotículas como reais, porque as antocianinas são compostos coloridos e, por conseguinte, um índice de refração adequado a estes compostos deveria ser utilizado para ajustar as medidas dos diâmetros das gotículas. Na ausência desta informação sobre as propriedades ópticas das antocianinas, foi utilizado o índice de refração da água que pode também estar superestimando os valores. Os autores também avaliaram a influência do pH sobre o tamanho das partículas de 3 flavonoides tiliroside, rutina e naringina. O tamanho médio das gotículas das emulsões foi consideravelmente menor em pH maior, especialmente para a rutina. A solubilidade dos flavonoides na fase aquosa era de 4-6 vezes superior em pH 8 em comparação com pH 2 para tiliroside e rutina, embora as solubilidades absolutas permaneceram baixas ( $< 1 \text{ mM}$ ).

Nesse trabalho foi utilizado extratos de antocianinas, diferente do trabalho de Luo *et al.*, (2012) que utilizou os flavonoides isolados, mas o que pode ser analisado é a solubilidade do nosso extrato em função do pH porque, quando a amostra de antocianinas foi adicionada em pH ácido a emulsão “quebrou” na parte inferior (ver figura 7.17).

Pu Jing (2006) avaliou a solubilidade de extratos ricos em antocianinas do pó do sabugo de milho roxo (*Zea mays L.*). Os extratos obtidos apresentaram solubilidade limitada em valores de pH baixo enquanto era solúvel em água em pH próximo ao neutro ou superior. A solubilidade limitada dos extratos em água acidificada foi atribuída à formação de complexos de antocianina com macromoléculas tais como proteínas e compostos fenólicos. No entanto, estes extratos foram facilmente solubilizados em pH próximo ao neutro ou acima, o que sugere o uso destes resíduos, como corantes naturais para alimentos em pH próximo ao neutro. Isto pode ter ocorrido com o extrato utilizado neste trabalho que foi adicionado na fase aquosa interna acidificada e, portanto pode ter limitado a sua solubilidade e contribuído para a quebra da emulsão.

As antocianinas são altamente instáveis em valores de pH de 5-6, e a cor “desbota” rapidamente nestas faixas de pH. No entanto, algumas antocianinas aciladas mostraram alta estabilidade e intensidade de cor a pH 7-8 (FOSSEN *et al.*, 1998, PU JING, 2006), sugerindo que

pode ser possível usá-los como corantes em aplicações de alimentos nessas faixas de pH. No trabalho de Fossen *et al.* (1998), a petunidina 3-[6-O-(4-O-*E*-*p*-coumarol-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside]-5-O- $\beta$ -D-glucopyrano-lateral (petanin) aumentou a intensidade da cor e a estabilidade na região alcalina em pH 8,1. Esta pode ser uma alternativa para a encapsulação destes compostos em alimentos ou, outras formulações nas quais o pH neutro ou alcalino seja requerido.

De acordo com o estudo de Schwarz e Mehnert (1999), a diminuição do valor do pH pode levar a um aumento dos grupos funcionais à superfície da partícula. Também a diminuição do pH pode levar a um aumento na concentração de eletrólitos, que pode causar uma compressão na camada de difusão das partículas, assim como uma repulsão eletrostática e conseqüentemente a desestabilização da emulsão. Os resultados sugerem que o pH baixo na fase aquosa interna pode desestabilizar as emulsões múltiplas.

O aumento no tamanho das gotículas pode ser também devido ao gradiente osmótico que favorece que a água flua da fase aquosa externa para a fase aquosa interna, inchando os glóbulos de óleo até atingirem um tamanho crítico (GEIGER, TOKGOZ, *et al.*, 1998). Outros pesquisadores também relataram efeitos semelhantes no aumento do tamanho das gotas com o tempo quando encapsularam antioxidantes fenólicos como catequina, ácido gálico, quercetina e rutina (Di MATTIA *et al.*, 2010; AKHATAR *et al.*, 2014).

O tamanho das gotas formadas na emulsão A8-3A são relativamente grandes, o que também pode ter sido ocasionado pelo fato de que o emulsificante hidrofílico utilizado pode não estar diminuindo significativamente a tensão superficial. O tamanho das gotas tem grande interferência na estabilidade das emulsões. Quanto maiores e menos homogêneas as gotas, menor a estabilidade de uma emulsão. Portanto este sistema múltiplo com o passar do tempo vai desestabilizar.

Outro fator que leva à formação de emulsões múltiplas instáveis é a taxa de cisalhamento aplicada na obtenção da emulsão secundária. A perda da fase interna, devido à tensão de cisalhamento excessiva durante a produção da emulsão secundária é um grande problema e muita investigação tem sido efetuada para tentar minimizar esta dificuldade (LIU, MA, MENG, e SU, 2005). A taxa de liberação das gotículas internas é diretamente proporcional à tensão de cisalhamento aplicada e só um cisalhamento moderado pode ser aplicado, a fim de produzir emulsões múltiplas que mantêm um significativo percentual da fase interna (VAN der GRAAF, SCHROEN,

e BOOM, 2004). Por isso, é desejável o uso de um equipamento de baixo corte para impedir a expulsão das gotículas internas para a fase contínua externa, a fim de produzir emulsões múltiplas altamente estáveis (PAL, 2008). No entanto, as condições de baixo cisalhamento não podem ser usadas com equipamentos de emulsificação convencional sem que as gotículas tenham uma distribuição inaceitavelmente grande, o que eventualmente leva a produtos instáveis (VAN der GRAAF *et al.* 2004, AKHTAR, 2014). Isto pode ter ocorrido neste sistema de emulsões múltiplas, pois o equipamento utilizado para produzir as emulsões foi um sistema convencional com 4 pás de corte e velocidade de agitação máxima de 1800 rpm.

Outro fator relevante que leva a instabilidade da emulsão múltipla é, devido aos tensoativos utilizados. Laugel *et al.* (1998) verificaram que concentrações muito baixas de tensoativos hidrofílicos utilizados no processo de reemulsificação para sistemas (A/O/A) podem não ser suficientes para produzir uma emulsão estável. Entretanto, em altas concentrações, principalmente acima da concentração micelar crítica (CMC), pode haver solubilização através de micelas do tensoativo lipofílico da interface para a fase aquosa externa conduzindo a desestabilização do sistema.

Como a distribuição do tamanho das gotículas para as emulsões múltiplas testadas está muito grande não foram realizados ensaios de eficiência da encapsulação devido a instabilidade do sistema.

## 7.5 - CONCLUSÕES

Neste estudo foi proposta um método para a encapsulação dos extratos de antocianinas concentrado, proveniente do resíduo da borra do vinho tinto, em emulsões múltiplas A/O/A utilizando o método de inversão de fases com aquecimento.

As emulsões primárias A/O obtidas foram avaliadas quanto aos efeitos de variação da fração da fase oleosa e aquosa e a adição do emulsificante lipofílico span 80. Testes de estabilidade acelerada revelaram que a fração da fase dispersa e da fase contínua para obtenção de uma emulsão primária A/O estável foi de 50:50. A quantidade de span ideal para esta formulação está na faixa de 3 a 5 % (m:m). A distribuição de tamanho das gotículas da emulsão primária avaliados em relação ao diâmetro de Sauter foi de 3 - 8,6  $\mu\text{m}$ . As emulsões primárias obtidas se mostraram estáveis num período de 48 h armazenadas em temperatura ambiente. Uma emulsão primária A/O estável é essencial para se obter uma emulsão secundária A/O/A estável.

Quando a emulsão primária foi reemulsificada para a obtenção da emulsão múltipla A/O/A os diâmetros de partícula aumentaram significativamente.

Várias hipóteses para este aumento no tamanho de partícula, que leva a instabilidade do sistema foram propostas. A desestabilização da emulsão múltipla A/O/A, após a adição do encapsulante (extrato concentrado de antocianinas) foi o principal problema encontrado neste estudo. A fase aquosa interna onde o composto ativo foi incorporado foi tamponada com KCl 0,2 M e HCL 0,2 M para obter um pH 3,0 para assegurar a sua atividade biológica. No entanto a diminuição do pH pode levar a um aumento na concentração de eletrólitos, que pode causar uma compressão na camada de difusão das partículas, assim como uma repulsão eletrostática e, conseqüentemente a desestabilização da emulsão. Os resultados sugerem que o pH baixo na fase aquosa interna pode ter sido uma das causas da instabilidade das emulsões múltiplas que foram confirmados pelo valor do diâmetro de Sauter ( $D_{32}$ ) igual a 84,7 $\mu$ m e diâmetro médio volumétrico ( $D_{43}$ ) igual a 155,4  $\mu$ m que com o passar do tempo leva a desestabilização do sistema.

Outro fator que deve ser levado em consideração é a solubilidade dos extratos de antocianinas em função do pH. Alguns autores já relataram que a solubilidade de alguns flavonoides na fase aquosa é de 4-6 vezes superior em pH 8 em comparação com o pH 2, embora as solubilidades absolutas ainda permaneceram baixas. Isto pode ter sido um dos problemas na encapsulação do extrato de antocianinas. Estudos devem ser realizados para avaliar a solubilidade dos extratos em uma faixa de pH mais ampla pois, a possibilidade de poder utilizar um pH neutro o alcalino para a encapsulação de antocianinas pode ser uma das alternativas para sua utilização como corante ou como composto bioativo em formulações alimentícias que requerem este valor de pH.

Neste estudo o diâmetro das gotículas foi determinado utilizando-se o índice de refração da água sendo que, as antocianinas são compostas coloridos um índice de refração adequado a estes compostos deveria ser utilizado para ajustar as medidas dos diâmetros das gotículas. Na ausência desta informação sobre as propriedades ópticas das antocianinas, foi utilizado o índice de refração da água que pode também estar superestimando os valores.

## 7.6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

✓ Modificação nas propriedades dos componentes da emulsão múltipla como: adição de proteínas e polissacarídeos na fase aquosa

interna, pode ser a chave em estudos futuros para melhorar a estabilidade das emulsões;

✓ Incorporar o composto ativo na fase aquosa interna em  $\text{pH} > 6,0$ . De acordo com os resultados obtidos da determinação da capacidade antioxidante dos extratos, os produtos de degradação das antocianinas poderiam ser responsáveis pela atividade antioxidante global das amostras analisadas. Com o aumento do  $\text{pH}$  acima de 6,0 tanto a estrutura pseudobase carbinol quanto a anidrobases quinoidal (A) podem formar a espécie *cis*-chalcona (Cc) que é um produto de degradação e, conseqüentemente haveria aumento da capacidade antioxidante. O único inconveniente é a perda da coloração mas, comparando os efeitos benéficos relativos aos antioxidantes seria uma alternativa viável para incorporar o composto ativo na fase aquosa interna em valores de  $\text{pH} > 6,0$  evitando assim a incorporação do composto ativo em  $\text{pH}$  ácido (1-3) que pode ter sido uma das causas da instabilidade do sistema de emulsões múltiplas A/O/A.

✓ Testar diferentes fases oleosas com diferentes emulsificantes hidrofílicos e lipofílicos.

✓ Testar a metodologia de nanopartículas lipídicas sólidas (SLN, solid lipid nanoparticles) baseadas em emulsões múltiplas para a incorporação de fármacos hidrofílicos, onde as gotículas de água internas podem ser estabilizadas pelos cristais de gordura na fase oleosa. A fase de oleosa será idealmente cristalizada de uma maneira controlada, em termos de tamanho, tipo e forma de cristais.

✓ Obter o índice de refração das antocianinas e utilizá-lo na obtenção dos tamanhos de partículas.

✓ Avaliar a solubilidade dos extratos em uma ampla faixa de  $\text{pH}$ .



## CAPÍTULO 8 - CONCLUSÕES GERAIS

O aproveitamento do resíduo da produção vinícola (borra do vinho tinto) como matéria-prima para a obtenção de compostos bioativos (antocianinas) é promissor devido a uma elevada quantidade destes compostos permanecem presentes no resíduo industrial vinícola.

Os ensaios de DPPH confirmaram a capacidade antioxidante destes extratos principalmente sob temperaturas elevadas (80 °C).

Foi realizada uma cinética de extração com o objetivo de contribuir para uma melhor utilização de energia, tempo e solvente. O tempo para se atingir o equilíbrio foi de 10 h e a melhor proporção soluto:solvente foi de 1:5.

Com o propósito de maximizar o rendimento das antocianinas totais, a borra do vinho tinto foi submetida à extração variando o pH, a concentração de solvente (etanol/água), concentração de HCl e a temperatura. As melhores condições de extração de antocianinas foram concentração de HCl 1,75 N, extrato hidroalcoólico 70 % e temperatura de 35 °C com 341,1 mg de cianidina-3-glicosídeo presentes em 100 g de amostra.

Após a etapa de extração, foi proposta uma estratégia de purificação das antocianinas utilizando extração líquido-líquido seguida de cromatografia em coluna aberta. Para a extração líquido-líquido foi utilizado acetato de etila como solvente extrator sendo que, após a segunda etapa de extração, não houve diferenças significativas nos espectros definindo que apenas uma extração é suficiente para esta etapa.

Na análise das frações obtidas após a etapa de purificação do extrato bruto, cloreto de malvidina pode ser identificada como a principal antocianidina presente na amostra. Cloreto Cianidina também foi identificada, mas em percentuais inferiores. Além disso, a purificação permitiu uma antocianidina isolada com um elevado grau de pureza (76,47 %).

Após ser identificada a presença de compostos bioativos no extrato da borra do vinho tinto foi proposta a sua incorporação em emulsões do tipo A/O e A/O/A visando a proteção e, a viabilidade de sua utilização pela indústria. Primeiramente foram utilizados elementos de estrutura pré-fabricadas (proteínas do soro do leite) por serem um caminho possível para criar produtos com propriedades desejadas, utilizando para isto o método da emulsificação/gelificação térmica. A fase oleosa utilizada na obtenção das emulsões do tipo A/O foi o óleo de girassol. A concentração de proteínas na fase aquosa foi de 30 % (m/v).

O diâmetro das partículas obtidas variou entre 9,5  $\mu\text{m}$  e 37  $\mu\text{m}$ . As análises das partículas por espectroscopia no infravermelho (IV) sugeriram que as antocianinas obtidas do extrato da borra do vinho tinto foram aprisionadas fisicamente nas micropartículas. A eficiência de encapsulamento foi de 73,1 % para as amostras analisadas sem a presença de emulsificante lipofílico.

Emulsões múltiplas do tipo A/O/A foram testadas para a encapsulação de antocianinas. Foram estudadas as propriedades e características das emulsões, a estabilidade das emulsões, em diferentes condições experimentais. As composições das formulações foram comparadas e, selecionada a emulsão múltipla que apresentou maior estabilidade. As frações volumétricas da fase dispersa e da fase contínua que se mostrou mais estável foi 50:50 para a emulsão primária A/O e, para a emulsão secundária A/O/A foi 60:40.

Para as emulsões A/O obtidas a concentração de span 80 que apresentou emulsões primárias estáveis está na faixa de 3 a 5 % (m:m) e, o diâmetro de Sauter para as gotículas da emulsão primária está na faixa de 3  $\mu\text{m}$  - 8,6  $\mu\text{m}$ . Neste estudo a concentração de emulsificante hidrofílico que produziu sistemas múltiplos parcialmente estáveis foi 0,1 % em massa em relação a fase aquosa externa. Uma concentração maior do emulsificante hidrofílico levou a separação de fases imediatamente após o seu preparo.

A desestabilização da emulsão múltipla A/O/A, após a adição do encapsulante hidrofílico (antocianinas) obtido a partir da extração da borra do vinho tinto foi o principal problema encontrado neste estudo. Os resultados sugerem que o pH baixo do extrato na fase aquosa interna pode ter sido uma das causas da instabilidade das emulsões múltiplas que foram confirmados pelo valor do diâmetro de Sauter ( $D_{32}$ ) igual a 84,7 $\mu\text{m}$  e diâmetro médio volumétrico ( $D_{43}$ ) igual a 155,4  $\mu\text{m}$  que com o passar do tempo leva a desestabilização do sistema.

## REFERÊNCIAS

- ABE, L.T.; DA MOTA, R.V.; LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M. I. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, p. 394-400, 2007.
- AKHTAR, M.; MURRAY, S.B.; AFEISUME, E.I.; KHEW, H.S. Encapsulation of flavonoid in multiple emulsion using spinning disc reactor technology. **Food Hydrocolloids**, v.34, p. 62-67, 2014.
- ALLEBRANDT, R. Caracterização da maturação e composição das uvas “Cabernet Sauvignon e Merlot” produzidas em São Joaquim – SC. **Trabalho de conclusão de curso**. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, 2012.
- AMENDOLA, D.; DE FAVERI, D.M.; SPIGNO, D.F. Grape marc phenolics: Extraction Kinetics, quality and stability of extracts. **Journal of Food Engineering**, v. 97, p. 384-392, 2010.
- ANSEL, H. C., POPOVICH, N. G., ALLEN Jr, L. V. Farmacotécnica: formas Farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. Tradução Terezinha Oppido, Edi Gonçalves de Oliveira, Ivone Castilho Benedetti. São Paulo: **Premier**, 6. ed. 2000.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.; ROBARDS, K.; RYAN, D. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. Critical Review. **Analyst**, v. 125, p. 989-1009, 2000.
- ARAÚJO, A. S. Desenvolvimento de novas formulações de vacinas inativadas e subunidades utilizando o parvovírus suíno como modelo. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG. 2012.
- ARVANITOYANNIS, I.; LADAS, D.; MAVROMATIS, A. Wine waste treatment methodology. **International Journal of Food Science & Technology**. Vol. 41, p. 1117-1151, dez.,2006.
- AUGUSTA, I.M.A. Extração e secagem da casca de jambo vermelho (*Syzygium malaccensis*, (L) Merryl et Perry) para obtenção de corante.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

BAGHERI, L.; MADADLOU, A.; YARMAND, M.; MOUSAVI, M.E. Nanoencapsulation of date palm pit extract in whey protein particles generated via desolvation method. **Food Research International**, v.51, p.866-871, 2013.

BALOGH, T.S. Uso de cosmético de extratos glicólicos: avaliação da atividade antioxidante, estudo da estabilidade e potencial fotoprotetor. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2011.

BELTZ, M.; KULOZIK, U. Whey protein gels for the entrapment of bioactive anthocyanins from bilberry extract. **International Dairy Journal**, v. 21, p.703-710, 2011.

BENELLI, P. Agregação de valor ao bagaço de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) mediante obtenção de extratos bioativos através de diferentes técnicas de extração. **Dissertação de Mestrado** - Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC - Florianópolis, SC, 2010.

BENICHOU, A., ASERIN, A., LUTZ, R., GARTI, N. Formation and characterization of amphiphilic conjugates of whey protein isolate (WPI)/xanthan to improve surface activity. **Food Hydrocolloid**, v. 21, pp. 379-391, 2007.

BENICHOU, A.; ASERIN, A.; GARTI, N. W/O/W double emulsions stabilized with WPI polysaccharide complexes. **Colloids Surface**, v.294, p.20-32, 2007.

BONILLA, F.; MAYEN, M.; MERIDA, J.; MEDINA, M. Extraction of phenolic compounds from grape marc for use as food lipid antioxidants. **Food Chemistry**, v.66, p.209-215, 1999.

BONNET, M.; CANSELL, M.; BERKAOUI, A.; ROPERS, M.H.; ANTON, M.; LEAL-CALDERON, F. Release rate profiles of magnesium from multiple W/O/W emulsions. **Food Hydrocolloids**, v.23, p. 92–101, 2009.

BONNET, M.; CANSELL, M.; PLACIN, F.; DAVID-BRIAN, E.; ANTON, M.; LEAL-CALDERON, F. Influence of ionic complexation on release rate profiles from multiple water-in-oil-in-water (W/O/W) emulsions. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 58, p.7762-7769, 2010.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v.28, p.25-30. 1995.

BROUILLARD, R. Origin of the exceptional dour stability of the Zebrinu anthocyanin. *Phytochemistry* 20: 143-145, 1981.

CABRITA, M. J.; RICARDO-DA-SILVA, J.; LAUREANO, O. Os compostos polifenólicos das uvas e dos vinhos. **In: I Seminário Internacional de vitivinicultura**. Anais Ensenada, México, 2003.

CACACE, J.E.; MAZZA, G. Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol. **Journal of Food Science**, v.1, p. 240-248, janeiro, 2003.

CACACE, J.E; MAZZA, G. Extraction of Anthocyanins and Other Phenolics from Black Currants with sulfured water. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.71, p.5939-5946, setembro, 2002.

CAMPOS, D. D. P. Extração, purificação e isolamento de antocianinas de jambolão (*Syzygium cumini*) e avaliação dos seus efeitos biológicos. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, S.P.,2006.

CARRILHO-NAVAS, H. *et al.* Rheological properties of a double emulsion nutraceutical system incorporating chia essential oil and ascorbic acid stabilized by carbohydrate polymer protein blends. **Carbohydrate Polymers**, v. 87: 1231-1235, 2012.

CATANEO, B. C.; CALIARI, V.; GONZAGA, L.V. Atividade antioxidante e conteúdo fenólico do resíduo agroindustrial da produção de vinho. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 93-102, jan./mar. 2008.

CHAUSSIER, J.L. Treatment and valorization of wastes in Mombazzilac winery. **Proceedings of Special Conference on Winery Waste Waters, Bordeaux, France**, p.144. 1998.

CHEN, L.Y.; SUBIRADE, M. Alginate–whey protein granular microspheres as oral delivery vehicles for bioactive compounds. **Biomaterials**, v.27, p.4646-4654, 2006.

CHEN, L.Y.; SUBIRADE, M. Effect of preparation conditions on the nutrient release properties of alginate–whey protein granular microspheres. **Europe Journal Pharmaceutics Biopharmaceutics**, v.65, p. 354-362, 2007.

CHIM, J. Caracterização de compostos bioativos em amora-preta (*Rubus sp.*) e sua estabilidade no processo e armazenamento de geléias convencional e *light*. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS, 2008.

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

CONSTANT, P. B. L. Extração, Caracterização e aplicação de antocianinas de açaí. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, 2003.

COSTA, C. T.; HORTON, D.; MARGOLIS, S. A. Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 881, n. 1-2, p. 403-410, 2000.

CRUZ, A. P. Avaliação do efeito da extração e da microfiltração do açaí sobre sua composição e atividade antioxidante. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, 2008.

DAVIS, S.S.; WALKER, I.M. Measurement of the yield of multiple emulsion droplets by a fluorescent tracer technique. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 17, p.203-213, 1983.

DAY, L.; XU, M.; HOOBIN, P.; BURGAR, I.; AUGUSTIN, M.A. Characterisation of fish oil emulsions stabilised by sodium caseinate. **Food Chemistry**, v.105, p.469–79, 2007.

DELGADO-VARGAS, F.; PAREDES-LÓPEZ, O. Anthocyanins and betalains. In *Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses*. CRC Press, Boca Raton, p. 167-219, 2003.

DICKINSON, E., PARKINSON, E. L. Heat-induced aggregation of milk protein stabilized emulsions: sensitivity to processing and composition. **International Dairy Journal**, v.14, p. 635–645, 2004.

DICKINSON, E.; GALAZKA, V. B. Emulsion stabilization by ionic and covalent complexes of  $\beta$ -lactoglobulin with polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, Vol. 5, No. 3, 281–296, 1991a.

DICKINSON, E.; MATSAMURA, Y. Proteins at liquid interfaces: role of the molten globule state. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.3, p. 1–17, 1994b.

DICKINSON, E.; PHILIPS, G.; WILLIAMS, P. Hydrocolloids and emulsion stability. **Handbook of hydrocolloids**, p.23-49, 2009.

Di MATTIA, C. D., SACCHETTI, G., MASTROCOLA, D., PITTIA, P. Effect of phenolic antioxidants on the dispersion state and chemical stability of olive oil O/W emulsions. *Food Research International*, 42, 1163e1170, 2009.

DOHERTY, S. B.; GEE, V. L.; ROSS, R. P.; STATON, C.; FITZGERALD, G. F.; BRODKORB, A. Development and characterisation of whey protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1604-1617, 2011.

DURST, R. W., WROLSTAD, R. E. Characterization and measurement of anthocyanins by UV–visible spectroscopy. In R. E. Wrolstad (Ed.), **Handbook of analytical food chemistry** (pp. 33–45). New York: John Wiley & Sons, 2005.

DURST, R.W.; WROLSTAD, R.E. Separation and Characterization of Anthocyanins by HPLC. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, 1994.

ETZION, Y.; LINKER, R.; COGAN, U.; SHMULEVICH, I. Determination of protein concentration in raw milk by mid-infrared Fourier transform infrared/attenuated total reflectance spectroscopy. **Journal of Dairy Science**, v. 879, p.2779-2788, 2004.

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

FANGEIRO, P.F.J. Desenvolvimento e formulação de nanopartículas lipídicas mucoadesivas. **Dissertação de Mestrado** em Ciências Farmacêuticas. Universidade de Fernando Pessoa. Porto, 2012.

FELLOWS, P. J. Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e prática. 2ª edição. Porto Alegre: **Artmed**, p.602, 2006.

FLORENCE, A.T.; WHITEHILL, D. The formulation and stability of multiple emulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v.11, p.227-308, 1982.

FOSSEN, T.; CABRITA, L.; ANDERSEN, M. Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region. **Food Chemistry**, Vol. 63, No. 4, p. 435±440, 1998.

FRANCIS, F. Analysis of anthocyanins. In P. Markakis (Ed.), *Anthocyanins as food colors*. **New York: Academic Press**, 1982.

FRANK, K.; WALZ, E.; GRÄF, V.; GREINER, R.; KÖHLER, K.; SCHUCHMANN, H. P. Stability of anthocyanin-rich W/O/W emulsions designed for intestinal release in gastrointestinal environment. **Journal Food Science**, v.77, 2012.

FULEKI, T.; FRANCIS, F.J.; “Quantitative methods for anthocyanins. 1. Extraction and determination of total anthocyanin in Cranberries”. **Journal Food Science**, v. 33, p.72-77, 1968 a.

FULEKI, T.; FRANCIS, F.J.; “Quantitative methods for anthocyanins. 2. Determination of total anthocyanin and degradation index for cranberry juice.” **Journal Food Science**., v. 33, p.78-80, 1968 b.

GEIGER, S.; TOKGOZ, S.; FRUCTUS, A.; JAGER-LEZER, N.; SEILER, M.; LACOMBE, C.; GROSSIORD, J.L. Kinetics of swelling-

breakdown of a w/o/w multiple emulsion: Possible mechanisms for the lipophilic surfactant effect. **Journal Controlled Release**, v. 52, p.99-107, 1998.

GIUSTI, M. M., WROLSTAD, R. E. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. In R. E. Wrolstad (Ed.), **Handbook of analytical food chemistry** (pp. 19–31). New York: John Wiley & Sons, 2005.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Anthocyanins. Characterization and Measurement with UV-Visible Spectroscopy. In: Wrolstad, R. E. (Ed.). **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 2001. Unit. F1.2.1-13.

GIUSTI, M.M., RODRIGUEZ-SAONA, L., GRIFFIN, D., and WROLSTAD, R.E. Electrospray and tandem mass spectroscopy as tools for anthocyanin characterization. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 47, p. 4657-4664, 1999.

GONÇALVES, R.A. Desenvolvimento e avaliação in vitro e in vivo de emulsões contendo óleo de canola e ácidos carboxílicos. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

GOUVÊA, A. C. M. S. Quantificação das antocianinas majoritárias do açaí por cromatografia líquida de alta eficiência. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2010.

HAWKES, J.J. An Introduction to Chromatographic Methods. **Journal of Chemical Education**, p. 490-508, 1983.

HEMAR, Y., CHENG, L.J. OLIVER, C.M. SANGUANSRI, L. AUGUSTIN, M. Encapsulation of resveratrol using water-in-oil-in-water double emulsions. **Food Biophysics**, v.5, p. 120-127, 2010.

HEREDIA, F.J., FRANCIA-ARICHA, E.M., RIVAS-GONZALO, J.C., VICARIO, I.M., SANTOS-BUELGA, C., Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes – I. pH effect. **Food Chemistry**, v. 63, 491–498, 1998.

HERRMANN, K. Pflanzlichen Lebensmitteln vorkommende Flavonoide als Antioxidantien. **Gordian, Hamburg**, v. 93, n.7-8, p. 108-111, 1994.

HOGAN, S.; CANNING, C.; SUN, S., SUN, X.; ZHOU, K., Effects of grape pomace antioxidant extract on oxidative stress and inflammation in diet induced obese mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.11250-11256, 2010.

HONG, V.; WROLSTAD, R. E. Use of HPLC separation / photodiode array detection for characterization of anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.38, p.708-715, 1990.

HONG, Y.H.; McCLEMENTS, D.J. Modulation of pH Sensitivity of Surface Charge and Aggregation Stability of Protein-Coated Lipid Droplets by Chitosan Addition. **Food Biophysics**, v.2, p.46-55, 2007

IAL. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo, 2008.

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

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

JACKMAN, R.L., YADA, R.Y. e TUNG, M.A. Review: Separation and chemical properties of anthocyanins used for their qualitative and quantitative analysis. **Journal of Food Biochemistry**, v. 11, p.279-308, 1987.

JAFARI, S.M.; ASSADPOOR, A.E.; HE, Y.; BHANDARI, B. Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification. **Food Hydrocolloids**, 22: 1191-1202, 2008.

JAMPANI, C., NAIK, A., RAGHAVARAO, K. S. M. S. Purification of anthocyanins from jamun (*Syzygium cumini* L.) employing adsorption. **Separation and Purification Technology**, p.170-178. 2014.

JATO, J. L. V. Tecnologia Farmaceutica: Aspectos Fundamentais de los Sistemas farmacéuticos y operaciones basicas. **Madrid: Editorial Sintesis**. v. I, p. 1-362, 1997.

JE LEE, S.; ROSENBERG, M. Whey protein-based microcapsules prepared by double emulsification and heat gelation. **Food Science and Technology**, v.33, p. 80-88, 2000.

JING, P. Purple corn anthocyanins: chemical structure, chemoprotective activity and structure/function relationships. **Dissertation, Food Science and Nutrition** – The Ohio State University, 2006.

JURD, L.; ASEN, A. The formation of metal and “copigment” complexes of cyanidin-3-glucoside. **Phytochemistry**, v.5, p.1263-1271, 1966.

KALLITHRAKA, S. *et al.* Determination of major anthocyanin pigments in Hellenic native grapes varieties (*Vitis vinifera* sp.): association with antiradical activity. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, n. 5, p. 375-386, 2005.

KARLESKIND, D.; LAYE, I.; MEI, F.I.; MORR, C.V. Foaming properties of lipid-reduced and calcium reduced whey protein concentrates. **Journal Food Science**, v. 60, p.738-741, 1996a.

KECHINSKI, C.P. Estudo das diferentes formas de processamento do mirtilo visando à preservação dos compostos antociânicos. **Tese de doutorado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRS, Porto Alegre – RS, 2011.

KIM, H.J.; DECKER, E.A; MCCLEMENTS, D.J. Role of post adsorption conformation changes of beta-lactoglobulin on its ability to stabilize oil droplets against flocculation during heating at neutral pH. **Langmuir**, v.18, p.7577–7580, 2002.

KINSELLA, J.E. Milk protein: physicochemical and functional properties. Critical Review **Food Science and Nutrition**. v.21, n.3, p.197-287, 1984.

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

LAM, S.H.; NICKERSON, M.T. Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure-function approach. **Food Chemistry**, v.141, p.975-984, 2013.

LAUGEL, C.; BAILLET, A.; YOUENANG PIEMI, M.P., MARTY, J.P. FERRIER, D. Oil-water-oil multiple emulsions for prolonged delivery of hydrocortisone after topical application: comparison with simple emulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v.160, p.109-117, 1998.

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

LEE, S. J. AND ROSENBERG, M. Preparation and some properties of water-insoluble, whey protein-based microcapsules. **Journal of Microencapsulation**, 17, 29-44 (2000).

LÉVY, E.F.; MUNIN, A. Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review. *Pharmaceutics*, v.3, p.793-829, 2011.

LIANG, L.; TAJMIR-RIAHI, H.A.; SUBIRADE, M. Interaction of beta-lactoglobulin with resveratrol and its biological implications. **Biomacromolecules**, v. 9, p.50-56, 2008.

LIMA, A. Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo, e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.). **Tese de Doutorado** – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. São Paulo. p.182, 2008.

LIMA, V.L.A.G.; PINHEIRO, I.O.; NASCIMENTO, M.S.; GOMES, P.B.; GUERRA, N.B. Identificação de antocianidinas em acerolas do banco ativo de germoplasma da Universidade Federal de Pernambuco. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.4, p.927-935, 2006.

LIU, H.C.; CHEN, W.L.; MAO, S.T.J. Antioxidant nature of bovine milk beta-lactoglobulin. **Journal Dairy Science**, v.90, p.547-555, 2007.

LIU, R.; MA, G.H.; WAN, Y.H.; SU, Z.G. Influence of process parameters on the size distribution of PLA microcapsules prepared by combining membrane emulsification technique and double emulsion-solvent evaporation method. **Colloids Surface**, v.45, p.144-153, 2005.

LIU, T.X, RELKIN, P., LAUNAY, B. Thermal-Denaturation and Heat-Induced Gelation Properties of  $\beta$ -Lactoglobulin – Effects of Some Chemical-Parameters. **Thermochim Acta**; v. 246, p. 387-403, 1994.

LIVNEY, Y. D. Milk proteins as vehicles for bioactives. **Colloid & Interface Science**, v. 15 p. 73–83, 2010.

LONGO, L.; VASAPOLLO, G.; RESCIO, L. Identification of anthocyanins in *Rhamnus alaternus* L. berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1723-1727, 2005.

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

LOURENÇO, L.A. Extração de pigmentos antociânicos de resíduo vinícola para a utilização em produtos alimentícios. **Dissertação de mestrado**. Fundação Universidade Regional de Blumenau, Blumenau – S.C, 2013.

LUO, Z.; MURRAY, B.S.;ROSS, A.L.; POVEY, M.J.W.; MORGAN, M.R.A.; DAY, A.J. Effects of pH on the ability of flavonoids to act as Pickering emulsion stabilizers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 92, p. 84– 90, 2012.

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

MALACRIDA, C.R., MOTTA, S. Compostos Fenólicos Totais e Antocianinas em Suco de Uva. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, p.659-664, 2005.

MALACRIDA, R. C.; MOTTA, S. Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade. **Boletim do Ceppa**, v. 24, n. 1, p. 59-82, 2006.

MANTELL, C.; RODRIGUEZ, M.; MARTINEZ DE LA OSSA, E. Semi-batch extraction of anthocyanins from red grape pomace in packed beds: experimental results and process modeling. **Chemical Engineering Science**, [S.1], v.57, p.3831-3838,2002.

MARÇO, P. H.; POPPI, R. J. e SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, v. 31, p. 1218, 2008.

MARTENDAL, E. Aplicação de planejamento fatorial fracionário e box-behnken para a otimização de extração microgota para a determinação de tricloroanisol e tribromoanisol de amostras de vinho por cromatografia a gás. **Dissertação de Mestrado**. UFSC, 2007.

MATALANIS, A.; GRIFFITH, J.; McCLEMENTS, D.J. Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of compounds lipophilic. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1865 – 1880, 2011.

McCLEMENTS, D. J. Food emulsions: Principles, practice and techniques. **Boca Raton, FL, USA: CRC Press Taylor & Francis Group**, 2ª Edição, p. 46-55, 2005.

MELO, P. S. Composição química e atividade biológica de resíduos agroindustriais. **Dissertação de Mestrado**. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2010.

MEZADRI, H. Desenvolvimento de nanoemulsões contendo extratos dos frutos de *Syagrus romanzoffiana*(Cham.) Glassman e estudo fitoquímico destes extratos. **Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas** – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2010.

MEZZOMO, N. Extração e encapsulamento de compostos com importância tecnológica e biológica proveniente do resíduo de processamento de camarão. **Tese de doutorado**. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Florianópolis – SC, 2012.

MORAIS, J.M. Desenvolvimento e avaliação do processo de obtenção de emulsões múltiplas A/O/A em etapa única empregando óleo de canola e tensoativo não iônico derivado do óleo de rícino. **Tese de Doutorado**. USP. Ribeirão Preto, 2008.

MULERO, J.; PARDO, F.; ZAFRILLA, P. Antioxidant activity and phenolic composition of organic and conventional grapes and wines. **Journal of Food Composition and Analysis**. V. 23, p. 569–574, 2010.

MUSCHIOLIK, G. Multiple emulsions for food use. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 12, p. 213–220, 2007.

MYERS, D. **Surfaces, Interfaces, and Colloids: Principles and Applications**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1999.

NACZK, M., OICKLE, D., PINK, D., SHAHIDI, F. Protein precipitating capacity of crude canola tannins: Effect of pH, tannin, and protein concentrations. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 44, p.2144–2148. 1996.

NARAYAN, N. *et al.* Crystal structure of the potent natural product inhibitor balanol in complex with the catalytic subunit of camp-dependent protein kinase. **Biochemistry**, v. 38, p.2367–2376, 1999.

NASCIMENTO, J.C., LAGE, L.F.O., CAMARGOS, C.R.D., AMARAL, J.C., COSTA, L.M., SOUSA, A.N.; OLIVEIRA, F.Q. Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonoides totais em extratos de folhas da *Bauhinia variegata* L. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 92, p. 327–332, 2011.

NAYAK, B., BERRIOS, J. D. J., POWERS, J. R., & TANG, J. Thermal degradation of anthocyanins from purple potato (cv. Purple Majesty) and impact on antioxidant capacity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p.11040–11049, 2011.

NIELSEN, N.S., JACOBESSEN, C. Methods for reducing lipid oxidation in fish-oil-enriched energy bars. **International Journal Food Science Technology**, v. 44, p.1536–46, 2009.

OKUMURA, F.; SOARES, M.H.F.B.; CAVALHEIRO, E.T.G. Identificação de pigmentos naturais de espécies vegetais utilizando-se cromatografia em papel. **Química Nova**, v. 25, p.680-683; 2002.

OLIVEIRA, A. C. de; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Revista Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

OLIVEIRA, M. S. Inibição de Crescimento Fúngico e sua Produção de Micotoxinas por Compostos Fenólicos Presentes em Vegetais e seus Resíduos. **Dissertação de Mestrado**. FURG, p. 78-91, 2005.

PALAMIDIS, N.; MARKAKIS, P. Stability of grape anthocyanin in carbonated beverage. **Journal of Food Science**, v. 40, n. 5, p. 1047-1049, 1975.

PATO, O. O vinho sua preparação e conservação. **Editora Clássica, 8ª ed.** Lisboa, 1988.

PINELO, M. et al. Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. **Journal of the Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 2111-2117, 2005.

PIRRA, António J. D. Caracterização e tratamento de efluentes vinícolas da região demarcada do Douro. **Tese de Doutorado em Engenharia Agrícola**, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 2005.

POMAR, F.; NOVO, M.; MASA, A. Varietal differences among the anthocyanin profile of 50 red table grape cultivars studied by high performance liquid chromatography. **Journal Chromatography**, v. 1094, p. 34-41, 2005.

PONCET-LEGRAND, C., EDELMANN, A., PUTAUX, J.-L., CARTALADE, D., SARNI-MANCHADO, P., VERNHET, A. Poly(L-proline) interactions with flavan-3-ols units: influence of the molecular structure and the polyphenol/protein ratio. **Food Hydrocolloids**. v.20, p. 687–697, 2006.

PORTO, C. D.; DECORTI, D.; NATOLINO, A. Water and ethanol as co-solvent in supercritical fluid extraction of proanthocyanidins from grape marc: A comparison and a proposal. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.87, p.1-8, marc. 2014.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. Tecnologia farmacêutica. **5. ed. Lisboa**: Fundação Calouste Gulbekian; v. 1, 1995.

PU JING, M.S. Purple corn anthocyanins: Chemical structure, chemoprotective activity and structure/function relationships. Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the **Degree Doctor** of Philosophy the Graduate School of The Ohio State University, 2006.

REIN, M. J. Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. **Dissertation**. EKT series 1331. University of Helsinki, Department of Applied Chemistry and Microbiology, 2005.

REQUE, M.P., STEFFENS, S.R., JABLONSKI, J., FLORES, H. S., RIOS, A., JONG, V. E. Cold storage of blueberry (*Vaccinium* spp.) fruits and juice: Anthocyanin stability and antioxidant activity. **Journal of Food Composition and Analysis**. V. 33, p.111-11, 2014.

REVILLA, E.; GARCÍA-BENEYTEZ, E.; CABELLO, F.; MARTÍN-ORTEGA, G.;RYAN, J.M. Value of high-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them. **Journal of Chromatography**, v.915, p. 53-60, 2001.

RIBEIRO, E.P.; SERAVALLI, E.A.G. Química dos Alimentos. São Paulo: **Instituto Mauá de Tecnologia**, p.58-76, 2004.

RIBEIRO, T. P. Maturação, qualidade, compostos bioativos e atividade antioxidante de uvas americanas e dos sucos elaborados no Submédio do Vale do São Francisco. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Mossoró, 2011.

RIGHETTO, A.M.; NETTO, F.M. Vitamin C stability in encapsulated green West Indian cherry juice and in encapsulated synthetic ascorbic acid. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.86, n.8, p. 1020-1208, 2006.

RIZZON, L.A.; MIELE, A. Avaliação da cv. Cabernet Sauvignon para elaboração de vinho tinto. **Ciências e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 22, p. 192-198, 2002.

ROBLES CASTILHO, O. A.F. Análise experimental do escoamento de emulsões óleo em água através de micro-capilares com garganta. **Dissertação de Mestrado**. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2011.

ROCKENBACK, I.I.; RODRIGUES, E.; GONZAGA, L.V.; CALIARI, V.; GENOVESE, M.I.; GONÇALVES, E. S. S.; FETT, R. Compostos fenólicos, ácidos graxos e capacidade antioxidante do bagaço da vinificação de uvas tintas (*Vitis vinifera* L. e *Vitis labrusca* L.). **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC; 2008.

RODRIGUEZ-SAONA, L.E.; WROLSTAD, R.R. Extraction, isolation, and purification of anthocyanins. **Currents Protocols in Food Analytical Chemistry**, F 1.1.1-F1.1.11, 2001.

ROSSO, V.V.; HILLEBRAND, S.; MONTILLA, E.C.; BOBBIO, F.O.; WINTERHATER, P.; MERCADANTE, A.Z. Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) and açai (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC-PDA-MS/MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 291-299, 2008.

RUBILAR, M. et al. Separation and HPLC-MS identification of phenolic antioxidants from agricultural residues: almond hulls and grape pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.10101-10109, 2007.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. **Comunicado técnico 127. Embrapa**, 2007.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; de BRITO, E.S.; PEREZ, J.; SAURA-CALIXTO, F., MANCINI\_FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v.121, p. 996–1002, 2010.

SAGLAM, D. Design and Functionality of Dense Protein Particles. **Thesis submitted in fulfilment of the requirements for the degree of doctor** at Wageningen University, 2012.

SAHU, A.; KASOJU, N.; BORA, U. Fluorescence study of the curcumin-casein micelle complexation and its application as a drug nanocarrier to cancer cells. **Biomacromolecules**, v. 9, p.2905–2912, 2008.

SALAGER, J.L.; FORGIARINI, A.; MARQUÉZ, L.; PEÑA, A.; PIZZINO, A.; RODRIGUEZ, M.P. Using emulsion inversion in industrial process. **Advances in Colloid and Interface Science**. Amsterdam, v.259, p.108-109, 2004.

SAMPAIO, P. G. Otimização da extração, esterilização e identificação de antocianinas obtidas a partir de frutas. **Dissertação de Mestrado**. Universidade de Campinas, Campinas, 2008.

SANDRA, S.; DECKER, E.A.; McCLEMENTS, D.J. Effect of interfacial protein cross-linking on the in vitro digestibility of emulsified corn oil by pancreatic lipase. **Journal Agriculture Food**, v.56, p.7488–7494, 2008.

SANTANA, M.T.A.; SIQUEIRA, H.H.; REIS, K.C.; LIMA, L.C.O.; SILVA, R.J.L. Caracterização de diferentes marcas de sucos de uva comercializados em duas regiões do Brasil. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, n.3, p.882-886, 2008.

SANT’ANNA, V. Concentração de suco de uva por osmose direta e estudo tecnológico para o aproveitamento do bagaço. **Tese de doutorado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, 2013.

SANTOS, dos A.R.F. Emulsões múltiplas, formulação, caracterização, estabilidade e aplicações. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Fernando Pessoa, 2011.

SEERAM, N.P.; BOURQUIN, L.D. Degradation products of cyanidin glycosides from tart cherries and their bioactivities. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.49, p.4924–4929, 2001.

SEMO, E.; KESSELMAN, E.; DANINO, D.; LIVNEY, Y.D. Casein micelle as a natural nanocapsular vehicle for nutraceuticals. **Food Hydrocolloids**, v.21, p.936-942, 2007.

SHIMADA, K.; CHEFTEL, J. C. Sulfhydryl group/disulfide bond interchange reactions during heat-induced gelation of whey protein isolates. **Agriculture Food Chemistry**, v.37, p.161-168, 1989.

SIEBERT, J.K.; TROUKHANOVA, V. N.; LYNN, Y.P. Nature of Polyphenol-Protein Interactions. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.44, p.80-85, 1996.

SILVA, L.M.L.R. Caracterização dos subprodutos da vinificação. **Millenium, Viseu**, v.28, p.123-133, out., 2003.

SILVERSTEIN, M. R., WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. Spectrometric identification of Organic Compounds. 5ª. Edição. **John Wiley & Sons**, New York, 1991.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, Published Quarterly by the American Society of Enologists, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SJÖBLOM, J.; ASKE, N.; AUFLEM, I.H.; BRANDAL, Ø.; HAVRE, T.E.; SAEHER, Ø. **Handbook of hydrocolloids** (2nd ed.), p. 23 – 49. Boca Raton: CRC Press. 2003.

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

SOUZA, V. B de. Aproveitamento dos subprodutos de vinificação da uva Bordô (*Vitis Labrusca*) para obtenção de pigmentos com propriedades funcionais. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de

Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo, 2013.

SOUZA, V.B.; FERREIRA, J.R.N. Desenvolvimento e estudos de estabilidade de cremes e géis contendo sementes e extratos do bagaço da uva Isabel (*Vitis labrusca* L.). **Revista Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.31, p.217-222, 2010.

SPADA, J.C. Uso do amido de pinhão como agente encapsulante. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. Porto Alegre. 2011.

SPIRO, M.; JAGO, D.S. Kinetics and equilibria of tea infusion. Part 3. Rotating disc experiments interpreted by a steady-state model. **Journal of Chemical Society Faraday Transaction**, v.78, n.1, p.295-305, 1982.

SU, J. Formation and stability of food-grade water-in-oil-in-water emulsions. **Thesis of Doctor**. Riddet Institute, Massey University, Palmerston North, New Zealand, 2008.

TAO, Y., Di WU, QING-AN, Z.; DA-WEN, S. Ultrasound-assisted extraction of phenolics from wine lees: Modeling, optimization and stability of extracts during storage. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, p.706–715, 2014.

TAYLOR, M.S. Stabilisation of water-in-oil emulsions to improve the emollient properties of Lipstick. **Dissertation**. University of Birmingham, 2011.

TEIXEIRA, L.N.; STRINGHETA, P.C.; OLIVEIRA, F.C. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. **Revista Ceres**, Viçosa, ano 55, nº4, p.297-304, 2008.

TERCI, D. B. L; ROSSI, A. V. “Indicadores naturais de pH: usar papel ou solução?”. **Química Nova**, v. 25, p. 684-688; 2002.

TERCI, D.B.L. Aspectos analíticos e didáticos de antocianinas extraídas de frutas. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, 2004.

VAN der GRAAF, S.; SCHROËN, C.G.P.H.; VAN DER SMAN, BOOM, R.M. Influence of dynamic interfacial tension on droplet formation during membrane emulsification. **Journal Colloids Interface Science**, v. 277, p. 456, 2004.

VASCO, C.; RUALES, J.; KAMAL-ELDIN, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. **Food Chemistry**, v.111, p. 816–823, 2008.

VON STASZEWSKI, M.; JAGUS, R. J.; PILOSOF, A. M. R. Influence of green tea polyphenols on the colloidal stability and gelation of WPC. **Food Hydrocolloids**, v.25, p. 1077–1084, 2011.

WALSTRA, P. Physical chemistry of foods. **New York: Marcel Dekker**, 2003.

WALSTRA, P. Principles of emulsion formation. **Chemical Engineering Science**, v.48, p.333-349, 1993.

WALSTRA, P., SMULDERS, I. Making emulsions and foams: an overview. **Food Colloids: Proteins, Lipids and Polysaccharides**. Cambridge, U.K.: The Royal Society of Chemistry. P 367-381, 1997.

WANG, E.; YIN, Y.; XU, C.; LIU, J. Isolation of high-purity anthocyanin mixtures and monomers from blueberries using combined chromatographic techniques. **Journal of Chromatography**, v.1327, p.39-48, 2014.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 45, p.304-309, 1997.

WROLSTAD, R. E.; DURST, R. W. Use of anthocyanin and polyphenolic analyses in authenticating fruit juices. **In Proceedings of Fruit Authenticity Workshop**, pp. 79-86. Montreal, Canada, September, 1999.

XU, C.; ZHANGA, Y.; CAO, L.; LUA, J. Phenolic compounds and antioxidant properties of different grape cultivars grown in China. **Food Chemistry**, v. 119, p.1557-1565, 2010.

YUE, X., XU, Z. Changes of Anthocyanins, Anthocyanidins, and Antioxidant Activity in Bilberry Extract during Dry Heating. **Journal of Food Science**. Vol. 73, nº 6, 2008.

ZHANG, Y.; VAREED, S. K.; NAIR, M. G. Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables. **Life Sciences**, v. 76, n. 13, p. 1465-1472, 2005.

ZIMMERMANN, E.; MULLER, R.H. Electrolyte- and pH stabilities of aqueous solid lipid nanoparticle (SLN) dispersions in artificial gastrointestinal media. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, p. 203-210, 2001.

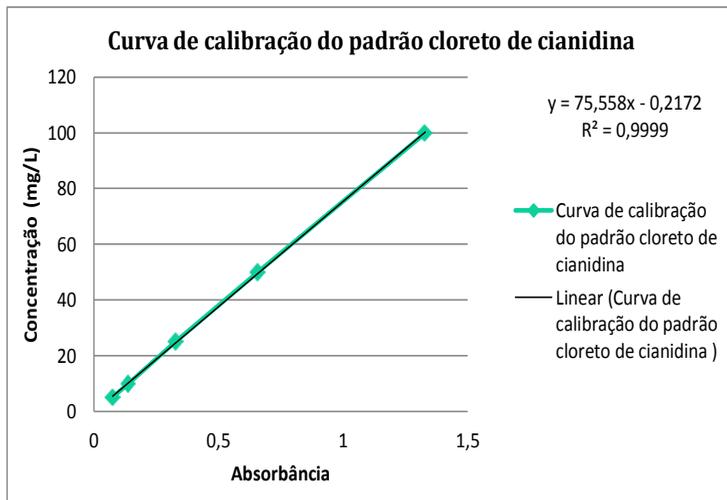
ZORNAN, C. Comparação Físico-química e sensorial de vinhos tintos variedades Ancellota e Tannat. **Monografia apresentada ao Curso Superior de Tecnologia em Viticultura e Enologia** - Centro Federal



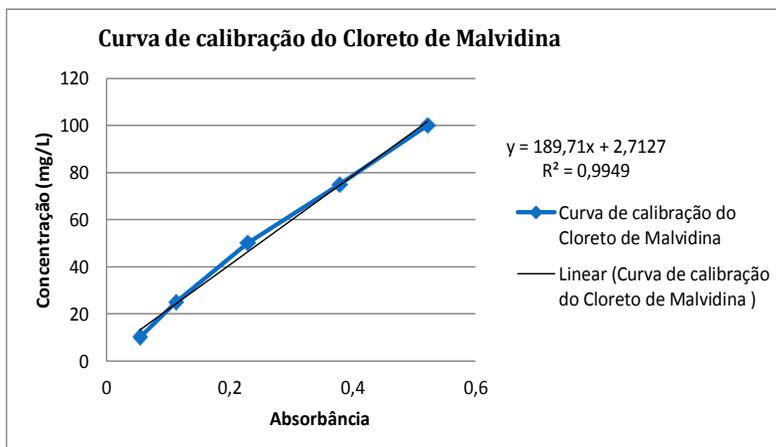
## APÊNDICE A.

Nas Figuras A1 e A2 são apresentadas as curvas de calibração dos padrões de antocianidinas utilizadas na identificação e quantificação das antocianidinas presentes no extrato bruto e nas frações purificadas.

**Figura A. 1** - Curva de calibração do padrão de antocianidina cloreto de cianidina.

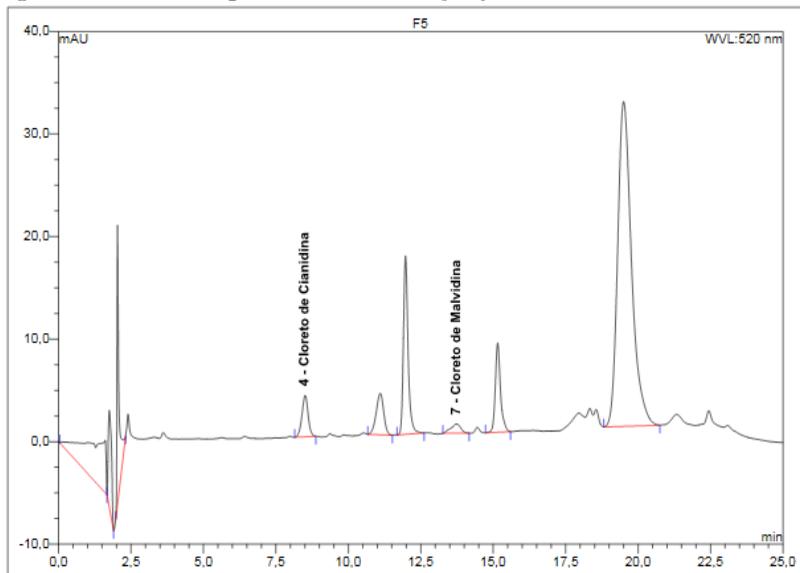


**Figura A. 2** - Curva de calibração do padrão de antocianidina cloreto de malvidina.

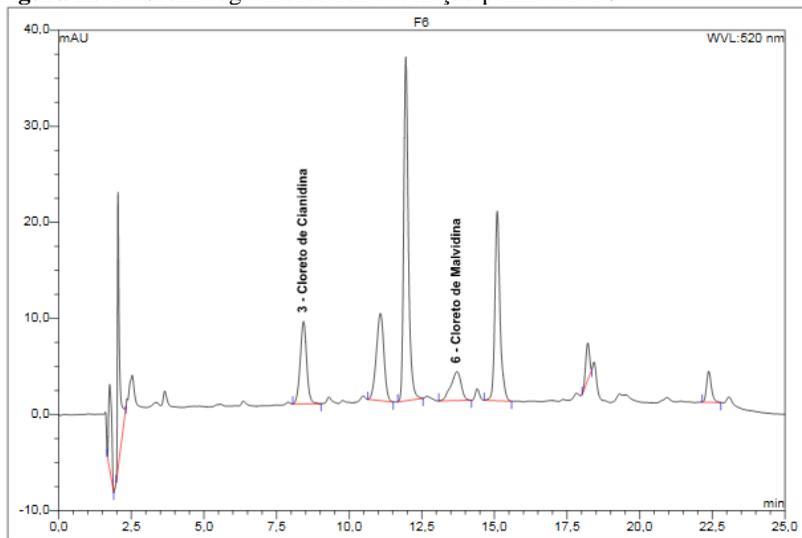


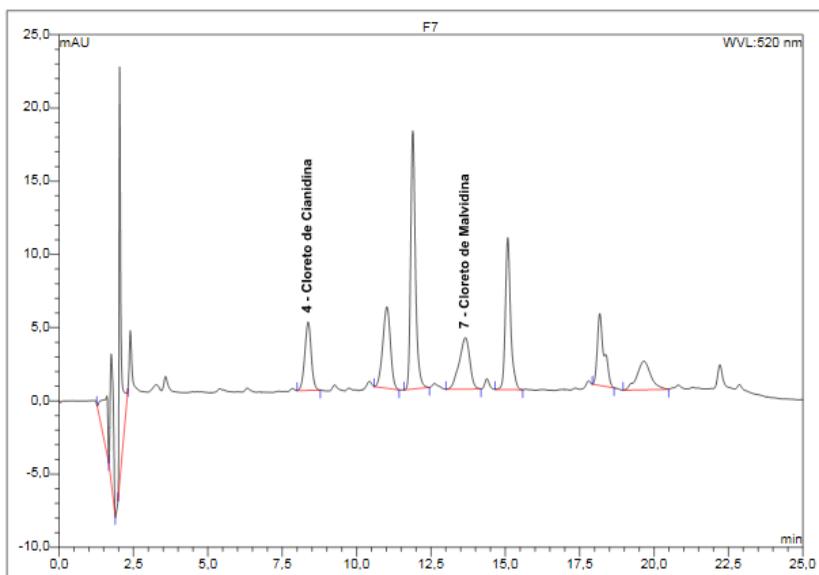
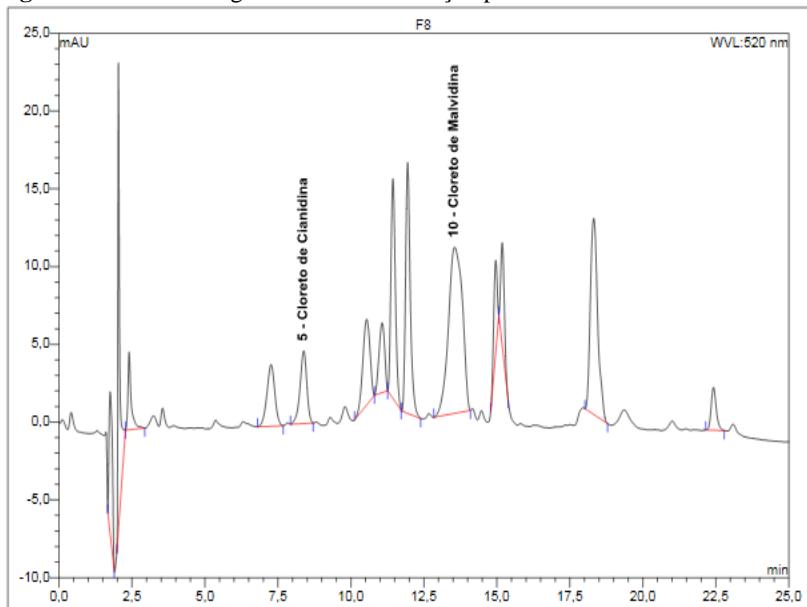
As Figuras A3 á A7 são apresentados os cromatogramas referentes as frações purificadas do extrato bruto da borra do vinho tinto.

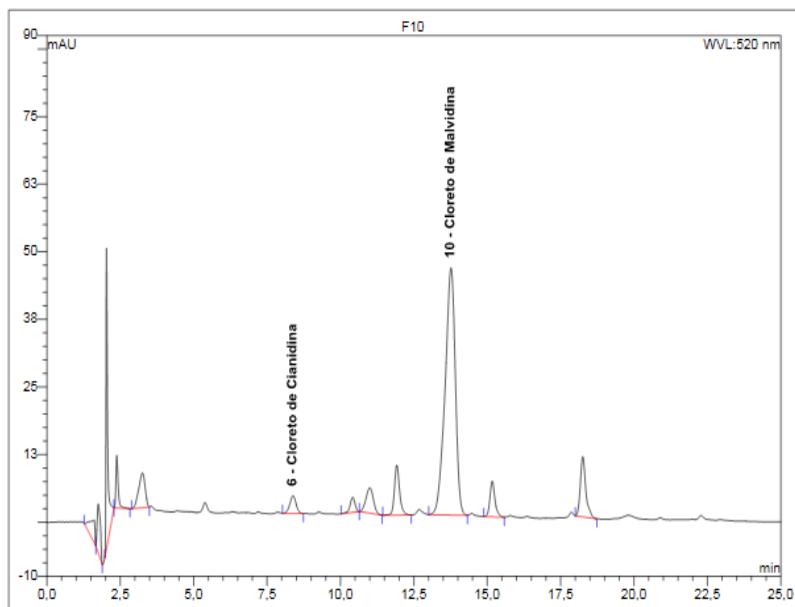
**Figura A. 3** - Cromatograma referente a fração purificada F5.



**Figura A. 4** - Cromatograma referente a fração purificada F6.



**Figura A. 5** - Cromatograma referente a fração purificada F7.**Figura A. 6** - Cromatograma referente a fração purificada F8.

**Figura A. 7-** Cromatograma referente a fração purificada F10.

## **APÊNDICE B. – TRABALHOS PUBLICADOS/ENVIADOS**

### **Artigos completos enviados para periódicos**

1. LOURENÇO, L.A.; PERUZZO, L.C.; SOUZA, A.A.U.; SOUZA, S.M.A.G.U.; TAVARES, L.B.B.; VALLE, R.C.S.C.; VALLE, J.A.B. Optimization of pigment extraction from winemaking waste using response surface methodology. **Food Chemistry**, 2014.

2. PERUZZO, L.C.; LOURENÇO, L.A.; SOUZA, A.A.U.; SOUZA, S.M.A.G.U.; TAVARES, L.B.B.; VALLE, R.C.S.C.; VALLE, J.A.B. Antioxidant capacity and anthocyanins extract purification from the red wine lees

### **Trabalhos completos publicados em anais de congressos**

1. L. C. PERUZZO, L. A. LOURENÇO, J. A. B. VALLE, R. de C. S. C. VALLE, A. A. U. de SOUZA, S. M. A. G. U. de SOUZA. Otimização da extração de antocianinas do resíduo vinícola através da metodologia de superfície de resposta. XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Búzios, RJ, 2012.

2. L. C. PERUZZO, L. A. LOURENÇO, J. A. B. VALLE, R. de C. S. C. VALLE, A. A. U. de SOUZA, S. M. A. G. U. de SOUZA. Purificação de antocianinas obtidas a partir do resíduo vinícola. XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Búzios, RJ, 2012.