

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS
ALIMENTOS

Lauren Fresinghelli Ferreira

**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO AQUOSA DE POLIFENÓIS DO
BAGAÇO DE MIRTILO E DO RESÍDUO DA VINIFICAÇÃO**

Santa Maria, RS
2017

Lauren Fresinghelli Ferreira

**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO AQUOSA DE POLIFENÓIS DO BAGAÇO DE
MIRTILO E DO RESÍDUO DA VINIFICAÇÃO**

**Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do
Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia dos Alimentos, Área de Concentração
em Qualidade de Alimentos, da Universidade
Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como
requisito parcial para obtenção do grau de Mestre
em Ciência e Tecnologia dos Alimentos.**

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Vivian Caetano Bochi

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Tatiana Emanuelli

Santa Maria, RS
2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

FRESINGHELLI FERREIRA, LAUREN
OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO AQUOSA DE POLIFENÓIS DO BAGAÇO
DE MIRTILO E DO RESÍDUO DA VINIFICAÇÃO / LAUREN
FRESINGHELLI FERREIRA.- 2017.
124 p. ; 30 cm

Orientadora: VIVIAN CAETANO BOCHI
Coorientadora: TATIANA EMANUELLI
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2017

1. EXTRAÇÃO AQUOSA 2. POLIFENÓIS 3. ANTOCIANINAS 4.
QUÍMICA VERDE 5. OTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS I. CAETANO BOCHI,
VIVIAN II. EMANUELLI, TATIANA III. Título.

Lauren Fresinghelli Ferreira

**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO AQUOSA DE POLIFENÓIS DO BAGAÇO DE
MIRTILO E DO RESÍDUO DA VINIFICAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Área de Concentração em Qualidade de Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos.

Aprovado em 03 de Março de 2017:

Vivian Caetano Bochi, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Tatiana Emanuelli, Dra. (UFSM)
(Co-orientadora)

Cristiano Augusto Ballus, Dr. (UFSM)

Aline Ferreira Ourique, Dra. (UNIFRA)

Santa Maria, RS
2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, por todo apoio e incentivo durante a minha jornada acadêmica e em todos os momentos da vida. Em especial à minha mãe, que também exerce papel de anjo da guarda, amiga, conselheira, confidente. Obrigada pelo carinho, atenção e compreensão nos meus momentos difíceis. As minhas vitórias são para ti, que és a luz que me guia.

Às minhas amigas de infância, Adriana Ortiz e Jamile Camargo, que há mais de 15 anos acompanham meu crescimento. Juntas dividimos as alegrias e superamos momentos de dificuldade. Agradeço em especial à Jamile, pelo bem mais precioso com o qual poderia ter nos presenteado, minha afilhada Lívia. A dinda ama incondicionalmente essa princesa!

Agradeço também à todas as meninas do Nidal, vulgo Nidaletis, pelo auxílio nos experimentos, pelos almoços, mates, bolos e todas as demais gordices que tanto compartilhamos. Agradecimentos em especial à Luana Maurer e Cristine Rampelotto, pela paciência ao me ensinar estatística; Andréia Quatrin por dividir todo seu conhecimento comigo e por sempre estar disposta a me ajudar. Lisiane Conte, Dariane Silva e Caroline Speroni, pelas nossas conversas sobre a vida, por sempre estarem dispostas a me ouvir e aconselhar. Às ICs que executaram a maior parte dos meus experimentos, Renata Fritzsche e Natalia Minuzzi, e além da parceria de laboratório (muitas vezes nas sextas à noite), pela amizade, os conselhos o apoio de sempre. Obrigada pela força para seguir em frente!! Um agradecimento também aos “guris do professor Laerte”, Gustavo Argenta e Luciano Ritt, pela parceria, pelos churrascos, materiais emprestados, pelos mates diferenciados, enfim, por tornarem o ambiente de trabalho mais divertido e acolhedor.

Agradeço à Vivian Bochi por aceitar ser minha orientadora durante o mestrado, pelos ensinamentos, pela paciência e amizade e por todo o incentivo ao meu crescimento profissional e pessoal.

À minha co-orientadora, Tatiana Emanuelli, que acompanha minha evolução ao longo dos anos, desde a Iniciação Científica. Por me acolher em seu grupo de pesquisa, que é como uma segunda família. Pelo empenho e dedicação que tem por nós orientadas. Sinto imenso orgulho em dizer que faço parte desse grupo.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente auxiliaram nessa caminhada que é a vida da pós-graduação, dando suporte emocional ou apoio moral. Toda manifestação de afeto contribuiu para que o longo caminho fosse mais fácil de seguir.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO AQUOSA DE POLIFENÓIS DO BAGAÇO DE MIRTILO E DO RESÍDUO DA VINIFICAÇÃO

AUTOR: Lauren Fresinghelli Ferreira
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vivian Caetano Bochi
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Tatiana Emanuelli

As indústrias de processamento de frutas e a vitivinicultura geram grandes quantidades de resíduos sólidos, como o bagaço de mirtilo e o de uva, os quais são descartados ou subaproveitados. No entanto, representam fontes ricas em compostos bioativos benéficos à saúde. O presente trabalho teve como objetivo otimizar metodologias de extração aquosa das antocianinas presentes no bagaço de mirtilo e no resíduo de vinificação de uvas *Malbec*, e posterior caracterização da atividade antioxidante e identificação das antocianinas. Foram testadas metodologias convencionais de extração e a utilização de irradiação por micro-ondas para obtenção de soluções ricas em antocianinas. O bagaço de mirtilo foi produzido com a finalidade de simular o processamento industrial, a partir de uma mistura das cultivares (*Duke*, *Bluecrop* e *Climax*) obtida no comércio. Os resíduos da vinificação de uvas *Malbec*, foram doações da Vinícola Velho Amâncio (Itaara, RS), da safra de 2016. Os extratos aquosos do bagaço de mirtilo foram obtidos em condições ótimas de extração definidas com a utilização de um delineamento composto central rotacional (DCCR) e superfície de resposta para avaliação do comportamento das antocianinas monoméricas totais, determinadas por pH-diferencial. As variáveis independentes do processo foram temperatura (38 – 100 °C) e tempo de extração (5 – 60 minutos). A condição ótima (100 °C durante 5 minutos) foi capaz de recuperar mais de 75% das antocianinas presentes no bagaço de mirtilo. A antocianina majoritária foi a malvidina-3-galactosídeo (19%). Os extratos aquosos do resíduo de vinificação foram obtidos por extração assistida por micro-ondas e a condição definida como máximo de resposta (15 minutos, 700 W) também foi determinada através da utilização de DCCR e superfície de resposta. As variáveis independentes, nessa etapa do trabalho foram o tempo de extração (2 – 15 minutos) e a potência (350 – 700 W). A melhor condição determinada pelo modelo foi capaz de extrair mais de 70% das antocianinas presentes no resíduo de uva, e a majoritária foi a malvidina-3-*p*-coumaroilglicosídeo (42%). Os extratos aquosos do bagaço de mirtilo e do resíduo da vinificação apresentaram boa capacidade antioxidante e potencial aplicação como nutracêuticos na indústria de alimentos ou farmacêutica. O presente estudo otimizou metodologias “verdes” para a recuperação de bioativos presentes em resíduos de frutas. Os métodos propostos são simples e rápidos, podendo ser transpostos para escala industrial.

PALAVRAS-CHAVE: Química Verde. Micro-ondas. Antocianinas. Resíduos Agroindustriais.

ABSTRACT

OPTIMIZATION AQUEOUS EXTRACTION OF POLYPHENOLS FROM BLUEBERRY BAGASSE AND WASTE OF WINEMAKING

AUTOR: Lauren Fresinghelli Ferreira
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vivian Caetano Bochi
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Tatiana Emanuelli

Fruit processing and wine industries generate large quantities of solid wastes. Blueberry bagasse and grape pomace are some of them which are discarded or underutilized. However, it still is a rich source of bioactive compounds with putative beneficial effects to human health. The aim of this work was to optimize methodologies of aqueous extraction of anthocyanins present in blueberry bagasse and winemaking residue of *Malbec* grapes. Final solutions were characterized in relation to antioxidant activity and anthocyanin profile identification. Conventional extraction methodologies and use of microwave irradiation to obtain solutions rich in anthocyanins were tested. Blueberry bagasse was produced with the purpose of simulating industrial processing, from a mixture of commercially available cultivars (*Duke*, *Bluecrop* and *Climax*). Winemaking residues of *Malbec* grapes were donated by Vinícola Velho Amâncio (Itaara, RS) from 2016 harvesting year. The aqueous blueberry extract was obtained under optimum extraction conditions defined by the model determined using a central composite design (CCD) and the response surface methodology to evaluate the behavior of total monomeric anthocyanins using the pH-differential method. Independent variables for blueberry pomace extraction optimization were temperature (38 - 100 ° C) and extraction time (5 - 60 minutes). Optimal condition (100 ° C for 5 minutes) was able to recover more than 75% of the anthocyanins present in blueberry bagasse. Major anthocyanin was malvidin-3-galactoside (19%). Aqueous extracts of winemaking residue were obtained by microwave assisted extraction. The final behavior was majorly determined by the time under extraction and the highest recovery was predicted as using 15 minutes under 700 W. It was also determined by CCD and the response surface methodology. Extraction time (2 - 15 min) and power (350 - 700 W) were the independent variables studied for maximal response of total monomeric anthocyanins. Model's best condition was able to recover more than 70% of anthocyanins present in grape residue. Final solution was majorly composed of malvidin-3-*p*-coumaroyl glycoside (42%). Aqueous extracts of blueberry bagasse and winemaking residue presented good antioxidant capacity and potential application as nutraceuticals in food or pharmaceutical industry. Present study optimized "green" methodologies for the recovery of bioactives present in fruit residues. Proposed methods are simple and fast and can be transposed to industrial scale.

KEYWORDS: Green Chemistry; Microwave Assisted extraction; Anthocyanins; Fruit residues.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
2.1 Mirtilo e seu bagaço.....	10
2.2 Uva e o resíduo da vinificação.....	13
2.3 Antocianinas.....	15
2.4 Outros polifenóis não antociânicos.....	19
2.5 Polifenóis e seus benefícios para a saúde.....	20
2.6 Polifenóis e sua aplicação em alimentos.....	22
2.7 Reaproveitamento de resíduos para processos extrativos: desenvolvimentos de métodos utilizando “química verde”.....	22
2.8 Estabilidade de extratos antociânicos.....	25
2.9 Considerações finais.....	27
3 ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	29
3.1 Artigo 1 – Water based extraction of blueberry anthocyanins from pomace: optimization, characterization and comparisons with microwave-assisted conditions.....	29
3.2 Artigo 2 – Otimização de extração aquosa assistida por micro-ondas das antocianinas do bagaço de uvas Malbec, caracterização e comparação com outras metodologias.....	62
4 DISCUSSÃO GERAL.....	91
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	95
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96

1 INTRODUÇÃO

Os polifenóis são encontrados abundantemente em frutas como a uva, mirtilo, amora-preta, sendo responsáveis pela sua coloração, bem como pelas propriedades antioxidantes e antiinflamatórias associadas ao consumo dessas frutas (BOUSSENA et al., 2016a; KY; TEISSEDRE, 2015). O bagaço de uva retém grande quantidade de polifenóis, (BRENES et al., 2016). KHANAL et al. (2009) apontou em seu estudo que 25 – 50% das proantocianidinas de mirtilos frescos permanecem no bagaço após a extração do suco, além disso, mais compostos fenólicos localizados nas peles e sementes das bagas ficam retidos no bagaço. A crescente demanda por tecnologias ambientalmente seguras e o reaproveitamento dos subprodutos do processamento de frutas incentiva o estudo de metodologias extrativas para recuperação desses compostos.

A condição de extração ideal garante máxima extração dos polifenóis presentes na matriz de estudo e deve ser simples, rápida, econômica e aplicável em grande escala (TALMACIU; VOLF; POPA, 2015). Seguindo os princípios da “química verde”, deve ainda, minimizar/evitar a utilização de solventes orgânicos e aumentar a transferência de massa, para maiores rendimentos. Como a maioria dos polifenóis é solúvel em água e em álcool, grande parte dos métodos de extração utiliza-os separadamente ou em misturas, como solventes em processos de lixiviação com ou sem convecção (STRUCK et al., 2016).

A utilização de água em processos extrativos tem impacto ambiental quase insignificante, ainda mais quando misturada à acidificantes reconhecidamente seguros para o consumo humano, como o ácido cítrico (LEE; WROLSTAD, 2004; ZARDO, 2014). Quando associada ao uso de uma tecnologia não convencional de extração, como a irradiação por micro-ondas, pode gerar resultados promissores. DURMAZ; SUMNU; SAHIN (2015) comparou a utilização de metodologia de extração convencional com uma extração assistida por micro-ondas (MAE), e obteve redução no tempo de extração de 4h (convencional) para 5 minutos (MAE).

O presente estudo teve como objetivo otimizar metodologias convencionais e não convencionais para extração das antocianinas do bagaço do mirtilo e do resíduo da vinificação de uvas *Malbec*, utilizando água acidificada com 1% de ácido cítrico como solução extratora. Assim como, caracterizar os extratos obtidos quanto à sua atividade antioxidante e identificar as antocianinas presentes nas soluções.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os “pequenos frutos” englobam um seleto grupo de frutas de alto valor agregado dentre as quais se encontra o mirtilo. A cada safra, são produzidas mais de 100 toneladas de mirtilo, somente na cidade de Vacaria (Rio Grande do Sul) (EMATER, 2014). A uva também é uma fruta bastante produzida em nosso estado, totalizando mais de 870 mil toneladas (MELLO, 2016). Pequena parte da produção de frutas como o mirtilo e a uva é destinada ao consumo *in natura*, o restante é utilizado na indústria para fabricação de sucos, vinhos e geleias. Após o processamento das frutas, grande quantia de resíduos é gerada, criando um problema ecológico e econômico para as empresas do ramo. Por isso, os estudos estão cada vez mais focados em encontrar soluções no intuito de reaproveitar os subprodutos do processamento de frutas, e também recuperar os compostos bioativos que permanecem nas matrizes.

2.1 MIRTILO E SEU BAGAÇO

O mirtilo pertence à família *Ericaceae*, gênero *Vaccinium*, é um fruto pequeno, nativo e economicamente muito importante na América do Norte. É caracterizado por ser uma planta de porte arbustivo e que necessita de adaptação às diferenças climáticas, de fertilidade e de pH dos solos nos diferentes locais onde é cultivado (PERTUZATTI, 2009; RASEIRA; ANTUNES, 2004). Devido essa necessidade, o melhoramento genético foi uma alternativa viável para que novas cultivares fossem obtidas. Os tipos varietais comumente encontrados são os mirtilos *Highbush* do norte e do sul, *Rabbiteye*, *Lowbush*, *Halfhigh*, Pentaploides e Aneuploides (BIAN et al., 2014). Devido as condições de cultivo favoráveis para a produção ao longo do ano, as cultivares *Rabbiteye* e *Highbush* são as mais comercializadas em nosso país (PERTUZATTI et al., 2016).

No Brasil, a cultura do mirtilo ainda é pouco difundida. Porém, as pesquisas com o objetivo de caracterizar a composição de fitoquímicos na fruta e verificar sua adaptação às condições climáticas do país vêm se intensificando (MASSAROTTO et al., 2016; NICOUÉ; SAVARD; BELKACEMI, 2007; PERTUZATTI, 2009; PERTUZATTI et al., 2016). A disponibilidade e versatilidade do fruto permitem que o mirtilo seja incorporado em uma ampla variedade de formulações. Seu consumo é favorecido pela cor atrativa, oriunda do elevado conteúdo de pigmentos naturais, como os compostos fenólicos de natureza antociânica (ROCHA, 2009).

No Rio Grande do Sul, o cultivo de mirtilo concentra-se na região do extremo nordeste do estado, na cidade de Vacaria, e as principais variedades presentes nos pomares são: *Bluecrop, Duke, Elliot, Misty, O'neal* (do grupo *Highbush*) e *Gerogiageen, Sharpblue, Premier* e *Climax* (do grupo *Rabbiteye*) (XAVIER, 2015). A região possui alguns dos requisitos fundamentais para o crescimento e maturação do mirtilo, como as horas de frio necessárias (cerca de 890 horas), solos férteis e bom índice pluviométrico (RASEIRA; ANTUNES, 2004; XAVIER, 2015).

As variedades *Duke, Elliot* e *Bluecrop*, além de apresentarem boa qualidade da fruta, possuem ciclo tardio de crescimento (apresentam época de floração fora do período de geadas da região), e dispensam a utilização do sistema antigeadas, tornando o custo de implantação e produção mais barato, quando comparado às cultivares de ciclo precoce (RASEIRA; ANTUNES, 2004; XAVIER, 2015). As cultivares do grupo *Rabbiteye* necessitam de menos horas de frio (cerca de 360 horas), também são capazes de sobreviver a longos períodos de seca devido a características adaptativas. Os frutos produzidos são ácidos, firmes e de longa conservação (RASEIRA; ANTUNES, 2004).

Além das características fisiológicas das frutas, é importante estudar o perfil de polifenóis presentes nas cultivares, visto que, este fator sofre influência direta do solo, horas de frio, índice pluviométrico, irradiação solar (PERTUZATTI, 2009; STRUCK et al., 2016). Segundo PERTUZATTI et al. (2014), os teores de polifenóis totais em diferentes cultivares de mirtilo podem variar de 1622 a 3457 mg GAE / 100 g de amostra seca para cultivares do grupo *Highbush*. Já para o grupo *Rabbiteye* a oscilação é menor e os valores relatados vão de 2053 a 2792 mg GAE / 100 g de amostra seca. Os resultados de antocianinas também apresentaram variações, com valores médios de 159 a 261 mg CYD-3-G/100g de amostra seca para a variedade *Highbush*, e de 173 a 206 mg CYD-3-G/100g de amostra seca para o grupo *Rabbiteye*. Confirmando as diferenças que existem entre as variedades e a influência climática na concentração desses polifenóis.

Em nosso país, o consumo da fruta “*in natura*” é baixo e grande parte da produção dos frutos é destinada para obtenção de sucos e derivados. Inevitavelmente, esse processamento gera subprodutos residuais como sementes e cascas, denominados em conjunto como bagaço. Esse subproduto é rico em antocianinas e outros polifenóis sendo, portanto, considerado uma boa fonte de corantes naturais e compostos antioxidantes (WROLSTAD; CULVER, 2012; ZARDO, 2014). Segundo estudo para o reaproveitamento do bagaço de mirtilo, após a extração do suco, grande volume de resíduos é gerado e o total de bagaço gerado no processamento pode chegar a representar um volume de até 20% do peso inicial do fruto (KHANAL et al., 2009).

Das antocianinas e polifenóis presentes na baga fresca, cerca de 18% desses compostos permanecem no bagaço e não são extraídos durante o processo de prensagem (STRUCK et al., 2016). Por isso, uma tendência crescente no setor de frutas é a revalorização dos resíduos devido às propriedades funcionais que possuem e para dar um destino sustentável aos subprodutos da indústria (ŠARIĆ et al., 2016).

O bagaço pode ser reutilizado para diversos fins, como a fabricação de farinhas para enriquecimento de alimentos, devido à grande quantidade de fibras dietéticas que possui (GOLDMEYER et al., 2014; ŠARIĆ et al., 2016), ou ainda para processos extrativos. Os extratos recuperam os compostos bioativos que permanecem na matriz mesmo após o processamento e viabilizam uma posterior aplicação na indústria (KHANAL et al., 2009; LEE; WROLSTAD, 2004; STRUCK et al., 2016). LEE; WROLSTAD (2004) testaram diferentes condições de extração em bagas inteiras e em resíduos do processamento de mirtilo para obtenção de um extrato aquoso rico em antocianinas e polifenóis. Esses autores concluíram que a combinação de calor (temperatura de 80 °C) e uso de SO₂ (50 ppm) pode aumentar a extração dos bioativos das bagas e do resíduo (99.9 CYD-3-G/100g de amostra) quando comparado com a utilização somente de aquecimento (80 °C, 53.6 CYD-3-G/100g de amostra). Assim como a combinação de SO₂ (50 ppm) e ácido cítrico (1%) apresentou resultados satisfatórios (99.4 mg CYD-3-G/100g de amostra), quando comparada com o resultado do experimento sem a adição de SO₂ e ácido cítrico (38.9 mg CYD-3-G/100g de amostra). A combinação das três variáveis não revelou diferenças estatisticamente significativas. Os resultados apresentados são úteis pois servem de incentivo ao estudo de metodologias de extração, visando aumentar a recuperação de polifenóis do resíduo de mirtilo.

Os compostos bioativos presentes no bagaço do mirtilo, como as proantocianidinas, antocianinas e flavonóis, conferem a ele características funcionais. Pois, esses fitoquímicos possuem importante papel na prevenção de doenças crônicas, como problemas cardiovasculares e diabetes (GOLDMEYER et al., 2014; KY; TEISSEDRE, 2015; REQUE et al., 2014). Como os polifenóis são solúveis em água e álcool, a maioria dos métodos de extração utiliza misturas desses dois solventes como solução extratora (STRUCK et al., 2016). Por esta razão, há uma crescente atenção para o aproveitamento desse resíduo, principalmente, para o desenvolvimento de tecnologias que permitam a extração desses compostos de maneira segura e sustentável.

2.2 UVA E O RESÍDUO DA VINIFICAÇÃO

A uva é uma das frutas de maior produção mundial, totalizando anualmente mais de 67 milhões de toneladas e caracterizando-se como um produto de grande importância econômica (ANTONIOLLI et al., 2015). No Brasil, aproximadamente 60% da produção nacional de uvas destina-se ao processamento para elaboração de vinhos, sucos e derivados, sendo o restante destinado ao consumo *in natura*. O estado do Rio Grande do Sul é responsável por cerca de 90% da produção nacional, com grande importância econômica para as regiões da Campanha e Serra Gaúcha (PROTAS, 2016; MELLO, 2013). Existem muitos estudos relacionados à uva, por ser majoritariamente utilizada para o processo de vinificação e por ser fonte de diferentes classes de compostos fenólicos os quais estão relacionados com a prevenção de doenças crônicas e forte ação antioxidante (FONTANA; ANTONIOLLI; BOTTINI, 2013; KY; TEISSEDRE, 2015).

A uva da cultivar *Malbec* é de origem francesa, possui capacidade de adaptação em climas secos. Pela sua forte coloração, caracteriza-se por produzir vinhos pigmentados, encorpados, com elevada concentração de taninos, aroma frutado e sabor que assemelha-se ao de ameixa (FANZONE et al., 2010). Na Argentina, país onde é comumente cultivada, a produção de *Malbec* representa 31% da área de cultivo e o vinho obtido dessa variedade é considerado o emblemático do país (ANTONIOLLI et al., 2015; FANZONE et al., 2010). O cultivo de uvas *Malbec* ainda é pouco expressivo no Brasil. Porém, encontra-se em crescimento, principalmente após a popularização e expansão da variedade na Argentina. Sua produção concentra-se principalmente na região Sul do país, em locais de altitude elevada que proporcionam maior incidência de luz, maior amplitude térmica e temperaturas noturnas amenas, fatores que favorecem o desenvolvimento mais completo dos compostos fenólicos (BERLI et al., 2008; SILVA et al., 2008).

O bagaço de uva é o resíduo que fica após a fermentação na produção do vinho, constituído principalmente por cascas, sementes e restos de polpa. Ainda que a vinificação seja um processo de extração parcial, o resíduo de uva apresenta elevado teor de compostos fenólicos e antocianinas. O bagaço de uva retém cerca de 20 – 30% dos polifenóis na casca e 60 – 70% nas sementes. Essas concentrações podem variar de acordo com o processo de cultivo, colheita e processo de vinificação. Ainda assim, os resíduos podem ser considerados potenciais fontes naturais para obtenção desses bioativos (ANTONIOLLI et al., 2015; BRENES et al., 2016). Devido às propriedades benéficas, há um crescente interesse na extração de tais compostos que priorize a utilização de solventes reconhecidamente seguros (GRAS), como por exemplo, água e etanol (ANTONIOLLI et al., 2015; MONRAD et al., 2010).

O reaproveitamento do resíduo de uva é de suma importância, pois a falta de destino e o grande volume gerado pela indústria acabam tornando-se problemas ecológicos e econômicos (ANTONIOLLI et al., 2015). No Brasil, a geração de resíduos pelo setor de vitivinicultura tem crescido, cerca de 60% das uvas plantadas no país são destinadas à produção de vinhos, o que gera em torno de 5% na forma de bagaço (BARCIA, 2014; BARCIA et al., 2015).

Existem evidências de efeitos antiinflamatórios dos polifenóis de resíduos de uva em modelo de colite (BOUSSENA et al., 2016a, 2016b), em modelo de infarto agudo do miocárdio e de doenças crônicas degenerativas (ANTONIOLLI et al., 2015; KY; TEISSEDE, 2015). Além disso, efeito antimicrobiano contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (DAGLIA et al., 2007; YU; AHMEDNA, 2013) também já foram atribuídos aos polifenóis de extratos de bagaço de uva. Na literatura consultada, há relatos da utilização do resíduo de uva de maneira diferente ao uso de extratos e os resultados obtidos são positivos. Os estudos mostram a utilização direta do bagaço de uva liofilizado para o enriquecimento de dietas de animais, e o efeito protetor causado no tecido do cólon contra o desenvolvimento de tumores (LIZARRAGA et al., 2011; SÁNCHEZ-TENA et al., 2013).

A identificação de compostos fenólicos e antocianinas e determinação da atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva obtidos por diferentes metodologias extrativas foi recentemente estudada, para diferentes cultivares: *Grenache*, *Syrah*, *Carignan*, *Alicante*, *Mourvèdre* (KY; TEISSEDE, 2015), *Sunbelt* (MONRAD et al., 2010) e *Malbec* (ANTONIOLLI et al., 2015; FONTANA; ANTONIOLLI; BOTTINI, 2013).

2.3 ANTOCIANINAS

Compostos antociânicos são encontrados não exclusivamente, mas em grandes concentrações em frutas vermelhas (RUIZ et al., 2013), no vinho e em resíduos da vinificação (NIXDORF; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2010; ROBY; MATTHEWS, 2008) e também em resíduos do processamento de frutas como o mirtilo (LEE; WROLSTAD, 2004; ŠARIĆ et al., 2016).

Antocianinas pertencem a um grande grupo de polifenóis chamados flavonoides, que são metabólitos secundários sintetizados pelas plantas (HE; GIUSTI, 2010). Flavonoides são uma classe de compostos bioativos que ocorrem naturalmente nos vegetais, e apresentam grande importância para a reprodução e crescimento, promovendo a proteção do vegetal contra patógenos e predadores, e também contra variações no conteúdo de água, luz, deficiência de

nutrientes minerais (BOCHI, 2013; SEBASTIAN et al., 2015). O interesse no estudo dessas substâncias é estimulado pelo potencial benéfico à saúde possivelmente relacionado à atividade antioxidante desse grupo de fitoquímicos. Além disso, estão associados ao melhoramento de propriedades organolépticas importantes de frutas e produtos processados, como cor e sabor (AHAMD et al., 2015; LITVINOV, 2007).

Os compostos fenólicos, de uma forma geral, possuem similaridades quanto à estrutura molecular básica possuindo pelo menos um anel aromático com um grupo hidroxila ligado a ele, variando de moléculas simples a compostos altamente polimerizados (SUCUPIRA et al., 2014). Os pigmentos ocorrem geralmente na forma de antocianinas, que são derivados glicosilados das agliconas, antocianidinas. As antocianidinas na sua maioria possuem hidroxilas nas posições 3, 5 e 7. A figura 1a mostra a estrutura do cátion flavílico (estrutura fundamental das antocianidinas) e 1b mostra o exemplo de estrutura de uma antocianidina.

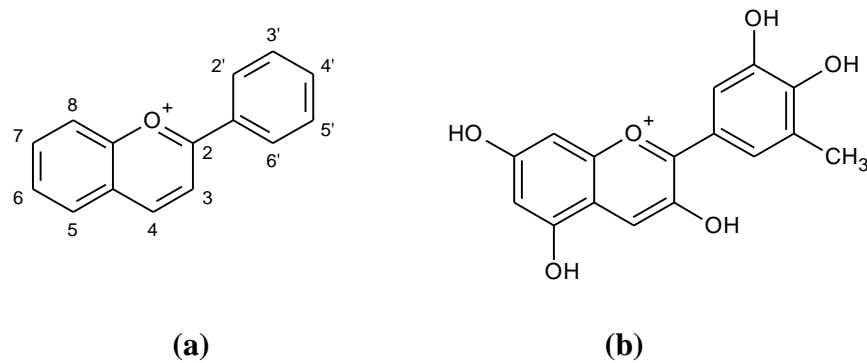


Figura 1: (a) estrutura do *cátion flavilium* e (b) estrutura da antocianidina cianidina.
 FONTE: Arquivo pessoal.

Devido à presença de um longo cromóforo com oito ligações duplas conjugadas que transportam uma carga positiva, as antocianinas são intensamente coloridas em condições ácidas. O máximo de absorção no espectro visível geralmente é entre 465 e 550nm (HE; GIUSTI, 2010; PATRAS et al., 2010). Diferindo nos padrões de hidroxilação, metilação e nas posições de ligação nos anéis, cerca de 25 agliconas foram identificadas na natureza. As antocianinas mais encontradas na natureza são: cianidina, delphinidina, malvidina, pelargonidina e petunidina (HE; GIUSTI, 2010; RENTZSCH; SCHWARZ; WINTERHALTER, 2007). A cor varia entre as agliconas (tabela 1), quando o anel B possui mais grupos hidroxila, há tendência à cor azul no espectro e as que possuem mais grupos metoxila, à cor vermelha no espectro (HE; GIUSTI, 2010; WROLSTAD; CULVER, 2012).

Tabela 1: Diferenças na estrutura química, cor e λ_{max} das antocianidinas comumente encontradas na natureza.

Nome	Substituição		Cor	λ_{\max} (nm) em MeOH acidificado com HCl
	R1	R2		
Cianidina	OH	H	Magenta	535
Peonidina	OCH ₃	H	Magenta	532
Pelargonidina	H	H	Vermelho	520
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃	Roxo	542
Delfinidina	OH	OH	Roxo	546
Petunidina	OCH ₃	OH	Roxo	543

FONTE: He & Giusti (2010).

Quando a antocianidina é glicosilada, é conhecida como antocianina. Os grupos hidroxila podem ser substituídos por açúcares, que podem ainda estar ligados a outros açúcares (por ligações glicosídicas) ou acilados através de ligações éster com ácidos orgânicos ou alifáticos (ácido cinâmico, ácido malônico, por exemplo) (HE; GIUSTI, 2010; TERCI; ROSSI, 2002). A forma aglicona das antocianinas dificilmente é encontrada na natureza, por causa da sua baixa estabilidade. A glicosilação melhora as propriedades químicas da molécula por formar uma rede intramolecular de ligações de hidrogênio (HE; GIUSTI, 2010; PASCUAL-TERESA; SANCHEZ-BALLESTA, 2008; TERCI; ROSSI, 2002).

As antocianinas têm a propriedade de apresentar cores diferentes dependendo do pH do meio em que elas se encontram. De um modo geral, em pH extremamente ácido (1-2), as antocianinas apresentam coloração intensamente avermelhada, em virtude do predomínio do cátion flavílico. Em pH maior que 2, há um equilíbrio entre o cátion flavílico e uma estrutura chamada pseudobase carbinol. Com o aumento do pH, as antocianinas podem tornar-se incolores (pH 6). Em valores de pH acima de 6, pode haver a formação da espécie cis-chalcona. Em meio fortemente alcalino, a coloração torna-se amarelada, devido ao equilíbrio entre formas ionizadas de chalconas cis e trans (HE; GIUSTI, 2010; MARÇO; POPPI, 2008; TERCI; ROSSI, 2002; WROLSTAD; CULVER, 2012) As transformações estruturais das antocianinas em meio aquoso em função do pH estão representadas pela Figura 2.

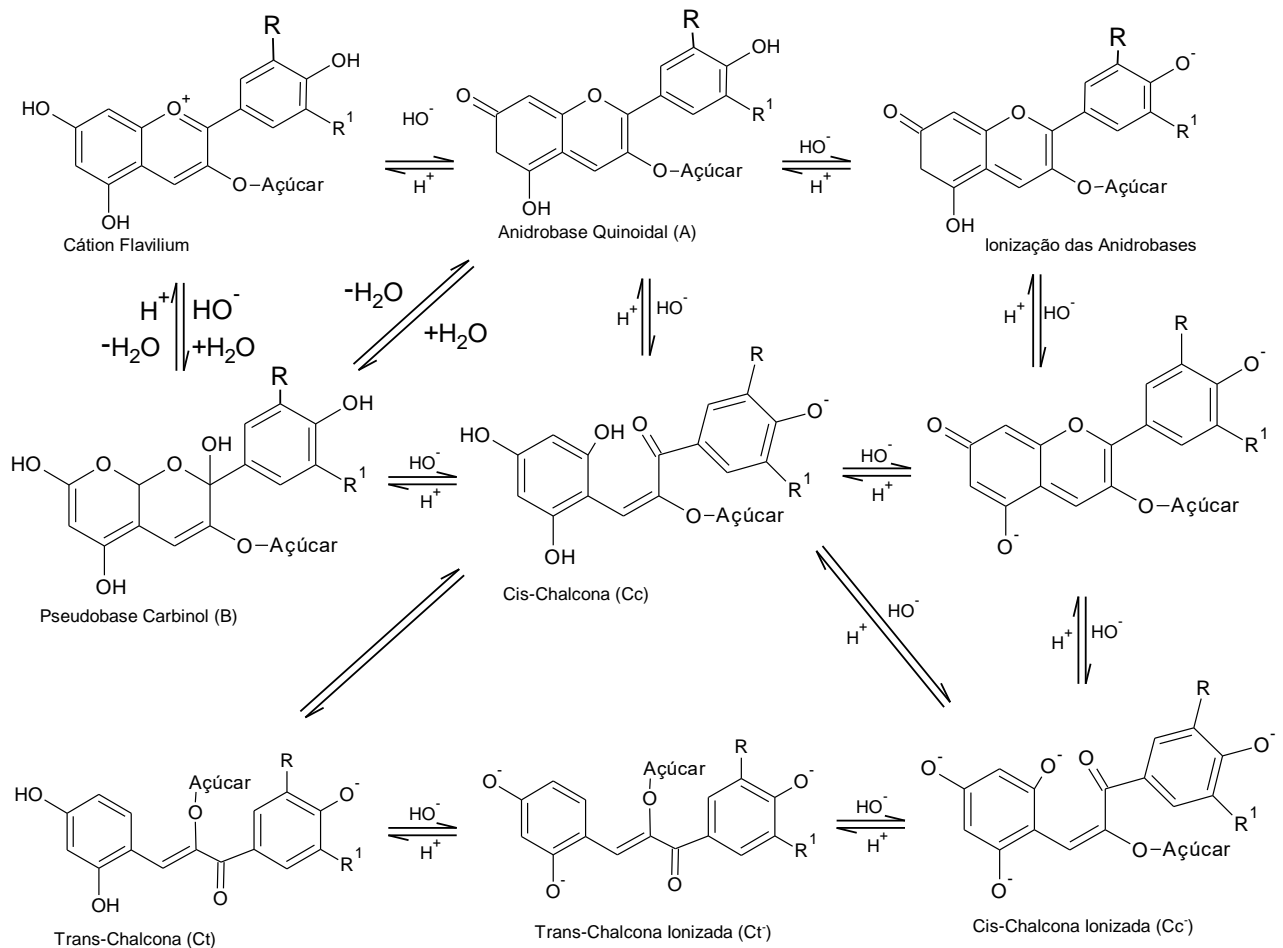


Figura 2: Possíveis transformações estruturais das antocianinas em meio aquoso em função do pH. FONTE: Arquivo pessoal.

A grande diversidade estrutural, a alta reatividade, e a capacidade de formar complexos insolúveis com proteínas e carboidratos, são alguns fatores que devem ser considerados durante a extração, separação, identificação e quantificação de compostos fenólicos em alimentos (BOCHI et al., 2014). Antocianinas são compostos hidrossolúveis estáveis em condições ácidas, por isso, algumas opções de solventes são metanol, etanol, acetona, água e suas combinações, acidificados com ácido fórmico ou cítrico, por exemplo (BOCHI et al., 2014; LEE; WROLSTAD, 2004; ZARDO, 2014). Acidificar o meio para manter os valores de pH inferiores a 2 é uma das medidas tomadas para facilitar a remoção e garantir a estabilidade das antocianinas.

Por isso, há crescente interesse em desenvolver e otimizar metodologias extrativas que preservem as características das antocianinas. Levando em consideração os preceitos da “química verde”, prioriza-se a utilização de solventes que não agridam o meio ambiente, como a água, e o uso de acidificantes que sejam reconhecidamente seguros para aplicação em alimentos, como ácido cítrico, por exemplo.

2.4 OUTROS POLIFENÓIS NÃO ANTOCIÂNICOS

A expressão “polifenóis não antociânicos” inclui diversas classes desses compostos, desde ácidos fenólicos simples até taninos altamente polimerizados. Nos vegetais, também são formados no metabolismo secundário e são igualmente importantes para a sobrevivência e desenvolvimento das espécies (EDIRISINGHE; BURTON-FREEMAN, 2016; JOSEPH et al., 2016).

Existem dados sobre a caracterização de diversas cultivares de mirtilo na literatura consultada. O ácido cafeico foi identificado nas cultivares *Duke*, *Bluecrop* (ambas do grupo Highbush) e *Climax* (do grupo Rabbiteye). Quercetina, rutina, laritricina, siringetina, ácido clorogênico e ferrúlico estão presentes nas cultivares *Bluecrop* e *Duke* (GAVRILOVA et al., 2011). A presença de miricetina, kaempferol, catequina, e dos ácidos p-coumárico, gálico, hidroxibenzoico, elágico, ferrulico foi relatada para as cultivares *Climax* e *Bluecrop* (B. PERTUZATTI et al., 2012; LOHACHOOMPOL et al., 2008).

A caracterização do resíduo de uva de diversas cultivares (*Cabernet mitos*, *Lemberger*, *Spatburdunger*, *Trollinger*, *Weissner riesling*, *Kerner*, *Cabernet sauvignon*, *Merlot*) revelou a presença dos mesmos compostos não antociânicos em todas as cultivares: catequina, epicatequina, galato de epicatequina, *polydatin*, quecertina, kaempferol, *trans-resveratrol* e dos ácidos gálico, siríngico, caftárico, cafeico, p-coumárico, ferrúlico (FONTANA; ANTONIOLLI; BOTTINI, 2013; KAMMERER et al., 2004; VERGARA-SALINAS et al., 2015). No resíduo de uvas da cultivar *Malbec*, além dos compostos citados, ainda foram encontrados: piceatannol, galocatequina, epigalocatequina e galato de epigalocatequina (ANTONIOLLI et al., 2015).

2.5 POLIFENÓIS E SEUS BENEFÍCIOS PARA A SAÚDE

A estrutura química dos polifenóis permite que atuem por diferentes mecanismos como antioxidantes, como por exemplo: inibidores de radicais livres, quelantes de íons metálicos (como Ferro e Cobre), e também como inibidores de enzimas responsáveis pela produção de radicais livres (BOHN, 2014; DORNAS et al., 2007; GHOUILA et al., 2017). Evidências epidemiológicas sugerem os benefícios do consumo de alimentos ou bebidas ricas em polifenóis e a redução da incidência de doenças cardiovasculares (AMIOT; RIVA; VINET, 2016), redução do risco de doenças inflamatórias do intestino (KAULMANN; BOHN, 2016),

diabetes (EDIRISINGHE; BURTON-FREEMAN, 2016), câncer e doenças crônicas degenerativas (KY; TEISSEDRE, 2015).

Estudos *in vitro* e *in vivo*, mostram os efeitos antidiabéticos dos polifenóis presentes em bagas. Tais efeitos, geralmente estão associados com a realização e manutenção da homeostase da glicose, mas também são relatados efeitos em mecanismos não dependentes de insulina (que é o elemento central na homeostase da glicose) (EDIRISINGHE; BURTON-FREEMAN, 2016; JOSEPH et al., 2016). Antocianinas, por exemplo, têm sido consideradas cardioprotetoras, antidiabéticas, antiinflamatórias e anticarcinogênicas, bem como podem auxiliar na perda de peso (DIACONEASA et al., 2015; HE; GIUSTI, 2010). BUNEA et al. (2013) relataram que a fração rica em antocianinas em concentrações superiores a 500 µL/mL, foi capaz de inibir a proliferação de células de melanoma B16-F10. Além disso, estimulou a apoptose e aumentou a atividade total de lactato desidrogenase em células de melanoma B16-F10 metastático. Estes resultados indicam que as antocianinas presentes no extrato podem servir como tratamento quimiopreventivo ou adjuvante para o controle de metástases.

Atualmente, não existem doses de ingestão estabelecidas para antocianinas e muitos outros compostos bioativos, em países como Estados Unidos, Canadá e União Europeia. A China tem um nível proposto de 50 mg/dia para antocianinas, já a *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) 2007-2008 estimou para a população dos Estados Unidos a ingestão de aproximadamente 11,66 mg/dia para indivíduos com idade menor ou igual a 20 anos, mulheres tiveram maior ingestão diária de antocianinas (cerca de 12,66 mg/dia) que os homens (cerca de 10,56 mg/dia) (WALLACE; GIUSTI, 2015).

Contudo, as propriedades benéficas dos polifenóis não podem ser totalmente compreendidas sem a análise da sua distribuição pelos tecidos e sua biodisponibilidade no organismo (KIRAKOSYAN et al., 2015). A biodisponibilidade pode ser avaliada de várias maneiras, quando avaliada pela ingestão oral de nutrientes, geralmente se refere à quantidade e proporção ou fração da dose ingerida que é digerida, absorvida e metabolizada através de vias normais (MCGHIE; WALTON, 2007). A captação de polifenóis pode depender da sua estrutura química, como também da porção de açúcar ligada e da estrutura da aglicona. Já é relatado que antocianinas possuem baixa biodisponibilidade, a maioria dos estudos mostram uma recuperação de cerca de 1% da dose ingerida (HE; GIUSTI, 2010; KIRAKOSYAN et al., 2015; POJER et al., 2013; WALLACE; GIUSTI, 2015).

Polifenóis são compostos bastante sensíveis às condições ambientais (pH, temperatura, luz, oxigênio), e podem ainda interagir com outros compostos como polissacarídeos e proteínas

e reduzir ou perder sua atividade antioxidante (GIBIS; RUEDT; WEISS, 2015; KUNTZ et al., 2015). A degradação das antocianinas pode começar já na cavidade oral, e mostrou-se dependente da estrutura e mediada pela microbiota oral (KAMONPATANA et al., 2012; WALLACE; GIUSTI, 2015).

Uma boa alternativa aos problemas de estabilidade, é o encapsulamento dos compostos, a fim de preservar suas características iniciais e aumentar a meia vida ao longo do trato gastrointestinal. Evidências do aumento da absorção de compostos bioativos encapsulados já foram relatadas. SESSA et al., (2014) demonstraram em seu estudo, que a utilização de nanossistemas lipídicos para encapsulamento de fenólicos oriundos de resíduos de vinificação, promoveu aumento da atividade antioxidante desses compostos em modelos com células Caco-2. No entanto, mais estudos são necessários a fim de avaliar a distribuição tecidual de compostos fenólicos nanoencapsulados, e seus metabólitos em animais como dados relevantes para a futura aplicação desses compostos bioativos em alimentos.

Além disso, o desenvolvimento de encapsulados de antocianinas e outras aplicações é dependente de estudos prévios para a otimização de métodos de extração rápidos e seguros. Os extratos finais, obtidos por métodos livres de solventes orgânicos, não apresentam teores residuais desses solventes e podem ser concentrados e purificados para o desenvolvimento de fitoquímicos.

2.6 POLIFENÓIS E SUA APLICAÇÃO EM ALIMENTOS

Como antioxidantes naturais, os compostos fenólicos foram adicionados em diversos modelos alimentares, como carnes frescas ou processadas, no lugar de aditivos sintéticos (que têm o uso cada vez mais restrito) para evitar a oxidação lipídica (MAESTRE et al., 2010; PAZOS et al., 2010). TSENG & ZHAO, (2013) na tentativa de retardar a oxidação lipídica de iogurtes e molhos para salada durante armazenamento refrigerado, testaram a adição de bagaço de uva como fonte de fibra antioxidante. A adição de bagaço de uva resultou na redução de 35 a 65% dos valores de peróxidos (indicativo de oxidação lipídica) em todas as amostras testadas. O estudo sensorial mostrou aceitabilidade dos produtos, indicando que o bagaço de uva poderia ser utilizado como ingrediente alimentar funcional, promovendo benefícios à saúde humana e prolongando a vida útil dos produtos alimentares.

Em seu estudo para testar efeito antimicrobiano em sopas de legumes, utilizando bagaço de uva bruto e em pó, SAGDIC, OZTURK, & KISI, (2012) relataram que Cepas de

Staphylococcus aureus foram mais sensíveis que cepas de *Escherichia coli*, quando foi aplicado o resíduo bruto em comparação com o pó. Além disso, houve diminuição da contagem bacteriana com o aumento da concentração do extrato. Este estudo mostrou que o bagaço de uva poderia ser usado como agente antimicrobiano em modelos alimentares adequados.

O uso dos compostos fenólicos deve ser capaz de melhorar o processo de produção dos alimentos, sem afetar as propriedades funcionais dos compostos-alvo. O produto final deve atender os altos padrões de qualidade e segurança exigidos pelos órgãos regulamentadores sem perder as características organolépticas que são apreciadas pelos consumidores (FONTANA; ANTONIOLLI; BOTTINI, 2013).

2.7 REAPROVEITAMENTO DE RESÍDUOS PARA PROCESSOS EXTRATIVOS: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS UTILIZANDO “QUÍMICA VERDE”

Com o aumento da conscientização dos consumidores sobre o uso de aditivos alimentares e a atenção que os alimentos funcionais têm ganhado nos últimos anos, torna-se necessário identificar fontes naturais alternativas, mais seguras que os antioxidantes sintéticos (ANTONIOLLI et al., 2015; FONTANA; ANTONIOLLI; BOTTINI, 2013). Da mesma forma, as indústrias estão focadas em diminuir o impacto ambiental causado pelo grande volume de subprodutos gerados durante o processamento de frutas (FONTANA; ANTONIOLLI; BOTTINI, 2013; YU; AHMEDNA, 2013).

Na literatura, existem trabalhos de extração e avaliação da atividade antioxidante dos extratos oriundos do bagaço de diversas frutas, sendo que as mais estudadas são as *berries* (*cranberry*, *blueberry*, *raspberry*) e a uva (FONTANA; ANTONIOLLI; BOTTINI, 2013; ŠARIĆ et al., 2016; STRUCK et al., 2016). Estudos com bagaço de uvas *Malbec* visando à extração de polifenóis são descritos na literatura. FANZONE et al. (2011, 2012) caracterizaram os polifenóis de extratos do resíduo de vinificação de uvas *Malbec*, no entanto, utilizando como solução extratora uma mistura hidroalcoólica. Na literatura consultada, não há trabalhos que reportem a utilização de tecnologias não convencionais, como a extração assistida por micro-ondas e a utilização de solução extratora aquosa, para a extração dos polifenóis presentes no bagaço de uvas *Malbec*. LEE; WROLSTAD (2004) utilizaram bagaço do processamento de mirtilo para testar condições de extração, entre elas a utilização de água acidificada com ácido cítrico. Contudo, a metodologia proposta empregava longos períodos de extração (1 hora) a altas temperaturas (80 °C), combinação que pode ser prejudicial aos bioativos presentes na amostra, causando sua degradação.

A conceitualização de “extração verde” visa evitar/minimizar o uso de solventes orgânicos, além de outros benefícios, como encurtar o tempo de extração, intensificar o processo de transferência de massa e aumentar os rendimentos da extração (BARBA et al., 2016; CHEMAT et al., 2015). CHEMAT et al., (2015), em seu estudo sobre extrações em produtos naturais livres de solventes orgânicos, cita três possíveis soluções para que a “metodologia verde” de extração seja capaz de atingir o ponto ótimo de aproveitamento de matérias-primas, solventes, energia, e consiga ser transposta e aplicada na indústria: (1) melhoria e otimização de processos já existentes; (2) utilização de equipamentos que façam parte da rotina da indústria; e (3) inovação em processos e procedimentos que eliminem solventes orgânicos.

As metodologias convencionais utilizadas para a extração de polifenóis são baseadas em longos tempos de agitação e utilização de solventes orgânicos e soluções ácidas (CAI et al., 2016). Em comparação com o método convencional, a extração assistida por micro-ondas (MAE) possui várias vantagens, incluindo reduzido tempo de processamento e menor volume de solvente. Além disso, permite uma efetiva transferência de massa e penetração do solvente na matriz de trabalho, através da ruptura das paredes celulares vegetais (BARBA et al., 2016; TSUKUI; REZENDE, 2014). O processo de extração MAE envolve três etapas sequenciais: 1) separação dos solutos dos locais ativos da matriz sob aumento de temperatura e pressão, 2) difusão do solvente através da matriz da amostra, e 3) liberação dos solutos da matriz de amostra para o solvente (ALUPULUI; CĂLINESCU; LAVRIC, 2012; BARBA et al., 2016). Devido às vantagens da aplicação de MAE, a viabilidade do uso do processo em escala industrial tem sido estudada, principalmente em processos extrativos utilizando resíduos de frutas (ALUPULUI; CĂLINESCU; LAVRIC, 2012; LIAZID et al., 2011; SIMSEK; SUMNU; SAHIN, 2012).

Trabalhos aplicando MAE para a extração de polifenóis são comumente encontrados na literatura para diferentes matrizes, como por exemplo: pó de mirtilo (YU et al., 2016; ZHENG et al., 2013), cereja (GAROFULIC et al., 2013), uva (LI et al., 2012b) e também batata doce (CAI et al., 2016). Contudo, apesar da utilização de MAE, a maioria dos trabalhos utiliza como solução extratora misturas compostas de solventes orgânicos acidificados e água. Levando em consideração os princípios da “química verde”, há interesse em desenvolver, ou otimizar metodologias já existentes priorizando-se a utilização de solventes reconhecidamente seguros (GRAS), como a água, e acidificantes já usados como aditivos em alimentos, como o ácido cítrico (ANTONIOLLI et al., 2015; ZARDO, 2014).

A utilização de água em processos extrativos tem um impacto ambiental quase insignificante, o que a torna um solvente interessante e viável na extração de compostos

bioativos (ADJÉ et al., 2010). Várias das suas propriedades químicas modificam-se quando há variação de temperatura, e uma das alterações mais drásticas é a da constante dielétrica, que vai de 78 a 25 °C para 14 a 350 °C. Com o aumento da temperatura, há diminuição nas interações eletrostáticas entre as moléculas de água, ocorre aumento no movimento/rotações das suas moléculas, permitindo maior contato e dissolução dos compostos presentes na matriz da qual deseja-se extrair (PLAZA; TURNER, 2015). O uso de altas temperaturas em processos extrativos aumenta a permeabilidade dos tecidos da casca e facilita a passagem dos bioativos para o solvente. Além disso, a diminuição da viscosidade do solvente também facilita a rápida penetração. Em altas temperaturas ocorre a diminuição da solubilidade do oxigênio na solução extratora, reduzindo a degradação oxidativa dos polifenóis durante o processo, o que resulta no aumento da quantidade de compostos recuperados da matriz (OEY et al., 2008; PAINI et al., 2016; ZARDO, 2014).

2.8 ESTABILIDADE DE EXTRATOS ANTOCIÂNICOS

As características estruturais e a composição antociânica são alguns dos responsáveis pela estabilidade de extratos obtidos de frutas e de seus resíduos do processamento. Um bom exemplo disso, é a melhor estabilidade apresentada por extratos obtidos de cenouras pretas, quando comparados aos obtidos de bagaço de uva (que possui menor grau de acilação). Pigmentos acilados possuem estabilidade mais elevada do que os equivalentes não-acilados (MAIER et al., 2009; REYES; CISNEROS-ZEVALLOS, 2007). A manutenção da cor do extrato de cenoura preta pode ser atribuída aos efeitos de copigmentação intramolecular de antocianinas aciladas, impedindo o ataque nucleofílico da água, que leva à formação de chalconas por clivagem hidrolítica do sistema aromático e, assim, a perda de cor do extrato (KAMMERER; CARLE, 2004; PATRAS et al., 2010).

Vários fatores podem afetar a estabilidade de extratos ricos em antocianinas, incluindo: pH, luz, oxigênio, enzimas, ácido ascórbico, açúcares, dióxido de enxofre ou sais de sulfito, íons metálicos e o próprio fenômeno da copigmentação (LI et al., 2016; LOYPIMAI; MOONGNGARM; CHOTTANOM, 2016). O tratamento térmico é um dos métodos mais utilizados para prolongar a vida útil dos alimentos, e também um dos fatores mais importantes que afeta a estabilidade das antocianinas (SILVA et al., 2009; SUI; BARY; ZHOU, 2016). A degradação cinética das antocianinas pode ser avaliada também a partir de uma perspectiva termodinâmica, baseada em funções de ativação, tais como: energia livre (ΔG), entalpia (ΔH), entropia (ΔS) e energia de ativação (E_a). E essas funções podem ser estimadas para reações que

ocorrem em alimentos e podem fornecer informações valiosas sobre a cinética de degradação térmica (KECHINSKI et al., 2010; SADILOVA; CARLE; STINTZING, 2007). A degradação térmica tem sido estudada para vários tipos de extratos ricos em antocianinas, como: mirtilo (KECHINSKI et al., 2010; REQUE et al., 2014), hibisco (SINELA et al., 2017), arroz preto (BOLEA et al., 2016; LOYPIMAI; MOONGNGARM; CHOTTANOM, 2016), uva (KARASU et al., 2016).

Prevenir e controlar a degradação das antocianinas é fundamental para manutenção de suas propriedades antioxidantes e poder corante. Em geral, a taxa de degradação de antocianinas em soluções aquosas é muito mais rápida do que aquelas relatadas para alimentos sinteticamente coloridos. Isso pode ocorrer devido à pureza das antocianinas. SUI et al., (2016) em seu estudo de investigação das alterações de cor, estabilidade química e capacidade antioxidante de soluções aquosas de antocianinas tratadas termicamente, constatou que ao utilizar extratos aquosos purificados, há maior degradação das antocianinas, isso pode ser explicado pela ausência de compostos como açúcares, ácidos orgânicos, proteínas. Extratos aquosos de antocianinas com ou sem tratamento térmico foram quimicamente estáveis e mantiveram sua cor original, quando armazenados à 4 °C. Contudo, com o aumento da temperatura de armazenamento para 65 °C, ocorreu decréscimo na concentração e na cor das antocianinas. Comprovando mais uma vez, que a temperatura é um fator crucial na aplicação de extratos naturais ricos em antocianinas na indústria de alimentos.

A fim de minimizar a degradação térmica de bioativos, novas tecnologias não-térmicas têm sido sugeridas, como por exemplo, processamento de alta pressão, campo elétrico pulsado, ultrassom, irradiação com luz ultravioleta (CAMINITI et al., 2011; MARTYNENKO; CHEN, 2016). Há relatos de que essas tecnologias preservam grande quantidade de antocianinas e também são eficientes para matar microrganismos que provocam degradação nos alimentos (CAMINITI et al., 2011). No entanto, apresentam como desvantagens o elevado custo dos equipamentos e de sua manutenção para o funcionamento. Além disso, poucos estudos avaliaram os efeitos dos tratamentos não-térmicos sobre a biodisponibilidade dos compostos antioxidantes (CAMINITI et al., 2011; XUE et al., 2015).

2.9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Mesmo que não exclusivamente, os benefícios dos polifenóis para a saúde estão relacionados ao seu efeito antioxidante. Diversos trabalhos relatam a ação em modelos de doenças crônicas incluindo vários tipos de câncer. A ação desses compostos se dá por

mecanismos diversos, incluindo a inibição de enzimas e a modulação de respostas inflamatórias. A literatura evidencia que o consumo de alimentos fontes de polifenóis tem relação protetora contra o estresse oxidativo, e muitos estudos têm aprofundado as pesquisas sobre a biodisponibilidade e bioacessibilidade dos compostos no organismo a fim de determinar a real contribuição desses compostos como antioxidantes.

Nos alimentos, além da pesquisa na produção de alimentos funcionais, os polifenóis são estudados no aumento da qualidade e estabilidade de produtos processados. Os resultados dessas pesquisas reforçam o potencial que esses bioativos possuem para a utilização como ingredientes alimentares ou no desenvolvimento de fitoterápicos. Para isso, fontes de baixo custo e de fornecimento contínuo são necessárias. Dentre as fontes disponíveis na região sul do Brasil, se destacam os resíduos de uva viníferas e de mirtilos. A segunda fruta é de produção inferior, mas é majoritariamente destinada ao processamento para obtenção de sucos e polpas.

Para estar de acordo com práticas de sustentabilidade ambiental, é imprescindível que a extração desses compostos siga conceitos preconizados pela “química verde” que têm por objetivo o desenvolvimento de metodologias simples, rápidas e que minimizem/restringam o uso de solventes orgânicos. Na literatura consultada, há muitos relatos sobre a utilização de tecnologias alternativas, como extração assistida por micro-ondas, ultrassom e fluido supercrítico. Todas com o intuito de reduzir o tempo de extração e a quantidade de solvente utilizado sem comprometer ou aumentando o rendimento do processo. Contudo, nenhum trabalho alia a utilização de micro-ondas em meios unicamente aquosos para reaproveitamento de resíduos, e obtenção de extratos ricos em polifenóis. A extração aquosa possui inúmeras vantagens e causa pouco ou nenhum impacto ambiental.

3 ARTIGOS CIÊNTIFICOS

3.1 ARTIGO 1

(Formatado conforme as normas da revista *Food Chemistry*)

Water based extraction of blueberry pomace anthocyanins: optimization, characterization and comparisons with microwave-assisted conditions.

ABSTRACT

This study has optimized water-based extraction conditions for maximal recovery of anthocyanins from blueberry bagasse. Extraction was compared to other techniques, characterized in terms of anthocyanins, and antioxidant capacity. A citric acid solution (1% w/v) to extract anthocyanins from bagasse (*Bluecrop/Climax/Duke*) was used. Temperature (8-100°C) and time (5-60') were studied by response surface methodology. Total monomeric anthocyanin content (pH-differential method) was the studied response. Interaction between both variables; linear and quadratic effects for temperature were significant by ANOVA. Model allowed the prediction for maximal recovery (5 minutes/100 °C). No differences on stability were observed between extraction under heating and the cold organic-solvent method (p<0.05). Microwave irradiation was not capable to improve extraction in tested conditions. Twenty anthocyanins were identified in the water-based extract that was majorly composed of malvidina-3-galactoside (19%), cyaniding-3-galactoside (17%), and malvidin-3-glucoside (12%). The optimized method is fast, safe, and has low cost to be studied in the food ingredients or nutraceuticals development.

Keywords: Green chemistry; Residues; Optimization; Bioactive Compounds; Identification; Antioxidant Activity.

1 INTRODUCTION

Literature data shows a large number of studies in which polyphenols are described as phytochemicals with putative health effects (EDIRISINGHE; BURTON-FREEMAN, 2016; KAULMANN; BOHN, 2016; KY; TEISSEDE, 2015; VETRANI et al., 2016; WALLACE; GIUSTI, 2015) Internationally, blueberries are recognized by its high content of anthocyanins and other phenolic compounds (KAZAN et al., 2016; MANSOORIAN et al., 2016; MASSAROTTO et al., 2016; PERTUZATTI et al., 2016) being the reason by which fruit has gained popularity. These fruits belong to the *Ericaceous Vaccinium* group with different cultivars that are produced across the globe (KAZAN et al., 2016).

Blueberries are not native Brazilian fruits, but its cultivation was stimulated by favorable climatic conditions in south region. Production has started in 1900 with North American cultivars; but, nowadays, new cultivars were developed by the Brazilian agriculture research company (Embrapa, Brazilian Company of Farming Research). Blueberry global production is estimated as 467.048 ton, and a total of US\$ 227.842.000 was the profit obtained from blueberry processing in USA (Brazelton, 2013; USDA 2017). Annual production is around 59 tons. *Bluecrop*, *Climax*, and *Duke* are some of the cultivars that are being produced in south of Brazil and sold in blends for fresh consumption and industrialization (BRAZELTON, 2013; STRIK; YARBOROUGH, 2005).

Plant has as requirements for proper production a cold weather during the vegetative form and harvesting periods that are not greater than 1-3 months in south of Brazil (RASEIRA; ANTUNES, 2004). Thus, as alternatives to decrease losses and to attend commercial demand during all year, fruit processing into frozen pulps, juices, syrup, and other related products are available (Beaulieu et al., 2016; Howard, Brownmiller, Mauromoustakos, & Prior, 2016). Since fruit residue could reach to values of 20% of total processed amount, alternatives to improve the use of this natural resource are relevant (KECHINSKI, 2011; KHANAL et al., 2009). Moreover, Šarić et al., (2016) has stated that recycling fruit juice wastes from industrialization is a growing tendency due to the high remaining amount of polyphenols on these materials.

Therefore, effective extractive processes should increase the recovery of these compounds with minimal degradation and by the use of safe and non-pollutant procedures (Cai et al., 2016).

Common methods for extraction of anthocyanins generally uses organic solvent mixtures to linkage cell structures and deliver these compounds in an acidified environment (BOCHI et al., 2014; RODRIGUEZ-SAONA; WROLSTAD, 2001). However, most of these solvents are not GRAS (Generally Recognized as Safe) or, if safe, it is used in concentrations that did not allow direct food application. Moreover, some of these processes are efficient for analytical purposes, but have high environmental impact and are time-consuming which do not allow the amplification to industrial scales. In this scenario, many alternatives were already tested to recover anthocyanins by “green methodologies” as the use of supercritical fluid (PEREIRA et al., 2016), microwave (ZHENG et al., 2013), ultrasound in water solvents and its mixture with ethanol (JIANG; YANG; SHI, 2017). Some previous works in literature have tested citric acid solutions in water to recover anthocyanin from blueberries with interesting results (DENEV et al., 2010; LEE; WROLSTAD, 2004; ZARDO, 2014). However, none of these works had clearly designed the behavior of anthocyanin migration from matrix to the extraction media when different combination of time and temperature are used. Optimization by response surface methodology provides the comprehension of how these variables will change the process and in which conditions the highest recovery can be obtained.

Thus, this work has aimed to optimize time and temperature conditions in a water-based extraction procedure for maximal recovery of anthocyanin from blueberry pomace. In the best extraction condition, final solution was characterized in relation to antioxidant capacity and polyphenol composition to provide a background for future applications. Moreover, extraction efficiency was also compared to micro-wave assisted methods to determine if it could increase recovery in shorter times.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Sample

A commercial blend of blueberries (*Vaccinium spp*) composed of *Bluecrop*, *Climax*, and *Duke* Cultivars was acquired from Italbraz Ltda (Vacaria, Rio Grande do Sul) in March of 2016. Maturity degree was characterized by pH, total titratable acidity, and total soluble solids (°Brix). Blueberry pomace was also characterized by its nutritional composition. Thus, protein, moisture, and ash were determined as preconized in the AOAC (1996), and fat as detailed by BLIGH & DYER (1959). Results are available at the supplementary material.

2.2 Fruit processing

Fruits were submitted to bleaching as reported by Rossi et al. (2003) with some adaptations. Thus, entire fruits (1 Kg) were immersed in water and bleached for 4 minutes/80°C (water bath, Marconi, São Paulo, Brazil). Immediately after the thermal treatment, fruits were cooled by immersion in an ice bath. Bleached fruits were mashed in a turrax (10 minutes, 2000 rpm, Ultraturrax, Marconi MA 102, Brazil). Separation of fruit pulp from pomace was obtained as previously detailed Zardo (2014). Pomace batches were aliquoted (15 g) and stored in closed plastic containers flasks (50 ml, 13x75 mm) at frozen conditions (-20°C) until analyses. Initial and final weights were measured and the average pomace yield was 15.36% of the initial fruit weight.

2.3 Initial extraction procedure

An previously published extraction procedure using a water solution with 1% of citric acid was used as the starting method for extraction of anthocyanins from blueberry pomace (DENEV et al., 2010; LEE; WROLSTAD, 2004; NICOUÉ; SAVARD; BELKACEMI, 2007; ZARDO, 2014). All these methods have used different solid-to-liquid ratios and different sets of time and temperature. Thus, solid-to-liquid ratio was fixed as 1:15 m/v (Zardo, 2014). Time under stirring and temperature was controlled by thermostated water bath (80°C ± 0,1 °C, 240 bpm, Marconi MA093, Brasil) was studied by response surface methodology as described in

item 2.4. Each final extract solution was filtered and immediately analyzed for total monomeric anthocyanin content as described in 2.5.

2.4 Extraction optimization

A central composite design (CCD) based in the response surface methodology (RSM) was used for modeling total monomeric anthocyanins content that could be extracted from blueberry pomace when temperature (X_1) and time (X_2) are the independent variables. Each of these variables were studied in five levels that ranged from 38 °C to 100 °C and from 5 to 60 minutes for temperature and time, respectively (Table 1). A total of 11 different extractions distributed in a 2^2 factorial design, 4 axial points, three replicates of central point were performed. Results were used for regression analysis and determination of linear, quadratic and interaction effects (Eq. (1)):

$$Y = +a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_{11}X_1^2 + a_{22}X_2^2 + a_{12}X_1X_2$$

All experiments were realized in a random order to avoid that unexpected variability could affect results. Analysis of variance (ANOVA) was performed in regression results to determine the significance of regression model with no lack of fitness. Statistica® 7.0 software was used for data treatment and surface figure development. Optimized final extraction procedure was validated using new experiment trials (n=3). The validated model was obtained when the experimental value is inside of the confidence interval for prediction.

2.5 Total monomeric anthocyanins (TMA)

Measurements were performed by pH differential method as described by Giusti & Wrolstad (2001). Values of 449.2 and 26,900 were considered as the molecular weight and molar absorptivity of cyanidin-3-glucoside. Final values were expressed as mg/100 ml of extract solution for optimization experiments, and as mg/100 g of blueberry bagasse for comparison of method efficiency different extraction conditions.

Since this was the main answer used for optimization, quality assurance of the analytical measurement was determined by the intra-day repeatability (n=3) and inter-day repeatability (n=3) of measurements at a same extraction condition. Result were analyzed as the relative standard deviation (RSD %).

2.7 Method comparisons

At the optimal conditions for the acidified water-based extraction (1% citric acid), final solution with anthocyanins from blueberry pomace was evaluated in relation to the overall antioxidant capacity and polyphenol's profile by HPLC-PDA-MS/MS. Moreover, an exhaustive extraction was performed to determine the whole content of anthocyanins that could be present in the studied matrix. This result was used to determine extraction efficiency over different methods tested.

2.7.1 Exhaustive extraction

Total content of available monomeric anthocyanins in blueberry bagasse was determined by an well-stablished organic extraction of anthocyanins using 70% of acid acetone (0.01% de HCl) and a final liquid-liquid partition with chloroform for clean-up (Rodriguez-Saona & Wrolstad, 2001). This procedure is recognized as able to recover the total amount of anthocyanins from sample. Final extract was dry by rotatory evaporator (Rotatory evaporator R-3 Buchi, Labortechnik, Switzerland) recovered with a known small amount of acidified distilled water (0.01% de HCl) and analyzed as described in item 2.5.

2.7.2 Stability tests

Thermal degradation was performed according to López, Agosto, Giménez, & León (2013). The experiments were performed in triplicate in screw capped Falcon tubes (50 mL, 30x115 mm). Two extracts were tested: optimized extract (pH 2.5) and extract obtained exhaustively. Samples were placed in a thermostated water bath (240 bpm, Marconi MA093,

Brasil) at 50 °C, 70 °C, and 90 °C for 6h. At each point of analysis (0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 h), an aliquot of sample was withdrawn and immediately cooled in an ice bath in order to stop the reaction. Degradation was monitored by measurements of total monomeric anthocyanin content (described in section 2.5).

2.7.3 Micro-wave assisted extractions (MAE)

Blueberry bagasse anthocyanins were also tested for anthocyanin extraction using a microwave digestion system (*Advanced Microwave Digestion System* – Ethos1, Milestone Inc., Italy) which has digital control for irradiation time and potency (200 to 700W). Inside of the oven, on the top of the extraction exit vessel it was coupled a condensation system to recover any vapors that could be release from the extraction solution. Thus, at the same solid-to-liquid ratio (1:15 w/v) that was used in previous experiments for optimization (section 2.3); sample was mixture to 1% of citric acid in water and placed inside of bottle glasses from the microwave system. Two potencies (525 Watts, Condition I; 700 W, Condition II) were tested over a time of 3 minutes. After MAE, the final solution was filtered (Buchner system, and Whatman n° 2 paper filter) and used for analysis of total monomeric anthocyanins (item 2.5.)

2.8 Characterization of the water-based anthocyanin solution obtained at optimal conditions

2.8.1 Anthocyanin Identification

Blueberry bagasse anthocyanins that were obtained using predicted optimal conditions for the extraction in a 1% citric acid solution were identified using na HPLC-PDA-MS/MS system (HPLC Prominence 20A equipped with the PDA SPDM-20A from Shimadzu, Japan; coupled to a ESI-Ion trap mass analyzer Esquire 6000 from Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA).

Previously to injection, extracts were purified in a C-18 solid phase extraction (SPE) cartridge (Stracta[®], 6cc, 1 g of octadecylsilyl resin, Phenomenex, Torrance, EUA) to yield a

pure fraction of anthocyanins as described by Rodriguez-Saona & Wrolstad, (2001) using the same modifications already reported by Bochi et al. (2015). Final fraction of anthocyanins was recovered in acid methanol (0.35% v/v of formic acid, 85%, Merck®) and dried under vacuum at 38 °C (Rotavapor® R-300, Buchi, Labortechnik, Germany). Immediately previous to injection, dry anthocyanins were recovered in the initial mobile phase to a known volume (2 ml) and filtered (0.22µm, PTFE syringe filters, 25 mm, Simple pure, Allcrom, SP, Brazil).

Separation was performed in a reverse phase column (C18, 2.6µm, 100 mm x 4.6 mm, Phenomenex, Torrance, USA) thermostated at 38 °C. A solution of 3% v/v of formic acid in ultrapure water (Milli-Q Gradient System, Millipore Corporation, Massachusetts, EUA) and pure acetonitrile (HPLC grade, Merck, Darmstadt, Germany) were used as mobile phases A and B, respectively. Flow rate was 0.9 mL.min⁻¹ and the gradient elution was performed as follows: 8% of B as the initial condition until 5 min. 7% of B was increased in 2.5 minutes (from 5 to 7.5 min to final 15% of B). From 7.5 to 15 minutes B concentration was increased from 15% to 30% and all compounds were eluted. Thus, B concentration was increases to 80% in 2 minutes and kept on this condition during 5 minutes for column clean up. Initial condition was re-established (8% of B) in 2 minutes and column conditioned for 5 minutes previously to the next injection. Eluted compounds were detected from 200 to 800 nm and the relative percentage of each anthocyanin was obtained from chromatograms at 520 nm.

After elution from the HPLC-PDA system compounds were analyzed by a coupled mass spectrometer system that was set as follows: capillary voltage of +4.5kV, nebulizer gas pressure at 30 psi, dry gas at 11 mL min⁻¹, and gas temperature at 310 °C. A capillary exit voltage was set at 70 V. MRM experiments were performed in a full scan range of 200 to 1000 m/z of all fragments formed from 3 major parent ions per second.

2.8.2 Total polyphenol content

Method using the *Folin-Ciocalteu* reagent as described by Singleton & Rossi (1965) was used. Readings were performed at 765 nm and results were expressed as mg of Gallic acid equivalents/100 grams of blueberry bagasse.

2.8.3 Antioxidant capacity

It was measured by two methods. One of them was by ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) as described by Ou; Hampsch-Woodill; Prior (2001). Fluorescence (Spectramax M5 Microplate Reader, Molecular Devices) was monitored at 485 nm (excitation) and 538 nm (emission) during 90 minutes. Readings were performed at every minute and the area under the curve for fluorescence *versus* time was used in calculations. 7-Point calibration curves ($R^2 = 0.997$; $y = 0.175x + 1.635$) were built using a synthetic derivate of tocopherol (6-Hydroxy-2,5,7,8-Tetramethylchroman-2-Carboxylic Acid, Trolox[®], Sigma-Aldrich). Results were expressed mmol of Trolox equivalents/100 ml of extract.

FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Potencial Assay*) was also determined for the anthocyanin solution obtained in optimal conditions as detailed by Benzie & Szeto (1999). Readings were performed at 593 nm (Espectrofotômetro 600 Plus, Femto) and calibration curves with 7 equivalent distant points ($R^2 = 0.997$; $y = 0.004x + 0.223$) were used for quantification. Results were also expressed as mmol of Trolox/100 ml of extract.

2.9 Statistical analysis

Analyses of variance (ANOVA) from regression results of the CCD were performed as in item 2.4. T-Student test was used for method comparison with one independent variable ($p \leq 0.05$). Degradation results were analyzed by one-way ANOVA with repeated measures for time under heating. Total measurements and antioxidant capacity of the extracts obtained in optimal conditions was expressed as the average \pm standard deviation of three independent experiments.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 *The matrix under study: maturity and physico-chemical characterization.*

Blueberry has a sweet to acid taste and fruit's pH is related to sensorial quality. Saftner et al. (2008) reported that pH values between 2.25 and 4.25, total soluble solids above 10%, and titratable acidity between 0.3 and 1.3% are related to a good sensory acceptance. Blueberry bagasse obtained in this work showed values that are within those ranges (see supplementary material). Therefore, fruits were at the optimum maturity degree for processing. Moreover, moisture, total soluble solids, and titratable acidity are similar to values reported by Reque (2012) for blueberry products.

3.2 *Extraction Optimization*

Temperature and pressure could be used to manipulate water dielectric constant and increase extraction of polyphenols (Chemat, Vian, & Cravotto, 2012; Giusti & Jing, 2008). Also, high extraction temperatures could act in vegetable tissue decomposition and high anthocyanin extraction yields could be obtained when cell tissue structures are not intact (LEE; WROLSTAD, 2004). Nonetheless, it could also cause structural changes and pigment degradation which is linked to the length of the exposure time in high temperatures (FERNANDES et al., 2014; YU et al., 2016). Thus, the optimization for proper sets of time and temperature could be enough to reach in high extraction yields of anthocyanins from blueberry pomace.

Experimental results for time and temperature optimization by CCD are shown in Table 1. From the lowest level (coded level, -1.41) of temperature (X_1) to the highest (coded value, +1.41) total monomeric anthocyanins has increased almost 40% (experiment 6 *versus* 5). However, for time (X_2), the same comparison has resulted in a smaller percentage of increment

(18.03%, experiment 8 *versus* 7). This result is in agreement with ANOVA (Table 2) that revealed significant linear and quadratic effects for temperature (X_1). Moreover, in the studied range (5 to 60 minutes), no significant linear and quadratic effects of time (X_2) were found for anthocyanin extraction from blueberry pomace. Nonetheless, time cannot be excluded as a variable that affects anthocyanin recovery from matrix, because the interaction effect between the two studied variables (time and temperature) was significant (Table 2).

Model lack of fitness was not significant (Table 2). As previously stated by Myers e Montgomery (2002), regression models with significant lack of fitness are not capable to make predictions in the experimental ranges. Thus, inside of the studied range, the model obtained in our experiments is capable to predict the optimal set of time and temperature for maximal content of anthocyanins in extract. Higher temperatures could not be tested using the same experimental conditions due to the boiling point of water. Thus, in the experimental conditions, answer was considered as optimized.

Figure 1 shows anthocyanin extract concentration behavior modeled by the regression equation ($Y = + 86.76 \pm 1.16 + 13.76 \pm 0.71X_1 - 5.53 \pm 0.84X_1^2 - 4.47 \pm 1.00X_1X_2$) only with significant coefficients. It is possible to perceive that the highest concentration of anthocyanins is located in regions of high coded values for temperature and low for time. Thus, the prediction of the optimal combination of time and temperature for extraction of anthocyanins from blueberry pomace using acid water (1% of citric acid) was 5 minutes (-1.41) and 100°C (+1.41). It is in agreement with the water behavior under high temperatures in which dielectric constant is increased and could reach to values that are similar to organic solvents as methanol and ethanol (PLAZA; TURNER, 2015).

3.2 Model validation for predictions

Validation was performed by reproducing two selected conditions. One of those was the optimal condition for maximal recovery of anthocyanins from matrix (100 °C, 5 minutes), and

the another was the central point of CCD (69 °C, 32,5 minutes). In these both conditions, the average results and the interval of confidence of the analytical measurement are in agreement with predictions from model (Table 2). Thus, regression equation was validated and model can be used for prediction inside the studied ranges of time and temperature.

3.3. Final extraction yield and method comparison with different conditions of MAE.

Many extraction methods were already tested to exhaustively recover anthocyanins or polyphenols from *berries*. One of them was described by Rodriguez-Saona & Wrolstad (2001) and it is one of the most used analytical protocol for anthocyanins extraction that is capable to successful extract all pigments from different vegetable matrices. It mainly consists of an exhaustive extraction of anthocyanin by 70% of acetone in water. Solution is acidified with chloridric acid (0.01%) and final extract usually is a complex mixture of pigments from plant. Thus, the technique requires a final liquid-liquid extraction with chloroform to yield a final solution of anthocyanins. This procedure was applied in the blueberry pomace to determine the whole amount of anthocyanins in the matrix. These results were compared with those obtained from optimized extraction with acidified water (1% w/v citric acid) to estimate the recovery (Table 4) or the method efficiency in extract anthocyanins from pomace. Thus, in optimal condition a total of 171.7 ± 0.7 mg CYD-3-G/100 g bagasse were extracted which correspond to 75% of total anthocyanins in sample (Table 3). The initial procedure proposed by Zardo (2014) uses a temperature of 80°C during 5 minutes which will correspond to 152.3 mg CYD-3-G/100 g bagasse by model predictions. Thus, optimization has improved anthocyanin content in extract in at least 10%.

The percentage of anthocyanins that was not recovery (25%) by the optimized procedure of water-based extraction (1% citric acid, 100°C, 5 minutes) could correspond to acylated compounds. Since, these anthocyanins have a smaller polarity than only glycosylated compounds by the presence of ester with organic acids in the main structure. Moreover,

polyphenols thermal degradation cannot be excluded as a reason for a smaller quantification of total anthocyanins in a procedure with hot water when it is compared to a cold solvent extraction. Thus, these extracts were analyzed to identify anthocyanins and studied for stability. Stability tests (Figure 2) showed no significant differences on anthocyanin thermal degradation between optimized extraction with hot acidic water (1% w/v of citric acid) solution and the exhaustive organic solvent extraction (70% v/v). Degradation was temperature-dependent ($p < 0.05$) as already reported in literature (LÓPEZ et al., 2013).

Literature data shows a concentration of 188 mg CYD-3-G/100 g for cv *Rubel* blueberry skin (LEE; WROLSTAD, 2004). We have tested the same exhaustive procedure, but values were higher than this report for blueberry bagasse (*Bluecrop*, *Climax*, and *Duke*). In general, these differences are expected. Because, in literature it is already reported that fruit's polyphenol composition is altered by the cultivar type, soil composition, and climate conditions (MICHALSKA; ŁYSIAK, 2015; PERTUZATTI et al., 2014; STRUCK et al., 2016). Nonetheless, our work is in agreement with previous paper in indicating blueberries residues as rich sources of bioactive compounds with great potential to be used as natural colorants or nutraceuticals (Lee & Wrolstad, 2004).

There are many paper in literature that have already proposed water as a favorable solvent for anthocyanin and other polyphenols extraction with similar yields to methods with organic solvents in some of these cases (ADJÉ et al., 2010; CACACE; MAZZA, 2002; CHEMAT et al., 2015; LEE; WROLSTAD, 2004; LI et al., 2012a; PETERSSON et al., 2010). However, in all of these experiments, water is applied in combination with other factors that are not only temperature and time during extraction. It had applied other technologies as in microwave assisted extraction (LI et al., 2012b), combination of high pressure and temperature (PETERSSON et al., 2010), and ultrasound assisted methods (ADJÉ et al., 2010). Thus, when these methods are not performed in shorter times using low energy, it will have higher cost than the procedure that is proposed in our work. However, if one of these techniques is able to

increase extract's anthocyanin concentration in shorter times than 5 minutes (optimized value for time) it will be useful to increase yield. Therefore, microwave assisted extractions were performed in two different conditions, using same solid to liquid ratios but in shorter times (3 minutes). These experiments were designed based in previous experiments from literature for extraction of polyphenols from different matrices (GAROFULIC et al., 2013; ZHENG et al., 2013). Low levels of total monomeric anthocyanins were obtained with MAE when it is compared with aqueous extraction using optimized conditions (Table 3). Values obtained by MAE using the first conditions tested (condition I, Table 3) were lower than that obtained in the optimized method. When potency was increased (700 W, 3 minutes, condition II, Table 3) values had decreased which possible indicates degradation. Since these experiments showed no advantages to reduce time and increase yield in relation to the optimized extraction method (5 minutes, 100 °C), new experiments for optimization of microwave conditions were not performed.

3.4 Characterization of final anthocyanin solution obtained using optimized water-based extraction conditions: antioxidant capacity and polyphenols identification.

Table 4 shows data from anthocyanin identification and antioxidant capacity. HPLC-DAD-ESI-MS analysis had allowed the identification of more than 20 anthocyanins in water-based extract of blueberry bagasse in a total of 14 peaks detected at 520 nm (Figure 3). The proposed tentative identification was performed by combining information from C-18 elution order, UV-Visible maximal bands, MS-MS fragmentation pattern (Table 4), and comparison with literature data.

Blueberry residue is composed of a mixture of *Bluecrop*, *Duke* (Highbush cultivar types) and *Climax* (Rabbiteye cultivar type) cultivars. Anthocyanins already reported for these cultivars are majorly limited to glycosylated forms of all five aglycones (delphinidin, cyanidin, petunidin, peonidin, and malvidin) with galactoside, glycoside, arabinoside, and xyloside

residues. Pelargonidin derivatives were not found in blueberry bagasse extract which is in agreement with a previous study on anthocyanin characterization of different cultivars (PERTUZATTI et al., 2016). Main detected losses from molecular ions of anthocyanins had m/z values of 162 and 132 amu. These fragments, in anthocyanin analysis, generally correspond to sugar hexosides and pentosides that were linked to the main structure at position 3. This behavior is already expected for berries that commonly have a smaller amount of acylated anthocyanins. Anthocyanin identification for the same aglycone that were detected in different retention times with the same fragmentation pattern was based in the reported elution order for glycosylated anthocyanins (retention of galactoside derivatives < glycoside and arabinoside < xiloside) and it is in agreement with other works on blueberry pigment characterization (MASSAROTTO et al., 2016; PERTUZATTI et al., 2016).

Acylated anthocyanins were not detected using the optimized water based extraction. In the reviewed literature, there is a lack of agreement among blueberry cultivars in relation to the presence of these compounds (NICOUÉ; SAVARD; BELKACEMI, 2007; PERTUZATTI et al., 2016). For the same cultivars that were used to produce the blueberry pomace there is no reports about the presence of acylated compounds (MASSAROTTO et al., 2016; PERTUZATTI et al., 2016). However, in our work, the HPLC analysis of anthocyanins extracted by the organic solvent exhaustive protocol showed three peaks with characteristic UV-visible spectra of anthocyanins that could correspond to acylated forms of these compounds present in minor amounts (Figure 2). The major detected anthocyanin in bagasse was malvidin-3-galactoside which corresponds to 19% of total anthocyanins detected in samples by area normalization (Table 4). It was followed by cyaniding-3-glucoside (17%) and malvidin-3-glicosideo (12%). A direct comparison with literature is not possible since results are from a mixture of cultivars. However, it is interesting to highlight that all three major anthocyanins were previously reported for *Bluecrop* (Pertuzzatti, et al., 2016), *Duke* (GAVRILOVA et al., 2011) and *Climax* (LOHACHOOMPOL et al., 2008) as one of the major anthocyanins.

Identification of blueberry bagasse anthocyanin is relevant to determine possible future applications of this extract. For the development of natural pigments, glycosylated anthocyanins are less stable than acylated structures. Therefore, as reported by He and Giusti (2010), the use of non-acylated anthocyanins as natural food pigments should only be viable if high concentrations are obtained by a low cost. It could be the case of blueberry anthocyanin water based extract from bagasse using the optimized procedure with 1% of citric acid.

It is also interesting to highlight that acylated anthocyanins are much less absorbed than structures only linked with sugar moieties. For all flavonoids, including anthocyanins, sugar residues increase absorption by the sodium-dependent glucose transporter (He and Giusti, 2010). Therefore, blueberry pomace water-based extraction procedure could be used for the development of nutraceuticals or functional ingredients with higher bioavailability.

Nowadays, there are no recommendations for ingestion of anthocyanins. Only China has already proposed a dose of 50 mg of anthocyanins/day based on evidences of positive effects of these compounds in human health. Optimized extract has a concentration of 114.2 mg/L of anthocyanins and the Chinese recommendation could be reached with less than 500 ml of extract. Since all chemicals used for extraction of blueberry bagasse anthocyanin were GRAS, this method could be easily transferred to the development of a beverage with high concentration of bioactive compounds. Moreover, the development of encapsulated anthocyanins by spray drying or freeze-drying techniques could be studied using this extract to promote concentration and stabilization.

ORAC and FRAP methods were quantified using the same standard for quantification (Trolox[®]) and results clearly showed that blueberry bagasse anthocyanins had higher antioxidant activity by the first method than the second. Prior et al., (1998) were the first authors to report that blueberry extracts have high antioxidant activity by ORAC than by other techniques. Thus, it is possible that antioxidants from blueberries are more reactive to

neutralize peroxy radicals (ORAC) than by donation of electrons to oxidized transition metals (Fe^{3+} , FRAP). Recent reports from literature are in agreement with our results (Pertuzatti et al., 2014; Rebellor et al., 2014). Data observed in our study indicate a high antioxidant capacity for the extract obtained using the optimized aqueous methodology (Table 4) when it is compared with literature data for extracts and beverages. Lee & Wrolstad (2004) have exhaustively extracted anthocyanins and phenolic compounds from blueberry processing residues and reported lower results for antioxidant activity than values observed in our study (2.87 mmol TE / 100 g blueberry bagasse and 1.8 TE / 100 g blueberry bagasse for FRAP and ORAC, respectively). In a study comparing the antioxidant activity of commercial polyphenol-rich drinks, Seeram et al. (2008) report ORAC values ranging from 14.5 - 23.9 mmol / L for blueberry juice, which are about 4 times lower than value reported for the aqueous extract optimized in our study. Optimized blueberry extract showed higher antioxidant activity than blackberry juice (ORAC values of 14.6 mmol / L) as shown by the results of Azofeifa et al. (2016). And yet, lowest dose of diluted drink (12.5%) administered in water of rats with streptozotocin-induced diabetes had positive effects, as it caused a decrease in glycemia, triacylglycerols and cholesterol.

4 CONCLUSIONS

In this study, the ideal conditions for the extraction of anthocyanins from blueberry bagasse were established using water and 1% citric acid. The final extract obtained is a solution containing most of the blueberry bagasse anthocyanins (20 of the 22 compounds detected using the exhaustive extraction method) in a concentration that is equal to 75% of the total matrix content. The comparison with other methods proved that the aqueous optimized procedure is a good alternative for extraction of blueberry bagasse anthocyanins. Mainly because, it has a short extraction time, avoids the use of organic solvents, is safe, does not require advanced technologies to increase yield, and has low cost. Final solution has high concentration of

polyphenols with antioxidant activity and great potential to be used in the development of food ingredients or nutraceuticals.

5 REFERENCES

ADJÉ, F. et al. Optimization of anthocyanin , flavonol and phenolic acid extractions from *Delonix regia* tree flowers using ultrasound-assisted water extraction. **Industrial Crops and Products**, v. 32, p. 439–444, 2010.

AHAMD, A. et al. Therapeutic Potential of Flavonoids and Their Mechanism of Action against Microbial and Viral Infections-A Review. **Food Research International**, v. 77, p. 221–235, 2015.

ALUPULUI, A.; CĂLINESCU, I.; LAVRIC, V. Microwave extraction of active principles from medicinal plants. **Universitatea Politehnica din Bucuresti - Scientific Bulletin**, v. 74, n. 2, p. 129–142, 2012.

ÁLVAREZ, A. et al. **Yield vs selectivity in grape pomace polyphenol microwave extraction** 3rd Global Congress on Microwave Energy Applications. **Anais...**2016

AMIOT, M. J.; RIVA, C.; VINET, A. Effects of dietary polyphenols on metabolic syndrome features in humans : a systematic review. **Obesity Reviews**, v. 17, p. 573–586, 2016.

ANTONIOLLI, A. et al. Characterization of polyphenols and evaluation of antioxidant capacity in grape pomace of the cv. Malbec. **Food Chemistry**, v. 178, p. 172–178, 2015.

AZOFEIFA, G. et al. Hypoglycaemic, hypolipidaemic and antioxidant effects of blackberry beverage consumption in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Functional Foods**, v. 26, p. 330–337, 2016.

B. PERTUZATTI, P. et al. Quantification of Several Bioactive Compounds and Antioxidant Activities of Six Cultivars of Brazilian Blueberry. **The Natural Products Journale**, v. 2, n. 3, p. 188–195, 2012.

BARBA, F. J. et al. Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 49, p. 96–109, 2016.

BARCIA, M. T. **Study oh phenolic compounds and antioxidant capacity of by-products from winemaking process**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2014.

BARCIA, M. T. et al. Effect of drying methods on the phenolic content and antioxidant capacity of Brazilian winemaking byproducts and their stability over storage. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 66, n. 8, p. 895–903, 2015.

BEAULIEU, J. C. et al. Volatile, anthocyanidin, quality and sensory changes in rabbiteye blueberry from whole fruit through pilot plant juice processing. **J Sci Food Agric**, n. May, 2016.

BENZIE, I. F. F.; SZETO, Y. T. Total Antioxidant Capacity of Teas by the Ferric Reducing / Antioxidant Power Assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 633–636, 1999.

BERLI, F. et al. Phenolic composition in grape (*Vitis vinifera* L. cv. Malbec) ripened with different solar UV-B radiation levels by capillary zone electrophoresis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 9, p. 2892–2898, 2008.

BIAN, Y. et al. Patterns of simple sequence repeats in cultivated blueberries (*Vaccinium* section *Cyanococcus* spp.) and their use in revealing genetic diversity and population structure. **Molecular Breeding**, p. 675–689, 2014.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. Canadian Journal of. **The national research council of Canada**, v. 37, n. 8, 1959.

BOCHI, V. C. **CHEMICAL CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF CEYLON GOOSEBERRY (DOVYALIS HEBECARPA) IN DIFFERENT**

RIPPENING STAGES. [s.l: s.n.].

BOCHI, V. C. et al. Polyphenol extraction optimisation from Ceylon gooseberry (*Dovyalis hebecarpa*) pulp. **Food Chemistry**, v. 164, n. 2014, p. 347–354, 2014.

BOCHI, V. C.; GODOY, H. T.; GIUSTI, M. M. Anthocyanin and other phenolic compounds in Ceylon gooseberry (*Dovyalis hebecarpa*) fruits. **Food chemistry**, v. 176, p. 234–43, 2015.

BOHN, T. Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. **Nutrition Reviews**, v. 72, n. 7, p. 429–452, 2014.

BOLEA, C. et al. Thermal degradation kinetics of bioactive compounds from black rice fl our (*Oryza sativa* L .) extracts. **Journal of Cereal Science**, v. 71, p. 160–166, 2016.

BOUSSENNA, A. et al. Polyphenol-rich grape pomace extracts protect against dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 4, p. 1260–1268, 2016a.

BOUSSENNA, A. et al. Dietary Supplementation with a Low Dose of Polyphenol-Rich Grape Pomace Extract Prevents Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in Rats. **J Med Food**, v. 0, n. 0, p. 1–4, 2016b.

BRAZELTON, C. **World Blueberry Acreage & Production.** [s.l: s.n.].

BRENES, A. et al. Use of polyphenol-rich grape by-products in monogastric nutrition. A review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 211, p. 1–17, 2016.

BUNEA, A. et al. Anthocyanin determination in blueberry extracts from various cultivars and their antiproliferative and apoptotic properties in B16-F10 metastatic murine melanoma cells. **Phytochemistry**, v. 95, p. 436–444, 2013.

CACACE, J. E.; MAZZA, G. Extraction of Anthocyanins and Other Phenolics from Black Currants with Sulfured Water. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 1, p.

5939–5946, 2002.

CAI, Z. et al. Conventional, ultrasound-assisted, and accelerated-solvent extractions of anthocyanins from purple sweet potatoes. **Food Chemistry**, v. 197, p. 266–272, 2016.

CAMINITI, I. M. et al. Impact of selected combinations of non-thermal processing technologies on the quality of an apple and cranberry juice blend. **Food Chemistry**, v. 124, n. 4, p. 1387–1392, 2011.

CASAS, L. et al. Extraction of resveratrol from the pomace of Palomino fino grapes by supercritical carbon dioxide. **Journal of Food Engineering**, v. 96, n. 2, p. 304–308, 2010.

CHEMAT, F. et al. Solvent-free extraction of food and natural products. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 157–168, 2015.

CHEMAT, F.; VIAN, M. A.; CRAVOTTO, G. Green extraction of natural products: Concept and principles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 7, p. 8615–8627, 2012.

DAGLIA, M. et al. Antibacterial activity of red and white wine against oral streptococci. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 13, p. 5038–5042, 2007.

DAHMOUNE, F. et al. Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves. **FOOD CHEMISTRY**, v. 166, p. 585–595, 2015.

DENEV, P. et al. Solid-phase extraction of berries' anthocyanins and evaluation of their antioxidative properties. **Food Chemistry**, v. 123, n. 4, p. 1055–1061, 2010.

DIACONEASA, Z. et al. Antiproliferative and Antioxidant Properties of Anthocyanin Rich Extracts from Blueberry and Blackcurrant Juice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 2352–2365, 2015.

DORNAS, W. C. et al. Flavonoides: Potential terapeutico no estresse oxidativo. **Revista de**

Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada, v. 28, n. 3, p. 241–249, 2007.

DURMAZ, E.; SUMNU, G.; SAHIN, S. Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Caper. **Separation Science and Technology**, v. 50, n. 13, p. 1986–1992, 2015.

EDIRISINGHE, I.; BURTON-FREEMAN, B. Anti-diabetic actions of Berry polyphenols – Review on proposed mechanisms of action. **Journal of Berry Research**, v. 6, p. 237–250, 2016.

EL DARRA, N. et al. Extraction of Polyphenols from Red Grape Pomace Assisted by Pulsed Ohmic Heating. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 5, p. 1281–1289, 2013.

ESPADA-BELLIDO, E. et al. Optimization of the ultrasound-assisted extraction of anthocyanins and total phenolic compounds in mulberry (*Morus nigra*) pulp. **Food Chemistry**, v. 219, p. 23–32, 2017.

FANZONE, M. et al. Phenolic characterization of Malbec wines from Mendoza province (Argentina). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 4, p. 2388–2397, 2010.

FANZONE, M. et al. Phenolic Composition of Malbec Grape Skins and Seeds from Valle de Uco (Mendoza , Argentina) during Ripening . Effect of Cluster Thinning. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 6120–6136, 2011.

FANZONE, M. et al. Phenolic characterisation of red wines from different grape varieties cultivated in Mendoza province (Argentina). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 3, p. 704–718, 2012.

FERNANDES, I. et al. Bioavailability of anthocyanins and derivatives. **Journal of Functional Foods**, v. 7, n. 1, p. 54–66, 2014.

FONTANA, A. R.; ANTONIOLLI, A.; BOTTINI, R. Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: Extraction, characterization, and biotechnological applications of

- phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 38, p. 8987–9003, 2013.
- GAROFULIC, I. E. et al. The effect of microwave assisted extraction on the isolation of anthocyanins and phenolic acids from sour cherry Marasca (*Prunus cerasus* var . Marasca). **Journal of Food Engineering**, v. 117, p. 437–442, 2013.
- GAVRILOVA, V. et al. Separation, characterization and quantification of phenolic compounds in blueberries and red and black currants by HPLC-DAD-ESI-MSn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 8, p. 4009–4018, 2011.
- GHOUILA, Z. et al. Antioxidant, antibacterial and cell toxicity effects of polyphenols from Ahmeur bouamer grape seed extracts. **Journal of Fundamental and Applied Sciences**, v. 9, n. 1, p. 392–410, 2017.
- GIBIS, M.; RUEDT, C.; WEISS, J. In vitro release of grape-seed polyphenols encapsulated from uncoated and chitosan-coated liposomes. **Food Research International**, v. 88, p. 105–113, 2015.
- GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV - Visible Spectroscopy Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, n. August 2001, p. 0–13, 2001.
- GOLDMEYER, B. et al. Características físico-químicas e propriedades funcionais tecnológicas do bagaço de mirtilo fermentado e suas farinhas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 4, p. 980–987, 2014.
- GOULA, A. M.; THYMIATIS, K.; KADERIDES, K. Valorization of grape pomace: Drying behavior and ultrasound extraction of phenolics. **Food and Bioproducts Processing**, v. 100, p. 132–144, 2016.
- HE, J.; GIUSTI, M. M. Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties.

Annual Review of Food Science and Technology, v. 1, n. 1, p. 163–187, 2010.

HONG, N. et al. Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Caper.

Natural Product Letters, v. 15, n. 3, p. 197–204, 2001.

HOWARD, L. R. et al. Improved stability of chokeberry juice anthocyanins by ??-

cyclodextrin addition and refrigeration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 3, p. 693–699, 2016.

JIANG, H. L.; YANG, J. L.; SHI, Y. P. Optimization of ultrasonic cell grinder extraction of anthocyanins from blueberry using response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 325–331, 2017.

Sonochemistry, v. 34, p. 325–331, 2017.

JOSEPH, S. V et al. Fruit Polyphenols : A Review of Anti-inflammatory Effects in Humans

Fruit Polyphenols : A Review of Anti-inflammatory Effects in Humans. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, p. 419–444, 2016.

KAMMERER, D. et al. Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties

(*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 14, p. 4360–4367, 2004.

KAMMERER, D.; CARLE, R. Quantification of anthocyanins in black carrot extracts (

Daucus carota ssp . *sativus* var . *atrorubens* Alef .) and evaluation of their color properties.

European Food Research and Technology, p. 479–486, 2004.

KAMONPATANA, K. et al. Susceptibility of anthocyanins to ex vivo degradation in human

saliva. **FOOD CHEMISTRY**, v. 135, n. 2, p. 738–747, 2012.

KARABEGOVIĆ, I. T. et al. Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Cherry

Laurel Fruit. **Separation Science and Technology**, v. 49, n. 3, p. 416–423, 2014.

KARASU, S. et al. Characterization of some bioactive compounds and physicochemical

properties of grape varieties grown in Turkey : thermal degradation kinetics of anthocyanin.

Turkish Journal of Agriculture and Forestry, v. 40, p. 177–185, 2016.

KAULMANN, A.; BOHN, T. Bioactivity of Polyphenols: Preventive and Adjuvant Strategies toward Reducing Inflammatory Bowel Diseases - Promises, Perspectives, and Pitfalls.

Oxidative Medicine and Cellular Longevity, v. 2016, n. c, 2016.

KAZAN, A. et al. Investigating anthocyanin contents and in vitro tumor suppression properties of blueberry extracts prepared by various processes. **European Food Research and Technology**, v. 242, n. 5, p. 693–701, 2016.

KECHINSKI, C. P. et al. Degradation Kinetics of Anthocyanin in Blueberry Juice during Thermal Treatment. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 2, p. 173–176, 2010.

KECHINSKI, C. P. **Estudo de diferentes formas de processamento do mirtilo visando à preservação dos compostos antociânicos**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

KHANAL, R. C. et al. Influence of extrusion processing on procyanidin composition and total anthocyanin contents of blueberry pomace. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 2, p. 52–58, 2009.

KIRAKOSYAN, A. et al. Tissue bioavailability of anthocyanins from whole tart cherry in healthy rats. **Food chemistry**, v. 171, p. 26–31, 2015.

KUNTZ, S. et al. Uptake and bioavailability of anthocyanins and phenolic acids from grape/blueberry juice and smoothie in vitro and in vivo. **British Journal of Nutrition**, p. 1–12, 2015.

KY, I.; TEISSEDE, P. L. Characterisation of Mediterranean grape pomace seed and skin extracts: Polyphenolic content and antioxidant activity. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 2190–2207, 2015.

LEE, J.; WROLSTAD, R. E. Extraction of Anthocyanins and Polyphenolics from blueberry

- processing waste. **JFS C:Food Chemistry and Toxicology**, v. 69, n. 7, p. C564–C573, 2004.
- LI, D.-C.; JIANG, J.-G. Optimization of the microwave-assisted extraction conditions of tea polyphenols from green tea. **Informa Healthcare**, v. 61, n. 8, p. 837–845, 2010.
- LI, H. et al. Microwave-assisted extraction of phenolics with maximal antioxidant activities in tomatoes. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 928–936, 2012a.
- LI, X. et al. Copigmentation effects and thermal degradation kinetics of purple sweet potato anthocyanins with metal ions and sugars. **Applied Biological Chemistry**, v. 59, n. 1, p. 15–24, 2016.
- LI, Y. et al. Effect of energy density and citric acid concentration on anthocyanins yield and solution temperature of grape peel in microwave-Assisted extraction process. **Journal of Food Engineering**, v. 109, n. 2, p. 274–280, 2012b.
- LIAZID, A. et al. Microwave assisted extraction of anthocyanins from grape skins. **Food Chemistry**, v. 124, n. 3, p. 1238–1243, 2011.
- LINGUA, M. S. et al. From grape to wine: Changes in phenolic composition and its influence on antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 208, p. 228–238, 2016.
- LITVINOV, V. P. Chemistry and biological activities of 1,8-naphthyridines. **Russian Chemical Reviews**, v. 73, n. 7, p. 637–670, 2007.
- LIZARRAGA, D. et al. A Lyophilized Red Grape Pomace Containing Proanthocyanidin-Rich Dietary Fiber Induces Genetic and Metabolic Alterations in Colon Mucosa of Female C57BL / 6J Mice 1 – 3. **The Journal fo Nutrition**, v. 141, n. 9, p. 1597–1604, 2011.
- LOHACHOOMPOL, V. et al. Determination of anthocyanins in various cultivars of highbush and rabbiteye blueberries. **Food Chemistry**, v. 111, n. 1, p. 249–254, 2008.
- LÓPEZ, J. A. F.- et al. Thermal Stability of Selected Natural Red Extracts Used as Food

Colorants. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 68, p. 11–17, 2013.

LOYPIMAI, P.; MOONGNGARM, A.; CHOTTANOM, P. Thermal and pH degradation kinetics of anthocyanins in natural food colorant prepared from black rice bran. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, p. 461–470, 2016.

MAESTRE, R. et al. Incorporation and Interaction of Grape Seed Extract in Membranes and Relation with Efficacy in Muscle Foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 8365–8374, 2010.

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

MANSOORIAN, B. et al. Quantitative analysis of the flavonoid content of blueberry extracts by liquid chromatography – high resolution – mass spectrometry Proceedings of the Nutrition Society. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 75, p. 3148–3157, 2016.

MARÇO, P. H.; POPPI, R. J. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Novas**, v. 31, n. 5, p. 1218–1223, 2008.

MARTYNENKO, A.; CHEN, Y. Degradation kinetics of total anthocyanins and formation of polymeric color in blueberry hydrothermodynamic (HTD) processing. **Journal of Food Engineering**, v. 171, p. 44–51, 2016.

MASSAROTTO, G. et al. Chemical Characterization and Cytotoxic Activity of Blueberry Extracts (cv. Misty) Cultivated in Brazil. **Journal of Food Science**, v. 81, n. 8, p. H2076–H2084, 2016.

MCGHIE, T. K.; WALTON, M. C. The bioavailability and absorption of anthocyanins : Towards a better understanding. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 51, p. 702–713, 2007.

MELLO, L. M. R. Vitivinicultura brasileira: panorama 2015. **Comunicada Técnico 191 -**

EMBRAPA UVA e VINHO, p. 1–7, 2016.

MICHALSKA, A.; ŁYSIAK, G. Bioactive compounds of blueberries: Post-harvest factors influencing the nutritional value of products. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 8, p. 18642–18663, 2015.

MOJZER, E. B. et al. Polyphenols: Extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects. **Molecules**, v. 21, n. 7, p. 1–38, 2016.

MONRAD, J. K. et al. Subcritical solvent extraction of anthocyanins from dried red grape pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 5, p. 2862–2868, 2010.

NICOUÉ, E. É.; SAVARD, S.; BELKACEMI, K. Anthocyanins in wild blueberries of Quebec: Extraction and identification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 14, p. 5626–5635, 2007.

NIXDORF, S. L.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Brazilian red wines made from the hybrid grape cultivar Isabel: phenolic composition and antioxidant capacity. **Analytica chimica acta**, v. 659, n. 1–2, p. 208–15, fev. 2010.

OEY, I. et al. Effect of high- pressure processing on colour , texture and flavour of fruit- and vegetable-based food products : a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, p. 320–328, 2008.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4619–4626, 2001.

PAINI, M. et al. Influence of ethanol / water ratio in ultrasound and high-pressure / high-temperature phenolic compound extraction from agri-food waste. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 51, p. 349–358, 2016.

PASCUAL-TERESA, S. DE; SANCHEZ-BALLESTA, M. T. Anthocyanins: from plant to

health. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, n. 2, p. 281–299, 2008.

PATRAS, A. et al. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods ; mechanisms and kinetics of degradation. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 1, p. 3–11, 2010.

PAZOS, M. et al. Structure - Activity Relationships of Polyphenols To Prevent Lipid Oxidation in Pelagic Fish Muscle. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 11067–11074, 2010.

PEREIRA, P. et al. Supercritical fluid extraction vs conventional extraction of myrtle leaves and berries: Comparison of antioxidant activity and identification of bioactive compounds. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 113, p. 1–9, 2016.

PERTUZATTI, P. B. **Compostos bioativos em diferentes cultivares de mirtilo (vaccinium ashei Reade)**. [s.l.] Universidade Federal de Pelotas, 2009.

PERTUZATTI, P. B. et al. Antioxidant activity of hydrophilic and lipophilic extracts of Brazilian blueberries. **Food Chemistry**, v. 164, p. 81–88, 2014.

PERTUZATTI, P. B. et al. Antimicrobial activity and differentiation of anthocyanin profiles of rabbiteye and highbush blueberries using HPLC – DAD – ESI-MS n and multivariate analysis. **Journal of Functional Foods**, v. 26, p. 506–516, 2016.

PETERSSON, E. V. et al. Pressurized Hot Water Extraction of anthocyanins from red onion : A study on extraction and degradation rates. **Analytica Chimica Acta**, n. April 2014, p. 27–32, 2010.

PLAZA, M.; TURNER, C. Trends in Analytical Chemistry Pressurized hot water extraction of bioactives. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 39–54, 2015.

POJER, E. et al. The Case for Anthocyanin Consumption to Promote Human Health: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 5, p. 483–

508, 2013.

POZO-BAYON, M. A. et al. Occurrence of pyranoanthocyanins in sparkling wines manufactured with red grape varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 5, p. 1300–1306, 2004.

PRIOR, R. L. et al. Antioxidant Capacity As Influenced by Total Phenolic and Anthocyanin Content , Maturity , and Variety of Vaccinium Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 2686–2693, 1998.

PRIOR, R. L. et al. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 11, p. 3273–3279, 2003.

PROTAS, J. F. DA S. A dinâmica evolutiva da vitivinicultura brasileira. **Revista de Política Agrícola**, n. 1, p. 47–54, 2016.

RASEIRA, M. DO C. B.; ANTUNES, L. E. C. **A cultura do mirtilo**. [s.l: s.n.].

REBELLO, G. et al. Flour of banana (Musa AAA) peel as a source of antioxidant phenolic compounds. **Food Research International**, v. 55, p. 397–403, 2014.

RENTZSCH, M.; SCHWARZ, M.; WINTERHALTER, P. Pyranoanthocyanins e an overview on structures , occurrence , and pathways of formation. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 1, p. 526–534, 2007.

REQUE, P. M. et al. Cold storage of blueberry (Vaccinium spp .) fruits and juice : Anthocyanin stability and antioxidant activity. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 33, p. 111–116, 2014.

REYES, L. F.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Degradation kinetics and colour of anthocyanins in aqueous extracts of purple- and red-flesh potatoes (Solanum tuberosum L .). **Food Chemistry**, v. 100, p. 885–894, 2007.

ROBY, G.; MATTHEWS, M. A. Relative proportions of seed, skin and flesh, in ripe berries from Cabernet Sauvignon grapevines grown in a vineyard either well irrigated or under water deficit. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 10, n. 1, p. 74–82, mar. 2008.

ROCHA, F. I. G. DA. **Avaliação da cor e da atividade antioxidante da polpa e extrato de mirtilo (Vaccinium myrtilus) em pó.** [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2009.

RODRIGUEZ-SAONA, L. E.; WROLSTAD, R. E. Extraction , Isolation , and Purification of. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, p. F1.1.1, 2001.

RODRIGUEZ LANZI, C. et al. Grape pomace and grape pomace extract improve insulin signaling in high-fat-fructose fed rat-induced metabolic syndrome. **Food & function**, v. 7, n. 3, p. 1544–1553, 2016.

ROSSI, M. et al. Effect of fruit blanching on phenolics and radical scavenging activity of highbush blueberry juice. **Food Research International**, v. 36, n. 9–10, p. 999–1005, 2003.

RUBERTO, G. et al. Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. **Food Chemistry**, v. 100, n. 1, p. 203–210, 2007.

RUIZ, A. et al. Anthocyanin profiles in south Patagonian wild berries by HPLC-DAD-ESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 706–713, 2013.

SADILOVA, E.; CARLE, R.; STINTZING, F. C. Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and in vitro antioxidant capacity. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 51, p. 1461–1471, 2007.

SAGDIC, O.; OZTURK, I.; KISI, O. Modeling antimicrobial effect of different grape pomace and extracts on *S . aureus* and *E . coli* in vegetable soup using artificial neural network and fuzzy logic system. **Expert Systems With Applications**, v. 39, n. 8, p. 6792–6798, 2012.

SAHPAZIDOU, D. et al. Anticarcinogenic activity of polyphenolic extracts from grape stems

against breast, colon, renal and thyroid cancer cells. **Toxicology Letters**, v. 230, n. 2, p. 218–224, 2014.

SAID, K. A. M.; AMIN, M. A. M. Overview on the Response Surface Methodology (RSM) in Extraction Processes. **Journal of Applied Science & Process Engineering**, v. 2, n. 1, p. 8–17, 2015.

SAIKIA, S.; MAHNOT, N. K.; MAHANTA, C. L. Optimisation of phenolic extraction from Averrhoa carambola pomace by response surface methodology and its microencapsulation by spray and freeze drying. **Food Chemistry**, v. 171, p. 144–152, 2015.

SÁNCHEZ-TENA, S. et al. Grape antioxidant dietary fiber inhibits intestinal polyposis in Apc Min / + mice : relation to cell cycle and immune response. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 8, p. 1881–1888, 2013.

ŠARIĆ, B. et al. Valorisation of raspberry and blueberry pomace through the formulation of value-added gluten-free cookies. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 2, p. 1140–1150, 2016.

SEBASTIAN, R. S. et al. A new database facilitates characterization of flavonoid intake, sources, and positive associations with diet quality among US adults. **Journal of Nutrition**, v. 145, n. 6, p. 1239–1248, 2015.

SEERAM, N. P. et al. Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 1415–1422, 2008.

SESSA, M. et al. Bioavailability of encapsulated resveratrol into nanoemulsion-based delivery systems. **Food Chemistry**, v. 147, p. 42–50, 2014.

SHERIDAN, M. K.; ELIAS, R. J. Exogenous acetaldehyde as a tool for modulating wine color and astringency during fermentation. **Food Chemistry**, v. 177, p. 17–22, 2015.

SILVA, N. L. et al. Kinetic and thermodynamic analysis of anthocyanin thermal degradation in acerola (*Malpighia emarginata* D. C.) pulp. **Journal off Food Processing and Preservation**, v. 0, p. 1–7, 2009.

SILVA, L. C. DA et al. Níveis de produção em vinhedos de altitude da cv. Malbec e seus efeitos sobre os compostos fenólicos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 3, p. 675–680, 2008.

SIMSEK, M.; SUMNU, G.; SAHIN, S. Microwave Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Sour Cherry Pomace. **Separation Science and Technology**, v. 47, n. 8, p. 1248–1254, 2012.

SINELA, A. et al. Anthocyanins degradation during storage of Hibiscus sabdariffa extract and evolution of its degradation products. **Food Chemistry**, v. 214, p. 234–241, 2017.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of Total Phenolics With Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **Am. J. Enol. Vitic.**, v. 16, p. 144–158, 1965.

STRIK, B. C.; YARBOROUGH, D. Blueberry production trends in North America, 1992 to 2003, and predictions for growth. **HortTechnology**, v. 15, n. 2, p. 391–398, 2005.

STRUCK, S. et al. Berry pomace - A review of processing and chemical analysis of its polyphenols. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 6, p. 1305–1318, 2016.

SUCUPIRA, N. R. et al. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, n. 4, p. 263–269, 2014.

SUI, X.; BARY, S.; ZHOU, W. Changes in the color , chemical stability and antioxidant capacity of thermally treated anthocyanin aqueous solution over storage. **Food Chemistry**, v. 192, p. 516–524, 2016.

TALMACIU, A. I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A Comparative Analysis of the “Green”

Techniques Applied for Polyphenols Extraction from Bioresources. **Chemistry and Biodiversity**, v. 12, n. 11, p. 1635–1651, 2015.

TERCI, D.; ROSSI, A. V. INDICADORES NATURAIS DE pH: USAR PAPEL OU SOLUÇÃO? **Quimica Nova**, v. 25, n. 4, p. 684–688, 2002.

TSENG, A.; ZHAO, Y. Wine grape pomace as antioxidant dietary fibre for enhancing nutritional value and improving storability of yogurt and salad dressing. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 356–365, 2013.

TSUKUI, A.; REZENDE, C. M. Extração Assistida por Micro-ondas e Química Verde Microwave Assisted Extraction and Green Chemistry Extração Assistida por Micro-ondas e Química Verde. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 6, p. 1713–1725, 2014.

VERGARA-SALINAS, J. R. et al. Characterization of pressurized hot water extracts of grape pomace: Chemical and biological antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 171, p. 62–69, 2015.

VETRANI, C. et al. Metabolic transformations of dietary polyphenols: Comparison between in vitro colonic and hepatic models and in vivo urinary metabolites. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 33, p. 111–118, 2016.

WALLACE, T. C.; GIUSTI, M. M. Evaluation of parameters that affect the 4-dimethylaminocinnamaldehyde assay for flavanols and proanthocyanidins. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 7, p. 619–625, 2010.

WALLACE, T.; GIUSTI, M. Anthocyanins. **Advances in Nutrition an Internacional Review Journal**, v. 60, n. 11, p. 620–622, 2015.

WROLSTAD, R. E.; CULVER, C. A. Alternatives to Those Artificial FD&C Food Colorants. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 3, p. 59–77, 2012.

XAVIER, J. A. P. **Pomar Blueberry**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul,

2015.

XUE, Z. et al. Effects of nonthermal preservation technologies on antioxidant activity of fruits and vegetables : A review. **Food Science and Technology International**, v. 22, n. 5, p. 440–458, 2015.

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

YU, S. et al. Comparison of microwave assisted extraction with hot reflux extraction in acquirement and degradation of anthocyanin from powdered blueberry. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, v. 9, n. 6, p. 186–199, 2016.

ZARDO, I. **Extração e microencapsulação de compostos antociânicos do bagaço de mirtilo (Vaccinium corymbosum L .)**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014.

ZHENG, X. et al. Extraction characteristics and optimal parameters of anthocyanin from blueberry powder under microwave-assisted extraction conditions. **Separation and Purification Technology**, v. 104, p. 17–25, 2013.

TABLES

Table 1: The central composite design for response surface modeling of total monomeric anthocyanin content extraction from Blueberry pomace using a water solvent based extraction procedure*.

Random run order	Independent variables				TMA**
	Temperature (X ₁)		Time (X ₂)		
	Coded Values	Real Values	Coded Values	Real Value	
5	-1.41	38	0	32.5	57.1
1	-1	47	-1	14.45	62.6
9	0	69	0	32.5	88.04
2	-1	47	1	50.5	67.9
10	0	69	0	32.5	84.5
7	0	69	-1.41	5	75.9
8	0	69	1.41	60	92.6
11	0	69	0	32.5	88.0
3	1	91	-1	14.45	99.7
4	1	91	1	50.5	87.1
6	1.41	100	0	32.5	95.1

* Solid-to-liquid ratio and acid concentration were fixed as 1:15 (w/v) and 1% of citric acid as described for the initial extraction procedure.

**Total monomeric anthocyanin (TMA) content was determined by pH-differential method and results were expressed as mg of cyaniding-3-glucoside per liter of extract.

For all experimental conditions pH was measured and values ranged from 2.25 to 2.30

Table 2: ANOVA results obtained from central composite design experiments for total monomeric anthocyanin content in water-based extracts from blueberry pomace.

Parameters	SS	df	MS	F	P
X_1	1514.8	1	1514.8	375.1	0.002
X_1^2	172.9	1	172.9	42.8	0.02
X_2	32.7	1	32.7	8.1	0.10
X_2^2	12.2	1	12.2	3.03	0.22
X_1X_2	80.1	1	80.1	19.8572	0.04
<i>Lack of fitness</i>	121.4	3	40.4	10.0237	0.09
<i>Pure Error</i>	8.07	2	4.03		
<i>Total SS</i>	1930.3	10			

Regression Validation Results		
<i>Tested conditions</i>	<i>Optimal</i> *	<i>Central</i> *
<i>Predicted value TMA</i>	103.5	85.4
<i>Confidence Interval**</i>	± 10.9	± 3.61
<i>Experimental value*</i>	114.2	87.0
<i>Confidence interval**</i>	± 2.35	± 4.08

*Prediction and the experimental results were obtained for the maximum content of anthocyanin in extracts which correspond to an extraction at 100°C (+1.41) during 5 minutes (-1.41).

** Confidence intervals of the analytical measurement and from prediction were calculated at 5% of error probability. Experimental values are the average of six independent extractions performed in three different days of analyzes (n=6). Results were expressed as mg of cyaniding-3-glucoside/L of extract.

Table 3: Total content of anthocyanins in blueberry pomace and recoveries obtained in optimized conditions versus microwave assisted methods.

<i>Extraction procedures</i>	TMA (mg/100g)	Recovery (%)	Chemicals[#]	Total Cost (U\$)^{***}
<i>Total content by exhaustive organic solvent extraction*</i>	225,4 ± 9,1 ^a	100	Acetone, Chloroform, Hydrochloric Acid	78.3
<i>Water-based optimized conditions**</i>	171,7 ± 0,7 ^b	76.2	Water, Citric Acid	3.0
<i>Microwave assisted methods***</i>				
Condition I	142.5 ± 13.4 ^c	63.2		
Condition II	108.7 ± 1.9 ^d	48.2		

* Total content in samples was considered as the amount of anthocyanins that were extracted with a standardized protocol of exhaustive extraction with 70% of acidified acetone and a subsequent liquid-liquid extraction with chloroform (Giusti et al., 2001).

** Optimized condition (100°C, 5 minutos) for extraction with 1% (w/v) of citric acid in distilled water. 1:15

***Microwave assisted method was performed at three different conditions which correspond to 525 W, 3 min; 700 W, 3 min for conditions I and II, respectively.

*** The cost of solvents were obtained from the website of Sigma-Aldrich (Brazil). Costs of energy, equipment, and water were not considered for calculations.

Exhaustive organic solvent extraction uses 1L of 70% acetone, 2L of Chloroform, and 0.1 mL of hydrochloric acid to produce 1L of extract from 22 grams of blueberry bagasse. Water-based extraction uses 10 grams of citric acid in 1L of water to produce 1L of water-based extract.

Table 4: Blueberry bagasse anthocyanin in the water base extract: Characterization results for anthocyanin identification and antioxidant capacity

Peak#	Rt*	Relative %	UV-VIS spectral data	MS/MS Fragments		Tentative identification
			Maximal absorption bands (nm)	MS	MS ₂	
1	4.045	7.00	276 (297sh). 346. 521 (428sh)	465	303	Delphinidin-3-galactoside
2	4.878	2.76	275 (297sh). 345 (434sh). 522	465	303	Delphinidin-3-glucoside
3	5.956	17.4	279. 329 (377sh) (430sh). 515	449	287	Cyanidin-3-galactoside
4	6.301	2.67	276 (297sh) (345sh) (430Sh). 510	435	303	Delphinidin-3-arabinoside
5	7.365	7.37	279 (328sh) (371sh). (429sh). 516	449	287	Cyanidin-3-glucoside
6	7.753	5.28	275 (296sh). 344 (434sh). 523	479	317	Petunidin-3-galactoside
7	8.056	7.69	279 (297sh). 323 (432sh). 516	419	287	Cyanidin-3-arabinoside
7a			279 (297sh). 323 (432sh). 516	479	317	Petunidin-3-galactoside
8	8.282	4.15	275 (297sh). 348 (425sh). 525	479	317	Petunidin-3-arabinoside
8a			275(297sh). 348 (425sh). 525	419	287	Cyanidin-3-xyloside
9	8.666	7.60	278 (296sh). 323 (432sh). 517	463	301	Peonidin-3-galactoside
9a			278 (296sh). 323 (432sh). 517	449	317	Petunidin-3-arabinoside
10	9.094	19.03	277 (297sh). 350 (430sh). 522	493	331	Malvidin-3-galactoside
10a			277 (297sh). 350 (430sh). 522	463	301	Peonidin-3-glucoside
11	9.403	12.51	276 (297sh). 345 (435sh). 525	493	331	Malvidin-3-glicoside
11a			276 (297sh). 345 (435sh). 525	433	301	Peonidin-3-arabinoside
11b			276 (297sh). 345 (435sh). 525	463	301	Peonidin-3-xyloside
12	9.671	6.11	276 (297sh). 345 (435sh). 528	463	331	Malvidin-3-arabinoside
13	10	0.08	278 (297sh). 376 (440sh). 515	n.d.**	n.d	Unknown
14	10.125	0.22	281 (297sh) (348sh) (440sh). 524	463	331	Malvidin-3-xyloside

Colorimetric measurements and Antioxidant Capacity

Total anthocyanin content (mg/L)	114.2 ± 0.39
Total polyphenol content (mg/L)	611.68 ± 28.01
ORAC value (mmol/L)	88.43 ± 12.83
FRAP value (mmol/L)	0.365 ± 0.01

*Rt: retention time; **n.d.: non detected. Results of colorimetric measurements are shown as the average ± standard deviation.

FIGURES

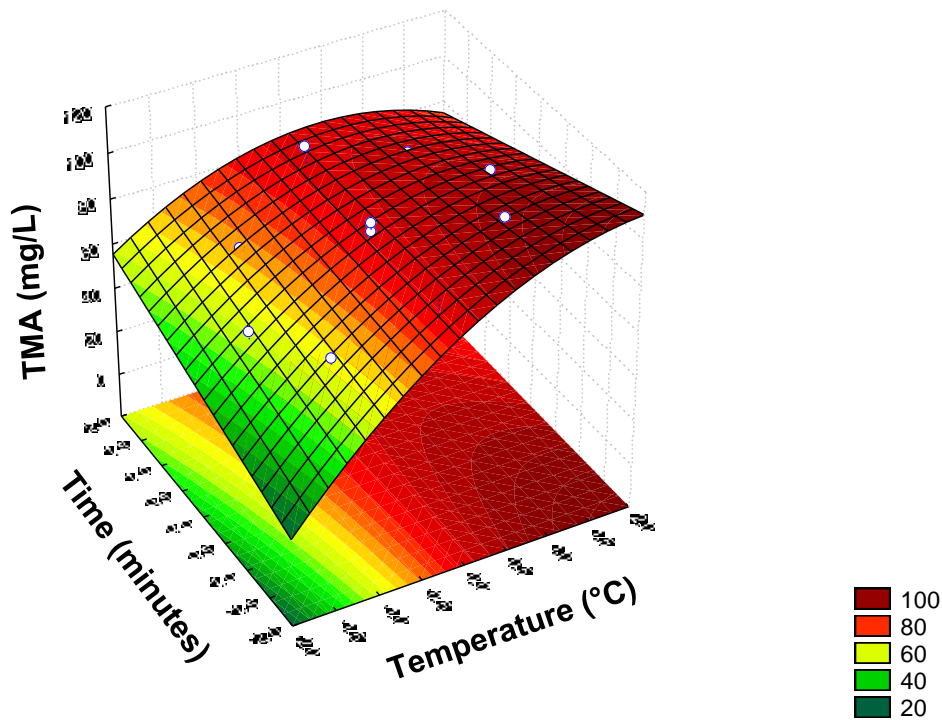


Figure 1: Response surface for the interaction of (5 to 60 minutes) and temperature (38 to 100°C) during a water-based extraction of monomeric anthocyanins from blueberry pomace. Results were expressed as mg of cyanidin-3-glicoside per liter of extract.

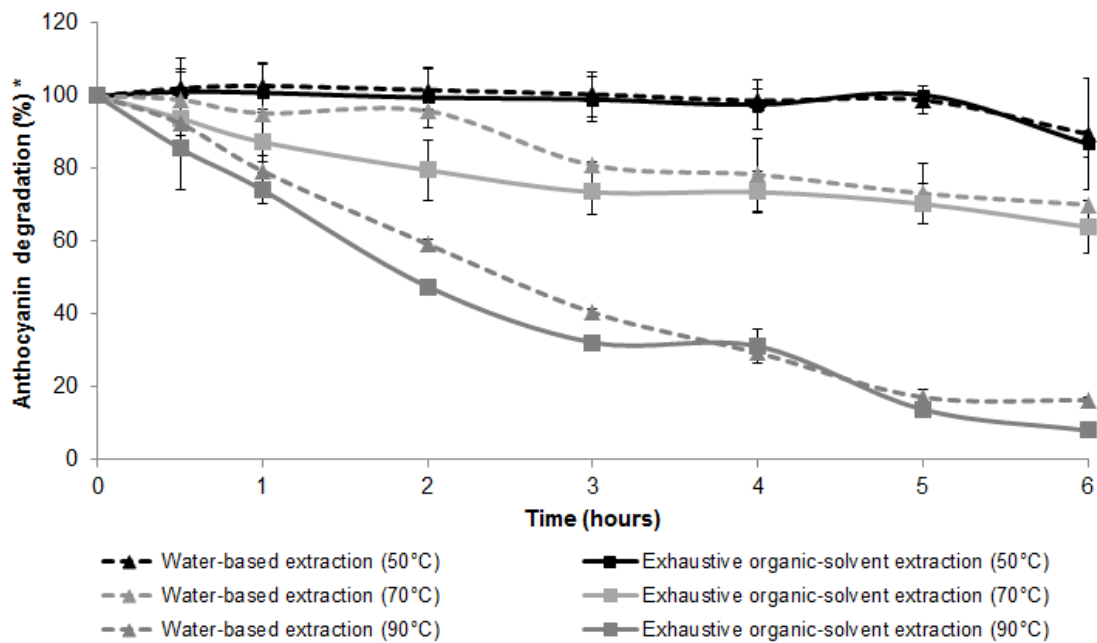


Figure 2: Stability of anthocyanin solution after cold organic solvent extraction versus optimized water-based extraction (1% w/v citric acid, 100°C/5 minutes).

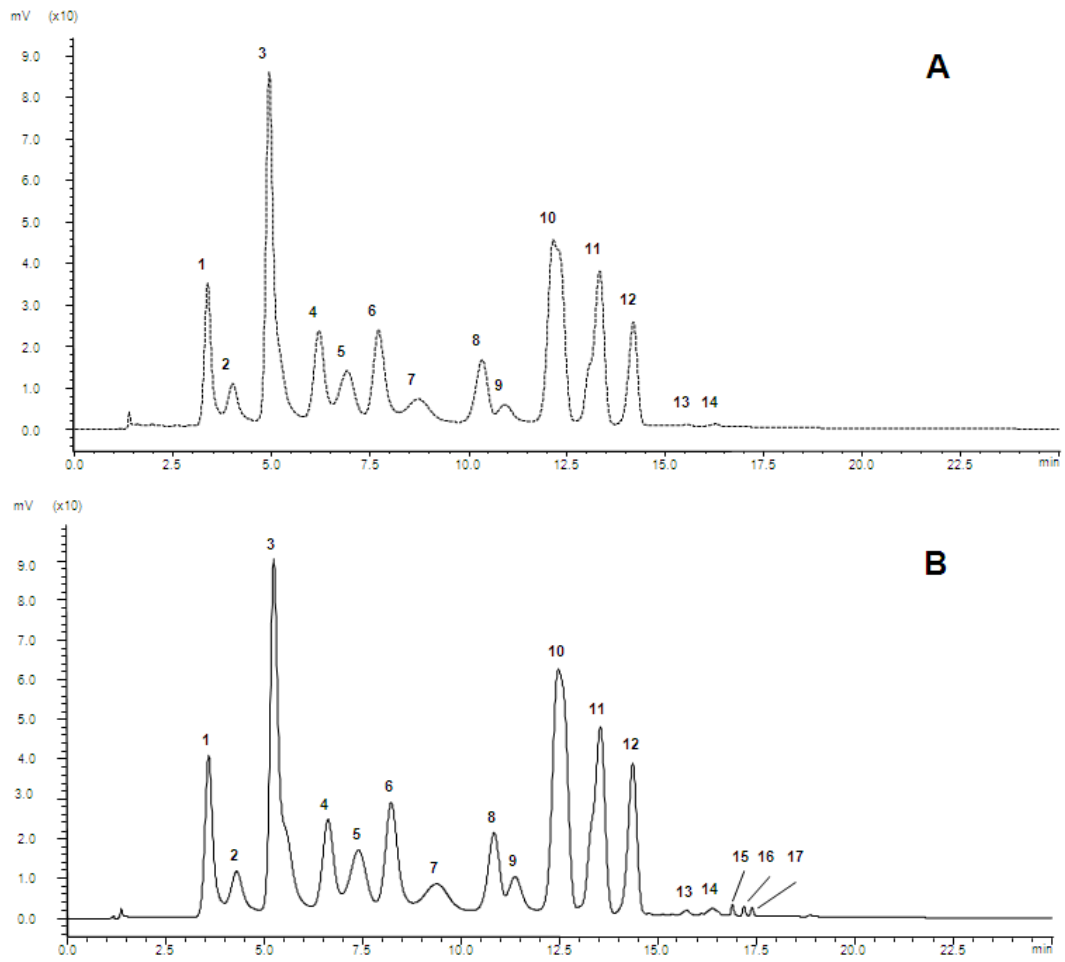


Figure 3: Chromatogram of anthocyanins from blueberry pomace. The top figure (A) is from optimized water-based extraction and bottom one (B) is from an exhaustive extraction with organic solvents. Peak assignments from A are detailed in table 4.

3.2 ARTIGO 2

(Formatado conforme as normas da Revista Boletim do Ceppa)

Extração aquosa de antocianinas do bagaço de uvas Malbec: avaliação da irradiação por micro-ondas

RESUMO

Este trabalho avaliou as condições de extração aquosa assistida por micro-ondas para a máxima recuperação de antocianinas presentes no resíduo de vinificação de uvas *Malbec*. A extração foi comparada com outras metodologias e caracterizado quanto ao perfil de antocianinas e capacidade antioxidante. O processo foi realizado utilizando uma solução de ácido cítrico 1% (p/v) e o teor de antocianinas foi determinado pelo método de pH diferencial. A ANOVA revelou que não houve efeito da potência e nem interação entre as variáveis estudadas, apenas efeito linear do tempo de extração. O modelo permitiu a visualização de tendências para o máximo de recuperação das antocianinas e os maiores valores em potências de 700 W 15 minutos. Vinte e dois pigmentos foram identificados usando as condições com máximos rendimentos incluindo pigmentos característicos de vinhos. Uma antocianina acilada (malvidina-3-*p*-coumaroil-glicosídeo) foi o composto majoritário da amostra (42%). Concluiu-se que a irradiação por micro-ondas foi capaz de melhorar a extração dos compostos, quando comparada à metodologia convencional, em mais de 28%, viabilizando a recuperação desses pigmentos em meio aquoso.

Palavras-chave: Química Verde; Comparação de métodos; Resíduos da vinificação; Compostos bioativos; Identificação; Atividade antioxidante.

Aqueous extraction of anthocyanins from *Malbec* grape pomace: evaluation of microwave irradiation

ABSTRACT

The use of microwave irradiation in the aqueous extraction of anthocyanins from 'Malbec' grape pomace was studied for the first time. Extraction was compared with other methodologies. The anthocyanin's profile and antioxidant capacity was determined in condition with the highest recovery. Extraction was performed in 1% (w / v) citric acid solution. Anthocyanin content was determined by the pH-differential method. ANOVA revealed that there was no significant effects of power neither the interaction between variables. Only the linear effect of extraction time was significant. Surface clearly shows a tendency of high recoveries with longer times (15 minutes)Equation showed a condition for maximum recovery of anthocyanins (700 W / 15 minutes). Twenty-two pigments were identified in the aqueous extract including winemaking derivative compounds. Malvidina-3-p-coumaroyl-glicoside was the major compound in sample (42%). Finally, microwave irradiation was able to improve extraction (28.31%) when compared to the conventional methodology, which make viable the use of aqueous citric acid solution for 'Malbec' pomace pigments extraction

Keywords: Aqueous extraction; Microwave; Grape pomace, Malbec, Anthocyanins; Antioxidant activity.

1 INTRODUÇÃO

A uva é uma das frutas de maior produção mundial e fonte rica em compostos fenólicos (ANTONIOLLI et al., 2015). Esses compostos foram indicados como importantes na saúde humana pela sua atividade em processos bioquímicos e por possuir efeitos nutracêuticos, anticarcinogênicas e antioxidantes (BRENES et al., 2016; GHOUILA et al., 2017; KAULMANN; BOHN, 2016; MOJZER et al., 2016; SAHPAZIDOU et al., 2014; YU; AHMEDNA, 2013).Cerca de 80% da produção das uvas é destinado à vinificação, sendo considerado uma indústria de extrema importância em vários países (FONTANA;

ANTONIOLLI; BOTTINI, 2013). Anualmente, o volume de resíduos gerados chega a 30% do volume de uvas utilizadas para a produção vinícola, e há trabalhos que avaliam alternativas de reutilização desses recursos (BARCIA, 2014; FONTANA; ANTONIOLLI; BOTTINI, 2013).

A cultivar *Malbec* é produzida principalmente na Argentina. O vinho produzido é considerado emblemático do país (ANTONIOLLI et al., 2015; FANZONE et al., 2012) e 31% da área cultivada de uva vermelha é destinada a uvas *Malbec*. Esta variedade é de origem francesa, adaptando-se bem em climas secos para a produção de vinhos de coloração escura, elevada concentração de taninos, aroma frutado e sabor assemelhado à ameixa (FANZONE et al., 2010). No Brasil, o cultivo de *Malbec* ainda é pouco expressivo, sendo cultivada principalmente no Rio Grande do Sul, em locais de altitude elevada que proporcionam maior amplitude térmica e temperaturas noturnas mais amenas, fatores que favorecem a maturação fenólica mais completa (SILVA et al., 2008).

O bagaço de uva é o resíduo que fica após a fermentação na produção do vinho, constituído principalmente por cascas, sementes, restos de polpa e engaces (GOULA; THYMIATIS; KADERIDES, 2016). Ainda que a vinificação seja considerada um processo de extração parcial, o resíduo de uva apresenta elevado teor de compostos bioativos (LINGUA et al., 2016). Utilizar o bagaço da vinificação como fonte de compostos fenólicos é de grande valia para a indústria, pois além de ser uma matriz barata, dá destino sustentável a esses resíduos que são um problema ecológico e econômico (KAMMERER et al., 2004; KY; TEISSEDRE, 2015). Por isso, devido às propriedades benéficas, há interesse na extração de tais compostos, priorizando a utilização de tecnologias menos agressivas ao meio ambiente e que eliminem o uso de solventes orgânicos.

Metodologias convencionais de extração sólido-líquido, geralmente, empregam grandes volumes de solventes orgânicos e necessitam de longo tempo para execução do processo. Essas metodologias podem causar certa degradação dos compostos de interesse ou a recuperação de

substâncias pouco desejáveis (KARABEGOVIĆ et al., 2014). Essas características inviabilizam a transferência desses processos a escalas industriais que necessitam de métodos rápidos, baratos e seguros. Os métodos de extração podem afetar o rendimento, a pureza e a composição dos compostos fenólicos, por isso, uma metodologia eficaz é aquela que maximiza a extração dos compostos alvo, causa mínima degradação e seja baseada em tecnologias que não causem danos ao meio ambiente (CAI et al., 2016).

Diferentes metodologias têm sido empregadas com a finalidade de extrair os fitoquímicos presentes nos resíduos de frutas, como: dióxido de carbono supercrítico (CASAS et al., 2010), água quente pressurizada (VERGARA-SALINAS et al., 2015), ultrassom (ESPADA-BELLIDO et al., 2017), aquecimento ôhmico pulsado (EL DARRA et al., 2013), micro-ondas (DAHMOUNE et al., 2015). A extração assistida por micro-ondas apresenta vantagens quando comparada às metodologias tradicionais. Dentre essas o aquecimento rápido e a diminuição no tempo do processo extrativo favorecem a recuperação de compostos bioativos com menores volumes de solvente. Resultados relevantes foram relatados na literatura, LIAZID et al. (2011) reportou considerável redução no tempo de extração das antocianinas da casca de uva utilizando micro-ondas. O tempo do processo passou de 5 horas (metodologia convencional) para 5 minutos (utilizando micro-ondas) com a extração de compostos que não foram recuperados da matriz pelo método tradicional. Por fim, vale ressaltar que muitos fatores podem afetar a extração de compostos bioativos, como: método de extração, solvente utilizado, razão sólido-líquido, tempo) (KARABEGOVIĆ et al., 2014). Por isso, é de suma importância avaliar o comportamento dos processos extrativos frente à diferentes situações e estipular condições para o máximo rendimento.

Atualmente, uma das principais alternativas para avaliar processos de extração é o uso de desenhos experimentais para a análise multivariada de processos como a metodologia de superfície de resposta (DAHMOUNE et al., 2015; JIANG; YANG; SHI, 2017; SAIKIA; MAHNOT; MAHANTA, 2015). Ao utilizar esse desenho experimental, a análise dos dados

permite a avaliação do efeito de cada variável isoladamente, bem como suas interações para o delineamento do comportamento da resposta em estudo. Além da redução de experimentos, os resultados obtidos a partir da metodologia de superfície de resposta são estatisticamente aceitáveis e permitem a obtenção de modelos de predição de condições ótimas para a resposta em análise (KARABEGOVIĆ et al., 2014; SAID; AMIN, 2015).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do uso de micro-ondas para a recuperação das antocianinas do bagaço de uvas Malbec usando solução aquosa acidificada com ácido cítrico. O processo visa à obtenção de uma solução rica em compostos bioativos, com menor impacto ambiental e seguro para o consumo humano. Sendo assim, o extrato final foi avaliado quanto ao perfil de antocianinas, os teores das principais classes de polifenóis e a atividade antioxidante.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostra

As amostras de resíduo da vinificação da cultivar *Malbec* foram fornecidas pela Vinícola Velho Amâncio, localizada na cidade de Itaara, RS. As uvas da safra de 2016 foram submetidas ao processo de vinificação e o bagaço foi recolhido após sete dias de maceração. Após o recebimento, as amostras armazenadas em sacos de polietileno e imediatamente congeladas (± -20 °C). O resíduo era composto de cascas, semente e os engaces (que foram removidos manualmente). Para a realização dos experimentos, o bagaço de uva foi triturado ainda congelado, em um multiprocessador de alimentos (3 minutos, 2000 rpm, Processador de Alimentos RI7625/71, Philips, China).

2.2 Extração

2.2.1 Extração inicial

Com a finalidade de estipular uma faixa de trabalho para tempo, potência e razão sólido-líquido, os polifenóis do bagaço de uva foram inicialmente extraídos, utilizando sistema digestor de micro-ondas (*Advanced Microwave Digestion System* – Ethos1, Milestone Inc., Itália). O aparelho possuía um sistema de controle digitalizado para tempo de irradiação e potência de micro-ondas (ajustável de 200 a 700 W). Ainda junto ao forno, estava acoplado um sistema condensador de vapores. Duas razões sólido-líquido foram testadas: 1:5 e 1:15. As amostras foram pesadas diretamente no tubo de extração e misturadas ao solvente de trabalho, que era água acidificada com 1 % de ácido cítrico. Após a extração assistida por micro-ondas (MAE), as amostras foram filtradas e analisadas para o conteúdo de antocianinas monoméricas totais (descrito na seção 2.3).

2.2.2 Otimização da extração

Para o processo de otimização da melhor condição de extração, o delineamento experimental do tipo composto central rotacional (DCCR) e a metodologia de superfície de resposta foram aplicados. As duas variáveis independentes tempo de extração (X_1) e potência (X_2) foram fixadas com base em testes preliminares anteriormente realizados (conforme descrito na seção 2.2.1). Um DCCR de cinco níveis (-1,41, -1, 0, +1, +1,41), para definir qual a melhor condição de extração de tempo (X_1 , de 2 min a 15 min) e potência (X_2 , de 350 W a 700 W) foi realizado. Foram realizadas extrações em 11 condições que incluíam um fatorial completo 2^2 , 4 pontos axiais e 3 repetições do ponto central. A variável dependente foi a concentração de antocianinas monoméricas totais (AMT) (descrito na seção 2.4). Os resultados obtidos foram utilizados para construir o modelo de regressão e determinar os coeficientes lineares, quadráticos e de interação (Eq. (1)):

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1X_2$$

Onde Y é a resposta mencionada para as extrações de antocianinas; b_0 é o coeficiente do modelo; b_1 e b_2 , b_{11} e b_{22} são os coeficientes lineares e quadráticos das variáveis X_1 e X_2 ,

respectivamente. b_{12} é o coeficiente de interação entre as variáveis em estudo. Todos os experimentos foram realizados de forma aleatória para reduzir os efeitos da variabilidade inexplicada nas respostas devido a erros operacionais. O software Statistica® 7.0 foi utilizado para as análises de variância dos resultados de regressão e para a obtenção do modelo de superfície de resposta. O procedimento de extração, utilizando as condições definidas como ótimas, foi validado com base nas previsões do modelo desenvolvido.

Tabela 1: Variáveis codificadas e valores reais do delineamento experimental do tipo composto central rotacional para a otimização da extração assistida* por micro-ondas de antocianinas monoméricas totais de bagaço de uva em meio aquoso

Ordem	Variáveis Independentes				AMT**
	Tempo (X_1)		Potência (X_2)		
	Valor codificado	Valor real	Valor codificado	Valor real	
8	0	8,5	1,41	700	59,10
5	-1,41	2	0	525	38,42
9	0	8,5	0	525	64,33
1	-1	4,29	-1	401	53,34
10	0	8,5	0	525	65,91
11	0	8,5	0	525	63,92
6	1,41	15	0	525	71,49
3	1	13,11	-1	401	60,68
7	0	8,5	-1,41	350	56,04
2	-1	4,29	1	649	65,21
4	1	13,11	1	649	59,98

* A razão sólido-líquido e a concentração de ácido cítrico foram 1:5 (m/v) e 1% de ácido cítrico, como descrito no procedimento inicial de extração.

** O conteúdo de antocianinas monoméricas totais (AMT) foi determinado por metodologia de pH-diferencial e os resultados foram expressos em mg cianidina-3-glicosídeo por litro de extrato.

Para todas as condições experimentais o pH foi medido e os valores ficaram em torno de $3,0 \pm 0,02$.

2.3 Conteúdo de antocianinas monoméricas totais (AMT)

O conteúdo de antocianinas monoméricas totais foi determinado utilizando a metodologia de pH-diferencial descrita por GIUSTI & WROLSTAD (2001). Os resultados foram expressos em mg de equivalente de cianidina-3-glicosídeo (ECG) por litro de extrato obtido para os ensaios de otimização de extração. Para o rendimento de extração (item 2.4) o teor de antocianinas na matriz obtido pelo método exaustivo foi calculado e expresso em mg ECG/100g de resíduo. Os valores de 449.2 e 26.900 foram considerados como peso molecular (PM) e absorvidade (ϵ) molar de ECG, respectivamente.

Levando em conta que AMT foi a resposta utilizada para avaliação das variáveis da extração nos experimentos de otimização, a garantia da qualidade foi verificada utilizando desvio padrão relativo, para os resultados obtidos a partir das extrações (n=3).

2.4 Caracterização do extrato otimizado e comparações com o teor total por método exaustivo e com metodologia de extração convencional

Após a determinação das condições ótimas de trabalho, a solução final de antocianinas foi avaliada quanto à capacidade antioxidante, teor total de polifenóis, teor de proantocianidinas e caracterização do perfil de antocianinas. Além disso, o extrato foi comparado à metodologia exaustiva comumente utilizada na caracterização de matrizes para a determinação de eficiência do processo por rendimento de extração. Por fim, as condições otimizadas foram testadas utilizando metodologia convencional de extração, com objetivo de comprovar os efeitos da utilização de micro-ondas no processo extrativo.

2.4.1 Determinação do rendimento da extração: extração exaustiva

As condições de otimização determinadas após os experimentos utilizando micro-ondas, foram comparadas com a metodologia de extração exaustiva reportada na literatura por RODRIGUEZ-SAONA & WROLSTAD, (2001). O solvente de extração usado nesse método é acetona acidificada (70%, 0.01% HCl).

2.4.2 Extração convencional

A condição de extração otimizada foi comparada com uma metodologia convencional, a fim de comprovar os efeitos do micro-ondas no processo extrativo. As antocianinas do resíduo da vinificação foram extraídas utilizando um sistema de aquecimento. A amostra foi pesada (cerca de 3 g) e misturada ao solvente (15 mL de água acidificada com 1% de ácido cítrico) no frasco de extração. O solvente extrator foi previamente aquecido, para simular o rápido aquecimento gerado micro-ondas. O frasco hermeticamente fechado foi colocado em um banho termostaticado com agitação ($100^{\circ} \pm 0.1$ °C, velocidade de 240 bpm, Marconi MA093, Brasil), durante 15 min. Após a extração, as amostras foram filtradas e analisadas para o conteúdo de antocianinas monoméricas totais.

2.4.3 Conteúdo de compostos fenólicos totais

A determinação do conteúdo de polifenóis totais foi feita utilizando o método de Folin-Ciocalteu descrito por SINGLETON & ROSSI, (1965). Após duas horas, a absorção foi determinada em 765 nm. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico por L de extrato de resíduo de uva.

2.4.5 Determinação de proantocianidinas pelo método DMAC

A determinação de proantocianidinas foi feita como descrito por WALLACE & GIUSTI, (2010), no ensaio DMAC ocorre a condensação do sítio nucleofílico da estrutura de fluroglicinol (anel A) com aldeídos, formando um produto colorido detectável a 640 nm (que está fora do espectro das antocianinas, eliminando assim sua interferência). A análise foi realizada nos extratos otimizados e naqueles obtidos por extração exaustiva. O padrão de catequina ((+)-Cyanidol-3, (2R,3S)-2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-1(2H)-benzopyran-3,5,7-triol, (+)-Catechin hydrate, Sigma-Aldrich) foi utilizado como padrão para a determinação das proantocianidinas com uma curva de calibração com 7 pontos equidistantes

($R^2 = 0,9993$; $y = 0,0034x - 0,0018$). Os resultados foram expressos em mg equivalente de catequina por L de extrato de resíduo de uva.

2.4.6 Determinação da atividade antioxidante

O ensaio de ORAC foi realizado como descrito por OU, HAMPSCH-WOODILL, & PRIOR, (2001), e a capacidade antioxidante frente aos radicais peroxil foi determinada nos extratos otimizados e naqueles obtidos por metodologia exaustiva. A fluorescência foi monitorada utilizando excitação de 485 nm e emissões de 538 nm, em intervalos de 1 minuto, durante 90 minutos em um fluorímetro de microplacas (Spectramax M5 Microplate Reader, Molecular Devices). O derivado sintético de tocoferol (6-Hydroxy-2,5,7,8-Tetramethylchroman-2-Carboxylic Acid, Trolox[®], Sigma-Aldrich) foi utilizado como padrão para a determinação da atividade antioxidante com uma curva de calibração com 7 pontos equidistantes ($R^2 = 0,9804$; $y = 0,4495x + 3,0203$). Os resultados foram expressos em mmol equivalentes de Trolox por L de extrato de resíduo de uva.

O ensaio de FRAP foi feito seguindo a metodologia proposta por BENZIE & SZETO, (1999), nos extratos otimizados e também nos obtidos por extração exaustiva. As leituras de absorção foram realizadas a 593 nm em espectrofotômetro (Espectrofotômetro 600 Plus, Femto). A curva de calibração foi feita com Trolox como padrão para a determinação da atividade antioxidante com uma curva de calibração com 7 pontos equidistantes ($R^2 = 0,9939$; $y = 0,0042x + 0,1465$), e os resultados expressos em mmol equivalentes de trolox por L de extrato de resíduo de uva.

2.4.7 Identificação das antocianinas por HPLC-DAD-ESI/MS

O extrato otimizado do resíduo de uva foi previamente purificado utilizando cartuchos de extração de fase sólida C-18 (Stracta[®], 6cc, 1 g of octadecylsilyl resin, Phenomenex, Torrance, EUA) para obtenção da fração pura de antocianinas, conforme descrito por

RODRIGUEZ-SAONA E WROLSTAD, (2001), com algumas modificações conforme descrito por BOCHI, GODOY, & GIUSTI, (2015). A fração de antocianinas foi recolhida do cartucho utilizando metanol acidificado com 0,1% de ácido fórmico v/v (85%, Merck®) e seca em rotaevaporador (Rotavapor® R-300, Buchi, Labortechnik, Germany) por 10 minutos a 38 °C. A amostra foi ressuspensa em água acidificada com 0,35% de ácido fórmico (v/v) em um volume conhecido (2 ml).

Anteriormente à injeção, a amostra foi filtrada (0.22µm, PTFE syringe filters, 25 mm, Simple pure, Allcrom, SP, Brazil). A separação foi realizada utilizando uma coluna de fase reversa (C18, 2.6µm, 100 mm x 4.6 mm, Phenomenex, Torrance, USA) com temperatura de 38 °C. O equipamento de HPLC utilizado foi o Prominence 20 A (Shimadzu, Japan), equipado com degasser (DGU20A5 prominence, Shimadzu, Japan), forno de coluna (CTO-20A prominence, Shimadzu, Japan), acoplado a um detector PDA (SPDM-20A prominence, Shimadzu, Japan). Foi utilizada mesma metodologia previamente padronizada em nosso grupo de pesquisa (TREPTOW, 2016). Sendo assim, os compostos foram separados por eluição em gradiente com as fases móveis (A) solução ácida (3% v/v de ácido fórmico, 85%, Merck®) em água ultrapura (Milli-Q Gradient System, Millipore Corporation, Massachusetts, EUA), e (B) acetonitrila pura (HPLC grade, Merck, Darmstadt, Germany) com um fluxo de 0,9 mL.min⁻¹ e o seguinte gradiente: 0 -5 min – 8% B; 5 -7,5 min – 15% B; 7,5 -15 min – 30% B; 15 -22 min – 80% B; 22 -31 min – 8% B. Os cromatogramas foram processados em 520 nm.

O Sistema de HPLC descrito estava conectado a um espectrômetro de massas do tipo *Ion Trap* (Esquire 6000, Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) equipado com uma interface de electrospray (ESI). As análises foram realizadas em modo positivo e as condições de ESI foram: tensão capilar de +4,5 kV, pressão do gás nebulizador de 30 psi, gás seco a 11 mL.min⁻¹, e temperatura do gás de 310 °C. A tensão de saída capilar foi ajustada para 70 V. As análises

de MRM foram realizadas no intervalo de varrimento completo de 200 a 1000 m/z de todos os fragmentos formados a partir de 3 íons principais por segundo.

2.5 Análise estatística

A análise de variância (ANOVA) e de regressão dos resultados obtidos pelo planejamento experimental do tipo composto central rotacional, detalhado no item, foram realizadas com o auxílio do software Statistica® 7.0. A caracterização de atividade antioxidante do extrato otimizado e comparação com o teor total na matriz foi realizado em triplicata e os resultados expressos como média \pm desvio padrão. As médias foram comparadas utilizando o teste T Student com uma variável independente ($p \leq 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Extração inicial

A extração de materiais vegetais pode ser afetada por muitos fatores (método de extração, razão sólido:solvente, tempo, tipo de solvente, temperatura) (KARABEGOVIĆ et al., 2014). Por isso, a análise prévia das condições de extração leva à seleção da faixa de trabalho ideal, permitindo a melhora do rendimento do processo extrativo e maior concentração do produto obtido (ÁLVAREZ et al., 2016). Em um teste de extração inicial, testamos as proporções de 1:5 e 1:15 (s/l), nas condições de 700 W por 3 minutos. A partir dos resultados obtidos (64.06 ± 2.15 mg Cyd-3-G/L e 24.65 ± 1.68 mg Cyd-3-G/L, para razão s/l 1:5 e 1:15, respectivamente), optamos pela utilização da proporção 1:5 para os experimentos seguintes. Visto que, um dos objetivos do trabalho é a obtenção de um extrato com maiores concentrações do composto em estudo, a razão sólido-líquido de 1:15 foi descartada também pelo fato de as antocianinas já estarem em concentrações muito diluídas nessa solução.

3.2 Otimização da extração

Para que um método de extração seja considerado competitivo e lucrativo, ele deve ser mais eficiente que os processos convencionais e ter baixo impacto ao meio ambiente. Com a finalidade de otimizar um método de extração que não utilize solventes orgânicos, a água acidificada com 1% de ácido cítrico foi o solvente escolhido para o desenvolvimento desse estudo, aliado à utilização de um sistema de micro-ondas. Ao desenvolver métodos baseados em MAE, vários efeitos devem ser levados em consideração, entre eles: a influência do solvente escolhido, o tempo de extração, a potência e a razão sólido-líquido (LIAZID et al., 2011). Esses efeitos (individuais ou combinados) podem ser estimados por métodos estatísticos. A superfície de resposta é um método estatístico-matemático que utiliza dados quantitativos em um desenho experimental para determinar e resolver equações multivariáveis e otimizar os processos de extração (LI; JIANG, 2010; LIAZID et al., 2011).

Os resultados dos experimentos realizados com as variáveis tempo e potência utilizando DCCR sobre o teor de antocianinas monoméricas totais são mostrados na Tabela 1. Os resultados de análise de regressão e ANOVA para os efeitos da potência e do tempo de extração são mostrados na Tabela 2. ANOVA revelou que não houve interação entre as duas variáveis analisadas e que houve somente efeito linear do tempo de extração. Na faixa estudada (350 a 700 W), os efeitos lineares e quadráticos da potência não foram significativos. A falta de ajuste para o modelo não foi significativa ($p > 0.05$). Portanto, o modelo em questão pode ter capacidade preditiva dentro das faixas em estudo desde que os resultados de experimentos de validação da equação estejam dentro das faixas de confiança da predição (Tabela 2). Sendo assim, de acordo com o modelamento utilizado, a condição máxima prevista para a extração das antocianinas do resíduo da vinificação de uvas *Malbec* com água acidificada (1% de ácido cítrico) é de 15 minutos (+1.41) e potência de 700 W (+1.41). Nessas condições, os valores previstos pelo modelo podem ir de 56,1 a 78,6 mg equivalentes de cianidina-3-glucosídeo/ml de extrato. Os valores experimentais obtidos com a reprodução das condições de máximo estão

dentro da faixa de confiança da previsão do modelo (Tabela 2). Sendo assim, o modelo obtido pela análise de regressão é válido e tem capacidade de previsão dentro das faixas de estudo.

Tabela 2: ANOVA dos resultados do delineamento experimental do tipo composto central rotacional para otimização da extração assistida por micro-ondas de antocianinas de bagaço de uva em solução aquosa de ácido cítrico (1% m/v).

Parâmetros	SS	df	MS	F	P
X_1	290,80	1	298,80	22,41	0,04
X_1^2	15,12	1	15,12	1,13	0,39
X_2	29,96	1	29,96	2,24	0,27
X_2^2	0,612	1	0,612	0,04	0,85
X_1X_2	39,51	1	39,51	2,96	0,22
<i>Falta de ajuste</i>	280,24	3	93,41	7,00	0,12
<i>Erro puro</i>	26,66	2	13,33		
<i>Total SS</i>	690,45	10			

<i>Resultados da validação da regressão</i>	
<i>Condição testada</i>	<i>Ótimo *</i>
<i>Valor previsto para AMT</i>	67,37
<i>Intervalo de confiança**</i>	± 11,2
<i>Valor experimental*</i>	59,08
<i>Intervalo de confiança**</i>	± 2,92

* O valor previsto e o resultado experimental foram obtidos pelo conteúdo máximo de antocianinas em extratos que correspondem a uma extração aquosa assistida por micro-ondas nas condições ótimas, com potência de 700 W (+1,41) durante 15 minutos (+1,41).

** Os intervalos de confiança da medida analítica e da precisão foram calculados a 5% da probabilidade de erro. Os valores experimentais são a média de seis extrações independentes (n=6). Os resultados foram expressos em mg de cianidina-3-glicosídeo/ L de extrato.

A Figura 1 é a representação gráfica do modelo ($Y = 58,75 \pm 2,05 + 6,11 \pm 2,72X_1$) e mostra o comportamento da resposta em estudo. A figura mostra com clareza a distribuição dos maiores rendimentos de extração que se encontram nas regiões de maior tempo e são independentes da potência utilizada. Há relatos na literatura que reportam comportamentos semelhantes aos do nosso estudo, em que a variável de extração mais significativa não foi a

potência do micro-ondas (HONG et al., 2001), e a variável tempo de extração foi o fator mais significativo para resposta analisada (KARABEGOVIĆ et al., 2014).

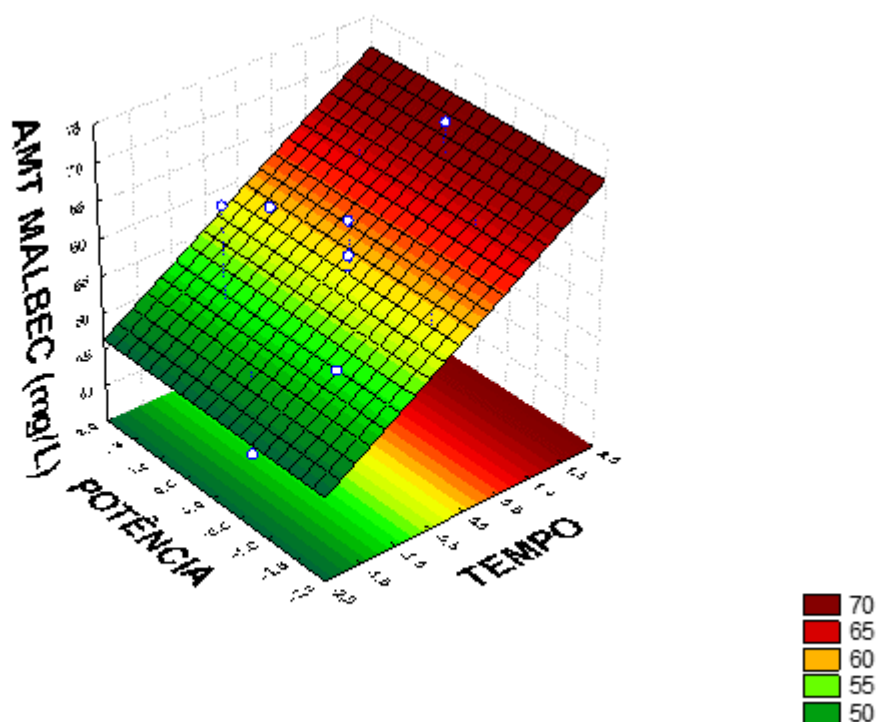


Figura 1: Superfície de resposta para efeito linear do tempo (2 a 15 minutos) durante extração aquosa assistida por micro-ondas das antocianinas do resíduo da vinificação de uvas Malbec.

3.4 Rendimento final da extração e comparação com diferentes metodologias extrativas

A metodologia exaustiva descrita por RODRIGUEZ-SAONA; WROLSTAD (2001) é uma das mais utilizadas por permitir a extração total de antocianinas de diversas matrizes. Utiliza acetona 70 % em água e ácido clorídrico (0.01%) e partição com clorofórmio, que separa a fração aquosa (contendo antocianinas, fenólicos, açúcares e outros compostos solúveis em água) da fração que contém solventes orgânicos imiscíveis, lipídeos, carotenoides, clorofila e outros pigmentos não polares. Esse método foi reproduzido utilizando-se o resíduo da vinificação da uva Malbec, para determinação do teor total de antocianinas na matriz em estudo. Os valores obtidos foram comparados com a extração nas condições otimizadas, a fim de avaliar

a eficiência do método de extração proposto. Assim sendo, com o método aquoso assistido por micro-ondas obtivemos um total de 29.42 ± 0.45 mg Cyd-3-G/100 g de bagaço de uva, e com a metodologia exaustiva, cerca de 41.38 ± 5.49 mg Cyd-3-G/100 g de bagaço de uva. A metodologia desenvolvida utiliza água acidificada com 1% de ácido cítrico e MAE foi capaz de extrair mais de 70% do total de antocianinas do bagaço da uva. Tendo em conta que a vinificação pode ser considerada um processo de extração parcial, o resíduo que fica apresenta elevado teor de compostos bioativos, porém eles estão fortemente ligados à matriz (LINGUA et al., 2016).

Metodologias extrativas convencionais possuem a vantagem de ser mais baratas em termos de custo de equipamentos. Contudo, existem desvantagens na utilização desses métodos, tais como a degradação dos compostos devido ao elevado tempo do processo e baixa eficiência de extração (DURMAZ; SUMNU; SAHIN, 2015). Visando comprovar que os valores obtidos na metodologia por micro-ondas são resultado da aplicação energia fornecida pela irradiação durante a extração e não somente da elevação da temperatura que ocorre no processo, testamos um método convencional de extração com solvente pré-aquecido. Menores teores de antocianinas monoméricas totais (17.68 ± 1.42 mg Cyd-3-G/ 100 g de bagaço de uva) foram obtidos com a extração convencional quando comparados aos resultados de MAE (Tabela 3) e correspondem a cerca de 42% do teor total encontrado na matriz. Melhores resultados obtidos por MAE podem ser explicados pelo aumento de transferência de massa entre a matriz e o solvente, devido ao gradiente de pressão que se acumula dentro das células e facilita a liberação dos bioativos (DURMAZ; SUMNU; SAHIN, 2015).

Tabela 3: Comparação entre diferentes métodos de extração.

<i>Procedimento de extração</i>	AMT (mg/100g)	Recuperação (%)
<i>Conteúdo total obtido por extração exaustiva com solvente orgânico*</i>	41.38 ± 5.49 ^a	100

<i>Condição otimizada de extração aquosa assistida por micro-ondas**</i>	$29.42 \pm 0,45^b$	71.09
<i>Extração aquosa por método convencional***</i>	17.68 ± 1.42^c	42.72

* O teor total das amostras foi considerado como a quantidade de antocianinas extraídas utilizando uma metodologia de extração exaustiva com 70% de acetona acidificada e subsequente partição líquido-líquido com clorofórmio

** Condição otimizada (700 W, 15 minutos) para extração aquosa com 1% (m/v) de ácido cítrico assistida por micro-ondas, na proporção sólido-líquido 1:5.

*** A extração convencional foi realizada utilizando banho de aquecimento durante 15 minutos e como solvente extrator, água acidificada com 1% (p/v) de ácido cítrico, na proporção sólido-líquido de 1:5.

3.5 Caracterização da solução de antocianinas obtida por extração aquosa assistida por micro-ondas: capacidade antioxidante e identificação de polifenóis

Os resultados de caracterização do extrato otimizado são mostrados na Tabela 5. A análise por HPLC-DAD-ESI-MS permitiu a identificação de 25 antocianinas no extrato de resíduo da vinificação em um total de 22 picos detectados à 520 nm (Figura 2).

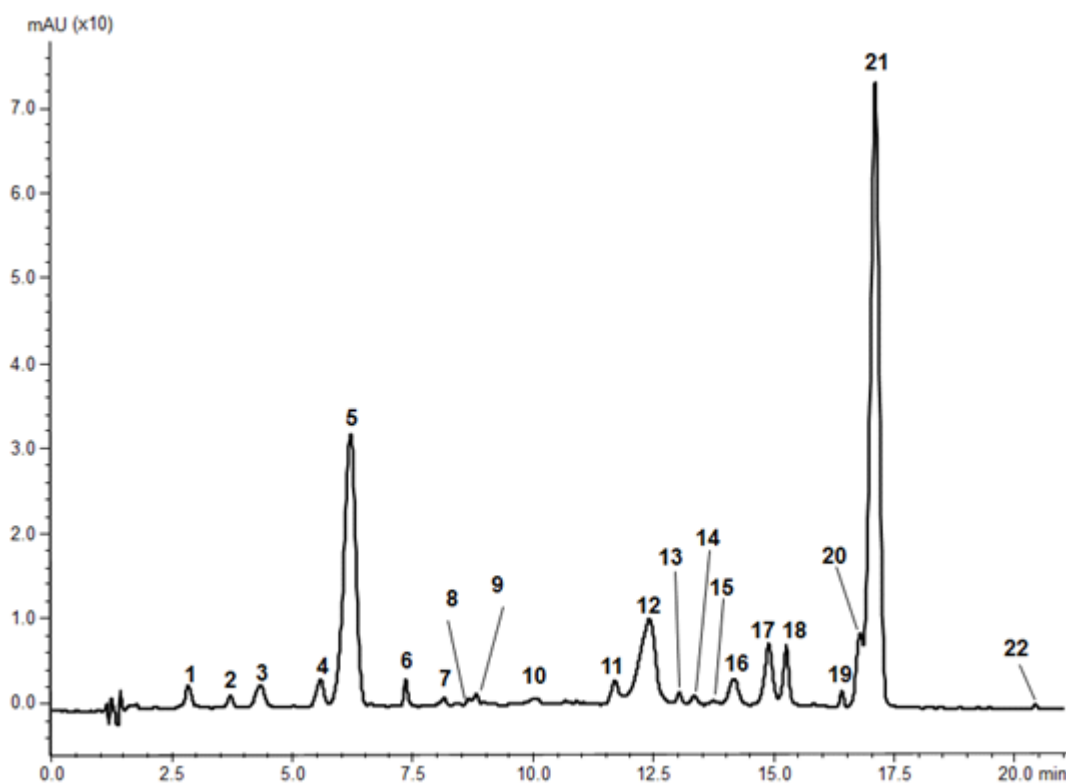


Figura 2: Cromatograma das antocianinas do resíduo de vinificação de uvas Malbec. A figura representa a solução de antocianinas obtida por extração assistida por micro-ondas. As atribuições dos picos estão detalhadas na tabela 4.

No extrato analisado foram identificados monômeros 3-glucosídeo de petunidina e malvidina (Tabela 4). A identificação foi feita seguindo a ordem de eluição lógica em cromatografia em fase reversa (C-18) e também o padrão de fragmentação em espectrometria de massas. Foram detectados fragmentos da parte aglicona da estrutura (317, 331 m/z para petunidina e malvidina, respectivamente) devido à perda neutra de 162 m/z que possivelmente corresponde a uma porção de hexose. Sendo que, este açúcar foi previamente identificado como glucosídeo na literatura (FANZONE et al., 2011) e devido à grande abundância desse açúcar ligado às antocianinas na natureza. A estrutura com perda neutra de 132 m/z, possivelmente correspondendo a uma pentose. Esse fragmento foi, identificado como um resíduo de arabinose perdido na fragmentação da molécula protonada de petunidina-3-arabinosídeo (pico 4). A identificação proposta para esse pico está de acordo com (FANZONE et al., 2010), o qual já identificou o mesmo monômero de antocianina ligado a arabinose em vinhos de *Malbec*. Não foram encontradas antocianinas à base de cianidina e nem de pelargonidina.

As antocianinas monoméricas aciladas com grupo acetil foram detectadas pela perda neutra de fragmento correspondente ao peso molecular do ácido desidratado (42 m/z). A estrutura foi identificada como malvidina-3-*p*-acetil-glucosídeo. A acilação com ácido *p*-coumárico por uma perda neutra da estrutura desidratada do ácido (146 m/z) também foi observada, em picos que foram identificados como: delphinidina-3-*p*-coumaroil-glucosídeo, petunidina-3-*p*-coumaroil-glucosídeo, malvidina-3-*p*-coumaroil-glucosídeo *cis*, peonidina-3-*p*-coumaroil-glucosídeo e malvidina-3-*p*-coumaroil-glucosídeo *trans*. A acilação com ácido cafeico foi identificada por uma perda neutra da estrutura desidratada do ácido (162 m/z), e os picos nomeados de malvidina-3-*p*-cafeoil-glucosídeo *cis* e malvidina-3-*p*-cafeoil-glucosídeo *trans*. Os fragmentos foram nomeados como perdas características de pigmentos de uvas e vinhos já relatados em trabalhos da literatura (FANZONE et al., 2010, 2011, 2012).

As piranoantocianinas formadas após a fermentação alcoólica e envelhecimento do vinho, também foram identificadas no extrato aquoso de resíduos da vinificação de uvas

Malbec. O pico 6, apresentou fragmentos de m/z 561 e 399 (cátion aglicônico) corresponde ao produto resultante da cicloadição em C4/C5 de ácido pirúvico a malvidina-3-glucosídeo, também chamado de Vitisin A. O pico 7 apresentando sinais m/z 517 e 355 corresponde ao produto da reação de condensação de malvidina-3-glucosídeo com acetaldeído, conhecido também como Vitisin B de malvidina-3-glucosídeo. O pico 17b apresentou sinais 663 e 355 também corresponde a piranoantocianina Vitisin B de Malvidina-3-*p*-coumaroil-glucosídeo.

As reações de condensação podem ocorrer diretamente pela formação de uma ligação covalente entre subunidades de flavonol ou antocianina, ou indiretamente através de uma ponte molecular, com acetaldeído, por exemplo (SHERIDAN; ELIAS, 2015). Em nosso trabalho, detectamos dois compostos que foram considerados produtos de condensação direta, devido ao padrão de fragmentação característico e detecção de m/z 289 característico de moléculas de catequina ligada à estrutura glicosilada. Sendo assim, esses compostos foram identificados como malvidina-3-glucosídeo-catequina e malvidina-3-*p*-coumaroil-glucosídeo-catequina.

Os picos formados por condensação direta mediada por acetaldeído foram identificados como malvidina-3-*p*-coumaroil-glicoídeo-catequina e malvidina-3-*p*-coumaroil-glicoídeo-(Epi)catequina. Esses compostos apresentaram o íon molecular de 955 m/z que gerou os íons 665 e 357 m/z em ambos os casos. Os resultados encontrados para antocianinas, piranoantocianinas, produtos de condensação direta e produtos de condensação mediada por acetaldeído, estão de acordo com dados reportados na literatura (FANZONE et al., 2010; POZO-BAYON et al., 2004; RUBERTO et al., 2007).

A antocianina majoritária no extrato de resíduo de uvas *Malbec* é a malvidina-3-*p*-coumaroil-glicosídeo, representando cerca de 42% da porcentagem relativa da área dos picos à 520 nm. Esse composto é seguido de malvidina-3-glicosídeo o qual representa sozinho cerca de 25% do total da área dos picos. Comparando os resultados obtidos para vinhos da cultivar *Malbec* com extratos do bagaço da uva, há uma pequena diferença no padrão de

acetilglucosídeos e coumaroilglucosídeos. Em vinhos, são encontradas maiores concentrações de acetilglucosídeos (FANZONE et al., 2010, 2012). Essa diferença pode estar relacionada com a extratibilidade dos diversos compostos durante a vinificação e o remanescente que permanece no bagaço e fica disponível para extração. ANTONIOLLI et al. (2015) em seu trabalho de caracterização dos polifenóis e avaliação da atividade antioxidante do bagaço de uva, relataram que os derivados de malvidina (particularmente os não acilados) são os compostos mais abundantemente encontrados na amostra, corroborando com os resultados encontrados em nosso estudo.

Tabela 4: Antocianinas do bagaço da uva obtidos por extração aquosa assistida por micro-ondas: resultados de caracterização para identificação das antocianinas e capacidade antioxidante.

Pico	TR*	% Relativa	Dados espectrais UV-VIS	Fragmentos MS/MS		Identificação
			Banda de absorção máxima (nm)	MS	MS ²	
Antocianinas						
3	4,8	1,47	278, 525	478	317	Petunidina-3-glu
4	6,06	1,58	278, 513	463	301	Peonidina-3-arab
5	6,6	24,9	277, 526	493	331	Malvidina-3-glu
12	12,6			657	331	Malvidina-3- <i>p</i> -caf-glu <i>Cis</i>
12b	12,8	10,7	278, 529	535	331	Malvidina-3- <i>p</i> -ac-glu
12c	12,9			611	303	Delfinidina-3- <i>p</i> -coum-glu
16	14,6	1,86	279, 481, 529	655	331	Malvidina-3- <i>p</i> -cafeoil-glu <i>Trans</i>
17	15,3	3,8	280, 512	625	317	Petunidina-3- <i>p</i> -coum-glu
18	15,7	2,73	279, 535	639	331	Malvidina-3- <i>p</i> -coum-glu <i>Cis</i>
20	17,2	3,55	281, 524	609	301	Peonidina-3- <i>p</i> -coum-glu
21	17,5	42,6	281, 531	639	331	Malvidina-3- <i>p</i> -coum-glu <i>Trans</i>
Piranoantocianinas						
6	7,8	0,6	276, 487	561	399	Vitisin A de Malvidina-3-glu
7	8,6	0,22	276, 468	517	355	Vitisin B de Malvidina-3-glu
17b	15,3	3,82	280, 512	663	355	Vitisin B de Malvidina-3- <i>p</i> -coum-glu

Produto de Condensação Direta

1	3,1	1,22	279, 514	867	579, 458, 289	Cianidina-(di)epicatequina-cat
1b	3,2	1,22	279, 514	781	619, 464, 373	Malvidina-3-glu-cat
11	12,1	1,53	280,481,529	927	619	Malvidina-3- <i>p</i> -coum-glu-cat

Produtos de Condensação Mediada por Acetaldeído

19	16,8	0,46	280, 468, 548	955	357	Malvidina-3- <i>p</i> -coum-glu-8-etil-cat
22	20,8	0,11	535	955	665, 357	Malvidina-3- <i>p</i> -coum-glu-8-etil-epicatequina

Compostos não identificados

2	4,1	0,46	279, 514	ND	ND	NI
8	9,1	0,16	278, 468, 535	653	635, 447, 509	NI
9	9,2	0,31	276, 481, 514	ND	ND	NI
10	10,5	0,43	279, 486, 604	ND	ND	NI
13	13,5	0,48	279, 481, 519	ND	ND	NI
14	13,8	0,40	279, 481, 538	ND	ND	NI
15	14,2	0,21	279, 529	ND	ND	NI

Medidas Colorimétricas e Capacidade Antioxidante

Conteúdo de Antocianinas Monoméricas Totais (mg/L)	59,08 ± 0,7
Conteúdo de Polifenóis Totais (mg/L)	6740,1 ± 212,5
Proantocianidinas (mg/L)	1744 ± 53,02
Valores de ORAC (mmol/L)	131,69 ± 5,43
Valores de FRAP (mmol/L)	49,37 ± 0,69

glu: glucosídeo; arab: arabinosídeo; cat: catequina; caf: cafeoil; ac: acetil; coum: coumaroil. ND: não detectado; NI: não identificado.

A importância de identificar os polifenóis presentes no extrato aquoso de resíduos da vinificação está relacionada com as futuras aplicações na indústria de alimentos ou farmacêutica, e os benefícios que a utilização de extratos ricos em compostos bioativos podem trazer. O teor de compostos fenólicos totais encontrado para o extrato aquoso do resíduo de uva foi cerca de 6740.1 ± 212.5 mg GAE/ L de extrato, muitas vezes superiores aos valores descritos na literatura para vinhos. FANZONE et al. (2010), por exemplo em seu estudo de caracterização de polifenóis de vinhos de diferentes cultivares de uva da Argentina, relataram valores de 4203

± 412.8 mg GAE/ L para compostos fenólicos totais. Esses resultados evidenciam o teor elevado desses compostos que ainda permanecem nesses resíduos agroindustriais. Em nosso estudo, os valores encontrados para proantocianidinas foram cerca de 1744.6 ± 53.02 Eq Catequina/ L de extrato que são inferiores aos valores relatados por FANZONE et al. (2010) para vinhos (5013.0 ± 507.2 mg Eq Catequina/ L para proantocianidinas). As proantocianidinas são um grupo de polifenóis responsáveis por sabores amargos e adstringentes em muitos produtos alimentícios como o vinho, o chocolate, a cerveja. Quando em elevadas concentrações podem levar a rejeição de bebidas e alimentos que os contém. Porém em quantidades adequadas colaboram para o sabor característico desses alimentos e são consideradas ingredientes funcionais em muitos alimentos e bebidas devido aos seus efeitos positivos na saúde humana (WALLACE; GIUSTI, 2010).

As espécies reativas de oxigênio apresentam grande importância no envelhecimento celular e na patogênese de muitas doenças. Por isso, há muito tempo existe o interesse na avaliação da capacidade antioxidante em extratos e produtos ricos em compostos bioativos (PRIOR et al., 2003). Além disso, as medições são estratégias úteis para avaliar a eficácia dos métodos de extração, bem como fornecer a caracterização preliminar das amostras, antes mesmo de ensaios biológicos (ANTONIOLLI et al., 2015; FONTANA; ANTONIOLLI; BOTTINI, 2013). A escolha do método de ensaio costuma ser baseada na velocidade, simplicidade, facilidade de utilização e disponibilidade de instrumentação para execução dos ensaios. De uma forma geral, mais de um tipo de medição precisa ser realizado para levar em consideração os vários modos de ação antioxidante (KY; TEISSEDE, 2015). As avaliações podem estar relacionadas com a capacidade dos extratos de transferir diretamente o hidrogênio para o radical (como ocorre em DPPH ou ABTS), ou então a capacidade para doar elétrons ao radical Fe^{3+} (FRAP), e também na capacidade de atuar como concorrentes do radical peróxil (ensaio de ORAC) (KY; TEISSEDE, 2015; LINGUA et al., 2016). Sendo assim, neste trabalho, a avaliação da capacidade antioxidante foi determinada por dois métodos: ORAC e

FRAP. Os valores encontrados pelo ensaio de ORAC foram cerca de 131.69 ± 5.43 mmol equivalentes de Trolox por L de extrato e são superiores aos resultados encontrados pelo método de FRAP (49.37 ± 0.69 mmol equivalentes de Trolox por L de extrato). Conforme reportado na literatura, não há uma padronização quanto ao tipo de teste utilizado e também são relatadas diferenças na expressão dos resultados e na escolha do antioxidante de referência (FONTANA; ANTONIOLLI; BOTTINI, 2013). Os valores de ORAC obtidos em nosso estudo são inferiores aos relatados por ANTONIOLLI et al. (2015), que apresentou 275.6 ± 109 mmol ET, mas ainda assim, indicam boa capacidade antioxidante. RODRIGUEZ LANZI et al. (2016) utilizaram extrato do bagaço de uvas *Malbec* (valores de ORAC 244.5 ± 32.4 mmol ET) para suplementar a dieta de ratos com síndrome metabólica, adicionando à ração a dose de 300 mg/kg/dia. Os resultados mostraram redução parcial na pressão arterial sistólica, nos triglicérides e que o consumo do extrato foi capaz de prevenir a resistência à insulina. Além dos efeitos biológicos apresentados, o estudo ressalta a importância da utilização de resíduos da vinificação na indústria alimentar/saúde humana, devido a elevada quantidade de compostos bioativos.

4 CONCLUSÃO

Neste estudo, foi comprovado o efeito favorável da aplicação de energia de micro-ondas durante a extração aquosa de antocianinas de bagaço de vinificação de uvas *Malbec* cv. Dentro das faixas estudadas, a condição de máximo foi estabelecida e representou um aumento significativo (28,37 %) no rendimento de extração quando comparado ao método tradicional sem micro-ondas. Sendo assim, a utilização de energia de micro-ondas viabiliza extração de antocianinas do bagaço de uva. Principalmente porque evita o uso de solventes orgânicos, tem curto tempo de extração e é seguro por utilizar um acidificante naturalmente presente em frutas. Além disso, a solução final possui elevada concentração de polifenóis com boa atividade

antioxidante e grande potencial para aplicação na indústria de alimentos ou farmacêutica para a produção de ingredientes alimentares ou nutracêuticos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADJÉ, F. et al. Optimization of anthocyanin , flavonol and phenolic acid extractions from *Delonix regia* tree flowers using ultrasound-assisted water extraction. **Industrial Crops and Products**, v. 32, p. 439–444, 2010.

AHAMD, A. et al. Therapeutic Potential of Flavonoids and Their Mechanism of Action against Microbial and Viral Infections-A Review. **Food Research International**, v. 77, p. 221–235, 2015.

ALUPULUI, A.; CĂLINESCU, I.; LAVRIC, V. Microwave extraction of active principles from medicinal plants. **Universitatea Politehnica din Bucuresti - Scientific Bulletin**, v. 74, n. 2, p. 129–142, 2012.

ÁLVAREZ, A. et al. **Yield vs selectivity in grape pomace polyphenol microwave extraction** 3rd Global Congress on Microwave Energy Applications. **Anais...**2016

AMIOT, M. J.; RIVA, C.; VINET, A. Effects of dietary polyphenols on metabolic syndrome features in humans : a systematic review. **Obesity Reviews**, v. 17, p. 573–586, 2016.

ANTONIOLLI, A. et al. Characterization of polyphenols and evaluation of antioxidant capacity in grape pomace of the cv. Malbec. **Food Chemistry**, v. 178, p. 172–178, 2015.

AZOFEIFA, G. et al. Hypoglycaemic, hypolipidaemic and antioxidant effects of blackberry beverage consumption in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Functional Foods**, v. 26, p. 330–337, 2016.

B. PERTUZATTI, P. et al. Quantification of Several Bioactive Compounds and Antioxidant

Activities of Six Cultivars of Brazilian Blueberry. **The Natural Products Journal**, v. 2, n. 3, p. 188–195, 2012.

BARBA, F. J. et al. Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 49, p. 96–109, 2016.

BARCIA, M. T. **Study oh phenolic compounds and antioxidant capacity of by-products from winemaking process**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2014.

BARCIA, M. T. et al. Effect of drying methods on the phenolic content and antioxidant capacity of Brazilian winemaking byproducts and their stability over storage. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 66, n. 8, p. 895–903, 2015.

BEAULIEU, J. C. et al. Volatile, anthocyanidin, quality and sensory changes in rabbiteye blueberry from whole fruit through pilot plant juice processing. **J Sci Food Agric**, n. May, 2016.

BENZIE, I. F. F.; SZETO, Y. T. Total Antioxidant Capacity of Teas by the Ferric Reducing / Antioxidant Power Assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 633–636, 1999.

BERLI, F. et al. Phenolic composition in grape (*Vitis vinifera* L. cv. Malbec) ripened with different solar UV-B radiation levels by capillary zone electrophoresis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 9, p. 2892–2898, 2008.

BIAN, Y. et al. Patterns of simple sequence repeats in cultivated blueberries (*Vaccinium* section *Cyanococcus* spp.) and their use in revealing genetic diversity and population structure. **Molecular Breeding**, p. 675–689, 2014.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. Canadian Journal of. **The national research council of Canada**, v. 37, n. 8, 1959.

BOCHI, V. C. **CHEMICAL CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF CEYLON GOOSEBERRY (DOVYALIS HEBECARPA) IN DIFFERENT RIPPENING STAGES.** [s.l: s.n.].

BOCHI, V. C. et al. Polyphenol extraction optimisation from Ceylon gooseberry (*Dovyalis hebecarpa*) pulp. **Food Chemistry**, v. 164, n. 2014, p. 347–354, 2014.

BOCHI, V. C.; GODOY, H. T.; GIUSTI, M. M. Anthocyanin and other phenolic compounds in Ceylon gooseberry (*Dovyalis hebecarpa*) fruits. **Food chemistry**, v. 176, p. 234–43, 2015.

BOHN, T. Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. **Nutrition Reviews**, v. 72, n. 7, p. 429–452, 2014.

BOLEA, C. et al. Thermal degradation kinetics of bioactive compounds from black rice fl our (*Oryza sativa* L .) extracts. **Journal of Cereal Science**, v. 71, p. 160–166, 2016.

BOUSSENNNA, A. et al. Polyphenol-rich grape pomace extracts protect against dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 4, p. 1260–1268, 2016a.

BOUSSENNNA, A. et al. Dietary Supplementation with a Low Dose of Polyphenol-Rich Grape Pomace Extract Prevents Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in Rats. **J Med Food**, v. 0, n. 0, p. 1–4, 2016b.

BRAZELTON, C. **World Blueberry Acreage & Production.** [s.l: s.n.].

BRENES, A. et al. Use of polyphenol-rich grape by-products in monogastric nutrition. A review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 211, p. 1–17, 2016.

BUNEA, A. et al. Anthocyanin determination in blueberry extracts from various cultivars and their antiproliferative and apoptotic properties in B16-F10 metastatic murine melanoma cells. **Phytochemistry**, v. 95, p. 436–444, 2013.

CACACE, J. E.; MAZZA, G. Extraction of Anthocyanins and Other Phenolics from Black Currants with Sulfured Water. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 1, p. 5939–5946, 2002.

CAI, Z. et al. Conventional, ultrasound-assisted, and accelerated-solvent extractions of anthocyanins from purple sweet potatoes. **Food Chemistry**, v. 197, p. 266–272, 2016.

CAMINITI, I. M. et al. Impact of selected combinations of non-thermal processing technologies on the quality of an apple and cranberry juice blend. **Food Chemistry**, v. 124, n. 4, p. 1387–1392, 2011.

CASAS, L. et al. Extraction of resveratrol from the pomace of Palomino fino grapes by supercritical carbon dioxide. **Journal of Food Engineering**, v. 96, n. 2, p. 304–308, 2010.

CHEMAT, F. et al. Solvent-free extraction of food and natural products. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 157–168, 2015.

CHEMAT, F.; VIAN, M. A.; CRAVOTTO, G. Green extraction of natural products: Concept and principles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 7, p. 8615–8627, 2012.

DAGLIA, M. et al. Antibacterial activity of red and white wine against oral streptococci. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 13, p. 5038–5042, 2007.

DAHMOUNE, F. et al. Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves. **FOOD CHEMISTRY**, v. 166, p. 585–595, 2015.

DENEV, P. et al. Solid-phase extraction of berries' anthocyanins and evaluation of their antioxidative properties. **Food Chemistry**, v. 123, n. 4, p. 1055–1061, 2010.

DIACONEASA, Z. et al. Antiproliferative and Antioxidant Properties of Anthocyanin Rich Extracts from Blueberry and Blackcurrant Juice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 2352–2365, 2015.

DORNAS, W. C. et al. Flavonoides: Potential terapeutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 28, n. 3, p. 241–249, 2007.

DURMAZ, E.; SUMNU, G.; SAHIN, S. Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Caper. **Separation Science and Technology**, v. 50, n. 13, p. 1986–1992, 2015.

EDIRISINGHE, I.; BURTON-FREEMAN, B. Anti-diabetic actions of Berry polyphenols – Review on proposed mechanisms of action. **Journal of Berry Research**, v. 6, p. 237–250, 2016.

EL DARRA, N. et al. Extraction of Polyphenols from Red Grape Pomace Assisted by Pulsed Ohmic Heating. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 5, p. 1281–1289, 2013.

ESPADA-BELLIDO, E. et al. Optimization of the ultrasound-assisted extraction of anthocyanins and total phenolic compounds in mulberry (*Morus nigra*) pulp. **Food Chemistry**, v. 219, p. 23–32, 2017.

FANZONE, M. et al. Phenolic characterization of Malbec wines from Mendoza province (Argentina). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 4, p. 2388–2397, 2010.

FANZONE, M. et al. Phenolic Composition of Malbec Grape Skins and Seeds from Valle de Uco (Mendoza , Argentina) during Ripening . Effect of Cluster Thinning. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 6120–6136, 2011.

FANZONE, M. et al. Phenolic characterisation of red wines from different grape varieties cultivated in Mendoza province (Argentina). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 3, p. 704–718, 2012.

FERNANDES, I. et al. Bioavailability of anthocyanins and derivatives. **Journal of Functional Foods**, v. 7, n. 1, p. 54–66, 2014.

FONTANA, A. R.; ANTONIOLLI, A.; BOTTINI, R. Grape pomace as a sustainable source of

bioactive compounds: Extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 38, p. 8987–9003, 2013.

GAROFULIC, I. E. et al. The effect of microwave assisted extraction on the isolation of anthocyanins and phenolic acids from sour cherry Marasca (*Prunus cerasus* var . Marasca). **Journal of Food Engineering**, v. 117, p. 437–442, 2013.

GAVRILOVA, V. et al. Separation, characterization and quantification of phenolic compounds in blueberries and red and black currants by HPLC-DAD-ESI-MSn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 8, p. 4009–4018, 2011.

GHOUILA, Z. et al. Antioxidant, antibacterial and cell toxicity effects of polyphenols from Ahmeur bouamer grape seed extracts. **Journal of Fundamental and Applied Sciences**, v. 9, n. 1, p. 392–410, 2017.

GIBIS, M.; RUEDT, C.; WEISS, J. In vitro release of grape-seed polyphenols encapsulated from uncoated and chitosan-coated liposomes. **Food Research International**, v. 88, p. 105–113, 2015.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV - Visible Spectroscopy Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, n. August 2001, p. 0–13, 2001.

GOLDMEYER, B. et al. Características físico-químicas e propriedades funcionais tecnológicas do bagaço de mirtilo fermentado e suas farinhas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 4, p. 980–987, 2014.

GOULA, A. M.; THYMIATIS, K.; KADERIDES, K. Valorization of grape pomace: Drying behavior and ultrasound extraction of phenolics. **Food and Bioproducts Processing**, v. 100, p. 132–144, 2016.

HE, J.; GIUSTI, M. M. Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 1, n. 1, p. 163–187, 2010.

HONG, N. et al. Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Caper. **Natural Product Letters**, v. 15, n. 3, p. 197–204, 2001.

HOWARD, L. R. et al. Improved stability of chokeberry juice anthocyanins by β -cyclodextrin addition and refrigeration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 3, p. 693–699, 2016.

JIANG, H. L.; YANG, J. L.; SHI, Y. P. Optimization of ultrasonic cell grinder extraction of anthocyanins from blueberry using response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 325–331, 2017.

JOSEPH, S. V et al. Fruit Polyphenols : A Review of Anti-inflammatory Effects in Humans
Fruit Polyphenols : A Review of Anti-inflammatory Effects in Humans. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, p. 419–444, 2016.

KAMMERER, D. et al. Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 14, p. 4360–4367, 2004.

KAMMERER, D.; CARLE, R. Quantification of anthocyanins in black carrot extracts (*Daucus carota* ssp . sativus var . atrorubens Alef .) and evaluation of their color properties. **European Food Research and Technology**, p. 479–486, 2004.

KAMONPATANA, K. et al. Susceptibility of anthocyanins to ex vivo degradation in human saliva. **FOOD CHEMISTRY**, v. 135, n. 2, p. 738–747, 2012.

KARABEGOVIĆ, I. T. et al. Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Cherry Laurel Fruit. **Separation Science and Technology**, v. 49, n. 3, p. 416–423, 2014.

KARASU, S. et al. Characterization of some bioactive compounds and physicochemical

- properties of grape varieties grown in Turkey : thermal degradation kinetics of anthocyanin. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 40, p. 177–185, 2016.
- KAULMANN, A.; BOHN, T. Bioactivity of Polyphenols: Preventive and Adjuvant Strategies toward Reducing Inflammatory Bowel Diseases - Promises, Perspectives, and Pitfalls. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, n. c, 2016.
- KAZAN, A. et al. Investigating anthocyanin contents and in vitro tumor suppression properties of blueberry extracts prepared by various processes. **European Food Research and Technology**, v. 242, n. 5, p. 693–701, 2016.
- KECHINSKI, C. P. et al. Degradation Kinetics of Anthocyanin in Blueberry Juice during Thermal Treatment. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 2, p. 173–176, 2010.
- KECHINSKI, C. P. **Estudo de diferentes formas de processamento do mirtilo visando à preservação dos compostos antociânicos**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.
- KHANAL, R. C. et al. Influence of extrusion processing on procyanidin composition and total anthocyanin contents of blueberry pomace. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 2, p. 52–58, 2009.
- KIRAKOSYAN, A. et al. Tissue bioavailability of anthocyanins from whole tart cherry in healthy rats. **Food chemistry**, v. 171, p. 26–31, 2015.
- KUNTZ, S. et al. Uptake and bioavailability of anthocyanins and phenolic acids from grape/blueberry juice and smoothie in vitro and in vivo. **British Journal of Nutrition**, p. 1–12, 2015.
- KY, I.; TEISSEDRE, P. L. Characterisation of Mediterranean grape pomace seed and skin extracts: Polyphenolic content and antioxidant activity. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 2190–2207, 2015.

- LEE, J.; WROLSTAD, R. E. Extraction of Anthocyanins and Polyphenolics from blueberry processing waste. **JFS C:Food Chemistry and Toxicology**, v. 69, n. 7, p. C564–C573, 2004.
- LI, D.-C.; JIANG, J.-G. Optimization of the microwave-assisted extraction conditions of tea polyphenols from green tea. **Informa Healthcare**, v. 61, n. 8, p. 837–845, 2010.
- LI, H. et al. Microwave-assisted extraction of phenolics with maximal antioxidant activities in tomatoes. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 928–936, 2012a.
- LI, X. et al. Copigmentation effects and thermal degradation kinetics of purple sweet potato anthocyanins with metal ions and sugars. **Applied Biological Chemistry**, v. 59, n. 1, p. 15–24, 2016.
- LI, Y. et al. Effect of energy density and citric acid concentration on anthocyanins yield and solution temperature of grape peel in microwave-Assisted extraction process. **Journal of Food Engineering**, v. 109, n. 2, p. 274–280, 2012b.
- LIAZID, A. et al. Microwave assisted extraction of anthocyanins from grape skins. **Food Chemistry**, v. 124, n. 3, p. 1238–1243, 2011.
- LINGUA, M. S. et al. From grape to wine: Changes in phenolic composition and its influence on antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 208, p. 228–238, 2016.
- LITVINOV, V. P. Chemistry and biological activities of 1,8-naphthyridines. **Russian Chemical Reviews**, v. 73, n. 7, p. 637–670, 2007.
- LIZARRAGA, D. et al. A Lyophilized Red Grape Pomace Containing Proanthocyanidin-Rich Dietary Fiber Induces Genetic and Metabolic Alterations in Colon Mucosa of Female C57BL / 6J Mice 1 – 3. **The Journal fo Nutrition**, v. 141, n. 9, p. 1597–1604, 2011.
- LOHACHOOMPOL, V. et al. Determination of anthocyanins in various cultivars of highbush and rabbiteye blueberries. **Food Chemistry**, v. 111, n. 1, p. 249–254, 2008.

LÓPEZ, J. A. F.- et al. Thermal Stability of Selected Natural Red Extracts Used as Food Colorants. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 68, p. 11–17, 2013.

LOYPIMAI, P.; MOONGNGARM, A.; CHOTTANOM, P. Thermal and pH degradation kinetics of anthocyanins in natural food colorant prepared from black rice bran. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, p. 461–470, 2016.

MAESTRE, R. et al. Incorporation and Interaction of Grape Seed Extract in Membranes and Relation with Efficacy in Muscle Foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 8365–8374, 2010.

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

MANSOORIAN, B. et al. Quantitative analysis of the flavonoid content of blueberry extracts by liquid chromatography – high resolution – mass spectrometry Proceedings of the Nutrition Society. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 75, p. 3148–3157, 2016.

MARÇO, P. H.; POPPI, R. J. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Novas**, v. 31, n. 5, p. 1218–1223, 2008.

MARTYNENKO, A.; CHEN, Y. Degradation kinetics of total anthocyanins and formation of polymeric color in blueberry hydrothermodynamic (HTD) processing. **Journal of Food Engineering**, v. 171, p. 44–51, 2016.

MASSAROTTO, G. et al. Chemical Characterization and Cytotoxic Activity of Blueberry Extracts (cv. Misty) Cultivated in Brazil. **Journal of Food Science**, v. 81, n. 8, p. H2076–H2084, 2016.

MCGHIE, T. K.; WALTON, M. C. The bioavailability and absorption of anthocyanins : Towards a better understanding. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 51, p. 702–713, 2007.

MELLO, L. M. R. Vitivinicultura brasileira: panorama 2015. **Comunicada Técnico 191 - EMBRAPA UVA e VINHO**, p. 1–7, 2016.

MICHALSKA, A.; ŁYSIAK, G. Bioactive compounds of blueberries: Post-harvest factors influencing the nutritional value of products. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 8, p. 18642–18663, 2015.

MOJZER, E. B. et al. Polyphenols: Extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects. **Molecules**, v. 21, n. 7, p. 1–38, 2016.

MONRAD, J. K. et al. Subcritical solvent extraction of anthocyanins from dried red grape pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 5, p. 2862–2868, 2010.

NICOUÉ, E. É.; SAVARD, S.; BELKACEMI, K. Anthocyanins in wild blueberries of Quebec: Extraction and identification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 14, p. 5626–5635, 2007.

NIXDORF, S. L.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Brazilian red wines made from the hybrid grape cultivar Isabel: phenolic composition and antioxidant capacity. **Analytica chimica acta**, v. 659, n. 1–2, p. 208–15, fev. 2010.

OEY, I. et al. Effect of high- pressure processing on colour , texture and flavour of fruit- and vegetable-based food products : a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, p. 320–328, 2008.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4619–4626, 2001.

PAINI, M. et al. Influence of ethanol / water ratio in ultrasound and high-pressure / high-temperature phenolic compound extraction from agri-food waste. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 51, p. 349–358, 2016.

PASCUAL-TERESA, S. DE; SANCHEZ-BALLESTA, M. T. Anthocyanins: from plant to health. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, n. 2, p. 281–299, 2008.

PATRAS, A. et al. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods ; mechanisms and kinetics of degradation. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 1, p. 3–11, 2010.

PAZOS, M. et al. Structure - Activity Relationships of Polyphenols To Prevent Lipid Oxidation in Pelagic Fish Muscle. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 11067–11074, 2010.

PEREIRA, P. et al. Supercritical fluid extraction vs conventional extraction of myrtle leaves and berries: Comparison of antioxidant activity and identification of bioactive compounds. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 113, p. 1–9, 2016.

PERTUZATTI, P. B. **Compostos bioativos em diferentes cultivares de mirtilo (vaccinium ashei Reade)**. [s.l.] Universidade Federal de Pelotas, 2009.

PERTUZATTI, P. B. et al. Antioxidant activity of hydrophilic and lipophilic extracts of Brazilian blueberries. **Food Chemistry**, v. 164, p. 81–88, 2014.

PERTUZATTI, P. B. et al. Antimicrobial activity and differentiation of anthocyanin profiles of rabbiteye and highbush blueberries using HPLC – DAD – ESI-MS n and multivariate analysis. **Journal of Functional Foods**, v. 26, p. 506–516, 2016.

PETERSSON, E. V. et al. Pressurized Hot Water Extraction of anthocyanins from red onion : A study on extraction and degradation rates. **Analytica Chimica Acta**, n. April 2014, p. 27–32, 2010.

PLAZA, M.; TURNER, C. Trends in Analytical Chemistry Pressurized hot water extraction of bioactives. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 39–54, 2015.

POJER, E. et al. The Case for Anthocyanin Consumption to Promote Human Health: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 5, p. 483–508, 2013.

POZO-BAYON, M. A. et al. Occurrence of pyranoanthocyanins in sparkling wines manufactured with red grape varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 5, p. 1300–1306, 2004.

PRIOR, R. L. et al. Antioxidant Capacity As Influenced by Total Phenolic and Anthocyanin Content , Maturity , and Variety of Vaccinium Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 98, p. 2686–2693, 1998.

PRIOR, R. L. et al. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 11, p. 3273–3279, 2003.

PROTAS, J. F. DA S. A dinâmica evolutiva da vitivinicultura brasileira. **Revista de Política Agrícola**, n. 1, p. 47–54, 2016.

RASEIRA, M. DO C. B.; ANTUNES, L. E. C. **A cultura do mirtilo**. [s.l.: s.n.].

REBELLO, G. et al. Flour of banana (Musa AAA) peel as a source of antioxidant phenolic compounds. **Food Research International**, v. 55, p. 397–403, 2014.

RENTZSCH, M.; SCHWARZ, M.; WINTERHALTER, P. Pyranoanthocyanins e an overview on structures , occurrence , and pathways of formation. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 1, p. 526–534, 2007.

REQUE, P. M. et al. Cold storage of blueberry (Vaccinium spp .) fruits and juice : Anthocyanin stability and antioxidant activity. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 33, p. 111–116, 2014.

REYES, L. F.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Degradation kinetics and colour of anthocyanins in aqueous extracts of purple- and red-flesh potatoes (Solanum tuberosum L .). **Food Chemistry**, v. 100, p. 885–894, 2007.

ROBY, G.; MATTHEWS, M. A. Relative proportions of seed, skin and flesh, in ripe berries

from Cabernet Sauvignon grapevines grown in a vineyard either well irrigated or under water deficit. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 10, n. 1, p. 74–82, mar. 2008.

ROCHA, F. I. G. DA. **Avaliação da cor e da atividade antioxidante da polpa e extrato de mirtilo (Vaccinium myrtillus) em pó**. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2009.

RODRIGUEZ-SAONA, L. E.; WROLSTAD, R. E. Extraction , Isolation , and Purification of. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, p. F1.1.1, 2001.

RODRIGUEZ LANZI, C. et al. Grape pomace and grape pomace extract improve insulin signaling in high-fat-fructose fed rat-induced metabolic syndrome. **Food & function**, v. 7, n. 3, p. 1544–1553, 2016.

ROSSI, M. et al. Effect of fruit blanching on phenolics and radical scavenging activity of highbush blueberry juice. **Food Research International**, v. 36, n. 9–10, p. 999–1005, 2003.

RUBERTO, G. et al. Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. **Food Chemistry**, v. 100, n. 1, p. 203–210, 2007.

RUIZ, A. et al. Anthocyanin profiles in south Patagonian wild berries by HPLC-DAD-ESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 706–713, 2013.

SADILOVA, E.; CARLE, R.; STINTZING, F. C. Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and in vitro antioxidant capacity. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 51, p. 1461–1471, 2007.

SAGDIC, O.; OZTURK, I.; KISI, O. Modeling antimicrobial effect of different grape pomace and extracts on *S . aureus* and *E . coli* in vegetable soup using artificial neural network and fuzzy logic system. **Expert Systems With Applications**, v. 39, n. 8, p. 6792–6798, 2012.

SAHPAZIDOU, D. et al. Anticarcinogenic activity of polyphenolic extracts from grape stems against breast, colon, renal and thyroid cancer cells. **Toxicology Letters**, v. 230, n. 2, p. 218–224, 2014.

SAID, K. A. M.; AMIN, M. A. M. Overview on the Response Surface Methodology (RSM) in Extraction Processes. **Journal of Applied Science & Process Engineering**, v. 2, n. 1, p. 8–17, 2015.

SAIKIA, S.; MAHNOT, N. K.; MAHANTA, C. L. Optimisation of phenolic extraction from Averrhoa carambola pomace by response surface methodology and its microencapsulation by spray and freeze drying. **Food Chemistry**, v. 171, p. 144–152, 2015.

SÁNCHEZ-TENA, S. et al. Grape antioxidant dietary fiber inhibits intestinal polyposis in Apc Min / + mice : relation to cell cycle and immune response. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 8, p. 1881–1888, 2013.

ŠARIĆ, B. et al. Valorisation of raspberry and blueberry pomace through the formulation of value-added gluten-free cookies. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 2, p. 1140–1150, 2016.

SEBASTIAN, R. S. et al. A new database facilitates characterization of flavonoid intake, sources, and positive associations with diet quality among US adults. **Journal of Nutrition**, v. 145, n. 6, p. 1239–1248, 2015.

SEERAM, N. P. et al. Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 1415–1422, 2008.

SESSA, M. et al. Bioavailability of encapsulated resveratrol into nanoemulsion-based delivery systems. **Food Chemistry**, v. 147, p. 42–50, 2014.

SHERIDAN, M. K.; ELIAS, R. J. Exogenous acetaldehyde as a tool for modulating wine color and astringency during fermentation. **Food Chemistry**, v. 177, p. 17–22, 2015.

SILVA, N. L. et al. Kinetic and thermodynamic analysis of anthocyanin thermal degradation in acerola (*Malpighia emarginata* D. C.) pulp. **Journal off Food Processing and Preservation**,

v. 0, p. 1–7, 2009.

SILVA, L. C. DA et al. Níveis de produção em vinhedos de altitude da cv. Malbec e seus efeitos sobre os compostos fenólicos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 3, p. 675–680, 2008.

SIMSEK, M.; SUMNU, G.; SAHIN, S. Microwave Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Sour Cherry Pomace. **Separation Science and Technology**, v. 47, n. 8, p. 1248–1254, 2012.

SINELA, A. et al. Anthocyanins degradation during storage of Hibiscus sabdariffa extract and evolution of its degradation products. **Food Chemistry**, v. 214, p. 234–241, 2017.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of Total Phenolics With Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **Am. J. Enol. Vitic.**, v. 16, p. 144–158, 1965.

STRIK, B. C.; YARBOROUGH, D. Blueberry production trends in North America, 1992 to 2003, and predictions for growth. **HortTechnology**, v. 15, n. 2, p. 391–398, 2005.

STRUCK, S. et al. Berry pomace - A review of processing and chemical analysis of its polyphenols. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 6, p. 1305–1318, 2016.

SUCUPIRA, N. R. et al. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, n. 4, p. 263–269, 2014.

SUI, X.; BARY, S.; ZHOU, W. Changes in the color , chemical stability and antioxidant capacity of thermally treated anthocyanin aqueous solution over storage. **Food Chemistry**, v. 192, p. 516–524, 2016.

TALMACIU, A. I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A Comparative Analysis of the “Green” Techniques Applied for Polyphenols Extraction from Bioresources. **Chemistry and Biodiversity**, v. 12, n. 11, p. 1635–1651, 2015.

TERCI, D.; ROSSI, A. V. INDICADORES NATURAIS DE pH: USAR PAPEL OU SOLUÇÃO? **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 684–688, 2002.

TSENG, A.; ZHAO, Y. Wine grape pomace as antioxidant dietary fibre for enhancing nutritional value and improving storability of yogurt and salad dressing. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 356–365, 2013.

TSUKUI, A.; REZENDE, C. M. Extração Assistida por Micro-ondas e Química Verde Microwave Assisted Extraction and Green Chemistry Extração Assistida por Micro-ondas e Química Verde. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 6, p. 1713–1725, 2014.

VERGARA-SALINAS, J. R. et al. Characterization of pressurized hot water extracts of grape pomace: Chemical and biological antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 171, p. 62–69, 2015.

VETRANI, C. et al. Metabolic transformations of dietary polyphenols: Comparison between in vitro colonic and hepatic models and in vivo urinary metabolites. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 33, p. 111–118, 2016.

WALLACE, T. C.; GIUSTI, M. M. Evaluation of parameters that affect the 4-dimethylaminocinnamaldehyde assay for flavanols and proanthocyanidins. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 7, p. 619–625, 2010.

WALLACE, T.; GIUSTI, M. Anthocyanins. **Advances in Nutrition an Internacional Review Journal**, v. 60, n. 11, p. 620–622, 2015.

WROLSTAD, R. E.; CULVER, C. A. Alternatives to Those Artificial FD&C Food Colorants. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 3, p. 59–77, 2012.

XAVIER, J. A. P. **Pomar Blueberry**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2015.

XUE, Z. et al. Effects of nonthermal preservation technologies on antioxidant activity of fruits and vegetables : A review. **Food Science and Technology International**, v. 22, n. 5, p. 440–

458, 2015.

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

YU, S. et al. Comparison of microwave assisted extraction with hot reflux extraction in acquirement and degradation of anthocyanin from powdered blueberry. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, v. 9, n. 6, p. 186–199, 2016.

ZARDO, I. **Extração e microencapsulação de compostos antociânicos do bagaço de mirtilo (Vaccinium corymbosum L .)**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014.

ZHENG, X. et al. Extraction characteristics and optimal parameters of anthocyanin from blueberry powder under microwave-assisted extraction conditions. **Separation and Purification Technology**, v. 104, p. 17–25, 2013.

4 DISCUSSÃO GERAL

Levando em consideração os riscos que os usos de solventes orgânicos podem trazer à saúde e visando seguir os princípios da “química verde”, os experimentos de extração foram realizados utilizando água acidificada com 1% de ácido cítrico, como solução extratora. O delineamento foi feito com a finalidade de estabelecer uma condição ideal para extração das antocianinas do bagaço do mirtilo e do resíduo de uva.

Para otimização da produção de extratos aquosos do bagaço de mirtilo, foram utilizadas como variáveis independentes o tempo de extração (de 5 a 60 minutos) e a temperatura (de 38 a 100 °C) como mostra o Artigo 1 – Tabela 1. E a modelagem de superfície de resposta (Artigo 1 – Figura 1) para avaliar o comportamento do conteúdo de antocianinas monoméricas totais determinadas pela metodologia de pH-diferencial, frente à diferentes condições de extração. A condição estabelecida como ótima (5 minutos, 100 °C) foi capaz de recuperar mais de 75% (Artigo 1 – Tabela 3) das antocianinas presentes no bagaço de mirtilo, quando comparada à metodologia que utiliza solventes orgânicos para extração exaustiva dos compostos da matriz (cerca de $171,7 \pm 0,7$ mg CYD-3-G/100 g bagaço e $225,4 \pm 9,1$ mg CYD-3-G/100 g bagaço, para condição otimizada e extração exaustiva, respectivamente).

O aumento da temperatura modifica as características da água, como a constante dielétrica, e aumenta sua difusividade, tornando-a semelhante a solventes como metanol e etanol, o que facilita a extração dos compostos de interesse. E também, em altas temperaturas ocorre maior decomposição do tecido da fruta, abrindo as células e aumentando o rendimento da extração das antocianinas. Os resultados encontrados em nosso estudo estão de acordo com os valores relatados por LEE; WROLSTAD (2004), que encontraram cerca de 188 mg CYD-3-G/100 g bagaço de mirtilo, utilizando metodologia exaustiva em seus experimentos de extração.

A literatura reporta a utilização de água como solvente extrator de compostos fenólicos, porém sempre associada a outros fatores que vão além da temperatura e do tempo de extração (CACACE; MAZZA, 2002; CHEMAT et al., 2015). São misturas de solventes orgânicos e água, aliados ao uso de tecnologias não convencionais, como por exemplo, o micro-ondas (MAE). Os resultados obtidos através da extração aquosa assistida por micro-ondas do bagaço de mirtilo (Artigo 1 – Tabela 3), foram inferiores aos apresentados pela metodologia exaustiva e pela condição otimizada em nosso estudo. Os teores de antocianinas obtidos por MAE foram cerca de 50% inferiores ao método otimizado, utilizando a condição de 525 W de potência

durante 3 minutos de extração. Ao aumentar a potência (700 W, 3 minutos), os resultados foram ainda menores. Uma das principais vantagens do uso do micro-ondas seria a diminuição do tempo de extração e consequentemente, redução do gasto energético. Porém, para a extração das antocianinas do bagaço de mirtilo a utilização de irradiação por micro-ondas não foi efetiva.

Os extratos obtidos pela metodologia otimizada foram caracterizados quanto à atividade antioxidante e as antocianinas presentes foram identificadas (Artigo 1 – Tabela 4 e Figura 3). Comparando com trabalhos encontrados na literatura, nosso extrato apresentou bons resultados pelo ensaio de ORAC (88.43 ± 12.83 mmol TE/ L extrato), cerca de 4 vezes mais que os valores relatados por AZOFEIFA et al. (2016) em seu estudo com ratos diabéticos, que mesmo com valores inferiores aos nossos (14.6 mmol/ L) obtiveram respostas positivas com a diminuição da glicemia, de triacilgliceróis e do colesterol.

A antocianina majoritária do extrato otimizado de bagaço de mirtilo foi a malvidina-3-galactosídeo, representando cerca de 19% do total. PERTUZATTI et al. (2016) também identificaram as antocianinas de diferentes cultivares de mirtilo e apresentaram resultados que corroboram com os nossos.

A combinação de elevada temperatura, curto tempo de extração e água acidificada com 1% de ácido cítrico como solução extratora, foi testada para a obtenção de extratos ricos em antocianinas a partir do resíduo da vinificação de uvas *Malbec*. No entanto, os resultados foram insatisfatórios. O bagaço de uva passa por um processo extrativo inicial, que é a vinificação, portanto, as antocianinas ainda presentes, estão fortemente ligadas à matriz e requerem metodologias mais efetivas que as convencionais para sua completa extração. Sendo assim, a tecnologia não convencional de irradiação por micro-ondas foi testada e os resultados obtidos foram melhores que os apresentados para o bagaço de mirtilo.

Testes preliminares indicaram bons resultados e serviram como base para o delineamento experimental para otimização da melhor condição de extração das antocianinas do resíduo da vinificação de uvas *Malbec*. A metodologia de superfície de resposta foi novamente utilizada para avaliar o comportamento das antocianinas em diferentes experimentos de extração, com as variáveis tempo de extração (2 a 15 minutos) e potência (350 a 700 W), como apresentado no Artigo 2 – Tabela 1. ANOVA revelou efeito significativo apenas do tempo de extração (Artigo 2 – Tabela 2), e a condição estabelecida como máxima foi a de 15 minutos e 700 W de potência. KARABEGOVIĆ et al. (2014) relataram comportamento semelhante em seu estudo utilizando MAE, em que o tempo de extração foi o fator significativo.

A extração assistida por micro-ondas das antocianinas do bagaço de uva foi capaz de recuperar cerca de 70% do total presente na matriz, quando comparada à metodologia exaustiva, que obteve 41.38 ± 5.49 mg CYD-3-G/100 g bagaço (Artigo 2 – Tabela 3). Uma metodologia convencional foi aplicada para testar se o rendimento da extração não seria resultado apenas da elevada temperatura, e os resultados obtidos foram inferiores aos apresentados pela condição otimizada (17.68 ± 1.42 mg CYD-3-G/100 g bagaço e 29.42 ± 0.45 mg CYD-3-G/100 g bagaço, para metodologia convencional e otimizada, respectivamente).

A utilização da irradiação de micro-ondas para extração de materiais vegetais resulta em aquecimento mais rápido. Durante a absorção das ondas eletromagnéticas, a energia de micro-ondas é convertida em energia cinética, permitindo o aquecimento seletivo das partes absorventes de micro-ondas do material vegetal. As células com volume aumentado explodem, liberando o seu conteúdo para a fase líquida. Quando a fase líquida absorve as micro-ondas, a energia cinética de suas moléculas aumenta e, conseqüentemente, a taxa de difusão também é aumentada, resultando em transferência de massa mais rápida (ALUPULUI; CĂLINESCU; LAVRIC, 2012).

A caracterização do extrato de antocianinas do bagaço de uva (Artigo 2 – Tabela 4) revelou elevado teor de compostos fenólicos totais (6740.1 ± 212.5 mg GAE/ L) e proantocianidinas (1744.6 ± 53.02 Eq Catequina/ L de extrato), o que conferiu ao extrato aquoso de resíduo da vinificação, elevada atividade antioxidante pelo ensaio de ORAC (131.69 ± 5.43 mmol TE por L de extrato). A antocianina identificada como majoritária foi a malvidina-3-p-coumaroil-glicosídeo, representando cerca de 42% da porcentagem relativa (Artigo 2 – Tabela 4 – Figura 2).

Diante dos resultados apresentados para os extratos aquosos de bagaço de mirtilo e de resíduo da vinificação de uvas *Malbec*, podemos concluir que a aplicação de irradiação por micro-ondas requer certos cuidados e, assim como outras metodologias de extração, apresenta limitações. Além dos vários fatores que podem influenciar na eficiência do processo extrativo (razão sólido-líquido; tipo de solvente; temperatura; tempo; potência), a matriz de estudo também interfere na MAE. Visto que, obtivemos resultados insatisfatórios para o bagaço de mirtilo, e positivos para a extração de antocianinas do resíduo de uva. Uma explicação para o baixo rendimento de MAE do bagaço de mirtilo é que a potência aplicada causou degradação dos compostos, ou a extração de impurezas presentes na amostra. Em geral, o rendimento da extração aumenta proporcionalmente com o aumento da potência de micro-ondas, até um limite. Dependendo da matriz em que são aplicadas as micro-ondas, a ruptura rápida da parede celular pode fazer com que impurezas sejam lixiviadas para o solvente extrator (TALMACIU; VOLFF;

POPA, 2015). Deve-se levar em consideração também, que o resíduo de vinificação da uva é uma matriz mais “resistente”, e apresenta características oriundas da fruta íntegra, possuindo cascas mais fortes e sementes maiores, quando comparadas ao mirtilo, que é uma fruta mais sensível. Esse fator, pode ter contribuído para os resultados positivos obtidos na extração das antocianinas do bagaço da uva. Além disso, vale ressaltar que a composição de antocianinas é bastante distinta entre as duas amostras. O extrato aquoso de mirtilo foi composto exclusivamente de antocianinas glicosiladas que apresentam maior polaridade e solubilidade em meio aquoso que derivados acilados ou complexados com outros flavonoides. Já o extrato aquoso de resíduo de vinificação era majoritariamente composto de uma antocianina acilada (42,6% de Malvidina-3-p-coum-glc (*Trans*)) e pequenas quantidades de alguns compostos formados pela complexação direta com outros polifenóis e com produtos da fermentação. Esses pigmentos possuem diferentes características químicas que seus derivados unicamente glicosilados. Esse fato também pode ter contribuído para necessidade de utilização de energia de microondas (700 W, 15 minutos). Na extração de pigmentos antociânicos de bagaço de uva Malbec. Enquanto que somente o aquecimento em curtos intervalos de tempo (100°C, 5 minutos) foi eficiente para o bagaço de mirtilo.

Sendo assim, diante dos resultados apresentados nesse estudo, pode-se dizer que os extratos aquosos ricos em antocianinas obtidos a partir do bagaço do mirtilo, por metodologia convencional, e do resíduo de vinificação de uvas *Malbec* por MAE, seguem os princípios da “química verde”. Visto que, requerem curto período de tempo de extração, não utilizam solventes orgânicos no processo e dão destino sustentável aos resíduos do processamento de frutas. Podendo ser considerados boas alternativas como ingredientes nutracêuticos para aplicação na indústria de alimentos ou farmacêutica.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A extração aquosa acidificada (1% de ácido cítrico) das antocianinas do bagaço de mirtilo e do resíduo de vinificação de uvas *Malbec* foi avaliada e condições para máximos de rendimentos fixados. As condições ótimas para o mirtilo foram 5 minutos à 100°C sob agitação unicamente. Já para o bagaço de uva *Malbec*, a irradiação por micro-ondas durante 15 minutos (700 W) foi essencial para que o rendimento de extração fosse aumentado para valores semelhantes aos obtidos com o bagaço de mirtilo em método de extração convencional sob aquecimento. Em ambos os processos, particularidades da amostra e a composição de pigmentos parecem determinar eficiência ou não de um processo assistido por irradiação de micro-ondas.

Sendo assim, as metodologias foram desenvolvidas sem a utilização de solventes orgânicos, utilizando somente aditivos químicos reconhecidamente seguros e aplicando tecnologias convencionais e não convencionais em curtos espaços de tempo. Por essa razão, os métodos de extração otimizados além de apresentarem elevados teores de polifenóis e boa atividade antioxidante, são obtidos a partir de processos rápidos e passíveis de reprodução em larga escala.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADJÉ, F. et al. Optimization of anthocyanin , flavonol and phenolic acid extractions from *Delonix regia* tree flowers using ultrasound-assisted water extraction. **Industrial Crops and Products**, v. 32, p. 439–444, 2010.

AHAMD, A. et al. Therapeutic Potential of Flavonoids and Their Mechanism of Action against Microbial and Viral Infections-A Review. **Food Research International**, v. 77, p. 221–235, 2015.

ALUPULUI, A.; CĂLINESCU, I.; LAVRIC, V. Microwave extraction of active principles from medicinal plants. **Universitatea Politehnica din Bucuresti - Scientific Bulletin**, v. 74, n. 2, p. 129–142, 2012.

ÁLVAREZ, A. et al. Yield vs selectivity in grape pomace polyphenol microwave extraction. **3º Global Congress on Microwave Energy Applications**. Anais...2016

AMIOT, M. J.; RIVA, C.; VINET, A. Effects of dietary polyphenols on metabolic syndrome features in humans : a systematic review. **Obesity Reviews**, v. 17, p. 573–586, 2016.

ANCILLOTTI, C. et al. Liquid chromatographic / electrospray ionization quadrupole / time of flight tandem mass spectrometric study of polyphenolic composition of different *Vaccinium* berry species and their comparative evaluation. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2016.

ANTONIOLLI, A. et al. Characterization of polyphenols and evaluation of antioxidant capacity in grape pomace of the cv. Malbec. **Food Chemistry**, v. 178, p. 172–178, 2015.

AZOFEIFA, G. et al. Hypoglycaemic, hypolipidaemic and antioxidant effects of blackberry beverage consumption in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Functional Foods**, v. 26, p. 330–337, 2016.

B. PERTUZATTI, P. et al. Quantification of Several Bioactive Compounds and Antioxidant Activities of Six Cultivars of Brazilian Blueberry. **The Natural Products Journale**, v. 2, n. 3, p. 188–195, 2012.

BARBA, F. J. et al. Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 49, p. 96–109, 2016.

BARCIA, M. T. et al. Effect of drying methods on the phenolic content and antioxidant capacity of Brazilian winemaking byproducts and their stability over storage. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 66, n. 8, p. 895–903, 2015.

BARCIA, M. T. **Study oh phenolic compounds and antioxidant capacity of by-products from winemaking process**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2014.

BERLI, F. et al. Phenolic composition in grape (*Vitis vinifera* L. cv. Malbec) ripened with different solar UV-B radiation levels by capillary zone electrophoresis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 9, p. 2892–2898, 2008.

BIAN, Y. et al. Patterns of simple sequence repeats in cultivated blueberries (*Vaccinium* section *Cyanococcus* spp.) and their use in revealing genetic diversity and population structure. **Molecular Breeding**, p. 675–689, 2014.

BOCHI, V. C. **Chemical characterization and biological activity of Ceylon gooseberry (*Dovyalis hebecarpa*) in different ripening stages**. [s.l: s.n.]. Universidade Estadual de Campinas, 2014.

BOCHI, V. C. et al. Polyphenol extraction optimisation from Ceylon gooseberry (*Dovyalis hebecarpa*) pulp. **Food Chemistry**, v. 164, n. 2014, p. 347–354, 2014.

BOHN, T. Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. **Nutrition Reviews**, v. 72, n. 7, p. 429–452, 2014.

BOLEA, C. et al. Thermal degradation kinetics of bioactive compounds from black rice flour (*Oryza sativa* L.) extracts. **Journal of Cereal Science**, v. 71, p. 160–166, 2016.

BOUSSENNNA, A. et al. Polyphenol-rich grape pomace extracts protect against dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 4, p. 1260–1268, 2016a.

BOUSSENNNA, A. et al. Dietary Supplementation with a Low Dose of Polyphenol-Rich Grape Pomace Extract Prevents Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in Rats. **J Medical Food**, v. 0, n. 0, p. 1–4, 2016b.

BRENES, A. et al. Use of polyphenol-rich grape by-products in monogastric nutrition. A review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 211, p. 1–17, 2016.

BRENES, A. et al. Use of polyphenol-rich grape by-products in monogastric nutrition. A review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 211, p. 1–17, 2016.

BUNEA, A. et al. Anthocyanin determination in blueberry extracts from various cultivars and their antiproliferative and apoptotic properties in B16-F10 metastatic murine melanoma cells. **Phytochemistry**, v. 95, p. 436–444, 2013.

CACACE, J. E.; MAZZA, G. Extraction of Anthocyanins and Other Phenolics from Black Currants with Sulfured Water. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 1, p. 5939–5946, 2002.

CAI, Z. et al. Conventional, ultrasound-assisted, and accelerated-solvent extractions of anthocyanins from purple sweet potatoes. **Food Chemistry**, v. 197, p. 266–272, 2016.

CAMINITI, I. M. et al. Impact of selected combinations of non-thermal processing technologies on the quality of an apple and cranberry juice blend. **Food Chemistry**, v. 124, n. 4, p. 1387–1392, 2011.

CHEMAT, F. et al. Solvent-free extraction of food and natural products. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 157–168, 2015.

DAGLIA, M. et al. Antibacterial activity of red and white wine against oral streptococci. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 13, p. 5038–5042, 2007.

DIACONEASA, Z. et al. Antiproliferative and Antioxidant Properties of Anthocyanin Rich Extracts from Blueberry and Blackcurrant Juice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 2352–2365, 2015.

DORNAS, W. C. et al. Flavonoides: Potential terapeutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 28, n. 3, p. 241–249, 2007.

DURMAZ, E.; SUMNU, G.; SAHIN, S. Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Caper. **Separation Science and Technology**, v. 50, n. 13, p. 1986–1992, 2015.

EDIRISINGHE, I.; BURTON-FREEMAN, B. Anti-diabetic actions of Berry polyphenols – Review on proposed mechanisms of action. **Journal of Berry Research**, v. 6, p. 237–250, 2016.

EMATER-RS. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Governo do Estado do Rio Grande do Sul, 2014. Disponível em: <http://www.emater.tche.br/>

ESPITIA, P. J. P. et al. Physical and Antibacterial Properties of Açai Edible Films Formulated with Thyme Essential Oil and Apple Skin Polyphenols. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 5, p. M903-910, 2014.

FANZONE, M. et al. Phenolic characterisation of red wines from different grape varieties cultivated in Mendoza province (Argentina). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 3, p. 704–718, 2012.

FANZONE, M. et al. Phenolic characterization of Malbec wines from Mendoza province (Argentina). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 4, p. 2388–2397, 2010.

FANZONE, M. et al. Phenolic Composition of Malbec Grape Skins and Seeds from Valle de Uco (Mendoza , Argentina) during Ripening . Effect of Cluster Thinning. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 6120–6136, 2011.

FERREIRA, V. et al. Identification of *Vitis vinifera* L . grape berry skin color mutants and polyphenolic profile. **Food Chemistry**, v. 194, p. 117–127, 2016.

FONTANA, A. R.; ANTONIOLLI, A.; BOTTINI, R. Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: Extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 38, p. 8987–9003, 2013.

GAROFULIC, I. E. et al. The effect of microwave assisted extraction on the isolation of anthocyanins and phenolic acids from sour cherry Marasca (*Prunus cerasus* var . Marasca). **Journal of Food Engineering**, v. 117, p. 437–442, 2013.

GAVRILOVA, V. et al. Separation, characterization and quantification of phenolic compounds in blueberries and red and black currants by HPLC-DAD-ESI-MSn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 8, p. 4009–4018, 2011.

GHOUILA, Z. et al. Antioxidant, antibacterial and cell toxicity effects of polyphenols from Ahmeur bouamer grape seed extracts. **Journal of Fundamental and Applied Sciences**, v. 9, n. 1, p. 392–410, 2017.

GIBIS, M.; RUEDT, C.; WEISS, J. In vitro release of grape-seed polyphenols encapsulated from uncoated and chitosan-coated liposomes. **Food Research International**, v. 88, p. 105–113, 2015.

GOLDMEYER, B. et al. Características físico-químicas e propriedades funcionais tecnológicas do bagaço de mirtilo fermentado e suas farinhas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 4, p. 980–987, 2014.

HAN, J. et al. Effect of polyphenolic ingredients on physical characteristics of cheese. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 494–497, 2011.

HE, J.; GIUSTI, M. M. Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 1, n. 1, p. 163–187, 2010.

JOSEPH, S. V et al. Fruit Polyphenols : A Review of Anti-inflammatory Effects in Humans
Fruit Polyphenols : A Review of Anti-inflammatory Effects in Humans. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, p. 419–444, 2016.

KAMMERER, D. et al. Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (Vitis vinifera L.) by HPLC-DAD-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 14, p. 4360–4367, 2004.

KAMMERER, D.; CARLE, R. Quantification of anthocyanins in black carrot extracts (Daucus carota ssp. sativus var. atrorubens Alef.) and evaluation of their color properties. **European Food Research and Technology**, p. 479–486, 2004.

KAMONPATANA, K. et al. Susceptibility of anthocyanins to ex vivo degradation in human saliva. **Food Chemistry**, v. 135, n. 2, p. 738–747, 2012.

KARABEGOVIĆ, I. T. et al. Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Cherry Laurel Fruit. **Separation Science and Technology**, v. 49, n. 3, p. 416–423, 2014.

KARASU, S. et al. Characterization of some bioactive compounds and physicochemical properties of grape varieties grown in Turkey : thermal degradation kinetics of anthocyanin. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 40, p. 177–185, 2016.

KAULMANN, A.; BOHN, T. Bioactivity of Polyphenols: Preventive and Adjuvant Strategies toward Reducing Inflammatory Bowel Diseases - Promises, Perspectives, and Pitfalls. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, n. c, 2016.

KECHINSKI, C. P. et al. Degradation Kinetics of Anthocyanin in Blueberry Juice during Thermal Treatment. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 2, p. 173–176, 2010.

KHANAL, R. C. et al. Influence of extrusion processing on procyanidin composition and total anthocyanin contents of blueberry pomace. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 2, p. 52–58, 2009.

KIRAKOSYAN, A. et al. Tissue bioavailability of anthocyanins from whole tart cherry in healthy rats. **Food Chemistry**, v. 171, p. 26–31, 2015.

KUNTZ, S. et al. Uptake and bioavailability of anthocyanins and phenolic acids from grape/blueberry juice and smoothie in vitro and in vivo. **British Journal of Nutrition**, p. 1–12, 2015.

- KY, I.; TEISSEDRE, P. L. Characterisation of Mediterranean grape pomace seed and skin extracts: Polyphenolic content and antioxidant activity. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 2190–2207, 2015.
- LEE, J.; WROLSTAD, R. E. Extraction of Anthocyanins and Polyphenolics from blueberry processing waste. **JFS C:Food Chemistry and Toxicology**, v. 69, n. 7, p. C564–C573, 2004.
- LI, X. et al. Copigmentation effects and thermal degradation kinetics of purple sweet potato anthocyanins with metal ions and sugars. **Applied Biological Chemistry**, v. 59, n. 1, p. 15–24, 2016.
- LI, Y. et al. Effect of energy density and citric acid concentration on anthocyanins yield and solution temperature of grape peel in microwave-Assisted extraction process. **Journal of Food Engineering**, v. 109, n. 2, p. 274–280, 2012.
- LITVINOV, V. P. Chemistry and biological activities of 1,8-naphthyridines. **Russian Chemical Reviews**, v. 73, n. 7, p. 637–670, 2007.
- LIZARRAGA, D. et al. A Lyophilized Red Grape Pomace Containing Proanthocyanidin-Rich Dietary Fiber Induces Genetic and Metabolic Alterations in Colon Mucosa of Female C57BL / 6J Mice 1 – 3. **The Journal of Nutrition**, v. 141, n. 9, p. 1597–1604, 2011.
- LOHACHOOMPOL, V. et al. Determination of anthocyanins in various cultivars of highbush and rabbiteye blueberries. **Food Chemistry**, v. 111, n. 1, p. 249–254, 2008.
- LÓPEZ-GUTIÉRREZ, N. et al. Determination of polyphenols in grape-based nutraceutical products using high resolution mass spectrometry. **LWT - Food Science and Technology**, v. 71, p. 249–259, 2016.
- LOYPIMAI, P.; MOONGNGARM, A.; CHOTTANOM, P. Thermal and pH degradation kinetics of anthocyanins in natural food colorant prepared from black rice bran. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, p. 461–470, 2016.
- MAESTRE, R. et al. Incorporation and Interaction of Grape Seed Extract in Membranes and Relation with Efficacy in Muscle Foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 8365–8374, 2010.
- MAIER, T. et al. Residues of grape (*Vitis vinifera* L .) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v. 112, p. 551–559, 2009.

MANSOORIAN, B. et al. Quantitative analysis of the flavonoid content of blueberry extracts by liquid chromatography – high resolution – mass spectrometry Proceedings of the Nutrition Society. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 75, p. 3148–3157, 2016.

MARÇO, P. H.; POPPI, R. J. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1218–1223, 2008.

MARTYNENKO, A.; CHEN, Y. Degradation kinetics of total anthocyanins and formation of polymeric color in blueberry hydrothermodynamic (HTD) processing. **Journal of Food Engineering**, v. 171, p. 44–51, 2016.

MASSAROTTO, G. et al. Chemical Characterization and Cytotoxic Activity of Blueberry Extracts (cv. Misty) Cultivated in Brazil. **Journal of Food Science**, v. 81, n. 8, p. H2076–H2084, 2016.

MCGHIE, T. K.; WALTON, M. C. The bioavailability and absorption of anthocyanins: Towards a better understanding. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 51, p. 702–713, 2007.

MELLO, L. M. R. **Viticultura brasileira: panorama 2015**. Comunicada Técnico 191 - EMBRAPA UVA e VINHO, p. 1–7, 2016.

MIJOWSKA, K.; OCHMIAN, I.; OSZMIANSKI, J. Impact of Cluster Zone Leaf Removal on Grapes cv. Regent Polyphenol Content by the UPLC-PDA/MS Method. **Molecules**, v. 21, p. 2–13, 2016.

MONRAD, J. K. et al. Subcritical solvent extraction of anthocyanins from dried red grape pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 5, p. 2862–2868, 2010.

NICOUÉ, E. É.; SAVARD, S.; BELKACEMI, K. Anthocyanins in wild blueberries of Quebec: Extraction and identification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 14, p. 5626–5635, 2007.

NIXDORF, S. L.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Brazilian red wines made from the hybrid grape cultivar Isabel: phenolic composition and antioxidant capacity. **Analytica Chimica Acta**, v. 659, n. 1–2, p. 208–15, fev. 2010.

OEY, I. et al. Effect of high- pressure processing on colour, texture and flavour of fruit- and vegetable-based food products: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, p. 320–328, 2008.

PAINI, M. et al. Influence of ethanol / water ratio in ultrasound and high-pressure / high-temperature phenolic compound extraction from agri-food waste. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 51, p. 349–358, 2016.

PASCUAL-TERESA, S. DE; SANCHEZ-BALLESTA, M. T. Anthocyanins: from plant to health. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, n. 2, p. 281–299, 2008.

PATRAS, A. et al. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods ; mechanisms and kinetics of degradation. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 1, p. 3–11, 2010.

PAZOS, M. et al. Structure - Activity Relationships of Polyphenols To Prevent Lipid Oxidation in Pelagic Fish Muscle. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 11067–11074, 2010.

PEREIRA, P. et al. Supercritical fluid extraction vs conventional extraction of myrtle leaves and berries: Comparison of antioxidant activity and identification of bioactive compounds. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 113, p. 1–9, 2016.

PERTUZATTI, P. B. **Compostos bioativos em diferentes cultivares de mirtilo (vaccinium ashei Reade)**. [s.l.] Universidade Federal de Pelotas, 2009.

PERTUZATTI, P. B. et al. Antimicrobial activity and differentiation of anthocyanin profiles of rabbiteye and highbush blueberries using HPLC – DAD – ESI-MS n and multivariate analysis. **Journal of Functional Foods**, v. 26, p. 506–516, 2016.

PERTUZATTI, P. B. et al. Antioxidant activity of hydrophilic and lipophilic extracts of Brazilian blueberries. **Food Chemistry**, v. 164, p. 81–88, 2014.

PINGRET, D. et al. Lab and pilot-scale ultrasound-assisted water extraction of polyphenols from apple pomace. **Journal of Food Engineering**, v. 111, n. 1, p. 73–81, 2012.

PLAZA, M.; TURNER, C. Pressurized hot water extraction of bioactives. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 39–54, 2015.

POJER, E. et al. The Case for Anthocyanin Consumption to Promote Human Health: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 5, p. 483–508, 2013.

PROTAS, J. F. DA S. A dinâmica evolutiva da vitivinicultura brasileira. **Revista de Política Agrícola**, n. 1, p. 47–54, 2016.

RASEIRA, M. DO C. B.; ANTUNES, L. E. C. **A cultura do mirtilo**. [s.l.: s.n.].

- RENTZSCH, M.; SCHWARZ, M.; WINTERHALTER, P. Pyranoanthocyanins e an overview on structures , occurrence , and pathways of formation. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 1, p. 526–534, 2007.
- REQUE, P. M. et al. Cold storage of blueberry (*Vaccinium spp.*) fruits and juice : Anthocyanin stability and antioxidant activity. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 33, p. 111–116, 2014.
- REYES, L. F.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Degradation kinetics and colour of anthocyanins in aqueous extracts of purple- and red-flesh potatoes (*Solanum tuberosum L.*). **Food Chemistry**, v. 100, p. 885–894, 2007.
- ROBY, G.; MATTHEWS, M. A. Relative proportions of seed, skin and flesh, in ripe berries from Cabernet Sauvignon grapevines grown in a vineyard either well irrigated or under water deficit. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 10, n. 1, p. 74–82, mar. 2008.
- ROCHA, F. I. G. DA. **Avaliação da cor e da atividade antioxidante da polpa e extrato de mirtilo (*Vaccinium myrtillus*) em pó.** [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2009.
- RUIZ, A. et al. Anthocyanin profiles in south Patagonian wild berries by HPLC-DAD-ESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 706–713, 2013.
- SADILOVA, E.; CARLE, R.; STINTZING, F. C. Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and in vitro antioxidant capacity. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 51, p. 1461–1471, 2007.
- SAGDIC, O.; OZTURK, I.; KISI, O. Modeling antimicrobial effect of different grape pomace and extracts on *S. aureus* and *E. coli* in vegetable soup using artificial neural network and fuzzy logic system. **Expert Systems With Applications**, v. 39, n. 8, p. 6792–6798, 2012.
- SAIKIA, S.; MAHNOT, N. K.; MAHANTA, C. L. Optimisation of phenolic extraction from *Averrhoa carambola* pomace by response surface methodology and its microencapsulation by spray and freeze drying. **Food Chemistry**, v. 171, p. 144–152, 2015.
- SÁNCHEZ-TENA, S. et al. Grape antioxidant dietary fiber inhibits intestinal polyposis in *Apc Min / +* mice : relation to cell cycle and immune response. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 8, p. 1881–1888, 2013.
- ŠARIĆ, B. et al. Valorisation of raspberry and blueberry pomace through the formulation of value-added gluten-free cookies. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 2, p. 1140–1150, 2016.

- SEBASTIAN, R. S. et al. A new database facilitates characterization of flavonoid intake, sources, and positive associations with diet quality among US adults. **Journal of Nutrition**, v. 145, n. 6, p. 1239–1248, 2015.
- SESSA, M. et al. Bioavailability of encapsulated resveratrol into nanoemulsion-based delivery systems. **Food Chemistry**, v. 147, p. 42–50, 2014.
- SILVA, L. C. DA et al. Níveis de produção em vinhedos de altitude da cv. Malbec e seus efeitos sobre os compostos fenólicos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 3, p. 675–680, 2008.
- SILVA, N. L. et al. Kinetic and thermodynamic analysis of anthocyanin thermal degradation in acerola (*Malpighia emarginata* D. C.) pulp. **Journal off Food Processing and Preservation**, v. 0, p. 1–7, 2009.
- SINELA, A. et al. Anthocyanins degradation during storage of Hibiscus sabdariffa extract and evolution of its degradation products. **Food Chemistry**, v. 214, p. 234–241, 2017.
- STRUCK, S. et al. Berry pomace - A review of processing and chemical analysis of its polyphenols. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 6, p. 1305–1318, 2016.
- SUCUPIRA, N. R. et al. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, n. 4, p. 263–269, 2014.
- SUI, X.; BARY, S.; ZHOU, W. Changes in the color , chemical stability and antioxidant capacity of thermally treated anthocyanin aqueous solution over storage. **Food Chemistry**, v. 192, p. 516–524, 2016.
- TALMACIU, A. I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A Comparative Analysis of the “Green” Techniques Applied for Polyphenols Extraction from Bioresources. **Chemistry and Biodiversity**, v. 12, n. 11, p. 1635–1651, 2015.
- TEISSEDRE, P. Grape Polyphenols’ Effects in Human Cardiovascular Diseases and Diabetes. **Molecules**, v. 22, p. 1–19, 2017.
- TERCI, D.; ROSSI, A. V. INDICADORES NATURAIS DE pH: USAR PAPEL OU SOLUÇÃO? **Quimica Nova**, v. 25, n. 4, p. 684–688, 2002.
- TSENG, A.; ZHAO, Y. Wine grape pomace as antioxidant dietary fibre for enhancing nutritional value and improving storability of yogurt and salad dressing. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 356–365, 2013.

TSUKUI, A.; REZENDE, C. M. Extração Assistida por Micro-ondas e Química Verde Microwave Assisted Extraction and Green Chemistry Extração Assistida por Micro-ondas e Química Verde. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 6, p. 1713–1725, 2014.

VERGARA-SALINAS, J. R. et al. Characterization of pressurized hot water extracts of grape pomace: Chemical and biological antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 171, p. 62–69, 2015.

WALLACE, T.; GIUSTI, M. Anthocyanins. **Advances in Nutrition an Internacional Review Journal**, v. 60, n. 11, p. 620–622, 2015.

WANG, Y. et al. Comparison of polyphenol , anthocyanin and antioxidant capacity in four varieties of *Lonicera caerulea* berry extracts. **Food Chemistry**, v. 197, p. 522–529, 2016.

WROLSTAD, R. E.; CULVER, C. A. Alternatives to Those Artificial FD&C Food Colorants. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 3, p. 59–77, 2012.

XAVIER, J. A. P. **Pomar Blueberry**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2015.

XUE, Z. et al. Effects of nonthermal preservation technologies on antioxidant activity of fruits and vegetables : A review. **Food Science and Technology International**, v. 22, n. 5, p. 440–458, 2015.

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

YU, S. et al. Comparison of microwave assisted extraction with hot reflux extraction in acquirement and degradation of anthocyanin from powdered blueberry. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering** v. 9, n. 6, p. 186-199, 2016.

ZARDO, I. **Extração e microencapsulação de compostos antociânicos do bagaço de mirtilo (Vaccinium corymbosum L .)**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014.

ZHAO, Y. et al. Retention of polyphenols in blueberries (*Vaccinium corymbosum*) after different cooking methods , using UHPLC – DAD – MS based metabolomics. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 56, p. 55–66, 2017.

ZHENG, X. et al. Extraction characteristics and optimal parameters of anthocyanin from blueberry powder under microwave-assisted extraction conditions. **Separation and Purification Technology**, v. 104, p. 17–25, 2013.

