

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC
CENTRO TECNOLÓGICO – CTC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
ALIMENTOS**

DANIELA ALVES DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E BIOLÓGICA DE
EXTRATOS OBTIDOS DE BAGAÇO DE UVA (*VITIS VINIFERA*)
DAS VARIEDADES *MERLOTE* E *SYRAH***

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Sandra Regina Salvador Ferreira

**Florianópolis/SC
2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC
CENTRO TECNOLÓGICO – CTC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
ALIMENTOS**

DANIELA ALVES DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E BIOLÓGICA DE
EXTRATOS OBTIDOS DE BAGAÇO DE UVA (*VITIS VINIFERA*)
DAS VARIEDADES *MERLOT* E *SYRAH***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Área de concentração:
Desenvolvimento de Processos na Indústria de Alimentos.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Sandra Regina Salvador Ferreira

**Florianópolis/SC
2010**

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo o que sou e por ter me dado forças ao longo do caminho.

À minha orientadora, Profa. Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira pela orientação, dedicação, paciência e incentivo que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação de Engenharia de Alimentos, pelos ensinamentos, em especial, aos professores Dr. Haiko Hense e Dr. Julian Martínez pelas orientações técnicas e momentos de descontração com os colegas de laboratório.

À Prof^a Dr^a Alcilene R. M. Fritz e à secretária Raquel C. Agostineto, pela competência e apoio fundamentais na Coordenação do Curso de Pós-Graduação de Engenharia de Alimentos.

Aos professores Dr. Artur Smânia Júnior, Dra. Elza de Fátima Albino Smânia e ao Dr. Marcelo Maraschin pelas gentis colaborações neste trabalho.

Aos membros da banca examinadora pelas excelentes contribuições.

À Miolo Wine Group pela doação da matéria-prima.

Aos diretores da empresa Maroma Ind. e Com. de Sorvetes Ltda, pelo apoio e compreensão dispensados no decorrer deste ano de 2010.

Aos meus colegas da Pós-Graduação e colegas do LATESC, pela troca de experiências, estudos compartilhados, companheirismo e momentos de descontração.

Em especial às amigas: Marta, Kátia, Natália, Susana, Darlene e Sílvia por todos os momentos que passamos juntas, que, de alguma forma, se transformaram em diversão.

Um “super” agradecimento a minha “amigona”, Pati, por ter sido meu “anjo-da-guarda” durante este mestrado, por sua grande amizade, por toda ajuda e companheirismo.

Às alunas de iniciação científica que trabalharam comigo, Ana Augusta Salvador e Karolina Mandella, pela dedicação.

À minha melhor amiga, Elaine, por entender minha ausência, em muitos momentos, durante o tempo do mestrado.

Ao meu namorado, Diogo, pelo amor e carinho e pela paciência e compreensão nos vários finais de semana dedicados ao mestrado.

Principalmente, aos meus pais, Elson e Isabel, pelo amor, educação, incentivo, compreensão e apoio incondicionais dados durante toda a minha vida.

A todos que, de alguma forma, contribuíram e torceram por mim e pelo sucesso deste trabalho.

*“Conhecer não é demonstrar nem explicar, é
aceder à visão.”*

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

Este trabalho alia dois interesses distintos da sociedade atual que se refletem nos esforços empregados pelas indústrias alimentícias e farmacêuticas: reaproveitamento de resíduos industriais através de tecnologias que sejam ambientalmente seguras e que garantam a qualidade dos produtos; e o consumo de produtos compostos por ingredientes naturais que ofereçam benefícios para a saúde humana. A extração supercrítica (ESC) é uma tecnologia que vem se destacando dentre os demais métodos de extração por sua seletividade, por empregar baixas temperaturas e por produzir um extrato livre de resíduos de solventes, garantindo assim extratos de alta qualidade em compostos de interesse, além de a técnica ser considerada segura para o meio ambiente. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi a aplicação desse método de extração na obtenção de extratos de bagaço de uva das variedades *Merlot* e *Syrah* em diferentes temperaturas e pressões de operação e avaliar rendimento, composição, atividade antioxidante e antimicrobiana. Os resultados obtidos com o CO₂ supercrítico puro e adicionando co-solvente a ele foram comparados com os resultados de técnicas de extração à baixa pressão, Soxhlet e maceração com ultrassom, utilizando diferentes solventes (etanol, acetato de etila, hexano e água). A extração supercrítica foi conduzida com pressões entre 150 e 300 bar, temperatura de 50 e 60 °C e vazão de CO₂ de 13 ± 2 g/min durante 4 h. A cinética da extração supercrítica e a modelagem matemática também foram estudadas, sendo o modelo de Martínez et al (2003) o que melhor se ajustou aos dados experimentais. A ESC proporcionou rendimentos de até $5,2 \pm 0,6$ % para a condição de 300 bar e 60 °C com CO₂ puro para a variedade *Merlot*, e inversão das isotermas de rendimento entre 175 e 180 bar. Com a adição de co-solvente ao CO₂ na condição de 250 bar e 60 °C, o rendimento máximo foi de $13,31 \pm 0,04$ % com 15 % de etanol, também para a variedade *Merlot*. Para as extrações à baixa pressão, o maior rendimento obtido pelo método Soxhlet foi $14,6 \pm 0,2$ %, com etanol, enquanto para a técnica com ultrassom foi 12 ± 1 % utilizando água como solvente para as variedades

Merlot e *Syrah*, respectivamente. O maior teor de compostos fenólicos, avaliado pelo método de Folin-Ciocalteu, foi encontrado para o extrato de bagaço de uva *Merlot* obtido por extração Soxhlet com etanol (118 ± 2 mg GAE/g). O menor valor de EC_{50} (concentração de extrato que neutraliza 50 % dos radicais livres), determinado pelo método do radical DPPH, também foi apresentado por um extrato de Soxhlet com etanol, mas, dessa vez, para a variedade *Syrah* (158 ± 2 µg/mL). A maior atividade antioxidante, determinada pelo método de descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoléico, foi apresentada pelo extrato supercrítico obtido a 150 bar e 50 °C com CO₂ puro para a variedade *Merlot* (66 ± 2 %). Na avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar, os extratos supercríticos obtidos com CO₂ puro apresentaram desempenho muito acima dos demais extratos. O extrato obtido na condição de 300 bar e 50 °C apresentou melhor resultado para a atividade antimicrobiana, determinada por microdiluição em meio líquido, inibindo o crescimento de *S. aureus* com 625 µg de extrato/mL. Os compostos identificados pela análise cromatográfica líquida de alta eficiência (HPLC) em um maior número de amostras foram ácido gálico, ácido p-OH-benzóico, ácido vanílico e epicatequina. Apesar dos menores rendimentos obtidos pela extração supercrítica quando comparados com as técnicas a baixa pressão, os resultados das análises utilizadas para a avaliação da qualidade dos extratos mostram a importância dessa tecnologia para a obtenção de extratos naturais com atividade biológica.

ABSTRACT

The present work combines two distinct interests of modern society that reflect on the efforts made by food and pharmaceutical industries: reuse of industrial waste through environmentally safe technologies that can assure the products quality and the consumption of natural products that offer health benefits. The supercritical fluid technology stands out among other extraction methods due to its selectivity, to the use of low temperatures, to produce high quality extracts related to compounds of interest and free of solvent residues and to be considered environmentally safe. Considering this advantages, the aim of this study was to apply this technique to obtain grape pomace extracts under different conditions to evaluate its performance by yield, extract composition, antioxidant and antimicrobial activities, besides comparing the results from pure supercritical CO₂ extraction to the same process with the addition of a co-solvent to CO₂ and to low pressure extraction techniques (Soxhlet and ultrasonic extraction) using different solvents (ethanol, water, ethyl acetate and hexane). It was used pomace from two grape cultivars, *Merlot* and *Syrah*. The supercritical fluid extraction (SFE) was conducted with pressures between 150 and 300 bar, temperatures of 50 e 60 °C and CO₂ flow rate of 13 ± 2 g/min during 4 h. The SFE kinetics and mathematical modeling were also studied. Martínez et al. (2003) model presented the best fit to experimental data. The SFE yields reached values up to $5,2 \pm 0,6$ % (w/w) for extraction with pure CO₂ at 300 bar and 60 °C to *Merlot* pomace and isoterms crossover between 175 e 180 bar. When a co-solvent was added to the extraction at 250 bar/50 °C, the maximum yield was $13,31 \pm 0,04$ % at 15 % ethanol, also to *Merlot* pomace. For the low pressure techniques, the best yield of Soxhlet extractions was obtained with ethanol, $14,6 \pm 0,2$ % (*Merlot*), and for ultrasonic extraction the water provided the highest yield, 12 ± 1 % (*Syrah*). The highest total phenolic content, evaluated by the Folin-Ciocalteu technique, was obtained for the *Merlot* pomace extract from Soxhlet extraction with ethanol (118 ± 2 mg GAE/g). Using DPPH radical method, the best EC₅₀ results (extract concentration that

neutralizes 50 % of free radicals) were obtained for *Syrah* pomace extract from Soxhlet extraction with ethanol (158 ± 2 $\mu\text{g/mL}$). For the β -carotene/linoleic acid bleaching method the highest antioxidant activity was presented by the supercritical extract obtained at 150 bar and 50 °C with pure CO₂ for *Merlot* pomace (66 ± 2 %). On the evaluation of antimicrobial activity by the agar diffusion method, the supercritical extracts showed performance well above the other extracts. The extract obtained at 300 bar and 50 °C presented the best antimicrobial activity by microdilution method, inhibiting growth of *S. aureus* with 625 μg of extract/mL. The main substances identified by HPLC analysis were galic acid, p-OH-benzoic acid, vanillic acid and epicatechin. Despite the lower yields obtained by supercritical fluid extraction when compared with the low pressure techniques, the results of the tests used to evaluate the quality of the extracts showed the importance of this technology to obtain natural biological active extracts.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma simplificado do processo de vinificação.	36
Figura 2 - Distribuição majoritária dos principais compostos fenólicos na uva.....	40
Figura 3 - Exemplos de ácidos benzóicos (a) e cinâmicos (b)...	46
Figura 4 - Estrutura genérica dos flavonóides.	47
Figura 5 - Estrutura genérica das principais classes de flavonóides.	47
Figura 6 - Estrutura química básica das antocianinas.....	49
Figura 7 - Estrutura do <i>trans</i> -resveratrol.....	50
Figura 8 - Representação genérica do diagrama de fases de um componente puro.....	63
Figura 9 - Diagrama esquemático da extração supercrítica de matrizes sólidas.....	65
Figura 10 - Curva de cinética de extração.....	68
Figura 11 - Bagaço de uva <i>in natura</i> no recebimento.....	78
Figura 12 - Extrator Soxhlet convencional.....	81
Figura 13 - Equipamento de extração supercrítica.....	84
Figura 14 - Diagrama esquemático da unidade de extração supercrítica.....	84
Figura 15 - Curva experimental de extração com fluido supercrítico de óleo de bagaço de uva <i>Merlot</i> a 150 bar, 50 °C e 8 ± 2 g/min de CO ₂	109

Figura 16 - Curva experimental de extração com fluido supercrítico de óleo de bagaço de uva <i>Merlot</i> a 150 bar, 50 °C e 13 ± 2 g/min de CO ₂	110
Figura 17 - Comportamento das isotermas de rendimento com a pressão de extração para a ESC do bagaço de uva <i>Merlot</i>	117
Figura 18 - Efeito da fração de etanol adicionada como co-solvente no rendimento da ESC de extrato de bagaço de uva <i>Merlot</i>	122
Figura 19 - Curva de ESC de extrato de bagaço de uva <i>Merlot</i> experimental e modelada a 150 bar, 50 °C e vazão de 13 ± 2 g/min de CO ₂	126
Figura 20 - Estrutura molecular da epicatequina e dos ácidos tânico e vanílico.....	156
Figura 21 - Curva padrão de ácido gálico.....	207
Figura 22 - Cromatograma relativo ao extrato de bagaço de uva <i>Merlot</i> obtido com CO ₂ puro a 250 bar e 60 °C.	208
Figura 23 - Cromatograma relativo ao extrato de bagaço de uva <i>Syrah</i> obtido com CO ₂ puro a 250 bar e 60 °C.....	209

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Resumo dos ensaios realizados.....	102
Quadro 2 - Perfil de composição dos extratos de bagaço de uva determinado por HPLC para compostos fenólicos, em mg GAE/g extrato.....	153

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produção de uvas no Brasil entre 2006 e 2009, em toneladas.....	32
Tabela 2 - Produção de vinhos, sucos e derivados no Rio Grande do Sul, em mil litros, entre 2006 e 2009.	33
Tabela 3 - Produção de vinhos e suco de uva no Estado de Santa Catarina, em mil litros, entre 2006 e 2009.	33
Tabela 4 - Índice de polaridade de solventes utilizados nos processos de extração a baixa pressão.....	55
Tabela 5 - Temperatura e pressão críticas de misturas CO ₂ -etanol (calculado por Software SF-Solver, ISCO Inc., Lincoln, NE, USA).	72
Tabela 6 - Pressão, temperatura e densidade críticas de solventes.	73
Tabela 7 - Dados de umidade do bagaço e condições de secagem.	106
Tabela 8 - Caracterização da partícula e do leito de partículas formado para a extração supercrítica.	108
Tabela 9 - Parâmetros cinéticos da extração com fluido supercrítico do bagaço de uva <i>Merlot</i> realizada a 150 bar, 50 °C e 13 ± 2 g/min de CO ₂	111
Tabela 10 - Valores de rendimento global (X ₀) obtidos para as extrações a baixa pressão de bagaço de uvas <i>Merlot</i> e <i>Syrah</i> com diferentes solventes e respectivos índices de polaridade.	112

Tabela 11 - Resultados de rendimento global (X_0) obtidos para a ESC de bagaço de uva *Merlot* com vazão de CO_2 de 13 ± 2 g/min e valores de densidade do CO_2 para cada condição. 114

Tabela 12 - ANOVA para a avaliação dos efeitos da temperatura (T), de 50 °C a 60 °C, e pressão (P), de 200 bar a 300 bar, sobre o rendimento da ESC de bagaço de uva *Merlot*..... 116

Tabela 13 - Valores de rendimento global (X_0) da ESC do bagaço das uvas *Merlot*, *Syrah* e *Cabernet Sauvignon* a 250 bar, 60 °C e vazão de CO_2 de 13 ± 2 g/min. 118

Tabela 14 - Valores de rendimento global (X_0) da ESC do extrato de bagaço de uva *Merlot* com diferentes frações mássicas de co-solvente na condição de 250 bar, 60 °C e vazão de CO_2 de 13 ± 2 g/min..... 121

Tabela 15 - Coeficientes, parâmetros ajustáveis e erros médios quadráticos (EMQ) da modelagem matemática da ESC do bagaço de uva *Merlot* a 150 bar, 50 °C e vazão de 13 ± 2 g/min de CO_2 127

Tabela 16 - Conteúdo de fenólicos total (TFT), expressos em equivalentes de ácido gálico (GAE), para os extratos de bagaço de uva e BHT. 132

Tabela 17 - Avaliação do potencial antioxidante dos extratos de bagaço de uva através do método DPPH, expressos através da concentração efetiva a 50 % (EC_{50}), e comparação com o BHT. 138

Tabela 18 - Avaliação do potencial antioxidante dos extratos de bagaço de uva e BHT através do método de descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoléico, expressos através do percentual de atividade antioxidante (% AA), após 120 minutos de reação. 141

Tabela 19 - Resultados do teste de difusão em ágar expressos em tamanho do halo de inibição (mm) para os extratos de bagaço de uva.....	145
Tabela 20 - Valores da concentração mínima inibitória (CMI) para os extratos de bagaço de uva determinados pelo método de microdiluição para <i>S. aureus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i>	148
Tabela 21 - Tempos de extração, massas, massas acumuladas e rendimentos do experimento cinético a 150bar, 50°C e 13 ± 2 g CO ₂ /min.	204
Tabela 22 - Dados experimentais de absorvância em função da concentração da solução de ácido gálico.	206
Tabela 23 - Compostos identificados e tempos de retenção relativos ao extrato de bagaço de <i>Merlot</i> obtido com CO ₂ puro a 250 bar e 60 °C.	208
Tabela 24 - Compostos identificados e tempos de retenção relativos ao extrato de bagaço de <i>Syrah</i> obtido com CO ₂ puro a 250 bar e 60 °C.	209

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 OBJETIVOS	29
2.1 OBJETIVO GERAL	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
3.1 UVA, VINIFICAÇÃO E BAGAÇO	31
3.1.1 <i>Uva Merlot</i>	34
3.1.2 <i>Uva Syrah</i>	35
3.1.3 <i>Vinificação</i>	35
3.1.4 <i>Bagaço</i>	38
3.2 ANTIOXIDANTES	41
3.2.1 <i>Compostos fenólicos</i>	43
3.2.1.1 Ácidos fenólicos	45
3.2.1.2 Flavonóides.....	47
3.2.1.2.1 Antocianinas.....	48
3.2.1.3 Estilbenos	49
3.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	52
3.4 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO.....	54
3.4.1 <i>Extração Soxhlet</i>	58
3.4.2 <i>Maceração ultrassônica</i>	59
3.4.3 <i>Extração supercrítica (ESC)</i>	62
3.4.3.1 Curvas de extração.....	67
3.4.3.2 Fluidos Supercríticos	70
3.4.3.3 Modelos Matemáticos.....	74
4 MATERIAIS E MÉTODOS	77
4.1 MATÉRIA-PRIMA	78
4.1.1 <i>Determinação do teor de umidade e substâncias voláteis</i>	78
4.1.2 <i>Pré-tratamento</i>	79

4.2 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO.....	80
4.2.1 Extração Soxhlet	80
4.2.2 Extração com ultrassom.....	82
4.2.3 Extração supercrítica (ESC).....	83
4.2.3.1 Determinação do diâmetro médio de partículas .	86
4.2.3.2 Densidade Real e Densidade Aparente.....	86
4.2.3.3 Porosidade do leito fixo de partículas	87
4.2.3.4 Densidade do solvente	87
4.2.3.5 Determinação da solubilidade	88
4.2.3.6 Experimentos cinéticos – Curvas de extração e parâmetros cinéticos.....	88
4.2.3.7 Determinação das isotermas de rendimento	89
4.2.3.8 Emprego de co-solvente (CS)	90
4.2.4 Tratamento dos extratos e eliminação do solvente ...	91
4.3 MODELAGEM MATEMÁTICA.....	92
4.4 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS EXTRATOS	93
4.4.1 Determinação do teor de fenólicos total (TFT)	93
4.4.2 Atividade antioxidante pelo método de DPPH.....	94
4.4.3 Atividade antioxidante pelo método β -caroteno/ácido linoléico	96
4.4.4 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	98
4.4.4.1 Difusão em gel.....	98
4.4.4.2. Determinação da concentração inibitória mínima	99
4.4.5 Determinação da composição química dos extratos	100
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	100
4.6 RESUMO DOS ENSAIOS	101
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	105
5.1 TESTES PRELIMINARES	105
5.2 CARACTERIZAÇÃO DO LEITO DE PARTÍCULAS	106
5.3 CINÉTICA DA EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO	108
5.4 DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO GLOBAL	111
5.5 MODELAGEM MATEMÁTICA.....	124

5.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	131
5.6.1 <i>Determinação do teor de fenólicos total (TFT)</i>	131
5.6.2 <i>Determinação da Atividade Antioxidante pelo método de DPPH</i>	137
5.6.3 <i>Método de descoloração do sistema β-caroteno/ácido linoléico</i>	140
5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	144
5.7.1 <i>Método de Difusão em Agar</i>	144
5.7.2 <i>Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)</i>	147
5.8 PERFIL DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	152
6 CONCLUSÃO	161
REFERÊNCIAS.....	165
APÊNDICE A - MODELOS MATEMÁTICOS.....	195
A.1 Modelo difusional de Crank (1975)	195
A.2 Modelo de Dessorção de Tan e Liou (1989).....	196
A.3 Modelo de Esquível et al. (1999).....	197
A.4 Modelo de Placa (SSP) proposto por Gaspar et al. (2003)	197
A.5 Modelo logístico de Martínez et al. (2003).....	198
A.6 Modelo de Sovová (1994)	200
APÊNDICE B - DADOS EXPERIMENTAIS DA CURVA DE EXTRAÇÃO	204
APÊNDICE C - CURVA PADRÃO DE ÁCIDO GÁLICO E CÁLCULO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAL.....	206
APÊNDICE D - CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR HPLC.	208

1 INTRODUÇÃO

Apesar de toda a riqueza da flora brasileira e do potencial para o aproveitamento de resíduos da agricultura e da agroindústria, no país ainda há poucos investimentos em tecnologias capazes de agregar valor a esses subprodutos. Entretanto, atualmente, as exigências governamentais e do mercado consumidor vêm acarretando custos cada vez maiores para o tratamento dos resíduos gerados pelas indústrias de alimentos, o que aumenta a importância do desenvolvimento de tecnologias que possibilitem o reaproveitamento desses resíduos, ao mesmo tempo em que sejam ambientalmente seguras (limpas) e garantam a qualidade dos produtos.

Por outro lado, a procura cada vez maior por um estilo de vida saudável e a preocupação dos consumidores com a segurança dos produtos utilizados ou ingeridos - incluindo o consumo de produtos compostos por ingredientes naturais que ofereçam benefícios para o corpo - desperta um grande interesse das indústrias tanto de alimentos como de fármacos e cosméticos na obtenção e utilização de extratos vegetais que apresentem características funcionais (biológicas), corantes ou aromatizantes, com alto grau de pureza, uma vez que substâncias sintéticas, muitas vezes, são suspeitas de causar efeitos maléficos à saúde. O isolamento desses compostos naturais possibilita o aproveitamento integrado de resíduos gerados na agroindústria e podem resultar em novas alternativas empresariais, além de minimizar o impacto ambiental causado pelo acúmulo desses resíduos.

A uva é uma das frutas de maior produção mundial, com mais de 67 milhões de toneladas ao ano, cultivada principalmente na variedade *Vitis vinifera* que é a mais utilizada para a produção de vinho (MAIER et al., 2009; Organização Internacional da Uva e do Vinho, acessado em 19/09/2009). Os principais subprodutos da vinificação são separados durante as etapas de esmagamento e prensagem das uvas, e apenas pequenas quantidades desses resíduos são valorizados ou aproveitados (TORRES et al., 2002). A recuperação de

compostos a partir dos rejeitos das indústrias de vinho e suco poderia representar um avanço significativo na manutenção do equilíbrio ambiental, visto que nas vinícolas as grandes quantidades de resíduos gerados causam sérios problemas de armazenagem, transformação ou eliminação, em termos ecológicos e econômicos. Esta situação explica o interesse crescente em explorar os subprodutos da vinificação (ALONSO et al., 2002; LOULI et al., 2004).

O bagaço de uva representa um importante subproduto da indústria vinícola, composto, basicamente, por sementes, cascas e engaço. Componentes antioxidantes, naturalmente presentes na uva, permanecem no bagaço, após a vinificação, em diferentes concentrações, dependendo do processo de fabricação e da variedade de uva. A maior parte desse resíduo é usada para ração animal ou adubo; sendo assim, pesquisas que permitam sua utilização para obtenção de compostos bioativos podem representar um ganho econômico significativo. Entre os antioxidantes que podem estar presentes, destaca-se o resveratrol - cujo consumo regular está atribuído à redução do risco de incidência de doenças cardíacas - e o ácido linoléico - ácido graxo essencial ao qual são atribuídas propriedades antiinflamatórias, antiistamínicas e de prevenção ao câncer.

A qualidade e composição dos extratos de produtos naturais estão fundamentalmente relacionadas com a técnica de extração empregada na sua preparação. Entre as diversas técnicas destaca-se a extração supercrítica (ESC) que emprega gases pressurizados como solventes, o que permite a obtenção de extratos isentos de solvente e sem degradação térmica, além de possibilitar o fácil controle da seletividade do processo, aspectos relevantes para a produção de compostos específicos de interesse de determinado setor da indústria. A validação da ESC como alternativa viável para a obtenção de extratos a partir de plantas, resíduos da agroindústria e diversos produtos naturais está associada à atividade biológica dos extratos e por isso tem sido extensivamente empregada para a obtenção de extratos de alto valor agregado, tanto na área acadêmica como industrial (DANIELSKI et al., 2005; KITZBERGER et al., 2007; MICHIELIN et al., 2009).

Métodos tradicionais de extração são bastante utilizados para a obtenção de extratos de diversas matrizes vegetais. Porém, essas técnicas geralmente envolvem uma alta temperatura de processo, o que pode ocasionar a destruição de compostos termossensíveis e, além disso, os solventes orgânicos utilizados podem ser prejudiciais à saúde e/ou ao ambiente, havendo a necessidade de separá-los do extrato posteriormente (WANG et al., 2004). Assim, a extração com fluido supercrítico surgiu como uma alternativa para a extração e fracionamento de produtos naturais, através de uma tecnologia limpa e com a possibilidade de ajustar parâmetros visando à seletividade do processo para um grupo específico de compostos a serem extraídos, o que é uma boa opção para agregar valor a subprodutos da indústria vinícola.

Assim, este trabalho tem como objetivo estudar a extração supercrítica (ESC) de óleo de bagaço de uvas *Merlot* e *Syrah* empregando como solventes CO₂ puro e CO₂ adicionado de co-solvente; comparar os resultados obtidos para as duas variedades de uva em termos de rendimento de processo e composição dos extratos; confrontar os resultados da extração supercrítica com os de extrações a baixa pressão (Soxhlet e maceração ultrassônica); e determinar os parâmetros de processo adequados para a obtenção de compostos de interesse através da ESC.

A modelagem matemática de curvas de ESC é empregada por vários autores com o objetivo de reproduzir dados experimentais existentes e, a partir deles, ajustar parâmetros com os quais se possam simular processos de extração em outras escalas e condições operacionais. A análise de uma curva de extração para um determinado processo pode ajudar a definir o volume do extrator, a vazão de solvente requerida para uma taxa de extração adequada, entre outros. Deste modo, também é objetivo deste trabalho estudar o fenômeno de transferência de massa através da aplicação de diferentes modelos matemáticos disponíveis na literatura.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho é sugerir a aplicação da extração supercrítica (ESC) para o aproveitamento do bagaço de uva (resíduo vinícola), visando a otimização do processo e avaliando sua eficácia na obtenção de produtos com destacada atividade biológica (antioxidante e antimicrobiana).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Utilização de técnicas de extração a baixa pressão, Soxhlet e maceração ultrassônica, com solventes orgânicos de diferentes polaridades para a obtenção de extratos de bagaço de uva;
- b) Determinação de rendimento dos extratos obtidos a baixa pressão visando à seleção de co-solvente para a ESC;
- c) Avaliação do rendimento da ESC em função das condições de operação e comparação com as técnicas convencionais de extração;
- d) Estudo da cinética de transferência de massa;
- e) Análise da atividade antioxidante dos extratos através dos métodos DPPH (1,1-diphenil-2-picryl hydrazil) e β -caroteno/ácido linoléico;
- f) Determinação do teor de compostos fenólicos dos extratos pelo método de Folin-Ciocalteu;
- g) Análise do perfil de composição do óleo de bagaço de uva por HPLC;
- h) Avaliação da influência da técnica de extração na composição do extrato;

i) Com base nos dados de composição do extrato, avaliar a seletividade do processo para compostos com comprovado efeito biológico;

j) Definição das condições ótimas de extração para o bagaço com CO₂ supercrítico com e sem adição de co-solvente, em termos de rendimento de processo e qualidade dos extratos;

k) Modelagem das curvas de extração supercrítica do bagaço de uva utilizando os seguintes modelos disponíveis na literatura: Sovová (1994), Martinez et al. (2003), Crank (1975), Esquivel et al. (1999), Tan e Liou (1989) e Gaspar et al. (2003).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 UVA, VINIFICAÇÃO E BAGAÇO

A vitivinicultura é uma atividade economicamente importante no mundo globalizado. No Brasil, é uma atividade importante para a sustentabilidade de pequenas propriedades e, nos últimos anos, tem se tornado importante também na geração de emprego, em grandes empreendimentos para produção de uvas de mesa e uvas para processamento (EMBRAPA, 2009). No cenário internacional a vitivinicultura brasileira ocupou, em 2006, o 22° em área cultivada com uvas, 16° em produção de uvas e o 15° em maior produção de vinhos.

Como pode ser observado na Tabela 1, que apresenta dados da produção brasileira de uva em 2009, houve redução na produção de uvas na maioria dos estados brasileiros, com um decréscimo de 4,08 % no total de uvas produzidas. Essa redução ocorreu, principalmente, devido à crise econômica mundial e a fatores climáticos desfavoráveis, interrompendo a tendência crescente dos 3 anos anteriores. O Rio Grande do Sul, principal Estado produtor de uvas e vinhos do país, apresentou redução de 4,98 % na produção de uvas em 2009 em relação ao ano anterior. Os Estados de Santa Catarina e Paraná apresentaram acréscimo na produção de uvas de 16,0 % e 0,57 %, respectivamente, no mesmo período. De acordo com os dados apresentados na Tabela 1, em 2009, praticamente metade da uva produzida no país foi destinada ao processamento para elaboração de vinhos, suco de uva e derivados, sendo o restante destinado ao mercado de uva *in natura* (EMBRAPA, 2009.).

Tabela 1 - Produção de uvas no Brasil entre 2006 e 2009, em toneladas.

Ano	2006	2007	2008	2009
Estado				
Pernambuco	155.783	170.326	162.977	158.515
Bahia	89.738	120.654	97.481	90.508
Minas Gerais	12.318	11.995	13.711	11.773
São Paulo	195.357	193.023	192.976	177.934
Paraná	95.357	99.180	101.500	102.080
Santa Catarina	47.787	54.554	58.330	67.546
Rio Grande do Sul	623.847	705.228	776.027	737.363
Brasil	1.220.187	1.354.960	1.403.002	1.345.719
Processamento	462.502	637.125	711.782	678.169
Consumo <i>in natura</i>	757.685	717.835	691.220	667.550

Fonte: IBGE. (Embrapa Uva e Vinho, Panorama 2009, acessado em 12/06/2010).

Não se dispõe de estatísticas sobre a produção e comercialização nacional de vinhos e suco de uvas. Apenas o Estado do Rio Grande do Sul, responsável por cerca de 90 % da produção nacional, disponibiliza todas as informações, apresentadas na Tabela 2, cuja análise permite ter uma boa aproximação do desempenho da agroindústria vinícola do país. O Estado de Santa Catarina apresenta dados de uvas processadas, vinhos e derivados, apresentados na Tabela 3; no entanto, não há informações sobre a comercialização de seus produtos. Para os demais Estados não há informações disponíveis (EMBRAPA, 2009).

Segundo dados da Organização Internacional da Uva e do Vinho (OIV) utilizando dados da FAO (Órgão das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura), o Brasil foi o 16º no *ranking* de produtores mundiais de vinho em 2006, mas o consumo *per capita* de 1,8 litros por habitante (l/hab) ainda ficou muito abaixo de países europeus como França e Itália, com 53,8 e 46,5 l/hab

respectivamente, ou até mesmo da vizinha Argentina que apresentou consumo de 28,4 l/hab. Por outro lado, o país aparece como 3º maior consumidor de suco de uva - acima de 100 mil litros no ano de 2006.

Tabela 2 - Produção de vinhos, sucos e derivados no Rio Grande do Sul, em mil litros, entre 2006 e 2009.

Produção \ Ano	2006	2007	2008	2009
Vinho de mesa	185.101	275.288	287.507	205.399
Vinho fino	32.169	43.176	47.334	39.900
Suco de uva integral	13.946	10.147	11.818	16.034
Suco concentrado*	87.073	97.113	115.073	115.032
Outros derivados	28.152	39.867	59.643	57.462
Total	346.416	465.591	521.375	433.828

*transformados em litros de suco simples.

Fontes: União Brasileira de Vitivinicultura - Uvibra, Instituto Brasileiro do Vinho - Ibravin. (Embrapa Uva e Vinho Panorama 2009, acessado em 12/06/2010).

Tabela 3 - Produção de vinhos e suco de uva no Estado de Santa Catarina, em mil litros, entre 2006 e 2009.

Produção \ Ano	2006	2007	2008	2009
Vinho de mesa	15.332	21.940	17.750	11.203
Vinho fino	247	252	335	237
Espumante	5	8	15	50
Mosto de uva	248	44	774	16
Total	15.832	22.244	18.875	11.507

Fonte: Embrapa Uva e Vinho, Panorama 2009 (acessado em 12/06/2010).

A uva da espécie *Vitis vinifera* L. tem grande importância na economia mundial, principalmente devido ao seu uso como matéria prima para a fabricação de vinhos e outros derivados (YANG et al., 2009). Essa espécie foi cultivada por várias civilizações europeias durante milhares de anos, o que originou dezenas de variedades, as denominadas *castas*, através de seleção artificial. Muitas variedades são conhecidas mundialmente pela produção de vinhos como é o caso de *Cabernet Sauvignon*, *Pinot Noir*, *Cabernet Franc*, *Malbec*, *Chardonnay*, *Riesling*, *Moscatel*, entre muitas outras, sendo que neste trabalho foram utilizadas amostras de bagaço das cultivares *Merlot* e *Syrah*.

3.1.1 Uva *Merlot*

O vinho *Merlot* apresenta perfil de sabor e aroma pronunciados, semelhantes ao vinho *Cabernet Sauvignon*, no entanto, tende a ser ligeiramente menos ácido e adstringente, sendo em geral mais exuberante organolepticamente. O vinho *Merlot* se tornou bastante consumido por ser considerado “fácil de beber”, o que fez com que essa variedade tenha ganhado grande espaço mundialmente em volume de produção entre as cultivares tintas de *Vitis vinifera* L. (RIZZON e MIELE, 2003). O vinho *Merlot* da região do Vale dos Vinhedos (Rio Grande do Sul/Brasil) tem se destacado internacionalmente por sua qualidade (ÉPOCA, 2010). Com isso, essa cultivar é, atualmente, a uva mais plantada entre as variedades de *Vitis Vinifera* do Vale dos Vinhedos (APROVALE, 2008).

Como a variedade *Merlot* amadurece, pelo menos, uma semana mais cedo do que qualquer variedade *Cabernet* (de maior produção mundial), é considerada uma “vinha segura”, onde as chuvas são um fator determinante para a colheita. A uva *Merlot* de melhor qualidade cresce em terreno rochoso, árido, mas é bastante adaptável a solos argilosos, mesmo em climas frios e úmidos. Por florescer cedo, a preocupação principal dos produtores é a susceptibilidade à quebra provocada por geadas, chuva ou ondas de calor no início da primavera. A baga de

Merlot é relativamente fina de pele e um pouco propensa a apodrecer (WINEPROS, 2009).

3.1.2 Uva Syrah

Uva de casca roxa escura fina, muito bem adaptada aos climas quentes, como sul da França, Austrália e nordeste brasileiro. Apesar de brotar relativamente tarde, amadurece rapidamente com o calor, o que requer maior cuidado para ser colhida no ponto certo, sem excesso de amadurecimento. Fácil de ser cultivada e vinificada, em comparação com outras uvas tintas, essa cultivar cresce bem em inúmeras áreas. Produz vinhos complexos, escuros, com boa presença de taninos, aromas e sabores de especiarias (CARPEVINUM, 2010; WINEXPERTS, 2009; WINEPROS, 2009).

De acordo com Moura et al. (2007), as variedades *Syrah* e *Cabernet Sauvignon* são as mais utilizadas para a elaboração de vinhos tintos finos na produção do Vale do Rio São Francisco no nordeste brasileiro, que em 2006 foi responsável por 15 % da produção nacional de vinho.

3.1.3 Vinificação

O processo de fabricação de vinhos varia muito de acordo com o tipo de uva e resultado final esperado, mas, de uma forma simplificada, o processo de fabricação de vinhos pode ser ilustrado conforme Figura 1.

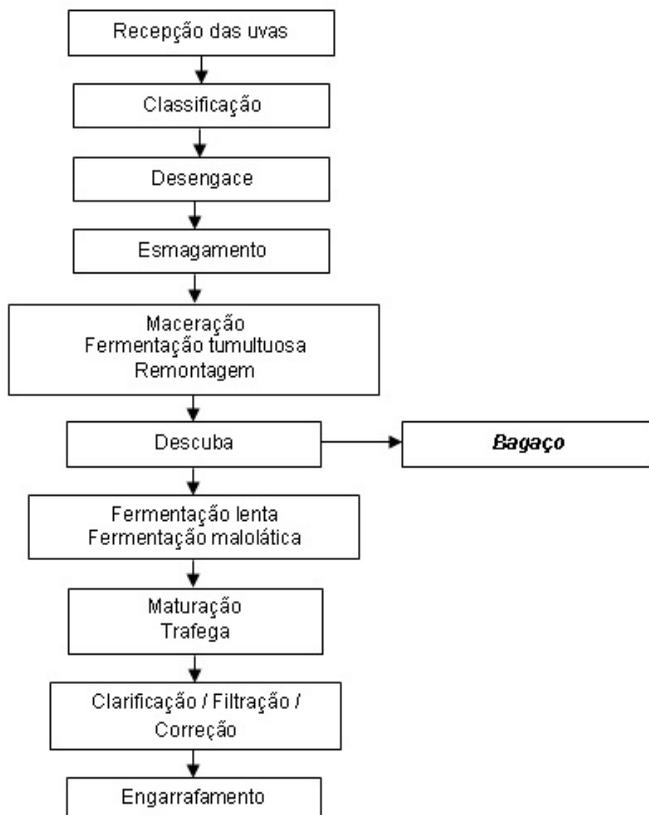


Figura 1 - Fluxograma simplificado do processo de vinificação.

Na chegada das uvas na vinícola, ocorre uma classificação quanto a variedade, a sanidade, o estado de maturação e a análise de teor de açúcar, o que determinará seu direcionamento para diferentes linhas de produção. Na sequência, os cachos de uva passam pelo desengace onde é feita a remoção da maior parte dos engaços (cabinhos que sustentam o cacho) para, então, as uvas serem encaminhadas à prensa que, por meio de uma leve pressão, fará com que se rompa a casca da uva, liberando, assim, o suco e dando origem ao mosto. A

fermentação do mosto constitui a fase principal do processo de vinificação, ou seja, é quando ocorrem as reações químicas em que os açúcares contidos nas uvas são transformados em álcool sob a ação de leveduras selecionadas (chamadas pé-de-cuba). No caso dos vinhos tintos, as partes sólidas da uva (cascas e sementes) são mantidas com o mosto para a fermentação e nos brancos elas são retiradas. Isso porque, simultaneamente à fermentação ocorre a maceração das cascas da uva no álcool, o que dará ao suco a cor tinta - e quanto maior o tempo de contato das cascas com o líquido, mais escuro será o vinho, porém mais adstringente também (LAZARINI e FALCÃO, 1999; ACADEMIA DO VINHO, 2010).

A fermentação é conduzida em tonéis que podem ser de madeira, cimento ou aço inox, com temperatura controlada de 25 °C a 30 °C. Após algumas horas de residência nos tanques de fermentação/maceração, uma massa constituída por cascas e outras substâncias mais grosseiras se concentra na parte superior do reservatório (boiam), e formam o chamado chapéu que transmite cor apenas à porção superior do líquido, permanecendo incolor a porção inferior. Portanto, torna-se necessária a operação de remontagem, ou seja, transferência do líquido da parte inferior para a superior, o que favorece também a oxigenação do meio, necessária para o desenvolvimento e multiplicação das leveduras, e um maior controle da temperatura do meio, que tende a aumentar. Essa etapa é chamada de fermentação “tumultuosa”, com duração de poucos dias (de 2 a 5) e grande desprendimento de gás carbônico (LAZARINI e FALCÃO, 1999; ACADEMIA DO VINHO, 2010).

Quando há uma queda na temperatura de fermentação e uma paralização no desprendimento de gás carbônico, é feita a descuba, operação na qual se separa o mosto em fermentação do bagaço (composto basicamente de cascas e sementes). Em seguida, tem início a fermentação lenta, quando o mosto é definitivamente transformado em vinho e os últimos traços de glicose são transformados em álcool. Neste momento ocorre também a fermentação secundária (ou malolática) caracterizada pela transformação do ácido málico (mais *duro* ao paladar) em ácido lático (mais *macio*), o que leva de 20 a 40 dias. Depois, é

feito um tratamento a frio para a precipitação de sais tais como o bitartarato de potássio e, conseqüentemente, a estabilização física do vinho (LAZARINI e FALCÃO, 1999; ACADEMIA DO VINHO, 2010).

A maturação geralmente é feita em pipas de madeira (preferencialmente carvalho) por um período de 6 meses a 5 anos, deixando o vinho em repouso para que se processe a clarificação (que pode ser facilitada pela adição de agentes floculantes) e se desenvolvam as suas propriedades organolépticas, responsáveis pelo buquê do vinho. Durante a maturação ocorrem sucessivas trasfegas (transferências de barris) para remoção da borra formada por precipitações contendo agentes floculantes (quando adicionados), leveduras e outras substâncias que podem conferir gosto e aroma desagradável ao vinho. É necessário também manter o nível dos barris, pois, conforme ocorre a evaporação e a diminuição do volume dentro do barril há liberação de espaço que é preenchido com ar o que pode ocasionar acetificação. Dependendo do produto obtido após a maturação, antes do engarrafamento podem-se empregar também alguns procedimentos para correção do vinho como filtração (para conferir mais limpidez), adição de anidrido sulfuroso (para intensificar a cor), corte ou *assemblage* (mistura de dois ou mais vinhos com o objetivo de obter um produto bem equilibrado e harmonioso, remediando o excesso ou a deficiência de alguns componentes), entre outros (LAZARINI e FALCÃO, 1999; ACADEMIA DO VINHO, 2010).

3.1.4 Bagaço

São vários os subprodutos secundários da vinificação, como o bagaço, o engaço e a borra. O bagaço é o principal subproduto da vinificação, por ser o de maior volume em comparação aos demais resíduos gerados, pela sua riqueza alcoólica e tartárica e também pelo interesse econômico de alguns dos seus componentes físicos. É o produto resultante da prensagem das uvas frescas, fermentado ou não (Regulamento CE n.º 1493/1999 do Conselho – Jornal Oficial das Comunidades

Européias (PT) L179 – 14.7.1999, pp. 1-84.), constituído pelas partes sólidas das uvas (semente, casca e ainda certa quantidade de engaço) e pelo mosto ou pelo conjunto mosto/vinho que as embebe (CORREIO RIOGRANDENSE, 2008).

Segundo dados da indústria, na produção de 100 litros de vinho tinto obtêm-se 25 kg de resíduo sendo 17 kg de bagaço. No Brasil, uma pequena parte deste resíduo é reutilizada para a produção de destilado de uva (conhecida como “grappa”), mas a maior parte é desperdiçada ou subutilizada para adubação do solo e complemento de ração animal (por ser fonte de fibras e proteínas). Porém, o uso frequente desse resíduo para a adubação de solo é desaconselhável devido à lenta biodegradabilidade das sementes de uva, o que não propicia a conversão total da matéria orgânica de uma safra para a outra. Por outro lado, o bagaço não deve ser oferecido puro aos animais em função da quantidade elevada de fibras; precisa ser triturado e servido com produtos complementares, o que torna inviável seu consumo em grande escala (CAMPOS, 2005; FAMUYIWA e OUGH, 1990; FREITAS, 2007).

Sendo assim, a recuperação de compostos antioxidantes a partir dos descartes contínuos da indústria de vinho poderia representar um avanço significativo na manutenção do equilíbrio do meio ambiente, visto que, para as vinícolas, as grandes quantidades de resíduos gerados apresentam sérios problemas de armazenagem, de transformação, ou de eliminação, em termos ecológicos e econômicos. Essa situação explica o interesse crescente em explorar e agregar valor aos subprodutos da vinificação, rico em propriedades biológicas relevantes para as indústrias farmacêuticas, químicas e alimentícias. (ALONSO et al., 2002; LOULI et al., 2004; ROCKENBACH et al., 2008)

A uva é fonte de diversos compostos fenólicos em elevadas concentrações e os subprodutos da vinificação, em sua maioria, podem manter quantidades apreciáveis dessas substâncias como os flavonóides (antocianinas, flavanóis e flavonóis), os estilbenos (resveratrol), os ácidos fenólicos (derivados dos ácidos hidroxicinâmicos e hidroxibenzóicos) e uma larga variedade de taninos, cuja distribuição nas uvas está

representada na Figura 2. Porém, a composição química dos bagaços varia consideravelmente segundo a variedade da uva, o modo de vinificação, as condições climáticas, os sistemas de condução da vinha e o estado sanitário das uvas no momento da vindima (ROCKENBACH et al., 2008).

A casca da uva é uma fonte de antocianidinas e antocianinas, que são corantes naturais e possuem propriedades antioxidantes, entre elas inibição de lipoperoxidação, e atividade antimutagênica. Enquanto o engaço, presente em pequena quantidade no bagaço por não ser totalmente eliminado no desengace, contém grande quantidade de polifenóis, especialmente compostos tânicos, que apresentam alto potencial nutracêutico e farmacológico, mas que podem conferir alta adstringência ao vinho, se em excesso (SOUQUET et al., 1996; 2000).

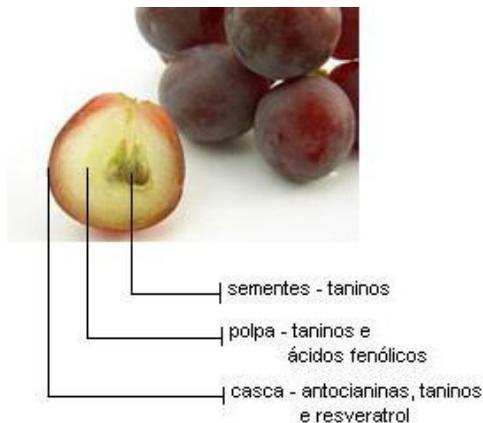


Figura 2 - Distribuição majoritária dos principais compostos fenólicos na uva.

Fonte: Rockenbach, 2008.

Já a semente contém de 14 a 17 % de óleo, dependendo da variedade da uva, além de aproximadamente 40 % de fibras e 7 % compostos fenólicos complexos, especialmente taninos e

flavonóis (MURGA et al., 2000; ROCKENBACH et al., 2008). O óleo de semente de uva é rico em ácidos graxos insaturados, destacando-se o elevado teor de ácido linoléico, conhecido como Ômega 6 - ácido graxo essencial ao homem que não é capaz de sintetizá-lo e que está ausente na maioria dos outros óleos comumente usados como os de soja, milho e algodão (MORETTO e FETT, 1998). Também possui grandes quantidades de tocoferol (vitamina E - antioxidante), principalmente sob a forma de alfa-tocoferol, e taninos (proantocianosídeos oligoméricos), o que o torna mais resistente a peroxidação (CAO e ITO, 2003). Por ser rica em óleo essencial de alto valor agregado, é o subproduto de uvas mais explorado por indústrias químicas, cosméticas e farmacêuticas. Os maiores produtores mundiais de óleo de semente de uva são Estados Unidos, Espanha e Itália (ÁRAGO, 2010).

3.2 ANTIOXIDANTES

O oxigênio é altamente reagente com a maior parte das substâncias orgânicas, sejam elas naturais ou sintéticas. Sua alta reatividade é, então, um fator determinante para a manutenção da saúde humana e para a preservação dos alimentos. A peroxidação lipídica é uma das principais razões de deterioração de produtos alimentícios durante o processamento e a estocagem. Uma forma de aumentar a validade, especialmente de produtos que contenham gordura, é a adição de antioxidantes (JAYAPRAKASHA et al., 2001).

O mecanismo de oxidação tem início com a presença de radicais livres, gerados por exposição ao calor, à luz ou a ações combinadas, seguido por reações de propagação (oxidação) levando à formação de radicais peróxido. Radical livre é uma molécula ou fragmento molecular que contém um ou mais elétrons desemparelhados. Quimicamente, esta valência livre torna a molécula extremamente reativa e, fisicamente, este

elétron desemparelhado torna a molécula paramagnética (momento magnético) (GALATO, 2004).

Os radicais de oxigênio (radicais hidroxila e peroxila) e o ânion superóxido têm um papel importante nas reações bioquímicas/fisiológicas do corpo humano. No entanto, se houver produção excessiva de radicais de oxigênio durante os processos patofisiológicos, ou devido a fatores ambientais adversos, e não existirem antioxidantes disponíveis *in vivo*, podem ocorrer danos profundos às células e tecidos do corpo humano. Isso porque a interferência desses radicais nas reações metabólicas pode debilitar o sistema imunológico, alterar o sistema hormonal, acelerar o processo de envelhecimento e/ou favorecer o aparecimento e desenvolvimento de células cancerígenas. Substâncias antioxidantes são a primeira defesa nesta área devido a sua habilidade de doar elétrons ou átomos de hidrogênio, inibindo ou retardando a oxidação de outras moléculas pela interferência na formação desses radicais (iniciação) ou na propagação de reações oxidativas em cadeia, mas não podem eliminar produtos da oxidação que já tiverem sido produzidos (BALASUNDRAM et al., 2006; CAMPOS, 2005; CORTESI et al., 1999; DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; LOULI et al., 2004; VELIOGLU et al., 1998).

Os antioxidantes podem ser sintéticos ou naturais e, para serem utilizados em alimentos, devem ser seguros para a saúde. Em geral, antioxidantes sintéticos são compostos com estrutura fenólica com diferentes graus de substituição do radical alquila, enquanto antioxidantes naturais podem ser compostos fenólicos (tocoferóis, flavonóides e ácidos fenólicos), compostos nitrogenados (alcalóides, derivados de clorofila, aminoácidos e aminas) ou carotenóides, assim como o ácido ascórbico (vitamina C) e a vitamina E. Substâncias sintéticas como BHA (hidroxianisol de butila), BHT (hidroxitolueno de butila) e THBQ (butil hidroquinona terciário) são usadas como antioxidantes desde o começo do século passado. No entanto, restrições ao uso desses compostos em alimentos têm sido impostas por suspeita de serem carcinogênicos. Sendo assim, o interesse por antioxidantes naturais, especialmente derivados de plantas,

aumentou consideravelmente (VELIOGLU et al., 1998; JAYAPRAKASHA et al., 2001).

Os tocoferóis são misturas de alfa, beta, gama e delta tocoferóis, obtidos a partir do resíduo industrial do processo de desodorização dos óleos vegetais, cuja finalidade é torná-los agradáveis ao paladar. Esse resíduo, chamado destilado desodorizado, é rico em tocoferóis e fitosteróis. Os tocoferóis representam o maior grupo de antioxidantes naturais em uso na indústria alimentícia por serem incolores e inodoros, lipossolúveis e atóxicos, porém são mais caros e menos efetivos que os sintéticos. Já os antioxidantes obtidos a partir dos extratos de plantas têm utilização geral, sem restrições quanto à aplicação e dosagem por serem totalmente naturais; existem em formas hidrossolúveis e lipossolúveis e não exigem declaração de concentração (extrato vegetal) no rótulo do produto onde é adicionado, proporcionando uma maior segurança aos consumidores. Como desvantagem, são menos efetivos que os sintéticos, mais caros e podem manter resíduos de cor, aroma e gosto de sua origem. Porém, nenhum antioxidante, individualmente, oferece proteção contra a deterioração oxidativa em todos os produtos alimentícios. A seleção de um antioxidante apropriado é determinada pela compatibilidade entre o efeito do antioxidante e as propriedades alimentares do produto (CAMPOS, 2005; KAUR e KAPOOR, 2001; SARMENTO, 2002).

3.2.1 Compostos fenólicos

Uma importante característica das plantas é sua capacidade de sintetizar uma grande diversidade de compostos com baixo peso molecular, denominados metabólitos secundários, essenciais para seu crescimento e reprodução (atrativo para polinizadores), provendo defesa contra agressões externas, como infecções, ferimentos, radiações UV, dentre outras funções. Muitos desses metabólitos são compostos fenólicos, que se encontram largamente distribuídos nas plantas e constituem um grupo muito diversificado de fitoquímicos derivados da fenilalanina e tirosina, englobando desde moléculas

simples até moléculas com alto grau de polimerização (ANTOLOVICH et al., 2000; ARSEGO, 2004; BALASUNDRAM et al., 2006).

Em alimentos, os compostos fenólicos são responsáveis pela cor, adstringência, aroma e estabilidade oxidativa, mas, recentemente, o reconhecimento das propriedades antioxidantes destes compostos tem evocado uma nova visão em direção aos efeitos benéficos para a saúde que eles podem apresentar. Os compostos fenólicos são incluídos na categoria de neutralizadores de radicais livres, sendo muito eficientes na prevenção da autoxidação. Fenólicos de uvas e vinhos tintos foram associados à inibição da oxidação do LDL (*low-density lipoprotein*) humano *in vitro*, à prevenção da aterosclerose e a efeitos antimutagênicos e antivirais (MOURE et al., 2001; JAYPRAKASHA et al., 2001; KAUR e KAPOOR, 2001).

Quimicamente, os compostos fenólicos são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. A atividade antioxidante dos compostos fenólicos depende da sua estrutura, particularmente do número e da posição dos grupos hidroxila e da natureza das substituições nos anéis aromáticos. Existem cerca de 8.000 diferentes compostos fenólicos que, de acordo com sua estrutura química, são divididos em classes: ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos e taninos (ANTOLOVICH et al., 2000; BALASUDRAM et al., 2006; ROCKENBACH, 2008).

Durante o processo de vinificação, os compostos fenólicos são extraídos do bagaço, ao longo da maceração, e transferidos para o mosto. Muitos desses compostos permanecem no bagaço após a vinificação em diferentes concentrações, dependendo do processo de fabricação e da variedade de uva (CAMPOS, 2005). Inúmeros fatores como cultivar, condições de cultivo das videiras, tempo de contato entre as cascas e o vinho em fermentação, temperatura de processo e presença de sementes e engaços afetam a transferência de fenólicos para o mosto, o que irá determinar a quantidade disponível de componentes fenólicos no bagaço (GÓMEZ-MÍGUEZ et al., 2007). De acordo com Vatai et al. (2009), do ponto de vista econômico, as melhores fontes para

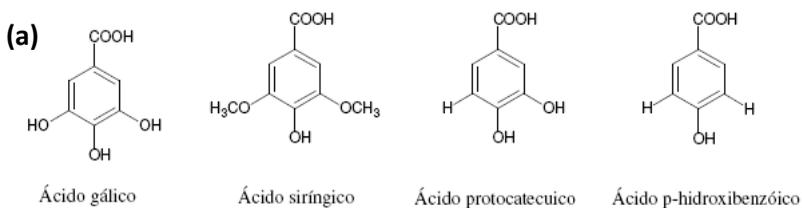
obtenção de compostos fenólicos para comercialização são os resíduos industriais de matérias vegetais com alta disponibilidade desses compostos.

3.2.1.1 Ácidos fenólicos

Como mostra a Figura 2, os ácidos fenólicos são encontrados em maior quantidade nos tecidos da polpa da uva (80 a 85 %), sendo que sua concentração diminui com o amadurecimento do fruto e varia de acordo com a cultivar (ARSEGO, 2004). São compostos simples formados por um anel aromático com substituintes com capacidade de sequestrar espécies reativas ligados à sua estrutura, como o radical hidroxila e o oxigênio singlete. Os ácidos fenólicos são divididos em dois grupos de substâncias:

a) Ácidos benzóicos, que possuem sete átomos de carbono (C6-C1), conforme apresentado na Figura 3a. São os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza, como os ácidos gálico, *p*-hidroxibenzóico, protocatecuico, vanílico e sirínico.

b) Ácidos cinâmicos, que possuem nove átomos de carbono (C6-C3), como os ácidos caféico, ferúlico, *p*-cumárico e sinápico, são apresentados na Figura 3b (BALASUNDRAM et al., 2006; ROCKENBACH, 2008).



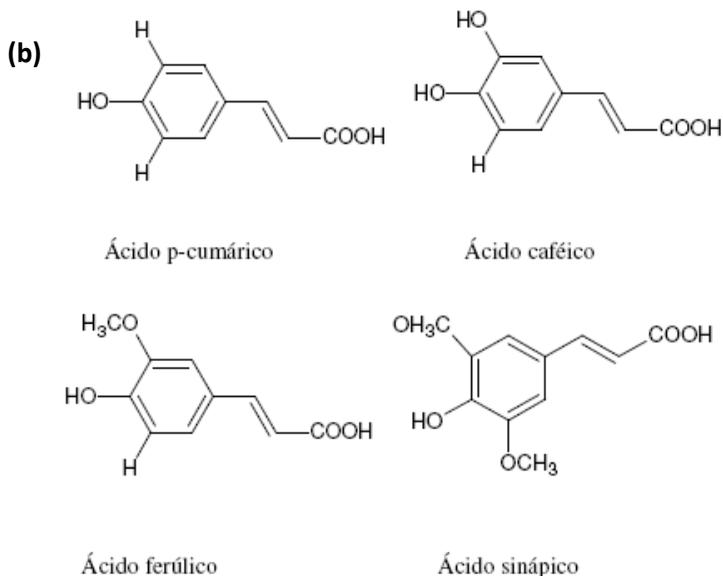


Figura 3 - Exemplos de ácidos benzóicos (a) e cinâmicos (b).

Fonte: Balasundram et al., 2006.

Esses ácidos, além de se apresentarem sob sua forma livre, podem também estar ligados entre si ou com outros compostos. A relação entre as estruturas dos ácidos fenólicos e sua atividade antioxidante já foi estabelecida. A capacidade antioxidante dos ácidos fenólicos e dos seus ésteres depende do número de grupos hidroxila presentes na molécula e de sua posição em relação ao grupo funcional carboxila. Derivados do ácido cinâmico são mais ativos como antioxidantes que os derivados do ácido benzóico e isto se deve ao fato de o primeiro composto apresentar maior número de grupos hidroxilas (OH) em relação ao segundo, o que garante maior habilidade de doar íons H^+ e estabilizar radicais. A introdução de um segundo grupo hidroxila na posição *orto* ou *para* também aumenta a atividade antioxidante destes compostos (ARSEGO, 2004; MARINOVA e YANISHLIEVA, 2003; ROCKENBACH, 2008).

3.2.1.2 Flavonóides

Os flavonóides constituem o maior grupo de compostos fenólicos de plantas, sendo responsáveis pela coloração das flores e dos frutos. São substâncias de baixo peso molecular, compostas de 15 átomos de carbono. A Figura 4 ilustra sua estrutura genérica formada, essencialmente, por dois anéis aromáticos, A e B, ligados por uma ponte de três carbonos, usualmente na forma de anel heterocíclico. Variações nas configurações de substituição do anel C resultam na maioria das subclasses dos flavonóides, apresentadas na Figura 5: flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonóis, flavanóis (catequinas) e antocianinas (BALASUNDRAM et al., 2006; HOLLMAN e ARTS, 2000; ROCKENBACH, 2008).

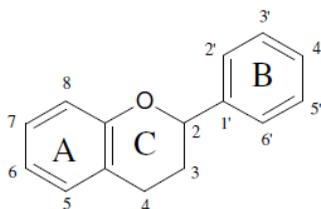


Figura 4 - Estrutura genérica dos flavonóides.

Fonte: Balasundram et al, 2006.

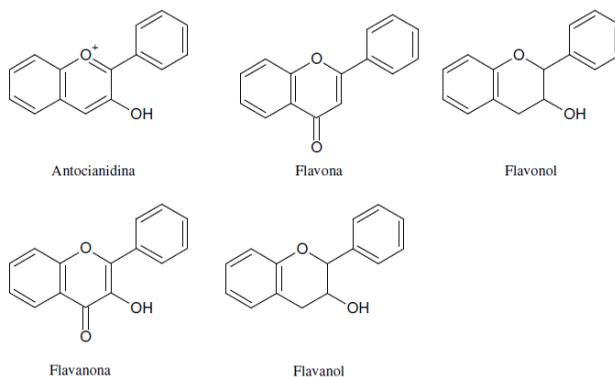


Figura 5 - Estrutura genérica das principais classes de flavonóides.

Fonte: Balasundram et al, 2006.

De acordo com a literatura, esses compostos têm demonstrado atividade contra alergias, hipertensão, viroses, inflamações, artrites, mutações e carcinogênese, câncer e AIDS (JAYAPRAKASHA et al., 2001; ROCKENBACH, 2008). Seu potencial antioxidante é dependente do número e da posição dos grupos de hidrogênio e suas conjugações, e também devido à presença de elétrons nos anéis benzênicos. Entretanto, as relações de estrutura e atividade dos flavonóides são mais complicadas que as dos ácidos fenólicos, devido à relativa complexidade das moléculas dos flavonóides. Em geral, a presença de grupos hidroxila nas posições 3, 4 e 5 do anel B tem sido descrita como responsável por aumentar a atividade antioxidante; no entanto, dependendo da subclasse de flavonóide, o efeito pode ser contrário (BALASUNDRAM et al., 2006; ROCKENBACH, 2008).

3.2.1.2.1 Antocianinas

As antocianinas são flavonóides que se encontram largamente distribuídos na natureza e são responsáveis pela maioria das cores azul, violeta e quase todas as tonalidades de vermelho que aparecem em flores, frutos, algumas folhas, caules e raízes de plantas. Nas videiras, são responsáveis pela coloração das cascas das uvas tintas e se transferem, em parte, para o vinho durante a vinificação, sendo encontradas também na polpa de algumas variedades de uvas (ROCKENBACH, 2008; VERSARI et al., 2008). A Figura 6 exemplifica a estrutura básica de uma molécula de antocianina.

O termo usual para antocianinas refere-se às duas formas em que se apresentam este grupo de polifenóis: quando na forma livre ou aglicona (sem açúcar) denomina-se antocianidina, e quando na forma ligada ou glicona (ligada a uma ou mais moléculas de açúcar) denomina-se antocianina. Na enologia, estudam-se seis antocianinas com maior frequência, são elas: pelargonina, cianidina, paeonidina, delfidina, petunidina e malvidina (SAUTTER, 2003).

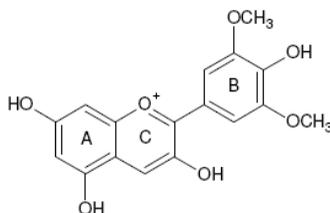


Figura 6 - Estrutura química básica das antocianinas.

Fonte: Rockenbach, 2008.

O uso de antocianinas como corante desperta grande interesse, mas, atualmente, isso ocorre muito mais devido a sua capacidade antioxidante, que chega a ser maior que a vitamina E, o butil hidroxianisol (BHA) e o butil hidroxitolueno (BHT). Por serem fortemente polares, podem substituir os antioxidantes lipofílicos como, por exemplo, a vitamina E (ROCKENBACH, 2008). Em um estudo de Pazos et al. (2006) foi possível retardar a oxidação de filés de peixe congelados pela adição de procianidinas de uva.

Além disso, estudos tanto *in vitro* quanto *in vivo* demonstraram a capacidade das antocianinas de reduzir a proliferação de células cancerígenas e inibir a formação de tumores (HOU, 2003; KANG et al., 2003; LILA, 2004).

3.2.1.3 Estilbenos

A família dos compostos estilbeno é vasta. Na década de 70, Langcake e Pryce (1976, 1977 e 1979 *apud* SAUTTER, 2003) identificaram os estilbenos resveratrol, ϵ -viniferin e *trans*-pterostilbeno em *Vitis vinifera*, e estudaram sua síntese nessa planta em resposta a radiação UV.

O interesse recente no monitoramento da presença e da efetividade do resveratrol é motivado pelo chamado “paradoxo francês” - observação de que a população francesa possui hábitos prejudiciais à saúde como fumo, bebida e alimentação gordurosa em excesso, mas apresenta baixa incidência de doenças cardíacas. Muitos cientistas explicam este paradoxo em

virtude da alta ingestão de vinho tinto, rico em compostos fenólicos, especialmente resveratrol, os quais são descritos como antioxidantes naturais (FILIP et al., 2003; GALATO, 2004; SCHIEBER et al., 2001).

O resveratrol (3,5,4-trihidroxi-*trans*-estilbeno) é uma substância biologicamente ativa, pertencente ao grupo das fitoalexinas, que são metabólitos secundários produzidos pelas plantas como uma resposta ao estresse como danos mecânicos, excesso de radiação, ataque de bactérias, fungos ou vírus, entre outros. Pode ser encontrado na natureza sob a forma aglicosídica ou glicosídica, tendo esta última diferentes denominações dependendo da glicona envolvida e da forma geométrica, *trans* e *cis*. A Figura 7 apresenta o isômero *trans* que predomina e, geralmente, é mais ativo biologicamente, mas é termo e fotossensível, sendo transformado em *cis* na presença de luz visível, o que dificulta sua identificação dependendo do método utilizado (FILIP et al., 2003; PRESTA, 2008; SAUTTER, 2003; VITRAC et al., 2005).

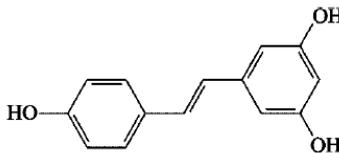


Figura 7 - Estrutura do *trans*-resveratrol.

Fonte: Souto et al., 2001.

O conhecimento fitoquímico mais aprofundado do resveratrol se deu a partir do desenvolvimento de instrumentos de análise, especialmente a cromatografia líquida de alta eficiência - mais conhecida pela sigla HPLC (abreviatura de High Performance Liquid Chromatography, em inglês) - método mais comum que permite sua detecção e a determinação de sua concentração em uvas. Com isso, nas últimas décadas, inúmeros artigos relatam diferentes propriedades biológicas do resveratrol, como efeito antioxidante; efeito anti-mutagênico e proteção contra o aparecimento do câncer, com destaque para os efeitos

benéficos ao sistema cardiovascular como anti-agregação plaquetária e redutora de triacilgliceróis (DAVID et al., 2007; FILIP et al., 2003).

Por ser um antioxidante natural, sua aplicação em alimentos traz uma série de benefícios, o que levou a realização de estudos sobre seu efeito antioxidante na peroxidação de lipídios e sua comparação com outros antioxidantes. Em geral, apresenta bons resultados nesse campo, dependendo da concentração, chegando a ser mais efetivo que o butilhidroxitolueno (BHT), a quercetina, a vitamina C e o α -tocoferol (vitamina E). Apresenta também efeito sinérgico na associação com a vitamina C e/ou com a vitamina E, com efeito antioxidante superior ao efeito de cada uma destas substâncias isoladamente (BAXTER, 2008; FILIP et al., 2003; SAUTTER, 2003).

Geralmente, os estilbenos são reconhecidos como compostos biologicamente ativos que apresentam atividade antifúngica contra vários patógenos (JEANDET et al., 2002). O efeito antimicrobiano mais relatado do resveratrol e de outros estilbenos é contra um patógeno comum das videiras, *Botrytis cinerea*, que causa perdas significativas em viticulturas do mundo todo (FILIP et al., 2003; LANGCAKE e PRYCE, 1976 *apud* SAUTTER, 2003).

Chan (2002) verificou atividade antimicrobiana do resveratrol contra microrganismos causadores de doenças de pele, notadamente as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa* e os fungos *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum* e *Microsporum gypseum*.

Recentemente foram relatadas outras importantes propriedades biológicas do resveratrol como melhorar a tolerância à glicose em diabéticos, atenuar os sintomas da menopausa - devido à semelhança de sua estrutura molecular com a do estrogênio sintético - e proteger contra a osteoporose, câncer e mal de Alzheimer (BAXTER, 2008; DAVID et al., 2007).

O conteúdo de resveratrol nas uvas diminui drasticamente durante seu amadurecimento, sendo praticamente indetectável

nos frutos maduros (JEANDET et al., 1991). Além disso, o autor ainda aborda que durante o processo de fermentação do vinho ocorre uma maceração do bagaço em álcool, transferindo boa parte do resveratrol da uva para o vinho, reduzindo, assim, sua disponibilidade no bagaço.

3.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O uso de produtos naturais para o tratamento de doenças que acometem o ser humano é uma prática milenar; entretanto, no último século, a medicina tradicional se baseou mais no uso e no desenvolvimento de fármacos sintéticos. Em contrapartida, as preparações nutracêuticas (composições naturais parcialmente purificadas com aplicação terapêutica) apresentam baixa toxicidade mesmo em doses altas o que explica seu grande consumo pela população oriental (BISCAIA, 2007; SMÂNIA, 2003; VIEIRA, 2005).

O número de antibióticos conhecidos é de aproximadamente 4.000; no entanto, somente em torno de 50 apresentam uso efetivo, uma vez que muitos deles são tóxicos. Antibióticos que são suficientemente atóxicos para o hospedeiro são usados como agentes quimioterápicos no tratamento de doenças infecciosas do homem, animais e plantas. Porém, o número crescente de microrganismos resistentes aos mais variados antibióticos devido a múltiplos fatores, sendo o principal a sua utilização indiscriminada, incentiva a pesquisa de novas substâncias antimicrobianas, que atuam diretamente sobre os microrganismos, agindo sobre sua membrana celular, suas enzimas ou seu DNA, promovendo a inibição do seu crescimento ou sua destruição (BISCAIA, 2007; SMÂNIA, 2003; VIEIRA, 2005).

Na literatura há a descrição de vários métodos que demonstram a atividade antimicrobiana dos extratos de produtos naturais sendo que as diferentes técnicas não são igualmente sensíveis (Vieira, 2005). Logo, os resultados obtidos são

influenciados pelo método selecionado e, também, pelos microrganismos usados para realizar o teste e pelas características de cada extrato. Desta forma, devem ser usadas cepas padrão, adquiridas de coleções de cultura como ATCC (*American Type Culture Collection*), para que seja possível a comparação com outras pesquisas. São priorizados bioensaios simples e baratos para uma rápida triagem de extratos e frações contra uma variedade de alvos.

Primeiramente, é feita uma triagem qualitativa dos extratos dos quais se deseja determinar a atividade antimicrobiana, sendo o método de difusão em ágar o mais utilizado para esse fim. Através dele, pode-se verificar se o extrato testado é capaz de inibir ou não o crescimento do microrganismo de interesse, tendo como vantagens a necessidade de pequenas quantidades de amostra e a economia na utilização de apenas uma placa de Petri para testar cinco extratos (VIEIRA, 2005).

Os extratos que apresentarem atividade antimicrobiana no método de triagem devem ser submetidos a testes quantitativos, como o método da concentração mínima inibitória (CMI), que consiste na determinação da quantidade mínima do extrato capaz de inibir o crescimento do microrganismo de interesse e pode ser determinada através de três técnicas: diluição em caldo, diluição em ágar e microdiluição em caldo de cultivo, que se baseiam no emprego de uma série de diluições do extrato para uma mesma concentração da bactéria (VIEIRA, 2005).

A técnica de microdiluição em caldo de cultivo é a mais usada e consiste na adição de diferentes concentrações do extrato em uma série de orifícios em placas de microdiluição contendo uma suspensão padronizada (10^8 unidades formadoras de colônias/mL) do microrganismo a ser testado. A menor diluição de extrato que não apresenta crescimento é a concentração mínima inibitória (CMI). A partir das diluições do extrato que não apresentaram crescimento, pode-se repicar para placa de ágar ou cultura em caldo e verificar a concentração mínima bactericida (CMB) que é a concentração de extrato que, além de inibir seu crescimento, também inativa o microrganismo (VIEIRA, 2005).

Katalinić et al. (2010) estudaram o efeito de extratos de cascas de 14 variedades de uva, entre brancas e tintas, contra bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*) e gram-negativas (*Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Infantis* e *Campylobacter coli*) com bons resultados. Thimothe et al. (2007) relataram atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans* de extratos de diferentes variedades de uvas inteiras e de seus respectivos bagaços após vinificação, sendo estes últimos relativamente mais eficientes que os primeiros. Daroch et al. (2001) reportaram atividade antimicrobiana de vinhos tintos, cujo composto ativo foi identificado como sendo o resveratrol, contra *H. pylori*. Esse microrganismo está associado a ocorrência de câncer de estômago em humanos.

3.4 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Extração é uma das operações unitárias mais usadas na indústria de alimentos. É usada principalmente para obtenção de certos componentes desejados, inicialmente retidos na matriz do alimento. As substâncias obtidas podem ser usadas como aditivos alimentares ou para produzir algum efeito específico na saúde humana (MOURE et al., 2001; PINELO et al., 2006).

A técnica de extração empregada na obtenção de extratos de produtos naturais influencia diretamente sua qualidade e sua composição final. O procedimento de extração é determinado pela família de compostos a ser extraída e se o objetivo é quantitativo ou qualitativo. Os métodos de extração dependem de fenômenos de difusão; logo, a renovação do solvente e a agitação são importantes na eficácia e duração do processo. O rendimento e a composição dos extratos dependem tanto do solvente utilizado como do método aplicado, que pode ser baseado em mecanismos químicos diferentes, pois a solubilidade de substâncias se dá em função de uma afinidade química existente entre as espécies do sistema, função de sua polaridade

- ou seja, diferentes substâncias serão extraídas de acordo com seu grau de polaridade e do solvente utilizado (BISCAIA, 2007; MOURE et al., 2001; ROCKENBACH, 2008; VIEIRA, 2005). A Tabela 4 apresenta o índice de polaridade de alguns solventes normalmente utilizados na obtenção de extratos naturais.

Tabela 4 - Índice de polaridade de solventes utilizados nos processos de extração a baixa pressão.

Solvente	Índice de polaridade
Hexano	0
Acetato de etila	4,4
Etanol	5,2
Água	9,0

Fonte: BYERS (2003).

Técnicas convencionais de extração com uso de solventes orgânicos, como maceração e Soxhlet, são comumente aplicadas nas indústrias química, farmacêutica e alimentícia para a obtenção de variados extratos e podem utilizar uma ampla variedade de solventes como metanol, hexano, clorofórmio, acetato de etila, acetona, éter, etc. No entanto, essas técnicas requerem um alto custo energético e podem degradar substâncias termicamente sensíveis, pois utilizam altas temperaturas de extração ou de separação da mistura soluto-solvente. A etapa de recuperação do solvente após a extração é crucial devido a problemas econômicos e de segurança ambiental, mas, principalmente, pela possibilidade de haver resíduo do solvente no produto final. Na maioria das situações, tanto para fins sensoriais quanto para fins farmacológicos, o solvente residual é indesejável por sua toxicidade, sua capacidade reagente ou mesmo pela interferência no aroma e no extrato obtido. O uso de solventes de baixa toxicidade como alcoóis (isopropanol e etanol) e dióxido de carbono supercrítico tem aumentado devido a estes problemas, porém, de maneira geral, são menos eficientes, devido à menor afinidade molecular

entre solvente e soluto (BISCAIA, 2007; CAMPOS, 2005; DÍAZ-REINOSO et al., 2006; LI et al., 2004; MEZZOMO, 2008).

Diversos métodos e sistemas de solventes vêm sendo usados para a extração de polifenóis biologicamente ativos de matérias vegetais, mas encontrar um método único que seja adequado para obtenção de um grupo diverso de fenólicos não é uma tarefa fácil devido à diversidade das estruturas químicas e variação de sensibilidade dos compostos às condições de extração. O tipo de solvente e a polaridade podem afetar a transferência de elétrons e de átomos de hidrogênio, que é aspecto-chave na medida da capacidade antioxidante. A presença de compostos não antioxidantes nas soluções testadas também pode afetar os resultados. Quando o objetivo é obter corantes ou produtos antioxidantes para a indústria de alimentos, as extrações geralmente são realizadas utilizando água, alcoóis ou uma mistura deles, como é o caso dos ácidos fenólicos por serem compostos polares (ANTOLOVICH et al., 2000; BISCAIA, 2007; ROCKENBACH et al., 2008). Outra boa opção seria o acetato de etila por apresentar baixo ponto de ebulição, o que facilita sua remoção do extrato e sua reutilização, além de a possível presença de seu resíduo no extrato dificilmente ser considerada tóxica, por ser um típico componente de bebidas fermentadas em níveis de mg/L (LOULI et al., 2004).

Um método alternativo às técnicas convencionais é a extração supercrítica (ESC), que utiliza fluidos supercríticos como solventes, sendo uma ótima opção para a extração e fracionamento de produtos naturais. Seu emprego em processos industriais vem ganhando espaço continuado, principalmente devido aos fatores ambientais e de qualidade. Trata-se de um processo que proporciona uma melhor seletividade e eficiência com menor risco de degradação térmica dos extratos e cujo solvente pode ser facilmente removido no final da extração, principalmente devido às características dos fluidos supercríticos. (GÓMEZ e OSSA, 2002; JOUYBAN et al., 2002; PEREIRA et al., 2004).

Na literatura, são reportadas diferentes técnicas para a obtenção de extratos de uva, seja de casca e semente separadas ou do bagaço como um todo. Os procedimentos

adotados em cada trabalho visam objetivos diferentes, tais como avaliação de atividades biológicas, de rendimento, de origem botânica entre outros. Vatai et al. (2009) realizaram a maceração do bagaço seco em soluções com diferentes frações de água/acetona para obter concentrados de antocianinas. Katalinić et al. (2010) estudaram as atividades antioxidante e antimicrobiana, assim como a composição de extratos de cascas de 14 variedades de uva obtidos através de maceração com solução etanol/água 80/20 v/v. Yang et al. (2009) utilizaram um método diferenciado, em que as uvas foram trituradas em uma solução de acetona para determinar sua concentração de fenólicos, flavonóides, antocianinas e resveratrol. Alonso et al. (2002) correlacionaram a atividade antioxidante e conteúdo fenólico de extratos de bagaço de uva obtidos por maceração ultrassônica com metanol. Luque-Rodríguez et al. (2007) utilizaram solventes superaquecidos para extração de fenólicos e antocianinas de bagaço. Louli et al. (2004) estudaram a atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva obtidos com diferentes solventes líquidos e diferentes pré-tratamentos submetidos posteriormente à extração supercrítica para incrementar o teor de compostos fenólicos, a atividade antioxidante e as propriedades organolépticas desses extratos. Murga et al. (2000) avaliaram a aplicação da mistura de dióxido de carbono e álcool em condições supercríticas para uma extração seletiva de alguns compostos fenólicos de semente de uva moída e desengordurada. Maier et al. (2009) utilizaram o resíduo de sementes de uva, já reutilizadas para obtenção do óleo por prensagem, para recuperar compostos fenólicos. Passos et al. (2009) associaram a extração supercrítica com um pré-tratamento enzimático das sementes de uva para aumentar a razão de células rompidas/intactas, favorecendo a extração e incrementando o rendimento de óleo. Silva et al. (2008) avaliaram a aplicação da extração supercrítica com CO₂ puro e com adição de etanol como solvente modificador para a obtenção de óleo de semente de uva. Palma e Taylor (1999a; 1999b) e Cao e Ito (2003) estudaram a extração supercrítica de semente de uva de diferentes formas e propósitos. Campos et al. (2008) compararam a atividade antioxidante e a composição de

extratos de bagaço de uva *Cabernet Sauvignon* obtidos através de extração supercrítica e de extrações convencionais.

3.4.1 Extração Soxhlet

A extração Soxhlet foi originalmente desenvolvida para determinação de gordura em leite. É, hoje, um dos métodos mais utilizados em escala laboratorial para extração de matrizes sólidas. De fato, por quase um século essa técnica foi o modelo a ser seguido e permanece como a referência com a qual novos métodos são comparados (CASTRO e GARCÍA-AYUSO, 1998; CASTRO e PRIEGO-CAPOTE, 2010).

Esse processo de extração é um método contínuo, considerado um caso particular da lixiviação em que a matéria-prima é extraída através do solvente aquecido em refluxo contínuo. A forma do equipamento (apresentada na Figura 12 no item 4.2.1) faz com que o solvente presente em um balão, aquecido até o seu ponto de ebulição, ascenda na forma de vapor até um condensador e desça liquefeito até o extrator onde entra em contato com a amostra. O solvente permanece em contato com a amostra até que atinja um determinado nível, no qual um sifão faz com que o solvente retorne para o balão, já com o extrato. Esse procedimento se repete até completa extração da matéria-prima. O solvente extrai o material orgânico retido na amostra à temperatura próxima à ambiente, mas o material extraído permanece em contato com o solvente em ebulição durante todo o procedimento o que pode provocar transformações químicas nos componentes extraídos (CASTRO e GARCÍA-AYUSO, 1998; MELECCHI, 2005).

O processo, em geral, produz altos rendimentos por fazer com que o solvente em contato com a amostra seja sempre renovado (já que o extrato permanece no balão); porém, há necessidade de uma etapa posterior de eliminação do solvente após a extração, exigindo grande dispêndio de energia. Na maioria dos casos, a temperatura de extração e a natureza do solvente determinam o poder de dissolução do soluto. Ainda que seja um método muito utilizado na extração de compostos

orgânicos, ele apresenta restrições ligadas à baixa seletividade e ao elevado tempo de extração, que pode variar de 1 a 72 horas. Prolongados tempos de extração aumentam a chance de oxidação dos fenólicos, a menos que agentes redutores sejam adicionados ao sistema solvente (CASTRO e PRIEGO-CAPOTE, 2010; MELECCHI, 2005; ROCKENBACH, 2008;).

Além disso, esse processo faz uso de grande quantidade de solventes orgânicos altamente purificados, com alto custo de obtenção e disposição, resultando ainda em grande quantidade de resíduo prejudicial ao meio ambiente e em extratos não totalmente livres de solvente orgânico. Em escala industrial, o uso de solventes orgânicos pode ser um fator limitante para aplicação deste método, além do emprego de altas temperaturas. Ainda assim, a extração Soxhlet é bastante utilizada em laboratório para comparação com outros métodos de extração devido a vantagens como renovação do solvente durante o processo, o que aumenta a eficiência da extração; dispensa filtração, o que simplifica o tempo de manuseio do extrato após a extração e os riscos de perda e/ou contaminação do extrato, além de apresentar boa reprodutibilidade (BISCAIA, 2007; CASTRO e GARCÍA-AYUSO, 1998; CASTRO e PRIEGO-CAPOTE, 2010).

Nas últimas décadas, alguns estudos propuseram modificações ao Soxhlet para aproximá-lo de técnicas mais modernas com o intuito de reduzir o tempo e/ou temperatura de extração, ou ainda minimizar o uso de solventes. Essas modificações incluem associações com alta pressão, microondas, ultrassom e ainda automatização do equipamento (CASTRO e PRIEGO-CAPOTE, 2010).

3.4.2 Maceração ultrassônica

A maceração assistida por ultrassom é uma técnica relativamente nova, que se baseia na utilização de energia das ondas sonoras (vibrações mecânicas) transmitidas em frequência superior à da capacidade auditiva humana. Apesar de, inicialmente, ter sido desenvolvida para limpeza de materiais,

atualmente vem sendo empregada numa ampla variedade de produtos, devido à simplicidade da técnica e do equipamento. Na última década, sua aplicação analítica teve um crescimento significativo, particularmente na preparação de amostras, por favorecer e acelerar a liberação de compostos, reações químicas e transformações físicas, como a emulsificação (FREITAS, 2007; MELECCHI, 2005; MA et al., 2008; OROZCO-SOLANO et al., 2010). Na indústria, dificilmente é aplicado como um processo isolado, mas, geralmente, como um coadjuvante, que auxilia no desempenho de outros processos para homogeneização e emulsificação de amostras, aceleração de reações, rompimento de estrutura celular e, conseqüentemente, tratamento de água e extração de substâncias, transesterificação para obtenção de biodiesel, dispersão de tinturas na indústria de tintas e pigmentos (ENGESOLUTIONS, 2010; UNIQUE, 2010).

A menor frequência ultrassônica é normalmente considerada como 20 kHz e a maior é limitada apenas pela habilidade em gerá-la, sendo que frequências em gigahertz (GHz) já foram utilizadas em algumas aplicações. As ondas sonoras se propagam na matéria através de ciclos de compressão e expansão, fazendo com que as moléculas do meio se aproximem e se afastem repetidas vezes. Essa variação na pressão do líquido empregado no processo gera cavitação, bolhas ou microfluxos o que causa mudanças físicas e químicas permanentes, como ruptura dos sólidos e instabilidade na interface de sistemas líquido-líquido e líquido-gás. Além disso, a agitação das moléculas provoca um aumento de temperatura que favorece a solubilidade e difusividade de compostos no meio. A associação desses fenômenos aumenta a transferência de massa e modifica o equilíbrio de fases diminuindo o tempo necessário para extração, se comparado com o mesmo processo na ausência de ultrassom (LUQUE-GARCÍA e CASTRO, 2003; MELECCHI, 2005).

O mecanismo para melhor extração utilizando ultrassom é atribuído ao comportamento das bolhas formadas pela cavitação na propagação das ondas acústicas, que acontece quando a pressão negativa resultante dos ciclos de expansão/compressão excede a tensão superficial do líquido naquele ponto. O colapso

das bolhas pode produzir efeitos físicos, químicos e mecânicos, os quais resultam no aumento da permeabilidade das paredes celulares, melhorando o processo de difusão e de transferência de massa. Em alguns casos, pode ocorrer ruptura da parede celular, causando a saída dos compostos aromáticos da célula, além de aumentar a eficiência da extração e/ou redução do tempo de extração, e aumentar a área de contato entre o sólido e a fase líquida. Contudo, o efeito do ultrassom no processo de extração depende da frequência e da potência do equipamento e do tempo empregado para a extração (LUQUE-GARCÍA e CASTRO, 2003; MELECCHI, 2005; MA et al., 2008).

Existem, basicamente, dois tipos de aparelhos geradores de ondas ultrassônicas: banho e sonda. Apesar de os banhos serem mais utilizados, sua principal desvantagem se dá ao fato de o gerador de frequência ser preso no fundo de uma cuba e a onda se propagar em um líquido, gerando muita dispersão da energia ultrassônica e, conseqüentemente, menor influência nos sistemas reacionais. Nas sondas ultrassônicas o transdutor encontra-se fixado em sua extremidade, focando a energia na região do meio que contém a amostra, promovendo, assim, uma cavitação mais eficiente no líquido. Em ambos os aparelhos, a energia ultrassônica é produzida por uma cerâmica piezoelétrica disposta entre duas chapas metálicas - transdutor piezoelétrico (ADAMS, 2002; LUQUE-GARCÍA e CASTRO, 2003).

A eficiência desta técnica de extração é dita equivalente ou maior que a obtida com o extrator Soxhlet. Entre as vantagens do uso do ultrassom para a obtenção de extratos naturais destacam-se: simplicidade do equipamento e economia no custo inicial; redução do tempo e da temperatura de extração; possibilidade de usar diferentes solventes e misturas assim como uma ampla gama de tamanhos de amostra; redução da quantidade de reagentes; seletividade e favorecimento de reações que não ocorrem em condições normais, com conseqüente aumento de rendimento. Como desvantagens podem ser citadas sua inabilidade de renovação do solvente durante o processo, fazendo com que a capacidade de extração seja limitada pelo equilíbrio de fases, e a necessidade de filtração após a extração o que aumenta o tempo do processo e o perigo de perda ou

contaminação do extrato durante a manipulação (ADAMS, 2002; CASTRO e GARCIA-AYUSO, 1998; FREITAS, 2007; MELECCHI, 2005).

3.4.3 Extração supercrítica (ESC)

A competitividade da área de compostos naturais, que tem como fatores fundamentais a conquista de mercados, a qualidade, a disponibilidade e o preço, sinaliza uma tendência para o emprego de técnicas modernas de extração. A extração supercrítica (ESC) se destaca por representar uma tecnologia que permite a obtenção de extratos de alta qualidade e que minimiza danos ao meio ambiente, devido à ausência de solvente no produto final. Por essa razão essa técnica vem se desenvolvendo e ganhando espaço continuamente em processos industriais nas últimas décadas. Assim, o emprego de fluidos supercríticos tem sido considerado uma ótima opção para a extração e fracionamento de produtos naturais, particularmente para as indústrias de alimentos e farmacêuticas (MICHELLIN, 2009; PEREIRA et al., 2004).

A tecnologia supercrítica permite a extração de compostos ativos de plantas com uma melhor reprodução de aromas do que as operações convencionais. A degradação térmica de compostos sensíveis é evitada por operar em temperaturas mais baixas enquanto a ausência de luz e oxigênio previne reações de oxidação, o que constitui uma grande vantagem para a extração de antioxidantes, garantindo a conservação de suas propriedades biológicas. Os materiais processados por fluidos supercríticos não necessitam de uma etapa à parte para esterilização, uma vez que o gradiente de pressão na saída do extrator pode gerar extratos livres de microrganismos vivos e de esporos (ADIL et al., 2007; CORTESI et al., 1999; DÍAZ-REINOSO et al., 2006). Depois de extraídos os compostos de interesse, a matriz pode ser usada em outras aplicações como alimentação animal, por exemplo, por não possuir resíduo de solvente (MEZZOMO, 2008).

Até o início da década de 80, o uso de fluidos supercríticos era limitado devido às dificuldades em se operar, com segurança, em temperaturas e pressões elevadas. A partir de então, atividades acadêmicas e comerciais envolvendo a extração com fluidos supercríticos têm crescido continuamente, especialmente nas áreas de extração de princípios aromáticos de especiarias (óleos e oleoresinas), remoção de nicotina do tabaco, extração de óleos essenciais de plantas, extração de princípios amargos e aromáticos do lúpulo na indústria cervejeira, produção de bases para cosméticos a partir do resíduo da cervejaria, descafeinização do café e de folhas de chá preto, obtenção de carotenos da cenoura, retificação e desodorização de óleos comestíveis em geral, remoção de colesterol de ovos e tecidos animais, extração de compostos das plantas medicinais, extração de lanolina de lã, extração de contaminantes do solo (metais pesados e pesticidas), entre outras aplicações (BRUNNER, 1994, 2005; MELECCHI, 2005).

A extração supercrítica é uma operação unitária de transferência de massa baseada no uso de fluidos a temperaturas e pressões acima dos valores críticos, conforme representado no diagrama de fases da Figura 8.

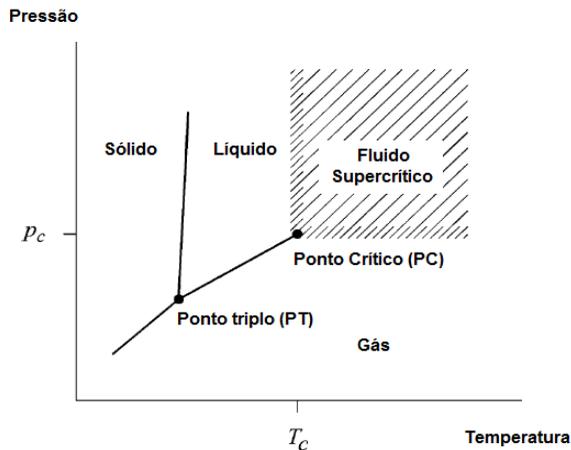


Figura 8 - Representação genérica do diagrama de fases de um componente puro

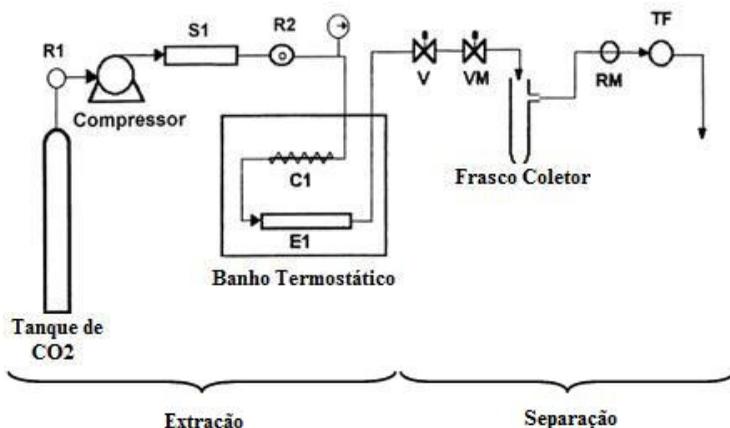
Fonte: Brunner, 2005.

A temperatura crítica (T_c) é a temperatura mais alta, na qual o gás pode ser convertido em líquido pelo aumento da pressão. A pressão crítica (P_c) é a pressão mais elevada, na qual o líquido pode ser convertido em gás pelo aumento da temperatura do líquido (GÓMEZ e OSSA, 2002; FREITAS, 2007). A área em torno do ponto crítico de um componente (ou de uma mistura) pode ser chamada de “região crítica”, abrangendo condições sub e supercrítica. Caso uma destas propriedades (pressão ou temperatura) se encontre abaixo do ponto crítico, diz-se que a substância está no estado subcrítico e, quando ambas estão acima dele, o fluido se encontra em estado supercrítico. Nessas condições de pressão e temperatura, as propriedades de um solvente são diferentes daquelas apresentadas no estado líquido ou gasoso, variando drasticamente com pequenas variações de pressão e temperatura (BRUNNER, 1994).

Os fluidos em condições supercríticas apresentam propriedades físico-químicas peculiares entre os estados gasoso e líquido, o que lhes confere um excepcional poder solvatante em função de sua alta difusibilidade e menor viscosidade e tensão superficial que em condições normais. Sua difusividade pode ser da ordem de até duas magnitudes maior do que a de líquidos, e a sua densidade possui valores próximos à densidade dos gases, o que facilita a transferência de massa e torna a extração mais rápida do que quando são utilizados líquidos em condições normais de temperatura e pressão. Além disso, a baixa viscosidade e a baixa tensão superficial permitem que o solvente supercrítico penetre facilmente na matriz vegetal, solubilizando o(s) componente(s) a serem extraídos. Outra característica importante é que o poder solvatante pode ser controlado em função da pressão e da temperatura, sendo que, na região do ponto crítico, pequenas alterações desses parâmetros podem provocar grandes mudanças no poder solvatante conduzindo a extrações mais seletivas. A seletividade também pode ser determinada pelo ajuste dos parâmetros do processo dentro da região supercrítica, ou seja, controlando a densidade do solvente, mas, principalmente pela escolha do fluido supercrítico empregado como solvente. Porém, alta solubilidade significa

baixa seletividade e vice-versa (DÍAZ-REINOSO et al., 2006; FERREIRA et al., 1999; FREITAS, 2007; GÓMEZ e OSSA, 2002; MICHIELIN, 2009).

A extração de matrizes sólidas com fluido supercrítico, esquematicamente representada na Figura 9, consiste, basicamente, de duas etapas: extração e separação da mistura soluto/solvente.



(R1) regulador de pressão do cilindro; (S1) pistão de compressão; (R2) regulador de pressão; (C1) serpentina; (E1) coluna de extração; (V) válvula abre-fecha; (VM) válvula micrométrica.

Figura 9 - Diagrama esquemático da extração supercrítica de matrizes sólidas

Fonte: FERREIRA et al., 1999 adaptado por MEZZOMO, 2008.

Durante a extração, o solvente supercrítico escoia através de um leito fixo formado por partículas sólidas (extrator), solubilizando os componentes presentes no sólido. Conforme o solvente escoia através do material vegetal, ocorre a transferência de massa do soluto da fase sólida para a fase fluída e, em qualquer ponto dentro do extrator, a concentração de óleo a ser extraído varia continuamente em cada fase até que o equilíbrio seja alcançado. Ou seja, a força motriz para a

transferência de massa no processo é o equilíbrio da concentração de solutos entre as fases sólida e fluida. Como o leito permanece fixo, a concentração do extrato na fase fluída varia com o tempo e a posição, aumentando na direção do fluxo do solvente supercrítico, o que caracteriza um processo em regime transiente. A mistura soluto/solvente deixa o extrator e, através da depressurização, ocorre a separação. Como muitos solutos podem ser extraídos simultaneamente, é possível fracionar o extrato em diferentes estágios de separação através do controle da pressão em cada um deles, permitindo a precipitação de determinado composto de acordo com sua solubilidade naquela pressão. Em sistemas maiores, o solvente pode ser reciclado reduzindo custos. Nesse caso, no último separador, a pressão e a temperatura devem ser mantidas em condições adequadas para recuperar o solvente no estado líquido e facilitar sua subsequente recompressão (REVERCHON, 1997; BRUNNER, 1994; MICHIELIN, 2009).

A transferência de massa entre as fases depende de muitos fatores como tipo e estrutura do material vegetal, grau de maturação, tratamento anterior a extração, presença de microrganismos e agrotóxicos, etc. Além disso, o leito de partículas pode formar diferentes geometrias e tamanhos de partículas que ainda podem sofrer alterações durante o processo. Dessa forma, uma grande variedade de parâmetros é relevante para a modelagem da transferência de massa no substrato sólido. As substâncias podem estar adsorvidas na superfície externa, na superfície dos poros, no interior do sólido ou no interior das células das plantas. Cada uma destas diferentes distribuições tem alguma influência no curso da extração (BRUNNER, 1994).

Segundo Brunner (1994), a extração de compostos solúveis de um material vegetal consiste em vários e consecutivos passos:

- 1) A matriz vegetal absorve o solvente supercrítico, inchando a estrutura das células, as membranas celulares e os canais intercelulares são dilatados, fazendo com que a resistência à transferência de massa diminua;

- 2) Em paralelo, ocorre a dissolução dos compostos do extrato que podem ser extraídos pelo solvente;
- 3) Ocorre a transferência por difusão dos compostos solubilizados de dentro do sólido até a sua superfície;
- 4) Os compostos solubilizados atingem a superfície externa;
- 5) Os compostos solubilizados são transportados da superfície para o seio do solvente supercrítico e são, subseqüentemente, removidos com o solvente.

3.4.3.1 Curvas de extração

A curva de extração é calculada pela quantidade total de extrato - obtida após despressurização - em função do tempo, sendo uma resposta ao fluxo de solvente entrando no extrator. A curva resposta depende dos parâmetros de processo e dos fenômenos que ocorrem no leito fixo durante a extração. Devido à influência de vários fatores no resultado dessa curva, seu uso para comparação de extrações de diferentes materiais e de diferentes equipamentos é limitado, mas as informações que ela pode fornecer são úteis para comparar uma série de experimentos com o mesmo substrato e o mesmo equipamento (BRUNNER, 1994).

De acordo com a literatura, essas curvas são geralmente divididas em três etapas, ilustradas na Figura 10:

- 1) Etapa de taxa constante de extração (CER), onde a resistência a transferência de massa na fase fluida predomina e o extrato está prontamente disponível na interface sólido/fluido, sendo que o valor máximo da concentração do extrato no solvente supercrítico é dada pela solubilidade de equilíbrio. Essa etapa corresponde à cerca de 50 % do rendimento total da extração;
- 2) Etapa de taxa de extração decrescente (FER), quando a resistência à transferência de massa aumenta incluindo, além do efeito convectivo na fase fluida, o efeito difusional na fase sólida devido ao esgotamento do extrato em sua superfície, sendo a quantidade de extrato no solvente supercrítico menor

que a concentração de equilíbrio. Até o final desta etapa, a extração atinge mais de 70 % do rendimento total da extração;

3) Etapa difusional ou etapa de taxa de extração nula, onde taxa transferência de massa é controlada principalmente pelo fenômeno difusivo na parte interna da partícula sólida (Brunner, 1994; Ferreira et al., 1999).

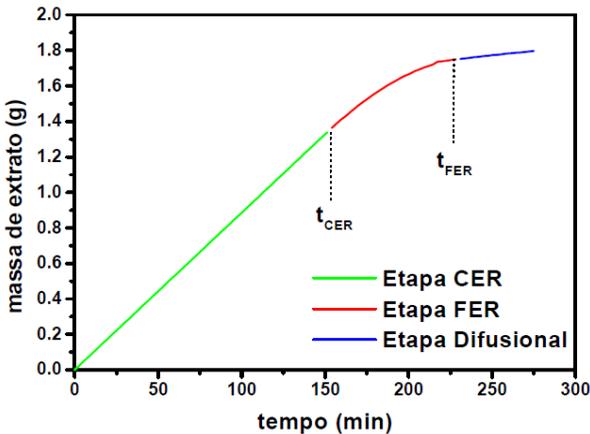


Figura 10 - Curva de cinética de extração.

Fonte: Martínez, 2005.

A curva de extração pode ser utilizada na determinação de parâmetros de processo, como tempo de extração, caracterização das etapas de extração supercrítica e determinação da solubilidade, como também na modelagem da transferência de massa do sistema (SILVA, 2004). A modelagem dessas curvas permite a obtenção de informações de rendimento do processo relacionado com a pressão, temperatura e vazão de solvente, possibilitando o projeto e ampliação de escala dos processos (PERRUT, 2001).

Do ponto de vista industrial, o projeto (incluindo ampliação da escala laboratorial para escala industrial), a otimização e a avaliação econômica de processos que empregam fluidos supercríticos requer conhecimento dos parâmetros termodinâmicos - como solubilidade e seletividade - assim como

parâmetros cinéticos - como taxa de transferência de massa do sólido para o fluido supercrítico. Além disso, é importante conhecer o efeito das variáveis envolvidas - pressão, temperatura, vazão do solvente, tamanho de partícula do sólido, duração do processo - e sua correlação com um modelo teórico que descreva a cinética de extração. A solubilidade é um parâmetro de grande relevância na determinação das condições de operação enquanto que a seletividade permite a obtenção de informações sobre qualidade e composição dos extratos (FERREIRA et al., 1999; REVERCHON e DE MARCO, 2006; POURMORTAZAVI e HAJIMIRSADEGHI, 2007).

Empiricamente, a solubilidade de um composto puro num fluido supercrítico pode ser determinada através da realização da extração supercrítica de um meio inerte, como areia ou cerâmica, impregnado com o composto de interesse em concentração conhecida. Além de dados sobre a solubilidade do composto no fluido supercrítico, esse procedimento fornece também informação sobre a recuperação do extrato após despressurização. Devido à grande demanda de tempo necessária para a realização desses experimentos, alguns pesquisadores propuseram modelos matemáticos fundamentados em teorias e equações de estado para estimar a solubilidade de vários compostos. A solubilidade do soluto é, geralmente, função da densidade do solvente. À temperatura constante, a solubilidade aumenta com o incremento da pressão, como resultado direto do aumento da densidade do solvente. Em baixas pressões, um aumento da temperatura leva a uma diminuição da solubilidade e o oposto é observado a altas pressões (FERREIRA et al., 1999; POURMORTAZAVI e HAJIMIRSADEGHI, 2007). Esse efeito oposto provoca uma inversão das isotermas de rendimento, chamado *crossover*, e já foi relatado por vários autores (CAMPOS, 2005; KITZBERGER et al., 2009; MICHIELIN et al., 2005). Sendo assim, a vantagem de conduzir extrações a pressões elevadas é devida ao favorecimento à transferência de massa que por sua vez está relacionada ao incremento da solubilidade (CASAS et al., 2007).

A vazão de solvente é um parâmetro relevante quando o processo é controlado pela resistência externa à transferência de

massa ou pelo equilíbrio, ou seja, a quantidade de fluido supercrítico introduzida no extrator determina a taxa de extração. Por outro lado, na maior parte dos casos de extração em matrizes sólidas, o processo é controlado pela resistência interna à transferência de massa. Para reduzir essa resistência e aumentar o rendimento de extração, pode-se reduzir o tamanho das partículas, com a finalidade de aumentar a área de contato entre o sólido e o solvente, diminuindo, desta forma, a distância que o soluto percorre no interior da partícula porosa. Porém, a redução da granulometria do sólido não pode ser realizada de forma indefinida, pois partículas muito pequenas tendem a formar aglomerados e interromper a passagem do solvente pelo leito, além de proporcionar perda de compostos voláteis. De um modo geral, são utilizadas partículas com diâmetro médio entre 0,25 e 2 mm (BRUNNER, 1994; MARTÍNEZ, 2005; REVERCHON e DE MARCO, 2006). Sovová et al. (1994) estudaram o efeito da moagem de sementes de uva sobre a taxa de extração do óleo, demonstrando que a redução do tamanho de partícula aumenta a área superficial e libera o soluto do interior das sementes, implicando um aumento da taxa de extração e maiores rendimentos ao final da extração.

3.4.3.2 Fluidos Supercríticos

Na prática, mais de 90 % das extrações analíticas com fluidos supercríticos são realizadas com gás carbônico por uma série de razões. Além de apresentar pressão e temperatura relativamente baixas (73,8 bar e 31,1 °C), o CO₂ é inerte, atóxico, não inflamável, de custo relativamente baixo, facilmente disponível em alta pureza, inodoro e pode ser prontamente removido do produto final, sem deixar resíduos. Isso porque, devido sua alta volatilidade, ele se dissipa totalmente no final da extração, após a descompressão, sendo um componente do ar atmosférico. Assim, a extração de compostos naturais com dióxido de carbono supercrítico resolve eficazmente as questões associadas às altas temperaturas e ao uso de solventes orgânicos empregados em extrações convencionais. Além disso,

esses extratos podem ser considerados naturais e até mesmo obter o *status* GRAS (*Generally Recognized As Safe*), uma designação do FDA (*Food and Drug Administration*) para substâncias consideradas seguras para adição em alimentos (ADIL et al., 2007; DÍAZ-REINOSO et al., 2006; MELECCHI, 2005; MICHIELIN, 2009; POURMORTAZAVI e HAJIMIRSADEGHI, 2007).

Todas essas características fazem o CO₂ parecer o solvente ideal, porém sua principal desvantagem é a apolaridade, o que torna a utilização desse componente puro não apropriada para extração de compostos polares e matrizes com alto poder de retenção, fazendo-se necessário a utilização de modificadores (em pequenas quantidades) para aumentar seu poder de solvatação (CORTESI et al., 1999; POURMORTAZAVI e HAJIMIRSADEGHI, 2007).

Dependendo do tipo da matriz sólida e da afinidade do soluto com a matriz, o solvente modificador (ou co-solvente) pode influenciar a extração de três modos:

- a) Aumentar a solubilidade do soluto no fluido supercrítico como resultado das interações soluto/modificador na fase fluida;
- b) Facilitar a dessorção do soluto – as moléculas de modificadores polares são capazes de interagir com a matriz e competir com o soluto pelos pontos ativos da matriz;
- c) Alterar o processo de difusão do soluto na matriz e favorecer a penetração do fluido supercrítico no interior da matriz quando o modificador dilata a matriz (CASAS et al., 2007).

A adição de co-solventes orgânicos como etanol, metanol, acetona, entre outros solventes polares, aumenta o poder de solvatação do CO₂ e o rendimento da extração quando há componentes polares a serem extraídos, como é o caso dos polifenóis. Por ser permitido como solvente em indústrias de alimentos e por, geralmente, apresentar bons resultados, o etanol é bastante utilizado, sendo que seu consumo ocorre em menor quantidade do que nas extrações convencionais e facilmente eliminado do extrato por evaporação a temperaturas moderadas (ADIL et al., 2007).

Quando um co-solvente é adicionado ao CO₂, a temperatura crítica da mistura resultante é elevada limitando sua

quantidade a ser usada se as extrações ocorrerem na faixa supercrítica entre 40 e 60 °C. A adição de 5 % de etanol ao CO₂ aumenta a temperatura crítica da mistura para 42,5 °C (Tabela 5). Uma extração utilizando 200 bar (ou qualquer pressão acima da crítica da mistura), 50 °C e 5 % de etanol como co-solvente é supercrítica, enquanto que a extração a 40 °C, mantendo fixos os demais parâmetros, é subcrítica. Assim, a adição de concentrações maiores de etanol (14 a 20 %) torna a extração subcrítica a temperaturas entre 40 e 60 °C (Tabela 5). Extrações supercríticas ou subcríticas com etanol e/ou metanol adicionados ao CO₂ como modificadores têm sido aplicadas para obtenção de polifenóis de subprodutos da indústria vinícola (ADIL et al., 2007).

Tabela 5 - Temperatura e pressão críticas de misturas CO₂-etanol (calculado por Software SF-Solver, ISCO Inc., Lincoln, NE, USA).

Concentração de etanol (%)	T _c (°C)	P _c (bar)
0	31,1	73,8
5	42,5	73,2
10	53,7	72,7
14	62,8	72,2
17	69,5	71,9
20	76,1	71,5
100	243,3	61,3

Fonte: Adil et al, 2007.

A Tabela 6 apresenta outras substâncias que também demonstram, em seu estado supercrítico, interessantes propriedades solventes que são utilizadas para extração de compostos de plantas entre outros materiais. Entretanto, por razões de custo, perigo de explosão, toxicidade, inflamabilidade e propriedades físicas adversas, poucos deles são usados comercialmente (FREITAS, 2007).

Tabela 6 - Pressão, temperatura e densidade críticas de solventes.

Substância	T _c (°C)	P _c (bar)	ρ _c (g/cm ³)
NH ₃	133	113	0,236
Água	374	220	0,323
N ₂ O	36	72	0,452
Metano	- 82	46	0,169
Etano	32	49	0,203
Propano	97	42	0,217
Pentano	197	34	0,237
Etileno	9	50	0,218
Tolueno	319	41	0,292
Metanol	240	81	0,272
Acetona	235	47	0,279
Éter etílico	194	36	0,265

T_c = temperatura crítica P_c = pressão crítica ρ_c = densidade crítica

Fonte: Freitas, 2007.

O propano, embora não apresente todas as qualidades do CO₂, também apresenta moderadas temperatura e pressão críticas (97 °C e 42 bar), e se dissipa após a descompressão, dispensando a etapa de evaporação do solvente; seu poder de solvatação é maior que do CO₂ na extração de muitas substâncias presentes em óleos e produtos naturais. Freitas (2007) obteve melhores rendimentos de extração de óleo de semente de uva com propano em estado subcrítico do que com CO₂ em estado supercrítico, ainda com a vantagem de temperatura e pressão mais baixas, proporcionando menor custo de operação.

O N₂O é considerado um bom fluido para extração de compostos polares, porém pode causar explosões violentas quando usado em amostras com alto teor de compostos orgânicos, sendo usado somente quando absolutamente necessário e possível (POURMORTAZAVI e HAJIMIRSADEGHI, 2007).

Apesar de a água supercrítica ser usada com frequência para destruição de orgânicos de risco, a alta temperatura e pressão necessárias ($T > 374$ °C e $P > 220$ bar), juntamente com

o efeito corrosivo da água nessas condições, é limitante de sua aplicação prática em plantas de extração de óleo. No entanto, a água em condições subcríticas - com pressão ou temperatura abaixo do valor crítico - tem demonstrado ser um fluido efetivo para a extração de várias classes de óleos, sendo a técnica chamada de extração subcrítica ou extração com líquido pressurizado (FREITAS, 2007; POURMORTAZAVI e HAJIMIRSADEGHI, 2007). Monrad et al. (2010) compararam a eficiência de água pura e diferentes concentrações de solução etanol/água sob condições subcríticas para a extração de procianidinas do bagaço seco de uvas tintas.

3.4.3.3 Modelos Matemáticos

A otimização das condições operacionais usadas durante a extração supercrítica é de grande importância para avaliar a viabilidade econômica da técnica, uma vez que o investimento inicial na construção de uma unidade extratora de alta pressão é elevado. A modelagem matemática de aspectos relevantes do processo é necessária para generalizar as informações experimentais para aplicação em diferentes materiais e para interpolar ou extrapolar essas condições experimentais a novas condições de processo, sendo bastante útil para a ampliação de escala do processo, de laboratorial para piloto e industrial, através da simulação das curvas globais de extração. Por isso, várias propostas de modelos matemáticos para a extração supercrítica são apresentadas na literatura (MARTINEZ et al., 2003; REVERCHON e DE MARCO, 2006).

A distribuição inicial do soluto na matriz sólida influencia a seleção dos possíveis modelos matemáticos. As substâncias a serem extraídas podem estar livres na superfície da matriz sólida, localizadas dentro dos poros ou ainda distribuídas no interior das células do material vegetal, sendo que cada uma dessas descrições corresponde a diferentes modelos. Os resultados experimentais também contribuem para a seleção do modelo, podendo evidenciar a influência de diferentes resistências a transferência de massa ou a existência de

condições de equilíbrio. Até mesmo a transição entre diferentes mecanismos de transferência de massa podem ser observados (REVERCHON, 1997; REVERCHON e DE MARCO, 2006).

No entanto, um modelo não deve ser um mero instrumento matemático, mas sim descrever o fenômeno físico do processo; faz-se necessário, para isso, observações experimentais e conhecimento da estrutura do sólido. A validação dos modelos matemáticos sem nenhuma correspondência física com o material e com o processo estudado é limitada, mesmo que possam ser utilizados para ajustar alguns dados experimentais. Três diferentes abordagens têm sido propostas para a modelagem matemática do processo de extração supercrítica de matrizes vegetais:

- 1) Modelos empíricos;
- 2) Modelos baseados na analogia com a transferência de calor;
- 3) Modelos resultantes da integração do balanço de massa diferencial, podendo ser obtidos perfis de concentração em função do tempo para ambas as fases, sólida e fluida. São, geralmente, os que proporcionam uma análise mais adequada do processo (REVERCHON, 1997; REVERCHON e DE MARCO, 2006).

Devido à complexidade do fluxo no leito fixo, foram desenvolvidas também correlações semi-empíricas para descrever a transferência de massa do soluto entre as fases sólida e fluida. Conceitualmente, o coeficiente de transferência de massa – que é função da densidade, viscosidade, difusividade, porosidade do leito, tamanho de partícula e vazão do solvente – pode ser usado para descrever as condições cinéticas do sistema. O mecanismo de transferência de massa da extração à alta pressão de misturas complexas, como é o caso de óleos essenciais, ainda não é completamente conhecido. A maioria dos modelos disponíveis na literatura trata o extrato como uma substância pura, apesar do fato dele poder conter vários compostos de natureza química diferentes. Sendo assim, as dificuldades em modelar sistemas complexos residem no número elevado de componentes na mistura e em estabelecer as interações entre os componentes do extrato, o solvente e a fase

sólida (BRUNNER, 1994; FERREIRA et al., 1999; MARTINEZ et al., 2003). A principal diferença entre os diversos modelos encontrados na literatura reside na interpretação dada para os fenômenos e na possibilidade de negligenciar alguns deles (MARTINEZ et al., 2003). Neste trabalho a modelagem das curvas de extração de bagaço de uva da variedade *Merlot* foi realizada utilizando os modelos apresentados por Sovová (1994), Martinez et al. (2003), Crank (1975), Esquível et al. (1999), Tan e Liou (1989) e Gaspar et al. (2003).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir são apresentados e descritos os materiais e métodos utilizados para a determinação das condições ótimas de processo para a obtenção do extrato de bagaço de uva e para a modelagem dos dados experimentais, bem como para determinação de sua composição e atividades antioxidante e antimicrobiana.

O foco deste estudo é nas variedades *Merlot* e *Syrah* e o intuito era realizar todas as análises com o bagaço de cada uma dessas variedades; porém, a quantidade recebida do bagaço da cultivar *Syrah* não foi suficiente para efetuar todas as extrações. Então, para os experimentos em condições supercríticas, foi priorizado o bagaço da variedade *Merlot*, e, posteriormente, aplicada uma condição selecionada ao bagaço de *Syrah*. Nos ensaios envolvendo extrações à baixa pressão, foram utilizadas as matérias-primas de ambas as variedades. O bagaço da variedade *Cabernet Sauvignon* foi objeto de estudo de Campos (2005), porém, o referido autor empregou algumas análises para avaliação de qualidade dos extratos diferentes das utilizadas no presente estudo. Assim, como havia matéria-prima disponível, decidiu-se realizar uma extração supercrítica, na mesma condição selecionada para a variedade *Syrah*, para comparar a qualidade dos extratos das três variedades.

Todos os procedimentos de preparação da amostra, caracterização do leito de partículas, experimentos de extração e de determinação da atividade antioxidante foram realizados no Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica (LATESC), do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos (EQA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os ensaios para avaliação da atividade antimicrobiana foram realizados no Laboratório de Antibióticos, do Departamento de Biotecnologia da UFSC, e a determinação do perfil químico dos extratos foi realizada no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal do Departamento de Fitotecnia da UFSC.

4.1 MATÉRIA-PRIMA

O resíduo do processamento de vinho, apresentado na Figura 11, composto de cascas, sementes e engaços, foi cedido por duas vinícolas da empresa Miolo Wine Group. O bagaço da variedade *Syrah* é proveniente da vindima de 2008 da Vinícola Ouro Verde, localizada no Vale do São Francisco na Bahia, e as matérias-primas das variedades *Merlot* e *Cabernet Sauvignon* são oriundos da vindima de 2009 da Vinícola Miolo, localizada no Vale dos Vinhedos no Rio Grande do Sul.

Ao serem recebidas as diferentes matérias-primas, separou-se uma amostra de cada para a determinação do teor de umidade do material (4.1.1) e o restante foi acondicionado em sacos plásticos de polietileno, em porções de aproximadamente 2 kg para facilitar o manuseio, e armazenado em freezer doméstico (*Freezer 250*, Brastemp, São Paulo/SP) à temperatura de aproximadamente -18 °C até o momento do pré-tratamento, realizado conforme metodologia descrita no item 4.1.2.



Figura 11 - Bagaço de uva *in natura* no recebimento.

4.1.1 Determinação do teor de umidade e substâncias voláteis

O teor de umidade e substâncias voláteis presentes na matéria-prima foi determinado pela metodologia 925.09 da AOAC

(2005) fundamentada na perda de umidade e substâncias voláteis da amostra submetida a 105 °C. Brevemente, a massa de cada amostra foi medida - em balança analítica (AY220, SHIMADZU do Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil) - 5 g de amostra em cápsula de alumínio tarada, previamente aquecida em estufa (E.L. 003, Odontobrás, Ribeirão Preto/SP, Brasil) a 105 °C por 1 hora, resfriada em dessecador até temperatura ambiente e pesada. Posteriormente, as amostras foram colocadas em estufa a 105 °C por 3 horas, resfriadas em dessecador até temperatura ambiente e sua massa medida novamente. Repetiram-se essas operações de aquecimento e resfriamento em intervalos de meia hora, até peso constante. Para o cálculo do teor de umidade e voláteis, foi empregada a Equação 1.

$$\frac{100 \times N}{P} = \text{umidade \%} \quad \text{Eq. 1}$$

onde: N é a perda de massa em gramas e P é o massa inicial da amostra em gramas.

Este procedimento foi aplicado nas matérias-primas *in natura*, assim que recebidas, e depois de submetidas ao pré-tratamento (item 4.1.2), sendo realizado em triplicata para cada material e os resultados expressos como média \pm desvio padrão.

4.1.2 Pré-tratamento

O bagaço de uva foi submetido à secagem em estufa com circulação de ar (De Leo, Porto Alegre/RS, Brasil). Foram testados diferentes tempos de secagem na menor temperatura proporcionada pelo equipamento, 32 °C, para evitar a degradação térmica de compostos. A melhor condição para manipulação (função da umidade final do bagaço) foi obtida com a secagem por 20 horas para a variedade *Syrah* e 21 horas e 30 minutos para as variedades *Merlot* e *Cabernet Sauvignon*. A diferença de tempo de secagem entre as variedades se deve à diferença de umidade inicial da matéria-prima recebida.

Com a finalidade de proporcionar um maior contato soluto/solvente, aumentando assim a transferência de massa, a matéria-prima seca foi triturada em moinho de facas (De Leo, Porto Alegre/RS, Brasil) e submetida à separação e classificação granulométrica em agitador de peneiras (Bertel Indústria Metalúrgica Ltda., Caieiras/SP, Brasil) para padronização do tamanho das partículas e determinação de seu diâmetro médio. A maior parte da matéria-prima ficou retida entre as peneiras - 20/+32 *mesh*, sendo, portanto, a fração utilizada para a realização dos experimentos. As frações menores (48 *mesh* e fundo) foram desprezadas e a fração +20 *mesh* foi reprocessada no moinho e reclassificada granulometricamente. Após a separação granulométrica, a matéria-prima foi acondicionada em embalagens plásticas identificadas, e mantida congelada, em *freezer* doméstico, à -18 °C até a realização dos experimentos (CAMPOS, 2005).

4.2 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Foram utilizados processos de extração à baixa pressão pelos métodos Soxhlet e maceração ultrassônica, para selecionar o co-solvente a ser empregado na extração supercrítica e comparar os resultados de rendimento, atividade biológica e atividade antimicrobiana dos extratos de bagaço de uva obtidos com os diferentes métodos.

4.2.1 Extração Soxhlet

A extração Soxhlet foi realizada de acordo com o método 920.39C da AOAC (2005), com os seguintes solventes orgânicos: n-hexano, acetato de etila, etanol e água destilada.

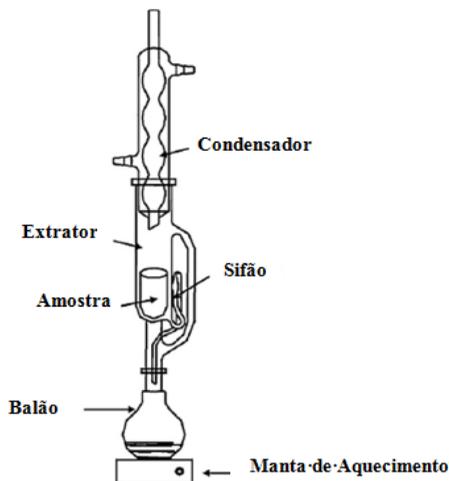


Figura 12 - Extrator Soxhlet convencional.

Fonte: Castro e Priego-Capote, 2010

Conforme apresentado na Figura 12, o sistema Soxhlet consiste de um extrator que é acoplado, na extremidade inferior, a um balão volumétrico de vidro com fundo redondo e capacidade para 250 mL e na extremidade superior, a um condensador, arrefecido por um banho (MQBMP-01, Microquímica Ind. Com. Repr. Ltda., Palhoça/SC, Brasil). No extrator é colocado um cartucho de papel de filtro contendo cerca de 5 g de amostra, enquanto no balão são adicionados 150 mL de solvente que é aquecido por uma manta de aquecimento (Fisatom, Mod. 52 - Classe 300, São Paulo/SP, Brasil) na temperatura de ebulição do solvente utilizado. O vapor do solvente sobe até o condensador, onde resfria e condensa gotejando (aproximadamente 4 gotas por segundo) sobre a matriz vegetal contida no extrator, solubilizando os compostos. O extrator lentamente enche com o solvente até ser esvaziado por ação de sifão, sendo então enviado de volta ao balão e o processo de refluxo é repetido continuamente durante 8 horas de extração. Em cada ciclo, novos compostos são dissolvidos no solvente que se evapora novamente, deixando a substância

dissolvida no balão. Os extratos obtidos foram submetidos, posteriormente, ao processo de eliminação do solvente (4.2.4) e armazenados em *freezer* doméstico (*Freezer 250*, Brastemp, São Paulo/SP) a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. As extrações foram realizadas em triplicata e o resultado expresso como média \pm desvio padrão.

4.2.2 Extração com ultrassom

A maceração ultrassônica consiste em utilizar solventes, em temperatura ambiente, para a extração de compostos mediante o uso de ondas sonoras. As extrações com ultrassom foram realizadas em duplicata em aparelho de ultrassom Ultrasonic cleaner, modelo USC-200 de frequência 40 KHz e potência de 60 W. A técnica utilizada se baseou na metodologia descrita por Freitas (2007), utilizando 3 g de amostra seca, com 50 ml de solvente por 30 minutos. Foram utilizados os mesmos solventes empregados na extração Soxhlet (seção 4.2.1).

O balão, contendo a mistura de amostra e solvente, foi acoplado a um condensador conectado a um banho refrigerado (MQBMP-01, Microquímica Ind. Com. Repr. Ltda., Palhoça/SC, Brasil), de acordo com o trabalho de Freitas (2007), e submetido ao tratamento em banho indireto com ultrassom através do uso de uma lavadora ultrassônica (USC-700/55 kHz, Unique Ind. e Com. de Produtos Eletrônicos Ltda., Indaiatuba/SP, Brasil) pelo tempo de extração de 30 minutos. Após a extração, o sistema foi filtrado com auxílio de bomba de vácuo (DVR 1400, Dosivac, Buenos Aires, Argentina) em funil de Büchner com papel-filtro, sendo o filtrado recolhido em *Kitasato*.

Os filtrados obtidos foram submetidos, posteriormente, ao processo de eliminação do solvente (4.2.4) e armazenados em *freezer* doméstico (*Freezer 250*, Brastemp, São Paulo/SP) a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. O resultado de rendimento foi expresso como média \pm desvio padrão.

4.2.3 Extração supercrítica (ESC)

Os experimentos de extração supercrítica foram realizados no LATESC em uma unidade de extração que opera até uma pressão máxima de 300 bar e vazões de solvente de 1,7 a 36,7 g/min. As condições operacionais utilizadas na ESC do bagaço de uva foram selecionadas de forma que abrangessem uma ampla faixa de massa específica de solvente, com o objetivo de determinar quais condições de temperatura, pressão e concentração de co-solvente proporcionam o maior rendimento global e os melhores parâmetros de qualidade, dentro dos limites de operação do equipamento utilizado.

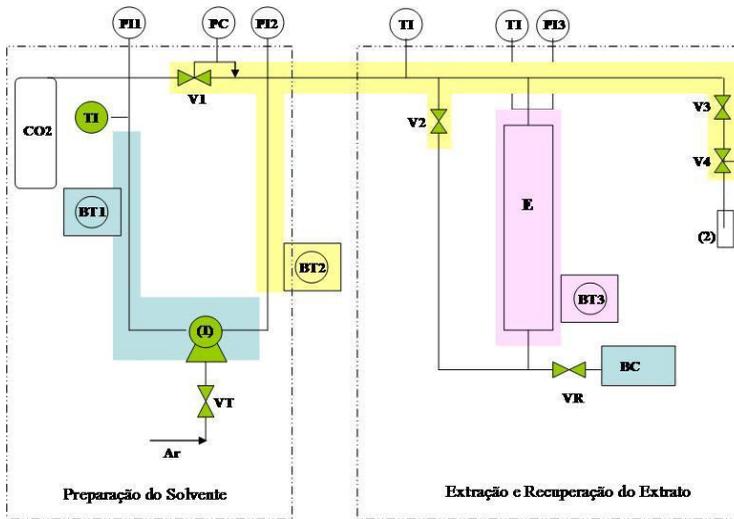
Os experimentos cinéticos (curvas de extração) foram realizados através do método dinâmico de extração, caracterizado pela passagem contínua do solvente supercrítico pela matriz sólida (FERREIRA et al., 1999; DANIELSKI et al., 2007). A partir desse método pode-se determinar X_0 , descrito como a quantidade percentual de soluto extraível do material sólido para determinadas condições de processo, assim como definir parâmetros como a quantidade de matéria-prima para a formação do leite de partículas e o tempo total de extração.

Os experimentos de rendimento global foram efetuados em duplicata e os extratos obtidos foram empregados para as análises de atividade biológica e atividade antimicrobiana, como também na determinação de seu perfil químico.

A Figura 13 apresenta a unidade de extração supercrítica desenvolvida pelo Laboratório *Thermische Verfahrenstechnik* da *Technische Universität Hamburg-Harburg* (TUHH), na Alemanha, que é utilizada no LATESC, enquanto a Figura 14 apresenta um esquema detalhado dos componentes dessa unidade.



Figura 13 - Equipamento de extração supercrítica.



E: Extrator; VT: Válvula de controle da frequência da bomba; V1: Válvula reguladora de pressão; V2, V3 e V4: Válvulas da entrada, saída e micrométrica do extrator, respectivamente; PI1: Manômetro de controle do cilindro (WIKA do Brasil, PI:Cat 233.50.10); PI2: Manômetro de controle da bomba (WIKA do Brasil, PI:Cat 233.50.10); PI3: Manômetro de controle do extrator (WIKA do Brasil, PI:Cat 233.50.10); TI: Controladores de temperatura; BC: Bomba de co-solvente; VR: Válvula de retenção da bomba de co-solvente.

Figura 14 - Diagrama esquemático da unidade de extração supercrítica.

(3)

O principal fluido utilizado é o CO₂ com 99,9 % de pureza que provém de um cilindro equipado com tubo pescador (White Martins Ltda., Joinville/SC, Brasil). A linha de solvente, na qual é inserido o CO₂, é imersa em um banho termostático (BT1) (C10 - K10, Thermo Haake, Karlsruhe, Alemanha) programado para manter a temperatura inferior a 0 °C, garantindo assim que o solvente (CO₂) esteja no estado líquido antes de sua entrada na bomba (1) (M111, Maximator, Niedersachsen, Alemanha). A bomba trabalha alimentada por uma linha de ar comprimido filtrado mantido na pressão mínima de 5 bar. A pressão de operação da unidade supercrítica é regulada através da válvula globo (V1) (Tescom Cat n° 26-1761-24-161, Alemanha). Durante o funcionamento, a bomba encaminha o CO₂ pressurizado (a uma pressão pré-estabelecida em V1) à linha de extração, passando pelo extrator (E), que consiste de um cilindro de aço inox encamisado de 31,6 cm de comprimento, 2,012 cm de diâmetro interno e volume de 103,3 mL, com extremidades rosqueadas. A linha que liga a bomba ao extrator, bem como a linha após o extrator, é mantida submersa em um banho termostático de aquecimento (BT2) (MQBTZ99-20, Microquímica Ind. Com. e Repr. Ltda., Palhoça/SC, Brasil) a uma temperatura constante de 65 °C, de modo a evitar o congelamento da linha e da válvula micrométrica durante a despressurização da mistura soluto/solvente (V4) (Sitec Microvalve 710.3012, Zurique, Alemanha). A temperatura de operação do extrator é mantida constante através de um banho termostático de aquecimento (BT3) (DC30-B30, Thermo Haake, Alemanha). No início do processo de extração, a válvula (V2) (Cat n° 3710.0104, Maximator) é mantida fechada e, após a pressurização do solvente, é aberta para permitir a passagem do CO₂ para o extrator. A válvula (V3) (Shutoff valve 710.3010, Sitec, Zurique, Suíça) também conectada na saída do extrator auxilia a V4 na despressurização do solvente e permite o controle do fluxo de solvente. Após passar pela V4, o extrato é coletado em frascos âmbar (2) e o fluxo de CO₂ é medido no rotâmetro (3) (10A61ABB, Automation Products), regulado por V3 e V4.

4.2.3.1 Determinação do diâmetro médio de partículas

O diâmetro médio de partícula foi determinado através do cálculo proposto por Gomide (1983). Para isso, foram medidos 100 g de amostra em balança semi-analítica (BG 2000, Gehaka Ind. e Com. de Eletro-eletrônicos Ltda., São Paulo/SP, Brasil) para cada batelada e utilizadas as peneiras da série Tyler de *mesh* -20/+48, sendo o conjunto agitado por 20 minutos. Com as frações retidas em cada peneira foi calculado o diâmetro médio de partículas conforme as Equações 2 e 3 (GOMIDE, 1983).

$$\bar{d}_s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \frac{\Delta m_i}{\bar{d}_i}}{\sum_{i=1}^n \frac{\Delta m_i}{\bar{d}_i^3}}} \quad \text{Eq. 2}$$

$$\Delta m_i = \frac{m_i}{M} \quad \text{Eq. 3}$$

onde d_s é o diâmetro médio superficial das partículas (mm), m_i é a massa de amostra retida na peneira i (g), M é a massa total de amostra (g), d_i é o diâmetro da peneira i (mm) e n é o número total de frações.

4.2.3.2 Densidade Real e Densidade Aparente

A densidade real (ρ_r) foi determinada utilizando-se o princípio de Arquimedes de deslocamento de fluidos através da técnica de picnometria em gás Hélio, com o uso do equipamento Accu Pyc II 1340 da Micromeritics. A utilização dessa técnica proporciona boa precisão nos resultados, visto que o gás Hélio penetra nos poros da matriz vegetal devido a sua baixa tensão superficial sem alterar as características das partículas; dessa forma evita, também, o umedecimento das mesmas como aconteceria se fosse utilizada a água como fluido picnométrico.

A densidade aparente (ρ_a) é a relação entre a massa de bagaço triturado e seco utilizada para formar o leito de sólidos e

o volume do extrator, incluindo assim apenas os poros do leito e não os poros do interior da partícula. A densidade aparente foi determinada pela razão entre a massa de amostra ($m_{\text{bagaço uva}}$) e o volume ocupado por esta no extrator (V_{leito}) conforme a Equação 4.

$$\rho_a = \frac{m_{\text{bagaço uva}}}{V_{\text{leito}}} \quad \text{Eq. 4}$$

4.2.3.3 Porosidade do leito fixo de partículas

Para formar o leito fixo de partículas foi utilizado aproximadamente 25 g de bagaço de uva seco e moído (*mesh* - 20/+32). A porosidade (ε) do leito foi determinada através da Equação 5, que relaciona a densidade real (ρ_r) e a densidade aparente (ρ_a). Tal parâmetro é necessário para a modelagem do processo.

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_a}{\rho_r} \quad \text{Eq. 5}$$

4.2.3.4 Densidade do solvente

Frequentemente, o poder de solvatação do dióxido de carbono supercrítico é descrito por sua densidade, que é uma função não linear da pressão e da temperatura de operação (REVENCHON e DE MARCO, 2006).

A equação de Angus et al. (1976), baseada em dados experimentais, foi utilizada para determinação da densidade do CO₂ nas condições operacionais de extração utilizadas neste estudo. Esses valores são utilizados na aplicação de modelos de transferência de massa para descrição das curvas de extração.

4.2.3.5 Determinação da solubilidade

A solubilidade é definida como a máxima concentração de óleo dissolvido na fase solvente, na saída do extrator, para uma dada condição de temperatura e pressão de operação. Para isto, a coluna de extração deve ser suficientemente longa ou a vazão de solvente suficientemente baixa, de modo a garantir um tempo de contato suficiente entre as fases, permitindo a saturação do solvente com o óleo na saída do extrator.

Para a aplicação do modelo de transferência de massa de Sovová (1994), a solubilidade é um parâmetro termodinâmico essencial. No presente trabalho, para a condição de 150 bar e 50 °C, a solubilidade do óleo de bagaço de uva em CO₂ supercrítico foi assumida como sendo igual $19,4 \times 10^{-4}$ (g_{extrato}/g_{CO2}), determinada experimentalmente por Campos (2005) de acordo com a metodologia descrita por Danielski (2002). Porém, esse valor ainda foi considerado preliminar por Campos (2005), sendo necessários mais experimentos em uma faixa maior de vazão para um estudo mais detalhado do comportamento dos valores de Y_{CER} .

4.2.3.6 Experimentos cinéticos – Curvas de extração e parâmetros cinéticos

Os experimentos cinéticos para a obtenção da curva de extração foram realizados apenas com amostra de bagaço de uva da variedade *Merlot* utilizando 20 g da matéria-prima pré-tratada. Essa massa de matéria-prima foi empregada para formar um leito de partículas com altura de pelo menos o dobro do diâmetro do extrator considerando-se que, com essa relação entre altura e diâmetro do leito, a dispersão axial pode ser desprezada. Os frascos de coleta foram previamente pesados em balança analítica e a coleta do extrato foi realizada em intervalos de tempo pré-determinados. Após a coleta, os frascos foram novamente pesados para se obter a massa de extrato em função do tempo de extração. As curvas de extração podem ser construídas através da massa de extrato acumulado em função

do tempo de extração ou da massa de CO₂ consumido, ou ainda pelo rendimento de extração *versus* a razão massa de solvente por massa de amostra (MEZZOMO et al., 2009; MICHIELIN, 2009).

Os experimentos cinéticos foram realizados utilizando CO₂ puro em duas condições de vazão de solvente (8 ± 2 g/min e 13 ± 2 g/min), mantendo-se constantes as demais condições de pressão (150 bar), temperatura (50 °C) e diâmetro de partícula do bagaço de uva (-20/+32 *mesh*). Os valores experimentais de massa de extrato *versus* tempo de extração obtidos na curva da extração supercrítica do bagaço de uva *Merlot* são apresentados na Tabela 22 (Apêndice II).

Os parâmetros cinéticos foram considerados para avaliar a cinética das extrações e calculados conforme Mezzomo et al. (2009). Os tempos de cada um dos períodos de extração foram calculados a partir da curva de extração, apresentada em 5.3, e, a partir daí, foi definido o tempo total de extração usado posteriormente nos experimentos de rendimento global. Os tempos t_{CER} e t_{FER} representam o final das etapas constante e decrescente de extração, respectivamente. A taxa de transferência de massa na etapa CER (M_{CER}) foi obtida a partir de regressão linear da curva de extração no período CER, realizada com auxílio do *software* Microsoft Excel, enquanto a concentração de soluto na fase solvente na etapa CER (Y_{CER}) foi determinada pela razão entre M_{CER} e Q_{CO_2} .

4.2.3.7 Determinação das isotermas de rendimento

Os ensaios para a determinação das isotermas de rendimento foram conduzidos conforme procedimento descrito por Michielin et al. (2005). O rendimento global de extrato (X_0) é a quantidade de soluto extraível presente na matriz sólida referente a uma dada condição de extração. A influência da pressão e da temperatura no rendimento global da ESC foi avaliada com as seguintes condições de operação: pressões de 150, 200, 250 e 300 bar, temperaturas de 50 e 60 °C e vazão fixa de solvente de 13 ± 2 g/min.

O tempo de extração foi definido através da observação das curvas de extração obtidas a 150 bar, 50 °C e vazão de solvente de 13 ± 2 g/min conforme explicado no item 4.2.3.6 sendo fixado em 4 horas, o que totaliza um consumo de 3,2 kg de CO₂. Como pode ser observado na Figura 16 do item 5.3, em 4 horas a extração se encontra na etapa difusional em que a taxa de extração é quase nula.

Cada experimento foi realizado em duplicata, com a mesma altura de leito utilizando 25 g de matéria-prima fracionada nas peneiras -20/+32 *mesh*. As extremidades da coluna foram revestidas com algodão para evitar a entrada de partículas sólidas na linha de extração e o espaço restante do leito foi preenchido com esferas de vidro (na entrada de solvente, antes da matéria-prima).

Os frascos com os extratos foram pesados em balança analítica e armazenados em freezer a -18 °C até a realização dos ensaios de avaliação da qualidade dos extratos. O rendimento global (X_0) foi calculado através da razão entre a massa de extrato (M_{extrato}) obtida e a massa de bagaço de uva (M) utilizada para formar o leito conforme a Equação 6.

$$X_0 = \frac{M_{\text{extrato}}}{M} \cdot 100 \quad \text{Eq. 6}$$

Com os resultados foi construído um gráfico de X_0 em função da pressão, obtendo-se as isotermas de rendimento da extração supercrítica do bagaço de uva *Merlot*. A partir desses experimentos, uma condição foi escolhida para a realização da extração no bagaço da variedade *Syrah* e para a aplicação do co-solvente, a fim de comparar os resultados.

4.2.3.8 Emprego de co-solvente (CS)

Apesar de não ser a condição que proporcionou melhor resultado de rendimento (4.2.3.7), foi utilizada a condição de 250 bar e 60 °C para a adição de co-solvente ao CO₂, devido à diferença não significativa do resultado dessa condição para a de

maior rendimento (300 bar e 60 °C) e a limitação do equipamento, que apresentou certa dificuldade para controle da operação a 300 bar com o bagaço de uva. Os demais parâmetros, vazão de CO₂ e tempo de extração, também não foram alterados a fim de avaliar a influência provocada pela adição do etanol em diferentes concentrações no rendimento da ESC do bagaço de uva *Merlot*.

Para a adição de co-solvente junto à extração supercrítica, foram acopladas ao equipamento uma bomba de co-solvente (BC) e uma válvula de retenção (VR), para evitar que o solvente orgânico retorne para BC se houver um aumento na pressão da bomba de CO₂ durante o experimento, conforme apresentado na Figura 14 (CAMPOS et al., 2008). A bomba de co-solvente (Constametric 3200, SP Thermo Separation Products, USA) trabalha numa faixa de vazão de 0,1 a 10 mL/min.

Utilizou-se como co-solvente o álcool etílico (P.A.) em frações mássicas de 12,5 %, 15 % e 17,5 % (m/m) em relação à massa total de CO₂ empregada na extração supercrítica. Esse solvente foi selecionado com base nos resultados de rendimento das extrações à baixa pressão (item 5.4), e em dados da literatura que relatam o uso deste solvente como co-solvente (CASAS et al., 2007; MURGA et al., 2000; SILVA et al., 2008). Essas frações foram definidas com base no estudo de Campos (2005), que avaliou a aplicação de etanol como co-solvente nas frações mássicas de 10, 15 e 20 %, obtendo melhor rendimento a 15 %. Assim, decidiu-se estreitar a faixa de concentração avaliada.

Os extratos obtidos ao final da extração foram submetidos à etapa de eliminação do solvente orgânico descrito no item 4.2.4. As extrações com emprego de co-solvente foram realizadas em duplicata e o resultado expresso como média ± desvio padrão.

4.2.4 Tratamento dos extratos e eliminação do solvente

Os extratos obtidos através das extrações à baixa pressão (Soxhlet e com ultrassom) e supercrítica adicionada de co-

solvente passaram pela fase de evaporação do solvente em evaporador rotativo (Mod. 550 e 802, Fisatom, São Paulo/SP, Brasil) com arrefecimento (MQBTZ99-20, Microquímica Ind. Com. e Repr. Ltda., Palhoça/SC, Brasil) e controle de vácuo (NT 613, Nova Técnica Piracicaba/SP, Brasil) a fim de eliminar o solvente contido na amostra. As temperaturas de evaporação foram ajustadas para valores inferiores aos pontos de ebulição dos solventes utilizados, para evitar alterações do extrato devido à aplicação de calor, e o vácuo ajustado em 650 mmHg.

4.3 MODELAGEM MATEMÁTICA

A modelagem da curva de extração (massa de extrato acumulada *versus* tempo de extração, construída com os dados do experimento cinético a 150 bar, 40 °C e 13 ± 2 g de CO₂/min), foi realizada com o objetivo de avaliar a influência dos parâmetros de operação e da abordagem fenomenológica de cada modelo no ajuste às curvas experimentais de ESC de extrato de bagaço de uva. Foram aplicados os modelos de Crank (1975), de Tan e Liou (1989), de Gaspar et al. (2003), de Sovová (1994), de Martínez et al. (2003) e de Esquível et al. (1999), através do *software* Mass Transfer, desenvolvido por Correia et al. (2006) no Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica (LATESC/EQA-UFSC), que utiliza o método da máxima verossimilhança para minimizar a soma dos quadrados dos desvios calculados (KITZBERGER et al., 2009).

Para a aplicação dos modelos são necessárias algumas considerações e o conhecimento de parâmetros de processo, obtidos experimentalmente ou estimados. Como a fase supercrítica é tratada como uma solução infinitamente diluída, a densidade do sistema (extrato de bagaço de uva/CO₂) foi considerada como a densidade do solvente puro. Os parâmetros foram medidos diretamente ou calculados a partir de dados experimentais, com exceção da solubilidade do extrato de bagaço de uva em CO₂ supercrítico, valores estes obtidos de

Campos (2005) para o bagaço de uva da variedade *Cabernet Sauvignon*, matéria-prima semelhante à estudada no presente trabalho.

Para a modelagem das curvas de extração do óleo de bagaço de uva utilizando o modelo logístico de Martínez et al. (2003), considerou-se que o extrato seja representado por um único grupo de compostos (pseudocomponente) devido a informações limitadas sobre o perfil de composição do extrato com o tempo de processo e a dificuldade de identificar todos os compostos presentes no extrato.

4.4 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS EXTRATOS

A qualidade dos extratos de bagaço de uva obtidos, tanto pelas extrações supercríticas quanto extrações a baixa pressão, foi avaliada em termos de atividade antioxidante, atividade antimicrobiana e perfil fitoquímico da composição de acordo com as metodologias apresentadas abaixo.

4.4.1 Determinação do teor de fenólicos total (TFT)

A determinação do conteúdo total de fenólicos presente nos extratos de bagaço de uva foi realizada pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton e Rossi (1965). A reação com o reagente de Folin-Ciocalteu baseia-se no princípio que em meio alcalino os compostos fenólicos presentes na amostra reduzem a mistura dos ácidos fosfotungstícos e fosfomolibdicos, do reagente de Folin, em óxidos de tungstênio e molibdênio de cor azul, tornando possível realizar leituras de absorvância na faixa visível do espectro a 765 nm.

Para interpretar os resultados é necessário preparar uma curva padrão de ácido gálico, com o objetivo de representar a absorvância da amostra frente à concentração da curva padrão.

Para isto, dissolve-se 0,5 g de ácido gálico em H₂O destilada de modo a obter uma solução de concentração 5 g/L de ácido gálico. A partir desta solução estoque, são preparadas, em balões volumétricos de 100 mL, soluções de concentrações crescentes de 0, 50, 100, 150, 250 e 500 mg/L. A reação de oxidação foi realizada em balões volumétricos de 10 mL, sendo transferido para estes 100 µL de cada uma das diluições, ao quais foram adicionados 2 mL de água destilada e 0,5 mL do reativo de Folin-Ciocalteu. Após 30 segundos e antes de 8 minutos após a adição do reativo, foi adicionado 1,5 mL de solução aquosa de carbonato de sódio a 20 % (m/v). Os balões foram completados com água destilada até a marca de 10 mL, agitados e deixados em repouso, ao abrigo da luz e em temperatura ambiente, por 2 horas para que a reação ocorresse. A absorvância de cada uma das soluções foi medida a 765 nm em espectrofotômetro (8500II UV/VIS, Techcomp Ltda., Kowloon, Hong Kong) e o branco realizado com água destilada. A curva padrão de ácido gálico é apresentada através do gráfico de absorvância (ABS) versus concentração de ácido gálico (mg/L), no Apêndice II.

Os valores de absorvância obtidos para cada um dos extratos foram correlacionados com a curva padrão de ácido gálico, e o teor de fenólicos total (TFT) foi determinado através da Equação 7. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em mg EAG/g de extrato, como média ± desvio padrão.

$$TFT (mg \text{ EAG/g}_{\text{extrato}}) = \left[\frac{(GAE \cdot 1000)}{D_{\text{extrato}}} \right] \quad \text{Eq. 7}$$

onde *GAE*: Equivalente em ácido gálico obtido através da curva padrão (mg GAE/L), *D*_{extrato}: diluição das amostras (mg_{extrato}/L).

4.4.2 Atividade antioxidante pelo método de DPPH

Uma das formas de determinar a atividade antioxidante dos extratos de bagaço de uva é através do método do DPPH

(2,2-difenil-1-picrilhidrazil), uma vez que, pela disponibilidade de grupos hidroxila, os compostos fenólicos são capazes de sequestrar radicais superperóxido e DPPH através de uma simples transferência de elétrons (MENSOR et al., 2001). Na literatura são encontrados muitos estudos que avaliaram a capacidade de sequestro de radicais de vinhos, uvas e seus derivados através deste método (BAYDAR et al., 2007; KATALINIĆ et al., 2010; LOULI et al., 2004;).

O radical DPPH é considerado um radical estável à temperatura ambiente, produz uma solução violeta quando adicionado ao etanol e tem sua absorção máxima em 517 nm. Quando esse composto recebe um elétron ou um radical hidrogênio para se tornar um composto mais estável, sua absorção diminui. Esse processo pode ocorrer de duas maneiras: processo direto ou processo de transferência de elétron, como apresentado a seguir.

$$\text{DPPH}^* + \text{RXH} \rightarrow \text{DPPHH} + \text{RX}^* \text{ (processo direto, separação do átomo)}$$
$$\text{DPPH}^* + \text{RXH} \rightarrow \text{DPPH}^- + \text{RXH}^{*+} \rightarrow \text{DPPHH} + \text{RX}^* \text{ (processo de transferência de elétron)}$$

No processo direto o antioxidante (RXH) doa um hidrogênio para o radical DPPH* tornando-o estável. O radical RX* é relativamente estável e não reage com os lipídios. No processo de transferência de elétron, primeiramente um elétron é cedido para o radical DPPH* pela molécula do antioxidante e, em seguida, é cedido o hidrogênio, estabilizando o radical DPPH e formando o radical estável RX*.

A técnica descrita por Mensor et al. (2001) se baseia na reação por 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, do composto em análise (extrato de bagaço de uva) em concentrações crescentes com uma solução etanólica de DPPH na concentração de 0,3 mM, com posterior leitura da absorbância em espectrofotômetro (8500II-UV/VIS, Techcomp Ltda., Kowloon, Hong Kong). Para o extrato da variedade *Syrah* utilizou-se as concentrações 5, 10, 25, 50, 125 e 250 mg/mL enquanto para a variedade *Merlot*, realizada posteriormente, foram utilizadas

concentrações maiores (25, 50, 125, 250, 500, 750 e 1000) devido à falta de atividade antioxidante em concentrações baixas. Quanto maior a atividade antioxidante da amostra testada, mais estável o radical DPPH se torna, provocando a descoloração da solução (DPPH e extrato) e diminuindo a absorbância. Deste modo, o percentual de inibição das amostras testadas sobre o radical DPPH pode ser calculado convertendo-se a absorbância em porcentual de atividade antioxidante (% AA), conforme a Equação 8.

$$AA\% = 100 - \left[\frac{(Abs_{\text{amostra}} - Abs_{\text{tensor}}) \cdot 100}{Abs_{\text{controle}}} \right] \quad \text{Eq. 8}$$

Os valores obtidos para % AA são plotados em um gráfico de % AA versus concentração. O ajuste dos pontos foi feito por regressão. A partir da regressão, obteve-se um valor conhecido como EC₅₀, que representa a concentração do extrato na qual se obtém uma inibição de 50 % da atividade antioxidante. Deste modo, quanto menor o valor de EC₅₀, menor a concentração de extrato necessária para se ter uma maior atividade e, conseqüentemente, maior o potencial antioxidante do extrato (MENSOR et al., 2001). Os resultados encontrados de concentração efetiva (EC₅₀) e atividade antioxidante (% AA) para os extratos analisados foram expressos como média ± desvio padrão.

4.4.3 Atividade antioxidante pelo método β-caroteno/ácido linoléico

Geralmente, os alimentos são sistemas heterogêneos compostos por mais de uma fase, formando, muitas vezes, emulsões entre lipídios e água através da presença de agentes emulsificantes. Assim, este método utiliza uma emulsão formada pelo sistema β-caroteno/ácido linoléico para avaliar a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico, determinando a capacidade de uma amostra,

nesse caso o extrato de bagaço de uva, de proteger um substrato lipídico da oxidação. O método está fundamentado em medidas espectrofotométricas da descoloração (oxidação) do β -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoléico (KATALINIĆ et al., 2010; DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Pela metodologia utilizada, descrita por Matthäus (2002), o sistema formado por β -caroteno e ácido linoléico é induzido a uma rápida descoloração na ausência de um composto antioxidante. O radical livre é formado pelo ácido linoléico e por um átomo de hidrogênio, retirado de um dos grupos metila, da molécula de β -caroteno. A taxa de descoloração da solução de β -caroteno é determinada pela medida entre a diferença da leitura espectrofotométrica inicial a 470 nm e após 120 minutos.

Inicialmente são preparadas duas emulsões, uma com adição de β -caroteno e outra sem (branco). Para a emulsão de β -caroteno, em um balão de 250 mL, foram medidos 40 g de ácido linoléico, 400 mg de Tween-20 e 3,34 mg de β -caroteno. A este balão adicionou-se 1 mL de clorofórmio e agitou-se bem até a completa solubilização das partículas de β -caroteno. O clorofórmio foi então removido em evaporador rotativo (Fisatom, Mod. 550 e 802, São Paulo/SP, Brasil) com arrefecimento (MQBTZ99-20, Microquímica Ind. Com. e Repr. Ltda., Palhoça/SC, Brasil) e controle de vácuo (NT 613, Nova Técnica Piracicaba/SP, Brasil) a 40 °C. Logo após foram adicionados 100 mL de água destilada na mistura, agitando vigorosamente para formar uma solução estável. A emulsão de branco foi preparada com 40 mg de ácido linoléico, 400 mg de Tween-20 e 100 mL de água destilada, e também agitada vigorosamente. As duas emulsões foram mantidas refrigeradas e ao abrigo da luz até a realização das análises.

Um alíquota de 5 mL da solução de β -caroteno foi adicionada à 200 μ L do extrato, sendo que cada um dos extratos a ser testado foi diluído em etanol P.A. na concentração final de 1667 mg/L. Imediatamente, a absorvância foi medida em espectrofotômetro (8500IUUV/ VIS, Techcomp Ltda., Kowloon, Hong Kong) em comprimento de onda de 470 nm com respectivas soluções de branco, constituídas de 5 mL de

emulsão de branco e 200 µL do extrato. Os tubos foram imediatamente imersos em banho termostatzado (Biomatic Aparelhos Científicos Ltda., Porto Alegre/RS, Brasil) a 50 °C durante 2 horas de reação, realizando-se leituras nos tempos 0, 15, 30, 60 e 120 minutos. Em paralelo, foi realizado também o controle do teste, em que a amostra foi substituída por etanol. Os resultados de atividade antioxidante (% AA) foram calculados pela Equação 9 e expressos como média ± desvio padrão.

$$AA\% = 1 - \left\{ \left[\frac{(Abs_{t=120} - Abs_{t=0})}{Abs_{controle,t=120} - Abs_{controle,t=0}} \right] .100 \right\} \quad \text{Eq. 9}$$

4.4.4 Avaliação da atividade antimicrobiana

4.4.4.1 Difusão em gel

A atividade antimicrobiana dos extratos de bagaço de uva foi avaliada para as bactérias *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. As três primeiras espécies foram selecionadas por serem causadoras de doenças transmitidas por alimentos (chamadas DTAs) de ocorrência frequente. Ainda, *E. coli* e *P. aeruginosa* por serem microrganismos geralmente multirresistentes aos antimicrobianos (VIEIRA, 2005).

No método de difusão em gel, uma suspensão bacteriana de cada espécie contendo 10⁸ UFC/mL foi semeada na superfície do ágar de Müeller-Hinton com auxílio de swab estéril. Em triplicata, foram aplicados diretamente em orifícios de 7 mm de diâmetro feitos no ágar (4 furos em cada placa de Petri feitos com auxílio de um furador de aço estéril) 50 µL de uma suspensão, contendo 1 mg de cada extrato, preparada a uma concentração de 20 mg/mL de DMSO (dimetilsulfóxido) a 10 %, por este não oferecer nenhuma inibição aos microrganismos testados. Os sistemas foram incubados por 24 horas a 36 °C, em

estufa bacteriológica e em condições aeróbicas. Após a incubação, as placas foram observadas quanto à homogeneidade do crescimento bacteriano e, nos casos em que foi verificada inibição do crescimento, o diâmetro do halo foi medido em milímetros, sendo que halos com tamanho acima de 9 mm são considerados resultados positivos (VALGAS et al., 2007; SMÂNIA et al., 1995, MICHIELIN et al., 2009).

4.4.4.2. Determinação da concentração inibitória mínima

Para os extratos de bagaço de uva que apresentaram halo de inibição ao serem submetidos ao método de difusão em ágar, foi determinada também a concentração inibitória mínima (CMI) pelo método de microdiluição em caldo, conforme a metodologia descrita por Ávila et al. (2008). Inicialmente, preparou-se soluções com 20 mg de cada extrato suspensos em 1 mL de DMSO a 10 % (previamente esterilizado em autoclave). Posteriormente, estas foram diluídas no mesmo solvente, obtendo-se concentrações finais dos extratos entre 2.000 e 3,90 µg/mL. Essas diluições foram distribuídas (10 µL), em orifícios distintos de uma placa de microdiluição de 96 poços. Em cada orifício-teste ainda foi adicionado 85 µL de caldo de Müeller-Hinton. Uma solução contendo apenas meio de cultura e DMSO, sem a adição dos extratos, foi usada como controle de crescimento e esterilidade. Nos orifícios-teste e de controle de crescimento foram adicionados 5 µl de inóculo bacteriano, que consiste em uma suspensão contendo aproximadamente 10^7 UFC/mL de cada espécie mencionada no item anterior. Os experimentos foram realizados em duplicata e as placas foram incubadas por 24 horas a 36 °C. A leitura dos experimentos foi realizada através da densidade ótica (DO), com uso de leitora de microplacas (modelo CLX800-BioTek Instrumentos, Inc.) e nos casos em que a turvação e ou a coloração do extrato interferiram na leitura da DO, foi utilizada uma solução reveladora de crescimento bacteriano (2-(4-iodophenyl)-3- (4-nitrophenyl)-5-phenyltrazolium-chloride). A CMI foi considerada a menor concentração do extrato que inibiu o crescimento bacteriano

sendo o resultado expresso pela média dos dois resultados ($\mu\text{g/ml}$).

4.4.5 Determinação da composição química dos extratos

O perfil químico dos extratos de bagaço de uva foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RF-HPLC) (Shimadzu LC-10, Kyoto, Japan), usando uma coluna C18 Shim-pack (com diâmetro interno de 4.6 mm e comprimento de 250 mm) e um detector ultravioleta visível (Shimadzu SPD 10A, 280 nm). Para a determinação da composição de fenólicos, diluiu-se uma quantidade conhecida de extrato em 1 mL de acetato de etila, e uma alíquota de 10 μL dessa solução foi injetada na coluna de HPLC termostatizada a 40 °C, com detecção ultravioleta em comprimento de onda de 280 nm. Foi utilizada a fase móvel isocrática composta de água/ácido acético/n-butanol (350:1:10, v/v/v) escoando com vazão de 0,8 mL/min. A determinação quantitativa foi baseada no método do padrão externo por comparação com o tempo de retenção de padrões de compostos fenólicos puros. Obteve-se a curva padrão de calibração através de um gráfico de área do pico versus diferentes concentrações de ácido gálico ($y = 33,5x$). Para todas as amostras, a concentração final dos compostos foi determinada pela média dos resultados de três injeções consecutivas (MORAIS et al., 2009).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados de rendimento, teor de fenólicos e de atividade antioxidante obtidos para os diferentes extratos de bagaço de uva foram avaliados através de análise de variância (ANOVA) ao nível de 5 % de significância ($p < 0,05$), com o auxílio do *software* Statistica 7.0 (Statsoft Inc., USA). O plano de experimentos de ESC com CO_2 puro foi organizado com duas

variáveis, temperatura (T) e pressão (P), nos níveis 50 e 60 °C e 150, 200, 250 e 300 bar, com uma replicação. Realizou-se a ANOVA dos rendimentos de extração supercrítica com diferentes concentrações de co-solvente considerando estes como experimentos de fator único (fração mássica de co-solvente) com uma replicação. Para os rendimentos obtidos através das extrações a baixa pressão a ANOVA foi realizada considerando o tipo de extração como fator único. Se, segundo a ANOVA, existe diferença significativa ao nível de 5 % de significância ($p < 0,05$) entre as médias dos tratamentos (tipo ou condição de extração) pode-se dar continuidade à análise aplicando o teste de Tukey o qual avalia as diferenças entre os pares de tratamentos. Sendo assim, o teste de Tukey foi aplicado para verificar quais tratamentos diferem entre si, através da avaliação de pares das médias dos resultados obtidos (MONTGOMERY, 2005).

4.6 RESUMO DOS ENSAIOS

O Quadro 1 apresenta o resumo dos ensaios realizados para obtenção e avaliação dos extratos de bagaço de uva e comparação com o BHT, um antioxidante comercial.

Quadro 1 - Resumo dos ensaios realizados.

Condições de extração	Uva	X ₀	Modelagem matemática	TFT	DPPH	β-caroteno	ADM	CMI	HPLC
Extração Soxhlet									
Sox-EtOH	<i>Syrah úmida</i>	x		x	x	x	x	x	x
Sox-EtOH	<i>Syrah</i>	x		x	x	x	x	x	x
Sox-EtOAc	<i>Syrah</i>	x		x	x				
Sox-HX	<i>Syrah</i>	x		x	x	x	x	x	
Sox-EtOH	<i>Merlot</i>	x		x	x	x	x	x	x
Sox-EtOAc	<i>Merlot</i>	x		x	x				
Sox-HX	<i>Merlot</i>	x		x	x	x	x	x	
Extração com ultrassom									
UE-EtOH	<i>Syrah</i>	x		x	x	x	x	x	x
UE-EtOAc	<i>Syrah</i>	x		x	x				
UE-HX	<i>Syrah</i>	x		x	x	x	x	x	
UE-H ₂ O	<i>Syrah</i>	x		x	x	x	x	x	
UE-EtOH	<i>Merlot</i>	x		x	x	x	x	x	x
UE-EtOAc	<i>Merlot</i>	x		x	x				
UE-HX	<i>Merlot</i>	x		x	x	x	x	x	
UE-H ₂ O	<i>Merlot</i>	x		x	x	x	x	x	

Extração Supercrítica – Cinética e Modelagem Matemática [T(°C)/P(bar)/QCO₂(g/min)]									
50/150/13 ± 2g/min	Merlot		x						
Extração Supercrítica – Determinação de rendimento [T(°C)/P(bar)/solvente]									
40/200/CO ₂	Syrah úmida	x		x	x				
40/200/CO ₂	Syrah	x		x	x				
50/150/CO ₂	Merlot	x		x	x	x	x	x	x
50/200/CO ₂	Merlot	x		x	x	x	x	x	x
50/250/CO ₂	Merlot	x		x	x	x	x	x	x
50/300/CO ₂	Merlot	x		x	x	x	x	x	x
60/150/CO ₂	Merlot	x		x	x	x	x	x	x
60/200/CO ₂	Merlot	x		x	x	x	x	x	x
60/250/CO ₂	Merlot	x		x	x	x	x	x	x
60/300/CO ₂	Merlot	x		x	x	x	x	x	x
60/250/CO ₂	Syrah	x		x	x	x	x	x	x
60/250/CO ₂	Cabernet Sauvignon	x		x	x	x	x	x	x
60/250/CO ₂ + 12,5 % EtOH	Merlot	x		x	x	x	x	x	x
60/250/CO ₂ + 15,0 % EtOH	Merlot	x		x	x	x	x	x	x
60/250/CO ₂ + 17,5 % EtOH	Merlot	x		x	x	x	x	x	x
Antioxidante Comercial									
BHT				x	x	x			
Análise Estatística									
		x		x	x	x			

EtOH: etanol; EtOAc: acetato de etila; Hx: hexano; H₂O: água; BHT: butilhidroxitolueno.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 TESTES PRELIMINARIES

A água, presente naturalmente em uma amostra submetida à extração com CO₂ supercrítico, pode melhorar o desempenho da extração abrindo os poros da matriz e aumentando a polaridade do fluido o que permite a solubilização de compostos relativamente polares. Porém, como apenas 0,3 %, aproximadamente, dessa água é solúvel no CO₂ supercrítico, um elevado teor de umidade da matéria-prima geralmente provoca um menor rendimento de extração, comparando com amostras secas do mesmo produto, pois a água da amostra, em excesso, agiria como um solvente para algumas substâncias competindo com o CO₂ supercrítico e diminuindo a recuperação do extrato (POURMORTAZAVI e HAJIMIRSADEGHI, 2007). Além disso, a umidade pode ocasionar também compactação do leito de extração supercrítica, formação de caminhos preferenciais no fluxo do solvente ou ainda entupimentos por formação de gelo (CASAS, 2007). Por isso foi necessário verificar se o bagaço de uva apresentava ou não esse comportamento. Assim, inicialmente, realizaram-se testes preliminares com a amostra úmida e amostra seca para a definição das condições de operação adequadas para a obtenção do extrato de bagaço de uva com CO₂ supercrítico.

Para estes experimentos, empregou-se a matéria-prima referente à vindima de 2008 da variedade *Syrah* submetida à extração Soxhlet padrão (conforme as demais amostras, posteriormente) e à extração com CO₂ supercrítico a 200 bar, 40 °C e vazão de CO₂ de 8 ± 2 g/min, durante 5 h. O rendimento obtido com a utilização da amostra seca para a extração com CO₂ supercrítico foi quase 5 vezes maior do que com a amostra úmida (5,6 % contra 1,2 %), enquanto que para extração Soxhlet o rendimento da amostra seca foi o dobro do obtido com a amostra úmida (Tabela 10), ambos diferentes estatisticamente entre si. A partir desses resultados, selecionou-se a amostra

submetida à secagem em estufa (conforme descrito no item 4.1.2) para os procedimentos de extração posteriores.

A secagem do bagaço com altas temperaturas pode causar uma redução significativa no teor de fenólicos extraível e, conseqüentemente, na atividade antioxidante (LARRAURI et al., 1996). Por isso, os testes de secagem foram realizados com uma única temperatura, 32 °C (a menor possível de ser controlada no equipamento), variando apenas o tempo. Escolheu-se trabalhar com um teor de umidade final em torno de 10 %, devido à facilidade de manuseio e também para efeito de comparação dos resultados com o estudo de Campos (2005). A Tabela 7 apresenta os parâmetros de secagem (tempo e temperatura) e os valores de teor de umidade e substâncias voláteis das matérias-primas *in natura* e após secagem.

Tabela 7 - Dados de umidade do bagaço e condições de secagem.

	Umidade inicial (% BU)	Temperatura secagem (°C)	Tempo secagem (h)	Umidade após secagem (% BU)
Syrah	56 ± 2	32	20	10,1 ± 0,3
Merlot	64 ± 1	32	21,5	10 ± 1
Cabernet Sauvignon	64 ± 1	32	21,5	15 ± 1

5.2 CARACTERIZAÇÃO DO LEITO DE PARTÍCULAS

A caracterização da matéria-prima é de primordial importância para os estudos cinéticos e para a avaliação das taxas de transferência de massa do processo de extração de óleo de bagaço de uva com CO₂ supercrítico, através da modelagem matemática.

Após definida a condição de umidade da matéria-prima, realizou-se a determinação do diâmetro médio de partícula da

fração do bagaço seco triturado, compreendida entre as peneiras -20/+32 *mesh*, por ser a fração com o maior rendimento no peneiramento da amostra. O diâmetro médio de partícula foi calculado de acordo com as Equações 2 e 3, resultando em 0,68 mm. A matriz sólida foi avaliada visualmente após a extração com fluido supercrítico, onde se observou a compactação adequada e coloração homogênea tanto na direção radial quanto na direção longitudinal, indicando que não houve formação de caminhos preferenciais na passagem do CO₂ através do leito de extração (MARTÍNEZ, 2005).

Nos experimentos de rendimento global, utilizou-se, aproximadamente, 25 g de amostra para a formação do leito. Esta quantidade de amostra foi escolhida com intuito de se obter quantidade de extrato suficiente para a posterior realização das análises de qualidade do extrato e para formar um leito de partículas com altura de, pelo menos, o dobro do diâmetro do extrator, a fim de se desprezar a dispersão axial no leito durante a extração na modelagem matemática. O volume ocupado pela massa de matéria-prima no extrator foi calculado através da altura preenchida pelas partículas de sólidas dentro do leito, sendo esta altura igual a $12,45 \pm 0,05$ cm para a variedade *Syrah* e $12,2 \pm 0,3$ cm para a variedade *Merlot* e, conseqüentemente, o volume ocupado igual a $39,6 \pm 0,2$ cm³ e $38,8 \pm 0,9$ cm³, respectivamente. O restante do volume do leito foi preenchido com esferas de vidro separadas da matéria-prima pela adição de algodão, para evitar sua mistura e mantendo constante a altura do leito durante a extração.

A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos para o diâmetro médio de partícula, calculado de acordo com as Equações 2 e 3; a densidade aparente e real do sólido, determinadas de acordo com o item 4.2.3.3; e a porosidade do leito, calculada conforme a Equação 5.

Tabela 8 - Caracterização da partícula e do leito de partículas formado para a extração supercrítica.

	Diâmetro médio de partícula (mm)	Densidade aparente ρ_a (g/cm³)	Densidade real ρ_r (g/cm³)	Porosidade do leito (ϵ)
Syrah	0,68	0,6335 ± 0,0003	0,681 ± 0,007	0,07
Merlot	0,68	0,64 ± 0,09	0,716 ± 0,002	0,1

5.3 CINÉTICA DA EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO

A cinética de extração da variedade *Merlot* foi realizada preliminarmente e utilizada como base para a definição do tempo de extração e da vazão de solvente a serem utilizados posteriormente nos experimentos de rendimento. Para isso empregou-se uma condição de pressão e temperatura baixas, 150 bar e 50 °C, e duas vazões de CO₂ (8 e 13 ± 2 g/min).

A maior vazão proporcionou maior rendimento de extrato (4,67 % contra 3,42 % com a menor vazão) indicando que uma maior quantidade de solvente é necessária para se obter uma cinética de transferência de massa favorável, como geralmente é o caso em um processo semi-contínuo (PEREIRA et al., 2004). Ou seja, a maior vazão promove maior disponibilidade de solvente no extrator por unidade de tempo, o que proporciona um maior gradiente de concentração entre o sólido e o solvente, ocasionando uma maior taxa de transferência de massa. Isso acontece pela diminuição da resistência à transferência de massa como resultado do aumento da convecção, causado pela não saturação do CO₂ pelo soluto (MICHIELIN, 2009).

Além disso, na menor condição de vazão ocorreu variação da vazão, em alguns momentos, causada por entupimentos na linha de solvente após o extrator, como se a vazão não fosse suficiente para carregar o extrato. Isso pode ser observado na

Figura 15, nos pontos de 60 e 220 minutos que foram precedidos por entupimentos causando picos de vazão e, com isso, uma variação no comportamento da curva. Sendo assim, a vazão de 13 ± 2 g/min, cuja curva de extração é apresentada pela Figura 16, foi selecionada para dar continuidade aos experimentos de determinação do rendimento global de extração e para o estudo da modelagem matemática.

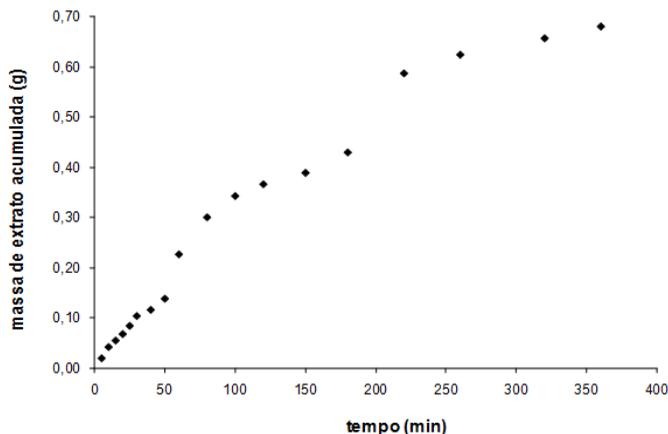
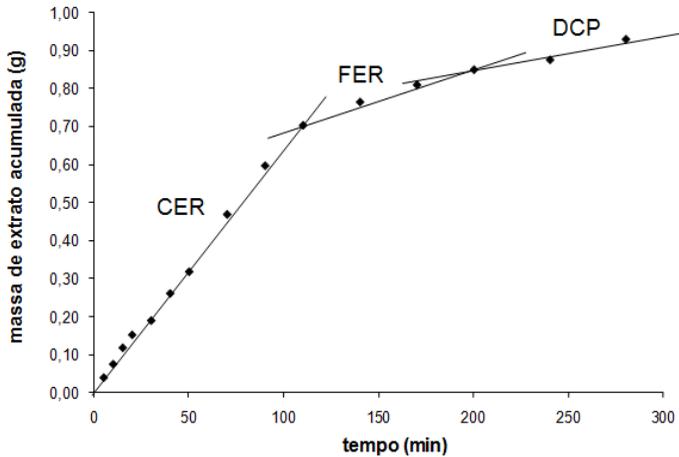


Figura 15 - Curva experimental de extração com fluido supercrítico de óleo de bagaço de uva *Merlot* a 150 bar, 50 °C e 8 ± 2 g/min de CO₂.

Para a determinação do rendimento global de extração (X_0) com fluido supercrítico é necessário fixar um tempo de extração para verificar a influência das condições de temperatura e pressão empregadas. Esse tempo é definido com base nas etapas da curva de extração, conforme descrito no item 3.4.3.1. Para a determinação de X_0 , que representa o conteúdo teórico de soluto extraível, o tempo de extração deve assegurar que a etapa de extração quase nula seja alcançada (FERREIRA e MEIRELES, 2002).



CER: etapa de taxa constante de extração; FER: etapa de taxa de extração decrescente; DCP: etapa difusional.

Figura 16 - Curva experimental de extração com fluido supercrítico de óleo de bagaço de uva *Merlot* a 150 bar, 50 °C e 13 ± 2 g/min de CO_2 .

Através de regressão linear dos dados obtidos na curva de extração chega-se aos parâmetros cinéticos t_{CER} (tempo de duração da etapa CER) e M_{CER} (taxa de extração da etapa CER), apresentados na Tabela 9, e Y_{CER} (concentração de soluto na fase solvente na etapa CER). Pela análise do comportamento da curva de extração do soluto com o tempo, apresentada na Figura 16, pode-se observar que o período CER ocorre entre 0 e 110 minutos, o período FER está compreendido entre 110 e 200 minutos e a etapa controlada pela difusão inicia-se após 200 minutos. A partir disso, estabeleceu-se que um tempo de extração de 4 horas garante que a etapa difusiva seja alcançada, sendo este tempo fixado para todos os experimentos de determinação de X_0 devido à extração da maior parte de soluto disponível. Neste experimento, em 4 horas de extração já havia sido alcançado 94,2 % do rendimento total obtido ao final dos 280 min. Esse tempo e vazão de solvente implicam em um consumo de 3,2 kg de CO_2 . O Apêndice I apresenta os dados experimentais de massa acumulada de extrato em função do

tempo para a curva de extração com fluido supercrítico de bagaço de uva *Merlot* a 150 bar e 50 °C para vazão de CO₂ de 13 ± 2 g/min.

Tabela 9 - Parâmetros cinéticos da extração com fluido supercrítico do bagaço de uva *Merlot* realizada a 150 bar, 50 °C e 13 ± 2 g/min de CO₂.

Parâmetro	Etapa extração		
	CER	FER	DCP
t (min)	0 - 110	110 - 200	> 200
m (g)	0,7036	0,1462	0,0800
X ₀ (%)	3,53	0,07	0,4
M (g/min)	0,0064	0,0016	0,001
Y	4,81x10 ⁻⁴	-	-

t: duração da etapa de extração; m: massa de extrato aproximada; X₀: rendimento da etapa; M: taxa de extração; Y: concentração de soluto na fase solvente; CER: etapa de extração constante; FER: etapa de extração decrescente; DCP: etapa difusional.

5.4 DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO GLOBAL

O rendimento global da extração (X₀) é definido como a fração de compostos presente na matriz sólida passível de ser extraída pelo solvente em condições de extração pré-estabelecidas (SILVA, 2004). Os rendimentos dos extratos de bagaço de uva das variedades *Merlot* e *Syrah* obtidos através das técnicas de extração à baixa pressão com diferentes solventes estão apresentados na Tabela 10, assim como o índice de polaridade desses solventes.

Tabela 10 - Valores de rendimento global (X_0) obtidos para as extrações a baixa pressão de bagaço de uvas *Merlot* e *Syrah* com diferentes solventes e respectivos índices de polaridade.

Método de extração	Solvente	Polaridade ⁽¹⁾	X_0 (%) ⁽²⁾	
			<i>Merlot</i>	<i>Syrah</i>
Soxhlet	etanol amostra úmida	5,2	-	7,1 ± 0,3 ^{e,f}
	etanol	5,2	14,6 ± 0,2 ^a	14 ± 1 ^{a,b}
	hexano	0	10 ± 1 ^{c,d}	10 ± 1 ^{c,d}
	acetato de etila	4,4	12,3 ± 0,3 ^{a,b,c}	10,4 ± 0,2 ^{c,d}
Ultrassom	etanol	5,2	5,97 ± 0,04 ^{f,g}	9,1 ± 0,6 ^{d,e}
	hexano	0	3,4 ± 0,1 ^g	4,1 ± 0,1 ^g
	acetato de etila	4,4	4,70 ± 0,06 ^{f,g}	4,1 ± 0,3 ^g
	água	9,0	9,1 ± 0,1 ^{d,e}	12 ± 1 ^{b,c}

⁽¹⁾ Índice de polaridade do solvente (BYERS, 2003).

⁽²⁾ Letras iguais indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

Conforme apresentado na Tabela 10, o melhor rendimento foi alcançado com a extração Soxhlet do bagaço da variedade *Merlot* (14,6 ± 0,2), mas bastante próximo ao obtido, com o mesmo método, para a variedade *Syrah* (14 ± 1). O maior rendimento das extrações ultrassônicas foi utilizando água como solvente, para ambas as variedades, porém, neste caso, havendo diferença significativa entre as variedades. Os menores rendimentos foram obtidos pela maceração com ultrassom e com o solvente de menor polaridade, o hexano. Apesar de a polaridade do acetato de etila ser mais próxima da do etanol, os resultados de rendimento daquele solvente foram mais próximos dos resultados das extrações com hexano (apolar). Isso, aliado ao fato de a extração ultrassônica com água (solvente utilizado com maior polaridade) apresentar melhor resultado, pode indicar uma alta polaridade dos compostos presentes no bagaço de uva.

Comparando as duas técnicas de extração, para um mesmo solvente, a Soxhlet apresenta maiores rendimentos que a

ultrassônica. Na extração Soxhlet, realizada na temperatura de ebulição do solvente, a tensão superficial e a viscosidade do solvente são reduzidas quando comparadas a extrações em temperatura inferior, como é o caso da maceração com ultrassom. Assim, com uma maior temperatura de processo, o solvente pode alcançar os espaços da matriz que contêm solutos com maior facilidade, solubilizando uma maior quantidade e diferentes tipos de solutos (MARKOM et al., 2007). Assim, o alto rendimento dessas extrações pode estar relacionado com a possível solubilização de outras substâncias, como açúcares e pectinas, além dos compostos fenólicos que são o foco deste estudo.

Ao se analisar a influência da polaridade dos solventes, o extrato de bagaço de uva apresentou rendimentos mais elevados com solventes de maiores índices de polaridade como o acetato de etila, etanol e água, em ordem crescente, sugerindo que os compostos presentes na matriz vegetal apresentam polaridade intermediária a alta. Em contrapartida, as extrações com solventes de baixa polaridade, como hexano e CO₂ (Tabela 11), apresentaram os menores rendimentos, sugerindo menor concentração de compostos apolares presentes na matriz vegetal do bagaço de uva.

Os rendimentos obtidos com as extrações Soxhlet para os bagaços de *Merlot* e *Syrah* apresentados na Tabela 10 são levemente superiores aos obtidos por Campos (2005) para o bagaço de *Cabernet Sauvignon* com hexano (5,64 %), acetato de etila (8,9 %) e etanol (13,20 %). Essa diferença provavelmente se deve ao menor tempo de extração utilizado pelo autor, uma vez que o pré-tratamento aplicado nas matérias-primas e o procedimento de extração são semelhantes.

Jayaprakasha et al. (2001) apresentaram um rendimento de 4,5 % para a extração Soxhlet com acetato de etila de semente desengordurada de uva *Bangalore*. Esse resultado é muito inferior aos obtidos neste estudo com os mesmos métodos e solvente para as variedades *Merlot* (12,3 %) e *Syrah* (10,4 %). Apesar de serem variedades diferentes, e de este estudo englobar o bagaço como um todo, não apenas sementes, a justificativa mais provável para essa diferença dos resultados

está no pré-tratamento aplicado às matérias-primas. Parte do rendimento obtido no presente estudo com o acetato de etila é devido à extração de ácidos graxos, enquanto que no resultado apresentado por Jayaprakasha et al. (2001) não está inclusa essa fração lipídica, uma vez que os autores utilizaram sementes previamente desengorduradas por uma extração Soxhlet com hexano, mas não mencionaram o rendimento dessa primeira etapa.

Para a extração com fluido supercrítico, a avaliação dos resultados de X_0 , obtidos para as diferentes condições de temperatura e pressão, indica o efeito do poder de solubilização do solvente sobre o rendimento do processo (SILVA, 2004). Decidiu-se, então, utilizar temperaturas um pouco mais elevadas, 50 e 60 °C, para estes experimentos de determinação do rendimento global, com intuito de facilitar a extração de compostos fenólicos, uma vez que o esperado é o poder solvatante do CO_2 aumentar com a temperatura. Os experimentos foram realizados com uma vazão de solvente de 13 ± 2 g/min por um tempo total de extração de 4 horas e pressões de 150, 200, 250 e 300 bar. Os resultados de X_0 para o bagaço da uva *Merlot* são apresentados na Tabela 11, com os valores de T, P e densidade de solvente correspondente, obtida de acordo Angus et al. (1976).

Tabela 11 - Resultados de rendimento global (X_0) obtidos para a ESC de bagaço de uva *Merlot* com vazão de CO_2 de 13 ± 2 g/min e valores de densidade do CO_2 para cada condição.

P (bar)	50 °C		60 °C	
	$\rho \text{CO}_2^{(1)}$ (g/cm ³)	X_0 (%) ⁽²⁾	$\rho \text{CO}_2^{(1)}$ (g/cm ³)	X_0 (%) ⁽²⁾
150	0,701	4,0 ± 0,6 ^{a,b}	0,606	3,7 ± 0,3 ^b
200	0,785	4,1 ± 0,3 ^{a,b}	0,724	4,35 ± 0,05 ^{a,b}
250	0,835	4,7 ± 0,1 ^{a,b}	0,787	4,9 ± 0,1 ^{a,b}
300	0,871	5,0 ± 0,2 ^{a,b}	0,830	5,2 ± 0,6 ^a

⁽¹⁾ ANGUS et al., 1976.

⁽²⁾ Letras iguais indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

O poder de solubilização do CO₂ supercrítico depende da sua densidade. Pelos dados da Tabela 11, pode-se observar o efeito das condições de operação na densidade do CO₂, que aumenta com o incremento da pressão à temperatura constante e diminui com a elevação da temperatura à pressão constante.

Conforme apresentado na Tabela 11, o maior rendimento (X₀ %) é obtido para a condição de 300 bar e 60 °C, 5,2 ± 0,6 %. Cao e Ito (2003) encontraram resultado semelhante (5,1 %) com a extração de semente de uva a 300 bar, 40 °C e fração de partículas entre 20 e 40 *mesh*, mesmo com uma vazão de CO₂ bastante inferior (0,4 mL/min); isso porque as sementes são ricas em óleo e a fração lipídica é mais solúvel em CO₂, aumentando o rendimento. Em estudo de Campos (2005) com bagaço de *Cabernet Sauvignon*, o maior resultado foi 4,2 %, também obtido a 300 bar e 60 °C. Esse resultado, ligeiramente menor que o do presente estudo para o bagaço da uva *Merlot*, pode ser explicado pela menor vazão de CO₂ (3,33 g/min) utilizada pelo autor ou ainda pela variedade da uva, uma vez que no presente estudo o bagaço da uva *Cabernet Sauvignon* também apresentou resultado um pouco inferior às demais variedades (Tabela 13).

Para ambas as temperaturas, maiores valores de rendimento são obtidos com pressões mais elevadas, indicando uma maior solubilização do soluto devido ao aumento da densidade do solvente. Além disso, um aumento na pressão de operação pode provocar a ruptura de algumas células da matriz vegetal, expondo parte do soluto que antes não estava disponível e, conseqüentemente, aumentar a transferência de massa (CAMPOS, 2005). Fiori (2007) apresentou rendimentos de até 8 % para a extração supercrítica de semente de uva com pressões de 350 a 550 bar.

Pelo teste de Tukey, apenas os resultados dos experimentos a 150 bar/60 °C e 300 bar/60 °C diferem significativamente, indicando que, nas condições estudadas, há maior influência da pressão na extração supercrítica do óleo bagaço de uva. Para afirmar qual o real efeito da temperatura (T), da pressão (P) e da interação entre essas variáveis (P x T) no rendimento global, é necessário que os períodos antes e após a inversão das isotermas de rendimento (conforme apresentado

na Figura 17 e discutido a seguir) sejam analisados separadamente. Como não há dados suficientes abaixo da inversão para a realização da ANOVA, procedeu-se essa análise estatística apenas acima do ponto de inversão. Assim, de acordo com a ANOVA apresentada na Tabela 12, realizada para avaliação dos efeitos das condições de operação entre 200 e 300 bar, apenas pressão ($p=0,01714$) apresentou efeito significativo sobre o valor de X_0 do bagaço de uva *Merlot* ao nível de 5 % de significância.

Tabela 12 - ANOVA para a avaliação dos efeitos da temperatura (T), de 50 °C a 60 °C, e pressão (P), de 200 bar a 300 bar, sobre o rendimento da ESC de bagaço de uva *Merlot*.

Efeito	SQ ⁽¹⁾	GL ⁽²⁾	F ⁽³⁾	p ⁽⁴⁾
P (bar)	1,5510	2	8,636	0,01714
T (°C)	0,1323	1	1,473	0,27044
Interação P x T	0,0052	2	0,029	0,97186
Erro	0,5388	6		

⁽¹⁾ Soma dos Quadrados; ⁽²⁾ Graus de liberdade; ⁽³⁾ Valor *F* (estatística do teste); ⁽⁴⁾ Probabilidade.

A Figura 17 apresenta as isotermas de rendimento do extrato de bagaço de uva da variedade *Merlot* em CO₂ supercrítico como função da pressão de operação, de acordo com os dados da Tabela 11, para as temperaturas de 50 e 60 °C, onde se pode perceber uma inversão das isotermas na região entre 175 e 180 bar.

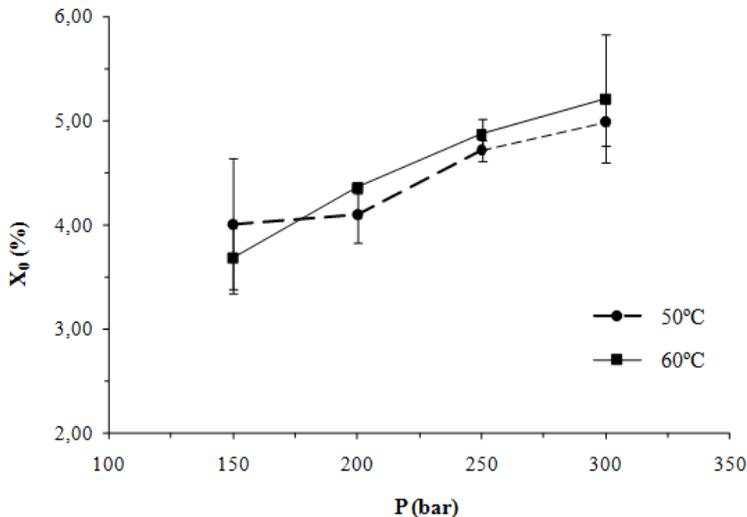


Figura 17 - Comportamento das isotermas de rendimento com a pressão de extração para a ESC do bagaço de uva *Merlot*.

A solubilidade dos compostos no fluido supercrítico é afetada pela pressão e temperatura de operação. A solubilidade aumenta com a pressão de operação a uma temperatura constante, devido ao aumento da densidade do solvente. Porém, o efeito da temperatura é mais complexo, ocorrendo o fenômeno de inversão das isotermas de rendimento, devido a influência da pressão de vapor do soluto e da densidade do solvente na solubilidade do soluto no fluido supercrítico. Ou seja, o efeito da temperatura a uma pressão constante, é devido a dois mecanismos: um aumento na temperatura do processo aumenta a solubilidade devido ao efeito da pressão do vapor do soluto e, reduz a solubilidade devido à diminuição da densidade solvente. Esses efeitos opostos resultam na inversão das isotermas de rendimento, conforme observado na Figura 17. Este comportamento ocorre nas proximidades do ponto crítico, em que pequenas alterações de temperatura e/ou pressão são acompanhadas por grandes variações de densidade do solvente. Em pressões mais elevadas, o efeito dominante passa a ser a

pressão de vapor do soluto (CAMPOS, 2005; MICHIELIN et al., 2005, REVERCHON e DE MARCO, 2006; CASAS et al., 2007).

Na literatura são encontrados vários estudos que relatam esse comportamento (CASAS et al., 2007; KITZBERGER et al., 2009; MEZZOMO et al., 2010; MICHIELIN et al., 2009), porém em diferentes faixas de pressão, o que é explicado pelas diferenças nas matrizes vegetais utilizadas. A faixa de inversão é determinada pela composição dos extratos, ou seja, pela influência dos grupos funcionais e estrutura dos ácidos graxos presentes no soluto sobre a pressão de vapor dos diferentes extratos e, portanto, na solubilidade destes no solvente supercrítico (MEZZOMO et al., 2010). No estudo de Campos (2005) com extração supercrítica de bagaço de uva *Cabernet Sauvignon*, as isotermas de rendimento a 50 e 60 °C apresentaram o mesmo comportamento encontrado neste estudo com inversão das isotermas a 190 bar, aproximadamente, semelhante à encontrada neste estudo para *Merlot*, entre 175 e 180 bar.

Houve certa dificuldade em manter e controlar a pressão do equipamento a 300 bar. Assim, como não houve diferença significativa com relação ao experimento a 250 bar, decidiu-se empregar essa pressão e a temperatura de 60 °C para as extrações com o bagaço das uvas *Syrah* e *Cabernet Sauvignon* e comparação dos resultados de rendimento e qualidade dos extratos. A Tabela 13 apresenta os rendimentos referentes à extração com CO₂ supercrítico puro do bagaço de cada variedade a 250 bar e 60 °C.

Tabela 13 - Valores de rendimento global (X₀) da ESC do bagaço das uvas *Merlot*, *Syrah* e *Cabernet Sauvignon* a 250 bar, 60 °C e vazão de CO₂ de 13 ± 2 g/min.

Variedade uva	X ₀ (%) ⁽¹⁾
<i>Merlot</i>	4,9 ± 0,1 ^a
<i>Syrah</i>	5,7 ± 0,4 ^a
<i>Cabernet Sauvignon</i>	4,7 ± 0,0 ^a

⁽¹⁾ Letras iguais indicam que não há diferença significativa (p < 0,05).

De um modo geral, não há diferença significativa entre os rendimentos obtidos para as três variedades de uva, com exceção das extrações ultrassônicas com etanol e água (Tabela 10). Beveridge et al. (2005) obtiveram melhores rendimentos, 10,5 %, 10,8 % e 13,6 %, para a extração supercrítica de sementes de uvas *Merlot*, *Syrah* e *Cabernet Sauvignon*, respectivamente. Porém, esses valores superiores relatados pelos autores podem ser explicados pelo fato de a matéria-prima ser composta somente por sementes (sem incluir cascas), que é a parte mais oleosa da uva, ou ainda, pelas condições de extração aplicadas, principalmente pressão (370 bar) e vazão de solvente (60 g/min) maiores.

O desempenho da extração supercrítica se assemelha ao da extração ultrassônica com solventes de baixa polaridade, não diferindo significativamente. Porém, com a aplicação de solventes polares quase todos os experimentos com ultrassom proporcionam melhores resultados que os obtidos pela extração supercrítica. Essa similaridade entre resultados de extrações supercrítica e ultrassônica também foi relatada por Palma e Taylor (1999b). Os rendimentos da extração Soxhlet, com todos os solventes, são muito superiores aos dos experimentos com CO₂ supercrítico, mas isso pode ser devido à extração de compostos como açúcares e pectinas, conforme mencionado anteriormente.

Como os resultados de rendimento das extrações à baixa pressão com solventes polares foram superiores aos da extração supercrítica podemos considerar a utilização de um solvente orgânico polar como co-solvente na extração supercrítica do óleo de bagaço de uva, a fim de melhorar o rendimento global de óleo, ampliando o espectro de compostos da matriz sólida solubilizados pelo solvente. O CO₂, por ser apolar, extrai preferencialmente compostos apolares; deste modo, a adição de um co-solvente (CS) com característica polar junto à ESC vai fazer com que compostos polares, que antes não eram extraídos somente com CO₂ supercrítico passem a ser solubilizados pela mistura de solventes (CO₂ + CS), aumentando assim o rendimento da extração. Relatos da literatura apontam a necessidade de adição de co-solvente ao CO₂ para extrair e/ou

melhorar o rendimento de extração de alguns compostos fenólicos, como é o caso do resveratrol (TENA et al., 1998; MURGA et al., 2000, BERNA et al., 2001). Palma e Taylor (1999a; 1999b) realizaram extração supercrítica de semente de uva em duas etapas usando CO₂ puro e modificado por metanol, obtendo uma fração oleosa na primeira fase e compostos fenólicos (catequina, epicatequina e ácido gálico) na segunda.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 10, os solventes água e etanol apresentaram os melhores resultados de rendimento. Esses são também os solventes mais empregados na indústria de alimentos por razões de segurança (toxicidade) e disponibilidade, respectivamente (MOURE et al., 2001). Apesar de a extração ultrassônica com água ter apresentado bons rendimentos, suas altas temperatura e pressão críticas são limitantes de sua aplicação como co-solvente supercrítico, sendo mais encontrado seu uso em condições subcríticas conforme apresentado por Ju e Howard (2006) e por Monrad et al. (2010) que utilizaram misturas de etanol e água em diferentes concentrações como co-solvente junto ao CO₂ para a separação de componentes antioxidantes de bagaço de uva.

Além de apresentar rendimentos um pouco melhores que a água, o uso do etanol como co-solvente ao CO₂ na ESC facilita sua eliminação do extrato após a extração por evaporação, por isso é amplamente relatada na literatura a sua utilização na tecnologia supercrítica (CAMPOS, 2005; CASAS et al., 2007; MEZZOMO et al., 2010; SALGIN, 2007). Silva et al. (2008) obtiveram um aumento bastante expressivo (até 7 vezes) no rendimento da extração de óleo de semente de uva utilizando 10 % de etanol como co-solvente em comparação com a extração com CO₂ puro; assim como Pinelo et al. (2007) com a adição de 8 % de etanol ao CO₂ supercrítico para extração de bagaço de uva. Cao e Ito (2003) obtiveram um aumento de 4 % no rendimento da extração de óleo de semente de uva utilizando 10 % de etanol como co-solvente em uma extração supercrítica de duas etapas, onde o primeiro estágio foi realizado com CO₂ supercrítico puro por 3 horas e o segundo com adição de co-solvente por 2 horas no mesmo leito. Berna et al. (2001)

adicionaram etanol como co-solvente ao CO₂ em concentrações de 5 a 15 % para determinar a solubilidade do resveratrol, sendo esta maior em 7,5 % de etanol.

Assim, com o objetivo de aumentar o rendimento e a quantidade de compostos no extrato de bagaço de uva obtida pela ESC, foi selecionado o etanol para ser adicionado ao CO₂ como co-solvente. Campos (2005) trabalhou com frações mássicas de 10, 15 e 20 % de etanol como co-solvente em condições de extração de 150 bar e 40 °C, obtendo melhores rendimentos com 15 %. No presente trabalho decidiu-se estreitar esta faixa, a fim de determinar se alguma fração intermediária poderia apresentar melhores resultados. Com isso, pode-se otimizar a extração com o mínimo consumo de solvente possível, ou seja, alcançar um processo sustentável e com menor custo de separação do solvente. Os experimentos foram realizados com frações mássicas de 12,5 %, 15 % e 17,5 % em relação à massa de CO₂ empregada, na condição de 250 bar, 60 °C e vazão de CO₂ de 13 ± 2 g/min. A influência da utilização do etanol como co-solvente e de sua concentração no rendimento da ESC pode ser observada nos dados apresentados na Tabela 14 e ilustrados na Figura 18.

Tabela 14 - Valores de rendimento global (X₀) da ESC do extrato de bagaço de uva *Merlot* com diferentes frações mássicas de co-solvente na condição de 250 bar, 60 °C e vazão de CO₂ de 13 ± 2 g/min.

Co-solvente (% etanol)	X ₀ ⁽¹⁾ (%)
12,5	10,6 ± 0,6 ^b
15	13,31 ± 0,04 ^a
17,5	11,9 ± 0,3 ^{a,b}

⁽¹⁾ Letras iguais indicam que não há diferença significativa (p < 0,05).

Como se pode observar na Figura 18, as extrações supercríticas de óleo de bagaço de uva *Merlot* com adição de co-solvente tiveram seus rendimentos aumentados para todas as frações de etanol testadas em relação ao experimento com CO₂ puro. Assim como no estudo de Campos (2005), aqui também a adição de 15 % de etanol ao CO₂ supercrítico proporcionou melhor rendimento, com um aumento de 171 % em relação ao rendimento obtido para as mesmas condições de extração com CO₂ puro. Isto se deve ao fato do etanol ser um solvente com característica polar; assim, sua adição como co-solvente fez com que substâncias polares passassem a ser solubilizadas pela mistura CO₂ supercrítico/etanol, aumentando a extração desses compostos polares que não eram extraídos pelo CO₂ supercrítico puro, que é uma substância apolar. Com isso, aumenta-se o rendimento, mas reduz-se a seletividade.

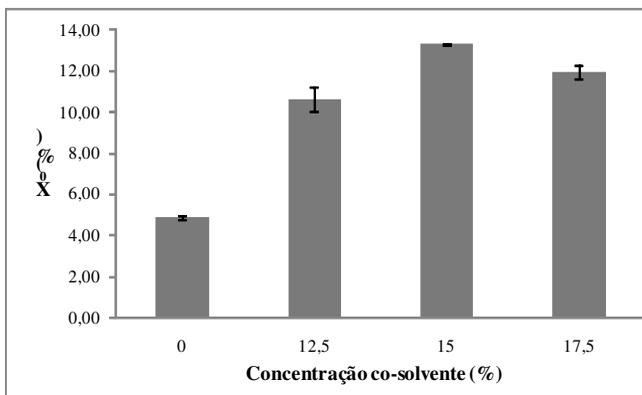


Figura 18 - Efeito da fração de etanol adicionada como co-solvente no rendimento da ESC de extrato de bagaço de uva *Merlot*.

Pode-se observar na Figura 18 que um aumento na fração de etanol de 12,5 % para 15 % melhora o rendimento da ESC devido a um favorecimento das interações soluto/co-solvente o que leva a uma maior solubilidade dos compostos no solvente (HOLLENDER et al., 1997). A partir de 15 %, aumentando-se a fração do co-solvente, o rendimento diminui. Esse efeito também

foi observado por outros pesquisadores como LÓPEZ et al. (2004), na extração de astaxantina de crustáceos, e Berna et al. (2001) na determinação de solubilidade do resveratrol em diferentes concentrações da mistura etanol/CO₂ supercrítico. Isto ocorre provavelmente porque quando a fração de co-solvente utilizado é muito alta (acima de uma fração ótima determinada experimentalmente), a extração de compostos apolares fica prejudicada, visto que o etanol é polar e extrai preferencialmente compostos polares. Ou então, provavelmente, porque com a adição de 17,5 % de etanol, a mistura de solventes não esteja mais em condição supercrítica (dados expostos na Tabela 5), o que reduziria seu poder de solubilização. Essa hipótese é baseada no fato de ter ocorrido condensação de etanol na amostra, que no final da extração se encontrava úmida e com forte cheiro de álcool, fato não ocorrido com as amostras submetidas a extração com 12,5 e 15 % de etanol como co-solvente.

Comparando a extração supercrítica com adição de etanol como co-solvente (Tabela 14) e as extrações à baixa pressão com o mesmo solvente (Tabela 10) para o bagaço de uva *Merlot*, a primeira técnica apresenta resultado significativamente superior à maceração com ultrassom e um pouco inferior ao ensaio com Soxhlet, mas não estatisticamente diferente no caso da adição de 15 % de etanol ao CO₂. Porém, as vantagens da extração supercrítica com adição de etanol como co-solvente em relação ao método convencional Soxhlet é a utilização desse solvente orgânico em quantidade muito menor e a temperatura de processo mais baixa, o que evita a degradação de alguns compostos de interesse (CAMPOS, 2005).

5.5 MODELAGEM MATEMÁTICA

Para a modelagem da curva de extração de óleo de bagaço de uva *Merlot* a 150 bar, 50 °C, e vazão de CO₂ de 13 ± 2 g/min foram empregados três modelos baseados na equação de balanço de massa diferencial, o modelo de Sovová (1994), o modelo logístico apresentado por Martínez et al. (2003) e o modelo de dessorção proposto por Tan e Liou (1989); dois modelos baseados na analogia a transferência de calor, o modelo difusivo de placa apresentado por Gaspar et al. (2003) e o modelo de difusão, proposto por Cranck e apresentado por Reverchon (1997); e ainda o modelo empírico proposto por Esquível et al. (1999) baseado na equação da cinética de crescimento microbiano de Monod.

A modelagem matemática exige o conhecimento de algumas variáveis de processo. Alguns modelos são de fácil aplicação por ser necessário conhecer poucas variáveis para seu emprego:

- a) Crank (1975), massa de soluto inicial (X_0) e raio da partícula sólida;
- b) Esquível et al. (1999), X_0 e massa de inerte, ou seja, a massa de matéria-prima isenta de óleo utilizada na extração;
- c) Martínez et al. (2003), massa de soluto inicial (X_0);
- d) Gaspar et al. (2003), massa de soluto inicial e espessura da partícula sólida;
- e) Outros modelos requerem um maior número de variáveis;
- f) Tan e Liou (1989), vazão de solvente, porosidade do leito, X_0 , densidade do solvente, raio do extrator, altura do leito e densidade do sólido (densidade real);
- g) Sovová (1994), vazão de solvente, porosidade do leito, X_0 , densidade do solvente, raio do extrator, altura do leito, densidade do sólido (densidade real), massa de inerte, solubilidade do extrato, tempo de extração, tempo de duração da etapa CER, taxa de extração na etapa CER (M_{CER}) e concentração de soluto na etapa CER (Y_{CER}).

O valor da massa de soluto inicial ($X_0 = 0,05$ g) foi determinado pela razão entre a massa inicial de soluto - considerada igual a massa de extrato obtida no final da extração ($0,93 \pm 0,01$ g) - e a massa utilizada para formar o leite ($19,93 \pm 0,01$ g), conforme Reverchon e Marrone (2001) e Fiori (2007). De acordo com Fiori (2007), a escolha da consideração a ser utilizada em relação a esse parâmetro, afeta fortemente a predição proporcionada pelos modelos. Teoricamente, esse valor deveria corresponder à porcentagem de soluto contida na matéria-prima e, conseqüentemente, deveria ser um valor constante quando se utiliza o mesmo substrato. Mas, resultados encontrados na literatura contradizem essa afirmação (REVERCHON e MARRONE, 2001; FIORI, 2007; GASPAR et al., 2003). Sovová et al. (1994) consideraram X_0 constante e igual ao valor máximo obtido nos experimentos com menor tamanho de partícula.

A Figura 19 apresenta os dados experimentais e modelados obtidos para a ESC de extrato de bagaço de uva *Merlot* na condição 150 bar, 50 °C e vazão de CO_2 igual a 13 ± 2 g/min. A Tabela 15, apresenta os coeficientes, parâmetros ajustáveis e os erros médios quadráticos (EMQ) obtidos para cada modelo.

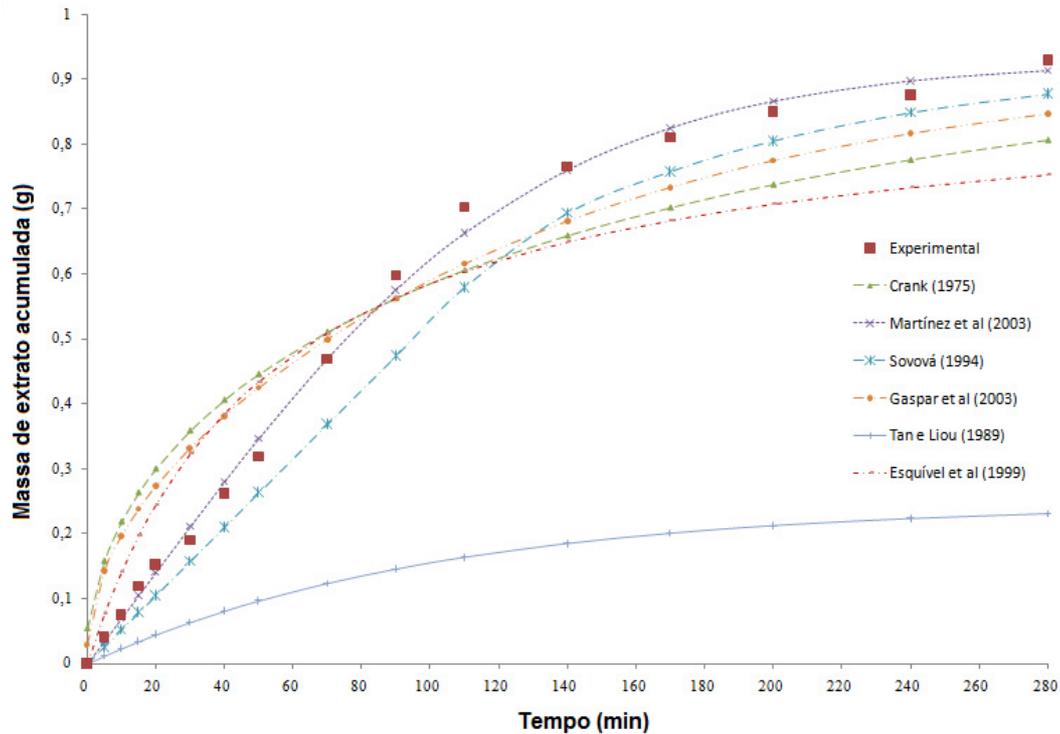


Figura 19 - Curva de ESC de extrato de bagaço de uva *Merlot* experimental e modelada a 150 bar, 50 °C e vazão de 13 ± 2 g/min de CO_2 .

Tabela 15 - Coeficientes, parâmetros ajustáveis e erros médios quadráticos (EMQ) da modelagem matemática da ESC do bagaço de uva *Merlot* a 150 bar, 50 °C e vazão de 13 ± 2 g/min de CO₂.

Modelo	Parâmetros		EMQ
Crank (1975)	D (m ² /min)	$6,384 \times 10^{-11}$	0,0136
Martínez et al. (2003)	b (min ⁻¹)	0,0174	0,0003
	t_m (min)	16,69	
Sovová (1994)	X_k	0,0148	0,0040
	k_{xa} (min ⁻¹)	0,0099	
	k_{ya} (min ⁻¹)	0,1471	
Gaspar et al. (2003)	D_m (m ² /min)	$3,679 \times 10^{-10}$	0,0087
Tan e Liou (1989)	k_d (min ⁻¹)	0,0100	0,1726
Esquivel et al. (1999)	b	52,9853	0,0113

De acordo com a Tabela 15, o modelo de Martínez et al. (2003) apresentou o menor erro médio quadrático, provavelmente porque esse modelo possui dois parâmetros ajustáveis, b e t_m , ao contrário de quatro dos outros cinco modelos aplicados que contam com apenas um parâmetro ajustável. Nesse modelo, o parâmetro t_m corresponde ao instante em que a taxa de extração é máxima, ou seja, próximo a 16 minutos de extração para o bagaço de uva *Merlot*. No estudo de Campos (2005) que avaliou a cinética do processo de ESC de bagaço de uva *Cabernet Sauvignon* em diferentes condições de extração, o modelo de Martínez et al. (2003) também foi o que proporcionou melhor ajuste aos dados experimentais. Para a condição 150 bar/50 °C - mesma utilizada no presente estudo - o autor apresentou valor de t_m de 157,64 min. A provável explicação para a diferença nos valores de t_m desses dois estudos está na vazão de CO₂ empregada em cada ensaio - 13 g CO₂/min neste contra 3 g CO₂/min no de Campos (2005). Ou seja, com uma maior vazão de solvente a taxa de extração máxima é alcançada em menor tempo.

O modelo de Sovová (1994) também proporcionou um bom ajuste aos dados experimentais, com valor de erro médio quadrático de 0,0040; porém, a massa modelada de extrato foi subestimada tanto da etapa de taxa constante de extração (CER) quanto de taxa decrescente de extração (FER). Como pode ser observado na Figura 19, o desvio inicia na etapa CER onde o ajuste do modelo é função do dado de solubilidade empregado. O valor de solubilidade utilizado no presente estudo, $1,94 \text{ g}_{\text{extrato}}/\text{kg CO}_2$, foi determinado por Campos (2005) para bagaço de uva *Cabernet Sauvignon* na condição de 150 bar e 40 °C. Este procedimento foi adotado pela impossibilidade operacional de realizar uma análise de determinação de solubilidade mais adequada. Todavia, valores maiores, $6,85 \text{ g}_{\text{extrato}}/\text{kg CO}_2$, $11,0 \text{ g}_{\text{extrato}}/\text{kg CO}_2$ e $10,1 \text{ g}_{\text{extrato}}/\text{kg CO}_2$, foram relatados por Sovová et al. (1994), Sovová et al. (2001) e Fiori (2007), respectivamente, para semente de uva na condição de 280 bar e 40 °C.

Apesar de o modelo de Sovová (1994) ser o que melhor descreve o processo de ESC por representar em suas equações os diferentes mecanismos de transferência de massa (convecção e difusão), se os parâmetros utilizados não tiverem sido corretamente determinados, a curva do modelo não se ajustará à curva experimental (CAMPOS, 2005). Embora o valor de solubilidade utilizado seja referente ao bagaço de uva, há diferenças de variedade da uva, de características das amostras e de condições de processamento aplicadas em cada estudo que podem justificar o desvio das massas de extrato calculadas pelo referido modelo em comparação aos dados experimentais.

O parâmetro k_{ya} do modelo de Sovová (1994) é definido como o coeficiente de transferência de massa na fase fluida, sendo diretamente afetado pela velocidade de escoamento do fluido que, por sua vez, aumenta com o incremento da vazão de solvente, o que explica o valor de k_{ya} obtido no presente estudo, $0,1471 \text{ min}^{-1}$, superior ao encontrado por Campos (2005), $0,0199 \text{ min}^{-1}$, para a mesma condição de temperatura e pressão, mas com menor vazão. Já o valor de k_{xa} é definido como o coeficiente de transferência de massa na fase sólida e não sofre a influência da vazão do solvente, pois é representado pela difusão do CO_2 e da mistura de CO_2 +soluto no interior das partículas de matéria-

prima (CAMPOS et al., 2008; MEZZOMO et al., 2009; MICHIELIN et al., 2005; SOVOVÁ, 1994).

Conforme os dados da Tabela 15, o valor do coeficiente de transferência de massa na fase fluida (k_{ya}) foi superior ao valor do coeficiente de transferência de massa na fase sólida (k_{xa}), o que indica que o mecanismo de difusão é menos representativo quando comparado com a convecção na ESC de bagaço de uva *Merlot*, pois o soluto localizado no interior das partículas de sólido (matéria-prima) tem maior dificuldade de ser dissolvido, levando mais tempo para vencer a interface sólido-fluido que o soluto localizado na superfície das partículas (MARTÍNEZ et al., 2003; MICHIELIN, 2009). Esse efeito também foi observado por Campos (2005) para o bagaço de uva *Cabernet Sauvignon* em todas as condições empregadas e pode ser explicado pela baixa solubilidade do extrato de bagaço de uva na condição utilizada, o que dificulta sua solubilização e posterior difusão.

No caso de matérias-primas com alto conteúdo de óleo, o modelo de Sovová (1994) geralmente proporciona melhores ajustes às curvas experimentais por possuírem um período de taxa constante de extração bem definido, ou seja, transição do período CER para o FER bem delimitada. A principal vantagem desse modelo é a adequada descrição dos fenômenos de transferência de massa envolvidos no processo de ESC, apresentando significado físico consistente para os parâmetros ajustáveis. Por outro lado, o uso deste modelo é limitado aos sistemas em que a solubilidade do soluto no solvente supercrítico é conhecida para a condição de temperatura e pressão do processo (REVERCHON e MARRONE, 2001; SOUZA et al., 2004).

Os modelos de Crank (1975) e de Gaspar et al. (2003) consideram que o processo de extração é controlado unicamente pela difusão, desconsiderando o mecanismo de transferência de massa por convecção. Analisando a Figura 19 percebemos que esses modelos geram curvas com comportamento semelhante entre si, mas diferente da curva de dados experimentais. Isso indica que essa condição de contorno pode ser inadequada para descrever o sistema em estudo, pois no início da extração, existe um gradiente de concentração entre a superfície da partícula e a

fase fluida e certa resistência à transferência de massa. Deste modo, talvez seja necessária a definição de uma nova condição de contorno para os modelos difusivos que descrevem a extração de óleo de bagaço de uva com CO₂ supercrítico (CAMPOS et al., 2005).

No modelo de Esquível et al. (1999), os efeitos termodinâmicos e de transferência de massa são representados por um único parâmetro ajustável (b) e, desta forma, não é possível verificar a influência dos diferentes mecanismos de transferência de massa na descrição da curva de extração. Provavelmente, por essa razão esse modelo proporcionou um ajuste pouco satisfatório aos dados experimentais. Além disso, como o referente modelo é empírico, ele só pode ser usado para ajustar curvas cinéticas de extração para a faixa experimental na qual o parâmetro b foi estimado (MICHIELIN, 2009).

O modelo de Tan e Liou (1989) apresentou o maior erro médio quadrático. Esta deficiência no ajuste aos dados experimentais pode estar ligada ao fato de que os autores tratam a constante de dessorção (k_d) como um parâmetro dependente apenas da temperatura do processo. A constante de dessorção representa a transferência de massa interfacial na qual a taxa de extração é proporcional à concentração de soluto na fase sólida e das características do solvente. Uma interpretação válida para essa constante seria atribuir a ela uma relação com alguns parâmetros de processo como a solubilidade (Y^*) e as restrições à transferência de massa (k_{ya} e k_{xa}).

De acordo com a literatura, os modelos baseados no balanço de massa da fase sólida são, geralmente, mais adequados para descrever a extração de óleos essenciais com CO₂ supercrítico, visto que, em muitos casos, o transporte intraparticular de solutos é definido como o fator limitante da extração (GASPAR et al., 2003). No entanto, os melhores resultados apresentados pelos modelos de Sovová e Martínez no presente estudo são uma forte evidência de que a difusão não é o único fenômeno envolvido na transferência de solutos no interior das partículas de bagaço de uva.

Todas as diferentes considerações usadas na concepção e aplicação dos modelos destacam que alguns aspectos do

fenômeno de transferência de massa no interior da matriz vegetal não são completamente conhecidos. De acordo com Fiori (2007), seria particularmente oportuna uma reconsideração do papel da estrutura das células dentro de uma partícula e a distribuição granulométrica dessas partículas na formação de cada leito de extração. O modelo apresentado por Del Valle et al. (2006) inclui uma relação quantitativa com a microestrutura do substrato, mas ainda há poucas informações na literatura sobre sua aplicação.

A modelagem da curva de ESC a partir de dados experimentais é importante para a otimização de projetos e aumento de escala, como a definição do volume do extrator e do tempo total da extração para uma condição de operação específica; e para a predição do comportamento da extração ao longo do processo e de seu rendimento, dependendo do fenômeno predominante na transferência de massa do sistema extrato de bagaço de uva/CO₂ supercrítico (fenômenos convectivos e difusivos) (GASPAR et al., 2003; MEZZOMO et al., 2009).

5.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

5.6.1 Determinação do teor de fenólicos total (TFT)

Embora os compostos fenólicos sejam os principais responsáveis pela atividade antioxidante de produtos naturais, não caracterizam completamente essa atividade, representando apenas uma boa estimativa desta propriedade (ROGINSKY e LISSI, 2005). O teor de fenólicos total (TFT) determinado pelo método de Folin-Ciocalteu para cada extrato de bagaço de uva obtido pelos diferentes métodos de extração para ambas as variedades, bem como para o BHT (amostra padrão), são apresentados na Tabela 16. A curva padrão de ácido gálico, para as diferentes concentrações testadas e as suas respectivas absorbâncias, está apresentada no Apêndice II, sendo utilizada para o cálculo do teor de fenólicos total.

Tabela 16 - Conteúdo de fenólicos total (TFT), expressos em equivalentes de ácido gálico (GAE), para os extratos de bagaço de uva e BHT.

Método de Extração	Variáveis de processo	Teor de fenólicos total (mg GAE/ g extrato) ⁽¹⁾		
		<i>Merlot</i>	<i>Syrah</i>	
ESC amostra úmida	Testes preliminares a	-	36 ± 2 ^{d,e,f}	
ESC amostra seca	40 °C e 200 bar	-	46,1 ± 0,2 ^{c,d}	
ESC CO ₂	50 °C	150 bar	34 ± 1 ^{d,e,f,g}	-
		200 bar	37,6 ± 0,9 ^{d,e,f}	-
		250 bar	36,5 ± 0,2 ^{d,e,f}	-
		300 bar	34,7 ± 0,2 ^{d,e,f,g}	-
	60 °C	150 bar	34,7 ± 0,9 ^{d,e,f,g}	-
		200 bar	33 ± 1 ^{d,e,f,g}	-
		250 bar	31 ± 2 ^{d,e,f,g}	32 ± 2 ^{d,e,f,g}
		300 bar	35 ± 1 ^{d,e,f,g}	-
ESC CO ₂ + co-solvente a 250 bar/60 °C	12,5 % de etanol	26,2 ± 0,7 ^{e,f,g}	-	
	15,0 % de etanol	25,3 ± 0,9 ^{e,f,g}	-	
	17,5 % de etanol	27,6 ± 0,4 ^{d,e,f,g}	-	
Soxhlet	etanol amostra úmida	-	110 ± 3 ^b	
	etanol	118 ± 2 ^b	60,7 ± 0,5 ^c	
	hexano	32 ± 2 ^{d,e,f,g}	45 ± 2 ^{c,d,e}	
	acetato de etila	32,7 ± 0,7 ^{d,e,f,g}	38 ± 2 ^{d,e,f}	
Ultrassom	etanol	40 ± 2 ^{d,e,f}	33 ± 2 ^{d,e,f,g}	
	hexano	34 ± 1 ^{d,e,f,g}	32,4 ± 0,3 ^{d,e,f,g}	
	acetato de etila	31,4 ± 0,4 ^{d,e,f,g}	36 ± 2 ^{d,e,f}	
	água	16,7 ± 0,2 ^g	21,2 ± 0,6 ^{f,g}	
BHT	-	268 ± 13 ^a		

⁽¹⁾ Letras iguais indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

A quantidade de compostos fenólicos dos extratos supercríticos não apresentou tendência com a temperatura e a pressão de operação, nem com a densidade do solvente. Nos

extratos supercríticos obtidos com CO₂ puro a quantidade de compostos fenólicos variou de 31 a 46,1 mg ácido gálico/g de extrato não havendo, porém, diferença significativa entre eles. Os extratos obtidos com a técnica supercrítica obtiveram teores de fenólicos similares à maioria dos extratos de baixa pressão de ambas as variedades de uva. As extrações Soxhlet com etanol apresentaram os maiores conteúdos de fenólicos para as amostras de bagaço de *Merlot*, *Syrah* úmida e *Syrah* seca com valores de 118 ± 2 , 110 ± 3 e $60,7 \pm 0,5$ mg GAE/ g extrato, respectivamente. Enquanto o menor teor de fenólicos foi encontrado para o extrato de bagaço de *Merlot* obtido pela maceração ultrassônica com água ($16,7 \pm 0,2$ mg GAE/ g extrato). Apenas estes quatro últimos resultados apresentados diferiram significativamente dos demais.

O teor de fenólicos obtido pela extração Soxhlet com etanol do bagaço de *Merlot*, 118 ± 2 mg GAE/ g extrato, está de acordo com o obtido por Luther et al. (2007) para semente desengordurada de uva *Chardonnay* pelo mesmo método, com valor de 99 mg GAE/ g extrato.

Apesar de os compostos fenólicos apresentarem uma ampla faixa de polaridade, podendo ser solubilizados por solventes de baixa polaridade como hexano e CO₂ supercrítico, conforme os resultados apresentados na Tabela 16, de forma geral, esses compostos são caracterizados como polares, sendo solubilizados com mais facilidade por solventes polares como é o caso do etanol. Assim, os resultados das extrações à baixa pressão com utilização de etanol, sugeriram que este seria indicado para adição como co-solvente junto ao CO₂ supercrítico. Porém, ao contrário do esperado, a adição de co-solvente gerou extratos com conteúdo de compostos fenólicos inferior aos obtidos com CO₂ puro. Pelo teste de Tukey, o emprego de diferentes concentrações de etanol não teve influência sobre o teor de fenólicos.

Avaliando a influência do teor de umidade da amostra no conteúdo total de fenólicos, podese observar comportamentos opostos nas extrações Soxhlet e supercrítica. Na técnica Soxhlet, a umidade da amostra parece favorecer a solubilização dos compostos fenólicos, talvez por a água da amostra se misturar

completamente com o etanol. Já na extração supercrítica, o excesso de água da amostra pode competir com o CO₂ na solubilização dos compostos, prejudicando sua recuperação (POURMORTAZAVI e HAJIMIRSADEGHI, 2007).

Não há evidência de diferença marcante entre as variedades de uva. Apenas os teores de fenólicos das extrações Soxhlet com etanol são significativamente diferentes entre as variedades *Syrah* e *Merlot*, sendo o resultado desta variedade quase o dobro daquela. O extrato supercrítico da variedade *Cabernet Sauvignon* apresentou um teor de fenólicos de 31,0 ± 0,3 mg GAE/g extrato, também semelhante estatisticamente aos demais extratos dessa mesma condição.

Como pode ser observado na Tabela 16, todos os extratos apresentaram teor de fenólicos bastante inferior e estatisticamente diferente do encontrado no antioxidante comercial, BHT, usado como referência.

Louli et al. (2004) relatam um teor de fenólicos de 13,8 % w/w GAE, equivalente a 138 mg GAE/g extrato, obtido para o bagaço da uva tinta grega *Agiorgitiko* através de uma extração Soxhlet com acetato de etila; esse valor é muito superior aos encontrados no presente estudo para o bagaço das uvas *Merlot* e *Syrah* com o mesmo método de extração e solvente. No entanto, essa divergência poderia ser explicada pela diferença de umidade entre as amostras usadas em cada estudo, uma vez que os autores não empregaram nenhum pré-tratamento no bagaço antes da extração, cuja umidade estava entre 60 e 65 %, e que a extração Soxhlet parece ser favorecida por um maior teor de umidade da amostra.

Os resultados alcançados por este estudo para as extrações Soxhlet e maceração ultrassônica com etanol para o bagaço de *Merlot* são inferiores aos apresentados por Rockenbach (2008) para uma técnica de maceração agitada em metanol acidificado do bagaço seco desengordurado da mesma variedade, 46,23 mg GAE/g bagaço seco. Para a comparação, foi necessário converter os resultados apresentados na Tabela 16, que são referentes à massa de extrato, para relacioná-los com massa de bagaço seco, obtendo-se 19,14 e 2,65 mg GAE/g bagaço (base seca), para Soxhlet e maceração ultrassônica,

respectivamente. Apesar de os solventes e técnicas de extração aplicados serem diferentes, o fato de os autores em questão terem utilizado o bagaço previamente desengordurado (em extrator Soxhlet com hexano), pode ser a principal razão da superioridade no teor de fenólicos, pois o óleo da matéria-prima agiria como uma barreira para transferência dos compostos fenólicos ao solvente.

Alonso et al. (2002) submeteram bagaços de *Syrah* e *Cabernet Sauvignon* liofilizados à extração ultrassônica com metanol, obtendo 50 e 25 mg GAE/g bagaço liofilizado, respectivamente. Convertendo os resultados das uvas *Syrah* e *Merlot* para a maceração ultrassônica com etanol apresentados na Tabela 16, tem-se 3,34 e 2,65 mg GAE/g bagaço (base seca), respectivamente. As diferenças de pré-tratamento da matéria-prima, do solvente empregado e de condições de vinificação poderiam ser as razões para a inferioridade dos resultados deste estudo quando comparados aos dos autores.

Vatai et al. (2009) obtiveram cerca de 15 mg GAE/g bagaço (base seca) para extração convencional (maceração) com etanol de bagaço de uva *Merlot*. Ao se converter os resultados das extrações Soxhlet e ultrassônica com etanol da uva *Merlot* apresentados na Tabela 16, tem-se 19,14 e 2,65 mg GAE/g bagaço (base seca), respectivamente. A comparação desses resultados poderia indicar que a maceração proporciona melhor teor de fenólicos que os métodos de extração aplicados no presente trabalho, mas é necessária uma pesquisa mais aprofundada para afirmar isso.

Da mesma forma, o resultado de fenólicos totais apresentado por Vatai et al. (2009) para a extração supercrítica do bagaço de *Cabernet Sauvignon* a 40 °C/150 bar com CO₂ puro foi cerca de 5 mg GAE/g bagaço (base seca), enquanto o valor encontrado aqui para 60 °C/250 bar foi 1,69 mg GAE/g bagaço (base seca). Como, de acordo com os dados da Tabela 16, não parece haver tendência do valor do conteúdo de fenólicos com a temperatura e a pressão do fluido supercrítico, essa diferença pode ser devida ao pré-tratamento aplicado ao bagaço (que não é especificado pelos referidos autores), condições de cultivo da uva e/ou processo de vinificação.

Katalinić et al. (2010) obtiveram um teor de fenólicos de 1,666 mg GAE/g uva inteira *in natura* através de uma extração convencional com solução etanol/água (80/20 v/v) da casca retirada diretamente da uva *Merlot* (sem ter passado pela vinificação). Porém, por ser referente ao fruto como um todo (incluindo polpa) sem pré-tratamento, não pode ser comparado com o resultado obtido no presente trabalho. Muitos outros estudos são encontrados na literatura sobre teor de fenólicos de extratos de uva e seus derivados (CORRALES et al., 2008; JU e HOWARD, 2003; NEGRO et al., 2003; RUBILAR et al., 2007; YANG et al., 2009), porém com variedades, métodos de extração e/ou solventes muito diferentes o que desqualifica a comparação dos resultados.

As diferenças encontradas na literatura no teor de fenólicos total para uma mesma fruta ou vegetal dependem, principalmente, das diferentes técnicas empregadas na extração e quantificação destes compostos. Os compostos fenólicos presentes nas frutas são encontrados na forma livre e ligada, porém esta última geralmente é excluída das análises, sendo o teor de fenólicos total subestimado. Além disso, a quantidade de fenólicos das plantas também depende de fatores como o gênero, espécie e cultivar da planta e de condições de cultivo, colheita e armazenamento. Ainda, no processo de vinificação, os compostos fenólicos são extraídos do bagaço durante a maceração e transferidos para o mosto. O tempo e a temperatura empregados na maturação do vinho afetam a transferência de fenólicos, o que irá determinar sua quantidade disponível no bagaço (GÓMEZ-MÍGUEZ, 2007; SUN et al., 2002).

Com base na literatura, sabe-se que o conteúdo de compostos fenólicos determinado pelo método de Folin-Ciocalteu não é uma medida absoluta da quantidade desse tipo de substância na matéria-prima, e que algumas moléculas respondem diferentemente a esse experimento. O teor fenólico tem influência na atividade antioxidante das amostras, mas existem outros compostos bioativos que podem estar presentes no bagaço de uva, como fitosteróis, vitaminas e minerais. Deve-se considerar, ainda, um possível efeito sinérgico entre esses

componentes na atividade antioxidante resultante (SÁNCHEZ-MORENO et al., 1999).

5.6.2 Determinação da Atividade Antioxidante pelo método de DPPH

Foi avaliada a atividade antioxidante dos extratos de bagaço de uva de três variedades da espécie *Vitis vinífera*, pelo método do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), conforme descrito no item 4.4.2. A atividade antioxidante é apresentada em EC_{50} , ou seja, a concentração efetiva a 50 %. A Tabela 17 apresenta os valores de EC_{50} dos extratos obtidos pelas diferentes técnicas de extração empregadas em ambas as variedades de uva. Utilizou-se o BHT, um composto sintético de reconhecida atividade antioxidante como referência para comparação dos resultados. Na presença de antioxidantes, o radical DPPH recebe um elétron (ou hidrogênio), tornando-se um composto mais estável. Assim, sua absorvância diminui. Esse processo pode ser notado visualmente pela descoloração da solução de DPPH com extrato e através da utilização de um espectrofotômetro.

Quanto menor o valor de EC_{50} , maior a atividade antioxidante do produto, ou seja, menor a quantidade de extrato que é necessária para inibir em 50 % a atividade dos radicais livres. Como esperado, os resultados de atividade antioxidante, em geral, são função da polaridade do solvente, com valores maiores de EC_{50} para os solventes apolares (hexano e CO_2). A única discrepância nesse sentido é o melhor desempenho apresentado pelos extratos obtidos à baixa pressão com etanol e não com água, que é mais polar. Isso pode ser observado nos dados dos extratos ultrassônicos de bagaço de uva *Syrah* desidratado com $158 \pm 2 \mu\text{g/mL}$ para o etanol e $346 \pm 27 \mu\text{g/mL}$ para a água, apesar de estatisticamente não serem diferentes entre si. Os valores de concentração efetiva (EC_{50}) desses extratos são comparáveis estatisticamente ao valor obtido para o BHT ($261 \pm 12 \mu\text{g/mL}$), ao nível de 5 % de significância.

Tabela 17 - Avaliação do potencial antioxidante dos extratos de bagaço de uva através do método DPPH, expressos através da concentração efetiva a 50 % (EC₅₀), e comparação com o BHT.

Método de Extração	Variáveis de processo	EC ₅₀ (µg/mL) ⁽¹⁾		
		Merlot	Syrah	
ESC amostra úmida	Testes preliminares a	-	2101 ± 232 ^{d,e,f}	
ESC amostra seca	40 °C e 200 bar	-	4706 ± 281 ^{k,l}	
ESC CO ₂	50 °C	150 bar	5770 ± 240 ^m	-
		200 bar	4471 ± 58 ^{j,k}	-
		250 bar	5508 ± 213 ^{l,m}	-
		300 bar	5161 ± 186 ^{l,m}	-
	60 °C	150 bar	2349 ± 57 ^{e,f,g}	-
		200 bar	3528 ± 123 ^{h,i}	-
		250 bar	2917 ± 97 ^{g,h}	4788 ± 258 ^{k,l}
		300 bar	3814 ± 157 ^{i,j}	-
ESC CO ₂ + co-solvente a 250 bar/60 °C	12,5 % de etanol	1772 ± 98 ^{c,d,e}	-	
	15,0 % de etanol	2143 ± 88 ^{d,e,f}	-	
	17,5 % de etanol	1501 ± 72 ^{c,d}	-	
Soxhlet	etanol amostra úmida	-	129,5 ± 0,7 ^a	
	etanol	208 ± 2 ^a	158 ± 2 ^a	
	hexano	9299 ± 44 ⁿ	2684 ± 233 ^{f,g}	
	acetato de etila	600 ± 16 ^a	680 ± 21 ^{a,b}	
Ultrassom	etanol	394 ± 5 ^a	211 ± 2 ^a	
	hexano	4097 ± 2 ^{l,j,k}	2618 ± 112 ^{f,g}	
	acetato de etila	1402 ± 59 ^c	1493 ± 148 ^{c,d}	
	água	1321 ± 129 ^{b,c}	346 ± 27 ^a	
BHT	-	261 ± 12 ^a		

⁽¹⁾ Letras iguais indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

Um maior teor de umidade da amostra parece beneficiar a obtenção de composto de atividade antioxidante, uma vez que ambos os ensaios realizados com a amostra sem pré-tratamento apresentaram melhores resultados em comparação ao mesmo

procedimento de extração aplicado ao bagaço seco, sendo significativo no caso da extração supercrítica. De acordo com Monrad et al. (2010) a desidratação dos tecidos vegetais, como o pré-tratamento aplicado ao bagaço neste estudo, pode prejudicar a extração de compostos de interesse, pois as pectinas podem formar ligações cruzadas e, conseqüentemente, bolsões hidrofóbicos capazes de encapsular e complexar alguns desses compostos.

Os extratos supercríticos apresentaram uma tendência de aumento dos valores de atividade antioxidante e, conseqüente, redução dos valores EC_{50} com o aumento da temperatura de extração de 50 °C para 60 °C, para todas as condições de pressão analisadas. Isso pode indicar que os compostos responsáveis pela atividade antioxidante presentes no bagaço de uva são mais solúveis a 60 °C. Já a pressão não parece ter efeito sobre a atividade antioxidantes dos extratos.

Analisando os dados da Tabela 17, nota-se que a adição de co-solvente ao CO_2 supercrítico melhora a extração de compostos antioxidantes, reduzindo significativamente os valores de EC_{50} em comparação aos valores obtidos com CO_2 puro. Porém, mesmo com a adição de etanol, os extratos supercríticos ainda apresentaram desempenho bastante inferior ao proporcionado pelos extratos obtidos pelas técnicas à baixa pressão com etanol, água e acetato de etila, possivelmente, porque a polaridade das misturas CO_2 /etanol não atinge os níveis necessários para a solubilização de componentes com alta atividade antioxidante.

Segundo Campos et al. (2008), valores de EC_{50} acima de 250 $\mu\text{g/mL}$ indicam baixo potencial antioxidante. Assim, apenas os extratos obtidos com etanol à baixa pressão poderiam ser considerados potencialmente antioxidantes.

Rubilar et al. (2007) relatam um valor de EC_{50} de 200 $\mu\text{g/mL}$ (0,20 g/L) para um extrato obtido de bagaço de *Cabernet Sauvignon* sem pré-tratamento submetido à trituração com etanol, semelhante aos resultados encontrados no presente trabalho para as extrações à baixa pressão com o mesmo solvente, enquanto Campos et al. (2008) apresentaram valor de EC_{50} inferior (49,5 $\mu\text{g/mL}$) para o extrato Soxhlet de bagaço

desidratado de *Cabernet Sauvignon*. Para as extrações supercríticas com adição de etanol estes últimos autores não especificaram o valor exato, apenas informaram que foi superior a 250 µg/mL, não sendo possível a comparação com os extratos do bagaço de *Merlot* obtidos neste estudo.

Katalinić et al. (2010) apresentaram valor de EC₅₀ de 153 µg/mL de extrato de casca de uva *Merlot* seca (sem ter passado pela vinificação) obtido através de uma extração convencional com solução etanol/água (80/20 v/v). Esse resultado é semelhante ao encontrado no presente trabalho para a extração Soxhlet do bagaço de *Merlot*, mas seria esperado que a casca não vinificada apresentasse maior atividade antioxidante que o bagaço, uma vez que a maceração que ocorre durante o processo de fabricação do vinho transfere muitos compostos antioxidantes da casca para o vinho.

Como no caso do teor de fenólicos, outros estudos são encontrados na literatura sobre avaliação da atividade antioxidante de extratos de uva e seus derivados (ALONSO et al., 2002; LOULI et al., 2004; PINELO et al., 2006, 2007), porém com tipo de uva, técnica de extração, solventes e/ou métodos de detecção diferentes o que dificulta a comparação dos resultados.

5.6.3 Método de descoloração do sistema β-caroteno/ácido linoléico

No método de descoloração do sistema β-caroteno/ácido linoléico, o β-caroteno sofre descoloração na ausência de um composto antioxidante, o que resulta na redução da leitura espectrofotométrica da absorbância da solução, num dado tempo de reação. Isto ocorre devido à formação de radicais livres a partir da oxidação do β-caroteno e do ácido linoléico. A Tabela 18 apresenta os valores obtidos para o método de descoloração do sistema β-caroteno/ácido linoléico, expressos em percentual de atividade antioxidante (% AA) após 120 minutos de reação, para os extratos de bagaço de uva e BHT.

Tabela 18 - Avaliação do potencial antioxidante dos extratos de bagaço de uva e BHT através do método de descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoléico, expressos através do percentual de atividade antioxidante (% AA), após 120 minutos de reação.

Método de Extração	Variáveis de processo	% AA (120 min) ⁽¹⁾		
		<i>Merlot</i>	<i>Syrah</i>	
ESC CO ₂	50 °C	150 bar	66 ± 2 ^b	-
		200 bar	27 ± 2 ^{d,e,f}	-
		250 bar	24 ± 3 ^{d,e,f}	-
		300 bar	23,6 ± 0,6 ^{d,e,f}	-
	60 °C	150 bar	45 ± 1 ^c	-
		200 bar	27 ± 2 ^{d,e,f}	-
		250 bar	32,18 ± 0 ^{c,d,e}	23 ± 2 ^{d,e,f}
		300 bar	45 ± 6 ^c	-
ESC CO ₂ + co-solvente a 250 bar/60 °C	12,5 % de etanol	23 ± 4 ^{d,e,f}	-	
	15,0 % de etanol	26 ± 5 ^{d,e,f}	-	
	17,5 % de etanol	35 ± 2 ^{c,d}	-	
Soxhlet	etanol amostra úmida	-	7,1 ± 0,5 ^{g,h}	
	etanol	46 ± 3 ^c	4,4 ± 0,8 ^h	
	hexano	45,7 ± 0,3 ^c	29,2 ± 0,6 ^{d,e,f}	
	acetato de etila	-	-	
Ultrassom	etanol	61 ± 2 ^b	20,0 ± 0,7 ^{e,f,g}	
	hexano	61,7 ± 0,0 ^b	15 ± 1 ^{f,g,h}	
	acetato de etila	-	-	
	água	4,4 ± 0,3 ^h	20 ± 1 ^{e,f}	
BHT	-	113 ± 7 ^a		

⁽¹⁾ Letras iguais indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

Os melhores resultados foram apresentados pelo extrato supercrítico obtido com CO₂ puro a 150 bar/50 °C, com 66 ± 2 % de atividade antioxidante, e pela extração ultrassônica com hexano, com 61,7 % AA - ambos para a variedade *Merlot* - por

esta técnica ser mais adequada para a determinação da atividade antioxidante de frações lipídicas.

Na extração supercrítica, não é observada nenhuma tendência dos valores de atividade antioxidante com a temperatura, a pressão ou com a densidade do CO₂. A adição de etanol como co-solvente ao CO₂ supercrítico, em qualquer concentração, não proporcionou melhora alguma da atividade antioxidante, não havendo diferença estatística em comparação aos resultados obtidos com o CO₂ puro. Isso porque a adição de etanol não aumenta a fração lipídica extraída. Em contrapartida, o etanol se destaca nas extrações à baixa pressão, apresentando resultados bastante próximos, e iguais estatisticamente, aos do hexano.

Na Tabela 18, pode ser observado também que há diferença significativa entre as atividades antioxidantes dos extratos de *Syrah* e *Merlot* para todos os ensaios Soxhlet e com ultrassom, com melhores resultados para a segunda variedade. Isso, aliado aos resultados um pouco melhores apresentados pela variedade *Syrah* no método DPPH, pode indicar o extrato de bagaço de *Merlot* apresenta maior fração lipídica que o de *Syrah*. Apesar de não ter sido verificada a proporção de cascas e sementes em cada matéria-prima, isso pode estar relacionado a uma maior proporção de sementes no bagaço de *Merlot*.

No entanto, os dados da Tabela 18 mostram baixa atividade antioxidante para todos os extratos se comparados ao BHT (113 ± 7 %), com diferença significativa pelo Teste de Tukey.

Negro et al. (2003) utilizaram o método β -caroteno/ácido linoléico para comparar a atividade antioxidante de extratos de bagaço e, separadamente, de semente e de casca da uva *Negro Amaro* obtidos por trituração em solução de 80 % etanol acidificada com 0,5 % 0,1 N HCl. Comparando o resultado dos autores para um extrato de bagaço com 40ppm de fenólicos e 64,67 % AA, ao seu equivalente obtido no presente estudo que seria o extrato ultrassônico obtido com etanol da variedade *Merlot*, com 40 μ g GAE/g (ou ppm) e 61 % AA, pode-se considerá-los equivalentes. Ao se comparar os resultados dos extratos de casca, bagaço e semente obtidos pelos referidos

autores, a atividade antioxidante cresceu nessa ordem, corroborando o resultado apresentado por Baydar et al. (2004) em que o teor de fenólicos em extratos de sementes foi superior (cerca de 12 vezes) ao de extratos de casca.

O resultado apresentado na Tabela 18 para a extração ultrassônica com etanol do bagaço de *Merlot* (61 % AA) está de acordo com os dados apresentados por Rockenbach et al. (2008) para os extratos de bagaço seco desengordurado das variedades *Ancelota* e *Tannat*, 53,29 e 55,77 % AA, respectivamente, obtidos com uma técnica de maceração agitada em etanol. Rockenbach (2008) também apresentaram resultado semelhante (65 % AA) para o bagaço de uva *Pinot Noir* submetido ao mesmo procedimento de pré-tratamento e extração. Jayaprakasha et al. (2001) obtiveram resultados de atividade antioxidante de até 88,7 % para extratos de semente de uva *Bangalore* desengordurada obtidos por Soxhlet com metanol.

De acordo com os dois métodos de avaliação de atividade antioxidante utilizados, DPPH e β -caroteno, de um modo geral, os extratos de bagaço de uva obtidos são menos eficientes que o BHT. Apesar disso, o uso de extratos naturais, obtidos a partir do resíduo de vinícolas, como aditivos alimentares pode ser vantajoso, conforme sugerido por Bonilla et al. (1999). Isso porque o uso de antioxidantes sintéticos em produtos alimentícios é limitado pela legislação, de acordo com parâmetros toxicológicos, o que não se aplica a compostos de origem natural. De acordo com Negro et al. (2003), concentrações de extratos de uva até mesmo acima de 1 g/L podem ser considerados benéficos à saúde, sem nenhuma toxicidade, o que possibilita seu uso em maiores quantidades que os antioxidantes sintéticos. Estudos mais recentes avaliam o efeito sinérgico de antioxidantes sintéticos com a adição de compostos naturais com atividade antioxidante com o intuito de reduzir a quantidade daqueles para produzir uma mesma inibição da oxidação *in vitro* (ROCKENBACH et al., 2008).

5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

5.7.1 Método de Difusão em Agar

A atividade antibacteriana dos extratos foi avaliada inicialmente pelo método qualitativo de difusão em ágar segundo o procedimento descrito no item 4.4.4.1. Essa técnica funciona como um teste de triagem para avaliar se o extrato inibe ou não o crescimento do microrganismo de interesse, no caso as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. A Tabela 19 mostra os resultados obtidos em termos de tamanho dos halos de inibição para os microrganismos testados. Um halo de inibição superior a 9 mm de diâmetro é considerado um resultado positivo. São apresentados somente os extratos que inibiram o crescimento de ao menos uma das bactérias testadas; os demais não inibiram crescimento (NIC).

Os extratos foram mais efetivos contra o crescimento das bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *B. cereus*) quando comparados às bactérias Gram-negativas (*E. Coli* e *P. aeruginosa*). O mesmo comportamento também foi verificado por Smith-Palmer et al. (1998), Boussaada et al. (2008) e por Michielin et al. (2009) para outras matérias-primas. A maior resistência das bactérias Gram-negativas pode ser devido a diferenças na membrana celular desses grupos de bactérias. A membrana externa da bactéria Gram-negativa é altamente hidrofílica agindo como uma barreira à permeabilidade (SMITH-PALMER et al., 1998), enquanto que a membrana externa da bactéria Gram-positiva tem caráter lipofílico que reduz a sua resistência à penetração de compostos com propriedades antibacterianas (ULTEE et al. 1999).

Tabela 19 - Resultados do teste de difusão em ágar expressos em tamanho do halo de inibição (mm) para os extratos de bagaço de uva.

Método de Extração	Variedade uva	Variáveis de processo	Halo de inibição (mm)				
			<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
ESC CO ₂	<i>Merlot</i>	150 bar	12	11	7	NIC	
		200 bar	9	10	NIC	NIC	
		250 bar	11	10	7	NIC	
		300 bar	12	10	7	NIC	
	<i>Merlot</i>	60 °C	150 bar	10	9	8	7
			200 bar	10	8	9	7
			250 bar	10	9	10	10
			300 bar	10	7	9	NIC
	<i>Syrah</i>	60 °C	250 bar	10	10	NIC	NIC
	<i>Cabernet Sauvignon</i>	60 °C	250 bar	10	10	NIC	NIC
	ESC CO ₂ + co-solvente 250bar/60°C	<i>Merlot</i>	12,5 % de etanol	NIC	NIC	NIC	NIC
			15,0 % de etanol	NIC	NIC	7	7
17,5 % de etanol			NIC	NIC	NIC	NIC	
Soxhlet	<i>Syrah</i>	hexano	NIC	14	NIC	NIC	

NIC: não inibiu crescimento.

De todos os microrganismos testados, o *P. aeruginosa* demonstrou ser o mais resistente, tendo seu crescimento efetivamente inibido (10 mm) somente pelo extrato supercrítico de *Merlot* a 250 bar e 60 °C. De acordo com a literatura, essa bactéria Gram-negativa parece ser menos sensível a ação de muitos outros extratos de planta (BOUSSAADA et al., 2008).

Assim, o extrato de *Merlot* obtido com CO₂ supercrítico a 250 bar e 60 °C foi o único que apresentou atividade contra todas as quatro bactérias. Por outro lado, todos os extratos obtidos com CO₂ supercrítico puro apresentaram resultado considerado positivo (tamanho do halo maior que 9 mm) para a inibição do crescimento de *S. aureus*.

De maneira geral, a temperatura de 60 °C parece favorecer extração de substâncias ativas contra o crescimento de microrganismos, não representado por maior tamanho de halo, mas sim por maior número de inibições, uma vez que os extratos obtidos a 50 °C foram efetivos somente contra *S. aureus* e *B. cereus*.

O maior tamanho de halo foi obtido pelo extrato proveniente do bagaço de *Syrah* pelo método Soxhlet com hexano para o *B. cereus*, sendo este também o único de todos os extratos obtidos pelas técnicas a baixa pressão que apresentou atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar. Isso pode caracterizar que a fração lipídica (mais facilmente extraída por CO₂ e hexano) é mais efetiva contra alguns microrganismos devido à presença de esteróis (PALMA e TAYLOR, 1999a), o que também explica a maior atividade dos extratos contra as bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *B. cereus*). Esta suposição pode ser corroborada pelos resultados apresentados por Baydar et al. (2004), em que não foi observada atividade antimicrobiana em extratos de casca de uva, enquanto extratos de sementes dessas uvas (ricos em ácidos graxos) foram altamente ativos.

Porém, o fato de apenas um entre os quatro extratos obtidos com hexano, apresentar atividade pode também indicar a destruição desses compostos ativos durante o processo de eliminação dos solventes devido à temperatura ou exposição à luz e ao ar (durante a manipulação), mesmo sendo efetuado a

vácuo com temperatura moderada e em frascos âmbar. Isso explicaria também os resultados insignificantes apresentados pelos extratos supercríticos obtidos com CO₂ + etanol.

Assim, as análises de atividade antimicrobiana indicam uma alta eficiência dos extratos supercríticos de bagaço de uva obtidos com CO₂ puro em comparação aos oriundos das extrações com solventes orgânicos, seja à alta ou baixa pressão. Esse comportamento, também relatado por Kitzberger et al. (2007) e por Palma e Taylor (1999a), pode ser explicado pela temperatura amena e pela ausência de ar e luz durante a extração supercrítica o que garante a conservação dos compostos bioativos extraídos (PALMA e TAYLOR, 1999a).

5.7.2. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

Os extratos que apresentaram halo de inibição de crescimento acima de 9 mm para algum dos microrganismos testados no método de difusão em ágar (Tabela 19), foram submetidos ao método quantitativo de microdiluição em caldo de cultivo para a determinação da CMI (concentração mínima inibitória) que se refere à menor concentração de extrato capaz de inibir o crescimento de determinado microrganismo. Os extratos selecionados para o teste de microdiluição em caldo de cultivo são apresentados na Tabela 20 com os respectivos resultados de CMI. A maioria dos ensaios mostrou valores de concentração coincidentes entre as duplicatas, sendo apresentado o desvio padrão apenas dos resultados não coincidentes. Em razão dos ensaios terem sido realizados apenas em duplicata, os valores de desvio padrão são relativamente elevados.

Tabela 20 - Valores da concentração mínima inibitória (CMI) para os extratos de bagaço de uva determinados pelo método de microdiluição para *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Método de Extração	Variedade uva	Variáveis de processo	Concentração Mínima Inibitória ($\mu\text{g/mL}$)				
			<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
ESC CO ₂	Merlot	50°C	150bar	750 \pm 250	2000	>2000	>2000
			200bar	1500 \pm 500	1000	>2000	>2000
			250bar	2000	1500 \pm 500	>2000	>2000
			300bar	625 \pm 375	1000	1000	1000
	Merlot	60°C	150bar	1000	1000	2000	2000
			200bar	1000	2000	2000	2000
			250bar	2000	2000	2000	2000
			300bar	1500 \pm 500	1000	2000	2000
	Syrah	60°C	250bar	1500 \pm 500	2000	>2000	>2000
	Cabernet Sauvignon	60°C	250bar	500	1000	>2000	>2000
Soxhlet	Syrah	Hexano	-	2000	-	-	

De forma geral, não há um consenso sobre o nível aceitável de inibição de extratos quando comparado com padrões, embora, de acordo com Duarte et al. (2007), Wang et al. (2008) e Sartoratto et al. (2004), seja possível classificar os materiais como agentes antimicrobianos baseando-se no valor de CMI apresentado pelos seus extratos. Comumente, a classificação do extrato é estabelecida como forte inibidor para CMI até 500 µg/mL; moderado inibidor para CMI entre 600 e 1500 µg/mL e fraco inibidor para CMI acima de 1600 µg/mL (MICHIELIN et al., 2009).

Conforme os dados da Tabela 20, os melhores resultados, ou seja, as menores concentrações inibitórias foram obtidas nos testes contra o *S. aureus*, sendo o único microrganismo cujo crescimento foi inibido por uma concentração de extrato menor que 1000 µg/mL. Esses resultados foram proporcionados pelos extratos supercríticos obtidos a 250 bar/60 °C para a variedade *Cabernet Sauvignon* e 300 bar/50 °C e 150 bar/50 °C para a variedade *Merlot* com valores de 500, 625 e 750 µg/mL, respectivamente, e classificados com moderado poder de inibição.

Assim como no teste de difusão em ágar, os extratos foram mais efetivos contra o crescimento das bactérias Gram-positivas, principalmente *S. aureus*, quando comparados às bactérias Gram-negativas (*E. Coli* e *P. aeruginosa*). Apenas o extrato supercrítico obtido na condição 300 bar e 50 °C inibiu moderadamente o crescimento destas últimas, com concentração mínima de 1000 µg/mL, enquanto todos os demais extratos apresentaram fraco poder de inibição (acima de 1600 µg/mL) contra as bactérias Gram-negativas. Em estudo de Katalinić et al. (2010) com extratos de 14 variedades de uva obtidos através de maceração das cascas (sem ter passado pela vinificação) com mistura etanol/água (80/20 v/v), não foi evidenciada diferença significativa de susceptibilidade entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Contudo, há relatos na literatura de que extratos fenólicos de plantas são mais eficientes contra bactérias Gram-positivas (KLANCNICK et al., 2009).

Além disso, de acordo com os resultados apresentados por Palma e Taylor (1999a) e Katalinić et al. (2010), parece haver uma leve tendência de extratos de uvas tintas serem mais eficientes contra bactérias Gram-positivas enquanto as Gram-negativas parecem ser mais afetadas por extratos de variedades de uvas brancas. Contudo, é necessário que haja mais pesquisas para confirmar esse comportamento.

Comparando as Tabelas 19 e 20, pode-se observar que o tamanho do halo de inibição do teste de difusão em ágar não está necessariamente relacionado com o valor de concentração inibitória, pois, embora o tamanho da zona de inibição no teste de difusão possa depender da sensibilidade do organismo ao antimicrobiano, isso não pode ser usado para comparar a potência das amostras (MICHIELIN et al., 2009). Pode-se destacar os resultados dos seguintes ensaios com esse comportamento: *Syrah/Soxhlet/B.cereus* que apresentou maior halo de inibição, mas alta concentração mínima e classificação de fraco poder de inibição; e *Merlot/50 °C/300 bar/ P. aeruginosa* que não inibiu crescimento (NIC) pelo método de difusão mas que, com CMI de 1000 µg/mL, pode ser classificado como inibidor moderado. Este comportamento também foi relatado por Kitzberger et al. (2007) e Rios et al. (1988) para extratos de diferentes matérias-primas.

De acordo com os estudos realizados por Michielin et al. (2009) e Smânia et al. (2003), a continuidade dos testes com outras espécies de microrganismos é indicada quando o extrato apresenta uma forte atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *E. coli*, com valores CMI de até 500 µg/mL, o que não ocorreu no presente trabalho.

Poucos resultados diretamente comparáveis são encontrados na literatura devido a diferenças na preparação dos extratos, microrganismos estudados, formas de expressar os resultados entre outros (KATALINIĆ et al., 2010).

Em estudo de Katalinić et al. (2010) as diluições testadas foram preparadas utilizando concentrações de extrato em equivalentes de ácido gálico (GAE) dispersas no meio de cultura aplicados às bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*) e gram-negativas (*Escherichia coli* O157:H7,

Salmonella Infantis e *Campylobacter coli*). Para o extrato de *Merlot*, os autores apresentaram valores de CMI de 0,44 mg GAE/mL para *S. aureus* e *E. coli* e 0,22 mg GAE/mL para *B. cereus*. Para poder comparar esses resultados com os do presente trabalho, foi necessário usar os dados do teor de fenólicos totais apresentados na Tabela 16 para converter os resultados da Tabela 20, obtendo-se valores de CMI de 0,0347 mg GAE/mL contra *S. aureus* e *B. cereus* e 0,0694 mg GAE/mL contra *E. Coli* e *P. aeruginosa* para o extrato de *Merlot* proveniente da extração supercrítica a 150 bar e 60 °C. Nesse caso também o extrato obtido com solvente apolar (CO₂) apresentou maior efeito antimicrobiano que o extrato resultante de extração com solvente polar apresentado pelos referidos autores.

Thimothe et al. (2007) estudaram extratos em pó de uvas inteiras das variedades *Cabernet Franc* e *Pinot Noir* e de seus respectivos bagaços após vinificação, obtidos a partir das matérias-primas liofilizadas e submetidas à extração ultrassônica com uma mistura de metanol/etanol/água (50/25/25 %, v/v). Os autores relataram atividade de todos os extratos contra algumas das propriedades de virulência do *Streptococcus mutans* de em concentrações superiores a 62,5 µg/mL.

A atividade antimicrobiana apresentada pela uva pode ser atribuída à presença de compostos específicos presentes em seus extratos e, com isso, muitos estudos de atividade antiomicrobiana de derivados de uva encontrados na literatura tratam de alguma substância específica, como é o caso do resveratrol. Filip et al. (2003) apresentaram inibição de 57,2 % do crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* com 11 mg de resveratrol/L e de 55,8 % do desenvolvimento de *Aspergillus Níger* com 22 mg de resveratrol/L. Chan (2002) obteve inibição no crescimento de bactérias *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa* com 171 a 342 µg de resveratrol/ml de DMSO (dimetilsulfóxido) e de fungos *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton rubrum*, *Epidermophytonfloccosum* e *Microsporum gypseum* com 25 a 50 µg/ml DMSO, todos causadores de

doenças de pele. Porém esse composto não foi detectado nos extratos obtidos no presente trabalho.

5.8 PERFIL DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Muitos estudos são encontrados na literatura com a utilização de HPLC para avaliação da composição de derivados de uva para diferentes grupos de compostos como antocianinas (CORRALES et al., 2008; JU e HOWARD, 2003), ácidos graxos (CAO e ITO, 2003), tocoferóis (BEVERIDGE et al., 2005), resveratrol (YANG et al., 2009, SAUTTER et al., 2005, LAMUELA-RAVENTÓS et al., 1995). Kammerer et al. (2004) caracterizaram os compostos fenólicos de 14 diferentes amostras de bagaço de uva utilizando metanol acidificado como solvente extrator, sendo identificados 13 tipos de antocianinas, 11 ácidos fenólicos, 13 catequinas e flavonóis e 2 estilbenos.

No presente estudo, essa técnica foi utilizada para a avaliação do perfil de composição em compostos fenólicos. Para tal, foram selecionados os extratos supercríticos obtidos com CO₂ puro e com adição de etanol como co-solvente e os extratos obtidos pelas técnicas à baixa pressão com etanol como solvente, por terem sido os que apresentaram melhores resultados de teor de fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu e para comparação com os extratos supercríticos com co-solvente. Os valores de concentração dos compostos fenólicos obtidos por HPLC para esses extratos são mostrados no Quadro 2, expressos em equivalentes de ácido gálico (GAE) pela correlação com a curva padrão ($y = 33,5x$). O Apêndice III apresenta alguns exemplos dos cromatogramas obtidos para os extratos de bagaço de uva.

Quadro 2 - Perfil de composição dos extratos de bagaço de uva determinado por HPLC para compostos fenólicos, em mg GAE/g extrato.

Método de Extração	Variedade uva	Variáveis de processo	Epicatequina	Ácido gálico	Ácido tânico	Ácido p-OH-benzóico	Ácido vanílico	Ácido cafeico	Ácido protocateuico	
Tempo de retenção (min)			4,6	5,7	6,01	10,1	12,0	17,0	7,6	
ESC CO₂	<i>Merlot</i>	50 °C	150 bar	35,5 ± 0,1	10,82 ± 0,09	ND	49,8 ± 0,7	31,5 ± 0,5	ND	ND
			200 bar	ND	115,9 ± 0,8	ND	11,6 ± 0,1	18,9 ± 0,4	ND	ND
			250 bar	5,4 ± 0,1	395,6 ± 0,6	387,0 ± 0,5	121,8 ± 0,7	461,1 ± 0,3	ND	ND
			300 bar	6,7 ± 0,7	55,0 ± 0,1	50,1 ± 0,5	233 ± 1	14,6 ± 0,9	ND	ND
	<i>Merlot</i>	60 °C	150 bar	ND	121,6 ± 0,7	ND	ND	33,7 ± 0,1	ND	ND
			200 bar	ND	44 ± 1	ND	4,6 ± 0,1	10,6 ± 0,1	ND	ND
			250 bar	ND	14,20 ± 0,09	30,3 ± 0,7	88,81 ± 0,08	50,5 ± 0,3	ND	ND
			300 bar	9,55 ± 0,05	44,5 ± 0,7	38,4 ± 0,1	71,4 ± 0,3	58,8 ± 0,5	ND	ND

ESC CO₂	<i>Syrah</i>	60 °C	250 bar	ND	64,3 ± 0,9	ND	26,3 ± 0,1	ND	ND	ND
	<i>Cabernet Sauvignon</i>	60 °C	250 bar	87,99 ± 0,04	18,7 ± 0,1	ND	207,5 ± 0,3	58 ± 1	ND	ND
ESC CO₂ + CS 250 bar/ 60 °C	<i>Merlot</i>	12,5 % de etanol		119 ± 1	123,09 ± 0,09	ND	500,5 ± 0,5	3,85 ± 0,07	40,6 ± 0,2	ND
		15,0 % de etanol		ND	ND	ND	ND	ND	ND	537 ± 7
		17,5 % de etanol		200,8 ± 0,3	162,4 ± 0,4	26,3 ± 0,2	65,9 ± 0,3*	15,21 ± 0,06	71,7 ± 0,8	ND
SOX	<i>Syrah</i> úmida	etanol		1,7 ± 0,2	7,9 ± 0,1	18,3 ± 0,6	24,3 ± 0,2	ND	ND	ND
	<i>Syrah</i> seca			5,3 ± 0,1	10,6 ± 0,3	20,3 ± 0,2	22,8 ± 0,5	ND	ND	ND
	<i>Merlot</i>			ND	ND	ND	ND	ND	ND	9864 ± 4
US	<i>Syrah</i>	etanol		-	-	-	-	-	-	-
	<i>Merlot</i>			121,9 ± 0,6	51,0 ± 0,5	62,1 ± 0,1	505,73 ± 0,06	ND	39,37 ± 0,02	ND

ESC: extração supercrítica; CS: co-solvente; SOX: Soxhlet; US: maceração ultrassônica; ND: não detectado

Ao contrário do que se poderia esperar, os resultados, de um modo geral, não apresentaram tendência com a temperatura, pressão, adição de co-solvente ou método de extração, o que pode ser explicado pela complexidade do material estudado e das substâncias identificadas, suscetível a diferentes interações e reações de acordo com as condições aplicadas.

Os principais compostos identificados, presentes nas três variedades de uva, foram os ácidos gálico e p-OH-benzóico, cuja estrutura é apresentada na Figura 3. O ácido protocatecuico, apesar de ter sido indentificado em poucas amostras, apresentou a maior concentração entre todos os resultados para o extrato de bagaço de uva *Merlot* obtido por Soxhlet com etanol; no entanto, nenhum outro composto foi identificado nos extratos em que foi encontrado esse componente. Isso pode indicar que o ácido protocatecuico necessita, além da utilização de um solvente polar, de condições mais intensas de temperatura e tempo de contato com esse solvente para ser extraído.

O ácido protocatecuico possui estrutura molecular bastante semelhante ao ácido gálico (Figura 3), porém com um grupo hidroxila a menos (SOUZA FILHO et al., 2006); e, de acordo com Kammerer et al. (2004), esses dois compostos são encontrados em maior quantidade nas sementes das uvas, assim como a epicatequina (Figura 20). Enquanto o ácido p-OH-benzóico está mais concentrado na casca da uva e, geralmente, encontra-se esterificado a polímeros da parede celular (KAMMERER et al., 2004; KANG et al., 2008).

Nos extratos supercríticos obtidos com CO₂ puro não foi possível identificar os ácidos cafeico e protocatecuico (Figura 3). A adição de etanol como co-solvente ao CO₂ nas concentrações 12,5 e 17,5 % aumentou o número de compostos identificados e a concentração de alguns compostos no extrato, comparando com a mesma condição sem adição de co-solvente. O ácido cafeico foi identificado apenas em alguns extratos obtidos com etanol, indicando ser um composto de maior polaridade.

Tsuda et al. (1995) relatam um aumento na quantidade extraída de epicatequina com o aumento da pressão e da temperatura na extração supercrítica com CO₂ puro de semente

de tamarindo, o que não ocorreu neste estudo. Os autores também obtiveram maior rendimento desse composto com a adição de etanol ao CO₂ supercrítico, o que pode ser observado no presente trabalho.

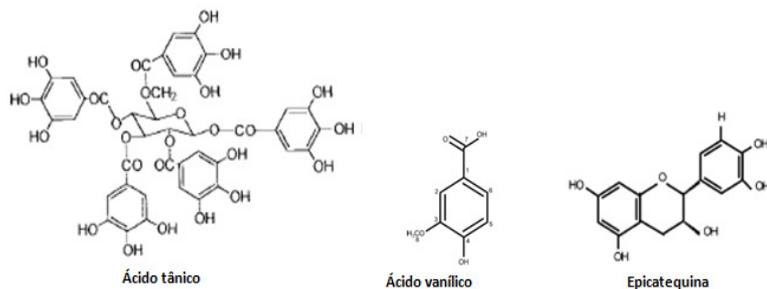


Figura 20 - Estrutura molecular da epicatequina e dos ácidos tânico e vanílico.

Fontes: González-Baró et al. (2008), Sanchez-Moreno et al. (1999) e Singh et al., 2003.

Segundo Adil et al. (2007), os ácidos hidroxicinâmicos, como o ácido cafeico, são levemente solúveis em CO₂ supercrítico sem a adição de co-solvente, enquanto para aumentar a solubilidade de compostos como quercitina, epicatequina e resveratrol é necessária a adição de etanol como co-solvente em concentrações de 5 a 30 %. Comportamento semelhante foi observado no estudo de Murga et al. (2000), em que o ácido gálico foi solubilizado em CO₂ puro, mas houve a necessidade de adição de etanol para a solubilização de epicatequina. Os resultados do presente estudo estão de acordo com ambos os trabalhos mencionados, uma vez que as concentrações de ácido gálico obtidas em CO₂ supercrítico puro foram superiores às de epicatequina e que a adição de etanol nas concentrações 12,5 e 17,5 % aumentou a concentração deste último composto nos extratos. Entretanto, o contrário é observado para outros componentes como o ácido cafeico, que

não foi identificado nos extratos obtidos com CO₂ puro, e as substâncias quercitina e resveratrol, que não foram identificadas em nenhum extrato. Floris et al. (2010) também relatam que compostos de interesse são levemente solúveis em CO₂ sem adição de co-solvente em condições abaixo de 500bar.

Pinelo et al. (2007) apresentaram maiores concentrações ácido gálico e epicatequina para extratos supercríticos obtidos com adição de etanol como co-solvente ao CO₂ em comparação com uma extração sólido/líquido (a baixa pressão). Esse comportamento também pode ser observado neste estudo, comparando os resultados da extração com ultrassom e da supercrítica com 12,5 e 17,5 % de etanol, principalmente no caso do ácido gálico.

De acordo com Pinelo et al. (2005), como os compostos fenólicos são altamente reativos, as condições de extração podem modificar profundamente o perfil fenólico dos extratos. Segundo os autores, duas zonas típicas são geralmente observadas em cromatogramas por HPLC de extratos de uva e derivados: uma monomérica, cujos compostos mais comumente identificados são catequina, epicatequina e quercitina; e uma zona polimérica, uma vez que os compostos fenólicos são suscetíveis a reações de polimerização que promovem importantes mudanças estruturais e, conseqüentemente, variações de suas propriedades. E assim, as condições de extração, como temperatura, tempo e solvente aplicado, poderiam favorecer a formação de compostos fenólicos polimerizados, cujas concentrações no extrato seriam maiores que na matrix vegetal original.

De acordo com Monrad et al. (2010), quando as uvas são prensadas para a liberação do suco, as procianidinas (também conhecidas como taninos condensados) são liberadas e podem facilmente se ligar aos polissacarídeos e proteínas da parede celular, através de pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas. As procianidinas com maior grau de polimerização apresentam maior propensão para se ligarem que as de menor grau de polimerização. Além disso, o rompimento dos tecidos da uva permite que as procianidinas monoméricas, como é o caso

da epicatequina, e outros compostos fenólicos entrem em contato com a enzima polifenoxidase, o que pode levar a oxidação e polimerização dessas substâncias, dificultando sua extração.

A exposição de alguns compostos fenólicos, como ácido gálico e epicatequina, a temperaturas um pouco elevadas também pode provocar reações de oxidação e polimerização, devido ao aumento da reatividade dessas substâncias (MURGA et al., 2000). Assim, a não detecção de ácido gálico e epicatequina nos extratos de Soxhlet e ESC com 15 % de etanol pode ser justificada pela ocorrência de reações que alteraram a estrutura dessas moléculas. No caso da extração Soxhlet, essas reações podem ser provocadas pela elevação da temperatura que é inerente ao processo e, no caso do extrato supercrítico, ocorridas, provavelmente, durante a etapa de remoção do solvente.

Por último, a não detecção de outras substâncias de interesse nas amostras em estudo, como resveratrol e quercitina, pode ser decorrente de sua degradação provocada pela luz, uma vez que algumas delas são fotoinstáveis (t-resveratrol, por exemplo). A luz pode reduzir consideravelmente a concentração dos compostos fenólicos a níveis que não permitam sua detecção, i.e., a impossibilidade de geração de uma adequada relação sinal/ruído (ARSEGO, 2004; MAIER et al., 2009).

Alguns estudos avaliaram a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos isoladamente, contudo, há certa divergência na ordem dos resultados de acordo com o método de avaliação utilizado. Yilmaz e Toledo (2004) compararam a capacidade de seqüestro de radical peroxil de alguns compostos fenólicos e relatou os seguintes resultados e ordem decrescente: resveratrol > catequina > epicatequina = galocatequina > ácido gálico. Sánchez-Moreno et al. (1999) também compararam a atividade antioxidante de alguns compostos fenólicos com antioxidantes comerciais (naturais e sintéticos) através de dois métodos: de inibição da oxidação de lipídios (tiocianato férrico) com resultados nessa ordem, Rutina = ácido ferrúlico > ácido tânico = ácido gálico = resveratrol > BHA = quercetina > D-L- α -tocoferol >

ácido cafeico; e de seqüestro do radical DPPH obtendo alta atividade para o ácido gálico, moderada para os ácidos tânico e cafeico, quercitina, BHA e rutina, e baixa para resveratrol e D-L- α -tocoferol. A propriedade de inibição da oxidação lipídica é, geralmente, mais pronunciada em substância de maior estrutura, como o ácido tânico (Figura 20), mas outros fatores têm influência como: dissociação de ligações O-H, presença e localização na molécula de grupos hidroxila e metoxila, entre outros (SÁNCHEZ-MORENO et al., 1999). No presente estudo não foi possível encontrar relação entre os resultados de atividade antioxidante e compostos identificados dos extratos. Provavelmente, a atividade antioxidante, encontrada através das técnicas DPPH e β -caroteno, foi causada pelo efeito sinérgico de mais de uma substância presente nos extratos ou pela polimerização dos compostos fenólicos, o que aumenta a capacidade antioxidante desses componentes (SÁNCHEZ-MORENO et al., 1999). A atividade antimicrobiana apresentada pelos extratos supercríticos pode estar associada à presença do ácido vanílico (Figura 20), encontrado em boa parte deles e em maiores concentrações nos extratos obtidos com CO₂ puro (NAZ et al., 2006); ou, também, por um efeito sinérgico de mais substâncias.

A utilização de CO₂ supercrítico pode não ser competitiva com alguns outros métodos de extração mais convencionais para a obtenção da totalidade da fração fenólica; todavia, a extração supercrítica oferece como vantagem a possibilidade de ajustar o poder solvatante pelo controle de algumas variáveis de processo. Murga et al. (2000) demonstraram que, pelo ajuste da pressão de operação e da adição de co-solvente (tipo e quantidade), o conteúdo fenólico dos extratos de semente de uva pode ser fracionado. Assim, um processo de extração supercrítica sequencial poderia ser projetado para alcançar tal fracionamento.

6 CONCLUSÃO

Os extratos obtidos por ESC apresentaram rendimentos inferiores aos das extrações Soxhlet e com ultrassom. Os melhores resultados de rendimento para a ESC foram obtidos nas condições a 300 bar/50 °C e 300 bar/60 °C, enquanto que para as extrações à baixa pressão foram obtidos por Soxhlet com etanol e ultrassônica com água.

O uso de co-solvente na extração supercrítica aumentou consideravelmente o rendimento da extração (quase 3 vezes com 15 % de etanol), mas não produziu efeito positivo nos resultados de atividade antioxidante determinada pelo método β -caroteno nem de atividade antimicrobiana dos extratos. Apenas os valores de EC₅₀ (método DPPH), apresentaram melhora significativa com a adição de etanol como co-solvente.

O maior teor de fenólicos foi apresentado pelo extrato obtido pela extração Soxhlet com etanol para o bagaço de *Merlot*. No ensaio do radical DPPH, os melhores resultados de EC₅₀ foram obtidos para os extratos de bagaço de *Syrah*, sem e com pré-tratamento, provenientes da extração Soxhlet com etanol, com valores de $129,5 \pm 0,7$ e 158 ± 2 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Quando o potencial antioxidante foi avaliado pelo método de descoloração do sistema β -caroteno/ácido linoléico os melhores resultados foram encontrados para os extratos supercríticos obtidos a 150 bar e ultrassônicos obtidos com hexano e etanol, porém todos eles consideravelmente abaixo do antioxidante comercial, BHT.

O extrato de bagaço de uva obtido por ESC a 300 bar e 50 °C apresentou-se como o mais efetivo contra todos os microrganismos testados, especialmente contra *S. aureus*, com concentração mínima inibitória igual a 625 $\mu\text{g/mL}$. Os extratos obtidos pelas técnicas à baixa pressão não apresentaram atividade contra os microrganismos testados. Assim, os resultados das análises de atividade antimicrobiana apontam a extração supercrítica como uma técnica favorável à obtenção de

extratos de bagaço de uva ativos contra diferentes microrganismos.

Dentre os compostos presentes nos extratos de bagaço de uva, os componentes identificados pela análise cromatográfica de alta eficiência (HPLC) em um maior número de amostras foram ácido gálico, ácido p-OH-benzóico, ácido vanílico e epicatequina. Todavia, o que apresentou maior concentração foi o ácido protocatecuico no extrato de *Merlot* obtido por Soxhlet com etanol. Destaca-se que a atividade biológica de um extrato pode ser atribuída a possíveis efeitos de sinergismo entre os componentes. Maiores avaliações são necessárias para a identificação e quantificação de outros compostos presentes nos extratos, assim como verificar a contribuição de cada composto individual na atividade biológica.

É importante salientar que cada método de extração tem uma especificidade e, como apresentado neste trabalho, as características de operação da extração supercrítica que permite a obtenção de um extrato livre de resíduos num tempo de operação adequado e com baixas temperaturas de operação fazem com que este seja um método interessante para a obtenção de extratos naturais com atividade antimicrobiana. Ao mesmo tempo, o uso do bagaço de uva como matéria-prima para a obtenção destes extratos é promissor devido à permanência de compostos bioativos de alta qualidade nesse resíduo industrial.

As limitações mencionadas de biodegradabilidade e alto teor de fibras são uma barreira para a aplicação do bagaço de uva em adubação de solo e alimentação animal, tornando esse resíduo um possível problema ambiental para as vinícolas. Além disso, a presença de alguns compostos polifenólicos nas forragens e rações dificulta sua digestibilidade para os animais (SHARMA et al., 1998) e, no caso de utilização como adubo, inibe a germinação de sementes de diversas plantas (SOUZA FILHO et al., 2006); isso se constitui em mais um argumento para o aproveitamento de resíduos vinícolas para a obtenção de compostos fenólicos bioativos de interesse para indústrias alimentícias e farmacêuticas, e posterior reutilização desse novo resíduo para adubação e/ou alimentação animal.

Sugestões para trabalhos futuros

- Utilizar o bagaço da produção de suco de uva, cujo conteúdo fenólico deve ser maior por não ser submetido a maceração alcoólica do processo de vinificação que extrai naturalmente os compostos fenólicos do bagaço;

- Extrações convencionais com misturas de solventes orgânicos e água, pois, de acordo com a literatura, resultam em maior teor de fenólicos totais para extração convencional de bagaço de uva (VATAI et al., 2009);

- Aplicação de diferentes pré-tratamentos, como enzimático, por exemplo;

- Fracionamento do extrato na extração supercrítica;

- Incluir na modelagem matemática novos modelos disponibilizados na literatura mais recentemente;

- Após as extrações, manter os extratos em atmosfera de hidrogênio e manipulá-los ao abrigo da luz para evitar a degradação de compostos;

- Avaliar atividade hipolipemiante e antienvelhecimento da pele.

REFERÊNCIAS

ACADEMIA DO VINHO. Disponível em:
<<http://www.academiadovinho.com.br>>. Acesso em: 29 jun. 2010.

ADAMS, M. M. **Estudo de diferentes métodos de extração por ultra-som de pesticidas em latossolo utilizando técnicas cromatográficas**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, 2002.

ADIL, I. H.; ÇETIN, H. I.; YENER, M. E.; BAYINDIRLI, A. Subcritical (carbon dioxide + ethanol) extraction of polyphenols from apple and peach pomaces, and determination of the antioxidant activities of the extracts. **Journal of Supercritical Fluids**. v. 43, p. 55-63, 2007.

ALONSO, A. M.; GUILLEÁN, D. A.; BARROSO, C. G.; PUERTAS, B.; GARCÍA, A. Determination of Antioxidant Activity of Wine Byproducts and Its Correlation with Polyphenolic Content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5832-5836, 2002.

ANGUS, S.; ARMSTRONG, B.; DE REUCK, K. M. **International Thermodynamic Tables of the Fluid State: Carbon dioxide**, Pergamon Press, New York, 1977.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.; ROBARDS, K.; RYAN, D. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. **The Analyst**, v. 125, p. 989-1009, 2000.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). **Official methods of analysis**. ed. 14. Washington, D. C. 1980.

APROVALE (Associação dos Produtores de Vinhos Finos do Vale dos Vinhedos). Disponível em: <www.valedosvinhedos.com.br>. Acesso em: 09 set. 2010.

ÁRAGO. Disponível em: <www.arago.com.br>. Acesso em: 05 jun. 2010.

ARSEGO, J. L. **Composição polifenólica de vinhos *Bordô, Isabel, Seyve Villard e Niágara Branca*, produzidos no alto Vale do Rio do Peixe-SC**. Florianópolis: UFSC, 2004. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais), Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

ÁVILA, H.; SMANIA, E.; MONACHE, F.; SMANIA JUNIOR, A. Structure-activity relationship of antibacterial chalcones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16: p. 9790- 9794, 2008.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.

BAXTER, R. A. Anti-aging properties of resveratrol: review and report of a potent new antioxidant skin care formulation. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 7, p. 2-7, 2008.

BAYDAR, N.G.; ÖZKAN, G.; SAĞDIÇ, O. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. **Food Control**, v. 15, p. 335-339, 2004.

BAYDAR, N. G.; ÖZKAN, G.; YAŞAR, S. Evaluation of the antiradical and antioxidant potential of grape extracts. **Food Control**, v. 18, p.1131-1136, 2007.

BERNA, A.; CHÁFER, A.; MONTÓN, J. B. High-pressure solubility data of the system resveratrol (3) + ethanol (2) + CO₂ (1). **Journal of Supercritical Fluids**, v. 19, p. 133-139, 2001.

BEVERIDGE, T. H. J.; GIRARD, B.; KOPP, T.; DROVER, J. C. G. Yield and Composition of Grape Seed Oils Extracted by Supercritical Carbon Dioxide and Petroleum Ether: Varietal Effects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v, 53, p. 1799-1804, 2005.

BISCAIA, D. **Comparação entre tecnologia supercrítica e técnicas convencionais de extração para obtenção de extratos de própolis avaliados através de suas atividades biológicas**. Florianópolis: UFSC, 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

BONILLA, F.; MAYEN, M.; MERIDA, J.; MEDINA, M. Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidants. **Food Chemistry**, v. 66, p. 209-215, 1999.

BOUSSAADA, O.; AMMAR, S.; SAIDANA, D.; CHRIAA, J.; CHRAIF, I.; DAAMI, M.; HELAL, A. N.; MIGHRI, Z., 2008. Chemical composition and antimicrobial activity of volatile components from capitula and aerial parts of *Rhaponticum acaule* D. C. growing wild in Tunisia. **Microbiological Research**, v, 163, p. 87-95.

BRUNNER, G. Gas extraction: An introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation process. **Darmstadt: Steinkopff**, v. 4, p. 387, 1994.

BRUNNER, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. **Journal of Food Engineering**, v. 67, p. 21-33, 2005.

BYERS, J. Available at. Disponível em:
<www.chemical-ecology.net/java/solvents.htm>. Acesso em: 10 set. 2008.

CAMPOS, L. M. A. S. **Obtenção de extratos de bagaço de uva Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera*):** parâmetros de processo e modelagem matemática. Florianópolis: UFSC, 2005. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

CAMPOS, L. M. A. S.; MICHIELIN, E. M. Z.; DANIELSKI, L.; FERREIRA, S. R. S.
Experimental data and modeling the supercritical fluid extraction of marigold (*Calendula officinalis*) oleoresin. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 34, p. 163-170, 2005.

CAMPOS, L. M. A. S., LEIMANN, F. V., PEDROSA, R. C., FERREIRA, S. R. S. Free radical scavenging of grape pomace extracts from *Cabernet sauvignon* (*Vitis vinifera*). **Bioresource Technology**, v. 99, p. 8413-8420, 2008.

CAO, X.; ITO, Y. Supercritical fluid extraction of grape seed oil and subsequent separation of free fatty acids by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1021, p. 117-124, 2003.

CARPEVINUM. Disponível em: <www.carpevinum.com.br>. Acesso em: 29 mai. 2010.

CASAS, L.; MANTELL, C.; RODRÍGUEZ, M.; TORRES, A.; MACÍAS, F. A.; DE LA OSSA, E. M. Effect of the addition of cosolvent on the supercritical fluid extraction of bioactive compounds from *Helianthus annuus* L. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 41, p. 43-49, 2007.

CASTRO, M. D. L.; GARCÍA-AYUSO, L. E. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. **Analytica Chimica Acta**, v. 369, p. 1-10, 1998.

CASTRO, M. D. L.; PRIEGO-CAPOTE, F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2383-2389, 2010.

CHAN, M. M. Y. Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin. **Biochemical Pharmacology**, v. 63, p. 99-104, 2002.

CORRALES, M.; TOEPFL, S.; BUTZ, P.; KNORR, D.; TAUSCHER, B. Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v, 9, p. 85-91, 2008.

CORREIA, J.; MICHIELIN, E. M. Z.; FERREIRA, S. R. S. (2006). **Estudo de modelos de transferência de massa para processos de extração supercrítica**. Relatório científico início (PIBIC-CNPQ) Departamento de Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

CORREIO RIOGRANDENSE. Caxias do Sul, ed. 4907. **Pesquisa indica uso de resíduo de uva (2004)**. Disponível em: <<http://www.esteditora.com.br/correio/4907/4907.htm>>. Acesso em: 02 dez. 2008.

CORTESI, A.; KIKIC, I.; ALESSI, P.; TURTOI, G.; GARNIER, S. Effect of chemical structure on the solubility of antioxidants in supercritical carbon dioxide: experimental data and correlation. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 14, p. 139-144, 1999.

CRANK, J. **The Mathematics of Diffusion**: second edn., Claredon Press, Oxford, 85 p, 1975.

DANIELSKI, L. **Solubilidade das Oleoresinas de Calêndula (*Calendula officinalis* L) e Cavalinha (*Equisetum arvense*) em CO₂ supercrítico**. Florianópolis, 2002. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos. Departamento de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.

DANIELSKI, L.; ZETZL, C.; HENSE, H.; BRUNNER, G. A process line for the production of raffinated rice oil from rice bran. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 34, p. 133-141, 2005.

DANIELSKI, L.; CAMPOS, L. M. A. S.; BRESCIANI, L. F.V.; HENSE, H.; YUNES, R. A.; FERREIRA, S. R. S. 2007. Marigold (*Calendula officinalis* L.) oleoresin: Solubility in SC-CO₂ and composition profile. **Chemical Engineering and Processing**, v. 46, p. 99-106.

DAROCH, F.; HOENEISEN, M.; GONZALEZ, C.L.; KAWAGUCHI, F.; SALGADO, F.; SOLAR, H.; GARCIA, A. *In vitro* antibacterial activity of Chilean red wines against *Helicobacter pylori*. **Microbios**, v. 104: p. 79-85, 2001.

DAVID, J. M. P.; DAVID, J. P.; SANTOS, V. L. C. S.; SANTOS, M. L. S.; MOTA, M. D. Resveratrol: Ações e Benefícios à Saúde Humana. **Diálogos & Ciência**, ano V, n. 10, ISSN1678-0493, 2007.

DEL VALLE, J. M.; GERMAIN, J. C.; UQUICHE, E.; ZETZL, C.; BRUNNER, G. Microstructural effects on internal mass transfer of lipids in prepressed and flaked vegetable substrates. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 37, p. 178-190, 2006.

DÍAZ-REINOSO, B.; MOURE, A.; DOMÍNGUES, H.; PARAJÓ, J. C. Supercritical CO₂ extraction and purification of compounds with antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 2441-2469, 2006.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

DUARTE, M. C. T.; LEME, E. E.; DELARMELENA, C.; SOARES, A. A., FIGUEIRA, G. M., SARTORATTO, A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 197-201, 2007.

EMBRAPA. Uva e Vinho. **Publicações: “Atuação do Brasil no Mercado Vitivinícola Mundial: Panorama 2007”**. “Área e produção de uvas: panorama mundial”, “Vitivinicultura brasileira: Panorama 2009”. Acesso em: 12 jun. 2010.

ENGESOLUTIONS. Disponível em:
<<http://www.engesolutions.com.br/artigosnews/folder%20sonochemi.pdf>>. Acesso em: 26 set. 2010.

ESQUÍVEL, M. M.; BERNARDO-GIL, M. G.; KING, M. B. Mathematical models for supercritical extraction of olive husk oil. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 16, p. 43-58, 1999.

FAMUYIWA, O. O.; OUGH, C. S. Effect of Structural Constituents of Cell Wall on the Digestibility of Grape Pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, n. 4, 1990.

FERREIRA, S. R. S.; NIKOLOV, Z. L.; DORAISWAMY, L. K.; MEIRELES, M. A. A.; PETENATE, A. J. Supercritical fluid

extraction of black pepper (*Piper nigrum L.*) essential oil. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 14, p. 235-45, 1999.

FERREIRA, S. R. S.; MEIRELES, M. A. A. Modeling the supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper Nigrum L.*) essential oil. **Journal of Food Engineering**, v. 54, p. 263-269, 2002.

FILIP, V.; PLOCKOVÁ, M.; ŠMIDRKAL, J.; ŠPICKOVÁ, Z.; MELZUCH, K.; SCHMIDT, Š. Resveratrol and its antioxidant and antimicrobial effectiveness. **Food Chemistry**, v. 83, p. 585-593, 2003.

FIORI, L. Grape seed oil supercritical extraction kinetic and solubility data: Critical approach and modeling. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 43, p. 43-54, 2007.

FLORIS, T.; FILIPPINO, G.; SCRUGLIA, S.; PINNA, M. B.; ARGOLAS, F.; MURRU, M.; REVERCHON, E. Antioxidant compounds recovery from grape residues by a supercritical antisolvent assisted process. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 54, p. 165-170, 2010.

FREITAS, L. S. **Desenvolvimento de Procedimentos de Extração do Óleo de Semente de Uva e Caracterização Química dos Compostos Extraídos**. Tese de Doutorado. Instituto de Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre/RS, 2007.

GALATO, D. **Correlação entre os dados eletroquímicos, fotométricos e de cálculos teóricos obtidos para avaliar a**

atividade antioxidante *in vitro* de compostos fenólicos. Florianópolis, 2004. Tese de Doutorado em Química. Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

GASPAR, F.; LU, T.; SANTOS, B.; AL-DURIN, B. Modeling the extraction of essential oils with compressed carbon dioxide, **Journal of Supercritical Fluids**, v. 25, p. 247-260, 2003.

GÓMEZ, A. M.; OSSA, E. M. Quality of borage seed oil extracted by liquid and supercritical carbon dioxide. **Chemical Engineering Journal**, v. 88, p. 103-109, 2002.

GÓMEZ-MÍGUEZ, M.; GONZÁLEZ-MIRET, M. L.; HEREDIA, F. H. Evolution of colour and anthocyanin composition of *Syrah* wines elaborated with pre-fermentative cold maceration. **Journal of Food Engineering**, v. 79, p. 271-278, 2007.

GOMIDE, R. (1983). Operações com sistemas sólidos granulares, v. 1, **Catalogation of Brazilian Chamber Publication Book**, São Paulo, Brazil.

GONZÁLEZ-BARÓ, A. C.; PARAJÓN-COSTA, B. S.; FRANCA, C. A.; PIS-DIEZ, R. Theoretical and spectroscopic study of vanillic acid. **Journal of Molecular Structure**, v. 889, p. 204-210, 2008.

HOLLENDER, J.; SHNEINE, J.; DOTT, W.; HEINZEL, M.; HAGEMANN, H. W.; GOTZ, G. K. E. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted soils with binary and ternary

supercritical phases. **Journal of Chromatography**, v. 776, p. 233-43, 1997.

HOLLMAN, P. C. H.; ARTS, I. C. W. Flavonols, flavones and flavanols – nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 7, p. 1081-1093, 2000.

HOU, D.X. Potential mechanisms of cancer chemoprevention by anthocyanins. **Current Molecular Medicine**, v. 3(2), p. 149-159, 2003.

JAYAPRAKASHA, G. K.; SINGH, R. P.; SAKARIAH, K. K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. **Food Chemistry**, v. 73, p. 285-290, 2001.

JEANDET, P.; BESSIS, R.; GAUTHERON, B. The production of resveratrol (3, 5, 4 -trihydroxystilbene) by grape berries in different developmental stages. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 42, p. 41-46, 1991.

JEANDET, P.; DOUILLET-BREUIL, A-C.; BESSIS, R.; DEBORD, S.; SBAGHI, M.; ADRIAN, M. Phytoalexins from the Vitaceae: Biosynthesis, Phytoalexin Gene Expression in Transgenic Plants, Antifungal Activity, and Metabolism. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2731-2741, 2002.

JOUYBAN, A.; CHAN, H-K.; FOSTER, N. R. Mathematical representation of solute solubility in supercritical carbon dioxide

using empirical expressions. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 24, p. 19-35, 2002.

JU, Z. Y.; HOWARD, L. R. Effects of Solvent and Temperature on Pressurized Liquid Extraction of Anthocyanins and Total Phenolics from Dried Red Grape Skin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 5207-5213, 2003.

JU, Z.; HOWARD, L. R. Subcritical Water and Sulfured Water Extraction of anthocyanins and other phenolics from dried red grape skin. **Journal Food Science**, v. 70, p. S270-S276, 2006.

KAMMERER, D.; CLAUS, A.; CARLE, R.; SCHIEBER, A. Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4360-4367, 2004.

KANG, S-Y.; SEERAM, N.P.; NAIR, M.G.; BOURQUIN, L.D. Tart cherry anthocyanins inhibit tumor development in Apc^{Min} mice and reduce proliferation of human colon cancer cells. **Cancer Letters**, v. 194, p. 13-19, 2003.

KANG, Y. H.; PARKER, C. C.; SMITH, A. C.; WALDRON, K. W. Characterization and Distribution of Phenolics in Carrot Cell Walls. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 8558-8564, 2008.

KATALINIĆ, V.; MOŽINA, S. S.; SKROZA, D.; GENERALIĆ, I.; ABRAMOVIĆ, H.; MILOŠ, M.; LJUBENKOV, I.; PISKERNIK, S.; PEZO, I.; TERPINC, P.; BOBAN, M. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin

extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). **Food Chemistry**, v. 119, p. 715-723, 2010.

KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 36, n. 7, p. 703-25, 2001.

KLANČNIK, A.; GUZEI, B.; KOLAR, M. H.; ABRAMOVIČ, H.; MOŽINA, S. S. *In Vitro* Antimicrobial and Antioxidant Activity of Commercial Rosemary Extract Formulations. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 8, p. 1744-1752, .aug. 2009.

KITZBERGER, C. S. G.; SMÂNIA JR, A.; PEDROSA, R. C.; FERREIRA, S. R. S. Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 631-638, 2007.

KITZBERGER, C. S. G.; LOMONACO, R. H.; MICHIELIN, E. M. Z.; DANIELSKI, L.; CORREIA, J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction of shiitake oil: Curve modeling and extract composition. **Journal of Food Engineering**, v. 90, p. 35-43, 2009.

LAMUELA-RAVENTÓS, R. M.; ROMERO-PÉREZ, A. I.; WATERHOUSE, A. L.; TORRE-BORONATT, M. C. Direct HPLC Analysis of *cis*- and *trans*-Resveratrol and Piceid Isomers in Spanish Red *Vitis vinifera* Wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 281-283, 1995.

LARRAURI, J. A.; RUPEREZ, P.; SAURA CALIXTO, F. Antioxidant activity of wine pomace. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 47, p. 369-372, 1996.

LAZARINI, F. C.; FALCÃO, T. 1999. Disponível em: <www.ufrgs.br/alimentus/feira/prfruta/vinhotin/pflux.htm>. Acesso em: 29 jun. 2010.

LI, H.; PORDESIMO, L.; WEISS, J. High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans. **Food Research International**, v. 37, p. 731-738, 2004.

LILA, M.A. Anthocyanins and human health: an *in vitro* investigative approach. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 5, p. 306-313, 2004.

LÓPEZ, M.; ARCE, L.; GARRIDO, J.; RÍOS, A.; VALCÁRCEL, M. Selective extraction of astaxanthin from crustaceans by use of supercritical carbon dioxide. **Talanta**, v. 64, n. 3, p. 726-731, 2004.

LOULI, V.; RAGOSSIS, N.; MAGOULAS, K. Recovery of phenolic antioxidants from wine industry by-products. **Bioresource Technology**, v. 92, n. 2, p. 201-208, 2004.

LUQUE-GARCÍA, J. L.; CASTRO, M. D. L. Ultrasound: a powerful tool for leaching. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 41-47, 2003.

LUQUE-RODRÍGUEZ, J. M.; CASTRO, M. D. L.; PÉREZ-JUAN, P. Dynamic superheated liquid extraction of anthocyanins and other phenolics from red grape skins of winemaking residues. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2705–2713, 2007.

LUTHER, M.; PARRY, J.; MOORE, J.; MEMG, J.; ZHANG, Y.; CHENG, Z.; YU, L. Inhibitory effect of *Chardonnay* and black raspberry seed extracts on lipid oxidation in fish oil and their radical scavenging and antimicrobial properties. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1065-1073, 2007.

MA, Y.; YE, X.; FANG, Z.; CHEN, J.; XU, G.; LIU, D. Phenolic compounds and antioxidant activity of extracts from ultrasonic treatment of Sastsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc) peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 5682-5690, 2008.

MAIER, T.; SCHIEBER, A.; KAMMERER, D. R.; CARLE, R. Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v. 112, p. 551-559, 2009.

MARINOVA, E. M.; YANISHLIEVA, N. V. Antioxidant activity and mechanism of action of some phenolic acids at ambient and high temperatures. **Food Chemistry**, v. 81, p. 189-197, 2003.

MARKOM, M.; HASAN, M.; DAUD, W. R.; SING, H.; JAHIM, J. M. Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.: Effects of solvents and extraction methods. **Separation and Purification Technology**, v. 52, p. 487-96, 2007.

MARTÍNEZ, J.; MONTEIRO, A. R.; ROSA, P. T. V.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. A. Multicomponent model to describe extraction of ginger oleoresin with supercritical carbon dioxide. **Industrial Engineering of Chemistry Research**, v. 42, p. 1057-1063, 2003.

MARTÍNEZ, J. **Extração de óleos voláteis e outros compostos com CO₂ supercrítico: desenvolvimento de uma metodologia de aumento de escala a partir da modelagem matemática do processo e avaliação dos extratos obtidos**. Campinas: UNICAMP, 2005. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2005.

MATTHÄUS, B. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 12, p. 3444-3452, 2002.

MELECCHI, M. I. S. **Caracterização química de extratos de *Hibiscus tiliaceus* L: Estudo comparativo de métodos de extração**. Porto Alegre: UFRGS, 2005. Tese (Doutorado em Química), Instituto de Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 127-130, 2001.

MEZZOMO, N. **Óleo de amêndoa de pêssigo: avaliação da técnica de extração, da qualidade dos extratos e parâmetros**

para ampliação de escala. Florianópolis: UFSC, 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

MEZZOMO, N.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus pérsica*) almond oil: Kinetics, mathematical modeling and scale-up. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 51, p. 10-60, 2009.

MEZZOMO, N.; MILEO, B. R.; FRIEDRICH, M. T.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: Process yield and extract composition. **Bioresource Technology**, v.101, n. 14, p. 5622-5632, 2010.

MICHIELIN, E. M. Z.; BRESCIANI, L. F. V.; DANIELSKI, L.; YUNES, R. A.; FERREIRA, S. R. S. Composition profile of horsetail (*Equisetum giganteum* L.) oleoresin: comparing SFE and organic solvents extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 33, p. 131-8, 2005.

MICHIELIN, E. M. Z. **Obtenção de extrato de erva baleeira (*Cordia verbenacea* D.C.) por diferentes técnicas: medida da atividade biológica, modelagem matemática e determinação do equilíbrio de fases.** Florianópolis: UFSC, 2009. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.

MICHIELIN, E. M. Z.; SALVADOR, A. A.; RIEHL, C. A. S.; SMÂNIA JR, A.; SMÂNIA, E. F. A.; FERREIRA, S. R. S.

Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6615-6623, 2009.

MONRAD, J. K.; HOWARD, L. R.; KING, J. W.; SRINIVAS, K.; MAUROMOUSTAKOS, A. Subcritical Solvent Extraction of Procyanidins from Dried Red Grape Pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 4014-4021, 2010.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 6. ed. USA: John Wiley & Sons, Inc., 2005. 643p.

MORAIS, E. C.; STEFANUTO, A.; KLEIN, G. A.; BOAVENTURA, B. C. B.; ANDRADE, F.; WAZLAWIK, E.; DI PIETRO, P. F.; MARASCHIN, M.; SILVA, E. L. Consumption of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Improves Serum Lipid Parameters in Healthy Dyslipidemic Subjects and Provides an Additional LDL-Cholesterol Reduction in Individuals on Statin Therapy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 8316-8324, 2009.

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria alimentícia**. São Paulo: Livraria Varela, 1998.

MOURA, M. S. B.; BRANDÃO, E. O.; SOARES, J. M.; DONOSO, C. D. S.; SOUSA, L. S. B. Exigência térmica e caracterização fenológica da videira *Syrah* no Vale do Rio São Francisco. **XV Congresso Brasileiro de Agrometeorologia**, 2007.

MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚNEZ, M. J.; PARAJO, J. C.

Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, p. 145-171, 2001.

MURGA, R.; RUIZ, R.; BELTRAN, S.; CABEZAS, J. L. Extraction of Natural Complex Phenols and Tannins from Grape Seeds by Using Supercritical Mixtures of Carbon Dioxide and Alcohol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3408-3412, 2000.

NAZ, S.; AHMAD, S.; RASOOL, S. A.; SAYEED, S. A.; SIDDIGI, R. Antibacterial activity directed isolation of compounds from *Onosma hispidum*. **Microbiological Research**, v. 161, p. 43-48, 2006.

NEGRO, C.; TOMMASI, L.; MICELI, A. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. **Bioresource Technology**, v. 87, p. 41-44, 2003.

ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DA UVA E DO VINHO. **Estatísticas 2006**. Disponível em: <www.oiv.org>. Acesso em: 19 set. 2009.

OROZCO-SOLANO, M.; RUIZ-JIMÉNEZ, J.; CASTRO, M. D. L. Ultrasound-assisted extraction and derivatization of sterols and fatty alcohols from olive leaves and drupes prior to determination by gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 1227-1235, 2010.

PALMA, M.; TAYLOR, L. T. Fractional extraction of compounds from grape seeds by supercritical fluid extraction and analysis for

antimicrobial and agrochemical activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 5044-5048, 1999.

PALMA, M.; TAYLOR, L. T. Extraction of polyphenolic compounds from grape seeds with near critical carbon dioxide. **Journal of Chromatography A**, v. 949, p. 117-124, 1999b.

PASSOS, C. P.; SILVA, R. M.; DA SILVA, F. A.; COIMBRA, M. A.; SILVA, C. M. Enhancement of the supercritical fluid extraction of grape seed oil by using enzymatically pre-treated seed. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 48, p. 225-229, 2009.

PAZOS, M.; ALONSO, A.; FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, J.; TORRES, J.L.; MEDINA, I. Physicochemical Properties of Natural Phenolics from Grapes and Olive Oil Byproducts and Their Antioxidant Activity in Frozen Horse Mackerel Fillets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 366-373, 2006.

PEREIRA, C. G.; MARQUES, M. O. M.; BARRETO, A. S.; SIANI, A. C.; FERNANDES, E. C.; MEIRELES, M. A. A. Extraction of índole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis* using supercritical CO₂ + ethanol: an evaluation of the process variables and the raw material origin. **Journal of Supercritical Fluids**. v. 30, n. 1, p. 51-61, 2004.

PERRUT, M. Supercritical Fluid Applications: Industrial development and economic issues. In: **Proceedings of the 2nd International Meeting on High Pressure Chemical Engineering**, 2001, Hamburg, Germany, CD-ROM, 2001.

PINELO, M.; DEL FABBRO, P.; MANZOCCO, L.; NÚÑEZ, M. J.; NICOLI, M.C. Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts. **Food Chemistry**, v. 92, p. 109-117, 2005.

PINELO, M.; SINEIRO, J.; NÚÑEZ, M. J. Mass transfer during continuous solid-liquid extraction of antioxidants from grape byproducts. **Journal of Food Engineering**, v. 77, p. 57-63, 2006.

PINELO, M.; RUIZ-RODRÍGUEZ, A.; SINEIRO, J.; SEÑORÁNS, F.J.; REGLERO, G.; NÚÑEZ, M. J. Supercritical fluid and solid-liquid extraction of phenolic antioxidants from grape pomace: a comparative study. **European Food Research and Technology**, v. 226, p.199-205, 2007.

PRESTA, M. A. **Determinação de flavonóides e resveratrol em vinho empregando cromatografia de fluxo turbulento-LC-MS**. Tese Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria/RS. 2008.

POURMORTAZAVI, S. M.; HAJIMIRSADEGHI, S. H. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. **Journal Chromatography A**, v. 1163, p. 2-24, 2007.

REVERCHON, E. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 10, n. 1, p. 1-37, 1997.

REVERCHON, E.; KAZIUNAS, A.; MARRONE, C. Supercritical CO₂ extraction of hiprose seed oil: experiments and mathematical modeling. **Chemical Engineering Science**, v. 55, p. 2195-2201, 2000.

REVERCHON, E.; MARRONE, C. Modeling and simulation of the supercritical CO₂ extraction of vegetable oils. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 19, p. 161-175, 2001.

REVERCHON, E.; DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, p. 146–66, 2006.

REVISTA ÉPOCA. Disponível em:
<<http://revistaepoca.globo.com/Revista/Epoca/0,,EMI153995-15201,00-A+GLORIA+DO+MERLOT+E+NOSSA.html>>. Acesso em: 09 set. 2010.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLER, A. Screening as methods for natural products with antimicrobial activity: Review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 23, p. 127-149, 1988.

RIZZON, L. A; MIELE, A. Avaliação da cv. *merlot* para elaboração de vinho tinto. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 23 (Supl):156-161, dez. 2003

ROCKENBACH, I. I. **Compostos fenólicos, ácidos graxos e capacidade antioxidante do bagaço da vinificação de uvas tintas (*Vitis vinifera L.* e *Vitis labrusca L.*)**. Florianópolis: UFSC, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

ROCKENBACH, I. I.; SILVA, G. L.; RODRIGUES, E.; KUSKOSKI, E.M.; FETT, R.; Influência do solvente no conteúdo

total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades *Tannat* e *Anceleta*; **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 28 (Supl.): 238-244, dez. 2008.

ROGINSKY, V.; LISSI, E.A. Review of Methods to Determine Chainbreaking Antioxidant Activity in Food. **Food Chemistry**, v. 92, p. 235-254, 2005.

RUBILAR, M.; PINELO, M.; SHENE, C.; SINEIRO, J.; NUÑEZ, M. J. Separation and HPLC-MS. Identification of Phenolic Antioxidants from Agricultural Residues: Almond Hulls and Grape Pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 10101-10109, 2007.

SALGIN, U. Extraction of jojoba seed oil using supercritical CO₂+ethanol mixture in green and high-tech separation process. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 39, p. 330-377, 2007.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. **Food Research International**, v. 32, p. 407-412, 1999.

SARMENTO, C. M. P. **Extração Supercrítica de Óleo de Farelo de Arroz e Obtenção de Frações Enriquecidas em Tocoferóis e Tocotrienóis**. Florianópolis, 2002. Tese de Mestrado em Engenharia de Alimentos - Departamento de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMEINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, São Paulo out./dez, 2004. ISSN 1517-8382.

SAUTTER, C. K. **Avaliação da presença de resveratrol em suco de uva**. Santa Maria: UFSM, 2003. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, 2003.

SAUTTER, C. K.; DENARDIN, S.; ALVES, A. O.; MALLMANN, C. A.; PENNA, N. G.; HECKTHEUER, L. H. Determinação de resveratrol em sucos de uva no brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 3, p. 437-442, jul.-set. 2005.

SILVA, D. C. M. N. **Determinação experimental de parâmetros de processo na extração supercrítica de óleo essencial de carqueja (*Baccharis trimera* Less)**. Florianópolis: UFSC, 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

SILVA, T. L.; BERNARDO, E. C.; NOBRE, B.; MENDES, R. L.; REIS, A. Extraction of *Victoria* and *Red Globe* grape seed oils using supercritical carbon dioxide with and without ethanol. **Journal of Food Lipids**, v. 15, p. 356-369, 2008.

SINGH, B.; BHAT, T. K.; SINGH, B. Potential Therapeutic Applications of Some Antinutritional Plant Secondary Metabolites. **Journal Agric. Food Chem.**, v. 51, p. 5579-5597, 2003.

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

SMÂNIA JR, A.; DELLE MONACHE, F.; SMÂNIA E. F. A.; GIL, M. L.; BENCHETRIT, L. C.; CRUZ, F. S. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. **Journal Ethnopharmacol**, v. 45, n. 3, p. 177-181, 1995.

SMÂNIA, E. F. A. **Esteróis e triterpenos isolados de espécies de *Ganoderma karsten* e sua atividade antimicrobiana.** Florianópolis: UFSC, 2003. Tese (Doutorado em Química Orgânica), Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

SMÂNIA, E. F. A.; MONACHE, F. D.; SMÂNIA JR, A.; YUNES, R. A.; CUNEO, R. S. Antifungal activity of sterols and triterpenes isolated from *Ganoderma annulare*. **Fitoterapia**, v. 74, p. 375-377, 2003.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. The Society for Applied Microbiology, **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p. 118-122.

SOUQUET, J. M.; CHEYNIER, V.; BROSSAUD, F.; MOUTOUNET, M. Polymeric Proanthocyanidins from grape skins. **Phytochemistry**, v. 43, n. 2, p. 509-512, 1996.

SOUQUET, J. M.; LABARBE, B.; LE GUERNEVÉ, C.; CHEYNIER, V.; MOUTOUNET, M. Phenolic Composition of Grape Stems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, 1076-1080, 2000.

SOUTO, A. H. A.; CARNEIRO, M. C.; SEFERIN, M.; SENNA, M. J. H.; CONZ, A.; GOBBI, K. Determination of *trans*-Resveratrol Concentrations in Brazilian Red Wines by HPLC. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, p. 441-445, 2001.

SOUZA, A. T.; CORAZZA, M. L.; CARDOZO-FILHO, L.; GUIRARDELLO, R.; MEIRELES, M. A. A. Phase Equilibrium Measurements for the System Clove (*Eugenia caryophyllus*) Oil + CO₂. **Journal Chemical Engineering Data**, v. 49, p. 352-356, 2004.

SOUZA FILHO, A. P. S.; SANTOS, R. A.; SANTOS, L. S.; GUILHON, G. M. P.; SANTOS, A. S.; ARRUDA, M. S. P.; MULLER, A. H.; ARRUDA, A. C. Potencial Alelopático de *Myrcia guianensis*. Planta Daninha, **Viçosa-MG**, v. 24, n. 4, p. 649-656, 2006.

SOVOVÁ, H. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂: I. Modelling of extraction curves. **Chemical Engineering Science**, v. 49, n. 3, p. 409-414, 1994.

SOVOVÁ, H.; KUCERA, J.; JEZ, J. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂: II. Extraction of grape oil. **Chemical Engineering Science**, v. 49, n. 3, p. 415-20, 1994.

SOVOVÁ, H.; ZAREVUCKA, M.; VACEK, M.; STRANSKY, K. Solubility of two vegetable oils in supercritical CO₂, **Journal Supercritical Fluids**, v. 20, p. 15, 2001.

SUN, J.; CHU, Y.; WU, X.; LIU, R. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 7449-7454, 2002.

TAN, C.; LIOU, D. Modeling of desorption at supercritical conditions. **American Institute of Chemical Engineers Journal**, v. 35, n. 6, p. 1029–1031. 1989.

TENA, M. T.; RÍOS, A.; VALCÁRCEL, M. (1998). Supercritical fluid extraction of *t*-resveratrol and other phenolics from a spiked solid. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 361, p. 143-148.

THIMOTHE, J.; BONSI, I. A.; PADILLA-ZAKOUR, O. I.; KOO, H. Chemical characterization of red wine grape (*Vitis vinifera* and *Vitis* interspecific hybrids) and Pomace Phenolic Extracts and Their Biological Activity against *Streptococcus mutans*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 55, p. 10200-10207, 2007.

TORRES, J. L.; VARELA, B.; GARCÍA, M. T.; CARILLA, J.; MATITO, C.; CENTELLES, J. J.; CASCANTE, M.; SORT, X.; BOBET, R. Valorization of grape (*Vitis vinifera*) byproducts: antioxidant and biological properties of polyphenolic fractions differing in procyanidin composition and flavonol content. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, p. 7548-7555, 2002.

TSUDA, T.; MIZUNO, K.; OHSHIMA, K.; KAWAKISHI, S.; OSAWAS, T. Supercritical Carbon Dioxide Extraction of

Antioxidative Components from Tamarind (*Tamarindus indica L.*) Seed Coat. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 43, p. 2803-2806, 1995.

ULTEE, A.; KETS, E.P.W.; SMID, E.J.. Mechanisms of actions of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 4606-4610, 1999.

UNIQUE. Disponível em:

<<http://www.unique.ind.br/desruptor.html>>. Acesso em: 28 set. 2010.

VALGAS, C.; SOUZA, S.M.; SMÂNIA, E.F .A.; SMÂNIA JR, A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 370-380, 2007.

VATAI, T.; SKERGET, M.; KNEZ, Z. Extraction of phenolic compounds from elder berry and different grape marc varieties using organic solvents and/or supercritical carbon dioxide. **Journal of Food Engineering**, v. 90, p. 246–254, 2009.

VELIOGLU, Y. S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B. D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 46, p. 4113-4117, 1998.

VERSARI, A.; BOULTON, R. B.; PARPINELLO, G. P. A comparison of analytical methods for measuring the color components of red wines. **Food Chemistry**, v. 106, p. 397-402, 2008.

VIEIRA, G. R. T. **Otimização das condições de cultivo de *Polyporus tricholoma* Mont. visando à produção de substâncias antibacterianas.** Florianópolis: UFSC, 2005. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

VITRAC, X.; BORNET, A.; VANDERLINDE, R.; VALLS, J.; RICHARD, T.; DELAUNAY, J-C.; MÉRILLON, J-M.; TEISSÉDRE, P-L. Determination of Stilbenes (δ -viniferin, *trans*-astringin, *trans*-piceid, *cis*- and *trans*-resveratrol, ϵ -viniferin) in Brazilian Wines. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, p. 5664-5669, 2005.

WANG, B. J.; LIEN, Y. H.; YU, Z. R. Supercritical fluid extractive fractionation – study of the antioxidant activities of propolis. **Food Chemistry**, v. 86, p. 237-243, 2004.

WANG, Y. S.; HE, H. P.; YANG, J. H.; DI, Y. T.; HAO, X. J. New Monoterpenoid Coumarins from *Clausena anisum-olens*. **Molecules**, v. 13, p. 931–937, 2008. ISSN 1420-3049.

WINEXPERTS. Disponível em:
<<http://winexperts.terra.com.br/arquivos/varietais04.html>>.
Acesso em: 19 set. 2009.

WINEPROS. Disponível em:
<http://www.winepros.org/wine101/grape_profiles>. Acesso em:
19 set. 2009.

YANG, J.; MARTINSON, T. E.; LIU, R. H. Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. **Food Chemistry**, v. 116, p. 332-339, 2009.

YILMAZ, Y.; TOLEDO, R. Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin and gallic acid. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 52, p. 255-260, 2004.

APÊNDICE A - MODELOS MATEMÁTICOS

A.1 Modelo difusional de Crank (1975)

O modelo de Crank (1975), apresentado por Reverchon (1997), considera a transferência de massa como uma analogia à transferência de calor. Para isso, estima que as substâncias a serem extraídas estão uniformemente distribuídas em partículas sólidas esféricas, que – como um corpo quente perde calor para o meio – liberam o soluto no solvente supercrítico com o tempo. No entanto, este modelo pode ser chamado de modelo difusional, pois considera que a transferência de massa se dá unicamente devido à difusão do soluto, contido no interior das partículas sólidas, para a fase supercrítica (CAMPOS, 2005; MEZZOMO, 2008; MICHIELIN, 2009; REVERCHON, 1997).

Resolvendo analiticamente o balanço de massa na parte interna da partícula e aplicando a segunda Lei de Fick para difusão, tem-se a Equação 10 que representa a massa de uma substância que se difunde através de uma partícula (MEZZOMO, 2008; MICHIELIN, 2009).

$$m_{ext} = m_0 \left[1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp\left(\frac{-n^2 \pi^2 D t}{r^2}\right) \right] \quad \text{Eq. 10}$$

onde t , é o tempo de extração (min); m_{ext} é a massa de extrato (kg) no tempo t ; m_0 , é a massa inicial de soluto (kg); n é um número inteiro; $D=D_{AB}$, é o coeficiente de difusão, um parâmetro ajustável do modelo (m^2/min) e r , é o raio da partícula sólida (m) (MEZZOMO, 2008).

A.2 Modelo de Dessorção de Tan e Liou (1989)

O modelo de dessorção apresentado por Tan e Liou (1989) é baseado no balanço de massa do processo considerando apenas o termo convectivo sem o termo de dispersão. Este modelo considera a transferência de massa interfacial como um modelo cinético de primeira ordem, ou seja, a taxa de extração é proporcional à concentração de soluto na fase sólida, sendo a transferência de massa interfacial representada pela constante de dessorção (k_d). O modelo de dessorção considera a unidade de extração como um leito cilíndrico no qual o sólido, devidamente pré-tratado (seco e moído), é acomodado; e o solvente, com pressão e temperatura fixas flui axialmente através do leito, retirando do sólido os compostos de interesse. Dessa forma, na saída do leito, tem-se o extrato, formado pelos compostos solubilizados no CO_2 supercrítico (MARTÍNEZ, 2005).

A massa de extrato na saída do extrator em função do tempo de extração é representada pela Equação 11.

$$m_{\text{ext}}(t = H, t) = \frac{A}{k_d} [1 - \exp(k_d B)]. [\exp(-k_d t) - 1] \quad \text{Eq. 11}$$

Sendo:

$$A = Q_{\text{CO}_2} \frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} X_0 \frac{\rho_s}{\rho} \quad \text{Eq. 12}$$

$$B = \frac{\varepsilon H}{u} = \frac{\varepsilon H S \rho_f}{Q_{\text{CO}_2}} \quad \text{Eq. 13}$$

onde k_d é a constante de dessorção, H é o comprimento do leito (m), S é a área da seção transversal (m^2), ρ_s é a densidade do sólido (kg/m^3), ρ_f é a densidade da fase fluida (kg/m^3), ε é a porosidade do leito.

A.3 Modelo de Esquível et al. (1999)

Esquível et al. (1999) realizaram simulações das curvas de extração de cascas de azeitonas e se basearam na equação da cinética do crescimento de microrganismos de Monod para descrever as curvas globais de extração. A equação empírica que representa a curva de extração está apresentada na Equação 14.

$$m_{\text{ext}}(t) = x_0 M \left(\frac{t}{b + t} \right) \quad \text{Eq. 14}$$

onde $m_{\text{ext}}(t)$ é a massa de extrato em função do tempo (kg); t é o tempo de extração (min); M é a massa de matéria-prima (kg); x_0 é a razão mássica de extrato na matéria-prima (kg/kg) e b é um parâmetro ajustável (min) (MEZZOMO, 2008).

A.4 Modelo de Placa (SSP) proposto por Gaspar et al. (2003)

O modelo de placa, proposto por Gaspar et al. (2003) considera a transferência de massa como uma analogia à transferência de calor assim como o modelo proposto por Crank (1975) e também é um modelo difusional. A diferença entre estes dois modelos está na geometria considerada em cada modelo, ou seja, no modelo SSP as partículas sólidas são consideradas como placas, enquanto que no modelo de difusão as partículas são consideradas esféricas. O modelo SSP ainda assume que a concentração de soluto na fase fluida é desprezível quando comparada à concentração na fase sólida, que a resistência à transferência de massa na fase fluida é desprezada e que o balanço de massa na fase fluida é negligenciado (CAMPOS, 2005; MEZZOMO, 2008).

Ao se aplicar a segunda Lei de Fick para a difusão e resolvendo analiticamente o balanço de massa na parte interna

da partícula, a massa de extrato obtida com o tempo é representada pela Equação 15 proposta por Gaspar et al. (2003), com modificação apresentada por Campos et al. (2005).

$$m_{\text{ext}} = m_0 \left[1 - \sum_0^{\infty} \frac{0,8}{(2n+1)^2} \exp\left(\frac{-D_m (2n+1)^2 \pi^2 t}{\delta^2}\right) \right] \quad \text{Eq. 15}$$

onde m_{ext} é a massa de extrato (kg); m_0 é a massa inicial de soluto (kg); D_m é a difusividade na matriz sólida (m^2/min); t é o tempo (min); δ é a meia espessura das partículas (placas) (m) e n é um número inteiro (MEZZOMO, 2008).

A.5 Modelo logístico de Martínez et al. (2003)

Como os extratos de plantas, geralmente, são misturas de vários compostos, o modelo logístico de Martínez et al. (2003) leva em conta a variação da composição do extrato ao longo da extração, de forma a otimizar o processo para a obtenção dos compostos de interesse. Para isso, divide o extrato em grupos de componentes com estrutura química similar.

O modelo é baseado no balanço de massa do leito de extração, considerando o leito como um cilindro de comprimento H muito maior que o diâmetro, cujo volume está completamente preenchido por ambas as fases envolvidas no processo (sólida e fluida), no qual o solvente escoar na direção axial com velocidade U e as condições de temperatura, pressão e as propriedades físicas de ambas as fases são mantidas constantes durante toda a extração. O acúmulo e a dispersão na fase fluida são negligenciados por estes fenômenos não apresentarem influência significativa no processo quando comparado ao efeito de convecção (MARTÍNEZ et al., 2003; MICHIELIN, 2009).

Em princípio, o modelo logístico possui, para cada grupo de compostos, três parâmetros ajustáveis: A_i , b_i e t_{mi} . Se a composição do óleo tiver sido determinada experimentalmente, é

possível obter o valor aproximado da massa total de cada grupo de compostos, conforme apresentado na Equação 16. Desta forma, o modelo pode ser reduzido a dois parâmetros ajustáveis, b e t_m , e a massa de cada grupo de compostos representada pela Equação 17.

$$m_{ti} = \frac{\%m_t}{100} = x_{0i}m_t \quad \text{Eq. 16}$$

$$m_i(h = H, t) = \frac{x_{0i}m_t}{\exp(b_i t_{mi})} \left\{ \frac{1 + \exp(b_i t_{mi})}{1 + \exp[b_i(t_{mi} - t)]} - 1 \right\} \quad \text{Eq. 17}$$

onde m_t é a massa total de sólidos extraível (kg); x_0 é a razão mássica inicial de soluto extraível (kg/kg) e m_{ti} é a massa total de cada grupo de composto (kg) (MICHIELIN, 2009).

A Equação 18 representa a curva de extração obtida pelo modelo de Martínez et al. (2003) para um único grupo de componentes.

$$m_{Ext}(h = H, t) = \frac{m_t}{\exp(bt_m)} \left\{ \frac{1 + \exp(bt_m)}{1 + \exp[b(t_m - t)]} - 1 \right\} \quad \text{Eq. 18}$$

onde h é uma coordenada axial (m); H é o comprimento total do leito (m); m_{Ext} é a massa de óleo extraído (kg); m_t é a massa total extraível de sólido no leito (kg); t é o tempo de extração (min), b e t_m são parâmetros ajustáveis do modelo (min^{-1} e min, respectivamente), sendo que o parâmetro t_m corresponde ao instante em que a taxa de extração de cada grupo de compostos ou um único pseudocomposto alcançou o máximo (MEZZOMO, 2008; MICHIELIN, 2009).

A.6 Modelo de Sovová (1994)

Sovová (1994) propôs um modelo baseado na hipótese de que a parte interna da matriz vegetal é formada por células, que contêm o soluto. Como resultado da moagem, as células localizadas na superfície das partículas estão rompidas, tornando parte do soluto exposto ao solvente, enquanto a estrutura interna permanece intacta, o que explicaria a repentina redução na taxa de extração normalmente observada durante processos de extração com fluido supercrítico. Aplicado principalmente no caso de sementes, esse modelo foi um dos primeiros a introduzir uma descrição da estrutura da matriz na modelagem matemática (MEZZOMO, 2008; REVERCHON et al., 2000; REVERCHON e DE MARCO, 2006).

A estrutura das sementes, de um modo geral, é formada por celulose e lignina. Esta última é um polímero natural bastante compacto, com um grau de polimerização maior que a celulose. Assim, a lignina é praticamente inacessível ao fluido supercrítico e seu conteúdo, que varia em cada tipo de semente, pode influenciar a resistência à transferência de massa, ou seja, a resistência interna à transferência de massa aumenta com o conteúdo de lignina da semente. A existência de estruturas formadas pela lignina pode explicar também o menor rendimento da extração com partículas maiores, uma vez que, nestas partículas, a estrutura da lignina pode não ter sido destruída pela moagem e a parte interna da partícula pode não estar acessível ao solvente (REVERCHON e MARRONE, 2001).

Também conhecido como modelo das células rompidas e intactas, baseia-se em balanços de massa que consideram o escoamento axial do solvente com velocidade superficial através de um leito fixo de seção transversal cilíndrica. Admite também que, na entrada do extrator, o solvente está livre de soluto, negligenciando seu acúmulo na fase fluida durante a extração, e a temperatura e pressão de operação são mantidas constantes.

O tamanho das partículas e a distribuição do soluto no interior do sólido são considerados homogêneos (CAMPOS, 2005; FERREIRA e MEIRELES, 2002; REVERCHON et al., 2000).

Esse modelo emprega o coeficiente de transferência de massa da fase fluida para descrever o período de taxa de extração constante (CER) e o da fase sólida para descrever a etapa na qual a resistência à transferência de massa é dominada pela difusão. Nesse modelo, o perfil da concentração do soluto na fase fluida é dividido em três etapas: (a) a primeira etapa considera que o soluto de fácil acesso (x_p), disponível na superfície das partículas sólidas, vai se esgotando ao longo do leito, chamada etapa CER (taxa de extração constante); (b) na segunda etapa, inicia-se a extração do soluto de difícil acesso, chamado etapa FER (taxa de extração decrescente); (c) na terceira etapa, são retirados os solutos de difícil acesso (x_k) presentes no interior das partículas sólidas, e esta é denominada etapa difusional e controlada pela resistência interna à transferência de massa (CAMPOS, 2005; MEZZOMO, 2008).

A curva de extração obtida pelo modelo de Sovová (1994) é representada pelas Equações 19, 20 e 21, com a massa total de extrato obtida na saída do extrator, em função do tempo.

Para $t < t_{CER}$: período de taxa constante de extração (CER)

$$m_{ext} = Y^* [1 - \exp(-Z)] Q_{CO_2} t \quad \text{Eq. 19}$$

Para $t_{CER} \leq t < t_{FER}$: período de taxa decrescente de extração (FER)

$$m_{ext} = Y^* [t - t_{CER} \exp(Z_W - Z)] Q_{CO_2} \quad \text{Eq. 20}$$

Para $t \geq t_{FER}$: período controlado pela difusão

$$m_{ext} = N \left(x_n - \frac{Y^*}{W} \ln \left\{ 1 + \left[\exp\left(\frac{WX_n}{Y^*}\right) - 1 \right] \exp\left[\left(\frac{WQ_{CO_2}}{N}\right)(t_{FER} - t)\right] \frac{x_n}{x_0} \right\} \right) \quad \text{Eq. 21}$$

onde m_{ext} é a massa de extrato (kg); t_{CER} é a duração da etapa constante de extração (min); t_{FER} é o período de taxa decrescente de extração (min); N é a massa de matéria-prima

livre de soluto (kg); Y^* é a solubilidade (kg/kg); Q_{CO_2} é a vazão média do solvente (kg/min); x_0 é a razão mássica inicial de soluto na fase sólida (kg/kg); x_k é a razão mássica de soluto no interior de células intactas (kg/kg) e W é um parâmetro para o período de taxa de extração lenta (MICHIELIN, 2009).

Nas equações do modelo de Sovová pode-se dizer que a quantidade Z , apresentada na Equação 22, é um parâmetro para o período CER porque essa quantidade (Z) é diretamente proporcional ao coeficiente de transferência de massa na fase fluida (k_{Ya}) e este coeficiente controla a taxa de extração no período CER.

$$Z = \frac{N k_{Ya} \rho_{CO_2}}{Q_{CO_2} (1 - \epsilon) \rho_s} \quad \text{Eq. 22}$$

onde ρ_{CO_2} é a densidade do solvente (kg/m³) e ρ_s é a densidade das partículas sólidas (kg/m³).

Para a resolução do modelo de Sovová (1994), é necessário conhecer alguns parâmetros: M_{CER} , taxa de extração na etapa CER (kg/min); Y_{CER} , razão mássica do soluto na fase supercrítica na saída da coluna na etapa CER (kg_{Extrato}/kg_{CO₂}); t_{CER} , duração da etapa CER (min) (CAMPOS, 2005). O parâmetro M_{CER} é o valor da tangente ao período CER e, a partir dele, obtêm-se o valor de Y_{CER} através da Equação 23.

$$Y_{CER} = \frac{M_{CER}}{Q_{CO_2}} \quad \text{Eq. 23}$$

As demais restrições e definições são descritas pelas Equações 24 a 27:

$$t_{CER} = \frac{x_0 - x_k}{Y^* Z} \cdot \frac{N}{Q_{CO_2}} \quad \text{Eq. 24}$$

$$W = \frac{N k_{Ya}}{Q_{CO_2} (1 - \epsilon)} = k \frac{Z Y^*}{x_k} \quad \text{Eq. 25}$$

$$\frac{z_w}{Z} = \frac{Y^*}{Wx_0} \ln \left\{ \frac{x_0 \cdot \exp \left[\left(\frac{WQ_{CO_2}}{N} \right) (t - t_{CER}) - x_k \right]}{x_0 - x_k} \right\} \quad \text{Eq. 26}$$

$$t_{PER} = t_{CER} + \frac{N}{Q_{CO_2}} \ln \left[\frac{x_k + (x_0 - x_k) \exp(Wx_0/Y^*)}{x_0} \right] \quad \text{Eq. 27}$$

Os parâmetros k_{Xa} e k_{Ya} são, respectivamente, os coeficientes de transferência de massa na fase fluida e fase sólida (min^{-1}), e são definidos pelas Equações 28 a 32:

$$k_{Ya} = \frac{M_{CER}}{\rho_{CO_2} S H \overline{\Delta Y}} \quad \text{Eq. 28}$$

$$k_{Xa} = \frac{k_{Ya} \rho_{CO_2} \overline{\Delta Y}}{\rho_s \Delta X} \quad \text{Eq. 29}$$

$$\Delta X = \frac{(x_p + x_k)}{2} \quad \text{Eq. 30}$$

$$x_p = x_0 + x_k \quad \text{Eq. 31}$$

$$\overline{\Delta Y} = \frac{Y_{CER}}{\ln \left(\frac{Y^*}{Y^* - Y_{CER}} \right)} \quad \text{Eq. 32}$$

onde ρ_{CO_2} é a densidade do solvente (kg/m^3), S é a área de seção transversal do leito (m^2), H é o comprimento do leito (m), $\overline{\Delta Y}$ é a média logarítmica para a razão mássica de soluto na fase fluida (kg/kg) e ΔX é a média aritmética da razão mássica de soluto na fase sólida (kg/kg) (MICHIELIN, 2009).

APÊNDICE B - DADOS EXPERIMENTAIS DA CURVA DE EXTRAÇÃO

Tabela 21 - Tempos de extração, massas, massas acumuladas e rendimentos do experimento cinético a 150bar, 50°C e 13 ± 2 g CO₂/min.

Tempo (min)	Massa (g)	Massa acumulada (g)	X ₀ (%)
0	0	0	0
5	0,0404	0,0404	0,202715
10	0,0353	0,0757	0,379839
15	0,0431	0,1188	0,596101
20	0,0340	0,1528	0,766703
30	0,0377	0,1905	0,955869
40	0,0712	0,2617	1,313129
50	0,0570	0,3187	1,599137
70	0,1508	0,4695	2,355804
90	0,1281	0,5976	2,99857
110	0,1060	0,7036	3,530445
140	0,0614	0,7650	3,838531
170	0,0450	0,8100	4,064327
200	0,0398	0,8498	4,264031
240	0,0260	0,8758	4,394491
280	0,0540	0,9298	4,665446

A partir da Figura 16, podem ser obtidas as Equações 33 a 35 que apresentam as taxas de extração para cada um dos períodos de extração.

Para $t < t_{CER}$ (período CER):

$$m_{ext} = 0,0064t + 0,0103$$

$$r^2 = 0,9979$$

Eq. 33

Para $t_{CER} \leq t < t_{FER}$ (período FER):

$$\begin{aligned} m_{ext} &= 0,0016t + 0,5322 \\ r^2 &= 0,9896 \end{aligned} \quad \text{Eq. 34}$$

Para $t \geq t_{FER}$ (período difusional):

$$\begin{aligned} m_{ext} &= 0,001t + 0,6451 \\ r^2 &= 0,9608 \end{aligned} \quad \text{Eq. 35}$$

De acordo com a Equação 23, o valor de Y_{CER} pode ser definido utilizando-se o parâmetro M_{CER} (valor da tangente ao período CER), obtido a partir da Equação 33.

Assim,

$$Y_{CER} = \frac{M_{CER}}{Q_{CO_2}} = \frac{0,0064}{13,3} = 4,81 \cdot 10^{-4} \quad \text{Eq. 36}$$

APÊNDICE C - CURVA PADRÃO DE ÁCIDO GÁLICO E CÁLCULO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAL

Na Tabela 22 e na Figura 20 são apresentados os dados experimentais e o respectivo gráfico obtido para a curva padrão de ácido gálico. A curva padrão foi construída plotando-se os dados de concentração de ácido gálico *versus* absorvância a fim de facilitar o cálculo do EAG (equivalente em ácido gálico). A equação obtida através da regressão linear do gráfico da Figura 20 foi utilizada para calcular os resultados de teor de fenólicos totais, conforme Equação 37.

Tabela 22 - Dados experimentais de absorvância em função da concentração da solução de ácido gálico.

Concentração (mg/L)	Absorvância (a 765 nm)*
0	0,0 ± 0,0
50	0,024 ± 0,004
100	0,075 ± 0,005
150	0,141 ± 0,002
250	0,270 ± 0,004
500	0,555 ± 0,004

* Resultado de análise em triplicata.

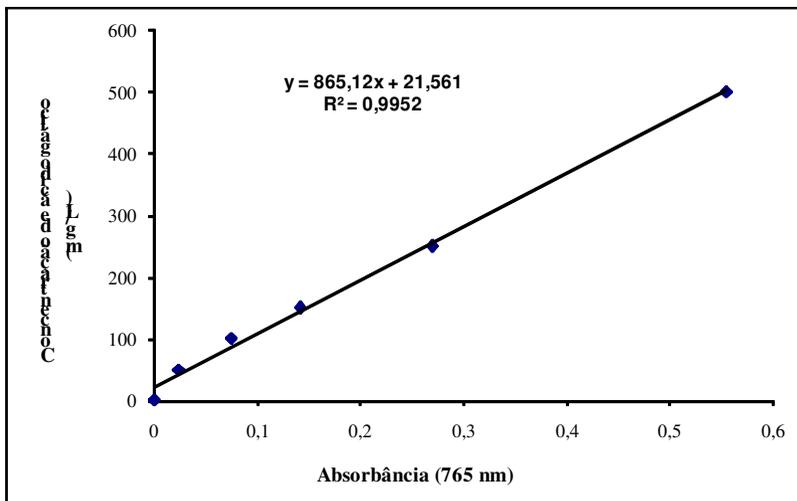


Figura 21 - Curva padrão de ácido gálico.

$$TFT \text{ (mg GAE/g}_{\text{extrato}}) = \frac{GAE}{C_{\text{ext}}} = \frac{865,12 \cdot ABS + 21,561}{C_{\text{ext}}} \quad \text{Eq. 37}$$

Onde:

EAG = equivalente em ácido gálico (mg GAE/L) obtido através da curva padrão;

C_{ext} = concentração da solução de extrato (g_{ext}/L);

A = absorvância (765 nm).

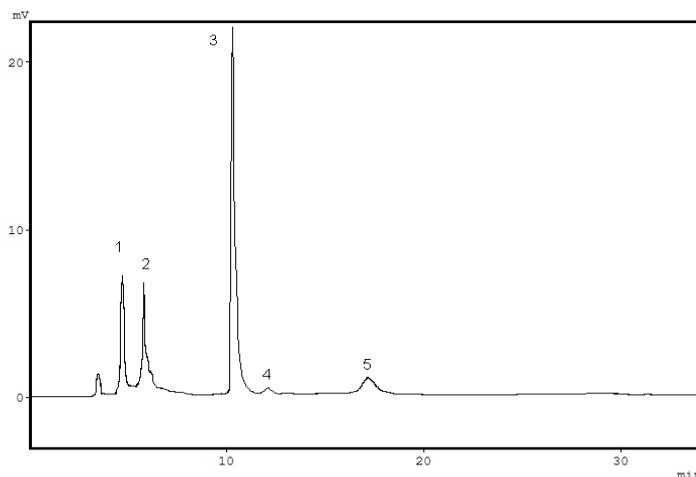
APÊNDICE D - CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR HPLC***Extrato supercrítico de bagaço de uva Merlot obtido com CO₂ puro a 250bar e 60°C***

Figura 22 - Cromatograma relativo ao extrato de bagaço de uva *Merlot* obtido com CO₂ puro a 250 bar e 60 °C.

Tabela 23 - Compostos identificados e tempos de retenção relativos ao extrato de bagaço de *Merlot* obtido com CO₂ puro a 250 bar e 60 °C.

	Substância	Tempo de retenção (min)
1	Epicatequina	4,6
2	Ácido gálico	5,7
3	Ácido p-OH-benzóico	10,1
4	Ácido vanílico	12,0
5	Ácido cafeico	17,0

O primeiro pico existente refere-se a um composto desconhecido.

Extrato supercrítico de bagaço de uva Syrah obtido com CO₂ puro a 250 bar e 60 °C

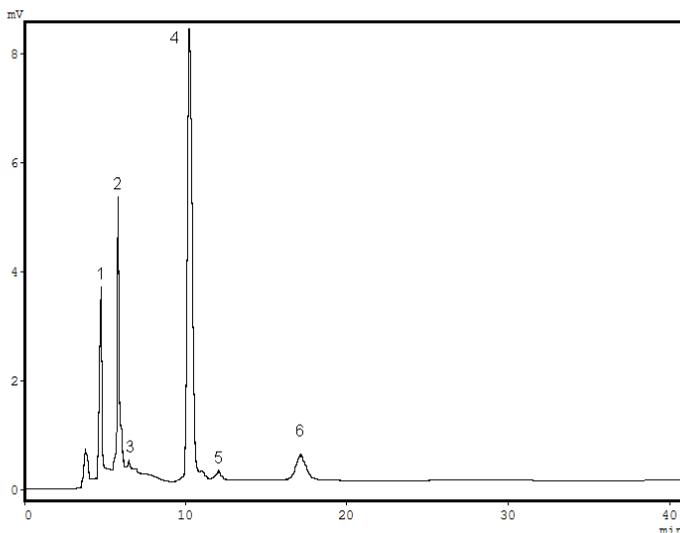


Figura 23 - Cromatograma relativo ao extrato de bagaço de uva *Syrah* obtido com CO₂ puro a 250 bar e 60 °C.

Tabela 24 - Compostos identificados e tempos de retenção relativos ao extrato de bagaço de *Syrah* obtido com CO₂ puro a 250 bar e 60 °C.

	Substância	Tempo de retenção (min)
1	Epicatequina	4,6
2	Ácido gálico	5,7
3	Ácido tânico	6,01
4	Ácido p-OH-benzóico	10,1
5	Ácido vanílico	12,0
6	Ácido cafeico	17,0

O primeiro pico existente refere-se a um composto desconhecido

“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

Fernando Pessoa