



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
ENG07053 - TRABALHO DE DIPLOMAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA



Análise da eficiência da extração de compostos fenólicos assistida por ultrassom

Autor: Ana Cristina Bacarin Gobo

Orientador: Ligia Damasceno Ferreira Marczak

Co-orientador: Júlia Ribeiro Sarkis

Porto Alegre, 13 de janeiro de 2015

Sumário

Agradecimentos	iv
Resumo	v
Lista de Figuras	vi
Lista de Tabelas	vii
Lista de Equações	viii
Lista de Abreviaturas e Siglas	ix
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica e Fundamentos Teóricos	3
2.1. Bagaço de uva e suas características	3
2.2. Compostos Fenólicos e suas características	3
2.3. Princípios da extração	6
2.4. Princípios do ultrassom	7
3. Materiais e Métodos	10
3.1. Bagaço de Uva	10
3.2. Pré-Tratamento	11
3.3. Extração	12
3.4. Análises Laboratoriais	13
3.5. Análises Estatísticas	14
4. Resultados e Discussão	16
4.1. Pré-Operação	16
4.2. Antocianinas	18
4.3. Compostos Fenólicos	20
5. Conclusões e Sugestões para Trabalhos Futuros	24
6. Referências	26

Agradecimentos

Aos meus pais, Anagilda e Antônio, por terem me proporcionado a formação, a qual me possibilitou todas as experiências que tive, inclusive a elaboração deste trabalho. Agradeço também por todo incentivo e participação em cada etapa do meu desenvolvimento.

Ao meu irmão, André, por estar sempre ao meu lado, ajudando nos momentos em que precisei e me incentivando a ser sempre melhor. Também, pela paciência em momentos decisivos da minha vida.

Aos meus amigos, que foram essenciais nos meses finais de elaboração deste trabalho e da minha graduação, pela paciência e encorajamento no momento mais importante da minha formação. Em especial aos meus amigos da faculdade, por trilharem, junto comigo, todos os passos da graduação, fazendo-a ser a melhor possível; às minhas amigas de Ijuí, pela amizade inabalável, pela paciência em momentos de ausência e pelo incentivo na escolha da minha profissão; e, aos meus amigos de Cork, que me proporcionaram experiências inesquecíveis e me deram força para enfrentar situações de mudança.

À professora doutora Ligia Damasceno Ferreira Marczak e à doutora Júlia Ribeiro Sarkis, pela orientação, ensinamentos passados, ajuda e paciência na elaboração deste trabalho.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo grande empenho na construção do 4º melhor curso de engenharia química do Brasil.

Resumo

Com o grande potencial dos resíduos provenientes do processo de produção do vinho, o bagaço de uva é largamente utilizado para a recuperação de compostos fenólicos e antocianinas e, conseqüente uso em indústrias de alimentos, cosméticos e fármacos. No presente trabalho, a aplicação de energia de pressão através da sonda de um ultrassom foi utilizada no bagaço de uva da espécie *Vitis vinifera* do cultivar Merlot para aumentar a eficiência de extração dos compostos anteriormente citados. Foi feita a comparação da aplicação de três diferentes intensidades de potência do ultrassom, 170, 340 e 510 W/cm², com dois outros métodos convencionais, a moagem do bagaço de uva antes da extração e, a não utilização de nenhum tratamento prévio à extração. A concentração de antocianinas foi feita utilizando o método do pH diferencial com leitura em espectrofotômetro, e, para a determinação da concentração de compostos fenólicos, foram utilizadas leituras de absorvância do espectrofotômetro e posterior ajuste com curva analítica para a concentração. Os resultados mostraram que não houve diferença estatística entre os métodos para a extração das antocianinas e uma considerável vantagem na utilização da moagem e de 510 W/cm² como intensidade de potência do ultrassom para a extração de compostos fenólicos. A moagem forneceu uma extração de 674,21 ± 61,5 mg GAE/100 g e, a intensidade de potência de 510 W/cm² aplicados pela sonda do ultrassom, forneceu um valor de 570,12 ± 12,2 mg GAE/100 g. Com base nos resultados, sugere-se para extração de compostos fenólicos do bagaço de uva a incorporação da moagem ou da aplicação do ultrassom com uma alta intensidade de potência.

Lista de Figuras

Figura 2.1 Estruturas básicas de a) ácidos benzoicos, que é um tipo de ácido fenólico; b) Flavonóides; c) Taninos condensados, sendo n o número de subunidades.	4
Figura 2.2 Formas estruturais das antocianinas predominantes em cada valor de pH.....	5
Figura 2.3 Curvas cinéticas da extração de compostos fenólicos do bagaço de uva a diferentes temperaturas. (o) 60 °C, (x) 50 °C, (Δ) 40 °C, (◇) 30 °C e (□) 20 °C.	7
Figura 2.4 Classificação das ondas de acordo com a sua frequência.....	8
Figura 2.5 Diferentes tipos de ultrassom a) Ultrassom tipo sonda; b) Ultrassom tipo banho	9
Figura 3.1 Bagaço de uva proveniente da Vinícola Salton.	10
Figura 3.2 Sistema do pré-tratamento com ultrassom	11
Figura 3.3 Sistema com banho termostático, agitador e célula encamisada onde ocorre a etapa de extração.	13
Figura 4.1 Comportamento das temperaturas da solução aquosa com o bagaço de uva com o tempo para as três intensidades de potência do ultrassom.	16
Figura 4.2 Curva analítica para leituras de absorbância de compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu	17
Figura 4.3 Gráfico da concentração de antocianinas de cada experimento pelo tempo ...	18
Figura 4.4 Gráfico da concentração de compostos fenólicos de cada experimento pelo tempo	20
Figura 4.5 Imagem feita por microscopia eletrônica do a) bagaço de uva fresco e b) bagaço de uva após aplicação de ultrassom.	22
Figura 4.6 Interior do moedor após o processo de moagem do bagaço de uva úmido	22

Lista de Tabelas

Tabela 4.1 Valores de concentração de antocianinas no tempo de 60 minutos de extração para cada experimento.....	19
Tabela 4.2 Valores de concentração de compostos fenólicos no tempo de 60 minutos de extração para cada experimento.....	21

Lista de Equações

(3.1).....	13
(3.2).....	13
(4.1).....	17

Lista de Abreviaturas e Siglas

A	Absorbância
C	Concentração (mg/L)
DF	Fator de diluição
GAE	Equivalentes de ácido gálico
MW	Massa molar (g/mol)
r	Raio (m)
t	Tempo (min)
ϵ	Absortividade Molar (L/cm.mol)

1. Introdução

A uva é uma das frutas que foi mais cedo domesticada pela humanidade, datada de 6.000 a 8.000 anos atrás, vêm sendo cultivada desde a antiguidade para consumo *in natura* e na forma de vinhos e sucos. Seu plantio se deu início com a variedade *Vitis sylvestris*, e, após alguns anos recebendo tratamento químico para o combate de doenças e sua propagação para outros climas, acabou resultando na modificação genética da espécie, originando a *Vitis vinífera*, hoje uma das espécies de uva mais cultivadas no mundo (Myles *et al.*, 2011).

A uva (*Vitis L.*) é uma fruta amplamente utilizada para o consumo humano, tanto em bebidas e alimentos quanto em suplementos e aditivos alimentares. O Brasil produz, em média, 1,4 milhões de toneladas de uva por ano (Dados da FAO - Food And Agriculture Organization Of The United Nations, 2004 a 2013 – www.faostat.fao.org, acesso em 20/11/14). Dessas, 0,544 milhões de toneladas são processadas no Rio Grande do Sul, sendo que deste processamento são produzidos aproximadamente 375 milhões de litros de vinho e outros derivados da uva, por ano (Dados do IBRAVIN – Instituto Brasileiro do Vinho, de 2004 a 2013 – www.ibravin.org.br, acesso em 20/11/14).

Com esse grande volume de processamento, a geração de resíduos torna-se um importante fator a ser considerado pelas indústrias; mais recentemente, outros destinos para esses resíduos que não apenas a alimentação animal passaram a ser buscados. Uma das rotas mais importantes é o aproveitamento dos compostos bioativos, principalmente compostos fenólicos, que atuam como antioxidantes (Fu *et al.*, 2011) e que estão presentes em grandes quantidades no bagaço da uva. (Sant’anna *et al.*, 2012)

Dentre os compostos fenólicos presentes no bagaço da uva, destacam-se as antocianinas, que representam um grupo de grande valor agregado; por possuírem uma coloração que varia de vermelho a azul, elas são um dos principais corantes naturais utilizados na indústria de alimentos. Nos dias de hoje a indústria alimentícia vem buscando diminuir a utilização de corantes sintéticos, substituindo-os por pigmentos naturais que, além de adicionarem cor, possuem benefícios à saúde, aumentando ainda mais o valor nutricional do alimento a que forem adicionados. (Downham e Collins, 2000)

Muitas pesquisas vêm sendo realizadas na recuperação de compostos fenólicos do bagaço de uva residual das empresas viníferas, com o intuito de tornar o processo mais eficiente. Estudos que buscam formas de melhorar o processo de extração, nos quais o tempo de extração, a temperatura e o solvente utilizados são avaliados para definir um ponto ótimo de operação, são cada vez mais frequentes. (Spigno, Tramelli e De Faveri, 2007) (Pinelo, Fabbro, *et al.*, 2005)

A utilização de um tratamento prévio à extração vem se mostrando muito eficiente quando se deseja aumentar o rendimento da extração. A comparação entre métodos, como feita por Corrales *et al.* (2008), em que três métodos recentes no ramo alimentício são testados e comparados na extração de antocianinas do bagaço de uva, é cada vez mais vista em publicações científicas, mostrando que a busca por um pré-tratamento é bastante relevante.

A aplicação do ultrassom é bastante citada, por ser um tratamento simples, seguro e economicamente acessível, porém, ainda são necessários estudos para aprimoramento da tecnologia. Dentro desse contexto, o presente trabalho objetiva testar meios de aplicação de ultrassom para extração de compostos fenólicos e de antocianinas do bagaço de uva, fazendo a comparação com métodos convencionais, com o intuito de obter resultados que auxiliem no desenvolvimento dessa tecnologia.

Cinco diferentes experimentos, sendo três envolvendo a tecnologia de ultrassom, foram usados no presente trabalho. Três diferentes intensidades de potência do ultrassom, que utilizam diferentes quantidades de energia, foram testadas para tentar otimizar esse parâmetro. O conteúdo de compostos fenólicos e de antocianinas foi comparado com os resultados de uma extração convencional, onde os compostos são extraídos pelo solvente sem nenhum tratamento prévio, e com uma extração em que o bagaço de uva foi moído, reduzindo o tamanho das partículas e, assim, aumentando sua área superficial.

A extração convencional e a moagem foram escolhidas para comparação porque são as tecnologias mais utilizadas atualmente em extração de compostos bioativos de alimentos. Por serem tecnologias mais desenvolvidas, e utilizadas há mais tempo, a garantia do retorno financeiro pelas indústrias é maior. Ao se propor a utilização de uma tecnologia emergente, no caso, o ultrassom, surge a necessidade de se investigar a extensão do ganho no rendimento da extração.

2. Revisão Bibliográfica e Fundamentos Teóricos

Este capítulo apresentará os principais conceitos, características e benefícios das matérias-primas e da tecnologia utilizados no presente trabalho. Ele está dividido em quatro seções, “Bagaço de uva e suas características”; “Compostos fenólicos e suas características”; “Princípios da extração”; e “Princípios do ultrassom”.

2.1. Bagaço de uva e suas características

A uva é uma fruta muito utilizada na produção de vinhos e sucos; os tipos de vinho dependem do tipo de uva utilizada para sua fabricação, a qual possui muitas variedades. A quantidade de compostos fenólicos presentes no grão da uva podem alterar o sabor do vinho, influenciando na adstringência, amargura, corpo e cor do vinho. No vinho branco, por exemplo, a presença de níveis elevados de compostos fenólicos é indesejável, uma vez que esses dão um sabor mais amargo ao líquido, podendo causar uma alteração de cor para o marrom quando exposto ao ar. Por isso, este tipo de vinho é feito processando-se o grão da uva sem casca e semente, diferentemente do vinho tinto, em que o grão é processado inteiro (Waterhouse, 2002).

No processamento da uva para produção de vinho, o bagaço de uva é gerado como resíduo. Esse bagaço, que corresponde à, aproximadamente, 20 % da uva em massa, contém, principalmente, cascas, sementes e engaço (Kammerer *et al.*, 2005). Cada parte desse bagaço é composta por diferentes substâncias; a casca é feita, basicamente, de polissacarídeos neutros, substâncias ácido pécticas e antocianinas (Lecas e Brillouet, 1994); as sementes são compostas por óleo e compostos fenólicos (Da Porto, Porretto e Decorti, 2013); por fim, o engaço, que é o talo do cacho de uva, possui compostos tânicos (Luque-Rodríguez, Luque De Castro e Pérez-Juan, 2007).

Por possuir substâncias nutricionais naturais, o bagaço de uva é um alimento que vem sendo bastante pesquisado, focando na extração de compostos fenólicos e antocianinas. Com a renovação da dieta alimentar da população mundial, componentes naturais são preferencialmente utilizados em formulações alimentares a componentes sintéticos; além de agregarem valor nutricional, esses componentes naturais bioativos, como as antocianinas, podem prevenir doenças e auxiliar para uma vida mais saudável. (Mishra, Dolan e Yang, 2008)

As antocianinas estão presentes nos vacúolos das células da casca da uva, em uma forma livre não complexada; por estarem no interior da célula, a parede e membrana celular - que são complexas e dinâmicas, compostas de polissacarídeos - são uma barreira para a sua extração. Por isso, para facilitar sua extração, essa parede deve ser quebrada, sendo que a resistência mecânica da parede celular a essa quebra depende da variedade da uva (Ortega-Regules *et al.*, 2006).

2.2. Compostos Fenólicos e suas características

Compostos fenólicos são compostos orgânicos que contêm anéis aromáticos com uma ou mais hidroxilas substituintes; possuem muitos benefícios relacionados à saúde humana, principalmente pela sua capacidade antioxidante e pelo auxílio na prevenção de

inflamações crônicas, doenças cardiovasculares, câncer e diabetes. Por isso, são utilizados como aditivos em produtos alimentícios, substituindo conservantes sintéticos (Waterhouse, 2002; Acosta-Estrada, Gutiérrez-Urbe e Serna-Saldívar, 2014).

Mais de 8000 polifenóis podem ser encontrados na natureza, estando presentes, principalmente, em frutas e vegetais. As frutas, geralmente, contêm mais compostos fenólicos do que os vegetais, sendo o principal, o grupo dos flavonoides (Kim e Lee, 2002).

Compostos fenólicos estão divididos em vários grupos, comportando uma grande quantidade de compostos, sendo os principais presentes na uva, os ácidos fenólicos, três classes de flavonoides (antocianinas vermelhas, flavonóis e favon-3-óis), proantocianidinas oligoméricas e taninos poliméricos condensados. A Figura 2.1 mostra as estruturas químicas mais comuns para alguns desses grupos de compostos fenólicos mais encontrados na uva (Waterhouse, 2002; Acosta-Estrada, Gutiérrez-Urbe e Serna-Saldívar, 2014).

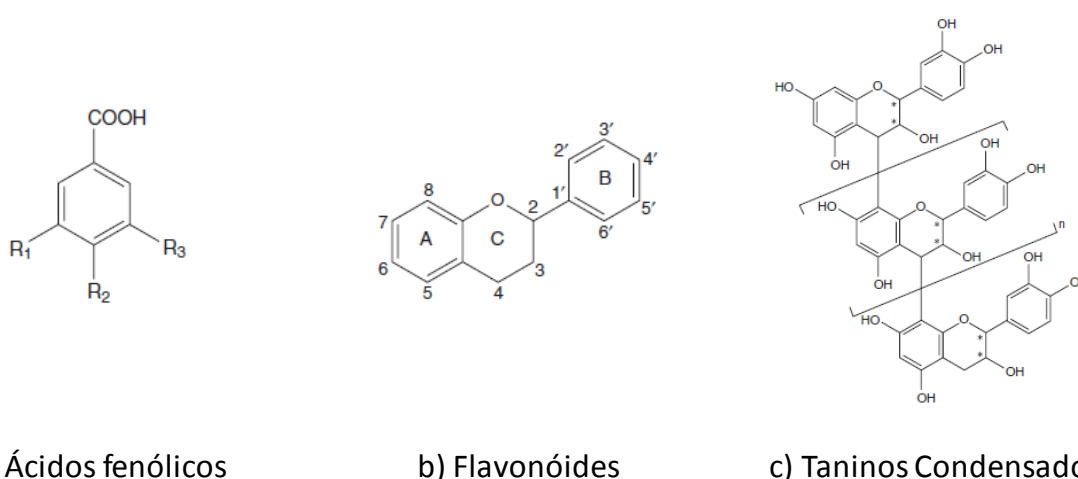


Figura 2.1 Estruturas básicas de a) ácidos benzoicos, que é um tipo de ácido fenólico; b) Flavonóides; c) Taninos condensados, sendo n o número de subunidades.

Fonte: (Kim e Lee, 2002)

No vinho, compostos fenólicos são importantes substâncias que determinam adstringência, amargura e outras características do sabor, assim como a sua cor, atribuída à quantidade de antocianinas presentes. A concentração de compostos fenólicos e antocianinas são parâmetros importantes a serem analisados, graças à sua ação antioxidante e capacidade de atribuir cor e sabor (Carrera *et al.*, 2012).

2.2.1. Antocianinas e suas características

Conforme comentado anteriormente, as antocianinas são compostos fenólicos do grupo dos flavonoides, responsáveis pela cor púrpura, azul, vermelha e laranja de algumas frutas e vegetais que a contém. Também, é o principal componente que dá a coloração ao vinho tinto e a outros derivados da uva, pois é um dos compostos fenólicos majoritários na fruta. Segundo Jackman, Yada e Tung (1987), as antocianinas estão presentes geralmente próximo às superfícies da uva e de frutas e vegetais em geral (Rodríguez-Saona e Wrolstad, 2002).

Além de conferir cor, as antocianinas também são substâncias antioxidantes e importantes indicadores de amadurecimento de frutas e vegetais frescos e processados. Por possuir essas características, antocianinas são largamente utilizadas em substituição a corantes e antioxidantes sintéticos na indústria alimentícia. Além de elas conferirem um maior valor nutricional ao produto, pelo seu benefício na redução de doenças coronárias do coração, aperfeiçoamento da acuidade visual e atividades anticancerígenas, acabam se tornando indicadores naturais nesses alimentos, tornando-se amarronzadas quando eles não estão mais frescos (Giusti e Wrolstad, 2001).

As antocianinas são compostos instáveis que acabam se degradando durante o processamento e armazenamento e, por isso, sua extração e análises devem ser feitas em condições específicas de pH, temperatura, luz, oxigênio, enzimas, íons metálicos, açúcares, e a presença de outros compostos fenólicos. Antocianinas são coloridas em valores muito baixos de pH, em torno de 1,0, e incolores em pH menos ácido, em torno de 4,5, azuis em pH neutro e são extremamente instáveis em valores de pH acima de 7,0. A Figura 2.2 mostra as estruturas das antocianinas mais presentes em cada valor de pH e sua coloração predominante.

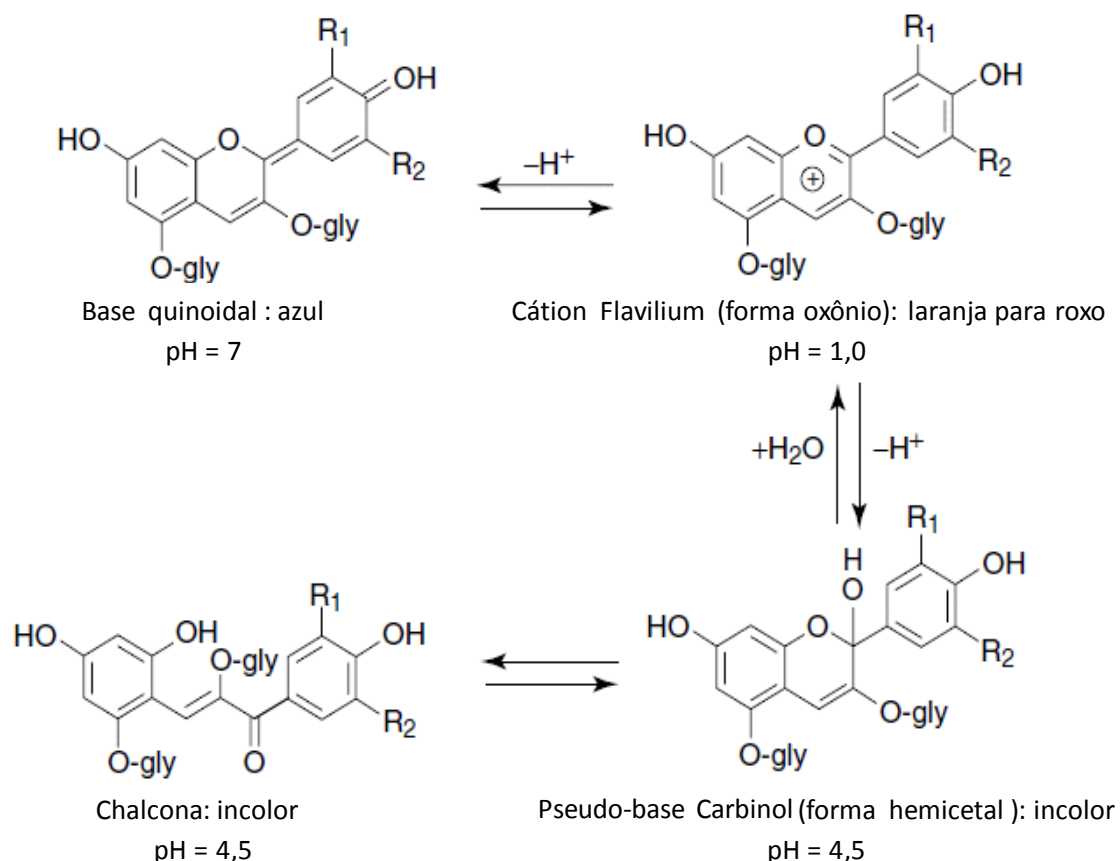


Figura 2.2 Formas estruturais das antocianinas predominantes em cada valor de pH.

Fonte: traduzido de (Giusti e Wrolstad, 2001)

As antocianinas mais presente em pH 7 são as da forma base quinoidal, e que apresentam uma coloração azul; as que possuem a forma de cátion flavílio, apresentam coloração roxa alaranjada em pH em torno de 1,0. Aquelas que têm a forma pseudo-base carbinol e chalcona, são incolores em pH 4,5. Essa característica facilita a análise das antocianinas por espectrofotometria. Sendo ela um composto fenólico, a sua

determinação deve ser diferente, em que apenas antocianinas sejam detectadas. Por possuir cor, e esta variar com o pH, foi desenvolvido o método de determinação do pH diferencial, em que a absorbância de uma amostra é comparada estando ela em pH 1,0 e 4,5. Esse foi o método utilizado neste trabalho e está descrito no item 3.4.1 (Giusti e Wrolstad, 2001; Castañeda-Ovando *et al.*, 2009; Nayak *et al.*, 2011).

A estrutura das antocianinas é formada por uma antocianidina na sua forma glicosídea, que é um anel aromático ligado a um anel heterocíclico, que contém oxigênio ligado a um carbono ligado a um terceiro anel aromático (Giusti e Wrolstad, 2001; Castañeda-Ovando *et al.*, 2009; Nayak *et al.*, 2011).

Além da variação de suas características com o pH, as antocianinas também sofrem mudanças com a temperatura, sendo sensíveis a temperaturas acima de 70 °C. A literatura relata perdas em sua pigmentação da ordem de 32 % a 77 °C, 53 % a 99 °C e 87 % a 121 °C (Sastry e Tischer, 1952; Mishra, Dolan e Yang, 2008).

2.3. Princípios da extração

No processamento de alimentos, a extração é um processo difusivo em que um ou mais componentes de uma substância biológica são transferidos para uma fase fluida, seguido de uma etapa de separação entre o soluto e o solvente. A maioria dos alimentos que são submetidos à extração é de origem vegetal, mas o processo é bastante semelhante quando se trata de alimentos de origem animal.

A extração na indústria de alimentos é um processo importante, pois aumenta a eficiência da recuperação de alguns compostos. Um exemplo é a extração do açúcar da cana-de-açúcar, que é, geralmente, feita por compressão, mas que apresenta uma eficiência maior quando realizada com água quente. Além disso, quando componentes voláteis estão presentes nas soluções, não é necessário grande aumento da temperatura (Lloyd e Van Wyk, 2012).

Processos extrativos podem ocorrer de diversas formas, sendo as principais a extração sólido-líquido e a extração líquido-líquido. O presente trabalho irá utilizar uma extração sólido-líquido, uma vez que o bagaço da uva está na forma sólida, e o solvente utilizado na forma líquida. A escolha desse solvente depende de diversos fatores e se torna importante quando esse pode ser o fator determinante da taxa de extração. Suas características químicas e sua estrutura, relacionadas à estrutura e composição do soluto natural, podem alterar completamente a forma como a extração é realizada (Pinelo, Sineiro e Núñez, 2006; Lloyd e Van Wyk, 2012).

O solvente de uma extração deve ser capaz de dissolver o soluto de interesse, sendo a seletividade um fator mais importante do que a solubilidade. Uma extração é considerada efetiva quando se consegue extrair da substância de alimentação apenas o que é de interesse, caso contrário, um novo processo de separação deve ser aplicado. Outro aspecto importante é que o solvente deve ser estável e que não reaja com as substâncias presentes na extração, para que não se obtenha produtos indesejáveis. Por fim, o solvente deve ser de fácil separação, tanto do refinado, quando solvente e soluto formam o extrato e apenas este é de interesse, quanto do soluto, após a separação extrato-refinado, a recuperação do soluto, que é o produto de valor agregado, precisa ser realizada com o máximo de eficiência. (Lloyd e Van Wyk, 2012)

Para extração de polifenóis do bagaço de uva, o etanol é largamente utilizado como solvente. Por conter uma molécula polar, ser um solvente barato e não tóxico, é preferível ao metanol, que possui eficiências similares de extração de compostos fenólicos. A água também pode ser utilizada, porém é um solvente que possui uma baixa seletividade, dificultando os processos posteriores à extração, além de fornecer concentrações mais baixas de extração do soluto quando comparada com o etanol. (Pinelo, Rubilar, *et al.*, 2005)

Com o intuito de exemplificar o efeito da temperatura no processo de extração de composto fenólicos do bagaço da uva, a Figura 2.3 mostra as curvas das cinéticas de extração obtidas por Sant'anna *et al.* (2012) que utilizaram bagaço de uva *Vitis labrusca* do cultivar Isabel. A extração de compostos fenólicos foi feita com uma solução de água e etanol como solvente. Pela análise da figura, observa-se claramente a relação direta da taxa de extração com a temperatura.

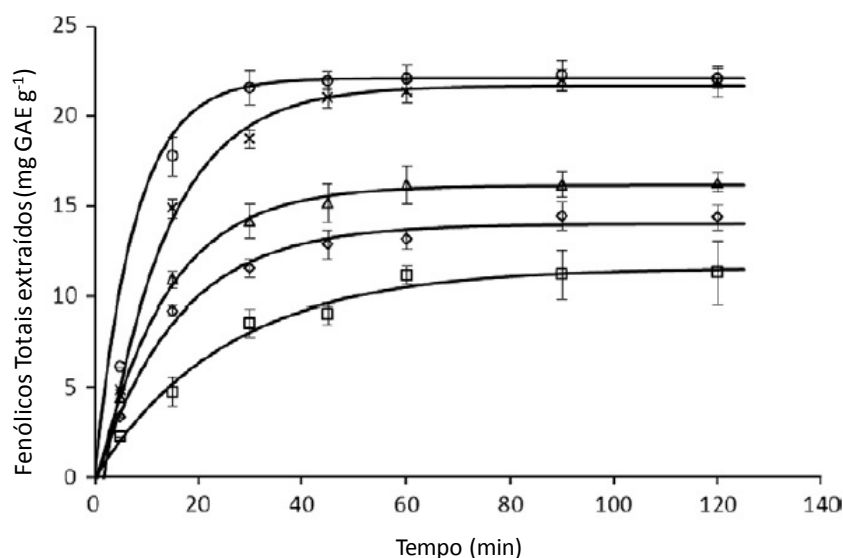


Figura 2.3 Curvas cinéticas da extração de compostos fenólicos do bagaço de uva a diferentes temperaturas. (o) 60 °C, (x) 50 °C, (Δ) 40 °C, (◇) 30 °C e (□) 20 °C.

Fonte: traduzido de (Sant'anna *et al.*, 2012)

2.4. Princípios do ultrassom

2.4.1. Definição

Ultrassons são ondas de pressão dispersas em um material, transmitindo energia. O nível de energia transmitida depende da intensidade do ultrassom, que está relacionada com a potência por unidade de área do transmissor. Por causa dessa transmissão, ultrassons são importantes meios de transporte de energia.

A intensidade de uma onda de ultrassom é um parâmetro importante para a quantidade de energia que será transmitida, assim como a sua frequência de oscilação. A **Erro! Fonte de referência não encontrada.** mostra os intervalos de frequência de uma onda, sendo que, quando uma onda possui frequência acima de 16 kHz, ela deixa de ser considerada um som e passa a ser chamada de ultrassom. Ultrassons podem ter

frequências de até 10^6 kHz, sendo frequentemente classificadas como ultrassom de alta e ultrassom de baixa frequência (Dolatowski e Stasiak, 2012).

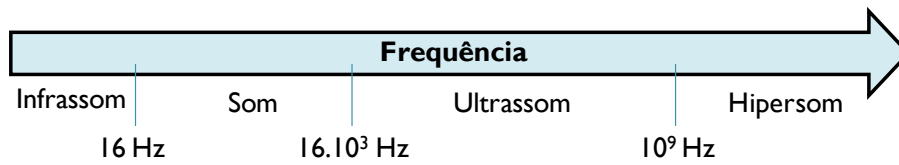


Figura 2.4 Classificação das ondas de acordo com a sua frequência

2.4.2. Aplicações

A utilização das ondas de ultrassom em substâncias biológicas é feita com combinações de frequência e intensidade. Normalmente, em análises de materiais em diagnósticos médicos são utilizadas ondas de alta frequência e baixa intensidade, entre 5 e 10 MHz e menores que 1 W/cm^2 ; para causar mudanças químicas e físicas nas substâncias, as ondas de ultrassom devem apresentar baixa frequência e alta intensidade, entre 20 e 100 kHz e entre 10 e 1000 W/cm^2 . No presente trabalho, será utilizada essa última faixa de ultrassons, uma vez que se objetiva causar um dano físico à célula do bagaço de uva de forma a acelerar o processo difusivo da extração (Hoover, 2000; Dolatowski e Stasiak, 2012).

Os efeitos que as ondas de ultrassom podem causar são diversos, o que aumenta a sua gama de utilização. Dentre os efeitos mecânicos pode-se citar a cavitação e a coagulação; os efeitos térmicos levam a um aumento da temperatura das substâncias processadas com ultrassom e os efeitos físico-químicos, como polimerização de compostos, têm impacto na taxa de reação e no aumento da ionização. Para a aplicação no presente trabalho, o efeito físico-químico e a cavitação são os efeitos de interesse (Dolatowski e Stasiak, 2012).

O efeito físico-químico aumenta a taxa de extração pelo rompimento das barreiras do líquido através da criação de microfluxos (Dolatowski e Stasiak, 2012).

A cavitação é um fenômeno que ocorre em líquidos quando bolhas de gás se formam no seu interior, pela criação de pequenos vácuos causados pela diferença de pressão que, depois, colapsam violentamente, provocando uma pequena vibração no fluido. Como ultrassons são ondas de pressão, existe a cavitação ultrassônica, que é a principal responsável pelos efeitos mecânicos dessa tecnologia. (Webster, 1963)

A tecnologia de ultrassom já possui aplicações em alimentos, onde se destacam os processos de extração, a cristalização, a salga e cura, a secagem e em processos de separação com membranas. O uso desta técnica na extração de compostos tem a vantagem de não necessitar a redução do tamanho da partícula para o aumento da superfície de contato, uma vez que a quebra da estrutura celular ocorre com a aplicação das ondas. Além disso, não é necessário o incremento de temperatura para aumentar a difusão, uma vez que o ultrassom já causa essa melhora difusiva (Dolatowski e Stasiak, 2012).

2.4.3. Tipos de ultrassom e suas utilizações

Existem basicamente dois tipos de equipamentos de ultrassom: a sonda e o banho. A Figura 2.5 mostra estes dois equipamentos e cada um deles é voltado para diferentes aplicações.

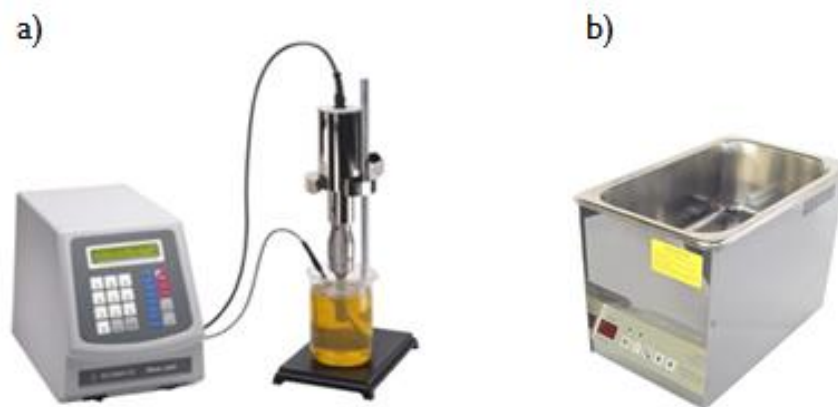


Figura 2.5 Diferentes tipos de ultrassom a) Ultrassom tipo sonda; b) Ultrassom tipo banho
Disponível em a) www.sonics.com b) www.ciencor.com.br

O ultrassom tipo banho é o mais utilizado, sendo que as ondas são emitidas pela parte de baixo e atingem a substância presente no interior do banho. Por ter um grande volume, e ser fixo, as ondas emitidas acabam tendo uma maior dispersão e, por isso, a densidade de potência emitida é baixa, limitando seu uso. Além disso, a área que pode sofrer corrosão pelas bolhas da cavitação é muito maior do que no equipamento com a sonda, tornando-se um problema quando altas intensidades de potência são requeridas. Portanto, equipamentos de ultrassom do tipo banho são, na maioria dos casos, utilizados para baixas e médias intensidades de potência.

O ultrassom tipo sonda, pelo contrário, possui uma menor área suscetível à corrosão e pode ser utilizado em recipientes de qualquer tamanho, podendo-se concentrar suas ondas em um volume menor. Isso possibilita o seu uso para aplicações que exigem alta intensidade de potência, que é o caso do presente trabalho. Esse tipo de equipamento possui apenas a desvantagem de sofrer um intenso aquecimento na face do emissor, aquecimento esse que deve ser controlado para se obter experimentos padronizados (Dolatowski e Stasiak, 2012).

Com relação às questões de segurança, o equipamento de ultrassom não apresenta grandes riscos. Uma vez que as interfaces líquido-ar e sólido-ar refletem as ondas emitidas pelo equipamento, praticamente nenhum resquício de ultrassom é dissipado para o ambiente. Além disso, a superfície do recipiente também bloqueia a passagem das ondas de ultrassom. Um perigo observado quando o equipamento é utilizado em grande escala é o alto ruído provocado pela cavitação ultrassônica, o que pode causar danos ao aparelho auditivo se não forem utilizados equipamentos de proteção adequados (Dolatowski e Stasiak, 2012).

3. Materiais e Métodos

Esse capítulo trata dos materiais e métodos utilizados para a elaboração do trabalho e está dividido em 5 partes; “Bagaço de Uva”, “Pré-tratamento”, “Extração”, “Análises Laboratoriais” e “Análises Estatísticas”. Optou-se por uma divisão uma vez que os experimentos foram feitos em etapas: 1) aplicação de um pré-tratamento ao bagaço da uva; 2) extração com solvente por 60 minutos; 3) análises de concentração de antocianinas e de compostos fenólicos para cada extração feita; e, por fim, 4) análise estatística e tratamento dos dados obtidos nas análises laboratoriais.

Foram realizados 5 diferentes experimentos, sendo três deles utilizando o ultrassom como pré-tratamento, um utilizando um moinho como pré-tratamento e, o último, sem a aplicação de ultrassom, utilizado como controle, sendo que todos os experimentos foram feitos em duplicata.

3.1. Bagaço de Uva

O bagaço de uva utilizado nesse trabalho provém da Vinícola Salton, localizada na cidade de Bento Gonçalves/RS, e corresponde ao cultivar Merlot (*Vitis vinífera*) da safra de 2014. O bagaço foi recolhido em fevereiro de 2014 e foi utilizado dióxido de enxofre para a sua conservação, além de armazenamento em local refrigerado, para posterior utilização. O teor de umidade do bagaço utilizado foi previamente determinada por gravimetria, no Laboratório de Tecnologia e Processos em Alimentos (LATEPA) da UFRGS, tendo sido obtido um valor de 56,27 % (m/m).

Foram feitas 10 extrações e em cada uma foram utilizadas 15 g de bagaço de uva que continha, principalmente, cascas e sementes, conforme está mostrado na Figura 3.1. As amostras foram pesadas aleatoriamente, não se selecionando quantidades específicas de casca ou de sementes para cada experimento.



Figura 3.1 Bagaço de uva proveniente da Vinícola Salton.

A balança utilizada para a pesagem do bagaço foi a balança analítica Shimadzu modelo AY220 (Kyoto, Japão).

3.2. Pré-Tratamento

Foram feitos tratamentos no bagaço de uva antes da extração de seus compostos bioativos, com o objetivo de aumentar a recuperação desses compostos. Este item discorre sobre como foram feitos esses pré-tratamentos.

3.2.1. Ultrassom

Um dos pré-tratamentos utilizados foi a aplicação do ultrassom. O equipamento de ultrassom utilizado foi o do tipo sonda (Sonics & Materials, Inc., modelo VCX750, Newtown, Estados Unidos). O bagaço foi submetido, por 15 minutos, a 20 kHz e a três diferentes intensidades de potência do ultrassom, 170, 340 e 510 W/cm², que correspondem a 30, 60 e 90 % da capacidade do equipamento, respectivamente.

A sonda do ultrassom foi submersa por aproximadamente 2,5 cm em 100 g de uma solução de água acidificada com 1 % (m/m) de ácido cítrico (Dinâmica Química Contemporânea LTDA, Diadema, Brasil), e 15 g do bagaço de uva, dentro de uma célula de vidro encamisada com altura de 9 cm e diâmetro de 5,5 cm, conforme mostra a Figura 3.2. A célula foi ainda posicionada sobre um agitador magnético (Fisatom Equipamentos Científicos Ltda, modelo 752A, São Paulo, Brasil) e agitada durante os 15 minutos.



Figura 3.2 Sistema do pré-tratamento com ultrassom

A temperatura de 30 °C foi controlada utilizando um banho termostático (Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, modelo Alpha RA 12, Lauda-Königshofen, Alemanha). Como as ondas de pressão do ultrassom causam um aquecimento da solução, foram feitos testes para determinar a temperatura da água na camisa da célula, para cada intensidade de potência utilizada. Os testes se resumiam em definir uma temperatura para o banho, aplicar o ultrassom na solução a ser utilizada nos experimentos, ao mesmo tempo em que a temperatura da solução era monitorada por um termômetro digital (Agilent, modelo 34972^a, Santa Clara, Estados Unidos). Quando a temperatura da água da camisa da célula conseguisse manter a temperatura da solução abaixo de 30 °C, durante os 15 minutos de aplicação do ultrassom, essa era definida como a temperatura do banho dos experimentos.

O sistema montado do ultrassom foi utilizado para os três experimentos onde o ultrassom foi aplicado e, ainda, para o experimento controle; neste caso, o equipamento de ultrassom permaneceu desligado, a fim de se excluir qualquer variação na etapa da extração e para que a comparação pudesse ser feita sob as mesmas condições.

3.2.2. Moedor

Para o pré-tratamento em que o bagaço da uva foi reduzido mecanicamente, foi utilizado um motor de moedor microfino (IKA-Werke GmbH & Co. KG, modelo MF 10 basic, Staufen, Alemanha) com um cabeçote de corte-moagem (IKA-Werke GmbH & Co. KG, modelo MF 10.1, Staufen, Alemanha) acoplado. O moedor ainda continha uma malha de 4 mesh (4,76 mm de abertura), que acompanha o motor, por onde a amostra passava após ser moída.

Foram moídas 50 g de bagaço de uva, durante um minuto, interrompendo-se uma vez para limpeza do moedor e recolocação do bagaço, aderido nas paredes, no moedor. Obteve-se, ao final, 26,9 g de bagaço de uva moído, resultando numa eficiência de 53,8 %. Nas extrações feitas com o bagaço de uva moído também foram utilizadas 15 g de bagaço, como descrito anteriormente.

O bagaço moído foi armazenado sob refrigeração e utilizado na extração, neste caso, sem qualquer outro pré-tratamento.

3.3. Extração

Após o pré-tratamento, o ultrassom foi desligado e o conteúdo da célula foi transferido para outra célula encamisada, com altura de 12 cm e diâmetro de 8 cm, com tampa de borracha, onde ocorria a etapa de extração. O bagaço da uva foi então submetido a 60 minutos de extração em 300g de uma solução aquosa com 50 % (v/v) de etanol (Anidrol Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, Brasil) e 1 % (m/m) de ácido cítrico, resultante da mistura dos 100 g da solução vinda do pré-tratamento com ultrassom, mais 200 g de uma solução aquosa 75 % etanol (v/v) com 1 % (m/m) de ácido cítrico. A solução teve sua temperatura controlada em 30 °C por um banho termostático (Lauda, modelo T, Lauda-Königshofen, Alemanha) e permaneceu sob agitação constante durante todo o processo (agitador Velp Scientifica, modelo ARE, Usmate, Itália). A Figura 3.3 mostra uma fotografia do sistema de extração utilizado.



Figura 3.3 Sistema com banho termostático, agitador e célula encamisada onde ocorre a etapa de extração.

Durante a extração foram retiradas alíquotas de aproximadamente 5 mL. As amostras foram coletadas nos tempos 0, 5, 10, 20, 30, 45 e 60 minutos e, depois, foram centrifugadas por 4 minutos a 13400 rpm em uma centrífuga (Eppendorf AG, modelo MiniSpin®, Hamburgo, Alemanha). Após a parte líquida ser separada dos sólidos centrifugados, o sobrenadante foi armazenado sob refrigeração, para posterior análise.

3.4. Análises Laboratoriais

Foram feitas duas análises das amostras, uma para determinação do teor de antocianinas e outra para determinação da concentração dos compostos fenólicos. As análises foram feitas para todos os tempos de coleta.

3.4.1. Concentração de Antocianinas

A determinação da concentração de antocianinas das amostras foi feita pelo método do pH diferencial (Giusti e Wrolstad, 2001). Esse método consiste na comparação do valor de absorvância medida em dois diferentes comprimentos de onda, um de referência e outro a 700 nm, e dois valores de pH, 1,0 e 4,5. A equação (3.1) demonstra o cálculo utilizado para determinação da absorvância final (A) da amostra.

$$A = (A_{Referência} - A_{700nm})_{pH 1} - (A_{Referência} - A_{700nm})_{pH 4,5} \quad (3.1)$$

O comprimento de onda utilizado como referência foi de 520 nm, pois é o comprimento de onda em que a antocianina majoritária do bagaço de uva, a cianidina-3-glucosídeo, possui o maior valor de absorvância.

Obtendo o valor de absorvância, utiliza-se a equação (3.2) para calcular a concentração de antocianinas em mg/L em cada amostra.

$$C = \frac{A \times MW \times DF \times 1000}{\epsilon \times 1} \quad (mg/L) \quad (3.2)$$

onde MW é a massa molar, DF é o fator de diluição e ϵ é a absortividade molar. Utilizam-se os parâmetros da antocianina majoritária na amostra para a massa molar e

absortividade molar. Para os cálculos deste trabalho, foram utilizados os valores de $MW = 449,2 \text{ g.mol}^{-1}$, $\epsilon = 26900 \text{ L.cm}^{-1}.\text{mol}^{-1}$.

As análises para leitura no espectrofotômetro (PG Instruments Limited, modelo T80, Leicestershire, Reino Unido) foram realizadas em triplicata, misturando-se 0,4 mL de amostra com 1,6 mL de solução tampão de pH 1,0 e 4,5. A solução tampão de pH 1,0 foi elaborada com 1,86 g de KCl (Vetec Química Fina Ltda., Duque de Caxias, Brasil) e 980 mL de água destilada misturados, medindo-se o pH e fazendo seu ajuste para 1,0 com HCl concentrado (F. Maia Indústria e Comércio Ltda., Cotia, Brasil). Foi adicionada água até que o volume da solução completasse 1 L. A solução tampão de pH 4,5 foi feita misturando-se 54,43 g de $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Nuclear, Brasil) com 960 mL de água destilada em uma proveta. O ajuste para o pH 4,5 foi feito da mesma forma que para a solução de pH 1,0 e a solução também foi adicionada de água até completar 1 L (Giusti e Wrolstad, 2001).

Após a mistura da amostra e da respectiva solução tampão, aguardou-se um tempo entre 15 minutos à 1 hora para efetuar a leitura nos dois comprimentos de onda (520 e 700 nm), para todas as amostra, em cada pH. O branco utilizado foi água destilada.

A absorbância e a concentração foram calculadas conforme comentado anteriormente e, depois, as concentrações foram convertidas para concentração de antocianinas em base seca, utilizando a umidade do bagaço de uva.

3.4.2. *Concentração de Compostos Fenólicos*

As análises para determinação da concentração de compostos fenólicos foram feitas de acordo com o método de Folin-Ciocalteu de determinação de fenólicos totais adaptado de Waterhouse (2002). Foram misturados 50 μL de cada amostra com 2,6 mL de água e 250 μL de reagente de Folin (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos), aguardando 5 minutos e, então, foi misturado à solução 2,1 mL de solução aquosa de 7,14 % de carbonato de sódio (Dinâmica Química Contemporânea LTDA, Diadema, Brasil). Após duas horas, foi feita a leitura no comprimento de onda de 765 nm no espectrofotômetro. O branco utilizado foi feito utilizando-se o solvente de extração (50 % etanol) no lugar da amostra.

As leituras de absorbância foram utilizadas para o cálculo da concentração de fenólicos totais através de uma curva analítica, feita com soluções de concentrações 50, 100, 200, 300, 400, 500 e 750 ppm de ácido gálico na solução de extração (50 % etanol), aplicando-se o mesmo método descrito acima. A curva analítica está descrita no item 4.1.2 dos resultados e discussões. Os valores de concentração foram depois expressos em base seca para uma melhor análise.

3.5. Análises Estatísticas

Para utilização dos valores lidos em triplicata pelo espectrofotômetro, foi feita uma média dos valores de absorbância, obtendo-se um desvio padrão relativo máximo de 16 % para as amostras dos tempos 10, 20, 30, 45 e 60 minutos. Para os tempos de 0 e 5 minutos, não foi avaliado o desvio padrão das análises pelos valores de absorbância serem muito baixos (apenas o desvio padrão entre as médias foi considerado).

Com o resultado das médias de absorvância dos pontos, foi calculada uma média global para cada tempo, entre as duplicatas de cada experimento. As análises estatísticas dos resultados foram feitas utilizando o *software* Statistica® versão 8 (Statsoft Inc., Tulsa, Estados Unidos). Os valores médios obtidos para o tempo de 60 minutos de cada experimento foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey HSD (*Honestly Significant Difference*) com um grau de significância de 95 %. Com essas análises, foi possível determinar a significância estatística dos resultados e obter uma comparação entre os experimentos.

Na análise estatística dos dados de teor de compostos fenólicos nas amostras foram feitos dois testes de Tukey diferentes. Um com os valores das médias de todos os experimentos e outro sem os valores das médias do experimento com bagaço de uva moído, por estes terem apresentado um desvio padrão maior que os outros, podendo interferir nos resultados de significância.

4. Resultados e Discussão

Nesse capítulo serão mostrados os resultados obtidos no presente trabalho e o mesmo está dividido em três partes: “Pré-Operação”, “Antocianinas” e “Compostos Fenólicos”.

4.1. Pré-Operação

Conforme comentado no capítulo de Materiais e Métodos, houve alguns experimentos feitos anteriormente às extrações que objetivaram padronizar os dados e as condições dos experimentos. Estes experimentos foram: o ajuste da temperatura do banho termostático quando aplicado o ultrassom na célula encamisada; e, a elaboração da curva analítica para determinação das concentrações de compostos fenólicos.

4.1.1. Temperatura do banho termostático aplicado ao ultrassom

Para manter a solução de água, ácido cítrico 1 % (m/m) e bagaço de uva a 30 °C – em função do aquecimento causado pelo ultrassom - foram feitos testes para determinar a temperatura ideal da água na camisa da célula. Para cada intensidade de potência foi utilizada uma temperatura no banho.

Após os testes, foram definidas as temperaturas de 3 °C, 14 °C e 28 °C no banho termostático para as intensidades de potência de 510 W/cm², 340 W/cm² e 170 W/cm², respectivamente. A Figura 4.1 mostra o comportamento da temperatura das soluções com o banho nas temperaturas citadas, quando aplicadas as correspondentes intensidades de potência do ultrassom.

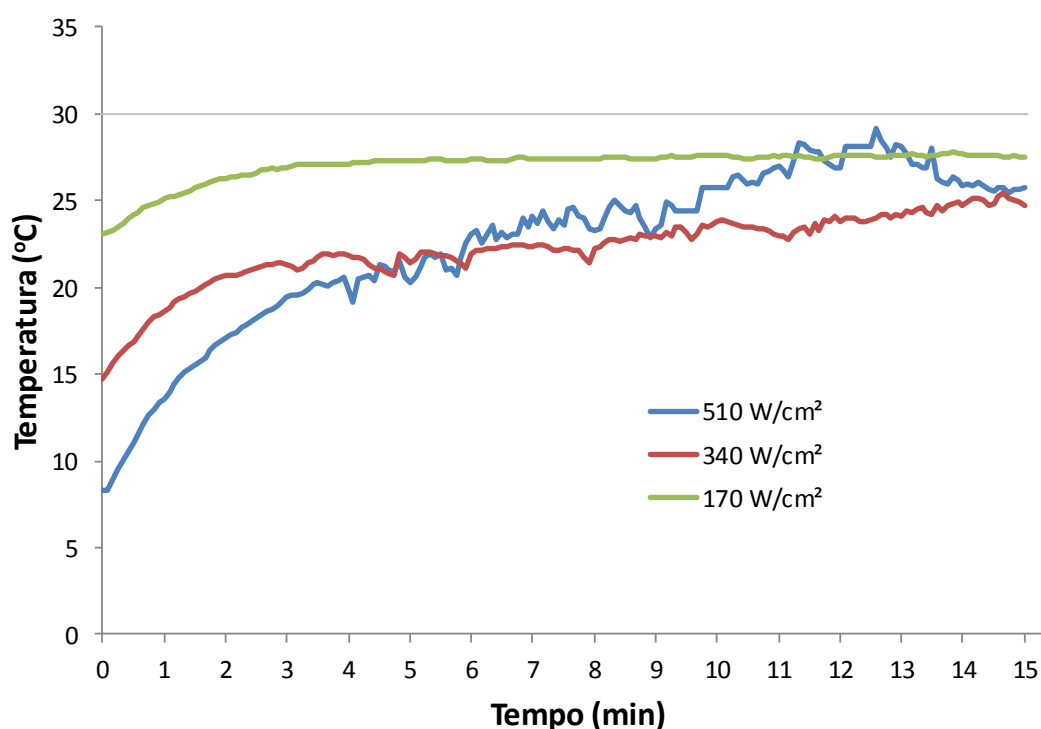


Figura 4.1 Comportamento das temperaturas da solução aquosa com o bagaço de uva com o tempo para as três intensidades de potência do ultrassom.

Pela análise da figura, nota-se que todos os experimentos com o ultrassom ficaram com a temperatura abaixo de 30 °C, satisfazendo o critério estabelecido para a máxima temperatura. A solução com intensidade de potência aplicada de 340 W/cm² teve uma temperatura abaixo de 25 °C com a temperatura definida do banho. A fim de manter as mesmas condições, a temperatura do banho foi acrescida de 2 °C, ficando em 16 °C, durante a realização dos experimentos. A oscilação em sua curva de aquecimento, conforme pode ser visto na figura, foi causada por esse aumento da temperatura do banho, que ocorreu durante o experimento em, aproximadamente, 10 minutos de operação.

Na solução em que foi aplicada a intensidade de potência de 510 W/cm² percebe-se a formação de dois patamares de temperatura. Isso ocorre porque o dano na célula nessa intensidade de potência do ultrassom é alto, formando, depois de um tempo, uma espécie de gel, com uma viscosidade aparentemente mais elevada, dificultando a agitação e, assim, diminuindo a troca térmica, aumentando a sua temperatura. Supõe-se que isso se deve ao fato das ondas de alta intensidade quebrarem a parede celular, que é a parte que possui as fibras vegetais, liberando-as na solução e formando esse gel. A Figura 4.5 mostra imagens de microscopia eletrônica do bagaço de uva fresco e do bagaço após passar pelo tratamento de um banho de ultrassom, e que será discutida mais adiante, e corrobora esta observação.

4.1.2. Curva analítica dos compostos fenólicos

A curva analítica para as leituras de absorvância das análises de concentração de compostos fenólicos foi feita conforme descrito no item 3.4.2. A Figura 4.2 mostra essa curva analítica, e a equação (4.1) é a equação feita por regressão linear, sendo C a concentração em mg/L e A, a absorvância, que foi posteriormente utilizada para o cálculo das concentrações. O coeficiente de determinação, R², encontrado foi de 0,998.

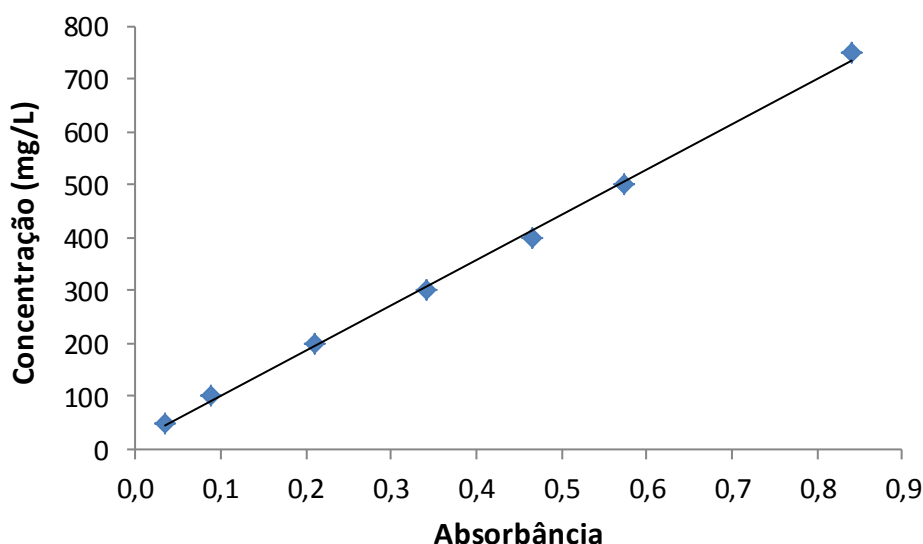


Figura 4.2 Curva analítica para leituras de absorvância de compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu

$$C = 855,61 \times A + 16,438 \quad (4.1)$$

4.2. Antocianinas

O resultado das análises de determinação da concentração de antocianinas no bagaço de uva pelo método do pH diferencial em função do tempo está mostrado na Figura 4.3. Os dados correspondem à média, para cada tempo, da duplicata dos experimentos, foram calculados em base seca, e estão expressos em mg de cianidina-3-glucosídeo (C3G)/100 g de bagaço de uva (base seca). Cada curva representa um dos 5 experimentos realizados: utilizando a intensidade de potência do ultrassom de 510, 340 e 170 W/cm², moído e controle, ou seja, sem aplicação de ultrassom.

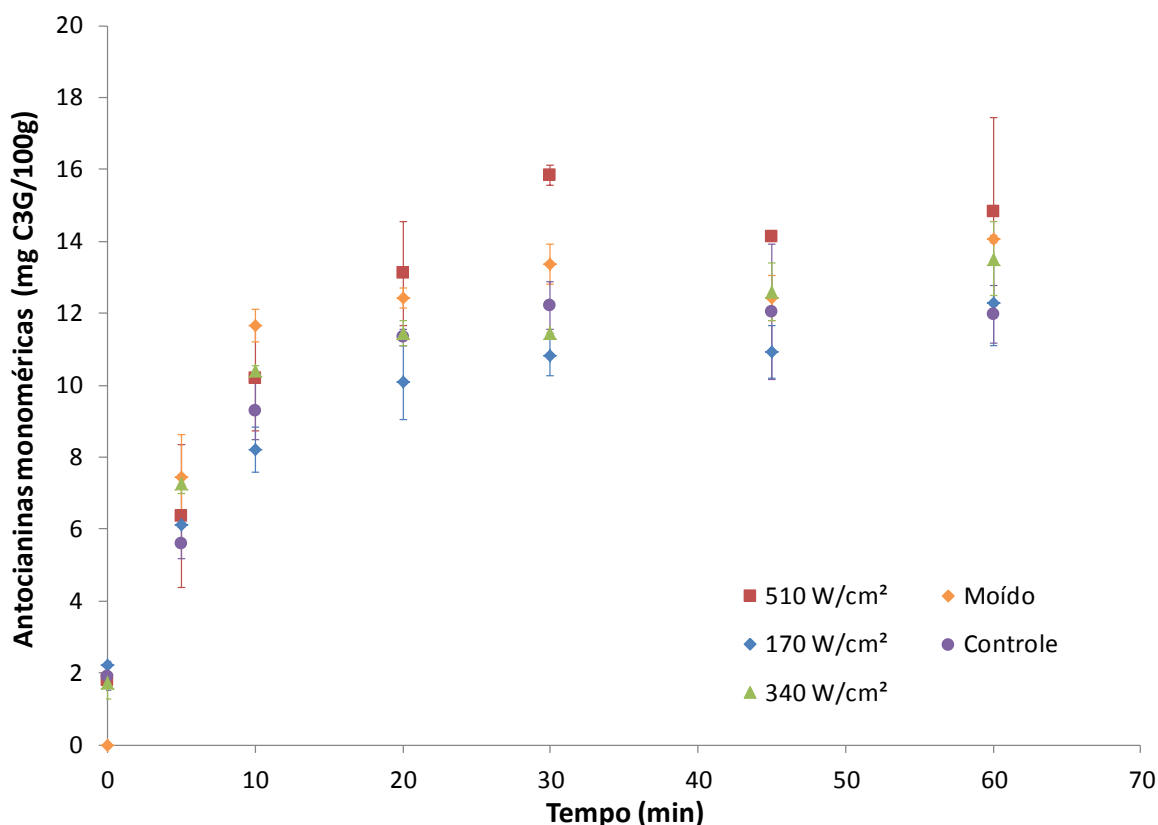


Figura 4.3 Gráfico da concentração de antocianinas de cada experimento pelo tempo

Conforme pode ser observado, o experimento moído, diferentemente dos demais, inicia com uma concentração igual a zero. A alíquota retirada no tempo zero teve o objetivo de quantificar a extração feita pela água com 1 % de ácido cítrico durante a aplicação de uma intensidade de potência pelo ultrassom e, como o processo de moagem não operava da mesma forma, não foi feita a retirada dessa alíquota, não se obtendo valores de concentração para este caso. O experimento da moagem foi conduzido, como citado anteriormente, por ser uma tecnologia muito utilizada em processos de redução de tamanho e aumento da área superficial, favorecendo a extração (Metzger *et al.*, 2012).

Pela análise da figura percebe-se que em todos os experimentos, as concentrações aumentam com o tempo; além disso, tendem a estabilizar após certo tempo, aproximadamente 30 minutos, atingindo, possivelmente, o seu estado estacionário (concentração constante). Nota-se, também, que a concentração de antocianinas é relativamente baixa, na ordem de 29,73 mg/100 g de amostra.

Os resultados obtidos estão abaixo dos valores encontrados na literatura. Corrales *et al.* (2008) obtiveram uma concentração de 776 mg/100 g, utilizando um banho de ultrassom com 35 kHz de frequência, operando a 70 °C durante uma hora, ao mesmo tempo em que a extração ocorria com uma solução de 50 % etanol como solvente. Porém, estes autores obtiveram o mesmo resultado quando comparados os métodos convencionais e com a utilização do ultrassom, resultado semelhante ao encontrado no presente trabalho, em que não existe diferença significativa entre os métodos.

A análise estatística das médias no tempo de 60 minutos originou os resultados apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 Conteúdo de antocianinas no tempo de 60 minutos de extração para cada experimento

Experimento	Concentração Antocianinas (mg/100g)¹
Controle	11,77 ^{a2} ± 0,28
170 W/cm ²	12,27 ^a ± 1,17
340 W/cm ²	13,51 ^a ± 1,03
Moído	14,07 ^a ± 0,10
510 W/cm ²	14,82 ^a ± 2,61

¹ Valores médios ± desvio padrão de 2 repetições

² Diferentes letras nas colunas representam diferenças significativas (p < 0,05)

Pelo teste de Tukey, com grau de significância de 95 %, observa-se que não houve diferença significativa entre os valores de concentração de antocianinas de cada experimento, o que dificulta a escolha de um pré-tratamento como método mais eficiente.

Essa falta de diferença significativa pode estar relacionada à baixa concentração de antocianinas nas amostras, causada pela diluição feita pelo solvente de extração, o que compromete a leitura do espectrofotômetro. Para uma melhor análise, poderiam ter sido concentradas as amostras, obtendo absorvâncias em um intervalo de valores mais elevados, diminuindo o erro da leitura.

Ainda, a baixa concentração de antocianinas no bagaço pode ter sido causada pela sua degradação durante o processamento da uva e durante o seu armazenamento. Sulfito, que foi adicionado como antifúngico no bagaço de uva, pode causar a degradação das antocianinas pelo rompimento do sistema de ligações duplas, o que as torna incolor. Além disso, as amostras de bagaço de uva foram coletadas em fevereiro de 2014 na empresa Salton, após terem sido processadas sob diferentes condições, e foram armazenadas sob refrigeração, sem serem congeladas, até a sua utilização em outubro de 2014. Como compostos fenólicos, principalmente antocianinas, são instáveis, podendo degradar-se com o tempo, pela temperatura, incidência de luz, presença de íons metálicos, esses meses de armazenamento podem ter degradado as antocianinas (Giusti e Wrolstad, 2001; Castañeda-Ovando *et al.*, 2009; Nayak *et al.*, 2011).

4.3. Compostos Fenólicos

A determinação da concentração dos compostos fenólicos foi feita pela leitura em espectrofotômetro e seus resultados podem ser observados na Figura 4.4, onde a concentração está expressa em miligramas de Equivalentes de Ácido Gálico (GAE) por 100 g de bagaço de uva seco em função do tempo de extração.

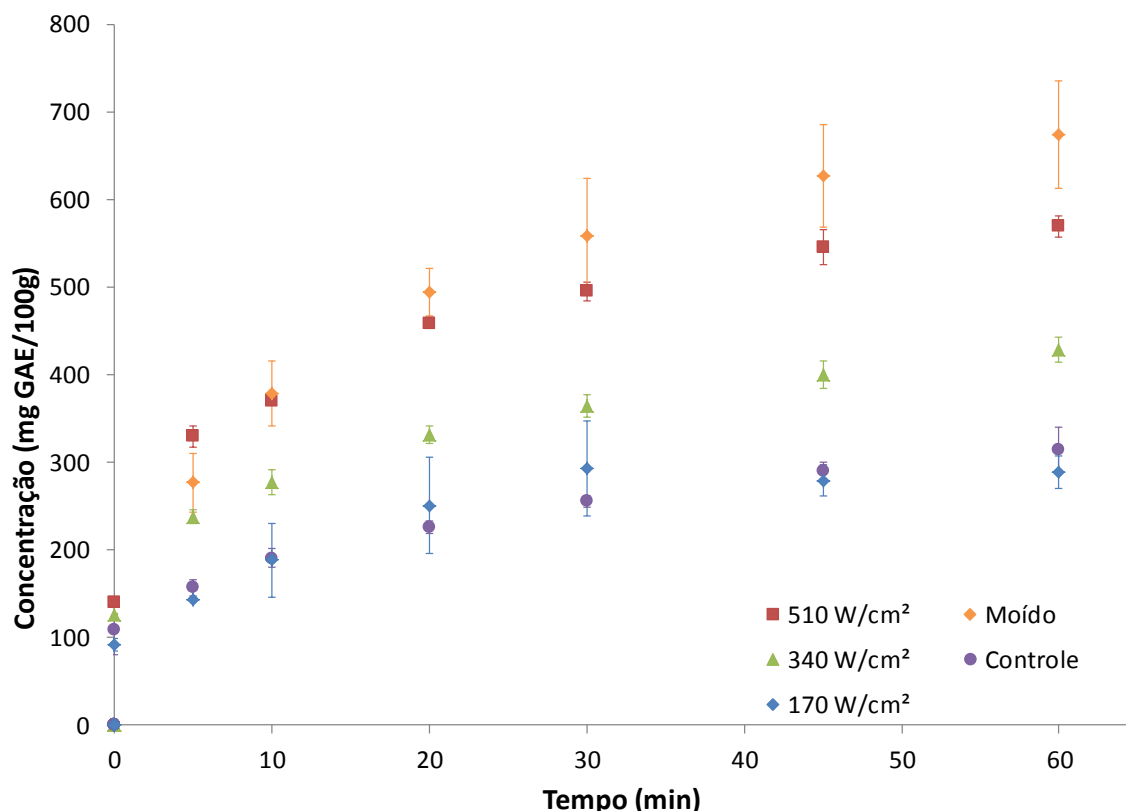


Figura 4.4 Gráfico da concentração de compostos fenólicos de cada experimento pelo tempo

Novamente pode-se observar que as concentrações seguem um padrão, comprovando a existência de uma cinética de extração de primeira ordem. No caso dos compostos fenólicos, não se pode afirmar que foi atingido o estado estacionário para todos os experimentos, como foi concluído para as antocianinas, pois nota-se que a concentração não atinge um patamar bem estabelecido. Apesar disso, observa-se que o aumento de concentração para os pontos posteriores a 30 minutos é baixa, mostrando que o estado estacionário está próximo de ser atingido.

Diferentemente das antocianinas, a concentração de compostos fenólicos extraída é mais significativa, na ordem de 500 mg GAE/100 g de amostra (base seca). Observa-se, além disto, que a utilização de ultrassom na potência mais alta e o processamento apenas com a moagem levaram a resultados maiores de extração de compostos fenólicos.

A análise estatística das médias no tempo de 60 minutos está apresentada pela Tabela 4.2, que contém o valor médio entre a duplicata de cada experimento, o desvio padrão e a indicação das diferenças significativas entre as médias.

Tabela 4.2 Valores de concentração de compostos fenólicos no tempo de 60 minutos de extração para cada experimento

Experimento	Concentração Fenólicos (mg GAE/100g) ¹
170 W/cm ²	289,07 ^{c2} ± 18,1
Controle	314,45 ^c ± 26,5
340 W/cm ²	428,97 ^b ± 14,1
510 W/cm ²	570,12 ^a ± 12,2
Moído	674,21 ^a ± 61,5

¹ Valores médios ± desvio padrão de 2 repetições

² Diferentes letras nas colunas representam diferenças significativas ($p < 0,05$)

Pelos testes de Tukey realizados com grau de significância de 95 %, pode-se perceber que, no caso dos compostos fenólicos, obteve-se diferença significativa entre os métodos utilizados no pré-tratamento. Isso foi possível pela alta concentração de compostos fenólicos no bagaço de uva, o que aumentou os valores de absorbância lidos pelo espectrofotômetro, em comparação com as antocianinas, mesmo com a diluição feita quando adicionado o solvente da extração. Acredita-se que os principais compostos fenólicos presentes no bagaço de uva são, principalmente os ácidos fenólicos, flavonoides, proantocianidinas oligoméricas e taninos poliméricos condensados (Waterhouse, 2002; Acosta-Estrada, Gutiérrez-Urbe e Serna-Saldívar, 2014). Conforme discutido anteriormente, antocianinas são compostos muito instáveis, mais do que a maioria dos outros polifenóis, que são mais resistentes ao processamento e ao armazenamento, se mantendo por longos períodos no bagaço. Isso pode ter influenciado a diferença nos resultados entre a análise de concentração de compostos fenólicos e de antocianinas (Giusti e Wrolstad, 2001; Castañeda-Ovando *et al.*, 2009; Nayak *et al.*, 2011).

Os resultados de concentração de compostos fenólicos obtidos estão de acordo com a literatura. González-Centeno *et al.* (2014) obtiveram valores em torno de 230 mg GAE/100 g de bagaço de uva, operando a extração a 20 °C, em torno de 500 mg GAE/100 g de bagaço de uva a 35 °C e em torno de 770,9 mg GAE/100 g de bagaço de uva a 50 °C. Seus experimentos aplicaram a moagem no bagaço de uva antes da extração, o solvente utilizado foi água e o ultrassom de sonda foi aplicado na frequência de 55 kHz e intensidade de potência de 22,9 W/cm². Tao, Zhang e Sun (2014) obtiveram resultados na mesma ordem de grandeza, porém menores do que os obtidos neste trabalho, operando com um banho de ultrassom a uma frequência de 25 kHz, variando a sua potência de 0 a 300 W e utilizando um solvente com 50 % de etanol. Sua extração obteve, aproximadamente, 244,2 mg/100 g no melhor resultado. Corrales *et al.* (2008) também concluíram que o ultrassom aumenta significativamente a eficiência da extração de compostos fenólicos, quando comparado ao método convencional (sem utilização de tecnologias para facilitar a transferência de massa).

Os métodos que conseguiram extrair mais compostos fenólicos foram a aplicação da maior intensidade de potência do ultrassom e a passagem do bagaço de uva pelo moedor, sendo eles significativamente iguais. O segundo método que extraiu mais compostos fenólicos foi a aplicação de 340 W/cm². Para a intensidade de potência do ultrassom de 170 W/cm², não houve efeito significativo nas amostras, já que esta foi considerada significativamente igual ao experimento controle.

Comparando-se apenas os três diferentes pré-tratamentos feitos com o ultrassom, pode-se dizer que as três diferentes intensidades de potência utilizadas causam diferentes danos nas células da uva. A mais alta, que utiliza 510 W/cm^2 , causa danos bem mais rigorosos na estrutura celular do que as outras duas, danos comparáveis à uma quebra mecânica, que ocorre com a moagem. Isso pode ser observado pela formação do gel durante a aplicação do ultrassom, o que não ocorre nas outras. A formação de um gel e o aumento na concentração de compostos fenólicos no meio são indicativos de que essa intensidade de potência do ultrassom consegue destruir mais partes da célula, liberando componentes intracelulares que intensidades mais baixas não conseguem. A Figura 4.5 mostra duas imagens de microscopia eletrônica do bagaço de uva fresco (a) e após passar pelo processo de ultrassom (b), obtidas por Minjares-Fuentes *et al.* (2014). Foi utilizado um banho de ultrassom com frequência de 37 kHz e 140 W. A figura comprova que o ultrassom causa um dano considerável à célula da uva, concordando com a hipótese feita.

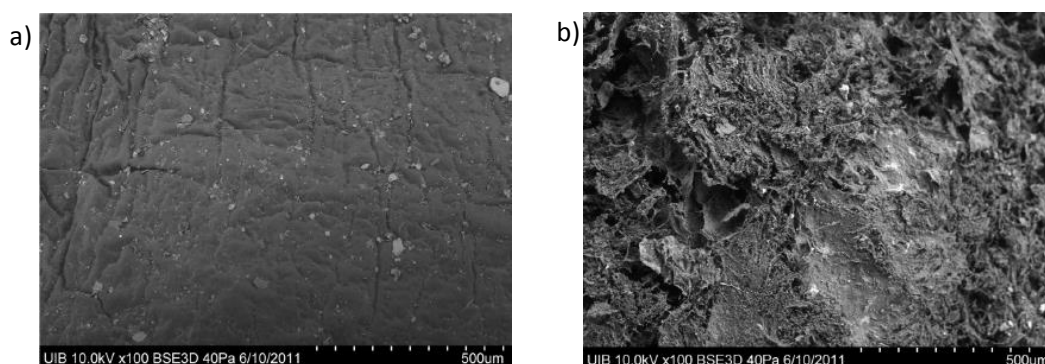


Figura 4.5 Imagem feita por microscopia eletrônica do a) bagaço de uva fresco e b) bagaço de uva após aplicação de ultrassom.

Fonte: (Minjares-Fuentes *et al.*, 2014)

Apesar de a moagem resultar em um dos processos com maior rendimento na extração, o moedor apresentou uma eficiência de apenas 53,8 %, causando grandes perdas de massa de bagaço de uva. A Figura 4.6 mostra o moedor após o processo de moagem do bagaço de uva, evidenciando as perdas causadas, com o bagaço úmido aderido às paredes e ao rotor. A adição de uma etapa de secagem pode aumentar a eficiência do processo de moagem, entretanto aumenta consideravelmente o gasto energético envolvido nesse pré-tratamento.



Figura 4.6 Interior do moedor após o processo de moagem do bagaço de uva úmido

Com base nos resultados obtidos, é possível concluir que os métodos mais eficientes utilizados como pré-tratamento no bagaço de uva, para utilizá-la em uma extração de

compostos fenólicos, são a moagem e a aplicação de uma alta intensidade de potência, correspondente à aproximadamente 90 % da capacidade do ultrassom. Essa conclusão pode ser facilmente explicada pelo aumento do teor de compostos fenólicos extraídos, comparado ao experimento controle. O experimento moído e o de 510 W/cm² de intensidade de potência extraíram 114 % e 81 % a mais de compostos fenólicos que o controle, respectivamente. Já o experimento de média intensidade de potência, 340 W/cm², extraiu 36 % de compostos fenólicos a mais que o controle, o que também representa uma melhoria na extração.

5. Conclusões e Sugestões para Trabalhos Futuros

O presente trabalho apresentou o estudo da extração de antocianinas e compostos fenólicos do bagaço de uva assistida por ultrassom. Com base nos resultados, é possível afirmar que o bagaço da uva contém compostos bioativos e que eles podem ser extraídos para um uso futuro, agregando valor para esse resíduo, e criando uma alternativa para as empresas produtoras de vinho e seus derivados.

Entre os métodos que foram testados neste trabalho, conclui-se que a utilização de um moedor ou uma alta intensidade de potência do ultrassom, na ordem de 500 W/cm², como pré-tratamento ao bagaço da uva, auxiliam na extração desses compostos bioativos e podem se tornar eficientes formas de melhorar o processo de extração. Valores menores de intensidade de potência, abaixo de 170 W/cm², não conferem muitas vantagens ao processo, sendo que se equivalem à uma extração convencional, onde nenhum pré-tratamento é utilizado, ou seja, nenhum gasto é contabilizado antes da extração.

Com relação à comparação entre a extração das antocianinas e a extração de compostos fenólicos, foi possível concluir que a extração das antocianinas forneceu um resultado insatisfatório, sendo que não houve diferença significativa entre os métodos. Para as concentrações de compostos fenólicos, por sua vez, obtiveram-se resultados que diferiram significativamente para os métodos utilizados, indicando que a maior intensidade de potência de ultrassom e a moagem melhoram a eficiência de extração.

Uma sugestão a um estudo futuro poderia ser a utilização de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para determinação exata de quais compostos estão presentes nesse bagaço, possivelmente confirmando a análise realizada por espectrofotometria, porém, com mais detalhes.

A análise econômica dos dois processos mais eficientes deve ser algo a ser estudado, para que se possa definir o processo ótimo. Essa análise não pode ser feita juntamente com esse trabalho, pois os parâmetros envolvidos nos dois pré-tratamentos não foram completamente aperfeiçoados, sendo assim, difíceis de comparar economicamente.

Para elaboração da análise econômica, os dois tipos de pré-tratamento precisam ser otimizados. A aplicação de ultrassom pode ocorrer em um menor tempo, em outra temperatura, e pode-se testar a aplicação do ultrassom juntamente com a extração. O tempo de extração foi fixado em 15 minutos por ser um tempo que se acredita romper o máximo possível de células do bagaço de uva. Porém, esse tempo pode ser melhor estudado, visando reduzir o gasto energético.

O processo de moagem também precisa ser otimizado. Uma etapa de secagem pode ser adicionada anteriormente à passagem do bagaço de uva pelo moedor, para evitar a manutenção do mesmo; a rotação do motor pode ser otimizada para uma economia de energia; e o tipo de moedor pode ser alterado, utilizando um que torne as perdas menos consideráveis (no experimento obteve-se 53,8 % (m/m) de eficiência).

Ainda, outros parâmetros de extração podem ser estudados, como: alteração do solvente, ou a não utilização de solventes; tempo; temperatura; e ainda, a quantidade de solvente.

Estudos da continuação do processo são igualmente importantes como, a separação dos compostos fenólicos do solvente da extração, o armazenamento dos compostos para posterior utilização, evitando-se a sua degradação, e, análises qualitativas do bagaço de uva que é resíduo da extração, para verificar a presença de componentes nutricionais e esse continuar sendo útil para utilização em rações animais.

6. Referências

ACOSTA-ESTRADA, B. A.; GUTIÉRREZ-URIBE, J. A.; SERNA-SALDÍVAR, S. O. Bound phenolics in foods, a review. **Food Chemistry**, v. 152, n. 0, p. 46-55, 2014. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814613017305> >.

CARRERA, C. et al. Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. **Analytica Chimica Acta**, v. 732, n. 0, p. 100-104, 2012. ISSN 0003-2670. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267011015546> >.

CASTAÑEDA-OVANDO, A. et al. Chemical studies of anthocyanins: A review. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 859-871, 2009. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814608010674> >.

CORRALES, M. et al. Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 9, n. 1, p. 85-91, 2008. ISSN 1466-8564. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856407000756> >.

DA PORTO, C.; PORRETTO, E.; DECORTI, D. Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n. 4, p. 1076-1080, 2013. ISSN 1350-4177. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350417712002763> >.

DOLATOWSKI, Z. J.; STASIAK, D. M. Ultrasonically Assisted Diffusion Processes. In: LEOVKA, N.; VOROBIEV, E., *et al* (Ed.). **Enhancing Extraction Processes in the Food Industry**. Estados Unidos: CRC Press, 2012. cap. 4, p.123 - 143. (Contemporary Food Engineering).

DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Colouring our foods in the last and next millennium. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 35, n. 1, p. 5-22, 2000. ISSN 1365-2621. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2621.2000.00373.x> >.

FU, L. et al. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. **Food Chemistry**, v. 129, n. 2, p. 345-350, 11/15/ 2011. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814611006455> >.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry** Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy Estados Unidos: John Wiley & Sons, Inc: 1 - 13 p. 2001.

GONZÁLEZ-CENTENO, M. R. et al. Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (*Vitis vinifera* L.): Experimental kinetics and modeling. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 22, n. 0, p. 506-514, 2014. ISSN 1350-4177. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350417714001886> >.

HOOVER, D. G. Ultrasound. **Journal of Food Science**, v. 65, p. 93-95, 2000. ISSN 1750-3841. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2000.tb00624.x> >.

JACKMAN, R. L.; YADA, R. Y.; TUNG, M. A. **A Review: Separation and chemical properties of anthocyanins used for their qualitative and quantitative analysis.** *J. Food Biochem.* 11: 279-308 p. 1987.

KAMMERER, D. et al. Recovery of anthocyanins from grape pomace extracts (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Mito) using a polymeric adsorber resin. **European Food Research and Technology**, v. 220, n. 3-4, p. 431-437, 2005. ISSN 1438-2377. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-004-1078-z> >.

KIM, D.-O.; LEE, C. Y. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry.** Extraction and Isolation of Polyphenolics: John Wiley & Sons, Inc: 1-12 p. 2002.

LECAS, M.; BRILLOUET, J.-M. Cell wall composition of grape berry skins. **Phytochemistry**, v. 35, n. 5, p. 1241-1243, 1994. ISSN 0031-9422. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942200948283> >.

LLOYD, P. J.; VAN WYK, J. Introduction to Extraction in Food Processing In: LEOVKA, N.; VOROBIEV, E., *et al* (Ed.). **Enhancing Extraction Processes in the Food Industry** Estados Unidos: CRC Press, 2012. cap. 1, p.1 - 24. (Contemporary Food Engineering).

LUQUE-RODRÍGUEZ, J. M.; LUQUE DE CASTRO, M. D.; PÉREZ-JUAN, P. Dynamic superheated liquid extraction of anthocyanins and other phenolics from red grape skins of winemaking residues. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 14, p. 2705-2713, 2007. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852406004871> >.

METZGER, M. J. et al. Using the attainable region analysis to determine the effect of process parameters on breakage in a ball mill. **AIChE Journal**, v. 58, n. 9, p. 2665-2673, 2012. ISSN 1547-5905. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/aic.12792> >.

MINJARES-FUENTES, R. et al. Ultrasound-assisted extraction of pectins from grape pomace using citric acid: A response surface methodology approach. **Carbohydrate**

Polymers, v. 106, n. 0, p. 179-189, 2014. ISSN 0144-8617. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861714001349> >.

MISHRA, D. K.; DOLAN, K. D.; YANG, L. Confidence Intervals for Modeling Anthocyanin Retention in Grape Pomace during Nonisothermal Heating. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 1, p. E9-E15, 2008. ISSN 1750-3841. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00598.x> >.

MYLES, S. et al. Genetic structure and domestication history of the grape. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 9, p. 3530-3535, 2011. Disponível em: < <http://www.pnas.org/content/108/9/3530.abstract> >.

NAYAK, B. et al. Thermal Degradation of Anthocyanins from Purple Potato (Cv. Purple Majesty) and Impact on Antioxidant Capacity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 20, p. 11040-11049, 2011/11/20 2011. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/jf201923a> >.

ORTEGA-REGULES, A. et al. A first approach towards the relationship between grape skin cell-wall composition and anthocyanin extractability. **Analytica Chimica Acta**, v. 563, n. 1-2, p. 26-32, 2006. ISSN 0003-2670. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267005020581> >.

PINELO, M. et al. Optimization of continuous phenol extraction from Vitis vinifera byproducts. **Food Chemistry**, v. 92, n. 1, p. 109-117, 2005. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814604005631> >.

_____. Effect of Solvent, Temperature, and Solvent-to-Solid Ratio on the Total Phenolic Content and Antiradical Activity of Extracts from Different Components of Grape Pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 2111-2117, 2014/11/21 2005. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/jf0488110> >.

PINELO, M.; SINEIRO, J.; NÚÑEZ, M. A. J. Mass transfer during continuous solid-liquid extraction of antioxidants from grape byproducts. **Journal of Food Engineering**, v. 77, n. 1, p. 57-63, 2006. ISSN 0260-8774. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877405004267> >.

RODRIGUEZ-SAONA, L. E.; WROLSTAD, R. E. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. Extraction, Isolation, and Purification of Anthocyanins John Wiley & Sons, Inc.: 1 - 8 p. 2002.

SANT'ANNA, V. et al. Kinetic modeling of total polyphenol extraction from grape marc and characterization of the extracts. **Separation and Purification Technology**, v. 100, n. 0, p. 82-87, 2012. ISSN 1383-5866. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586612004686> >.

SASTRY, L.; TISCHER, R. **Behavior of the anthocyanin pigments in concord grapes during heat processing and storage** *Food Technol.* 6:82 1952.

SPIGNO, G.; TRAMELLI, L.; DE FAVERI, D. M. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. **Journal of Food Engineering**, v. 81, n. 1, p. 200-208, 2007. ISSN 0260-8774. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877406006649> >.

TAO, Y.; ZHANG, Z.; SUN, D.-W. Kinetic modeling of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from grape marc: Influence of acoustic energy density and temperature. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, n. 4, p. 1461-1469, 2014. ISSN 1350-4177. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350417714000571> >.

WATERHOUSE, A. L. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. Estados Unidos: John Wiley & Sons, Inc.: 1-8 p. 2002.

WEBSTER, E. Cavitation. **Ultrasonics**, v. 1, n. 1, p. 39-48, 1963/3// 1963. ISSN 0041-624X. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0041624X63901161> >.