



X Oktoberfórum – PPGEQ

04 a 07 de outubro de 2011

EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE BAGAÇO DE UVA

Voltaire Sant'Anna^{1,2}, Ligia Damasceno Ferreira Marczak², Isabel Cristina Tessaro¹

¹Laboratório de Separação por Membannas

²Laboratório de Tecnologia de Processamento de Alimentos

Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

R. Eng. Luis Englert, s/n. Campus Central. CEP: 90040-040 - Porto Alegre - RS - BRASIL,

E-MAIL: {voltaire, isabel}@enq.ufrgs.br

Resumo: O objetivo deste trabalho foi avaliar a cinética de extração de compostos fenólicos totais e de antocianinas monoméricas de bagaço de uva, além de investigar a quantificação destes compostos iônica e ligada no resíduo e suas atividades biológicas. A melhor concentração de etanol a ser utilizada para extração é de 50% com ratio de 50 mL de solvente por grama de bagaço. O modelo de pseudo-primeira ordem foi a equação que melhor se adequou aos dados experimentais com valores de taxa de extração para compostos fenólicos variando entre 0,1302 e 0,0398 min⁻¹ e entre 0,1574 e 0,0336 para antocianinas na faixa de temperatura entre 60-25°C. Do total presente no bagaço, 55,64% dos compostos fenólicos e 33,86% das antocianinas monoméricas estão fortemente ligados no resíduo. Os resultados ainda mostram que o extrato apresenta atividade antioxidante, poder quelante de ferro e poder redutor, sendo grande parte dessas atividades relacionadas a compostos não-extraíveis com o solvente. Os resultados deste trabalho mostram que bagaço de uva e o extrato fenólico extraído dele têm grande potencial a serem utilizados como componentes funcionais na indústria de alimentos.

Palavras-chave: bagaço de uva, cinética de extração, compostos fenólicos, antocianinas.

1. Introdução

O consumo de frutas e produtos derivados delas tem aumentado devido a recentes pesquisas que demonstram sua ação benéfica à saúde do ser humano. Entre os compostos bioativos relacionados a essa atividade, destacam-se os com alta atividade antioxidante como compostos polifenólicos (O'BYRNE *et al.*, 2002). A uva é uma fruta amplamente consumida em todo o mundo e de grande produção no Estado do Rio Grande do Sul. Esta fruta apresenta alta concentração desses compostos em relação outras frutas e vegetais (O'BYRNE *et al.*, 2002). Na produção de suco de uva e vinho, grandes quantidades de bagaço são geradas, sendo este resíduo rico em polifenóis, presentes tanto na casca quanto na semente.

Antocianinas são compostos pigmentosos naturais, principais responsáveis pela coloração laranja à violeta de plantas. São compostos fenólicos pertencentes ao grupo dos flavonóides e em grande concentração na casca de uvas (SEGADE *et al.*, 2008). A semente desta fruta, contudo, são ricas em outros compostos fenólicos como catequinas, taninos, ácido gálico (LIU *et al.*, 2011). Estes polifenóis apresentam atividade antioxidante, capacidade de suprimir o crescimento de células cancerígenas, prevenção de oxidação de LDL entre outras atividades biológicas importantes (STEINMETZ e POTTER, 1996; ISHIMOTO, 2008), tendo seu uso na indústria de alimentos e farmacêutica um grande potencial.

Neste contexto, visando à redução da geração de resíduos pela indústria e a obtenção de preparados ricos em

compostos bioativos a partir de uma fonte barata, que usualmente é considerada descarte da indústria, a extração de compostos fenólicos e antocianinas de bagaço de uva é uma interessante opção a ser estudada.

Estudos recentes utilizam a metodologia de superfície de resposta para investigar a extração de compostos fenólicos de material vegetal (MARTINELLO *et al.*, 2007; KARVELA *et al.*, 2009; GHAFOOR *et al.*, 2010; KARACABEY e MAZZA, 2010). No entanto, o uso de modelos matemáticos de cinética de extração facilita consideravelmente a otimização, o desenho, simulação e controle de projetos, além de contribuir para melhor utilização de tempo e energia (AMENDOLA *et al.*, 2010). O objetivo da modelagem matemática de extração é avaliar o efeito de diferentes tratamentos sobre a taxa de remoção desses compostos da planta para o solvente, podendo então estimar a extração bioativos sob diferentes condições de processamento, sem a necessidade de executar ensaios numerosos (VAN BOEKEL, 2008).

Muitos trabalhos têm sido publicados visando à modelagem de extração de compostos fenólicos e antocianinas, porém avaliando a adequação dos dados experimentais a apenas uma equação matemática (SIMEONOV e MINCHEV, 1999; CACACE e MAZZA, 2003; BUCIC-KOJIC *et al.*, 2007). Alguns modelos são mostrados na Tabela 1. AMENDOLA e colaboradores (2010) avaliaram diferentes modelos para extração de polifenóis de bagaço de uva a 60°C, além da qualidade dos extratos. Contudo, a maximização dos valores de

concentração de etanol e do *ratio* (volume de solvente/massa de bagaço) e a avaliação mais rigorosa dos modelos cinéticos, além de estimação de parâmetros de processo que o modelo escolhido possibilita obter, são dados que ainda faltam na literatura.

Tabela 1. Modelos cinéticos de extração de compostos bioativos de materiais vegetais.

| Equação (n°) | Referência |
|--|-------------------------|
| $C = C_0 \exp(kt)$ (1) | Amendola et al. (2010) |
| $C = C_0 \exp(kt^n)$ (2) | Amendola et al. (2010) |
| $C = A[1 - \exp(-Bt)] + C[1 - \exp(-Dt)]$ (3) | Cacace e Mazza (2003) |
| $C = \frac{C_\infty^w t}{t_{1/2} + t} + C_\infty^d [1 - \exp(-k_d t)]$ (4) | Linares et al. (2010) |
| $C = \frac{t}{K_1 + K_2 t}$ (5) | Peleg (1998) |
| $C = C_\infty - \frac{C_\infty}{\exp(kt+a)}$ (6) | Spiro e Jago (1982) |
| $C = A - B \exp(-kt)$ (7) | Minchev e Minkov (1999) |

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar a extração de compostos fenólicos de bagaço de uva. Especificamente, foi avaliada a melhor concentração de solvente, o *ratio*, a influência da temperatura e do tempo na extração desses compostos, além do estudo de compostos iônicamente ligados no bagaço, não extraíveis por solvente. Modelos cinéticos de extração descritos na literatura foram avaliados criteriosamente a fim de averiguar qual melhor descreve operação. Por fim, atividades biológicas dos extratos obtidos foram avaliadas.

2. Materiais e Métodos

2.1 Preparação da amostra

Bagaço de suco de uva *Vitis labrusca* da variedade “Isabel” foi doado pela empresa Vinícola Aurora (Bento Gonçalves, RS, Brasil) em 2011. O material foi então seco até umidade de 7,5% em equipamento de secagem por convecção forçada a 70°C, quando foi triturado em triturador doméstico. A fim de se obter uma amostra homogênea, o material foi peneirado por passagem através de peneira *mesh* 20, tendo a farinha final um tamanho de partícula médio de 0,239 mm de diâmetro, que foi estimado por difração de raio laser (Malvern® 2000 Mastersizer, Malvern Instruments, Reino Unido) e espalhamento de luz dinâmico (ZetaSizer® ZS, Malvern Instruments, Reino Unido). O material seco e classificado foi então mantido a -40 °C até sua utilização.

2.2 Extração aquoso-alcóolica

A extração de compostos fenólicos é geralmente mais eficaz com a utilização de solventes orgânicos. Dentre os utilizados, o etanol é o mais recomendado para posterior utilização do extrato em alimentos devido a sua não-toxicidade e ao menor custo.

2.2.1 Escolha da concentração do solvente e do *ratio* (mL de solvente/grama de bagaço)

Um planejamento fatorial 2² completo foi utilizado para avaliar o efeito da concentração de etanol e o *ratio* (mL de solvente/gramas de bagaço) sobre a extração de fenólicos totais e de antocianinas monoméricas do bagaço. O planejamento fatorial está mostrado na Tabela 2. Em agitador orbital de bancada, erleymeyers, com o volume de solvente na concentração planejada, foi estabilizado a 60°C por 15 min quando 1g de bagaço de uva foi adicionado. A extração ocorreu durante 1 h com agitação de 225 rpm, quando foi realizada a filtração do extrato em banho de gelo e a medição do volume de solvente extraído. A extração a 60°C por 1 h foi utilizada baseada em experimentos preliminares (dados não mostrados). A concentração de fenólicos totais e antocianinas monoméricas foi realizada conforme descrito na seção 2.4 e 2.5.

Os resultados foram analisados por um desenho fatorial composto pelo *software Statistica 7.0* (StatSoft Inc., Tulsa, OK).

2.2.2 Cinética de extração

Nas condições maximizadas pela seção 2.2.1, a extração de compostos fenólicos totais e de antocianinas monoméricas foi avaliada nas temperaturas de 25, 30, 40, 50 e 60°C, em que alíquotas foram retiradas por até 120 min. Os dados foram adequados a diferentes modelos cinéticos de extração (Tabela 1) por regressão não-linear, minimizando dos erros quadráticos por Gauss-Newton usando o *software Statistica 7.0* (StatSoft Inc., Tulsa, OK).

A escolha do melhor modelo foi baseada na análise do maior coeficiente de correlação (r^2) e menores valores de chi-quadrado (χ^2) e erro padrão médio (EPM) dos dados experimentais às equações matemáticas mostradas na Tabela 1.

2.2.3 Extração ácida

Averiguadas as melhores condições de extração (concentração de etanol, *ratio*, temperatura e tempo), foram realizadas extrações sucessivas até que a extração se cessasse. Então o bagaço residual sofreu extração ácida conforme KAPASAKALIDIS *et al.* (2006) a fim de quantificar antocianinas monoméricas e compostos fenólicos totais ligados ao bagaço. Para isso, ao resíduo da extração foi adicionado 50 mL de metanol 50% acidificado com HCl até a concentração de 1,2 mol L⁻¹. A extração ocorreu a 90°C por 90 min. Após o extrato foi filtrado em banho de gelo e então analisados antocianinas monoméricas e compostos fenólicos.

2.3 Análise de compostos fenólicos totais

A concentração de polifenóis totais foi determinada pelo método de Folin-Ciocalteu descrito por SINGLETON e ROSSI (1965) modificado. Em tubos falcon, a 40 µL de amostra diluída (1:1 v/v) foram adicionados 3,2 mL de água destilada e 200 µL de reagente de Folin-Ciocalteu. A mistura foi agitada e deixada em ambiente escuro por 5 min, e então foram adicionados 600 µL solução de carbonato de sódio

saturada (17%). A reação ocorreu à temperatura ambiente por 1,5 h, quando foi feita a leitura de absorbância a 765nm em espectrofotômetro UV/VIS. Para quantificação foi empregada uma curva padrão com solução de ácido gálico nas seguintes concentrações: 25, 50, 100, 150, 250 e 500 mg mL⁻¹. Foi calculado um coeficiente de correlação (r^2), resultando $r^2= 0,9977$ ao nível de significância de 5%. O teor de polifenóis totais foi expresso em mg de ácido gálico equivalente (EAG) mL⁻¹.

2.4 Análise de antocianinas monoméricas

A metodologia utilizada na determinação de antocianinas monoméricas dos extratos foi a de diferença de pH, de acordo com GIUSTI e WROLSTAD (2001). Foram elaboradas duas soluções tampão, uma de cloreto de potássio/ácido clorídrico de pH 1,0 (0,025M) e outra de acetato de sódio/ácido clorídrico de pH 4,5 (0,4M). As amostras foram diluídas nas soluções tampão e estabilizadas por 15 min a 4°C. Foram feitas leituras a 510 nm e 700 nm, tanto no tampão pH 1,0 quanto pH 4,5. A leitura a 700 nm é realizada para descontar a turbidez da amostra. O valor da absorbância final foi feito a partir da Equação (8):

$$A = (A_{510nm} - A_{700nm})_{pH1.0} - (A_{510nm} - A_{700nm})_{pH4.5} \quad (8)$$

A concentração total das antocianinas monoméricas foi expressa em mg de cianidina-3-glucosídeo por mL de extrato.

$$AM = \frac{A \cdot PM \cdot FD \cdot 100}{\epsilon \cdot l} \quad (9)$$

onde,

AM = Antocianinas Monoméricas(mg cianidina 3-glucosídeo mL⁻¹);

A = Absorbância;

PM = massa molar da cianidina 3-glucosídeo (449,2 g mol⁻¹);

FD = Fator de diluição (8,5);

ϵ = Absortividade molar da cianidina 3-glucosídeo (26.900 L mol⁻¹ cm⁻¹);

l = caminho óptico da cubeta (1cm);

2.5 Captura do radical ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiasolina-6-ácido sulfônico) (ABTS)

O método de captura do radical ABTS envolve a geração do radical cromóforo ABTS pela oxidação do ABTS com persulfato de potássio (RE *et al.*, 1999). O cátion radical ABTS é produzido através de uma reação entre a solução estoque de ABTS (7 mM) e persulfato de potássio (140 mM concentração final). Esta mistura é mantida no escuro durante 12 h a temperatura ambiente antes do uso. Para o ensaio, a solução ABTS^{*+} foi diluída em tampão fosfato de sódio (5 mM; pH 7) até atingir absorbância de 0,7 ($\pm 0,02$) a 734 nm. Amostras de 10 μ L do extrato foram misturadas com 1 mL da solução diluída de ABTS^{*+} e a absorbância (734 nm) foi acompanhada por 6 min. A porcentagem de inibição da absorbância foi calculada como:

$$A_{antioxidante} = \left(1 - \frac{A}{A_0}\right) \cdot 100 \quad (10)$$

onde A é a absorbância do ensaio, e A₀ é a absorbância do controle.

2.6 Poder quelante de ferro

A atividade quelante de Fe²⁺ é avaliada usando o método descrito por CHANG *et al.*, (2007), com algumas modificações. Alíquotas de 1 mL de amostra foram misturadas com 3,7 mL de água destilada e então adicionadas de 0,1 mL de FeSO₄ (Fe²⁺; 2 mM) e 0,2 mL de ferrozina (5 mM). A mistura foi agitada e, após 10 minutos, a leitura da absorbância a 562 nm foi mensurada. Para o controle usa-se água no lugar da amostra. Os resultados foram expressos como:

$$A_{quelante} = \left(1 - \frac{A}{A_0}\right) \cdot 100 \quad (11)$$

onde A é a absorbância do ensaio, e A₀ é a absorbância do controle.

2.7 Poder redutor

O poder redutor foi avaliado como descrito por ZHU *et al.* (2006). Amostras de 2,5 mL diluídas em tampão fosfato (200 mM, pH 6,6) foram misturadas a 2,5 mL de ferricianeto de potássio 1% e incubadas a 50°C por 20 min. Após 2,5 mL de TCA (10%) foi adicionado e centrifugado (3.000 g por 10 min). O sobrenadante (1 mL) foi misturado com 2,5 mL de água destilada e 0,2 mL FeCl₃ 0,1% e realizada a leitura em espectrofotômetro a 700 nm. A maior absorbância da reação indica um maior poder redutor.

2.8 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata e as médias de dois experimentos independentes foram avaliadas através de análise de variância e posterior teste de Tukey pelo *software Statistica 7.0* (StatSoft Inc., Tulsa, OK). As médias foram consideradas significativamente diferentes quando $p < 0,05$.

3. Resultados e Discussões

A fim de realizar estudos de cinética de extração de compostos fenólicos totais e antocianinas, avaliaram-se inicialmente as melhores condições de *ratio* e concentração de etanol a serem utilizados. Com isso foi realizado um planejamento fatorial 2² e os resultados estão mostrados na Tabela 2.

Para a extração de compostos fenólicos totais, de acordo com a análise de variância (Tabela 3), os efeitos do *ratio* e da concentração de etanol, tanto linear quanto quadráticos, foram significativos ($p < 0,05$).

Tabela 2. Desenho experimental e resultados para extração de compostos fenólicos e antocianinas para diferentes ratios e concentrações de etanol.

| Ratio ^a (x ₁) | Etanol ^b (x ₂) | Extração | |
|--------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| | | Polifenóis totais ^c | Antocianinas monoméricas ^d |
| 22 (-1) | 18 (-1) | 9,429±0,318 | 0,340±0,015 |
| 78 (1) | 18 (-1) | 18,819±1,005 | 0,735±0,045 |
| 22 (-1) | 82 (1) | 12,015±0,247 | 0,362±0,010 |
| 78 (1) | 82 (1) | 18,908±0,875 | 0,647±0,034 |
| 10 (-1,41) | 50 (0) | 4,356±0,110 | 0,139±0,005 |
| 90 (1,41) | 50 (0) | 16,899±0,422 | 0,650±0,009 |
| 50 (0) | 5 (-1,41) | 16,365±0,124 | 0,495±0,017 |
| 50 (0) | 95 (1,41) | 18,867±0,329 | 0,526±0,026 |
| 50 (0) | 50 (0) | 22,613±1,279 | 0,837±0,040 |
| 50 (0) | 50 (0) | 21,971±0,874 | 0,846±0,015 |
| 50 (0) | 50 (0) | 22,350±0,989 | 0,855±0,022 |
| 50 (0) | 50 (0) | 21,265±0,800 | 0,799±0,008 |

^a ratio expresso em mL g⁻¹;

^b concentração de etanol expressa em %;

^c extração expressa em mg AGE g⁻¹;

^d extração expressa em mg cianidina 3-glucosídeo g⁻¹;

A análise de variância mostrou que não houve significância da falta de ajuste do modelo ($p > 0,05$), valor de r^2 de 0,9833 e que, pelo teste F de Fisher, o valor $F_{(5,6)}$ calculado (18,65) foi maior que o valor tabelado ($F_{(5,6)} = 4,39$), demonstrando significância do modelo de regressão (Equação 12).

Tabela 3. Análise de variância para extração de compostos fenólicos para variações de ratio e concentração de etanol.

| Fonte | Soma dos Quadrados | Graus de liberdade | valor-p |
|-----------------|--------------------|--------------------|-----------|
| Ratio (L) | 144,664 | 1 | 0,000253* |
| Ratio (Q) | 196,446 | 1 | 0,000160* |
| Etanol (L) | 4,823 | 1 | 0,033139* |
| Etanol (Q) | 26,629 | 1 | 0,003083* |
| Ratio x Etanol | 1,559 | 1 | 0,122846 |
| Falta de Ajuste | 1,404 | 3 | 0,402437 |
| Erro | 1,030 | 3 | 0,000253 |
| Total | 355,907 | 11 | |

*parâmetros significativos a 95% de confiança.

$$Y_1 = 22,048 + 8,518x_1 - 11,126x_1^2 - 1,555x_2 - 4,097x_2^2 \quad (12)$$

onde Y_1 é a concentração de compostos fenólicos totais extraídos (mg AGE por grama de bagaço), x_1 o ratio (mL g⁻¹) e x_2 a concentração de etanol (%).

Para a extração de antocianinas monoméricas, de acordo com a análise de variância (Tabela 4), os efeitos do ratio, linear e quadrático, e da concentração de etanol quadráticos, foram significativos ($p < 0,05$).

Tabela 4. Análise de variância para extração de antocianinas monoméricas.

| Fonte | Soma dos Quadrados | Graus de liberdade | valor-p |
|-----------------|--------------------|--------------------|-----------|
| Ratio (L) | 0,246 | 1 | 0,000267* |
| Ratio (Q) | 0,262 | 1 | 0,000242* |
| Etanol (L) | 0,000 | 1 | 0,767750* |
| Etanol (Q) | 0,133 | 1 | 0,000663* |
| Ratio x Etanol | 0,003 | 1 | 0,111274 |
| Falta de Ajuste | 0,012 | 3 | 0,078998 |
| Erro | 0,002 | 3 | 0,000267 |
| Total | 0,597 | 11 | |

*parâmetros significativos a 95% de confiança.

A análise de variância mostrou que não houve significância da falta de ajuste do modelo ($p > 0,05$), r^2 de 0,9771 e que, pelo teste F de Fisher, valor de $F_{(5,6)}$ calculado (11,25) foi maior que aquele tabelado ($F_{(5,6)} = 4,39$), demonstrando significância do modelo de regressão, cuja equação obtida é:

$$Y_2 = 0,8341 + 0,351x_1 - 0,4066x_1^2 - 0,2899x_2 \quad (13)$$

onde Y_2 é a concentração de antocianinas monoméricas extraídas (mg de cianidina 3-glucosídeo por grama de bagaço), x_1 o ratio (mL g⁻¹) e x_2 a concentração de etanol (%).

A Figura 1 mostra a plotagem tridimensional dos resultados. É possível verificar que a maior extração de compostos fenólicos totais ocorreu em um intervalo de ratio entre 50 e 64 mL g⁻¹ e concentração de etanol entre 40 e 60% (Figura 1a). Já para as antocianinas monoméricas a maior extração foi obtida entre 50 e 60 mL g⁻¹ e entre 45 e 60 % de etanol (Figura 1b). Com base nestes resultados foram escolhidos para avaliação cinética de extração valores do ponto central: ratio de 50 mL g⁻¹ e concentração de etanol de 50%.

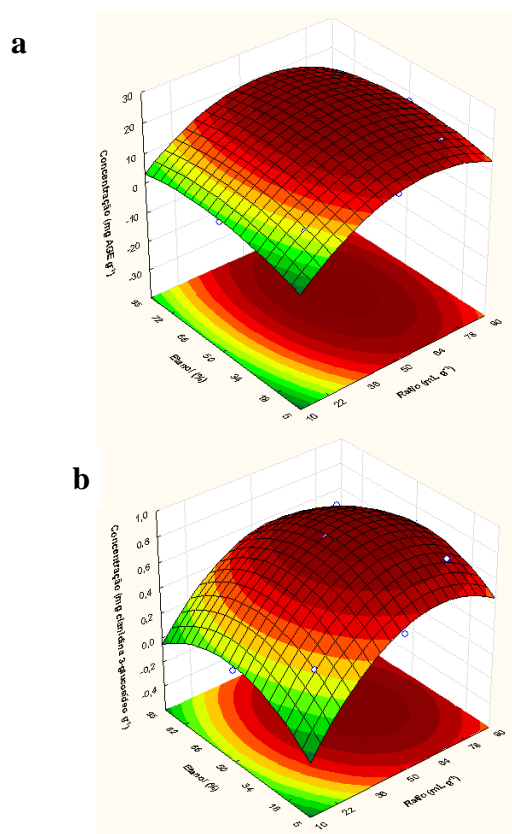


Figura 1. Superfície de resposta para extração de compostos fenólicos totais (a) e antocianinas monoméricas (b) em função da concentração de etanol e do *ratio*.

A combinação de água e solventes orgânicos é geralmente a melhor opção para extração de compostos bioativos. O aumento da concentração de etanol reduz a constante dielétrica do solvente, diminuindo a solvatação das moléculas e com isso, o aumento da sua difusão através da redução da interação com o solvente (CACACE e MAZZA, 2003). O aumento do rendimento de extração com o aumento do *ratio* é consistente com os princípios de transferência de massa. Como a força motriz durante o transporte dos polifenóis dentro do sólido é considerada o gradiente de concentração, quanto maior o volume de solvente em relação à massa de sólido, mais lenta é a diminuição do gradiente de concentração, resultando em aumento da taxa de difusão. Contudo, ocorre um limite do coeficiente de partição dos fenólicos no solvente (CACACE e MAZZA, 2003), ocasionando que o excesso de solvente não influencia o rendimento de extração, mas sim diluindo os bioativos no extrato.

Diversas equações matemáticas têm sido descritas na literatura a fim de modelar a extração de compostos bioativos de plantas. Na Tabela 1 são apresentados os modelos mais utilizados em recentes publicações. A escolha da melhor equação para modelar processos industriais é essencial do ponto de vista da engenharia, a fim de minimizar erros de processamento, assim melhorando a precisão do procedimento e qualidade do produto final. Dados experimentais de extração em intervalo de temperatura entre 25 e 60°C e de tempo entre 5 e 120 min foram adequados aos modelos e analisados criticamente.

Os resultados de r^2 , χ^2 e EPM para os diferentes

modelos são mostrados na Tabela 5 para compostos fenólicos totais, e na Tabela 6, para antocianinas monoméricas.

Tabela 5. Análise de erros para adequação dos dados experimentais a diferentes modelos para extração de compostos fenólicos totais.

| Equação | r^2 | χ^2 | EPM |
|---------|---------------|----------------|-----------------|
| 1 | [0,348;0,610] | [5,837;27,417] | [11,031;51,781] |
| 2 | [0,689;0,890] | [1,644;13,083] | [3,108;24,726] |
| 3 | [0,984;0,999] | [0,010;0,396] | [0,013;0,449] |
| 4 | [0,971;0,996] | [0,109;0,135] | [0,153;0,012] |
| 5 | [0,905;0,980] | [0,362;3,977] | [0,685;7,516] |
| 6 | [0,984;0,999] | [0,008;0,297] | [0,012;0,449] |
| 7 | [0,984;0,999] | [0,008;0,297] | [0,012;0,449] |

Tabela 6. Análise de erros para adequação dos dados experimentais a diferentes modelos para extração de antocianinas.

| Equação | r^2 | χ^2 | EPM |
|---------|---------------|----------------|----------------|
| 1 | [0,432;0,700] | [0,004;0,015] | [0,028;0,079] |
| 2 | [0,864;0,961] | [0,001;0,008] | [0,001;0,015] |
| 3 | [0,854;0,994] | [0,0001;0,009] | [0,002;0,0108] |
| 4 | [0,890;0,991] | [0,001;0,006] | [0,001;0,006] |
| 5 | [0,762;0,946] | [0,002;0,004] | [0,002;0,068] |
| 6 | [0,985;0,999] | [0,00;0,001] | [0,00;0,00] |
| 7 | [0,985;0,999] | [0,00;0,001] | [0,00;0,00] |

Modelos que consideram que a extração de compostos bioativos não atinge uma concentração de equilíbrio ao longo do processo (Equação 1 e 2) não apresentaram bom ajuste aos dados experimentais, tanto para análise de compostos fenólicos totais quanto para antocianinas monoméricas. Modelos que representam a extração acontecendo em duas taxas, como Equação 3 e 4, renderam baixos valores de r^2 e altos valores de χ^2 e EPM, tanto para extração de polifenóis totais quanto para antocianinas monoméricas. A equação proposta por LINARES *et al.* (2010), por exemplo, é baseada na suposição de que a extração ocorre primeiramente devido ao mecanismo de lavagem e inchaço do material e posteriormente processos difusivos regem o transporte dos compostos para o solvente. O modelo de Peleg (1998) (Equação 5), utilizado por BUCIC-KOJIC *et al.* (2007), baseado em curvas de sorção/dessorção, também não foi o modelo que melhor se adequou aos dados experimentais para as duas classes de polifenóis analisadas, como mostram os resultados na Tabela 6.

Os modelos que melhor se adequaram aos dados experimentais foram o de pseudo-primeira ordem (Equação 6) e o proposto por MINCHEV e MINKOV (1984) (Equação 7), não havendo dados conclusivos para escolha da melhor equação que representa a operação de extração. Os valores das taxas de extração (valores k)

aumentaram com o aumento da temperatura de processamento para ambos os modelos. Os valores k para a equação de pseudo-primeira ordem variaram entre 0,0399 e 0,1308 min^{-1} para compostos fenólicos totais e entre 0,034 e 0,157 min^{-1} (na faixa de temperatura de 25-60°C) para antocianinas monoméricas, valores idênticos àqueles estimados para o modelo de Minchev e Minkov. Já para o modelo de Minchev e Minkov os valores k aumentaram no intervalo entre 0,040 e 0,080 min^{-1} para compostos fenólicos totais na faixa de temperatura de 25-60°C.

Em processos industriais, além da modelagem da concentração de compostos bioativos no solvente em função do tempo, o equacionamento do processo em função da temperatura é importante. Muitos estudos mostram que constantes estimadas em tratamentos cinéticos em função da temperatura geralmente seguem a equação de Arrhenius:

$$\ln(k) = \ln(k_0) - \frac{E_a}{RT} \quad (14)$$

onde k_0 é constante de Arrhenius, R a constante universal dos gases ($8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) e E_a é a energia de ativação (J mol^{-1}) e T é a temperatura absoluta.

Os dados estão representados na Figura 2. A modelagem das taxas de extração estimadas pela equação de pseudo-primeira ordem renderam r^2 de 0,900 para compostos fenólicos e as calculadas pelo modelo de Minchev e Minkov, r^2 de 0,701. Para as antocianinas monoméricas os valores das taxas estimados foram idênticos para os ambos modelos, sendo o coeficiente de correlação à equação de Arrhenius de 0,827.

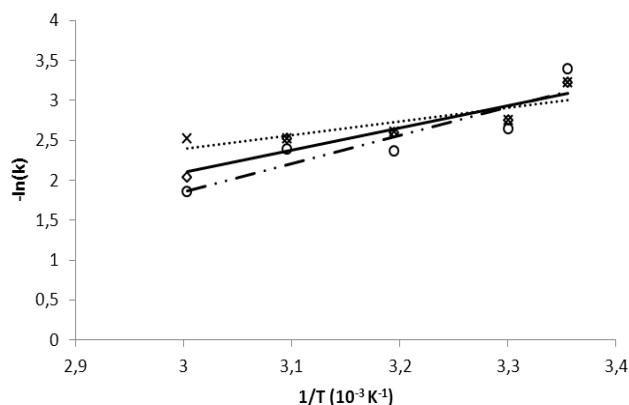


Figura 2. Adequação das taxas de extração à equação de Arrhenius. "x" valores de k do modelo de Monchev e Minkov para compostos fenólicos totais ($r^2=0,701$); "o" valores de k do modelo de pseudo-primeira ordem para compostos fenólicos totais ($r^2=0,900$); "o" valores de k do modelo de pseudo-primeira ordem e de Minchev e Minkov para antocianinas monoméricas ($r^2=0,827$).

Como o binômio tempo-temperatura é relevante na indústria, o modelo de pseudo-primeira ordem é o mais indicado para representar a extração em batelada de compostos fenólicos totais e antocianinas monoméricas de bagaço de uva, nas condições estudadas. A barreira

energética a ser superada para que o processo ocorra (E_a) é de $29,5 \text{ kJ mol}^{-1}$ para antocianinas e de 23 kJ mol^{-1} para os compostos fenólicos.

A extração, tanto para compostos fenólicos quanto para antocianinas, ocorre inicialmente de forma exponencial até atingir uma concentração de equilíbrio, como mostra a Figura 3.

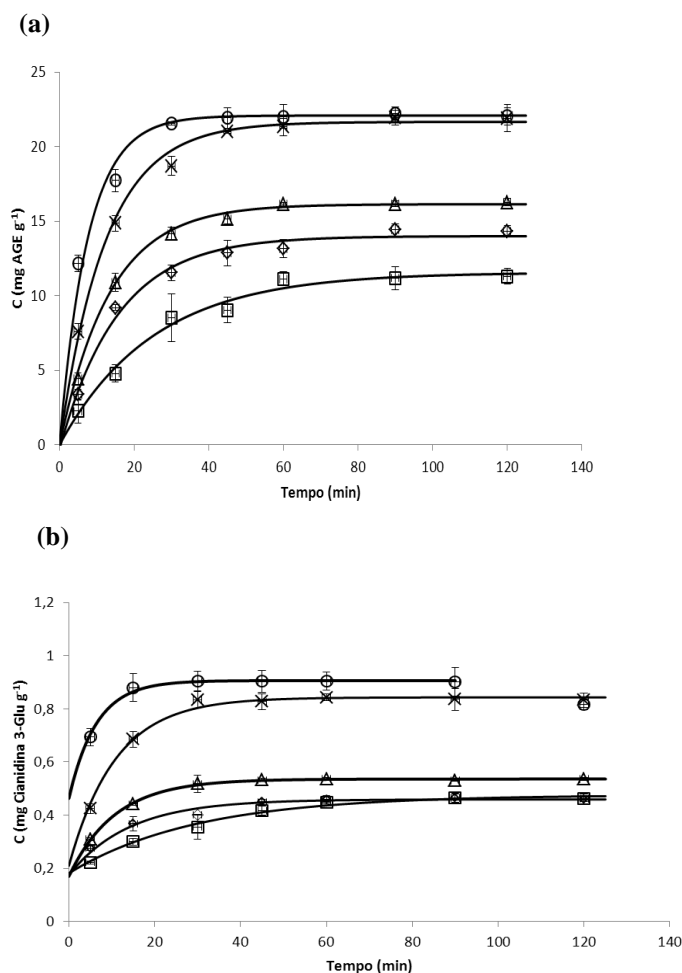


Figura 3. Adequação dos dados de extração de compostos fenólicos totais (a) e antocianinas monoméricas (b) ao modelo de pseudo-primeira ordem a 60 (o), 50 (x), 40(Δ), 30 (\diamond) e 25 (\square).

Na Tabela 7 estão apresentados os parâmetros estimados pela regressão não-linear dos dados experimentais à equação pseudo-primeira ordem para os compostos fenólicos totais.

Tabela 7. Parâmetros cinéticos de extração de compostos fenólicos totais em função da temperatura.

| T (°C) | C_∞ (mg g ⁻¹) | k (min ⁻¹) | a^* | $t_{1/2}$ (min) |
|--------|----------------------------------|--------------------------|--------|-----------------|
| 60 | 22,084±5,112 ^a | 0,130±0,005 ^a | -0,325 | 5,324±0,211 |
| 50 | 21,660±5,862 ^a | 0,081±0,001 ^b | -0,140 | 8,577±0,156 |
| 40 | 16,137±0,455 ^b | 0,075±0,005 ^b | -0,437 | 9,337±0,359 |
| 30 | 13,995±0,271 ^c | 0,064±0,003 ^c | -0,022 | 11,019±0,623 |
| 25 | 11,557±1,080 ^d | 0,040±0,003 ^d | -0,002 | 17,402±0,245 |

*valores dos desvios padrão sempre menor que 4%.

As concentrações de equilíbrio para o processo ocorrendo a 25, 30 e 40°C foram de 11,55, 14,00 e 16,14 mg AGE g⁻¹, respectivamente ($p < 0,05$). Já a 50 e 60°C, houve extração de 21,66 e 22,08 mg AGE g⁻¹, não sendo os dados significativamente diferentes ($p > 0,05$). Contudo a taxa de extração a 60°C foi significativamente maior que a 50°C, sendo a concentração de equilíbrio atingida em 30 min na primeira temperatura e em 45 min para a segunda. Esses dados podem ser visualizados na Figura 3.

Os valores de tempo de meia extração ($t_{1/2}$), calculados pela equação 15, aumentaram com o aumento da temperatura, variando entre 5,32 e 17,38 min na faixa de temperatura de 25-60°C.

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2 - a)}{k} \quad (15)$$

A análise da extração de antocianinas monoméricas mostrou que a concentração de equilíbrio para o processo a 25 e 30°C não diferiram significativamente ($p < 0,05$), estando os valores entre 0,476, 0,459 mg cianidina 3-glucosídeo g⁻¹ (Tabela 8). Já a 50 e 60°C, houve extração de 0,843 e 0,906 mg cianidina 3-glucosídeo g⁻¹ ($p > 0,05$). A extração a 60°C por 120min, contudo, mostrou valores de antocianinas monoméricas de 0,838 mg cianidina 3-glucosídeo g⁻¹, provavelmente devido ao início do processo de degradação térmica do composto no extrato. A mais alta taxa de extração (0,157 min⁻¹) ocorreu a 60°C. As taxas de extração a 40 e 50 °C foram de 0,0937 e 0,0924 min⁻¹, não diferindo estatisticamente ($p > 0,05$). Os valores $t_{1/2}$ variaram entre 1,589 e 12,435 min na faixa de temperatura de 25-60°C.

Tabela 8. Parâmetros cinéticos de extração antocianinas monoméricas em função da temperatura.

| T (°C) | C _∞ (mg g ⁻¹) | k (min ⁻¹) | a* | t _{1/2} (min) |
|--------|--------------------------------------|--------------------------|-------|------------------------|
| 60 | 0,907±0,027 ^a | 0,157±0,003 ^a | 0,716 | 1,591±0,071 |
| 50 | 0,843±0,015 ^b | 0,092±0,001 ^b | 0,287 | 5,827±0,035 |
| 40 | 0,536±0,002 ^c | 0,093±0,002 ^b | 0,382 | 5,135±0,029 |
| 30 | 0,459±0,017 ^d | 0,071±0,001 ^c | 0,480 | 5,881±0,054 |
| 25 | 0,476±0,005 ^d | 0,034±0,001 ^d | 0,048 | 12,435±0,345 |

*valores de desvio padrão sempre menores que 4,3%.

O aumento do rendimento e da taxa de extração, tanto de compostos fenólicos quanto de antocianinas, está ligado ao aumento da energia interna das moléculas e à redução da viscosidade dinâmica do solvente (CACACE e MAZZA, 2003). Contudo, a temperatura de processamento não pode ser aumentada indefinidamente, pois compostos bioativos são reativamente termo-lábeis, podendo ocorrer sua degradação em temperaturas muito elevadas.

O bagaço de uva, além de apresentar grandes quantidades de compostos fenólicos na sua composição, é uma interessante fonte de fibras, mostrando que este resíduo é um potencial componente funcional a ser utilizado na formulação de novos alimentos. SAURA-CALIXTO (1998), identificou fibras no bagaço de uva com

características estruturais diferentes das conhecidas, creditando ao fato delas estarem associadas com compostos fenólicos. Neste trabalho o autor sugere a existência de uma nova classe de fibra, denominada fibra alimentar antioxidante, devido aos compostos fortemente ligados à estrutura do resíduo. Neste sentido, foram avaliados os efeitos de extrações sucessivas e da extração de componentes fortemente ligados ao resíduo no rendimento de compostos fenólicos, antocianinas e de atividades biológicas desses extratos.

A Tabela 9 estão resumidos dados encontrados. É possível verificar que duas extrações são suficientes para extrair polifenóis e antocianinas extraíveis com etanol. É possível observar que 86,35% dos compostos fenólicos e 92% das antocianinas monoméricas extraíveis com solvente saem na primeira extração. Do valor total de compostos extraídos (soma das duas extrações com solvente e da extração ácida), 55,64% dos compostos fenólicos e 33,86% das antocianinas monoméricas estão fortemente ligados no bagaço e são extraídos apenas em condições de forte força iônica e altas temperaturas.

Tabela 9. Concentração de polifenóis e antocianinas, atividade antioxidante e quelante e poder redutor de extratos do bagaço para diferentes etapas de extração.

| | Primeira extração | Segunda extração | Extração ácida |
|--|-------------------|------------------|----------------|
| Polifenóis totais (mg g ⁻¹) | 24,155±1,113 | 3,875±0,134 | 35,557±1,27 |
| Antocianinas monoméricas (mg g ⁻¹) | 0,925±0,363 | 0,081±0,004 | 0,515±0,047 |
| ABTS (%) | 79,051±3,245 | 43,812±1,535 | 76,115±2,24 |
| Atividade Quelante (%) | 11,102±0,526 | 9,659±0,171 | 79,904±2,51 |
| Poder Redutor (Abs 600nm) | 2,122±0,028 | 1,504±0,043 | 2,520±0,031 |

KAPAKASALIDIS *et al.* (2006) também verificaram grande concentração de antocianinas, polifenóis e de compostos com atividade sequestrante do radical ABTS estão fortemente ligados no bagaço de amora preta e não são extraíveis com solvente. Neste estudo, os autores ainda observaram que apenas fenólicos do grupo dos ácidos hidroxicinâmicos (taninos, ácido gálico) são liberados após condições de alta força iônica e que compostos do grupo dos flavonoides (catequinas, antocianinas) não estão ligados fortemente no resíduo. Isso é uma provável consequência da associação de compostos fenólicos com polímeros da parede celular de células vegetais (REVILLA *et al.*, 1998). REVILLA *et al.* (1998) verificou que antocianinas não-aciladas (delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina e malvinidina) de bagaço de uva são extraíveis em grande quantidade em condições ácidas, possivelmente devido à hidrólise parcial dese compostos gerando antocianidinas no extrato.

Na Tabela 9 também se observa que o extrato obtido na primeira etapa apresenta alto poder de capturar radiais ABTS e relativamente baixo poder quelante e redutor. Contudo, os compostos iônicamente ligados ao bagaço, apresentam alta capacidade antioxidante de ABTS, alto poder quelante e mais elevado poder redutor que aqueles extraíveis por etanol. Estes resultados confirmam o que foi afirmado por SAURA-CALIXTO

(1998), onde afirma que ligado às fibras do bagaço de uva existe alta concentração de compostos com atividade antioxidante. no presente estudo, ainda, é mostrado que a maior parte dos compostos com atividade quelante de ferro e com poder redutor está ligada fortemente ao resíduo. Estes resultados trazem uma grande perspectiva para o desenvolvimento de produtos com a utilização de bagaço de uva em sua composição, potencialmente enriquecendo alimentos com um produto de baixo custo e rico em compostos bioativos.

4. Conclusão

O estudo cinético de extração de compostos fenólicos e de antocianinas de bagaço de uva é primordial para entender os fenômenos envolvidos no seu processamento e melhor dimensionar os equipamentos de em plantas industriais. Etanol em concentração de 50% em uma relação de 50 mL por grama de bagaço de uva resultou em maior extração dos compostos do resíduo da indústria suqueira. O modelo de pseudo-primeira ordem foi o modelo que melhor representou a extração em sistema de batelada na faixa de temperatura de 25-60°C, com energia de ativação do processo de 23 kJ mol⁻¹ para compostos fenólicos e de 29,5 kJ mol⁻¹ para antocianinas monoméricas. Grande parte dos polifenóis está fortemente ligada ao bagaço e não é extraível com solvente, assim como grande parte dos bioativos com atividade antioxidante, poder redutor e atividade quelante está ligada. Os resultados desse trabalho mostram o bagaço de uva como potencial componente funcional a ser utilizado tanto na indústria de alimentos quanto na agricultura familiar;

5. Referências

AMENDOLA, D.; DE FAVERI, D.M.; SPIGNO, D.F. Grape marc phenolics: Extraction kinetics, quality and stability of extracts. *Journal of Food Engineering*, 97, 384–392, 2010.

CACACE, J.E.; MAZZA, G. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering*, v.59, p.379-389, 2003

CHANG, C.-Y., WU, K.-C., & CHIANG, S.-H. Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates. *Food Chemistry*, 100, 1537-1543, 2007.

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

GIUSTI, M.M.; WROLSTAD, R.E. Anthocyanins: characterization and measurement with UV-visible spectroscopy. In: Wrolstad RE, Schwartz SJ, editors. *Current protocols in food analytical chemistry*. N.Y.:Wiley. p 1–13, 2001.

ISHIMOTO, E.Y. *Efeito hipolimiante e antioxidante de subprodutos de uva em hamsters*. Tese de doutorado, USP, SP, Brasil, 2008.

KAPAKASAKASALIDIS, P.G; RASTALL, R.A.; GORDON, M.H. Extraction of polyphenols from

processed black currant (*Ribes nigrum* L.) residues. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.54, p. 4016-4021, 2006.

KARACABEY, E.; MAZZA, G. Optimization of antioxidant activity of grape cane extracts using surface response methodology. *Food Chemistry*, v.119, p. 343-348, 2010.

KARVELA, E.; MAKRIS, D.P.; KALOGEROPOULOS, N.; KARATHANOS, V.T. Development of response surface methodology to optimise recovery of grape (*Vitis vinifera*) stem polyphenols. *Talanta*, v.79, p.1311-13-21, 2009.

Linares, A.R., Hase, S.L., Vergara, M.L., Resnik, S.L., 2010. Modeling yerba mate aqueous extraction kinetics: Influence of temperature. *J. Food Eng.* 97, 471-477.

LIU, D.; VOROBIEV, E.; SAVOIRE, R.; LANOISELLÉ, J.L. Intensification of polyphenols extraction from grape seeds by high voltage electrical discharges and extract concentration by dead-end ultrafiltration. *Separation and Purification Technology*, v.81, p.134-140, 2011.

MARTINELLO, M.; HECKER, G.; PRAMPARO, M.C. Grape seed oil deacidification by molecular distillation: analysis of operative variables influence using the response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, v.81, p.60-64, 2007.

O' BYRNE, D. J.; DEVARAJ, S.; GRUNDY, S.M.; JIALAL, I. Comparison of the antioxidant effects of Concord grape juice flavonoid and tocoferol on markers of oxidative stress in healthy adults. *American Journal of Clinical Nutrition*. v.76, n. 6, 1367-1374, 2002.

PELEG, M. An empirical model for the description of moisture sorption curves. *Journal of Food Science*, v.53, n.4, p.1216–1219, 1998.

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

SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant dietary fiber product: a new concept and a potential food ingredient. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.46, 4603-4606, 1998.

SEGADE, S.R.; VÁZQUEZ, E.S.; LOSADA, E.D. Influence of ripeness grade on accumulation and extractability of grape skin anthocyanins in different cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 21, p. 599-607, 2008.

SIMEONOV, E.; MINCHEV, MINCHEV, T.A. Solid-liquid extraction from plants – experimental kinetics and modeling. *Chemical Engineering Journal*, v.73, n.3, p.255-259, 1999.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 16, p. 144- 158, 1965.

SPIRO, M.; JAGO, D.S. Kinetics and equilibria of tea infusion. Part 3. Rotating disc experiments

interpreted by a steady-state model. *Journal of Chemical Society Faraday Transaction*, v.78, n.1, p.295–305, 1982.

STEINMETZ, K.A.; POTTER, J.D. Vegetables, fruits and cancer prevention: a review. *Journal of the American Dietetic Association*, v. 96, p. 1027-2039, 1996.

REVILLA, E.; RYAN, J.M.; MARTÍN-ORTEGA, G. Comparison of several procedures used for extraction of anthocyanins from red grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.46, p.4592-4597, 1998.

VAN BOEKEL, M.A.J.S. Kinetic modeling of food quality: A critical Review. *Critical Reviews in Food Science and Food Safety*, v.7, p.144-158, 2008.

ZHU, K.; ZHOU, H.; QIAN, H. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochemistry*, v.41, p.1296-1302, 2006.