

**COBEQ2012**XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA**09 a 12 de setembro de 2012**
Búzios, RJ

APLICAÇÃO DA METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA VISANDO OTIMIZAR A EXTRAÇÃO DAS ANTOCIANINAS DO BAGAÇO DE SUCO DE UVA

N. B. EITEL¹, M. de O. SANTOS²; A. P. G. CRUZ³, S. P. FREITAS¹, W. L. JÚNIOR⁴,
L. M. C. CABRAL⁴

¹ Universidade Federal do Rio de Janeiro - Escola de Química/UFRJ

² Universidade Castelo Branco - Escola de Ciências da Saúde e do Meio Ambiente

³ Universidade Federal do Rio de Janeiro - Instituto de Química/UFRJ

⁴ Embrapa Agroindústria de Alimentos

E-mail para contato: natalia.eitel@poli.ufrj.br

RESUMO – Apesar dos avanços tecnológicos na industrialização de alimentos, a destinação dos resíduos gerados ao longo do processo ainda se constitui em uma das principais dificuldades das empresas nacionais. No caso das indústrias produtoras de suco de uva, o principal resíduo e também o de maior volume é o bagaço, constituído basicamente de semente e cascas. Com objetivo de viabilizar técnica e economicamente a recuperação dos compostos fenólicos presentes neste resíduo, várias pesquisas vêm sendo realizadas. A crescente demanda pela sociedade de alimentos ricos em compostos bioativos e funcionais torna o uso do bagaço, gerado na produção de derivados de uva, de grande interesse para o setor produtivo. Neste trabalho, o planejamento fatorial 2³ e a metodologia de superfície de resposta foram empregados para se determinar a melhor condição de extração das antocianinas. Os fatores avaliados foram: o teor de etanol na solução, pH e razão solvente:substrato. O bagaço foi previamente hidratado com água destilada na proporção 2:1 e os experimentos de extração foram conduzidos adicionando ao mesmo uma solução hidroetanólica. A mistura completamente vedada foi mantida por duas horas a 50°C sob agitação de 60 rpm em banho termostaticado. Como esperado, o teor de antocianinas extraído depende da razão solvente:substrato e da concentração de etanol na solução. O maior rendimento de extração foi alcançado na condição de solução extratora com 70% de etanol, pH 2 e razão solvente carga igual a 9.

1. INTRODUÇÃO

O crescimento industrial acelerado das últimas décadas ampliou a dificuldade de lidar com os resíduos gerados ao longo dos processos industriais. O principal foco das pesquisas atuais é a reclassificação destes resíduos, principalmente os de fontes naturais, em subprodutos, de modo a transformar um alto custo de tratamento em lucro (Kosseva, 2009). No caso das indústrias produtoras de suco de uva, o principal resíduo e também o de maior volume é o bagaço, constituído de casca e semente (da Silva, 2003). Esse bagaço, quando descartado indevidamente, pode causar problemas ambientais devido a suas características físico-químicas, como por exemplo, seu baixo pH e elevadas concentrações de compostos fitotóxicos, resistindo até à biodegradação (Bustamante *et al.*, 2008).

Alguns autores estudaram possíveis aproveitamentos para o bagaço residual dos processamentos da uva, objetivando principalmente a extração de compostos bioativos para uso na área de alimentos, mas também como insumo de processos bioquímicos como a produção de enzimas e leveduras (Bustamante, 2008). Brazinha e Crespo (2010) afirmam que o resíduo proveniente do processamento da uva pode alcançar altos preços quando usado como aditivos nutricionais, sendo de grande interesse os compostos fenólicos, principalmente flavonóides nas cascas e sementes; ou ainda, como matéria prima na indústria cosmética. No Brasil, o seu destino principal ainda são as indústrias de ração animal ou de fertilizantes. Visando à recuperação de compostos bioativos presentes nestes resíduos e, devido ao seu consagrado uso nas indústrias farmacêutica e cosmética, o óleo da semente da uva vem despertando interesse da comunidade científica e industrial. Seu óleo é rico em ácidos graxos poli e monoinsaturados (90%), principalmente linoléico e oléico (Bail *et. al.*, 2008).

Segundo Gómez-Plaza *et al.* (2006), na produção do vinho e de outros derivados da uva, apenas 30-40% dos compostos coloridos são extraídos da uva. Pode-se concluir, portanto, que o bagaço residual do processo é uma excelente fonte de antocianinas, além de seu baixo custo e alta disponibilidade.

No Brasil, em 2009, foram processados 534 mil toneladas de uva apenas nas indústrias do Rio Grande do Sul (IBRAVIN, 2010) correspondendo a 90% da produção nacional de derivados da uva. Tendo em vista este cenário, é de interesse para a agroindústria nacional encontrar um uso alternativo para o bagaço de uva. Visando um aproveitamento mais nobre deste resíduo, o presente trabalho teve por objetivo determinar, em escala de bancada, a melhor condição de extração hidroetanólica das antocianinas presentes no bagaço gerado na produção de suco de uva.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O bagaço de uva utilizado neste trabalho foi gentilmente cedido pela Vinícola Aurora proveniente da safra 2010/2011e gerado no processamento do suco. O planejamento fatorial 2^3 com triplicata no ponto central, descrito na Tabela 1, permitiu avaliar a influência do pH, da concentração da solução etanólica e da razão solvente:substrato na extração das antocianinas.

Tabela 1 - Matriz do planejamento experimental fatorial 2³

Ensaio	pH		Concentração Etanol		Razão Solvente:substrato	
	Codificado	Real	Codificado	Real (%)	Codificado	Real
01	-1	2	-1	30	-1	3
02	-1	2	-1	30	+1	9
03	-1	2	+1	70	-1	3
04	-1	2	+1	70	+1	9
05	+1	4	-1	30	-1	3
06	+1	4	-1	30	+1	9
07	+1	4	+1	70	-1	3
08	+1	4	+1	70	+1	9
09 (C)	0	3	0	50	0	6
10 (C)	0	3	0	50	0	6
11 (C)	0	3	0	50	0	6

(C): ponto central.

O bagaço utilizado foi previamente reidratado com volume de água correspondente a metade de sua massa, devido a sua baixa umidade. Essa reidratação foi realizada por 1 hora, sob repouso, a 30°C em banho-maria. Em seguida, a solução etanólica acidificada com ácido cítrico foi adicionada ao bagaço hidratado conforme desenho experimental (Tabela 1). A extração foi, então, realizada a 50°C em shaker com 60 rpm de rotação, de forma a manter a homogeneidade da suspensão, durante 120 minutos. Para a remoção dos sólidos a mistura foi filtrada em funil de buchner sem papel de filtro e o extrato filtrado recolhido, pesado, armazenado em frascos devidamente identificados e congelados até o momento da análise. As antocianinas totais (AT) e antocianinas monoméricas (AM) foram quantificadas pelo método espectrofotométrico de pH diferencial baseado na metodologia proposta por Giusti & Wrolstad (2001) expressas em equivalente de malvidina-3,5-diglicosídeo empregando dados da literatura. As concentrações de antocianinas dos extratos foram calculadas em termos de rendimento de extração (por 100g de bagaço) para padronizar e possibilitar a comparação das diferentes condições de extração.

Apesar de a literatura reportar melhores rendimentos de extração de compostos fenólicos quando se utiliza uma solução metanólica acidificada com HCl, devido a sua toxidez optou-se pelo uso do etanol que alcança rendimentos próximos à extração metanólica (Teixeira *et al.*, 2008). Pela mesma razão, o agente acidificante foi substituído pelo ácido cítrico, também muito usado na área alimentícia (Valduga *et al.*, 2008)

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observa-se na Tabela 2 que o teor de antocianinas totais variou de 41,99 a 155,0 mg.100g⁻¹ de bagaço, enquanto o teor das antocianinas monoméricas ficou na faixa de 34,70 a 120,6 mg.100g⁻¹ de bagaço. As antocianinas monoméricas são mais instáveis e susceptíveis às



ações de fatores como pH, luz, oxigênio dentre outros (Rein, 2005) e tendem a se estabilizar através da polimerização ocasionando alterações na coloração tão característica dos vinhos.

Tabela 2 – Comparação entre os valores obtidos experimentalmente e os valores preditos pelo modelo.

Ensaio	pH	Etanol (%)	Razão S:S*	AT (mg.100g ⁻¹ bagaço)			AM (mg.100g ⁻¹ bagaço)		
				EXP	EST	Desvio (%)	EXP	EST	Desvio (%)
1	2	30	3	41,89 ± 0,41	36,19	13,61	34,70 ± 0,35	34,25	1,29
2	2	30	9	67,72 ± 0,59	73,43	-8,43	56,86 ± 0,61	57,30	-0,78
3	2	70	3	107,03 ± 1,18	112,71	-5,30	83,06 ± 0,73	83,51	-0,54
4	2	70	9	155,84 ± 1,62	150,19	3,63	120,63 ± 2,63	120,17	0,38
5	4	30	3	58,76 ± 2,38	64,43	-9,65	44,81 ± 2,38	45,26	-1,01
6	4	30	9	100,70 ± 1,52	95,00	5,66	78,42 ± 1,56	77,97	0,58
7	4	70	3	81,41 ± 1,85	75,67	7,05	37,62 ± 2,18	37,17	1,18
8	4	70	9	100,79 ± 3,90	106,48	-5,65	83,05 ± 4,37	83,49	-0,53
9 (C)	3	50	6	76,20 ± 1,23	89,26	-17,15	62,50 ± 0,92	67,39	-7,82
10 (C)	3	50	6	88,76 ± 3,17	89,26	-0,57	71,38 ± 3,08	67,39	5,59
11 (C)	3	50	6	85,91 ± 1,35	89,26	-3,90	68,85 ± 1,28	67,39	2,12

*S:S – solvente:substrato; (C): ponto central; EXP: valor obtido experimentalmente; EST: valor estimado pelo modelo; Desvio (%) = ((EXP – EST)/EXP)x100

Dentro das condições estudadas, foi possível ajustar modelos matemáticos para os teores de AT e de AM conforme descritos pelas Equações 1 e 2. Para tais modelos foram obtidos valores de R²= 0, 9609 e R²= 0, 9928, respectivamente. Os valores estimados pelos modelos foram comparados aos valores obtidos experimentalmente, ambos em mg malvidina-3,5-diglicosídeo por 100g de bagaço (Tabela 2).

$$AT = -120,271 + 40,269*(x_1) + 3,542*(x_2) + 7,289*(x_3) - 0,816*(x_1*x_2) - 0,556*(x_1*x_3) + 0,001*(x_2*x_3) \quad (1)$$

$$AM = -58,3108 + 24,5948*(x_1) + 2,4950*(x_2) + 0,5320*(x_3) - 0,7168*(x_1*x_2) + 0,8047*(x_1*x_3) + 0,0567*(x_2*x_3) \quad (2)$$

onde: x₁ = pH, x₂ = concentração de etanol e x₃ = razão solvente:substrato.

Como pode ser observado no gráfico de Pareto (Figura 1) os fatores concentração de etanol na solução, razão solvente:substrato e a interação pH e etanol influenciaram significativamente a extração das antocianinas totais e monoméricas.

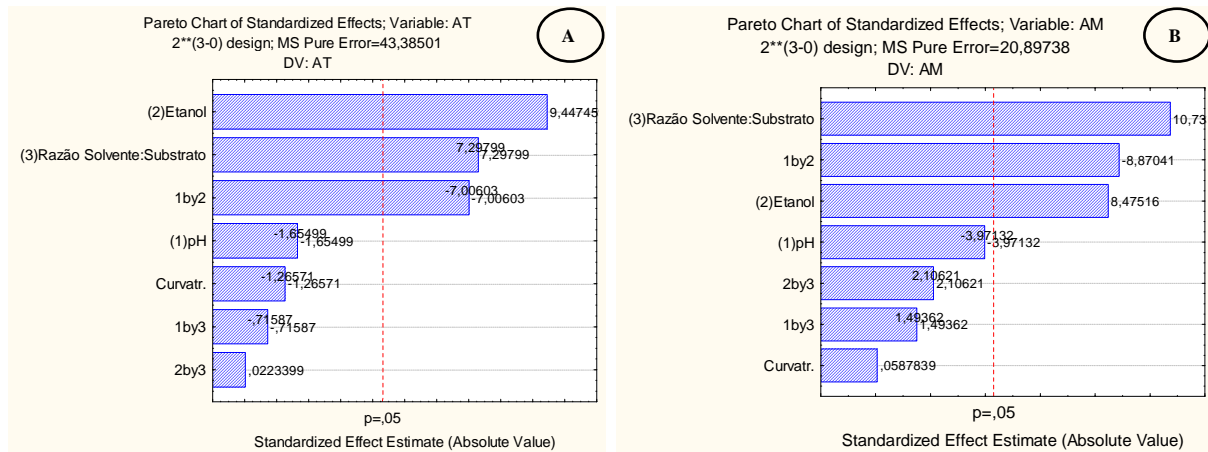


Figura 1 – Gráficos de Pareto para antocianinas totais (A) e monoméricas (B).

O fator pH isolado não influenciou a extração das antocianinas totais e monoméricas, no entanto colabora significativamente para a estabilização deste compostos e o fator de interação pH e etanol foi significativo, observando-se um aumento na extração com o aumento da relação solvente:substrato e redução do pH (Figura 1). As concentrações de etanol e de ácido cítrico na solução modificaram a viscosidade, constante dielétrica e densidade do solvente favorecendo a extração dos compostos bioativos (Cacace e Mazza, 2002).

O maior teor de antocianinas foi obtido com uma solução contendo 70% de etanol. Esta diluição foi bem próxima aos 74% encontrado por Pompeu *et al.* (2009) para a extração das antocianinas do açaí.

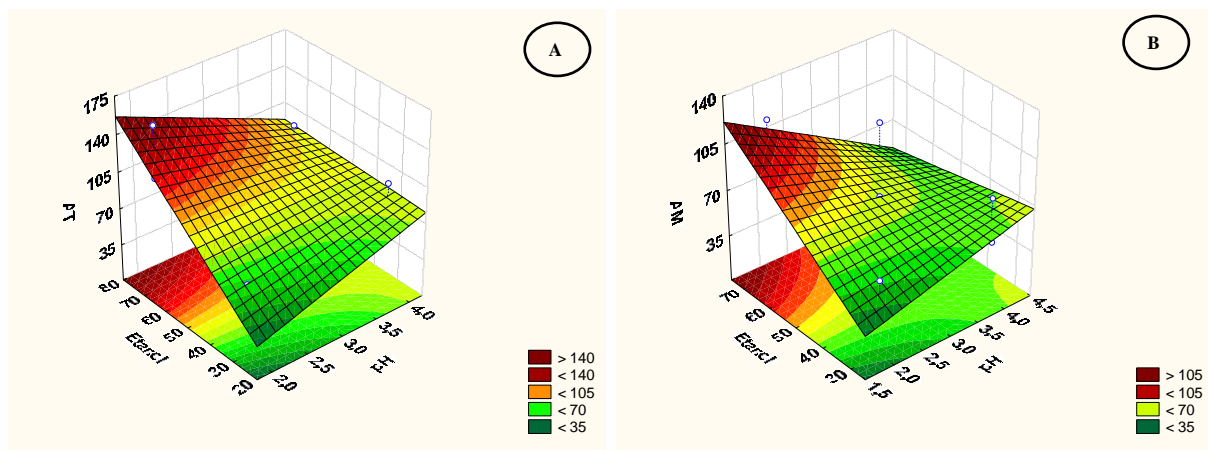


Figura 2 - Variação do teor de antocianinas totais (A) e monoméricas (B) em função da concentração de etanol e do pH.

As antocianinas são compostos instáveis em pHs alcalinos e até mesmo neutros (Março *et al.*, 2008; Stringheta e Bobbio, 2000), por favorecer a desprotonação do cátion flavílio facilitando reações de associação, o deslocamento do equilíbrio entre as formas com a formação de chalcona que por sua vez compromete a coloração da solução. Já a diminuição

do pH estabiliza as antocianinas e intensifica sua coloração avermelhada (Falcão *et al.*, 2003). Por sua vez, as antocianinas monoméricas são mais sensíveis ao pH, que por não estarem estabilizadas pelos mecanismos de co-pigmentação intramolecular, intermolecular e auto associação (Giusti e Wrolstad, 2003) sofrem mais facilmente o ataque nucleofílico da água e consequente formação de chalcona (Malien- Aubert *et al.*, 2001)

Com relação à razão solvente:substrato, o rendimento de extração ocorreu como esperado, uma vez que o aumento da concentração de solvente promove um aumento do potencial químico e favorece a transferência dos compostos da matriz sólida para a solução.

Nas melhores condições experimentais (etanol/água 70:30, razão solvente:substrato 9:1 e pH 2,0) obteve-se um rendimento em antocianinas totais de 156 mg.100g⁻¹ de bagaço. O extrato obtido com esta condição apresentou um teor de antocianinas monoméricas de aproximadamente 157 mg.L⁻¹, muito superior aos teores encontrados por Malacrida e Motta (2005) para os sucos de uva simples e reconstituídos cujos valores máximos encontrados foram 67 e 36, respectivamente.

4. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Os fatores mais relevantes para a extração das AT e AM foram a proporção de etanol na solução e a razão solvente:substrato. Com os resultados experimentais, foi possível ajustar modelos matemáticos, com elevado coeficiente de regressão, para estimar os teores de AT e AM extraídas.

A extração das antocianinas do bagaço proveniente do processamento do suco de uva pode ser uma interessante utilização deste coproduto, uma vez que os extratos apresentaram concentrações elevadas destes compostos.

Adicionalmente sugere-se, o estudo da cinética da extração o qual possibilitará maximizar o aproveitamento do bagaço para a obtenção de um extrato bioativo.



5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAIL, S.; STUEBIGER, S.; KRIST, S.; UNTERWEGER, H.; BUCHBAUER, G. Characterisation of various grape seed oils by volatile compounds, triacylglycerol composition, total phenols and antioxidant capacity. *Food Chemistry*, v. 108, p. 1122–1132, 2008.

BRAZINHA, C., CRESPO, J. Membrane processing: Natural antioxidants from winemaking by-products. *Filtration + Separation*, 2010.

BUSTAMANTE, M. A.; MORAL, R.; PAREDES, C.; PÉREZ-ESPINOSA, A.; MORENO-CASELLES, J.; PÉREZ-MURCIA, M.D. Agrochemical characterization of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry. *Waste Management*, v. 28, p. 372–380, 2008.

CACACE, J.E.; MAZZA, G. Extraction of anthocyanins and other phenolics from black currants with sulfured water. *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, p. 5939-5946, 2002.

DA SILVA, L. M. L. R., Caracterização dos subprodutos da vinificação. *Spectrum*, nº 28, p. 123-133, 2003.

FALCÃO, L. D.; BARROS, D. M.; GAUCHE, C.; BORDIGNON LUIZ, M. T. Copigmentação intra e intermolecular de antocianinas: uma revisão. *B. Ceppa*, v. 21, p.351-266, 2003.

GIUSTI, M. M., WROLSTAD, R. E. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *J. Biochemical Engineering*, v. 14, p. 217–225, 2003.

GIUSTI, M. M., WROLSTAD, R. E. Anthocyanins. Characterization and measurement with UV-visible spectroscopy, *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. Nova Iorque: 2001.

GÓMEZ-PLAZA, E.; MIÑANO, A., LÓPEZ-ROCA, J. M. Comparison of chromatic properties, stability and antioxidant capacity of anthocyanin-based aqueous extracts from grape pomace obtained from different vinification methods. *Food Chemistry*, v. 97, p. 87-94, 2006.

Ibravin Demonstrativo da Elaboração de Vinhos e Derivados de 2004 até 2010 (RS). Disponível em <<http://www.ibravin.org.br/admin/UPLarquivos/220220111853082.pdf>> Acesso em 01 de março de 2012.

KOSSEVA, M. R. Processing of Food Wastes. *Advances in Food and Nutrition Research*, v. 58, p.57-136, 2009.

MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 25, p. 659-664, 2005.

MALIEN- AUBERT, C.; DANGLES, O.; AMIOT, M. J. Color stability of commercial anthocyanin-based extracts in relation to the phenolic composition. Protective effects by intra-

and intermolecular copigmentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, p. 170–176, 2001.

MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. *Quim. Nova*, v. 31, p. 1218-1223, 2008.

POMPEU, D.R.; SILVA, E.M.; ROGEZ, H. Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using response surface methodology. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 6076–6082, 2009.

REIN, M. Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. *University of Helsinki*. Helsinki: p. 10–14, 2005.

STRINGHETA, P.C.; BOBBIO, P. A. Copigmentação de Antocianina. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v. 14, p. 34-37, 2000.

TEIXEIRA, L. N.; STRINGHETA, P. C.; DE OLIVEIRA, F. A. Comparação de métodos para quantificação de antocianina. *Ceres*, v. 55, p. 297-304, 2008.

VALDUGA, E.; LIMA, L.; DO PRADO, R.; PADILHA, F. F.; TREICHEL, H. Extração, secagem por atomização e microencapsulamento de antocianinas do bagaço da uva Isabel (*Vitis labrusca*). *Ciênc. agrotec.*, v. 32, n. 5, p. 1568-1574, 2008.