

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**OBTENÇÃO E ANÁLISE DE ÓLEO E COMPOSTOS FENÓLICOS DE
SEMENTES DE DIFERENTES VARIEDADES DE UVA (*Vitis vinifera* e *Vitis
labrusca*) CULTIVADAS NO RIO GRANDE DO SUL**

FABIANA AGOSTINI

CAXIAS DO SUL

OUTUBRO, 2011

FABIANA AGOSTINI

**OBTENÇÃO E ANÁLISE DE ÓLEO E COMPOSTOS FENÓLICOS DE
SEMENTES DE DIFERENTES VARIEDADES DE UVA (*Vitis vinifera* e *Vitis
labrusca*) CULTIVADAS NO RIO GRANDE DO SUL**

“Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias
do Sul, visando à obtenção de grau de Doutor em Biotecnologia”.

Orientadora: Prof^a Dr^a Regina Vanderlinde

CAXIAS DO SUL

OUTUBRO, 2011

Fabiana Agostini

**OBTENÇÃO E ANÁLISE DE ÓLEO E COMPOSTOS FENÓLICOS
DE SEMENTES DE DIFERENTES VARIEDADES DE UVA (*Vitis
vinifera* e *Vitis labrusca*) CULTIVADAS NO RIO GRANDE DO SUL**

“Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de
Caxias do Sul, visando à obtenção de grau de Doutor em Biotecnologia”.

Orientadora: Profa. Dra. Regina Vanderlinde

TESE APROVADA EM 11 DE OUTUBRO DE 2011.


Profa. Dra. Regina Vanderlinde


Profa. Dra. Adriana Del Carmen Escalona Gower


Profa. Dra. Mara Zeni Andrade


Prof. Dr. Adriano Brandelli

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
UCS - BICE - Processamento Técnico

A275o Agostini, Fabiana

Obtenção e análise de óleo e compostos fenólicos de sementes de diferentes variedades de uva (*Vitis vinifera* e *Vitis labrusca*) cultivadas no Rio Grande do Sul / Fabiana Agostini. - 2011.
xiii, 146. : il ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2011.

Apresenta bibliografia.

Orientação: Prof.^a Dr.^a Regina Vanderlinde.

1. Uva - Rio Grande do Sul. 2. Vinho e vinificação. 3. Vinho – Composto fenólico. 4. Uvas - Cultivo. I. Título.

CDU 2.ed.: 663.2(816.5)

Índice para o catálogo sistemático:

1. Uva – Rio Grande do Sul	663.2(816.5)
2. Vinho e vinificação	663.22
3. Vinho – Composto fenólico	663.25
4. Uvas - Cultivo	634.84

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária
Cleoni Cristina G. Machado CRB - 10/1355

Algumas pessoas marcam a nossa vida para sempre, umas porque nos vão ajudando na construção, outras porque nos apresentam projetos de sonhos e outras ainda porque nos desafiam a construí-los. Dedico esta Tese aos meus pais, Miguel e Rejane pela ajuda na construção e na trajetória deste objetivo e pelo amor incondicional e ao meu esposo Jonimar, um dos maiores incentivadores deste objetivo, pelo amor e compreensão diários.

O único lugar aonde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário.

“Albert Einstein”

AGRADECIMENTOS

À orientadora deste trabalho, Prof^a Dr^a Regina Vanderlinde, pelo importante auxílio prestado, meu respeito, muito obrigada.

À Prof^a Dr^a Ana Cristina Atti dos Santos e ao Prof^o. Dr^o. Marcelo Rossato, pela disposição de tempo, empenho, paciência e amizade, minha gratidão.

A todos os colegas, e acima de tudo, amigos do Laboratório de Óleos Essenciais e Extratos Vegetais, pelo incentivo, carinho e amizade, obrigada.

Agradeço a todos os meus familiares, principalmente aos meus pais, irmão e esposo, pelo apoio e compreensão, sem isso não teria chegado tão longe.

A CAPES, pela bolsa de estudos, muito obrigada.

Ào Instituto de Biotecnologia e à Universidade de Caxias do Sul, obrigada.

Um agradecimento muito especial a Dr^a Luciana Atti Serafini, que não mediu esforços para concretizar este ideal, incentivou-me a seguir e esteve presente nesta caminhada, meu respeito, admiração e carinho incondicional, muito obrigada.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	IX
RESUMO	X
ABSTRACT	XII
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 <i>Vitis</i> sp	3
2.1.1 <i>Vitis vinifera</i> e <i>Vitis labrusca</i>	5
2.2 Composição química das sementes de <i>Vitis</i> sp.....	7
2.2.1 Óleo fixo.....	8
2.2.1.1 Ácidos graxos.....	9
2.2.1.2 Tocóis.....	11
2.2.2 Compostos fenólicos	12
2.2.2.1 Taninos.....	14
2.2.2.2 Estilbenos.....	20
2.3 Extração de produtos naturais – compostos fenólicos e óleo fixo	22
2.3.1 Extração contínua a quente com aparelho tipo Soxhlet	22
2.3.2 Extração por Dióxido de Carbono Supercrítico - SFE	23
2.4 Métodos analíticos – compostos fenólicos e óleo fixo.....	26
2.4.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	26
2.4.2 Cromatografia Gasosa (GC).....	28
2.4.3 Métodos Espectrofotométricos	29
2.5 Ácidos graxos, tocoferol e compostos fenólicos em <i>Vitis</i> sp.	32
3 MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1 Obtenção do material.....	42
3.2 Determinação das condições do material vegetal para extração de óleo	42
3.3 Determinação do melhor solvente extrativo para obtenção de extrato bruto	43
3.4 Extração Contínua em Soxhlet.....	44
3.5 Extração Supercrítica em Bancada (SFE)	44
3.5.1 SFE de óleo fixo: Matriz experimental.....	45
3.5.2 SFE de óleo fixo: Definição do melhor tempo de extração	46
3.5.3 SFE de compostos fenólicos: Definição do melhor cossolvente	46
3.5.4 SFE de compostos fenólicos: Definição da porcentagem de cossolvente a ser utilizada	47
3.5.5 SFE de compostos fenólicos: Cálculo da massa de cossolvente.....	47
3.5.6 SFE de compostos fenólicos: Matriz experimental	48
3.5.7 SFE de compostos fenólicos: Definição do melhor tempo de extração	49
3.6 Extração Supercrítica em Equipamento Piloto (SFEP).....	49
3.7 Análise química dos compostos fenólicos presentes nos extratos de sementes de <i>Vitis</i> sp. (Método de Folin-Ciocalteu).....	51
3.8 Análise química dos compostos fenólicos presentes nos óleos de sementes de <i>Vitis</i> sp. (Método de Folin-Denis).....	51
3.9 Análise química de proantocianidinas (hidrólise por butanol/HCl) presentes nos extratos de sementes de <i>Vitis</i> sp. e na solução de polifenóis dos óleos de sementes de <i>Vitis</i> sp.....	52
3.10 Análise de catequina e epicatequina por Cromatografia Líquida de Alta eficiência	53

3.11	Análise de Resveratrol por Cromatografia Líquida de Alta eficiência	54
3.12	Análise de α -tocoferol por Cromatografia Líquida de Alta eficiência.....	54
3.13	Análise de ácidos graxos por Cromatografia Gasosa.....	55
3.14	Análise dos dados	56
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1	Rendimento de umidade das sementes de uva	57
4.2	Extração de óleo fixo de sementes das variedades Bordô, Isabel, Merlot, Cabernet Sauvignon e Moscato Giallo com extrator Soxhlet e análise por cromatografia e espectrofotometria	59
4.2.1	Teste de rendimento de óleo extraído em Soxhlet com o uso das variedades Bordô e Isabel	59
4.2.2	Testes de granulometria e análise do óleo em GC e GC/MS utilizando a variedade Bordô.....	60
4.2.3	Rendimento de óleo de sementes de uva extraído por Soxhlet nas variedades Bordô, Isabel, Merlot, Cabernet Sauvignon e Moscato Giallo	62
4.2.3.1	Ácidos Graxos, α -Tocoferol, Fenólicos totais e Procianidinas nas variedades Bordô, Isabel, Merlot, Cabernet Sauvignon e Moscato Giallo.....	66
4.3	Extração de óleo fixo de sementes das variedades Bordô, Isabel, Merlot, Cabernet Sauvignon e Moscato Giallo, com CO₂ supercrítico e análise por cromatografia e espectrofotometria.....	74
4.3.1	Extração de óleo fixo em SFE: testes com a variedade Merlot, safra de 2006.	74
4.3.2	Rendimento de óleo de sementes de uva extraído por SFE nas variedades Bordô, Isabel, Merlot, Cabernet Sauvignon e Moscato Giallo	77
4.3.2.1	Ácidos Graxos, α -Tocoferol, Fenólicos totais e Procianidinas nas variedades Bordô, Isabel, Merlot, Cabernet Sauvignon e Moscato Giallo.....	80
4.4	Comparação entre as metodologias extrativas: Soxhlet x SFE nas variedades Bordô, Isabel, Merlot, Cabernet Sauvignon e Moscato Giallo.....	88
4.4.1	Rendimento de óleo de sementes de uva: Soxhlet x SFE	88
4.4.1.1	Ácidos Graxos, α -Tocoferol, Fenólicos totais e Procianidinas: Soxhlet x SFE	90
4.5	Extração de compostos fenólicos de sementes das variedades Bordô, Isabel, Merlot, Cabernet Sauvignon e Moscato Giallo com extrator Soxhlet e análise por cromatografia e espectrofotometria.....	94
4.5.1	Testes de extração de compostos fenólicos de sementes da variedade Merlot em extrator Soxhlet e caracterização dos componentes.....	94
4.5.2	Rendimento de extrato de sementes de uva extraído por Soxhlet nas variedades Bordô, Isabel, Merlot, Cabernet Sauvignon e Moscato Giallo	96
4.5.2.1	Catequina, epicatequina, resveratrol, fenólicos totais e procianidinas nas variedades Bordô, Isabel, Merlot, Cabernet Sauvignon e Moscato Giallo.....	98
4.6	Extração de compostos fenólicos de sementes das variedades Bordô, Isabel, Merlot, Cabernet Sauvignon e Moscato Giallo, com CO₂ supercrítico e análise por cromatografia e espectrofotometria.....	109
4.6.1	Compostos fenólicos extraído por SFE: testes com a variedade Merlot, safra de 2006	109
4.6.2	Rendimento de extrato de sementes de uva extraído por SFE nas variedades Bordô, Isabel, Merlot, Cabernet Sauvignon e Moscato Giallo	114
4.6.2.1	Catequina, epicatequina, resveratrol, fenólicos totais e procianidinas nas variedades Bordô, Isabel, Merlot, Cabernet Sauvignon e Moscato Giallo.....	115
4.7	Comparação entre as metodologias extrativas: Soxhlet x SFE nas variedades Bordô, Isabel, Merlot, Cabernet Sauvignon e Moscato Giallo.....	121
4.7.1	Rendimento de extrato de sementes de uva: Soxhlet x SFE	121
4.7.1.1	Catequina, epicatequina, resveratrol, fenólicos totais e procianidinas: Soxhlet x SFE	122
5	CONCLUSÕES.....	126
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	128

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Estrutura dos ácidos palmítico, esteárico, oleico e linoleico (Moyna & Heinzen, 2000).	9
Figura 2:	Estrutura do α -tocoferol (Silva, 2007).	11
Figura 3:	Estrutura do ácido gálico (Yilmaz & Toledo, 2004a).	15
Figura 4:	Estrutura da (-)-epicatequina, da (+)-catequina (flavan-3-ol) e da leucocianidina (flavan-3,4-diol) (Santos & Mello, 2000; Hagerman, 2002).	15
Figura 5:	Estruturas de procianidinas B1 – epicatequina-(4 β →8)-catequina; B2 - epicatequina-(4 β →8)-epicatequina; B3 - catequina-(4 α →8)-catequina; B4 - catequina-(4 α →8)-epicatequina (Hagerman, 2002).	17
Figura 6:	Estrutura da procianidina A2 – epicatequina-(2 β →7, 4 β →8)-epicatequina (Hagerman, 2002).	18
Figura 7:	Estrutura do trans-resveratrol (esquerda) e cis-resveratrol (direita) (Sun & Spranger, 2005).	20
Figura 8:	Rendimento (% m/m) de óleo de sementes de uva extraído em extrator Soxhlet.	60
Figura 9:	Comportamento merendimentoológico na safra de 2006 em relação a normal climatológica (1961-1990) de Bento Gonçalves (Mandelli 2006).	65
Figura 10:	Perfil cromatográfico dos óleos de sementes das variedades Bordô (A), Isabel (B), Cabernet Sauvignon (C), Merlot (D) e Moscato Giallo (E), safra de 2005, analisados por GC.	68
Figura 11:	Análise de α -tocoferol nos óleo de sementes das variedades Bordô (A), Isabel (B), Merlot (C), Cabernet Sauvignon (D) e Moscato Giallo (E), safra de 2005, por HPLC.	69
Figura 12:	Perfil de tempo de extração de óleo de sementes de uva Merlot, safra de 2006, com 130min de extração, 40°C de temperatura, vazão de CO ₂ de 0,5mL/min, 200bar de pressão e análise por GC.	77
Figura 13:	Rendimento (% m/m) de óleo de sementes de uva extraído por SFE.	78
Figura 14:	Cromatogramas de ácidos graxos de óleo de sementes das variedades Bordô (A), Isabel (B), Cabernet Sauvignon (C), Merlot (D) e Moscato Giallo (E), safra de 2005, por GC.	83
Figura 15:	Cromatogramas de α -tocoferol nos óleos de sementes das variedades Bordô (A), Isabel (B), Cabernet Sauvignon (C), Merlot (D) e Moscato Giallo (E), safra de 2005, por HPLC.	84
Figura 16:	Comparação do rendimento (% m/m) de óleo de sementes de uva extraído por Soxhlet e por SFE, nas safras de 2005 e 2006.	89
Figura 17:	Rendimento (% m/m) de extrato bruto de sementes de uva Merlot obtido em Soxhlet, com diferentes solventes extrativos.	94
Figura 18:	Análise de catequina e epicatequina nos extratos de sementes das variedades Bordô (A), Isabel (B), Merlot (C), Cabernet Sauvignon (D) e Moscato Giallo (E), safra de 2005, por HPLC.	99
Figura 19:	Análise de resveratrol nos extratos de sementes das variedades Bordô (A), Isabel (B), Merlot (C), Cabernet Sauvignon (D) e Moscato Giallo (E), safra de 2005, por HPLC.	100
Figura 20:	Número de dias de chuva nas safras de 2005 e 2006 em relação a normal climatológica (1961-1990) em Bento Gonçalves (Mandelli, 2005; Mandelli 2006).	103
Figura 21:	Teste de cossolvente para extrações de compostos fenólicos de sementes de uva Merlot, safra de 2006, com 30min de extração, 40°C de temperatura, vazão de CO ₂ de 0,5mL/min, 200bar de pressão e análise espectrofotométrica por Folin-Ciocalteu.	110
Figura 22:	Teste de % de cossolvente etanol para as extrações de compostos fenólicos de sementes de uva Merlot, safra de 2006, com 30min de extração, 40°C de temperatura, vazão de CO ₂ de 0,5mL/min, 200bar de pressão e análise espectrofotométrica por Folin-Ciocalteu.	111
Figura 23:	Perfil de tempo de extração de compostos fenólicos de sementes de uva Merlot, safra de 2006, 60°C de temperatura, vazão de CO ₂ de 0,5mL/min, 225 bar de pressão, 3% de cossolvente etanol e análise espectrofotométrica por Folin-Ciocalteu.	114
Figura 24:	Rendimento (% m/m) de extrato de sementes de uva extraído por SFE.	115
Figura 25:	Cromatogramas de catequina e epicatequina nos extratos de sementes das variedades Bordô (A), Isabel (B), Cabernet Sauvignon (C), Merlot (D) e Moscato Giallo (E), safra de 2005, por HPLC.	116
Figura 26:	Cromatogramas de resveratrol nos extratos de sementes das variedades Bordô (A), Isabel (B), Cabernet Sauvignon (C), Merlot (D) e Moscato Giallo (E), safra de 2005, por HPLC.	117
Figura 27:	Comparação do rendimento (% m/m) de extrato de sementes de uva extraído por Soxhlet e por SFE.	122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Parâmetros de extração selecionados para óleo de semente de uva.	45
Tabela 2:	Parâmetros de extração selecionados para compostos fenólicos de semente de uva.	48
Tabela 3:	Variedades de uva estudadas, vinícolas que cederam o material vegetal e % média de umidade.	58
Tabela 4:	Rendimento (% m/m) de óleo de sementes de uva Bordô, obtido por extração em extrator Soxhlet de acordo com a granulometria.	61
Tabela 5:	Composição de ácidos graxos em óleo de sementes da variedade Bordô obtido por extração em extrator Soxhlet com diferentes granulometrias.	62
Tabela 6:	Rendimento (% m/m) de óleo de sementes de diferentes variedades de uva das safras de 2005 e 2006, obtidos por extração em extrator Soxhlet.	63
Tabela 7:	Concentração de ácidos graxos, α -tocoferol, fenólicos totais e procianidinas (mg/100g de sementes de uva) nas variedades estudadas nas safras de 2005 e 2006, por Soxhlet.	66
Tabela 8:	Concentração de ácidos graxos, α -tocoferol, fenólicos totais e procianidinas (mg/100g de óleo de sementes de uva) nas variedades estudadas nas safras de 2005 e 2006, por Soxhlet.	73
Tabela 9:	Matriz experimental dos parâmetros utilizados nas extrações de óleo de sementes de uva Merlot, safra de 2006, por SFE, com 60 minutos de extração e análise por GC.	76
Tabela 10:	Concentração de ácidos graxos, α -tocoferol, fenólicos totais e procianidinas (mg/100g de sementes de uva) dos óleos de sementes de diferentes variedades de uva das safras de 2005 e 2006, pelo método extrativo SFE.	82
Tabela 11:	Concentração de ácidos graxos, α -tocoferol, fenólicos totais e procianidinas (mg/100g de óleo de sementes de uva) dos óleos de sementes de diferentes variedades de uva das safras de 2005 e 2006, pelo método extrativo SFE.	87
Tabela 12:	Comparação da concentração de ácidos graxos, α -tocoferol, fenólicos totais e procianidinas, nos óleos de sementes das variedades de <i>V. labrusca</i> das safras 2005 e 2006, entre os métodos extrativos.	91
Tabela 13:	Comparação da concentração de ácidos graxos, α -tocoferol, fenólicos totais e procianidinas, nos óleos de sementes das variedades de <i>V. vinifera</i> das safras 2005 e 2006, entre os métodos extrativos.	91
Tabela 14:	Determinação do melhor solvente extrativo para obtenção de extratos de sementes de Merlot, avaliados por HPLC, a partir da concentração de catequina, epicatequina, procianidina B1, B2, B3 e B4.	95
Tabela 15:	Rendimento (% m/m) de extrato de sementes de diferentes variedades de uva das safras de 2005 e 2006, obtidos por extração em extrator Soxhlet.	97
Tabela 16:	Concentração de catequina, epicatequina, resveratrol, fenólicos totais e proantocianidinas, nos extratos de sementes de diferentes variedades de uva das safras 2005 e 2006 pelo método extrativo Soxhlet.	102
Tabela 17:	Matriz experimental dos parâmetros utilizados nas extrações de compostos fenólicos de sementes de uva Merlot, safra de 2006, por SFE, com 30min de extração, com 3% de cossolvente etanol e análise espectrofotométrica por Folin-Ciocalteu.	113
Tabela 18:	Concentração de catequina, epicatequina, resveratrol, fenólicos totais e proantocianidinas, nos extratos de sementes de diferentes variedades de uva das safras 2005 e 2006, pelo método extrativo SFE.	118
Tabela 19:	Comparação da concentração de catequina, epicatequina, resveratrol, fenólicos totais e proantocianidinas, nos extratos de sementes das variedades de <i>V. labrusca</i> das safras 2005 e 2006, entre os métodos extrativos.	123
Tabela 20:	Comparação da concentração de catequina, epicatequina, resveratrol, fenólicos totais e proantocianidinas, nos extratos de sementes das variedades de <i>V. vinifera</i> das safras 2005 e 2006, entre os métodos extrativos.	123

RESUMO

O Brasil, por ser um país de grande atividade agrícola, é um dos que mais produzem resíduos agroindustriais e por isso, a busca de alternativas para a utilização da matéria orgânica gerada vem crescendo. O crescimento esperado da área vitivinícola aumentará o volume de resíduos e o conseqüente acúmulo de subprodutos provavelmente se tornará um grave problema ambiental. Estes resíduos são geralmente queimados, embora sejam por vezes usados como fertilizante ou para alimentar o gado, porém, as sementes contêm uma variedade de substâncias biologicamente ativas que são desperdiçadas, tais como compostos fenólicos, ácidos graxos e tocoferol. Estes compostos contribuem para o tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares, além de atuarem contra a oxidação da LDL. Em vista disso, o principal objetivo deste estudo foi realizar a extração do óleo e de um extrato contendo compostos fenólicos de sementes de uva provenientes de resíduos de vinificação, utilizando as tecnologias de extração com dióxido de carbono supercrítico e extração contínua a quente em extrator Soxhlet. Foram selecionados resíduos das espécies *Vitis labrusca* (variedades Bordô e Isabel) e *Vitis vinifera* (variedades Cabernet Sauvignon, Merlot e Moscato Giallo), safras 2005 e 2006, provenientes de vinícolas de Caxias do Sul. As extrações em Soxhlet foram realizadas com hexano por 6 horas para o óleo e com etanol 70% por 8 horas para o extrato. As extrações com CO₂ supercrítico foram realizadas com temperatura de 80°C, vazão de CO₂ de 69g/min, pressão de 250bar e 1 hora de extração para o óleo. Para o extrato utilizou-se temperatura de 60°C, vazão de CO₂ de 76g/min, pressão de 225bar, 3% de cossolvente etanol e 1 hora de extração. Os compostos extraídos foram avaliados por cromatografia gasosa e líquida, além do uso de métodos espectrofotométricos. Observou-se que no geral, as variedades de *Vitis labrusca*, Bordô e Isabel apresentaram concentrações mais elevadas de ácidos graxos em relação às variedades Cabernet Sauvignon, Merlot e Moscato

Giallo (*Vitis vinifera*), demonstrando o grande potencial destas variedades mais rústicas, que ainda é pouco explorado. Já, as variedades de *V. vinifera* apresentaram maiores concentrações de compostos fenólicos quando comparadas às variedades de *V. labrusca*. Com relação aos métodos extrativos, a extração supercrítica do óleo de sementes de uva mostrou-se bastante semelhante à extração em Soxhlet, com a vantagem da ausência de solventes orgânicos durante o processo e menor tempo de extração, sendo um promissor método extrativo para óleo de sementes de uva das variedades testadas. Para extrato rico em compostos fenólicos, o melhor método extrativo foi a extração contínua a quente em extrator Soxhlet. Em geral, a safra de 2006 apresentou as maiores concentrações dos compostos avaliados quando comparada à safra de 2005. Os dados experimentais sugerem como fonte alternativa de compostos fenólicos, α -tocoferol e ácidos graxos, a utilização da biomassa residual da indústria vitivinícola, abrindo espaço para uma série de perspectivas de sua exploração, principalmente na indústria de fitoterápicos, cosméticos e de alimentos.

ABSTRACT

Brazil is known as a country of great agricultural activity, but also produces a large amount of agro-industrial residues. On this basis, the seek for alternatives to the use of residual organic matter is increasing. The expected development of the vineyard area will increase the volume of waste and the consequent accumulation of byproducts will probably become a considerable environmental problem. These wastes are usually burned out, although they sometimes are used as fertilizer or to feed the cattle, but the seeds contain a variety of biologically active substances that are wasted, such as phenolic compounds, fatty acids and tocopherol. These compounds are important in the treatment and prevention of cardiovascular disease, and act against oxidation of LDL (Low-density lipoprotein). Considering these affirmations, the major aim of this study was to perform the extraction of oil and phenolic compounds extract from grape seeds collected from winemaking waste, using the technologies of supercritical carbon dioxide extraction and Soxhlet apparatus. To this study were selected residues from *Vitis labrusca* (Isabel and Bordô varieties) and *Vitis vinifera* (Cabernet Sauvignon, Merlot and Moscato Giallo varieties), both belonging to the harvest of 2005 and 2006, from wineries located in Caxias do Sul. The extractions were performed in Soxhlet with hexane during 6 hour for oil, and with ethanol 70% during 8 hour for extract. The extractions were carried out with supercritical CO₂ at 80°C, CO₂ flow rate of 69g/min, 250bar pressure and 1 hour for oil extraction. To the extract, the parameters used were 60°C, CO₂ flow rate of 76g/min, 225bar pressure, 3% ethanol as cossolvent and 1 hour of extraction. The extracted compounds were analyzed by gas and liquid chromatography and by spectrophotometric methods. It was observed that in general, the varieties of *Vitis labrusca* (Isabel and Bordô) had higher concentrations of fatty acids in comparison to the varieties of *Vitis vinifera* (Cabernet Sauvignon Merlot and Moscato Giallo), demonstrating the great potential of

these more rustic varieties, which are still underexplored. On the other hand, the varieties of *V. vinifera* showed higher concentrations of phenolics compounds in comparison to the varieties of *V. labrusca*. With regard to the extraction methods, the supercritical extraction of grape seed oil proved to be very similar to the Soxhlet extraction, with the advantage of the absence of organic solvents during process and less extraction time, being a promising method for extraction of grape seed oil from the tested varieties. To the extract with higher amounts of phenolic compounds, the best extraction method was the one conducted in Soxhlet. In general, the harvest of 2006 showed the highest concentrations of the compounds evaluated in comparison to the harvest of 2005. The experimental data suggest the use of residual biomass of the wine industry as an alternative source of phenolic compounds, α -tocopherol and fatty acids. Therefore, a new source of exploitation, is reported especially in the herbal, cosmetics and food industry.

1 INTRODUÇÃO

A região da Serra Gaúcha é referência Nacional na área da viticultura: boa parte da economia da região está diretamente ligada a uma cadeia produtiva que envolve além da produção da uva, também a sua vinificação, bem como todo aparato instrumental necessário ao seu processamento. O Rio Grande do Sul atualmente representa o Estado com maior área de videiras cultivadas (cerca de 30.000 ha.), cabendo a Bento Gonçalves 19% da produção vitícola estadual que é a maior entre os municípios. Entre as variedades cultivadas, a Isabel é a mais produzida, com 44% do total.

Segundo a Embrapa Uva e Vinho (2007), os maiores volumes de uvas processadas no Rio Grande do Sul em 2005 e 2006 foram de uvas tintas comuns (*Vitis labrusca*), principalmente Isabel (aproximadamente 185 e 163 milhões de quilos em 2005 e 2006 respectivamente) e Bordô (aproximadamente 64 e 54 milhões de quilos em 2005 e 2006 respectivamente) e tintas viníferas (*Vitis vinifera*), destacando o Cabernet Sauvignon (aproximadamente 12 milhões de quilos em 2005 e 2006) e a Merlot (aproximadamente 10 e 8 milhões de quilos em 2005 e 2006 respectivamente).

Durante o processo de produção de vinho ou suco de uva, grandes quantidades de subprodutos residuais remanescentes (polpa, sementes e películas) são usados como alimento para animais devido ao seu alto conteúdo de fibras. Por outro lado, estes subprodutos são uma fonte alternativa de compostos fenólicos, óleo e vitamina E, que podem ser considerados como subprodutos com alto valor agregado, justificando seu isolamento a partir de resíduos agroindustriais.

Nas últimas décadas estudos têm sido realizados para a extração e análise de óleo e de compostos fenólicos de sementes de *Vitis* sp. com o intuito de determinar compostos ativos presentes em resíduos vitivinícolas visando à redução do desperdício destas substâncias biologicamente ativas. Estes trabalhos demonstraram que os ácidos graxos presentes no óleo de sementes de uvas possuem a habilidade de agir aumentando no sangue a Lipoproteína de Alta Densidade (HDL) e diminuindo a Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL) e triglicérides, um efeito que acaba minimizando os riscos de doenças vasculares. Além disso, o óleo age dissolvendo trombos nas artérias, reduzindo a agregação das plaquetas, com isso ele previne infartos e diminui o risco de derrames, ajuda na prevenção da hipertensão e age na normalização de lesões ocasionadas pela obesidade e diabetes provenientes da má circulação.

Estudos relacionados a compostos fenólicos encontrados nas sementes de uva, demonstram que estes compostos apresentam propriedades antioxidantes, sendo por isso indicados para o tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares, entre outras. Apresentam ainda, atividades antiinflamatória, antiúlcera e antiviral, além de atuar contra a oxidação da LDL.

O presente trabalho teve como objetivo, realizar testes de extração de óleo e de extrato de sementes de uva provenientes de resíduos de vinificação de diferentes variedades de uva, obtidos em duas safras, utilizando as tecnologias de dióxido de carbono supercrítico e extração contínua a quente em extrator Soxhlet, sendo a qualidade dos compostos obtidos avaliada por ensaios cromatográficos e espectrofotométricos.

Os resultados obtidos permitem traçar um perfil entre o potencial das substâncias extraídas de uvas comuns e viníferas para exploração industrial, além de apontar a melhor forma de extração destas substâncias nestas variedades e de sugerir um reaproveitamento para estes resíduos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Vitis* sp

A videira é uma planta arbustiva, perene, constituída por raízes fasciculadas, tronco, ramos, gemas, folhas, flores, gavinhas, frutos e sementes. A parte aérea da planta é composta pelo tronco e ramos, estes são responsáveis pela sustentação dos frutos, que são denominados de bagas e agrupados em cachos. Os frutos da videira podem apresentar diferentes formas e tamanhos, podendo apresentar coloração verde, vermelha, rosada ou azulada, conforme a variedade, sendo que sua polpa pode conter até quatro sementes. As folhas também podem apresentar diferentes formas e tamanhos, além da presença ou ausência de pilosidades. As flores são pequenas, reunidas em inflorescências, de coloração verde-clara podendo ser hermafroditas ou unissexuadas (Moraes, 2003).

A uva está entre as mais importantes espécies vegetais cultivadas mundialmente, com uma área de 7,4 milhões de hectares (Poudel *et al.*, 2008), perdendo apenas para citrus e banana. Sua produção mundial alcançou 66 milhões de toneladas em 2005 (Xu *et al.*, 2010). Botanicamente pertence à família *Vitaceae* (Poudel *et al.*, 2008), gênero *Vitis*, composto por cerca de 60 espécies conhecidas, divididas em três grupos: Europeu – grande maioria das uvas cultivadas, que inclui duas espécies: *V. vinifera* e *V. sylvestris*, não cultivada; Americano – com 28 espécies, destacando-se *V. labrusca*, com variedades muito conhecidas e cultivadas no Sul do Brasil, como Isabel, Niágara e Bordô; e o grupo Asiático – com aproximadamente 30 espécies, distribuídas no leste da Ásia (Fronza, 2003).

Estima-se que no Brasil, a área plantada seja de 60 mil hectares, sendo o Rio Grande do Sul, reconhecidamente, o Estado de maior área cultivada, com cerca de 30 mil hectares,

produzindo cerca de 580.000 toneladas/ano. Desse total, 85% estão concentrados em apenas nove municípios da Região da Serra, sendo Bento Gonçalves responsável por 19% da produção estadual (IBRAVIN, 2004).

Os benefícios do consumo de uvas e seus produtos tiveram reconhecimento com a descoberta dos compostos fenólicos (Poudel *et al.*, 2008), visto que as uvas estão entre os frutos com maior concentração destes compostos, de diferentes estruturas e presentes em cascas, polpa e sementes (Iacopini *et al.*, 2008).

Diversos são os fatores geográficos e climáticos que exercem influência na viticultura, como a latitude, a altitude, o relevo, a exposição solar, além da temperatura, da luminosidade e da pluviosidade entre outros (Giovannini, 2005). Essa influência ocorre em todos os estádios fenológicos da videira, ou seja, desde o repouso vegetativo (inverno), brotação, floração, frutificação, crescimento das bagas (primavera), maturação (verão) até a queda das folhas (outono) (Mandelli, 2006).

A safra, ou colheita, na Serra Gaúcha, ocorre desde dezembro (variedades precoces) até março (variedades tardias), com auge em fevereiro, quando se realiza a colheita da variedade Isabel, responsável por 44% da produção (IBRAVIN, 2002). A composição física do cacho inteiro se divide em engaço, que é a parte herbácea, mais ou menos lignificada, responsável por 4 a 6% do peso em uvas maduras e sadias, e bagaço, formado pelas bagas, que compõem os 94 a 96% restantes. A composição química das partes componentes do resíduo de uvas diferem umas das outras. O engaço é rico em água, matéria lenhosa, resinas, minerais e taninos. O bagaço é formado por 6 a 12% de película ou casca, 2 a 5% de sementes e 85 a 92% de polpa, da qual é produzido o vinho (Fronza, 2003).

O volume médio de produção de vinho e mosto no Rio Grande do Sul é de aproximadamente 300 milhões de litros/ano, representando 90% da produção nacional. Considerando que 70 a 80% da uva é aproveitada na produção do vinho e mosto, os 20 a 30% restantes tornam-se uma importante quantidade de resíduos, que contém aproximadamente entre 60 e 70% de água e entre 30 e 40% de sólidos (Oliveira *et al.*, 2003). As sementes, que estão presentes nos resíduos sólidos e que perfazem de 20 a 26% do bagaço (Bail *et al.*, 2008), contêm cerca de 10 a 20% de óleo, entre 5 e 9% de taninos, 0,5 e 1% de ácidos voláteis e compostos fenólicos em geral (Fronza, 2003; Oliveira *et al.*, 2003).

2.1.1 *Vitis vinifera* e *Vitis labrusca*

Vitis vinifera é uma espécie de origem européia, responsável por mais de 90% dos vinhos fabricados no mundo. Dentre as principais variedades viníferas para vinho tinto estão a Cabernet Sauvignon e a Merlot, sendo chamadas de uvas finas (Moraes, 2003).

A variedade Cabernet Sauvignon, originária da região de Bordeaux, França, está atualmente difundida na maior parte dos países vitivinícolas (Rizzon & Miele, 2002). É uma variedade de brotação e de maturação tardia (05/09 a 15/09 e 20/02 a 02/03 respectivamente) (Giovannini, 2005), relativamente vigorosa, de média produção e elevada qualidade para vinificação. Embora tenha sido introduzida no Brasil em 1921, foi somente depois de 1980 que houve incremento em seu plantio na Serra Gaúcha. É uma das variedades de *Vitis vinifera* com maior demanda para a implantação de novos vinhedos (Rizzon & Miele, 2002).

A uva Merlot originária de Bordeaux foi introduzida no Rio Grande do Sul através da Estação Agronômica de Porto Alegre, e depois para a Serra Gaúcha. Foi a partir da década de 1970 que houve maior incremento de seu plantio nessa região. A variedade Merlot, juntamente

com outras do grupo das européias, marcou o início da produção de vinhos finos varietais brasileiros. Ocupa o segundo lugar em volume de produção entre as variedades de *Vitis vinifera* tintas (Rizzon & Miele, 2003). Tem sua brotação de 03/08 a 13/08 e sua maturação de 10/02 a 20/02 (Giovannini, 2005).

A Moscato Giallo é uma variedade de uvas brancas originária da Grécia, de onde se difundiu primeiro pelos países banhados pelo Mediterrâneo, e em seguida para o mundo (Amarante, 1986). Uva aromática que atinge maturação mais completa que a Moscato Branco (brota de 18/09 a 28/09 e amadurece de 25/02 a 06/03) (Giovannini, 2005).

Vitis labrusca é de origem americana, ocorrendo desde o Canadá até a Carolina do Sul, apresenta características mais rústicas quanto à suscetibilidade a doenças. Isabel e Bordô fazem parte das principais variedades pertencentes a esta espécie (Moraes, 2003).

A variedade Isabel é originária do sul dos Estados Unidos e de onde foi introduzida em outras regiões. Chegou ao Rio Grande do Sul entre 1839 e 1842, trazida por Thomas Maister e, atualmente, representa aproximadamente 40% de toda a uva produzida no Rio Grande do Sul. Os principais destinos desta variedade são a produção de vinho tinto comum, suco de uva, vinagre, geléias e comercializada como fruta *in natura*. Sua expansão deu-se devido à sua fácil adaptação, variabilidade de condições edafoclimáticas (relação planta-solo-clima), elevada produtividade, longevidade e à relativa rusticidade (Rombaldi *et al.*, 2004). Brota de 23/08 a 06/09 e amadurece de 19/02 a 05/03 (Giovannini, 2005).

A uva Bordô é originária de Ohio, Estados Unidos, é muito rústica, necessitando de poucos cuidados e é bastante produtiva, sendo cultivada desde o Rio Grande do Sul até o sul de Minas Gerais. Apresenta vigor moderado e alta resistência a doenças fúngicas (Camargo, 2003), brotando de 16/08 a 26/08 e com amadurecimento de 15/01 a 25/01 (Giovannini, 2005).

2.2 Composição química das sementes de *Vitis* sp.

O Brasil, por ser um país de grande atividade agrícola, é um dos que mais produzem resíduos agroindustriais e por isso, a busca de alternativas para a utilização da matéria orgânica gerada vem crescendo dentro de vários centros de pesquisa (Negro *et al.*, 2003; Cataneo *et al.*, 2008). O crescimento esperado da área vitivinícola aumentará o volume de resíduos e o conseqüente acúmulo de subprodutos provavelmente se tornará um grave problema ambiental (Dalmolin *et al.*, 2010).

Produtores e indústrias da área vitivinícola já enfrentam o problema de descarte da biomassa residual que embora seja biodegradável, necessita de um tempo mínimo para ser mineralizada, constituindo-se numa fonte de potenciais poluentes ambientais (Negro *et al.*, 2003; Cataneo *et al.*, 2008). Porém, esses resíduos já estão se tornando cada vez mais reconhecidos para a produção de produtos com alto valor agregado (Negro *et al.*, 2003; Bucić-Kojić *et al.*, 2007; Passos *et al.*, 2009).

De um ponto de vista ecológico, a completa utilização das uvas incluindo o bagaço, como subproduto da produção de vinho, é um importante aspecto na redução do desperdício (Bail *et al.*, 2008). O resíduo da vinificação é geralmente queimado, embora seja por vezes usado como fertilizante ou para alimentar o gado (Gómez *et al.*, 1996; Luque-Rodríguez *et al.*, 2005; Bucić-Kojić *et al.*, 2007; Adhikari *et al.*, 2008). Também é tradicionalmente vendido para indústrias de extração de óleo e mais recentemente vem sendo solicitado por setores farmacêuticos e cosméticos para seu uso como fonte de antioxidantes (Fiori, 2007). O processo de extração de óleo gera um outro produto, comumente conhecido como torta que contém diferentes tipos de compostos fenólicos (Tobar *et al.*, 2005).

As sementes contêm uma variedade de substâncias biologicamente ativas que são desperdiçadas, muitas delas ricas em compostos fenólicos (Bucić-Kojić *et al.*, 2007; Cataneo *et al.*, 2008; Soares *et al.*, 2008) como catequina e epicatequina, além de procianidinas diméricas, triméricas e tetraméricas (Baydar *et al.*, 2004). Também são conhecidas por terem uma considerável quantidade de óleo com potencial nutricional (Tobar *et al.*, 2005; Adhikari *et al.*, 2008) baseado em seu alto nível de insaturações e alto conteúdo de tocóis (Gómez *et al.*, 1996; Adhikari *et al.*, 2008).

O alto custo da exploração de produtos naturais biologicamente ativos constitui uma importante limitação da exploração economicamente viável, como resultado, os esforços têm sido concentrados na obtenção de resíduos agrícolas ricos em polifenóis (Guendez *et al.*, 2005), entre outros compostos de interesse, como ácidos graxos e tocóis (Fiori, 2007).

2.2.1 Óleo fixo

Óleos são misturas complexas, não voláteis, de componentes lipídico (Simões & Spitzer, 2000; Temelli, 2009) insolúveis em água e obtidos geralmente de sementes (Simões & Spitzer, 2000). Os principais componentes lipídicos são os triglicerídeos, além de mono e diglicerídeos, ácidos graxos livres, fosfolipídeos, glicolipídeos, esteróis e outros componentes lipossolúveis como tocoferóis, tocotrienóis e carotenóides. Estes compostos são usados não só em indústrias de alimentos, mas também em indústrias de cosméticos, farmacêutica, oleoquímica entre outras indústrias (Temelli, 2009). Em se tratando de sementes de uva, dados de literatura citam um rendimento que varia de 11 a 22% de óleo, variando conforme a variedade (Oomah *et al.*, 1998; Fronza, 2003), o ambiente de cultivo e as características do ano (Oomah *et al.*, 1998).

2.2.1.1 Ácidos graxos

Óleo de sementes de uva consiste principalmente de triglicerídeos e ácidos graxos (Cao & Ito, 2003). Ácidos graxos são ácidos monocarboxílicos, que apresentam o grupo carboxila ligado a uma cadeia alquila saturada ou insaturada, podendo ser ramificados ou não. Na natureza, quatro ácidos graxos formam cerca de 95% dos ácidos que se encontram nos diversos tipos de lipídeos. São eles: ácido palmítico (C_{16}), ácido esteárico (C_{18}), ácido oleico ($C_{18:1}$) e ácido linoleico ($C_{18:2}$) (Figura 1) (Moyna & Heinzen, 2000).

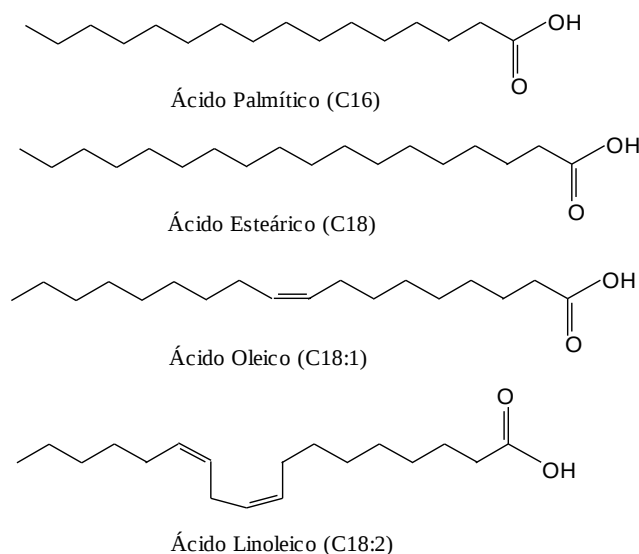


Figura 1: Estrutura dos ácidos palmítico, esteárico, oleico e linoleico (Moyna & Heinzen, 2000).

Ácidos graxos poli-insaturados como o ácido linoleico e o ácido linolênico são essenciais para o metabolismo humano devido à falta de enzimas responsáveis pela síntese dos mesmos, e, por este motivo, devem ser ingeridos diariamente na dieta (Beveridge *et al.*, 2005; Sahena *et al.*, 2009). Por ser rico em ácido linoleico, e devido à presença de tocoferol, também chamada de vitamina E (Beveridge *et al.*, 2005) o óleo de semente de uva possui alto valor

nutricional podendo ser usado como fonte de óleo vegetal comestível (Baydar & Akkurt, 2001; Luque-Rodríguez *et al.*, 2005; Bail *et al.*, 2008; Passos *et al.*, 2009).

O alto conteúdo de ácido linoleico (72-76%) do óleo de semente de uva, excede aquele encontrado em óleo de girassol (60-62%) e em óleo de milho que apresenta cerca de 52% (Cao & Ito, 2003). Excede também o conteúdo encontrado em óleo de oliva que está entre 9 e 15% (Moyna & Heinzen, 2000), óleo de soja com cerca de 54%, óleo de algodão com aproximadamente 53% (Vieira *et al.*, 2005), óleo de canola com cerca de 22% e óleo de palma com 9% (Medeiros, 2002), entre outros.

Óleos que não passaram pelo processo de refino, contém compostos bioativos incluindo tocoferóis e numerosos compostos fenólicos de alta e baixa massa molecular que contribuem para os efeitos benéficos dos óleos vegetais (Bail *et al.*, 2008). Em adição, o óleo de sementes de uva contém taninos em concentrações mais elevadas que outros óleos de sementes (Luque-Rodríguez *et al.*, 2005), como por exemplo, ácido gálico, catequina, epicatequina e uma grande quantidade de procianidinas (Maier *et al.*, 2009).

Em termos de aplicações, o óleo de sementes de uva é cada vez mais usado na culinária popular, na medicina, em cosméticos e em produtos farmacêuticos. É também um produto atraente devido a sua grande disponibilidade como um dos principais subprodutos das indústrias vinícolas (Passos *et al.*, 2009).

A composição de ácidos graxos do óleo de semente de uvas viníferas apresenta pequenas diferenças entre as regiões de cultivo. Ácido linoleico representa de 70 a 72% dos ácidos graxos presentes, ácido oleico representa de 16 a 19%, ácido palmítico de 6 a 8% e ácido esteárico de 3 a 5% (Mattick & Rice, 1976). Segundo Oomah e colaboradores (1998), o conteúdo de lipídios provenientes de sementes de uvas vermelhas é maior que aquele de sementes de uvas brancas.

2.2.1.2 Tocóis

São um grupo de antioxidantes lipossolúveis com um anel cromanol com uma cadeia lateral que se inicia no carbono 2 (C2) (Silva, 2007; Schwartz *et al.*, 2008). Dependendo do tipo de cadeia lateral a vitamina E é composta por oito análogos: α -, β -, γ - e δ -tocoferóis e seus correspondentes insaturados tocotrienóis (Ueda & Igarashi, 1990; Silva, 2007; Adhikari *et al.*, 2008; Schwartz *et al.*, 2008). Tocoferóis e seus correspondentes tocotrienóis diferem pelo número e posição dos substituintes metila na porção fenólica do anel cromanol, o que influencia significativamente a atividade de vitamina E, dos quais o α -tocoferol (Figura 2) é o que apresenta maior atividade biológica (Miranda, 2004; Schwartz *et al.*, 2008).

É bem conhecido que tocóis desempenham vários benefícios à saúde, sendo um importante grupo de antioxidantes presentes em óleos vegetais (Adhikari *et al.*, 2008; Schwartz *et al.*, 2008) utilizados por indústrias químicas como aditivo em alimentos e cosméticos, entre outros (Freitas *et al.*, 2008). A principal fonte de tocóis na dieta humana são óleos vegetais, frutos, sementes, nozes, cereais e produtos derivados destes (Adhikari *et al.*, 2008; Schwartz *et al.*, 2008).

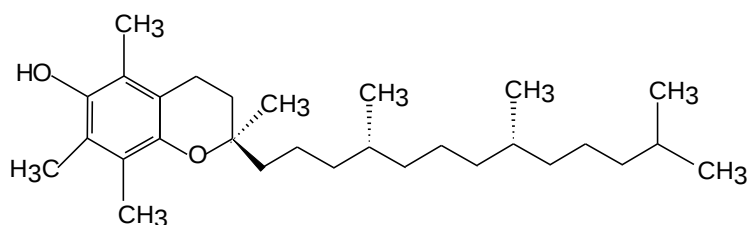


Figura 2: Estrutura do α -tocoferol (Silva, 2007).

Estes compostos aparecem em pequenas quantidades, mas são de grande importância devido a suas propriedades medicinais (Freitas *et al.*, 2008; Schwartz *et al.*, 2008; Charoensiri *et*

al., 2009). O α -tocoferol diminui o risco de doenças cardiovasculares, diabetes, câncer e previne a impotência sexual (Freitas *et al.*, 2008; Schwartz *et al.*, 2008; Charoensiri *et al.*, 2009). Não podendo ser sintetizada por humanos. Cada variedade de óleo possui diferentes quantidades de vitamina E, sendo que o óleo de sementes de uva é uma das maiores fontes de vitamina E (Freitas *et al.*, 2008).

Estudos demonstraram que o óleo de semente de uva exibe muitas atividades farmacológicas, como a propriedade de inibir a oxidação da Lipoproteína de Baixa Densidade - LDL (Cao & Ito, 2003). Além disso, este óleo age dissolvendo trombos nas artérias e reduzindo a agregação das plaquetas, prevenindo infartos e diminuindo o risco de derrames, auxiliando também na prevenção da hipertensão e agindo na normalização de lesões ocasionadas pela obesidade e diabetes proveniente da má circulação. É indicado para o tratamento de obesidade, celulite e estrias, pois auxilia na elasticidade dos tecidos, reduz o inchaço e o edema, restaura o colágeno e melhora a circulação periférica. Atua também como excelente antioxidante (Fronza, 2003). É um óleo com alta qualidade nutricional para crianças e idosos (Cao & Ito, 2003), além disso, o uso deste óleo em produtos cosméticos e de aromaterapia está em acelerado crescimento (Oomah *et al.*, 1998).

2.2.2 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos pertencem a uma classe de compostos de grande diversidade de estruturas simples e complexas, que possuem pelo menos um anel aromático no qual, ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila. Dentre os compostos fenólicos pertencentes ao metabolismo secundário dos vegetais são encontradas estruturas tão variadas como a dos ácidos fenólicos, dos derivados das cumarinas, dos pigmentos hidrossolúveis, além

disso, essa classe de compostos abrange as ligninas e os taninos, polímeros com importantes funções nos vegetais (Carvalho *et al.*, 2000).

A maior parte dos compostos fenólicos não é encontrada no estado livre na natureza, mas sob a forma de ésteres ou heterosídeos, sendo, portanto, solúveis em água e solventes orgânicos polares. São muito reativos quimicamente e têm a propriedade de complexação com metais, formando quelatos importantes em diversos sistemas biológicos (Carvalho *et al.*, 2000).

O interesse por estes compostos, entre outros fatores, é devido ao fato de que são responsáveis pela coloração e aroma nos alimentos (Palma *et al.*, 2002), além de apresentarem um amplo espectro de atividades farmacológicas. Estes compostos atuam sobre a redução de arteriosclerose, de doenças coronarianas e de desordens dérmicas (Poudel *et al.*, 2008) Também possuem atividade antiinflamatória (Guerrero *et al.*, 2009), anti-carcinogênica (Negro *et al.*, 2003), anti-úlceras, anti-mutagênica (Nawaz *et al.*, 2006), bactericida e anti hepatotóxica, bem como, propriedades antioxidantes (Palma *et al.*, 2002; Pirniyazov *et al.*, 2003; Guerrero *et al.*, 2009) tanto para alimentos quanto para o organismo (Madhavan *et al.*, 2002).

São amplamente distribuídos no reino vegetal e são os metabólitos secundários mais abundantes encontrados em plantas (García-Marino *et al.*, 2006; Nawaz *et al.*, 2006; Köhler *et al.*, 2008), podendo ser facilmente extraídos de subprodutos de indústrias vinícolas em grandes quantidades, favorecendo sua aplicação como ingredientes de alimentos funcionais ou enriquecidos (Maier *et al.*, 2009).

Compostos fenólicos são encontrados principalmente nas camadas internas de cascas e sementes de uva, sendo que seu conteúdo na polpa é usualmente muito baixo. Sua concentração depende da variedade e é influenciada por fatores viticulturais e ambientais (Muñoz *et al.*, 2008) como luz, temperatura, altitude, água e tipo de solo, entre outros (Guerrero *et al.*, 2009).

Polifenóis derivados de uva tem recebido muita atenção devido aos seus inúmeros benefícios à saúde (Prokop *et al.*, 2006), sendo que o conteúdo de compostos fenólicos é um dos principais fatores responsáveis pela qualidade das uvas e do vinho (Guerrero *et al.*, 2009), acarretando um aumento do consumo de alimentos contendo estes compostos (Poudel *et al.*, 2008).

Polifenóis de uvas consistem principalmente de catequinas, procianidinas oligoméricas e poliméricas, antocianinas, ácidos fenólicos, resveratrol e seus derivados, flavonóis, flavononóis e flavonas (Sun & Spranger, 2005; Soares *et al.*, 2008). Compostos como catequina, epicatequina e procianidinas estão presentes em nossa dieta, tanto em alimentos quanto em bebidas, como vinhos tintos, chás e sucos de frutas (Freitas *et al.*, 2004).

A porcentagem de compostos fenólicos que podem ser extraídos de uvas são: 10% ou menos na polpa, 60-70% nas sementes e 28-35% nas cascas (Nawaz *et al.*, 2006; Hatzidimitriou *et al.*, 2007).

Independente da genética, o estagio de maturidade e o status de água, causam impacto no nível de compostos fenólicos, indicando que práticas culturais podem ser usadas para modificar a composição fenólica das uvas. O processo de extração também pode afetar o conteúdo fenólico das amostras estudadas (Iacopini *et al.*, 2008).

2.2.2.1 Taninos

Taninos são substâncias fenólicas solúveis em água com massa molecular entre 500 e 3000 Dalton, que apresentam a habilidade de formar complexos insolúveis em água com alcalóides, gelatinas e outras proteínas. Tradicionalmente são classificados segundo sua estrutura

química em dois grupos: taninos hidrolizáveis e taninos condensados (Oh & Hoff, 1979; Santos & Mello, 2000).

Os taninos hidrolizáveis são derivados biossinteticamente do ácido chiquímico. Caracterizam-se por um poliol central, geralmente β -D-glucose, cujas funções hidroxilas são esterificadas com o ácido gálico (Figura 3). São polifenóis de elevada massa molecular.

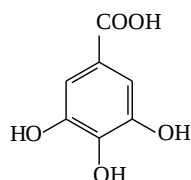


Figura 3: Estrutura do ácido gálico (Yilmaz & Toledo, 2004a).

Taninos condensados também são polifenóis de elevada massa molecular, denominados como proantocianidina ou procianidina, devido ao fato de produzirem pigmentos avermelhados da classe das antocianidinas. São formados pela ligação de unidades de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol (Figura 4), provenientes do metabolismo dos flavonóides (Santos & Mello, 2000; Yilmaz & Toledo, 2004a), assumindo a forma de oligômeros ou polímeros (Madhavan *et al*, 2002; Yamakoshi *et al.*, 2002; Segura *et al*, 2003; Martinez & Ashraf-Khorassani, 2004; Yilmaz & Toledo, 2004a; Bozan *et al.*, 2008).

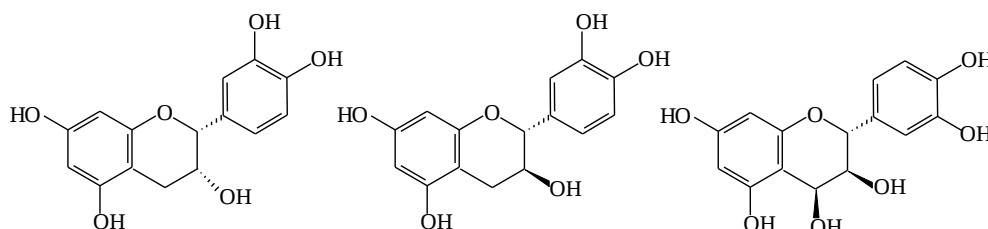


Figura 4: Estrutura da (-)-epicatequina, da (+)-catequina (flavan-3-ol) e da leucocianidina (flavan-3,4-diol) (Santos & Mello, 2000; Hagerman, 2002).

Os dímeros de procianidinas foram caracterizados através do nome trivial e divididos em dois grupos designados por A ($C_{30}H_{24}O_{12}$) e B ($C_{30}H_{26}O_{12}$). Procianidinas do grupo B (Figura 5) possuem uma ligação carbono-carbono entre C4 da “unidade superior” e C8 ou C6 da “unidade inferior”, enquanto que os representantes do grupo A (Figura 6) possuem complementarmente uma ligação do tipo éter (Murga *et al.*, 2000; Santos & Mello, 2000; Yang & Chien, 2000; Passos *et al.*, 2007; Köhler *et al.*, 2008; Spranger *et al.*, 2008).

Procianidinas são compostos amplamente disponíveis em frutos, vegetais, nozes, sementes, flores e cascas (Madhavan *et al.*, 2002; Yamakoshi *et al.*, 2002; Segura *et al.*, 2003; Martinez & Ashraf-Khorassani, 2004; Yilmaz & Toledo, 2004a; Bozan *et al.*, 2008).

Nas videiras, as procianidinas estão localizadas nas folhas, nos brotos (Sun & Spranger, 2005) e em todas as partes do cacho de uva, sendo que cascas e engaços contêm menores quantidades de proantocianidinas quando comparadas às sementes (Spranger *et al.*, 2008; Cosme *et al.*, 2009), e suas características estruturais também diferem (Cosme *et al.*, 2009). A explosão das pesquisas sobre procianidinas durante os últimos anos foi devido à hipótese de que elas são compostos chave responsáveis pelo efeito benéfico do vinho tinto (Sun & Spranger, 2005).

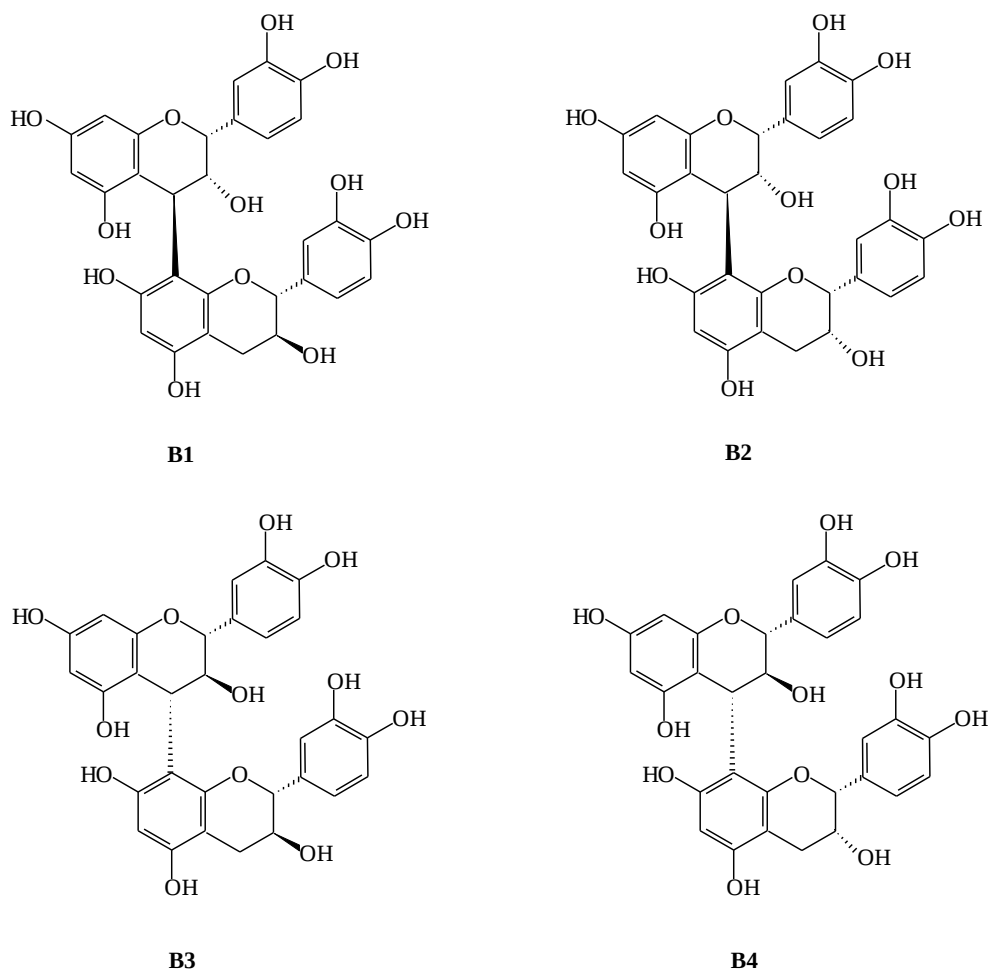


Figura 5: Estruturas de procianidinas B1 – epicatequina-(4β→8)-catequina; B2 - epicatequina-(4β→8)-epicatequina; B3 - catequina-(4α→8)-catequina; B4 - catequina-(4α→8)-epicatequina (Hagerman, 2002).

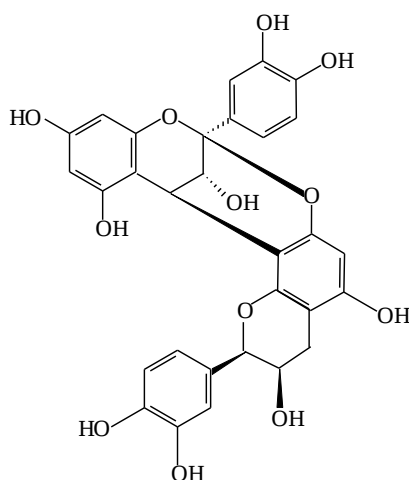


Figura 6: Estrutura da procianidina A2 – epicatequina-(2 β →7, 4 β →8)-epicatequina (Hagerman, 2002).

Sementes de uva são, particularmente, uma rica fonte de procianidinas perfazendo de 60 a 70% do conteúdo polifenólico da uva (Madhavan *et al*, 2002; Yamakoshi *et al.*, 2002; García-Marino *et al.*, 2006; Passos *et al.*, 2007). Baseado em informações quantitativas, monômeros de catequina e epicatequina parecem ser os dois principais compostos, com quantidades semelhantes, dependendo da variedade. Suas concentrações variam de uma a algumas poucas centenas de mg/100g de sementes secas (Hatzidimitriou *et al.*, 2007).

Segundo Iacopini e colaboradores (2008), em geral, catequina e epicatequina estão entre os principais compostos presentes em sementes de uva. Entre as numerosas proantocianidinas encontradas em sementes de uva, destacam-se, por sua abundância, o dímero procianidina B2 e o trímero procianidina C1. Outras procianidinas presentes em semente de uva são os dímeros procianidina B1, B3, B4 e A2, o trímero procianidina C2, o 3-O-galato de triepicatequina, a

tetraepicatequina (4 β -8) e a tetracatequina (4 β -6) (Segura *et al.*, 2003; Hatzidimitriou *et al.*, 2007).

Durante a vinificação, apenas uma parte das catequinas e procianidinas é extraída das sementes e difundida para o vinho (Hatzidimitriou *et al.*, 2007; Köhler *et al.*, 2008). O alto conteúdo remanescente torna o extrato de semente de uva uma rica fonte de antioxidantes. Este extrato exibe numerosas atividades farmacológicas interessantes, como redução ou inibição da absorção intestinal do colesterol e vaso dilatação, apresentando ainda propriedade antiinflamatória e atividades antiúlcera e antiviral (Palma & Taylor, 1999; Hong *et al.*, 2001; Kamangerpour *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2002; Madhavan *et al.*, 2002; Pirniyazov *et al.*, 2003; Ashraf-Khorassani & Taylor, 2004; Lee *et al.*, 2004; Martinez & Ashraf-Khorassani, 2004; Passos *et al.*, 2007). Podem ainda atuar contra oxidação da lipoproteína de baixa densidade - LDL (Palma & Taylor, 1999; Yang & Chien, 2000; Hong *et al.*, 2001; Baydar *et al.*, 2004) e proteger o organismo contra alguns tipos de câncer (Köhler *et al.*, 2008).

O reconhecimento dos benefícios à saúde, por parte das catequinas e das proantocianidinas, tem levado ao uso de extratos de sementes de uva como suplementação alimentar (Gómez-Alonso *et al.*; 2007; Cataneo *et al.*, 2008) aumentando o interesse em agregar valor a sementes descartadas sob forma de resíduos (Hatzidimitriou *et al.*, 2007; Köhler *et al.*, 2008).

A composição fenólica de uma variedade de uva depende das condições de extração e do material utilizado, como polpa, casca ou semente. Por exemplo, proantocianidinas são encontradas em maior quantidade nas sementes (Palma & Taylor, 1999; Ashraf-Khorassani &

Taylor, 2004), que contém ainda grande quantidade de ácido gálico e dos monômeros catequina e epicatequina (Yilmaz & Toledo, 2004b).

2.2.2.2 Estilbenos

Estilbenos (1,2-diariletenos) pertencem a uma classe não-flavônica de compostos fenólicos. Em geral, são considerados como fitoalexinas, que são componentes químicos das plantas de baixa massa molecular. Podem existir nas formas isoméricas *cis* e *trans* (Sun & Spranger, 2005; Sun *et al.*, 2006; Montsko *et al.*, 2008).

Estes compostos podem ser encontrados nas formas oligoméricas e poliméricas, chamados de ϵ -viniferina (resveratrol dimérico) e α -viniferina (resveratrol trimérico), entre outros. Entretanto, a forma principal de estilbeno encontrado é o resveratrol (3,4',5-trihidroxiestilbeno) (Sun *et al.*, 2006) que é principalmente encontrado em uvas e vinhos tintos, e é um dos mais importantes em termos de atividades biológicas (Abe *et al.*, 2007).

O resveratrol é sintetizado naturalmente na planta sob duas formas isômeras: *trans*-resveratrol e *cis*-resveratrol (Sun *et al.*, 2006), com suas estruturas representadas na Figura 7.

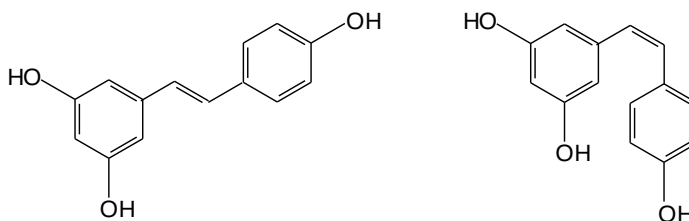


Figura 7: Estrutura do *trans*-resveratrol (esquerda) e *cis*-resveratrol (direita) (Sun & Spranger, 2005).

Dentre os compostos fenólicos das uvas, o resveratrol tem atraído atenção especial nas ultimas décadas em decorrência de estudos epidemiológicos que mostram correlação inversa entre o consumo moderado de vinho e a incidência de doenças cardiovasculares (Abe *et al.*, 2007).

Tanto vinhos brancos quanto vinhos tintos produzem subprodutos que podem ser interessantes como fontes de estilbenos (Sun *et al.*, 2006), visto que, uma quantidade considerável de resveratrol pode ser encontrada em cascas de uva, da mesma forma que pode ser encontrado em vinho, conhaque, vinagre e amendoim. Podendo também estar presente em sementes e engaços de uva, mas em pequenas quantidades (Montsko *et al.*, 2008; Sun & Spranger, 2005).

O resveratrol tem demonstrado diversas atividades biológicas, moldando o metabolismo de lipídeos, inibindo a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, reduzindo a agregação de plaquetas, tendo ainda, efeitos antiinflamatório, anti-tumoral e de proteção neuro-cardiovascular (Tena *et al.*, 1998; Iacopini *et al.*, 2008; Montsko *et al.*, 2008; Casazza *et al.*, 2010). Tem demonstrado prevenir a arteriosclerose, ter propriedades anti-carcinogênicas, e presumivelmente retardar o envelhecimento (Hung *et al.*, 2000; Henry-Vitrac *et al.*, 2006; Prokop *et al.*, 2006; Montsko *et al.*, 2008), além de ser antioxidante (Henry-Vitrac *et al.*, 2006).

Uvas produzem estilbenos em resposta a infecções fúngicas e estresse fisiológico. Se este estresse não está presente, os níveis de estilbenos em uvas permanecem baixos (Tena *et al.*, 1998; Iacopini *et al.*, 2008; Casazza *et al.*, 2010).

2.3 Extração de produtos naturais – compostos fenólicos e óleo fixo

Processos tradicionais de extração podem ser classificados em extração com solventes orgânicos (percolação, maceração e extração contínua usando aparelho tipo Soxhlet); e extração com água por infusão, decocção ou destilação por arraste a vapor (Yrjönem, 2004).

Até o presente momento, existe também um número de métodos de extração não-convencionais que vêm sendo usados na área de produtos naturais, principalmente extrações sólido-líquido mas com a introdução de alguma forma de energia adicional no processo para facilitar a transferência dos analitos da amostra para o solvente. Estes métodos incluem extração ultrassônica, extração assistida por microondas e extração líquida pressurizada. Um outro método que vêm recebendo crescente importância é a extração supercrítica que utiliza um líquido em seu estado supercrítico. A principal vantagem destes métodos não-convencionais comparados aos convencionais é o aumento da eficiência da extração conduzindo a um aumento de rendimento e/ou redução nos tempos de extração (Yrjönem, 2004).

2.3.1 Extração contínua a quente com aparelho tipo Soxhlet

Extração sólido-líquido de produtos naturais com diferentes solventes é uma das técnicas mais comumente usadas para isolamento destes compostos (Bucić-Kojić *et al.*, 2007). Entre as técnicas mais utilizadas para extração sólido-líquido, a extração com extrator Soxhlet é bastante utilizada em análise vegetal (Yrjönem, 2004).

O processo de extração consiste no tratamento sucessivo da amostra imersa em um solvente, graças à sifonagem e subsequente condensação do solvente aquecido (Brum *et al.*, 2009). A principal vantagem desta técnica é que é um método contínuo que não requer muita manipulação, também é muito efetiva em termos de rendimento de extração e, portanto, muitas

vezes usado como método de referencia para novos métodos de extração. Uma desvantagem é que o material é aquecido durante a extração até o ponto de ebulição do solvente empregado, e compostos termicamente lábeis podem hidrolisar, decompor ou produzir artefatos (Yrjönem, 2004). Outras desvantagens são a inflamabilidade dos solventes orgânicos e a emissão de gases durante a extração. Além disso, o uso de solventes orgânicos pode levar a contaminação do produto por resíduos do solvente (Sahena *et al.*, 2009).

2.3.2 Extração por Dióxido de Carbono Supercrítico - SFE

Métodos comuns de extração para remoção de compostos de interesse a partir de sementes de uva usam, tradicionalmente, solventes orgânicos e os tempos de extração variam de poucos minutos a algumas horas (Ashraf-Khorassani & Taylor, 2004; Martinez & Ashraf-Khorassani, 2004).

O alto custo dos solventes orgânicos, o rigoroso aumento das regulações ambientais e as novas exigências das indústrias médicas e alimentícias por produtos ultra-puros e com alto valor agregado, tem aumentado a necessidade do desenvolvimento de novas tecnologias limpas para o processamento de produtos alimentícios. Extração com dióxido de carbono supercrítico tem atraído atenção nos últimos anos como uma alternativa promissora a extração convencional por solvente e a prensagem mecânica para extração de óleo e outros compostos de interesse (Sahena *et al.*, 2009).

Processos de extração de produtos naturais que usam fluídos supercríticos vem sendo estudados e usados em escala laboratorial, piloto e industrial, para isolar produtos naturais, desde décadas passadas (Murga *et al.*, 2000; Yrjönem, 2004; Herrero *et al.*, 2010).

Quando comparados aos métodos convencionais de extração e separação, fluídos supercríticos apresentam características e vantagens importantes que justificam o interesse por este tipo de processo: o elevado potencial de solubilização de compostos orgânicos de médias e elevadas massas moleculares em relação a solubilidade dos mesmos fluídos na fase vapor; as baixas temperaturas críticas, o que permite a extração de compostos termo sensíveis, sem que ocorra alteração nas propriedades dos compostos extraídos; a eficiência energética do processo, que opera à baixas temperaturas quando comparado com processos tradicionais de extração; e a facilidade de separação solvente/soluto (Pansera, 2002; Yrjönem, 2004). Além disso, a ausência de luz e ar durante a extração pode reduzir o processo de degradação que ocorre em outras técnicas de extração (Ashraf-Khorassani & Taylor, 2004; Martinez & Ashraf-Khorassani, 2004).

O dióxido de carbono (CO_2) possui uma baixa temperatura crítica ($30,4^\circ\text{C}$) e uma pressão crítica moderada (72,8 bar), sendo um solvente ideal para compostos que podem sofrer degradação térmica. O CO_2 cria um meio sem oxigênio, onde as reações de oxidação podem ser evitadas (Murga *et al.*, 2000), além de ser um solvente inerte, atóxico e ambientalmente seguro (Ghafoor *et al.*, 2010). Algumas moléculas de flavan-3-ol, como epicatequina, são solúveis em CO_2 supercrítico e sua solubilidade aumenta quanto é modificado com pequenas quantidades de etanol (Murga *et al.*, 2000).

As propriedades mais importantes da extração por fluídos supercríticos são a densidade, a viscosidade, a difusividade, a capacidade de aquecimento e a condutividade térmica. As altas densidades contribuem para a grande solubilização dos compostos, enquanto baixas viscosidades permitem a penetração nos sólidos e permitem o fluxo com menor atrito (Sahena *et al.*, 2009).

Sabe-se que a solubilidade de substâncias polares em solventes apolares, como o CO₂ é muito baixa; porém, se uma pequena quantidade de algum cossolvente polar é adicionada, a solubilidade dos solutos polares pode ser aumentada significativamente (Murga *et al.*, 2000; Yrjönm, 2004; Herrero *et al.*, 2010). O cossolvente pode ser selecionado por interagir fortemente com os solutos de interesse para facilitar sua extração. Neste sentido, metanol e etanol são capazes de formar pontes de hidrogênio e interações dipolo-dipolo com fenóis, que indica que eles podem ser bons cossolventes do CO₂ (Murga *et al.*, 2000; Yrjönm, 2004) para extração de compostos fenólicos de sementes de uva (Murga *et al.*, 2000).

O CO₂ supercrítico é um promissor solvente de extração e fracionamento de óleos comestíveis ricos em ácidos graxos insaturados, visto que a extração pode ser realizada a baixas temperaturas (Cao & Ito, 2003). Além disso, extração com fluídos supercríticos oferece outros aspectos favoráveis sobre as técnicas tradicionais, como destilação a vapor e extração com solventes, devido ao fato de usar um solvente puro, relativamente barato, não inflamável e atóxico (Murga *et al.*, 2000; Cao & Ito, 2003).

As propriedades de solvatação do dióxido de carbono supercrítico podem variar sobre uma extensa faixa, pela modificação da pressão e da temperatura. Esta propriedade pode ser utilizada a fim de se realizar uma extração altamente seletiva de compostos de interesse a baixas temperaturas e sem a adição de solventes orgânicos (Pansera, 2002), possuindo assim, vantagens quando comparado a solventes líquidos, como a seletividade ou poder de solvatação ajustável, podendo ter seus valores modificados para estado gasoso ou líquido (Murga *et al.*, 2000).

2.4 Métodos analíticos – compostos fenólicos e óleo fixo

Os métodos analíticos compreendem diferentes técnicas e métodos que visam caracterizar a natureza e determinar a composição de amostras de diferentes origens, em termos de elementos, espécies ou agrupamentos de átomos ou moléculas (Cienfuegos & Vaitsman, 2000).

2.4.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A cromatografia líquida é uma técnica usada para a separação dos componentes de uma amostra, os quais se distribuem em duas fases, uma estacionária que pode ser sólida ou líquida, e a outra móvel que é líquida (Cienfuegos & Vaitsman, 2000).

O emprego das primeiras técnicas acopladas à cromatografia líquida de alta eficiência abriu a possibilidade do uso de diferentes sistemas de detecção, como ultravioleta (UV), infravermelho (IV), eletroquímico, fluorescência, entre outros, possibilitando a análise de matrizes não-voláteis e de alta massa molecular (Pinto *et al.*, 2002).

A cromatografia líquida de alta eficiência utiliza pequenas colunas cheias de materiais especialmente preparados e fase móvel submetida a altas pressões. O sistema cromatográfico é composto por um reservatório para a fase móvel; uma ou mais bombas de alta pressão, responsáveis pelo bombeamento da fase móvel líquida; um injetor, por onde se introduz a amostra; um detector, que recebe e fornece o sinal que representa a quantidade do componente de interesse no eluente da coluna; e por uma coluna que pode ter diferentes tipos de enchimentos, tamanhos e formas de partículas (Cienfuegos & Vaitsman, 2000).

As principais vantagens desta técnica são a rapidez de análise, a alta eficiência, a reprodutibilidade, a sensibilidade e a possibilidade de automação (Cienfuegos & Vaitsman,

2000). Contudo, a necessidade de uma maior informação estrutural de cada componente das matrizes analisadas levou ao desenvolvimento de técnicas acopladas mais modernas, como o acoplamento do HPLC com espectrômetro de massas (MS) e com ressonância magnética nuclear (RMN). A maior limitação do uso deste equipamento é a baixa concentração do analito e o alto custo dos solventes (Pinto *et al.*, 2002).

Cromatografia líquida de alta eficiência vem sendo usada para análises qualitativas e quantitativas de ácidos nucléicos, pesticidas, aromáticos polinucleados, polímeros, lipídeos, aminoácidos, carboidratos, entre outros (Cienfuegos & Vaitsman, 2000). Também vem recebendo crescente importância para a análise de extratos vegetais, podendo ser uma ferramenta muito útil na análise de metabólitos secundários como flavonóides (Oliveira *et al.*, 2001), e resveratrol, que tem sido determinado a partir de vinhos, sucos, bagas e subprodutos de indústrias vinícolas por HPLC (Tena *et al.*, 1998; Montsko *et al.*, 2008). Também é um método eficiente na separação e quantificação de α -tocoferol (Rios & Penteado, 2003; Schwartz *et al.*, 2008).

Segundo Freitas e colaboradores (2008), as análises de amostras de óleo por cromatografia líquida de fase reversa, sem o uso de saponificação ou de passos de derivação, permitem a quantificação de α -tocoferol em óleo de sementes de uva com alta precisão e de uma forma direta.

Houveram aumentos no número de pesquisas envolvendo HPLC na análise de procianidinas diméricas e triméricas, comprovando várias atividades biológicas (Sun *et al.*, 1999), sendo uma técnica efetiva, também, na análise de monômeros de procianidinas (Peng *et al.*, 2001). É o método mais comum usado para estudar procianidinas (Yang & Chien, 2000).

2.4.2 Cromatografia Gasosa (GC)

Cromatografia gasosa é um processo de análise imediata por migração diferencial dos componentes de uma mistura, dentro do sistema cromatográfico. Apresenta como princípio a separação dos componentes de um líquido, o qual é volatilizado em uma coluna cromatográfica. A mesma é formada por uma fase estacionária (ou fixa), onde se processa a separação da amostra, visto que alguns compostos são adsorvidos, enquanto outros são arrastados pela fase móvel que é composta normalmente pelos gases hidrogênio ou hélio. Os componentes são separados devido à diferença dos coeficientes de partição, isto é, os compostos que apresentam maior afinidade com a fase estacionária saem depois na coluna cromatográfica (Serafini & Cassel, 2001).

Tem por finalidade identificar os componentes da amostra. O parâmetro utilizado é o tempo de retenção, que é o tempo transcorrido desde a injeção da amostra até o máximo do pico gerado. Na análise quantitativa a área de cada pico no cromatograma é proporcional à concentração do componente na amostra e usada na determinação da concentração de um ou mais componentes de uma mistura (Cienfuegos & Vaitsman, 2000).

Um sistema cromatográfico básico é constituído de cilindro com gás de arraste, controladores de pressão e vazão, injetor, forno com colunas, detector e registrador. O sistema de injeção da amostra permite a introdução de amostras líquidas ou gasosas no sistema cromatográfico. Para conduzir a amostra através da coluna até o detector utiliza-se o hélio ou hidrogênio como gás de arraste. A coluna é o coração do sistema cromatográfico, pois é nela que ocorre a separação dos componentes presentes na amostra. O detector indica e mede a quantidade dos componentes individuais separados na coluna cromatográfica (Cienfuegos & Vaitsman, 2000).

Atualmente, a possibilidade do emprego de técnicas acopladas pode ajudar, em parte, os estudos em produtos naturais. O grande avanço na análise destas misturas decorreu do desenvolvimento de equipamentos de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (Pinto *et al.*, 2002). Na cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, o espectro de massa de cada componente é detectado e a partir dos dados obtidos é possível identificar o composto químico referente ao pico obtido (Serafini & Cassel, 2001).

Este método permite, como na GC, a separação dos componentes e fornece, ainda, um espectro de massas para cada pico, o qual geralmente indica a massa molecular e o padrão de fragmentação que pode ser comparado com aqueles constantes da espectroteca de aquisição (Simões & Spitzer, 2000), a qual pode apresentar cerca de 300.000 componentes (Serafini & Cassel, 2001). Em alguns segundos, o espectro da amostra é comparado com os das substâncias da espectroteca e o computador faz propostas da probabilidade quanto à identidade da substância analisada. É normal que quase sempre sobre picos que não podem ser identificados, sendo necessários outros métodos analíticos para elucidação estrutural de tais compostos (Simões & Spitzer, 2000).

2.4.3 Métodos Espectrofotométricos

Os espectrofotômetros são equipamentos de composição avançada que utilizam prismas ou redes de difração na seleção da região desejada do espectro eletromagnético. Muitos deles fazem medições nas porções do espectro correspondentes ao ultravioleta (UV), visível (VIS) e infravermelho (IV). São empregados na faixa compreendida entre 200 e 1000nm. Um espectrofotômetro UV-VIS é formado basicamente por uma fonte de energia que pode ser um tubo de descarga de hidrogênio ou uma lâmpada de deutério; um monocromador que dispersa a

luz proveniente da fonte; um fotômetro que é o sistema de lentes; formado também pela área da amostra onde é colocada a cubeta com as soluções; e por um detector. A concentração do soluto é calculada pela luz absorvida e comparada com a absorbância de uma solução padrão, segundo a Lei de Lambert-Beer (Cienfuegos & Vaitsman, 2000).

Procedimentos espectrofotométricos como os ensaios vanilina/HCl, butanol/HCl e Folin-Ciocalteu, tem sido geralmente utilizados para a determinação de proantocianidinas em gêneros alimentícios (Nakamura *et al.*, 2003). A presença de proantocianidinas em tecido vegetal tem sido tradicionalmente determinada por sua conversão a antocianidina em solução ácida aquecida (Porter *et al.*, 1986).

Ensaio comuns para a quantificação de polifenóis são baseados na habilidade destes compostos de formar complexos com proteínas, para formar produtos despolimerizados. Alguns ensaios reagem com todas as classes de polifenóis, enquanto outros, apenas reagem com classes específicas, como proantocianidinas, galotaninos ou elagitaninos (Yu & Dahlgren, 2000).

Classicamente o conteúdo de procianidinas é determinado por um, dos vários métodos colorimétricos. O método butanol/HCl que é bastante popular nas indústrias alimentícias, foi desenvolvido baseado na degradação ácida de procianidinas à cianidinas de coloração vermelha (Waterhouse *et al.*, 2000). Outros ensaios espectrofotométricos também são comumente utilizados na indústria alimentícia, especialmente o teste de Folin-Ciocalteu para fenólicos totais, e o teste vanilina/HCl para flavonóides. O teste de Folin-Ciocalteu não é específico para procianidinas, ele responde por mais tipos de fenóis com variados graus de sensibilidade. O teste vanilina/HCl é específico para flavonóides e é usado na determinação de catequinas e procianidinas (Yang & Chien, 2000).

O método de Folin-Ciocalteu é bastante utilizado para estimar quantidades de fenólicos totais em tecidos vegetais. Este método emprega um reagente espectrofotométrico (fosfomolibdico-fosfotúngstico) que mede a habilidade do material fenólico da amostra para reduzi-lo e produzir uma resposta espectrofotométrica a 765nm, baseando-se em uma reação de óxido-redução (Appel *et al.*, 2001; Waterhouse *et al.*, 2000). Embora existam interferências, é um método que está bem descrito e estabelecido. A resposta espectrofotométrica é comparada a uma curva padrão baseada em ácido gálico, e o resultado final é expresso em equivalentes de ácido gálico (EAG). Este é um método geral para medir a massa de fenólicos em sementes de uva (Waterhouse *et al.*, 2000).

O método de hidrólise com butanol/HCl é referido como o melhor para determinação de taninos condensados em função da alta seletividade, não detectando taninos hidrolizáveis (Agostini-Costa *et al.*, 2003; Herderich & Smith, 2005). Neste método os taninos condensados são aquecidos em butanol e HCl (95:5 v/v). Sob estas condições, os taninos condensados são depolimerizados para formar subunidades individuais, que são então oxidadas à antocianidinas, que tem coloração vermelha em meio ácido (Herderich & Smith, 2005). A coloração vermelha é quantificada por absorbância a 550nm (Waterhouse *et al.*, 2000). O desenvolvimento da cor é dependente do solvente e é reduzido pela presença de água, sendo que as condições da reação precisam ser rigorosamente controladas (Agostini-Costa *et al.*, 2003).

Sulfato ferroso amoniacal pode ser adicionado a reação para catalizar a hidrólise ácida a fim de melhorar a conversão de procianidina à antocianidina e reduzir a variabilidade do ensaio. O método butanol/HCl é um procedimento comum para a análise de extratos de sementes de uva (Waterhouse *et al.*, 2000).

Embora o reagente da vanilina detecte tanto flavonóides monoméricos quanto poliméricos, ele é específico para uma classe limitada de compostos que apresentam uma ligação simples na posição 2, 3 e grupos hidroxila em posições alternadas no anel A (Agostini-Costa *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2003). Neste ensaio, a vanilina é protonada em uma solução ácida, reagindo com o anel do tanino na posição 6 ou 8. Este composto intermediário é desidratado para formar um composto vermelho (Nakamura *et al.*, 2003). Catequinas e proantocianidinas reagem com a vanilina na presença de ácido para produzir um produto de condensação vermelho. A catequina comercial é empregada como padrão (Agostini-Costa *et al.*, 2003).

2.5 Ácidos graxos, tocoferol e compostos fenólicos em *Vitis* sp.

Nas últimas décadas, vêm sendo realizados estudos em relação à extração e análise de óleo e compostos fenólicos de sementes de *Vitis* sp. O óleo de sementes de uva vem sendo estudado devido a sua composição química, visto ser rico em ácidos graxos insaturados, principalmente ácido linoleico, além da presença de α -tocoferol.

Cao & Ito (2003) analisaram óleo de sementes de uva através da variação de parâmetros como pressão (200, 250 e 300bar), temperatura (35, 40 e 45°C) e tamanho de partícula 10/20, 20/40 e 40/60mesh) em extrator supercrítico (SFE), obtendo como rendimento máximo 5,1% com 300bar, 35°C e 20/40mesh. O óleo foi submetido à separação dos ácidos graxos insaturados, que foram identificados por cromatografia gasosa (GC) como ácidos linoleico (48 - 63,2%), oleico (9,4 - 14,2%), palmítico (3,4 - 4,9%), e esteárico (1,3 - 2,3%). Em um teste posterior, a pressão foi aumentada de 300 para 400bar e a temperatura de 35 para 40°C, resultando num rendimento de óleo de 6,2% e 55,9% de ácido linoleico, 12,9% de ácido oleico, 2,8 de ácido palmítico e 1,4% de ácido esteárico, em um tempo de 3h de extração. Posteriormente, esta mesma

amostra foi extraída com CO₂ supercrítico acrescido de 10% de cossolvente etanol por 2h, sendo que 4,0% mais de óleo de mesma composição foi obtido. Um terceiro experimento foi a comparação de SFE com Soxhlet (300mL de hexano por 6h) onde o rendimento de óleo foi de 10,6% para partículas de 20/40mesh e a composição foi de 57,1% de ácido linoleico, 13,8% de ácido oleico, 3,1 de ácido palmítico e 1,4% de ácido esteárico.

Beveridge e colaboradores (2005) realizaram extração de óleo de semente de uva em SFE a partir de oito variedades. As condições utilizadas foram 370bar de pressão, 65°C de temperatura e 6 horas de extração, onde o rendimento de óleo variou de 5,85% a 13,60%. As análises de ácidos graxos foram realizadas em GC e indicaram a presença de oito ácidos graxos comuns às oito variedades analisadas, sendo que o ácido graxo com maior concentração foi o ácido linoleico, que variou de 67,56% a 73,23%. Paralelo a este estudo, os autores realizaram extração das mesmas variedades com éter de petróleo, obtendo rendimentos de óleo que variaram de 6,64% a 11,17%, além de uma composição de ácidos graxos semelhante àquela obtida por SFE, onde a variação de concentração de ácido linoleico foi de 66,76% a 73,61%.

Sementes de uva do tipo Airen foram analisadas por Gómez e colaboradores (1996). O óleo das sementes desta variedade foi extraído por SFE e por Soxhlet e as análises foram realizadas em GC. Em Soxhlet, o solvente utilizado foi hexano e o tempo de extração foi de 20h, resultando em um rendimento de 7,5%, já para SFE, as melhores condições de extração foram 350bar de pressão, 40°C e 3 horas de extração, resultando em 6,9% de óleo. A composição química dos óleos extraídos em ambas as metodologias apresentou seis ácidos graxos, palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico, linoleico e linolênico, sendo que a maior concentração foi obtida com o ácido linoleico, que foi de 66,16% extraído em Soxhlet e de 67,39% em SFE.

Freitas e colaboradores (2008) avaliaram a presença de α -tocoferol no óleo de seis variedades de *Vitis* sp. extraído em Soxhlet com hexano. As concentrações variaram de 0,10mg de α -tocoferol/100g de óleo a 3,79mg de α -tocoferol/100g de óleo

Mattick & Rice (1976) avaliaram o rendimento de óleo e a concentração de ácidos graxos de cinco variedades de uvas tintas e de cinco variedades de uvas brancas utilizando éter de petróleo para a extração em Soxhlet. Os rendimentos obtidos variaram de 13,45% a 16,5% nas uvas brancas e de 13,02% a 18,41% nas uvas tintas. A composição de ácidos graxos foi avaliada em GC e apontou a presença dos ácidos mirístico, palmítico, esteárico, oleico, linoleico e linolênico. A concentração de ácido linoleico variou de 66,85% a 73,93% nas variedades brancas e de 69,69% a 77,78% nas variedades tintas.

Doze variedades de uvas viníferas e seis variedades de uvas de mesa foram analisadas por Baydar & Akkurt (2001) através de cromatografia gasosa, apontando a presença de ácido palmítico, esteárico, oleico, linoleico, linolênico e eicosenóico. O ácido graxo presente em maior concentração foi o ácido linoleico, que variou de 60,1% a 70,1% nas 18 variedades analisadas. O rendimento de óleo apresentou valores de 11,6% a 19,6%.

Bail e colaboradores (2008) analisaram nove óleos comerciais de sementes de uva quanto à composição fenólica total, pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu e obtiveram concentrações de 59 μ g a 115,5 μ g de equivalentes de ácido gálico/g de óleo de sementes de uva.

Os extratos de sementes de uva também vêm sendo muito estudados devido à presença de compostos fenólicos, antioxidantes naturais. Diversos autores estudaram extratos de sementes de diferentes variedades de *Vitis* sp, sendo que os métodos mais utilizados para extração foram

Soxhlet e extração supercrítica, e, os métodos de análise da composição dos extratos foram HPLC e métodos espectrofotométricos como Folin-Ciocalteu, Butanol/HCl e Vanilina/HCl.

Extração a quente com extrator Soxhlet foi utilizada por Baydar e colaboradores (2004), para sementes moídas de *Vitis vinifera* var. Narince. Para a obtenção do óleo fixo, foi empregado éter de petróleo como solvente, por um período de 6h, apenas para desengordurar o material, após, as sementes foram reextraídas com duas misturas de solventes, acetona:água:ácido acético (90:9,5:0,5) por 8h, e acetato de etila:metanol:água (60:30:10) também por 8h. Os rendimentos dos extratos foram de 15,31% e 16,21% respectivamente. Os fenólicos totais foram quantificados pelo método de Folin-Ciocalteu, onde, para o extrato feito a partir de acetona:água:ácido acético, o rendimento de fenólicos totais foi de 667,87 $\pm$ 9,04mg de equivalentes de ácido gálico/g de extrato bruto e para o extrato de acetato de etila:metanol:água foi de 627,98 $\pm$ 8,09mg de equivalentes de ácido gálico/g de extrato bruto.

Ashraf-Khorassani & Taylor (2004) realizaram estudos com sementes moídas de uva da variedade Chardonnay em extrator supercrítico, onde o primeiro passo foi a remoção do óleo que obteve rendimento máximo de 10% com 80°C, 650bar de pressão, fluxo de CO₂ de 2mL/min e tempo de extração de 1h. Após, o material foi reextraído utilizando CO₂ com 40% de cossolvente metanol nas mesmas condições. A identificação da composição química dos extratos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas (HPLC/MS), tendo como compostos identificados, fenólicos monoméricos como catequina (3,34mg/g) e epicatequina (4,9mg/g), além de dímeros e trímeros de proantocianidinas.

Murga e colaboradores (2000) analisaram um concentrado comercial de sementes de uva rico em fenólicos complexos utilizando extrator supercrítico e cossolventes etanol e metanol. O volume dos co-solventes foi variado de 2 a 15%, o fluxo de CO₂ foi de 0,5mL/min, 40°C de

temperatura, 200 ou 300 bar de pressão e 2h de extração. Nessas condições e com 15% de cossolvente metanol a 300 bar, foi extraído o maior número de compostos e em concentrações mais elevadas. A análise dos compostos extraídos foi realizada em HPLC/MS identificando alguns compostos como catequina (22,63mg/g), epicatequina (11,66mg/g), ácido gálico (99,73mg/g), procianidinas diméricas B1 (0,44mg/g), B2 (0,40mg/g) e B3 (0,06mg/g), entre outros.

Palma & Taylor (1999) testaram diferentes parâmetros de extração de compostos fenólicos de sementes moidas de uvas da variedade Chardonnay em extrator supercrítico. Os melhores parâmetros foram fluxo de CO₂ de 1mL/min, tempo de equilíbrio de 20min, temperatura de 55°C, densidade de CO₂ de 0,95g/mL e 10% de cossolvente metanol. Ácido gálico, catequina e epicatequina foram os principais compostos fenólicos identificados em HPLC nos diferentes extratos.

Waterhouse e colaboradores (2000) analisaram diferentes extratos de sementes de uva adquiridos comercialmente utilizando métodos espectrofotométricos como Butanol/HCl e Folin-Ciocalteu além de cromatografia líquida. Foram quantificadas as proantocianidinas em 5 a 30% de monômeros, 17 a 63% de oligômeros, 11 a 39% de polímeros e 2 a 50% de polímeros de cadeias longas. Li e colaboradores (2002) também analisaram extratos comerciais de sementes de uva por HPLC/MS utilizando combinações de acetonitrila, metanol e água como eluentes. O conteúdo de (+)-catequina, (-)-epicatequina e (-)-epicatequina galato foi de 4,48%, 3,08% e 0,63% respectivamente. Outros compostos como ácido gálico, procianidinas B2 e B4 também foram identificados, mas não quantificados.

O método espectrofotométrico Vanilina/HCl foi utilizado por Nakamura e colaboradores (2003) para analisar quantitativamente as proantocianidinas de extratos comerciais de sementes

de uva. HPLC com coluna de fase reversa foi utilizado para a identificação dos compostos presentes nos extratos, sendo eles, ácido gálico (0,02 – 2,06%), catequina (1,03 – 4,93%), epicatequina (0,61 – 2,83%) e procianidinas B1 (0,69 – 1,73%), B2 (0,66 – 1,54%) e C1 (0,40 – 1,26%).

Yang & Chien (2000) utilizaram HPLC/MS para identificação de compostos presentes nos extratos - macerados com acetona:água (50:50) - de sementes inteiras de uvas, sendo detectados catequina, epicatequina, procianidinas diméricas e seus derivados galoilados.

Cromatografia líquida de alta eficiência foi empregada na análise de sementes de *Vitis vinífera* var. Tempranillo, var. Graciano e var. Cabernet Sauvignon, tendo como compostos identificados monômeros (catequina e epicatequina), dímeros (B1, B2, B3 e B4) e trímeros (C1 e T2) de procianidinas, além de dímeros galatos (B2-3-O-galato, B2-3'-O-galato e B1-3-O-galato). A concentração total de flavan-3-ol foi de 2,30 mg/g em Tempranillo, 7,82 mg/g em Graciano e 8,21mg/g em Cabernet Sauvignon (Monagas *et al.*, 2003).

Santos-Buelga e colaboradores (1995) fizeram uma comparação da composição química de flavan-3-ol em 27 amostras de sementes de uva de 17 diferentes variedades. A extração de flavan-3-ol foi realizada com o uso de metanol aquoso acrescido de 0,5g/L de ácido ascórbico e a análise destes compostos foi realizada em HPLC. Foram identificados cerca de 24 compostos variados, entre eles ácido gálico, catequina e epicatequina, sendo que as diferenças na composição das variedades estudadas podem ser devidas as particularidades de cada variedade.

Sementes e cascas de uvas das variedades Chardonnay, Muscadine e Merlot foram analisadas por HPLC sendo que as concentrações de ácido gálico, catequina e epicatequina foram de, respectivamente, 99, 12 e 96mg/100g de sementes secas de Muscadine, 15, 358 e 421mg/100g de sementes secas de Chardonnay e 10, 127 e 115mg/100g de sementes secas de

Merlot. As concentrações destes três compostos foram encontradas em menor quantidade nas cascas do que nas sementes (Yilmaz & Toledo, 2004b).

Cromatografia líquida de alta eficiência foi utilizada por Saucier e colaboradores (2001) para analisar extrato bruto de tanino, obtido de sementes de *Vitis vinifera* var. Merlot. Com o uso de metanol como solvente de eluição foi detectada a presença de 62,2% de (-)-epicatequina, 24,2% de (+)-catequina e 13,4% de epicatequina galato.

Para a purificação dos compostos presentes nos extratos de sementes de uva, alguns autores utilizam cromatografia de coluna. Oh & Off (1979) avaliaram extratos comerciais de uva por cromatografia líquida de coluna. Os extratos foram eluídos com diferentes proporções de tampão acetato (pH 4,0, 4,5 e 6,0) e n,n-dimetilformamida, e fracionados por afinidade cromatográfica em nove frações diferentes que foram submetidas aos testes espectrofotométricos, Butanol/HCl para antocianidinas e Vanilina/HCl para leucoantocianidinas. As frações contendo maiores quantidades de taninos foram identificadas como VI com 48%, VII com 11% e IX com 28%.

Pirniyazov e colaboradores (2003) investigaram os compostos fenólicos de sementes de *Vitis vinifera* a partir de extrato com acetato de etila, que teve como rendimento 5,1%, e extrato butanólico com 3,8% de rendimento. Para o extrato com acetato de etila a separação dos compostos fenólicos foi feita por cromatografia em coluna com diferentes proporções de éter etílico e acetato de etila como eluentes para a obtenção de (+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epicatequina galato e (+/-)-galocatequina. O extrato butanólico foi cromatografado com acetona:água (1:1) para o isolamento de (+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epicatequina galato e (+/-)-galocatequina, e das proantocianidinas 1 ($C_{86}H_{78}O_{43}$) e 2 ($C_{102}H_{85}O_{52}$). Para a confirmação

das estruturas foram feitos ponto de ebulição, densidade óptica, desvio polarimétrico, ressonância magnética nuclear e infravermelho.

Peng e colaboradores (2001) utilizaram em seu estudo sementes de três variedades diferentes de *Vitis vinifera* – Shiraz, Pinot Noir e Muscat. Os extratos foram obtidos com etanol:água (70:30), cromatografados em coluna e eluídos com metanol 60% acrescido de 0,2% de ácido fórmico para separar a fração com monômeros e oligômeros de procianidinas, já para as procianidinas poliméricas, foi utilizada acetona 60% acrescida de 0,2% de ácido fórmico. A análise dos compostos foi realizada por HPLC/MS identificando 13 picos correspondentes a ácido gálico, catequina, epicatequina, dímeros, trímeros e tetrâmeros de procianidinas com pequenas variações entre as variedades.

Sun e colaboradores (1999) isolaram e purificaram procianidinas de baixo peso molecular de sementes moídas de *Vitis vinifera* var. Fernão Pires, utilizando cromatografia em coluna obtendo nove frações. Os eluentes foram água para eliminar os ácidos fenólicos, acetato de etila para eluir catequinas e procianidinas oligoméricas e metanol para as procianidinas poliméricas. A análise em HPLC revelou a presença de (+)-catequina e (-)-epicatequina na fração 3; procianidinas B1, B2, B3 e B4 na fração 4; procianidinas B1, B2, B3, B4, B2-3-O-galato e T2 na fração 5; procianidinas T2, B2-3-O-galato e C1 na fração 6; e procianidinas B2-3'-O-galato e B1-3-O-galato na fração 7.

Bozan e colaboradores (2008) analisaram a composição fenólica de sementes de 11 variedades de uva com o uso das técnicas de HPLC, e de Folin-Ciocalteu. Os resultados obtidos foram: de 20,68% a 29,87% de rendimento de extrato, de 79,2mg a 139,4mg de equivalentes de ácido gálico/g de sementes, de 4,7mg a 25,8mg de catequina/g de sementes e de 2,49mg a 16,88mg de epicatequina/g de sementes.

Dez variedades de *Vitis vinifera* foram avaliadas quanto a sua composição fenólica por Iacopini e colaboradores (2008). A análise de fenólicos totais resultou em concentrações que variaram de 50,33mg a 87,08mg de equivalentes de ácido gálico/g de sementes. A análise por HPLC resultou na quantificação de compostos como catequina (0,603mg a 2,057mg/g de sementes) e epicatequina (0,472mg a 2,057mg/g de sementes).

O ensaio colorimétrico de Folin-Ciocalteu e o método cromatográfico de HPLC foram usados por Guendez e colaboradores (2005) para avaliar os compostos fenólicos presentes em sementes de nove variedades de *Vitis vinifera*. A concentração de equivalentes de ácido gálico variou de 1,43mg a 22,28mg/g de sementes. Foram obtidas concentrações de catequina e epicatequina, entre outros compostos fenólicos, que variaram de 0,367mg a 4,54mg/g de sementes para catequina e de 0,175mg a 2,49mg/g de sementes para epicatequina.

Bucić-Kojić e colaboradores (2007) avaliaram a composição fenólica de sementes de uvas brancas com o uso do reagente de Folin-Ciocalteu obtendo de 14,72mg a 66,81mg de equivalentes de ácido gálico/g de sementes de uva.

HPLC e Folin-Ciocalteu foram utilizados por Maier e colaboradores (2009) para analisar sete variedades de *Vitis vinifera*. A análise por HPLC resultou na identificação de monômeros, oligômeros e polímeros de procianidinas, entre eles, catequina (0,88mg a 4,64mg/g de sementes) e epicatequina (1,23mg a 6,12mg/g de sementes). A concentração de fenólicos totais variou de 107,4mg a 226mg de equivalentes de ácido gálico/g de sementes.

Delaunay e colaboradores (2002) empregaram cromatografia de coluna em extrato preparado com acetato de etila das sementes de *Vitis vinifera*. Obtiveram três frações, uma hexânica com aproximadamente 75% de estruturas monoméricas, catequina e epicatequina,

correspondendo a 18% do extrato bruto, outra de acetato de etila que apresentou ácido gálico e uma terceira de etanol, contendo 42% de dímeros de procianidinas (B1, B2, B3 e B4).

Santos e colaboradores (2004) testaram diferentes metodologias de extração de compostos fenólicos de sementes de *Vitis labrusca*. Extração a quente em extrator Soxhlet utilizando metanol como solvente de extração, maceração com metanol, hidrossolubilização e extração com CO₂ supercrítico e cossolvente água. A quantificação dos extratos foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu e os melhores resultados ocorreram em hidrossolubilização e extração com CO₂ supercrítico, com rendimento de 5,43mg de fenólicos totais/g de extrato bruto e 4,2mg de fenólicos totais/g de extrato bruto, respectivamente.

Diversos estudos com sementes de uva vêm sendo realizados, sendo que a grande maioria destes estudos está relacionada a variedades de *Vitis vinifera*, *Vitis labrusca* ainda é pouco estudada. Os métodos extrativos utilizam diferentes solventes orgânicos, como acetona, metanol, acetato de etila e etanol, sendo utilizadas diferentes formas de quantificação, como cromatografia e espectrofotometria. Dióxido de carbono supercrítico também vem sendo bastante estudado para a extração de compostos de interesse em sementes de uva, com bons resultados e aplicações.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção do material

As variedades de *Vitis vinifera* estudadas foram Moscato Giallo, Merlot e Cabernet Sauvignon, além de duas variedades de *Vitis labrusca*, Bordô e Isabel.

O resíduo da vinificação destas variedades foi obtido de vinícolas de Caxias do Sul e as extrações e análises foram realizadas no Laboratório de Óleos Essenciais e Produtos Naturais do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul.

O resíduo de cada variedade foi disposto em estufa, em uma camada de cerca de 3cm de altura e desidratado a temperatura de 36°C, por um período de sete dias, sendo homogeneizado a cada dia. As sementes utilizadas nos testes foram separadas manualmente do restante do resíduo, submetidas à determinação da umidade e armazenadas para os testes posteriores. Todos os testes foram realizados em um período de 1 ano a partir da obtenção do resíduo.

A obtenção do óleo e do extrato foi realizada por duas metodologias visando uma comparação entre técnicas: extração contínua a quente em extrator Soxhlet e extração com dióxido de carbono supercrítico, e as análises quali-quantitativas de óleo e extrato foram realizadas através de métodos cromatográficos e espectrofotométricos.

3.2 Determinação das condições do material vegetal para extração de óleo

Foram realizadas extrações de óleo em Soxhlet com as variedades Isabel e Bordô, sendo testadas em quatro tempos de extração diferentes (1, 3, 6 e 9h), e com o material inteiro e moído. Estas variedades foram selecionadas para este teste por sua maior disponibilidade de resíduos com relação às demais variedades avaliadas neste estudo.

Posteriormente, foram testadas diferentes frações de granulometria para sementes de uva da variedade Bordô, também em extrator Soxhlet. Estas sementes foram moídas em moinho de facas e posteriormente pesadas. Foram então tamisadas em uma série de tamises Tyler, sendo que o material retido em cada tamis foi pesado para a determinação da porcentagem de partículas retidas. Este teste foi realizado para as frações 14/20, 20/28, 28/35, 35/48, 20/48 e 28/48 mesh. O solvente utilizado nas extrações foi hexano (200mL) e a quantidade de sementes foi de 25g para cada teste.

3.3 Determinação do melhor solvente extrativo para obtenção de extrato bruto

Foram realizadas seis extrações em Soxhlet com a variedade Merlot fazendo uso dos solventes pré-selecionados segundo a bibliografia (Sun *et al.*, 1999; Peng *et al.*, 2001; Baydar *et al.*, 2004; Yilmaz & Toledo, 2004b), que foram: acetato de etila:metanol:água (60:30:10), etanol 70%, metanol 70%, metanol 80%, metanol 100% e acetona:água:ácido acético (180:90:1). A quantidade de sementes foi de 25g para cada teste e utilizou-se 200mL de hexano para remover o óleo das sementes, antes de cada extração. O volume dos solventes pré-selecionados foi de 200mL cada.

A variedade Merlot foi selecionada para os testes de extração de compostos fenólicos em função dos trabalhos realizados por diversos autores (Saucier *et al.*, 2001; Yilmaz & Toledo, 2004b; Guendez *et al.*, 2005; Bozan *et al.*, 2008; Iacopini *et al.*, 2008) que citam elevadas concentrações destes compostos nesta variedade.

3.4 Extração Contínua em Soxhlet

Utilizou-se 50g de sementes secas e moídas, onde o óleo fixo foi extraído em extrator Soxhlet com 200mL hexano a aproximadamente 70°C por 6 horas, com posterior concentração em evaporador rotatório para obtenção do óleo fixo. A massa de óleo foi determinada após o peso constante. Posteriormente, as sementes foram reextraídas em extrator Soxhlet por 8 horas com 200mL de etanol 70% a aproximadamente 80°C para extração de compostos fenólicos, de acordo com Baydar e colaboradores, (2004) adaptado. A solução resultante foi concentrada em Banho-Maria a 60°C, para obtenção do extrato bruto. A massa de extrato também foi determinada através de peso constante.

Para calcular o rendimento de óleo ou extrato obtido em cada extração utilizou-se a seguinte equação (1):

$$\text{Rendimento (\% m/m)} = \frac{\text{massa óleo ou extrato (g)}}{\text{massa sementes (g)}} \times 100 \quad (1)$$

3.5 Extração Supercrítica em Bancada (SFE)

Para realização dos experimentos em extrator supercrítico e a fim de determinar melhores condições de extração de óleo e compostos fenólicos de sementes de uva, foi utilizado um Módulo de bancada HP7680T da Hewlett Packard contendo célula de extração em aço inoxidável autosselante de 7mL, um coletor analítico ODS (Hipersil octadecilsilica) para retenção do extrato contendo compostos fenólicos e um coletor analítico sem preenchimento, para retenção do óleo. Para lavagem do coletor foram utilizados etanol P.A. (para fenólicos) e hexano P.A. (para óleo).

As extrações foram realizadas com cerca de 0,5g de material vegetal moído e o solvente supercrítico utilizado foi o CO₂ líquido industrial fornecido pela empresa Air Products.

3.5.1 SFE de óleo fixo: Matriz experimental

Para obtenção de óleo fixo, foi realizado um planejamento experimental, onde foram considerados parâmetros de extração as variáveis que influenciam nos resultados das extrações, em termos de rendimento de produto de interesse. As variáveis (parâmetros) utilizadas neste estudo foram vazão, pressão e temperatura do fluído supercrítico (CO₂), sendo utilizados três níveis para cada parâmetro (Tabela 1). Os valores dos parâmetros foram escolhidos em função de alguns trabalhos publicados em extração supercrítica de óleo de semente de uva (Beveridge *et al.*, 2005; Cao & Ito, 2003; Gómez *et al.*, 1996).

Tabela 1: Parâmetros de extração selecionados para óleo de semente de uva.

Parâmetro	Nível baixo	Nível médio	Nível alto
Temperatura (°C)	40	60	80
Vazão de CO ₂ (mL/min)	0,5	1,0	2,0
Pressão (bar)	200	250	300

A partir destes valores, montou-se uma matriz experimental, utilizando-se a metodologia conhecida como Projeto de Experimentos, onde diferentes planos experimentais podem ser escolhidos de modo a facilitar e otimizar a coleta de dados. Neste caso optou-se por um projeto fatorial do tipo 3^k sem repetições, num total de 27 testes. Os projetos fatoriais do tipo 3^k apresentam K fatores (parâmetros), cada um deles a três níveis: alto, médio e baixo conforme

Montgomery (1997). Os testes foram realizados com tempo de extração de 60 min e com uma única variedade.

Este tipo de projeto apresenta vantagens por ser simples de ser analisado, ser útil nos estágios iniciais de pesquisa e ser adequado quando há muitos fatores a serem investigados. A avaliação do rendimento de óleo e de sua composição química foi feita por cromatografia gasosa.

Após a seleção das melhores condições visando à obtenção de maior rendimento de óleo fixo e ácidos graxos foram realizadas as extrações das variedades estudadas.

3.5.2 SFE de óleo fixo: Definição do melhor tempo de extração

Para a determinação do melhor tempo de extração de óleo fixo, realizou-se uma extração fracionada, onde amostras de óleo foram coletadas em diferentes tempos de extração a fim de obter-se o maior rendimento de óleo possível. Os parâmetros utilizados nesta extração foram 40°C de temperatura, vazão de CO₂ de 0,5mL/min e pressão de 200bar, com um tempo de extração de até 130 min. As frações de óleo foram recolhidas em 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 90, 110 e 130 min. Este teste foi realizado com uma única variedade (Merlot). A avaliação do rendimento de óleo foi feita por cromatografia gasosa.

3.5.3 SFE de compostos fenólicos: Definição do melhor cossolvente

Devido ao fato do CO₂ ser um solvente apolar e os compostos fenólicos serem polares, faz-se necessário o uso de um cossolvente para aumentar a solubilidade de tais substâncias. Assim, foram testados etanol e água como cossolventes. Estes cossolventes foram adicionados à célula de extração, juntamente com o material vegetal para aumentar a eficácia da extração. Foram realizadas três extrações com cada cossolvente a 3%, sendo que os parâmetros utilizados

nas extrações foram 40°C de temperatura, 0,5mL/min de CO₂, 200 bar de pressão e 30 min de extração. A avaliação da concentração de fenólicos totais em equivalentes de ácido gálico foi feita por espectrofotometria.

Após a seleção do melhor cossolvente foram realizadas as extrações para definir a porcentagem de cossolvente apropriada para as extrações de compostos fenólicos.

3.5.4 SFE de compostos fenólicos: Definição da porcentagem de cossolvente a ser utilizada

Foram realizadas três extrações com o cossolvente selecionado e com cada uma das porcentagens avaliadas sendo que os parâmetros utilizados nas extrações foram 40°C de temperatura, 0,5mL/min de CO₂, 200 bar de pressão e 30 min de extração. As porcentagens de cossolventes testadas foram 3, 5, 10 e 15% (m/m). A avaliação da concentração de fenólicos totais em equivalentes de ácido gálico foi feita por espectrofotometria.

Após a seleção da porcentagem de cossolvente a ser utilizada, foram realizados os testes para definir os melhores parâmetros de extração para compostos fenólicos.

3.5.5 SFE de compostos fenólicos: Cálculo da massa de cossolvente

A massa de cossolvente utilizada foi calculada em função da quantidade de solvente (CO₂) utilizada em cada extração. A massa total de dióxido de carbono pode ser calculada utilizando a equação (2).

$$m_{CO_2} = t \cdot v \cdot \rho_{CO_2} \quad (2)$$

Onde:

m_{CO_2} = massa de dióxido de carbono utilizada durante a extração (g);

t = tempo de extração (min);

ν = vazão volumétrica de dióxido de carbono (mL/min);

ρ_{CO_2} = massa específica do dióxido de carbono (g/mL).

Uma vez conhecida a massa de dióxido de carbono pode-se calcular a massa de cossolvente, através da equação (3).

$$m_{\text{cos}} = \frac{\omega}{1 - \omega} m_{CO_2} \quad (3)$$

Onde:

m_{cos} = massa de cossolvente (g);

ω = fração mássica de cossolvente.

3.5.6 SFE de compostos fenólicos: Matriz experimental

O planejamento experimental utilizado para extração de compostos fenólicos seguiu o mesmo princípio daquele empregado na extração de óleo, com algumas modificações nos valores dos parâmetros avaliados (Tabela 2). Os valores dos parâmetros foram escolhidos em função de alguns trabalhos publicados em extração supercrítica de compostos fenólicos de semente de uva (Duarte *et al.*, 2004; Kamangerpour *et al.*, 2002; Murga *et al.*, 2000; Palma & Taylor, 1999).

Tabela 2: Parâmetros de extração selecionados para compostos fenólicos de semente de uva.

Parâmetro	Nível baixo	Nível médio	Nível alto
Temperatura (°C)	40	50	60
Vazão de CO ₂ (mL/min)	0,5	1,0	2,0
Pressão (bar)	200	225	250

A partir destes valores, montou-se uma matriz experimental, utilizando-se a mesma metodologia utilizada para óleo. Os testes foram realizados com tempo de extração de 30 min e com uma única variedade. A avaliação da concentração de fenólicos totais em equivalentes de ácido gálico foi feita por espectrofotometria.

Após a seleção dos melhores parâmetros e do melhor tempo de extração, visando à obtenção de maior concentração de fenólicos totais foram realizadas as extrações das variedades estudadas.

3.5.7 SFE de compostos fenólicos: Definição do melhor tempo de extração

Para a determinação do melhor tempo de extração de compostos fenólicos, realizou-se uma extração fracionada, semelhante àquela realizada para óleo. Os parâmetros utilizados nesta extração foram 60°C de temperatura, vazão de CO₂ de 0,5mL/min e pressão de 225bar (melhores condições encontradas a partir da matriz experimental), com um tempo total de extração de 240 min. As frações de extrato foram recolhidas em 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 90, 110, 130, 150, 180, 210 e 240 min. Este teste foi realizado com uma única variedade. A avaliação da concentração de fenólicos totais em equivalentes de ácido gálico foi feita por espectrofotometria.

3.6 Extração Supercrítica em Equipamento Piloto (SFEP)

Após a realização dos testes de determinação das melhores condições de extração, utilizou-se um extrator supercrítico piloto marca Trendtech para realização das extrações de óleo e compostos fenólicos das sementes das variedades avaliadas neste estudo. Nestas extrações, utilizaram-se as melhores condições obtidas pela matriz experimental do teste de bancada (tanto

para óleo quanto para extrato) com cerca de 100g de material vegetal moído e o solvente supercrítico utilizado foi o CO₂ líquido industrial fornecido pela empresa Air Products.

Como os testes para determinação de melhores condições de extração foram realizados em bancada e a vazão de CO₂ está relacionada com a massa de material vegetal utilizada na extração, foi realizado um aumento de escala para o parâmetro vazão de CO₂, através das equações (4 e 5):

$$F_{CO_2} = v_{CO_2} \cdot \rho_{CO_2} \quad (4)$$

Onde:

F_{CO_2} = vazão mássica de dióxido de carbono utilizada durante a extração (g/min);

v_{CO_2} = vazão volumétrica de dióxido de carbono utilizada durante a extração (mL/min);

ρ_{CO_2} = massa específica de dióxido de carbono (0,69g/mL para óleo e 0,76g/mL para extrato).

Após a determinação da vazão mássica de CO₂, foi realizada uma correlação desta vazão, utilizada para 0,5g de sementes de uva (extração em bancada) com a vazão que deverá ser usada para 100g de sementes de uva (extração piloto).

$$X = \frac{F_{CO_2} \cdot 100gSU}{0,5gSU} \quad (5)$$

Sendo assim, a vazão mássica de dióxido de carbono que passará pela célula durante a extração piloto para óleo será de 69g de CO₂/min e para extrato será de 76g de CO₂/min.

3.7 Análise química dos compostos fenólicos presentes nos extratos de sementes de *Vitis* sp. (Método de Folin-Ciocalteu)

Para a quantificação dos compostos fenólicos de cada extrato foi utilizado o reagente de Folin-Ciocalteu, onde a 0,5mL da amostra diluída, na proporção de 1:20000 em etanol absoluto, adicionou-se 2,5mL de Folin-Ciocalteu a 10% e 2,0mL de Na₂CO₃ a 7,5%. O tubo foi agitado em Vórtex e incubado por 5 min em Banho-Maria a 50°C. Após 15 min de repouso o complexo azul formado foi quantificado em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 760nm (Roesler *et al.*, 2007). A concentração de fenólicos foi estimada correlacionando-se a absorbância das amostras a uma curva padrão realizada a partir de 6 pontos com concentração de 10 a 100 µg/mL de ácido gálico (Baydar *et al.*, 2004; Waterhouse *et al.*, 2000), onde o resultado é expresso em mg de equivalentes de ácido gálico/g de semente de uva (mg EAG/g SU). Esta curva foi realizada em triplicata e durante três dias consecutivos.

3.8 Análise química dos compostos fenólicos presentes nos óleos de sementes de *Vitis* sp. (Método de Folin-Denis)

Para a quantificação dos compostos fenólicos de cada óleo foi realizada uma extração prévia, para a remoção destes compostos fenólicos presentes no óleo de sementes de uva das variedades estudadas. Para tanto, diluiu-se 1g de óleo de cada uma das variedades avaliadas em 5mL de hexano e a esta solução acrescentou-se 6mL de metanol 60%. Esta solução foi agitada em agitador magnético por 6 min sendo transferida posteriormente a um funil de separação, onde a fase inferior, contendo metanol 60% e compostos fenólicos, foi recolhida em um béquer. Tomou-se então, uma alíquota de 5mL que foi transferida para um balão volumétrico de 10mL,

tendo seu volume completado com água destilada. Esta solução foi chamada de Solução de Polifenóis.

A quantificação de compostos fenólicos totais foi realizada com o auxílio do reagente de Folin-Denis onde: em balão de 25mL, adicionou-se 15mL de água destilada, 2mL da solução de polifenóis e 1,25mL do reagente de Folin-Denis. Após repouso de 3 min, acrescentou-se 2,5mL de solução saturada de Na_2CO_3 e o volume final foi completado com água destilada. A solução foi agitada e mantida em repouso por 1 h, após procedeu-se a centrifugação das amostras a 13.000 RPM por 3 min, seguida de leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 725nm (Roncero *et al.*, 1973).

A concentração de fenólicos foi estimada correlacionando-se a absorbância das amostras a uma curva padrão realizada a partir de 7 pontos com concentração de 1 a 64 $\mu\text{g/mL}$ de ácido gálico (Maier *et al.*, 2009), onde o resultado é expresso em mg de equivalentes de ácido gálico/100g de semente de uva (mg EAG/100g SU). Esta curva foi realizada em triplicata e durante três dias consecutivos.

3.9 Análise química de proantocianidinas (hidrólise por butanol/HCl) presentes nos extratos de sementes de *Vitis* sp. e na solução de polifenóis dos óleos de sementes de *Vitis* sp.

Em um tubo de ensaio com tampa foi adicionado 6mL do reagente butanol/HCl (95:5) sobre 1mL da amostra de extrato diluída na proporção de 1:5000 em metanol (ou 1mL da solução de polifenóis), adicionou-se então 0,2mL de reagente férrico 2% (0,5g de sulfato férrico amoniacal diluído 25mL de HCl 2N). O tubo foi agitado em vórtex para misturar os reagentes e a amostra e, posteriormente tampado, sendo então colocado em banho-maria em ebulição por

50min. Depois de transcorrido este tempo, o tubo foi resfriado e a leitura foi feita em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 550nm (Porter *et al.*, 1986).

A concentração de proantocianidinas foi estimada correlacionando-se a absorbância das amostras a uma curva padrão realizada a partir de 6 pontos com concentração de 1 a 70µg/mL de proantocianidina B2. O resultado foi expresso em mg de equivalentes de proantocianidina B2/g de semente de uva (mg EPB2/g SU). Esta curva foi realizada em triplicata e durante três dias consecutivos.

3.10 Análise de catequina e epicatequina por Cromatografia Líquida de Alta eficiência

As análises foram realizadas em equipamento HPLC marca HP1100, coluna Lichrospher RP₁₈ (5µm) equipado com detector UV a 280nm e sistema quaternário de bombas. A análise em fase reversa consistiu de: solvente A – solução de água Milli Q com 5% de ácido acético e solvente B – solução de Metanol com 5% de ácido acético. O sistema de bombeamento da fase móvel foi isocrático, onde a proporção dos eluentes foi de 90% do solvente A e 10% do solvente B. O tempo total de análise foi de 45min e o fluxo padrão foi mantido a 1,0mL/min adaptado de Saucier e colaboradores (2001).

Os extratos obtidos em Soxhlet foram dissolvidos em metanol (1g/L) e filtrados em membranas de Nylon de 0,45µm de diâmetro de poro (Millipore). Uma alíquota de 50µL desta solução foi injetada no cromatógrafo.

Os compostos foram identificados de acordo com sua ordem de eluição e por comparação de seus tempos de retenção com aqueles dos padrões puros. A quantificação dos monômeros de procianidinas foi realizada pelo método de padrão interno, através da correlação

da área (mAU*s) dos picos relativos aos monômeros às curvas padrão realizadas a partir de 6 pontos com concentrações de 5 a 500mg/L de cada padrão (catequina e epicatequina).

3.11 Análise de Resveratrol por Cromatografia Líquida de Alta eficiência

As análises foram realizadas em equipamento HPLC marca HP modelo 1100, coluna Lichrospher RP₁₈ (5µm) equipado com detector UV a 305nm e sistema quaternário de bombas. A análise em fase reversa foi constituída de: solvente A – Metanol e solvente B – Água Milli Q. O sistema de bombeamento da fase móvel foi gradiente, com 35% - 95% do solvente A e 65% - 5% do solvente B. O tempo total de análise foi de 40 minutos e o fluxo padrão foi mantido a 1,0 mL/min de acordo com Prokop e colaboradores (2006).

Os extratos obtidos foram dissolvidos em metanol (5g/L) e filtrados em membranas de Nylon de 0,45µm de diâmetro de poro (Millipore). Uma alíquota de 50µL desta solução foi injetada no cromatógrafo.

Resveratrol foi identificado de acordo com sua ordem de eluição e por comparação de seu tempo de retenção com aquele do padrão puro. A quantificação foi realizada pelo método de padrão interno, através da correlação da área (mAU*s) do pico de resveratrol à curva padrão realizada a partir de sete pontos com concentrações de 0,03 a 2 µg/mL de resveratrol.

3.12 Análise de α -tocoferol por Cromatografia Líquida de Alta eficiência

As análises foram realizadas em equipamento HPLC marca HP1100, coluna Lichrospher RP₁₈ (5µm) equipado com detector UV a 294nm e sistema quaternário de bombas. A análise em

fase reversa teve como fase móvel metanol. O tempo total de análise foi de 45min e o fluxo padrão foi mantido a 0,6mL/min de acordo com Charoensiri e colaboradores (2009).

Os óleos obtidos em Soxhlet foram dissolvidos em clorofórmio:metanol (2:8) numa concentração de 20g/L (Charoensiri *et al.*, 2009) e filtrados em membranas de Nylon de 0,45 μ m de diâmetro de poro (Millipore). Uma alíquota de 50 μ L desta solução foi injetada no cromatógrafo.

O α -tocoferol foi identificado de acordo com sua ordem de eluição e por comparação de seu tempo de retenção com aquele do padrão puro. A quantificação foi realizada pelo método de padrão interno, correlacionando-se a área (mAU*s) do pico à uma curva padrão realizada a partir de 7 pontos com concentrações de 0,01 a 9,6 μ g/mL de α -tocoferol.

3.13 Análise de ácidos graxos por Cromatografia Gasosa

O óleo de semente de uva foi avaliado quanto à presença de ácidos graxos (palmítico, esteárico, oléico e linoleico) qualitativamente em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (GC/MS) Hewlett Packard 6890/MSD5973, equipado com software HP-Chemstation e biblioteca de espectros Wiley 275. As análises foram realizadas em coluna HP-INNOWax Polietilenoglicol (30 m x 250 μ m), 0,25 μ m de espessura de filme (Hewlett Packard, Califórnia, USA), com a seguinte programação de temperatura: 80°C (5min), 230°C a 3°C/min (30 min), interface 310°C, razão de *split* (1:25), gás de arraste He (40cm/s), intervalo de aquisição de massas 45-550. Injeção de 1 μ L diluído em hexano (1:20).

Estes compostos também foram analisados quantitativamente em cromatógrafo gasoso (GC) Hewlett Packard 6890, equipado com processador de dados HP-Chemstation. As análises

foram realizadas em coluna HP-FFAP (30m x 250µm i.d.), 0,25 µm de espessura de filme (Hewlett Packard, Califórnia, USA), com a seguinte programação de temperatura: 100°C (5min), 200°C a 5°C/min, 230°C a 3°C/min (30min); temperatura do injetor 230°C, razão de split (1:30), temperatura do detector 240°C, gás de arraste H₂ (59,3cm/s). Adaptado de Bertrand (1981).

Para a quantificação dos ácidos graxos presentes nos diferentes óleos de sementes de uva foram utilizados 200µL do padrão ácido heptadecanóico (C17) 1g/L o qual foi adicionado à amostra de óleo já diluído em hexano (1:20). A injeção foi de 1µL desta solução. Este é um método convencional na análise de ácidos graxos.

3.14 Análise dos dados

Os dados obtidos nas extrações de compostos fenólicos e óleo foram submetidos à análise de variância (ANOVA) ou a análise multivariada (AMOVA), ou ainda ao Teste *t*, com auxílio do programa computacional SPSS 11.5.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados os resultados compilados, referentes às sementes de uva das variedades Bordô, Isabel (*Vitis labrusca*), Moscato Giallo, Merlot e Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera*), quanto a sua composição química em relação a ácidos graxos, vitamina E e compostos fenólicos, juntamente com a comparação entre as safras de 2005 e 2006, além de uma comparação entre as metodologias extrativas usadas para obtenção de óleo e extrato.

O item 4.1 descreve a umidade média das sementes das variedades avaliadas e nos itens subsequentes há comparações entre composição química, métodos de extração, variedades e safras. A determinação de condições experimentais para extração em Soxhlet, como a condição do material vegetal, a granulometria das sementes e o tipo de solvente extrativo também podem ser visualizados, além da otimização do processo de extração supercrítica.

As metodologias extrativas utilizadas foram: extração contínua a quente em extrator Soxhlet e extração por CO₂ supercrítico. Técnicas cromatográficas e espectrofotométricas foram empregadas na análise dos compostos extraídos.

4.1 Rendimento de umidade das sementes de uva

Os resíduos da vinificação das safras de 2005 e 2006, das variedades Bordô, Isabel, Moscato Giallo, Merlot e Cabernet Sauvignon foram desidratados por um período de sete dias, a temperatura ambiente, isso porque segundo Hatzidimitriou e colaboradores (2007), sementes de uva contêm uma quantidade de água relativamente alta, e altos níveis de umidade aceleram a degradação, de modo que, mesmo uma ligeira aeração ou secagem faz-se necessária para armazenagem das sementes.

As sementes foram separadas do resíduo manualmente e após a secagem, foram submetidas à determinação da umidade (Tabela 3). A secagem das sementes para armazenagem e posterior emprego na extração dos compostos de interesse foi realizada, pois o excesso de umidade permite a ação de enzimas, podendo acarretar a degradação de constituintes químicos, além de possibilitar o desenvolvimento de fungos e bactérias (Farias, 2001). As análises de umidade foram realizadas em triplicata mostrando variações de 6,10% para Cabernet Sauvignon a 9,10% para Bordô na safra de 2005 e de 5,60% para Isabel a 8,60% para Cabernet Sauvignon na safra de 2006. Segundo Farias (2001) o rendimento de umidade estabelecido nas diferentes farmacopéias varia entre 8 e 14%. Na Tabela 3 também podem ser observadas as vinícolas que cederam os resíduos de cada variedade, todas localizadas em Caxias do Sul, RS.

Tabela 3: Variedades de uva estudadas, vinícolas que cederam o material vegetal e % média de umidade.

Variedade de <i>Vitis</i>	Vinícola	Média de Umidade (% m/m)	
		Safra 2005	Safra 2006
<i>V. labrusca</i> var. Bordô	Casa Ferdinando Zattera	9,1	6,8
<i>V. labrusca</i> var. Isabel	Casa Ferdinando Zattera	8,4	5,6
<i>V. vinifera</i> var. Moscato Gialo	Casa Ferdinando Zattera	7,0	6,3
<i>V. vinifera</i> var. Merlot	Casa Ferdinando Zattera	7,0	8,0
<i>V. vinifera</i> var. Cabernet Sauvignon	Vinícola Perini	6,1	8,6

4.2 Extração de óleo fixo de sementes das variedades Bordô, Isabel, Merlot, Cabernet Sauvignon e Moscato Giallo com extrator Soxhlet e análise por cromatografia e espectrofotometria

Este item trata dos resultados relacionados aos testes realizados para adaptação da metodologia extrativa em Soxhlet, para óleo de sementes de uva, bem como, dos resultados referentes à caracterização das variedades avaliadas neste estudo além da comparação entre elas.

4.2.1 Teste de rendimento de óleo extraído em Soxhlet com o uso das variedades Bordô e Isabel

Para a variedade Isabel, o rendimento de óleo nas sementes moídas se manteve semelhante em todos os tempos testados. As sementes inteiras apresentaram rendimentos muito inferiores, sugerindo que para estas, o tempo de extração parece interferir com maior intensidade no rendimento de óleo extraído, provavelmente pela maior dificuldade de penetração do solvente no interior das sementes, onde se encontra o óleo. A variedade Bordô comportou-se de maneira semelhante (Figura 8).

Com base nos dados obtidos neste teste, optou-se por trabalhar com sementes moídas visto a grande diferença de rendimento em relação às sementes inteiras. Com este teste também se observou que ambas as variedades se comportaram de forma semelhante com relação ao rendimento de óleo optando-se por realizar o teste de granulometria apenas com a variedade Bordô.

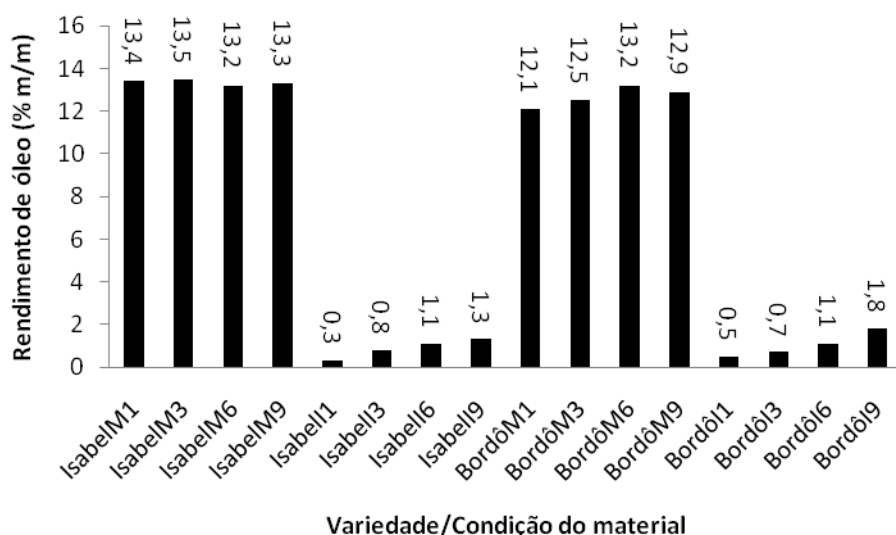


Figura 8: Rendimento (% m/m) de óleo de sementes de uva extraído em extrator Soxhlet.

Legenda: M - moída; I - inteira; 1 - 1h de extração; 3 - 3h de extração; 6 - 6h de extração; 9 - 9h de extração.

4.2.2 Testes de granulometria e análise do óleo em GC e GC/MS utilizando a variedade

Bordô

Segundo Oliveira e colaboradores (2003), o tamanho de partícula é uma variável que afeta diretamente a extração do óleo de sementes de uva por solvente. Assim, foram testadas diferentes frações de granulometria para sementes de uva da variedade Bordô, em extrator Soxhlet. As sementes foram moídas em moinho de facas e posteriormente pesadas e tamisadas.

Observando a Tabela 4, verifica-se que o maior rendimento de óleo ocorreu na fração 35/48 mesh, onde as partículas possuem 0,36mm de diâmetro, sendo este, o menor diâmetro avaliado, proporcionando uma maior superfície de contato das sementes moídas com o solvente extrativo, causa provável do maior rendimento de óleo obtido, isso porque segundo Bravi e colaboradores (2007). Este efeito do tamanho da partícula, relacionado com o rendimento do óleo pode ser explicado pelo aumento na área superficial disponível para transferência de massa. Este

fato é confirmado por Fiori (2007), que afirma que quanto menor a partícula, maior será o rendimento final de óleo.

Por outro lado, também pode ser a provável causa do menor aproveitamento do material vegetal, pois somente 11% de toda semente moída seria utilizada nesta fração para a extração de óleo. Desta forma, cerca de 89% das sementes moídas seriam novamente descartadas, tornando o processo inviável, já a fração 20/48 mesh, com partículas que variam de 0,30 a 0,85mm de diâmetro teve um rendimento de 10% de óleo, mas com aproveitamento de quase 80% das sementes moídas.

Tabela 4: Rendimento (% m/m) de óleo de sementes de uva Bordô, obtido por extração em extrator Soxhlet de acordo com a granulometria.

Granulometria (mesh)	% de partículas retidas nos tamises	Rendimento de óleo (% m/m)
Fração 14/20	25,2	5,75 d
Fração 20/28	22,7	8,74 c
Fração 28/35	20,2	15,7 b
Fração 35/48	11,3	19,3 a
Fração 20/48	79,4	10,4 c
Fração 28/48	54,2	8,67 c

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Para auxiliar na escolha da melhor granulometria a ser trabalhada nos experimentos posteriores fez-se a análise quali-quantitativa, por cromatografia gasosa, das frações dos óleos extraídos das sementes da variedade Bordô (Tabela5).

Os ácidos graxos identificados e quantificados foram os ácidos palmítico, esteárico, oleico e linoleico (Tabela 5). Levando em consideração o rendimento de ácido linoleico, por ser encontrado em maior concentração e ser o mais citado nas literaturas consultadas, a fração 20/28

mesh apresentou a maior concentração (71,1%), mas, com aproveitamento de cerca de 22% das sementes moídas, já a fração 20/48 mesh apresentou concentração de ácido linoleico de 69,6% com aproveitamento de quase 80% das sementes moídas.

Levando em consideração o rendimento de óleo (10,4%), a concentração de ácido linoleico (69,6%) e a quantidade de sementes moídas aproveitadas na extração de óleo (79,4%), optou-se pelo uso da granulometria de 20/48 mesh para os testes subseqüentes.

Tabela 5: Composição de ácidos graxos em óleo de sementes da variedade Bordô obtido por extração em extrator Soxhlet com diferentes granulometrias.

Composto	T.R. (min)	Concentração dos ácidos graxos nas frações (%)					
		14/20*	20/28*	28/35*	35/48*	20/48*	28/48*
Ácido palmítico	36,5	7,11	6,52	6,65	6,43	6,64	5,96
Ácido esteárico	41,3	4,20	3,90	4,41	4,20	4,67	4,16
Ácido oléico	42,1	18,1	17,0	17,1	16,9	17,8	19,2
Ácido linoleico	43,9	61,4	71,1	69,2	70,1	69,6	68,2
% de partículas retidas nos tamises	-	25,1	22,7	20,2	11,3	79,4	54,2

T.R.: Tempo de Retenção em minutos / * Mesh

4.2.3 Rendimento de óleo de sementes de uva extraído por Soxhlet nas variedades Bordô, Isabel, Merlot, Cabernet Sauvignon e Moscato Giallo

O rendimento de óleo (Tabela 6) das variedades estudadas variou de 9,8% (Merlot) a 14,4% (Cabernet Sauvignon) na safra de 2005 e de 10,6% (Cabernet Sauvignon) a 15,4% (Bordô) na safra de 2006. Estes dados estão de acordo com aqueles apresentados por Mattick & Rice (1976) que citam dados de rendimento de óleo de diferentes variedades de uvas americanas e híbridas, variando de 13% a 18,4%, estando também de acordo com Baydar & Akkurt (2001),

que demonstram que o rendimento de óleo de 18 variedades de uva variou de 11,6% a 18%, e com Cao & Ito, (2003) que apresentam rendimento de óleo de semente de uva de 10,6%.

Segundo Luque-Rodríguez e colaboradores (2005), o conteúdo de óleo de sementes de uva depende da variedade, embora o intervalo habitual seja de 10-16% do peso seco.

Tabela 6: Rendimento (% m/m) de óleo de sementes de diferentes variedades de uva das safras de 2005 e 2006, obtidos por extração em extrator Soxhlet.

Variedade	Rendimento (% m/m)	
	Safra de 2005	Safra de 2006
Bordô	11,0 Bb	15,4 Aa
Isabel	11,4 Ab	13,2 Aa
Cabernet Sauvignon	14,4 Aa	10,6 Bb
Merlot	9,8 Bb	15,4 Aa
Moscato Giallo	14,2 Aa	14,8 Aa

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste AMOVA a 5%.
Letras maiúsculas correspondem às linhas e minúsculas as colunas.

Na safra de 2005, as variedades Cabernet Sauvignon e Moscato Giallo destacam-se em relação às demais variedades por apresentarem maior rendimento de óleo. Na safra de 2006, a variedade Cabernet Sauvignon apresentou rendimento de óleo inferior às demais variedades (10,6%). Podemos destacar, na safra de 2006, as variedades Bordô, Moscato Giallo e Merlot, ambas com cerca de 15% de óleo, mas que não diferem significativamente da variedade Isabel (13,2%).

Os rendimentos de óleo parecem estar mais relacionados às diferenças entre as safras do que às variedades, pois com exceção da Moscato Giallo, houve diferenças significativas entre as safras 2005 e 2006 para todas as variedades. As variedades Bordô e Merlot tiveram um aumento no rendimento de óleo de 2005 para 2006, provavelmente devido às condições meteorológicas de

insolação e precipitação pluviométrica de 2006, que foram mais favoráveis para uvas de maturação precoce (Bordô) e intermediária (Merlot), quando comparadas à normal climatológica da região, o que pode ser observado na Figura 9 (Mandelli, 2006).

Este comportamento não foi observado para a variedade Moscato Giallo, sugerindo que os fatores maturidade e safra não são os únicos envolvidos nas diferenças observadas. Segundo Oomah e colaboradores (1998) e Gallander & Peng (1980), o rendimento de óleo de sementes de uva varia conforme a variedade, o ambiente de cultivo e as características do ano e segundo Baydar & Akkurt (2001), diferenças de conteúdo de óleo entre variedades, estão relacionadas à maturidade das uvas.

A variedade Cabernet Sauvignon apresentou uma redução no rendimento de óleo de 2005 para 2006, que pode ser explicada pelo fato de que as uvas de maturação tardia, como é o caso desta variedade, tiveram condições pluviométricas um pouco superiores à normal climatológica da região, na safra de 2006, como se observa na Figura 9 (Mandelli, 2006), podendo ter acarretado tal redução de rendimento de óleo.

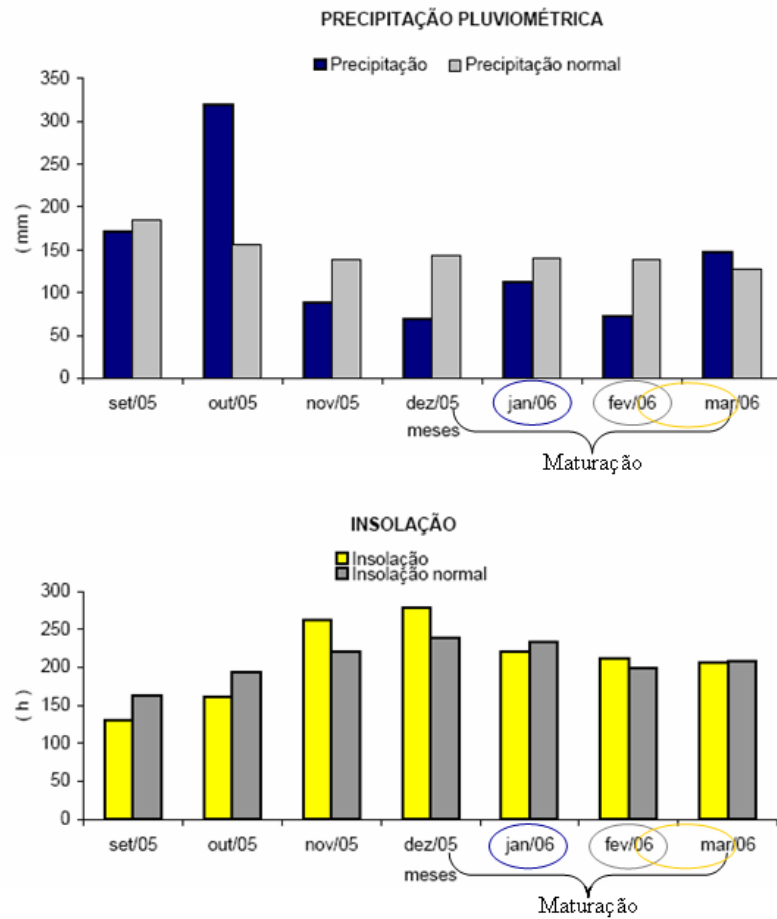


Figura 9: Comportamento merendimentoológico na safra de 2006 em relação a normal climatológica (1961-1990) de Bento Gonçalves (Mandelli 2006).

Legenda: círculo azul corresponde à variedade Bordô, círculo cinza corresponde à variedade Merlot e círculo amarelo corresponde à variedade Cabernet Sauvignon.

Destaca-se ainda com relação a rendimento de óleo (Tabela 6), que a variedade Merlot apresentou cerca de 10% de óleo em 2005 e cerca de 15% de óleo em 2006, e que a variedade Cabernet Sauvignon teve um rendimento de óleo aproximado de 14% em 2005 e de 10% em 2006. Esses dados assemelham-se aqueles apresentados por Beveridge e colaboradores (2005), que cita um rendimento de óleo de 10,7% para Merlot e de 11,1% para Cabernet Sauvignon.

4.2.3.1 Ácidos Graxos, α -Tocoferol, Fenólicos totais e Procianidinas nas variedades Bordô, Isabel, Merlot, Cabernet Sauvignon e Moscato Giallo

A composição de ácidos graxos do óleo pode ser observada na Tabela 7 e na Figura 10, onde se constata a presença de quatro ácidos graxos: ácido palmítico (C16), ácido esteárico (C18), ácido oleico (C18:1) e ácido linoleico (C18:2). Os resultados obtidos estão de acordo com estudos realizados por diferentes autores, como Beveridge e colaboradores (2005), Cao & Ito (2003), Baydar & Akkurt (2001), Lee e colaboradores (2000), Gómez e colaboradores (1996), e Mattick & Rice (1976), que também demonstraram a presença destes ácidos graxos no óleo de sementes de uva, além de outros ácidos graxos minoritários como os ácidos capríco (C8), caprílico (C9), mirístico (C14), linolênico (C18:3), araquidônico (C20) e eicosenóico (C20:1), com concentrações inferiores a 1%.

Tabela 7: Concentração de ácidos graxos, α -tocoferol, fenólicos totais e procianidinas (mg/100g de sementes de uva) nas variedades estudadas nas safras de 2005 e 2006, por Soxhlet.

Composto químico	Concentração de compostos/100g de sementes de uva									
	Bordô		Isabel		Cabernet Sauvignon		Merlot		Moscato Giallo	
	2005	2006	2005	2006	2005	2006	2005	2006	2005	2006
C16 ¹	338Aa	285Aa	247Aa	219Aa	121Ab	110Abc	47,5Bb	187Aab	90,6Bb	252Aa
C18 ²	202Aa	167Aa	156Ab	62,9Bb	47,4Ac	29,1Ab	18,4Bc	159Aa	50,8Bc	145Aa
C18:1 ³	704Aa	694Aa	560Ab	359Bb	181Ac	69,2Ac	67,1Bc	454Ab	140Bc	397Ab
C18:2 ⁴	2557Aa	2405Aa	1800Ab	795Bb	536Ac	160Ab	138Bc	2240Aa	483Bc	1823Aa
Procianidinas ⁵	0,37Ba	0,63Aa	0,23Aa	0,22Ab	0,18Aa	0,18Ab	0,29Aa	0,37Ab	0,27Ba	0,81Aa
Fenólicos ⁶	0,57Aa	0,31Aa	0,45Aa	0,35Aa	0,55Aa	0,40Aa	0,37Aa	0,20Aa	0,41Aa	0,26Aa
α -tocoferol ⁷	0,45Aa	0,32Ab	0,09Ab	0,12Ac	0,22Bb	1,12Aa	0,13Ab	0,22Abc	0,20Ab	0,26Abc

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste AMOVA a 0,05%. Letras maiúsculas correspondem às linhas nas colunas (entre safras diferentes) e minúsculas às linhas nas colunas de mesmo ano (referem-se aos compostos).

Legenda: ¹ácido palmítico em mg/100g de sementes de uva; ²ácido esteárico em mg/100g de sementes de uva; ³ácido oleico em mg/100g de sementes de uva; ⁴ácido linoleico em mg/100g de sementes de uva; ⁵mg de equivalentes de procianidina B2/100g de sementes de uva; ⁶mg de equivalentes de ácido gálico/100g de sementes de uva; ⁷mg/100g de sementes de uva.

Os óleos de sementes de uva também foram analisados quanto a presença de α -tocoferol (Tabela 7 e Figura 11) por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com o uso do padrão α -tocoferol apresentando curva padrão com coeficiente de regressão linear (R^2) de 0,9997.

Com relação aos ácidos graxos (Tabela 7) houve um aumento de concentração nas variedades Merlot e Moscato Giallo entre as safras e com exceção do ácido palmítico, houve uma redução nos demais ácidos graxos avaliados para a variedade Isabel, entre as safras.

A maior concentração de ácido palmítico foi observada nas variedades Bordô e Isabel, na safra de 2005, e nas variedades Bordô, Isabel e Moscato Giallo na safra de 2006. Para o ácido esteárico, a maior concentração foi observada na variedade Bordô, na safra de 2005, e nas variedades Bordô, Merlot e Moscato Giallo na safra de 2006. A variedade Bordô apresentou a maior concentração de ácido oleico nas duas safras, e a maior concentração de ácido linoleico foi observada novamente na variedade Bordô, na safra de 2005, e nas variedades Bordô, Merlot e Moscato Giallo na safra de 2006.

Observa-se que além da influência climática nas safras, da maturidade das uvas e das diferenças genéticas entre as variedades, outro fator também pode estar envolvido nas diferenças de concentração dos ácidos graxos avaliados, como o estado de conservação das sementes, pois segundo Oliveira e colaboradores (2003), este é um fator que determina a concentração de ácidos graxos e o rendimento do óleo de sementes de uva.

Variações são observadas nas concentrações dos diferentes ácidos graxos em cada variedade, sendo que o ácido linoleico apresentou a maior concentração, estando de acordo com dados apresentados na literatura (Beveridge *et al.*, 2005; Cao & Ito, 2003; Baydar & Akkurt, 2001; Lee *et al.*, 2000; Gómez *et al.*, 1996; Mattick & Rice 1976).

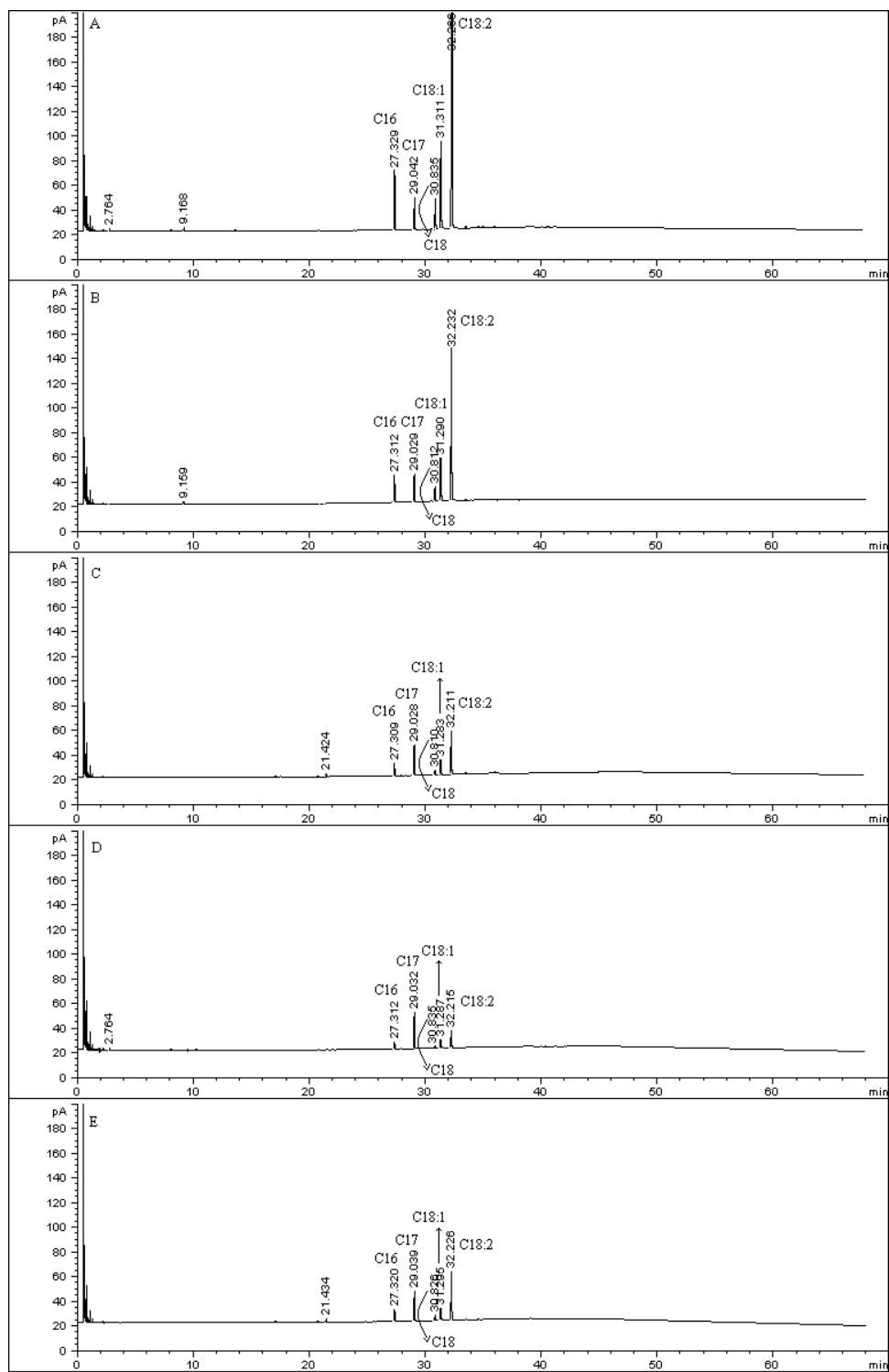


Figura 10: Perfil cromatográfico dos óleos de sementes das variedades Bordô (A), Isabel (B), Cabernet Sauvignon (C), Merlot (D) e Moscato Giallo (E), safra de 2005, analisados por GC.

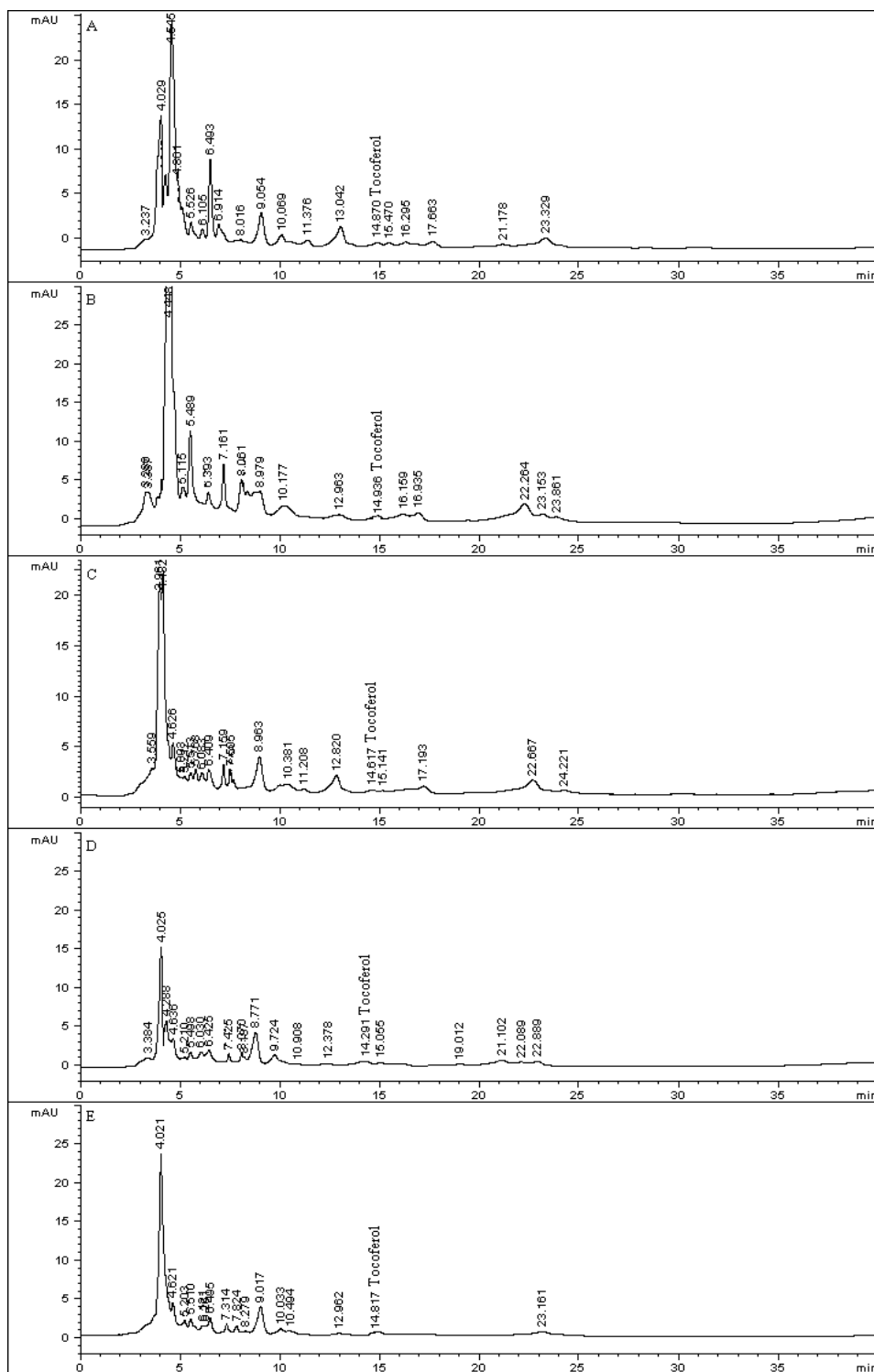


Figura 11: Análise de α -tocoferol nos óleo de sementes das variedades Bordô (A), Isabel (B), Merlot (C), Cabernet Sauvignon (D) e Moscato Giallo (E), safra de 2005, por HPLC.

Pode-se ainda observar que, em geral, as variedades de *Vitis labrusca*, Bordô e Isabel apresentaram concentrações mais elevadas de ácidos graxos em relação às variedades Cabernet Sauvignon, Merlot e Moscato Giallo (*Vitis vinifera*), demonstrando o grande potencial destas variedades mais rústicas, ainda pouco exploradas. Potencial este, que é evidenciado pelos dados de vitivinicultura do Rio Grande do Sul, fornecidos pela Embrapa (Embrapa, 2007), e que mostram que em 2005 foram processados 185.966.788kg de uva Isabel e 64.174.362kg de uva Bordô, o que em comparação à Cabernet Sauvignon (12.821.241kg), Merlot (10.632.174kg) e Moscato Giallo (703.485kg) confirma o potencial destas variedades, em função de sua elevada produção e disponibilidade de resíduo.

Fazendo uma estimativa da produção de óleo em relação à quantidade de uva processada em 2005, usando como parâmetros a média do rendimento de óleo obtido neste estudo, para cada variedade, e a porcentagem de sementes de uva presentes no bagaço, obtém-se para o ano de 2005: 686.217,4kg de óleo de sementes de uva Isabel e 254.130,4kg de óleo de sementes de uva Bordô, além de 48.079,6kg de óleo de sementes de uva Cabernet Sauvignon, 40.189,6kg de óleo de sementes de uva Merlot e 3.060,1kg de óleo de sementes de uva Moscato Giallo, o que ressalta o potencial das variedades Isabel e Bordô.

Ainda na Tabela 7, observam-se as diferentes concentrações de α -tocoferol nos óleos de sementes de uva avaliados, onde a maior concentração na safra de 2005 foi obtida com a variedade Bordô. Na safra de 2006, a maior concentração ocorreu na variedade Cabernet Sauvignon, sendo esta, a única variedade que sofreu variação na concentração de α -tocoferol de uma safra para outra.

A concentração de α -tocoferol obtida neste estudo, para as variedades de *V. vinifera* e *V. labrusca* analisadas, foram baixas, mas, segundo Freitas e colaboradores (2008), a maioria das

variedades brasileiras de uva possui pequenas quantidades de α -tocoferol. Considerando que as sementes de uva são um material desperdiçado pelas vinícolas e são produzidas em grandes quantidades, a extração de α -tocoferol é uma alternativa potencial de agregar valor as uvas.

Na Tabela 7, também se observa às concentrações de fenólicos totais e procianidinas. Para a determinação de fenólicos totais em óleo de sementes de uva, pela metodologia de Folin-Denis, foi primeiramente construída uma curva padrão com o uso de ácido gálico como padrão, que resultou em um coeficiente de regressão linear (R^2) de 0,9987. Os dados revelaram a não ocorrência de diferenças significativas entre as safras e também entre as variedades avaliadas.

Pelo método espectrofotométrico Butanol/HCl, determinou-se a concentração de proantocianidinas nas variedades estudadas, sendo que esta, foi correlacionada a uma curva padrão realizada com procianidina B2 como composto padrão (R^2 0,9963).

A variação de concentração (Tabela 7) foi de 0,18mg EPB2/100g SU na variedade Cabernet Sauvignon a 0,37mg EPB2/100g SU na variedade Bordô, na safra de 2005, e de 0,18mg EPB2/100g SU na variedade Cabernet Sauvignon a 0,81mg EPB2/100g SU na variedade Moscato Giallo, na safra de 2006. As variedades que sofreram alteração de uma safra para outra, foram Bordô e Moscato Giallo que tiveram a concentração de procianidinas aumentada de 2005 para 2006, além de terem apresentado a maior concentração de equivalentes de procianidina B2 na safra de 2006. Na safra de 2005, não foram observadas diferenças significativas entre as variedades avaliadas.

Segundo Montealegre e colaboradores (2006), sementes de uvas de variedades brancas possuem composição qualitativa e quantitativa muito semelhantes às variedades de uvas tintas em termos de compostos fenólicos, estando de acordo com os resultados obtidos neste estudo.

Para Adams (2006), compostos fenólicos exibem padrões de acúmulo e subsequente declínio durante amadurecimento, sugerindo degradação, utilização em biossíntese de outros compostos ou associações covalentes com outros componentes celulares. Este autor cita ainda que o grupo de dímeros de procianidinas B muda seu padrão de acúmulo durante a maturação dos frutos, em sementes de diferentes variedades. Esta citação sugere que as diferenças nas concentrações de equivalentes de procianidina B2 obtidas neste estudo podem estar relacionadas, não apenas a fatores genéticos e climáticos, mas também a maturidade destas variedades.

A partir dos dados obtidos com relação ao óleo de sementes de uva extraído em Soxhlet, observa-se que a variedade Bordô destaca-se, pois, além de ter apresentado altas concentrações de ácidos graxos, apresentou ainda, a maior concentração de α -tocoferol, na safra de 2005, destacando-se também no que diz respeito à procianidinas. O fato de que o óleo da variedade Bordô parece ser o mais rico em concentração de compostos avaliados, quando comparado aos demais óleos, também pode ser observado na Tabela 8 que faz uma comparação das concentrações destes compostos, em mg de composto/100g de óleo ao invés de mg de composto/100g de sementes de uva, visando à verificação da qualidade do óleo em relação a estes compostos avaliados. Observando esta Tabela, temos a confirmação da maior concentração de ácidos graxos, em geral, na variedade Bordô.

A maior concentração de α -tocoferol obtida foi de 10,5mg/100g de óleo com a variedade Cabernet Sauvignon safra de 2006 (Tabela 8), mostrando-se semelhante a valores citados por Beveridge e colaboradores (2005), que avaliaram o óleo de oito diferentes variedades de uva com concentrações que variaram de 3,5 a 27,2mg/100g de óleo com o uso de éter de petróleo para a remoção de óleo das sementes em Soxhlet.

Bravi e colaboradores (2007) avaliaram a concentração de α -tocoferol em uma mistura de diferentes variedades de *V. vinifera* e obtiveram 4,40mg/100g de óleo, utilizando hexano como solvente extrativo em Soxhlet, estando de acordo com as concentrações apresentadas neste estudo. Freitas e colaboradores (2008) avaliaram a presença de α -tocoferol no óleo de seis variedades de *Vitis* sp. extraído em Soxhlet com hexano. As concentrações variaram de 0,10mg de α -tocoferol/100g de óleo a 3,79mg de α -tocoferol/100g de óleo, também estando de acordo com as concentrações apresentadas neste estudo.

A partir destes dados podemos sugerir que diferentes fatores influenciam a concentração de α -tocoferol, como por exemplo, a variedade de uva empregada na extração de óleo ou o tipo de solvente extrativo empregado ou ainda, o tempo de extração.

Tabela 8: Concentração de ácidos graxos, α -tocoferol, fenólicos totais e procianidinas (mg/100g de óleo de sementes de uva) nas variedades estudadas nas safras de 2005 e 2006, por Soxhlet.

Concentração de compostos/100g de óleo de sementes de uva										
Composto químico	Bordô		Isabel		Cabernet Sauvignon		Merlot		Moscato Giallo	
	2005	2006	2005	2006	2005	2006	2005	2006	2005	2006
C16 ¹	3065Aa	1856Ba	2196Ab	1648Aab	844Ac	1071Ab	486Bc	1967Aa	637Bc	1720Aa
C18 ²	1834Aa	1087Ba	1385Aa	467Bb	329Ab	280Ab	190Bb	1036Aa	356Bb	989Aa
C18:1 ³	6382Aa	4506Ba	4773Ab	2692Bb	1258Ac	666Ac	689Bc	2942Ab	982Bc	2700Ab
C18:2 ⁴	23181Aa	15634Ba	15992Ab	5838Bb	3723Ac	1535Ab	1470Bc	14712Aa	3392Bc	12400Aa
Procianidinas ⁵	3,33Aa	3,96Ab	2,02Ab	1,65Ac	1,22Ab	1,65Ac	2,89Aab	2,38Ac	1,87Bb	5,44Aa
Fenólicos ⁶	5,13Aa	2,01Aa	3,95Aa	2,32Aa	3,82Aa	3,63Aa	3,70Aa	1,32Aa	2,82Aa	1,76Aa
α -tocoferol ⁷	2,64Aa	2,05Ab	1,02Ab	0,87Ab	1,51Bab	10,5Aa	1,30Ab	1,40Ab	1,38Aab	1,77Ab

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste AMOVA a 0,05%.

Letras maiúsculas correspondem às linhas nas colunas (entre safras diferentes) e minúsculas às linhas nas colunas de mesmo ano (referem-se aos compostos).

Legenda: ¹ácido palmítico em mg/100g de óleo de sementes de uva; ²ácido esteárico em mg/100g de óleo de sementes de uva; ³ácido oleico em mg/100g de óleo de sementes de uva; ⁴ácido linoleico em mg/100g de óleo de sementes de uva; ⁵mg de equivalentes de procianidina B2/100g de óleo de sementes de uva; ⁶mg de equivalentes de ácido gálico/100g de óleo de sementes de uva; ⁷mg/100g de óleo de sementes de uva.

4.3 Extração de óleo fixo de sementes das variedades Bordô, Isabel, Merlot, Cabernet Sauvignon e Moscato Giallo, com CO₂ supercrítico e análise por cromatografia e espectrofotometria.

Este item trata dos resultados relacionados aos testes realizados para adaptação da metodologia extrativa em extrator supercrítico, para óleo de sementes de uva, bem como, dos resultados referentes à caracterização das variedades avaliadas neste estudo além da comparação entre elas.

4.3.1 Extração de óleo fixo em SFE: testes com a variedade Merlot, safra de 2006.

Segundo Herrero e colaboradores (2010), o uso de projetos experimentais é uma das estratégias mais comuns quando se trata de estabelecer métodos de extração mais eficientes. O uso de valores ótimos para diferentes variáveis influencia a extração supercrítica podendo alterar significativamente a remoção ou o rendimento de compostos alvo. Temperatura e pressão são consideradas as variáveis que mais influenciam o processo de extração.

Sendo assim, para a definição dos melhores parâmetros a serem utilizados em extração supercrítica de sementes de uva foram realizados diferentes testes visando à obtenção de maior rendimento e de maior concentração de compostos de interesse, como é o caso de ácidos graxos, com uma única variedade (Merlot, safra de 2006) e com 60 min de extração.

Os óleos obtidos dos testes foram avaliados com o uso de cromatografia gasosa. Estas condições de extração foram escolhidas porque segundo Cao & Ito (2003), o rendimento do óleo em SFE depende da pressão e da temperatura aplicadas durante a extração, entre outras variáveis, e segundo Lee e colaboradores (2000), a pressão exerce maior impacto no processo de extração.

Observando-se a matriz experimental (Tabela 9) realizada para a escolha das melhores condições para a extração de óleo de sementes de uva, constata-se que a variação no rendimento de óleo foi de 6,03% no teste 19 a 9,29% no teste 6, e que, a concentração de ácido linoleico variou de 73,8% no teste 23 a 74,9% no teste 6.

Observa-se também, que neste caso ocorre o fenômeno de difusão interna que é diretamente proporcional à temperatura, porém inversamente proporcional à pressão. Deste modo, justifica-se o fato de que o maior rendimento em óleo fixo tenha ocorrido a 80°C. A condição de temperatura maior favoreceu a difusão interna e também a vaporização dos compostos orgânicos, devido ao incremento na sua pressão de vapor. Com relação à pressão, os resultados indicam que houve um compromisso entre o aumento da solubilidade, proporcionado pela elevação da pressão, porém associado a uma redução da difusividade. Isto fez com que a condição ótima fosse o nível intermediário da variável pressão, 250bar.

Desta forma, optou-se por utilizar os parâmetros empregados no teste 6 (principalmente em função do rendimento de óleo), para as extrações de óleo de sementes de uva das variedades estudadas, ou seja, 80°C de temperatura, 0,5mL/min de CO₂ e 250bar de pressão.

Segundo Lee e colaboradores (2000), um aumento gradual de temperatura aumenta a extração de óleo porque causa um aumento na pressão de vapor do soluto e uma redução na densidade do solvente supercrítico e segundo Temelli (2009), o impacto da temperatura na extração supercrítica é dependente da competição entre os parâmetros: a densidade do CO₂ diminui com a temperatura enquanto a pressão de vapor dos solutos aumenta, em adição, a difusividade aumenta com a temperatura reforçando a transferência de massa. Portanto, o poder de solvatação do CO₂ pode ser modificado alterando-se a pressão ou a temperatura de extração (Sahena *et al.*, 2009).

Tabela 9: Matriz experimental dos parâmetros utilizados nas extrações de óleo de sementes de uva Merlot, safra de 2006, por SFE, com 60 minutos de extração e análise por GC.

Corrida	Temperatura (°C)	Fluxo (mL/min)	Pressão (bar)	Rendimento de óleo (%)	Palmítico (%)	Estearico (%)	Oleico (%)	Linoleico (%)
1	40	0,5	200	8,31	6,99	4,33	14,5	74,1
2	60	0,5	200	7,44	6,61	4,16	14,2	74,6
3	80	0,5	200	8,32	6,48	4,19	14,2	74,6
4	40	0,5	250	7,67	6,67	4,21	14,2	74,7
5	60	0,5	250	7,91	6,67	4,21	14,3	74,7
6	80	0,5	250	9,29	6,20	4,24	14,2	74,9
7	40	0,5	300	6,77	6,64	4,24	14,3	74,7
8	60	0,5	300	7,43	6,86	4,29	14,2	74,1
9	80	0,5	300	8,28	6,62	4,26	14,3	74,7
10	40	1,0	200	7,66	6,50	4,14	14,2	74,7
11	60	1,0	200	6,77	6,73	4,22	14,3	74,2
12	80	1,0	200	7,67	6,22	4,30	14,3	74,4
13	40	1,0	250	6,65	6,71	4,19	14,4	74,3
14	60	1,0	250	7,24	6,81	4,22	14,2	74,5
15	80	1,0	250	6,42	7,00	4,24	14,3	74,3
16	40	1,0	300	6,53	6,84	4,22	14,3	74,6
17	60	1,0	300	6,78	6,67	4,18	14,2	74,8
18	80	1,0	300	6,71	6,75	4,27	14,2	74,3
19	40	2,0	200	6,03	6,80	4,20	14,2	74,7
20	60	2,0	200	9,14	6,78	4,27	14,4	74,5
21	80	2,0	200	8,60	6,88	4,25	14,3	74,4
22	40	2,0	250	8,16	6,86	4,27	14,2	74,6
23	60	2,0	250	7,71	8,61	4,17	13,3	73,8
24	80	2,0	250	7,60	6,63	4,36	14,3	74,6
25	40	2,0	300	8,72	6,70	4,24	14,3	74,7
26	60	2,0	300	7,79	6,93	4,26	14,4	74,3
27	80	2,0	300	7,10	6,76	4,22	14,3	74,3

Para a determinação do melhor tempo de extração foi realizado um teste, onde o óleo das sementes da variedade Merlot, safra de 2006, foi coletado em diferentes intervalos de tempo e avaliado em relação a rendimento de óleo, por cromatografia gasosa. Este teste pode ser observado na Figura 12, onde se constata que a extração de óleo torna-se constante com 60 min de extração, sendo que a partir deste ponto, não ocorre mais acréscimo no rendimento de óleo extraído.

Desta forma, as extrações de óleo de sementes de uva das variedades Isabel, Bordô, Cabernet Sauvignon, Moscato Giallo e Merlot, nas safras de 2005 e 2006 foram realizadas com temperatura de 80°C, vazão de CO₂ de 0,5mL/min e pressão de 250bar. O tempo de extração utilizado foi de 60 min.

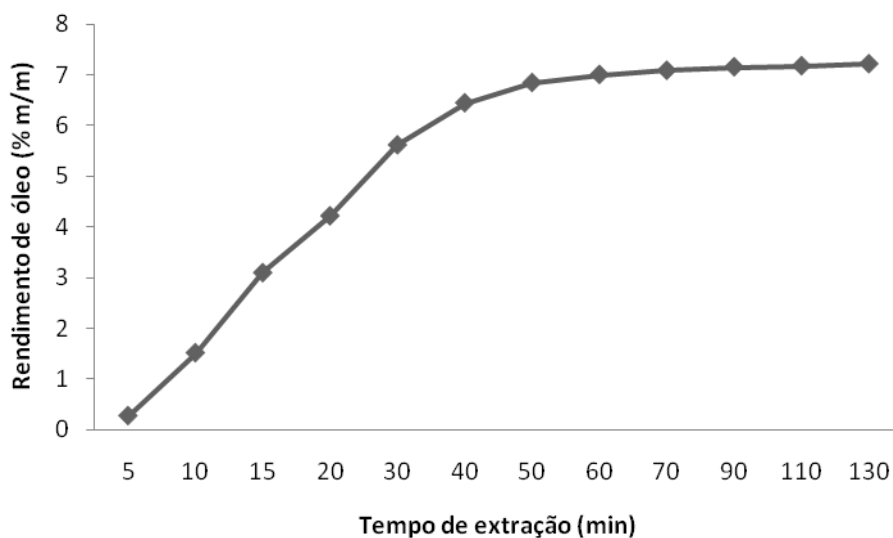


Figura 12: Perfil de tempo de extração de óleo de sementes de uva Merlot, safra de 2006, com 130min de extração, 40°C de temperatura, vazão de CO₂ de 0,5mL/min, 200bar de pressão e análise por GC.

4.3.2 Rendimento de óleo de sementes de uva extraído por SFE nas variedades Bordô, Isabel, Merlot, Cabernet Sauvignon e Moscato Giallo

O rendimento de óleo pode ser observado na Figura 13, onde se utilizou o Teste *t*. Segundo este teste, todos os rendimentos obtidos são diferentes entre si, sendo que o maior rendimento de óleo obtido foi com a variedade Bordô (15,40%), na safra de 2005 e com a variedade Merlot (14,66%), na safra 2006.

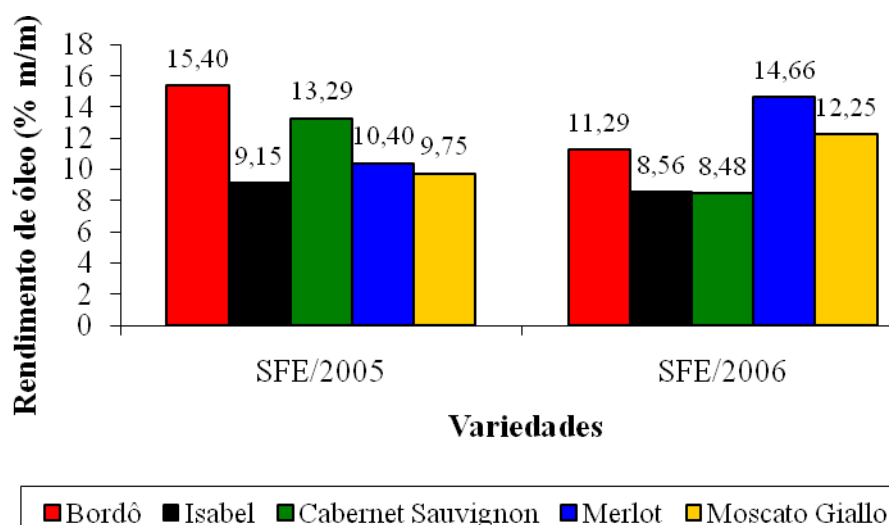


Figura 13: Rendimento (% m/m) de óleo de sementes de uva extraído por SFE.

Os rendimentos de óleo obtidos neste estudo são próximos aos citados por Beveridge e colaboradores (2005), que encontraram para variedades de *V. vinifera* rendimentos entre 5,85% e 13,60%, porém, utilizando pressão e tempo de extração superiores (370bar de pressão, 6h de extração), bem como temperatura inferior (65°C) a empregada em nosso estudo. Ainda de acordo com os rendimentos obtidos a partir das diferentes variedades avaliadas neste estudo, podemos citar Bravi e colaboradores (2007) que obtiveram um máximo de rendimento de óleo de 14,40% utilizando como material vegetal uma mistura de sementes de diferentes variedades de *V. vinifera*. A temperatura utilizada neste trabalho foi o dobro daquela empregada pelos autores citados e o tempo de extração foi bastante inferior, já a pressão foi a mesma (250bar de pressão, 40°C de temperatura e 7h de extração).

Os valores de rendimento de óleo obtidos neste estudo apresentam-se superiores aqueles descritos por Gómez e colaboradores (1996), que extraíram com CO₂ supercrítico, sementes da

variedade Airen durante 3h utilizando 350bar de pressão e 40°C de temperatura, obtendo 6,90% de rendimento de óleo. Comparando as condições utilizadas pelos autores e aquelas utilizadas neste estudo, observando uma menor temperatura e maiores pressão e tempo de extração. Cao & Ito (2003) também apresentaram valor de rendimento de óleo inferior aos obtidos neste estudo (6,20%), utilizando 400bar de pressão e 40°C de temperatura por um período de 3h. Estes autores também utilizaram pressão e tempo de extração superiores e temperatura inferior aos utilizados neste trabalho.

As diferenças observadas com relação aos autores citados podem ser devidas a vários fatores, como pressão, temperatura, tempo de extração e a variedade de uva empregada nos diferentes estudos. Segundo Lee e colaboradores (2000) e Passos e colaboradores (2009), geralmente a solubilidade do óleo de sementes de uva aumenta com o aumento da pressão devido ao aumento da densidade do fluído supercrítico, e ainda segundo Lee e colaboradores (2000), o aumento da temperatura causa aumento na pressão de vapor do soluto, diminuindo a densidade do fluído supercrítico e por consequência, aumentando o rendimento de óleo extraído.

Para Cao & Ito (2003), a pressão foi o mais importante fator na extração de óleo de sementes de uva, pois altas pressões aumentaram significativamente o rendimento de óleo e a quantidade de ácidos graxos insaturados extraídos, por outro lado, a temperatura não influenciou o rendimento de óleo. Sendo assim, podemos supor que os elevados rendimentos de óleo obtidos neste estudo, quando comparados aos obtidos pelos autores, que utilizaram maiores pressões, são provavelmente devidos as diferentes variedades de uva empregados nos diferentes estudos.

4.3.2.1 Ácidos Graxos, α -Tocoferol, Fenólicos totais e Procianidinas nas variedades Bordô, Isabel, Merlot, Cabernet Sauvignon e Moscato Giallo

A composição de ácidos graxos, α -tocoferol, compostos fenólicos totais e procianidinas totais do óleo extraído com CO₂ supercrítico, pode ser observada na Tabela 10. Constata-se a presença dos mesmos quatro ácidos graxos (Figura 14) observados na extração em Soxhlet: ácido palmítico (C16), ácido esteárico (C18), ácido oleico (C18:1) e ácido linoleico (C18:2). Os resultados obtidos estão de acordo com estudos realizados por diferentes autores, como Dalmolin e colaboradores (2010), Bravi e colaboradores (2007), Beveridge e colaboradores (2005), Cao & Ito (2003), Lee e colaboradores (2000) e Gómez e colaboradores (1996), que também demonstraram a presença destes ácidos graxos no óleo de sementes de uva extraído por SFE.

Com relação aos ácidos graxos (Tabela 10), em geral, houve um aumento de concentração nas variedades Merlot e Moscato Giallo entre as safras, e nas variedades Isabel e Bordô houve uma redução no ácido esteárico, entre as safras, além do ácido palmítico que teve uma redução apenas na variedade Bordô.

A maior concentração dos ácidos graxos avaliados foi observada na variedade Bordô, na safra de 2005, e nas variedades Bordô, Merlot e Moscato Giallo na safra de 2006, sendo que a variedade Bordô ainda apresentou a maior concentração de ácido oleico nas duas safras.

As variações encontradas nas concentrações de ácidos graxos podem ser conseqüências indiretas da radiação solar, da temperatura do ar, da precipitação pluviométrica e da umidade relativa do ar, como sugeriu Mandelli (2005). Estes são os elementos merendimentoológicos que mais exercem influência sobre o desenvolvimento, maturação, produção e qualidade da uva na Serra Gaúcha. Tais fatores merendimentoológicos podem estar influenciando o metabolismo das

videiras e proporcionando as variações observadas nas concentrações dos ácidos graxos em relação às safras avaliadas neste estudo.

Da mesma forma que o óleo extraído em Soxhlet, o óleo das diferentes variedades avaliadas, extraído por SFE, apresenta como composto majoritário o ácido linoleico, estando de acordo com a literatura (Dalmolin *et al.*, 2010; Bravi *et al.*, 2007; Beveridge *et al.*, 2005; Cao & Ito 2003; Lee *et al.*, 2000; Gómez *et al.*, 1996). Segundo Sahena e colaboradores (2009), a solubilidade de ácidos graxos em CO₂ supercrítico depende do tamanho da cadeia de hidrocarbonetos e da presença de grupos funcionais, bem como, do efeito dos parâmetros de extração, como pressão e temperatura.

Em geral, observa-se que a variedade Bordô, uma variedade ainda pouco estudada, apresentou as maiores concentrações de ácidos graxos quando comparada às demais variedades, podendo demonstrar um grande potencial para extração de óleo. Da mesma forma que para o Soxhlet, fez-se uma estimativa da produção de óleo em relação à quantidade de uva processada em 2005 (Embrapa, 2007), usando como parâmetros a média do rendimento de óleo obtido neste estudo, por SFE, para cada variedade, e a porcentagem de sementes de uva presentes no bagaço, obtendo-se para o ano de 2005: 494.299,7kg de óleo de uva Isabel e 257.018,3kg de óleo de uva Bordô, além de 41.848,5kg de óleo de uva Cabernet Sauvignon, 39.966,3kg de óleo de uva Merlot e 2.319,4kg de óleo de uva Moscato Giallo, ressaltando o potencial das variedades Isabel e Bordô, para produção de óleo.

Tabela 10: Concentração de ácidos graxos, α -tocoferol, fenólicos totais e procianidinas (mg/100g de sementes de uva) dos óleos de sementes de diferentes variedades de uva das safras de 2005 e 2006, pelo método extrativo SFE.

Concentração de compostos/100g de sementes de uva										
Composto químico	Bordô		Isabel		Cabernet Sauvignon		Merlot		Moscato Giallo	
	2005	2006	2005	2006	2005	2006	2005	2006	2005	2006
C16 ¹	496Aa	316Ba	185Ab	174Ab	149Abc	111Ab	77,9Bc	281Aa	156Bbc	273Aa
C18 ²	194Aa	147Ba	85,1Ab	29,8Bb	43,9Abc	23,4Ab	23,7Bc	134Aa	55,1Bbc	149Aa
C18:1 ³	774Aa	713Aa	280Ab	202Ac	187Abc	62,8Ad	79,2Bc	430Ab	143Bc	466Ab
C18:2 ⁴	2315Aa	2162Aa	800Ab	243Ab	425Ab	113Ab	252Bb	1951Aa	427Bb	2059Aa
Procianidinas ⁵	0,31Ba	0,54Aa	0,19Aa	0,25Aab	0,31Aa	0,25Aab	0,21Aa	0,37Aa	0,21Aa	0,39Aa
Fenólicos ⁶	2,37Aa	2,36Aa	1,70Ab	1,25Ab	2,13Aa	2,06Aa	1,57Ab	1,74Aa	1,33Ab	1,23Ab
α -tocoferol ⁷	1,32Aa	0,65Ba	0,39Ac	0,24Ab	0,26Ac	0,14Abc	0,17Bcd	0,37Ab	1,12Ab	0,18Bbc

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste AMOVA a 0,05%.

Letras maiúsculas correspondem às linhas nas colunas (entre safras diferentes) e minúsculas às linhas nas colunas de mesmo ano (referem-se aos compostos).

Legenda: ¹ácido palmítico em mg/100g de sementes de uva; ²ácido esteárico em mg/100g de sementes de uva; ³ácido oleico em mg/100g de sementes de uva; ⁴ácido linoleico em mg/100g de sementes de uva; ⁵mg de equivalentes de procianidina B2/100g de sementes de uva; ⁶mg de equivalentes de ácido gálico/100g de sementes de uva; ⁷mg/100g de sementes de uva.

Os óleos de sementes de uva também foram analisados quanto a presença de α -tocoferol (Tabela 10 e Figura 15) por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com o uso do padrão α -tocoferol, que apresentou curva padrão com coeficiente de regressão linear (R^2) de 0,9997. Observou-se um aumento na variedade Merlot de uma safra para outra e uma redução nas variedades Bordô e Moscato Giallo. As concentrações deste composto variaram de 0,14mg/100g SU na variedade Cabernet Sauvignon, safra de 2006, a 1,32mg/100g SU na variedade Bordô, safra de 2005. A variedade Bordô apresentou a maior concentração deste composto nas duas safras.

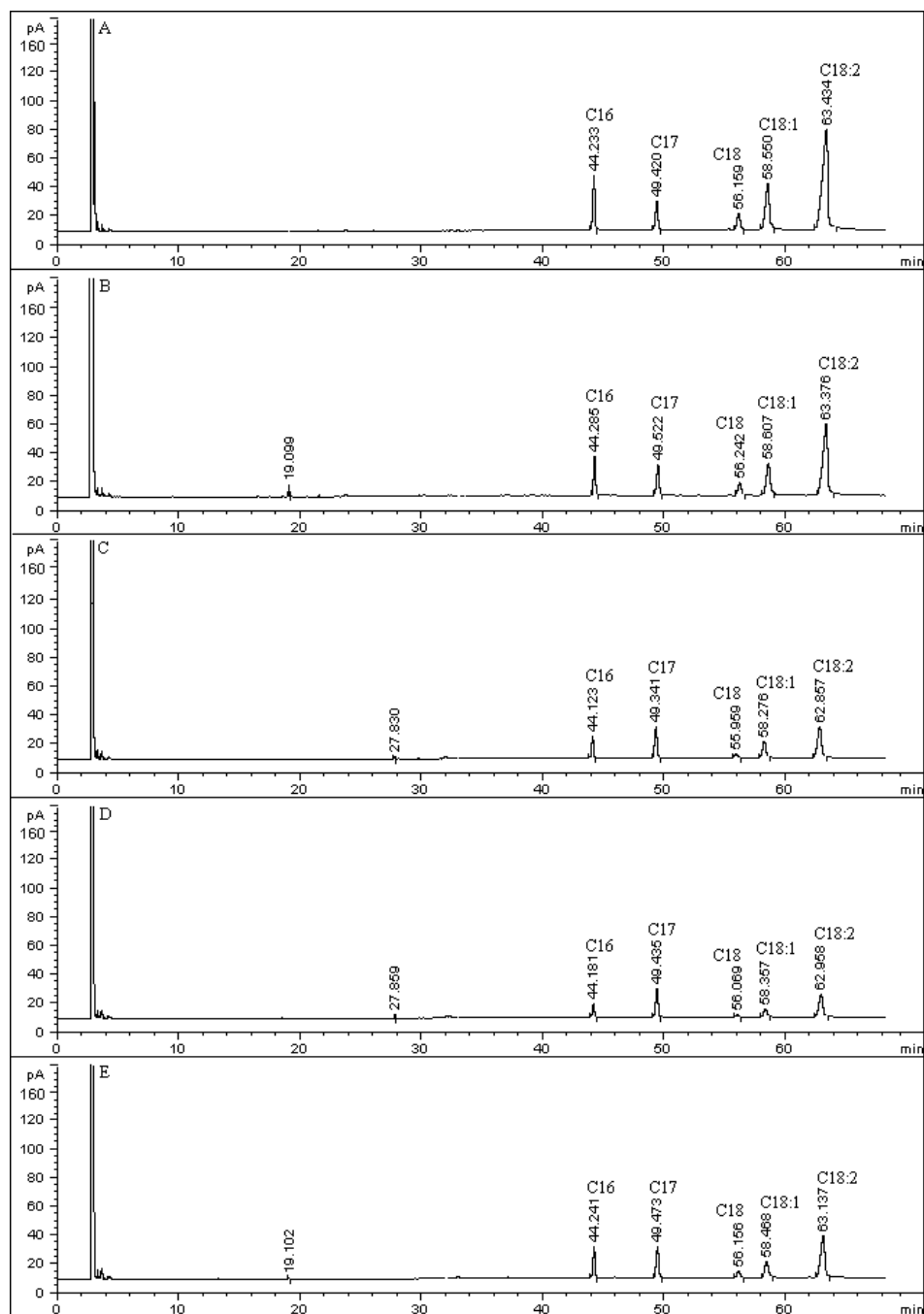


Figura 14: Cromatogramas de ácidos graxos de óleo de sementes das variedades Bordô (A), Isabel (B), Cabernet Sauvignon (C), Merlot (D) e Moscato Giallo (E), safra de 2005, por GC.

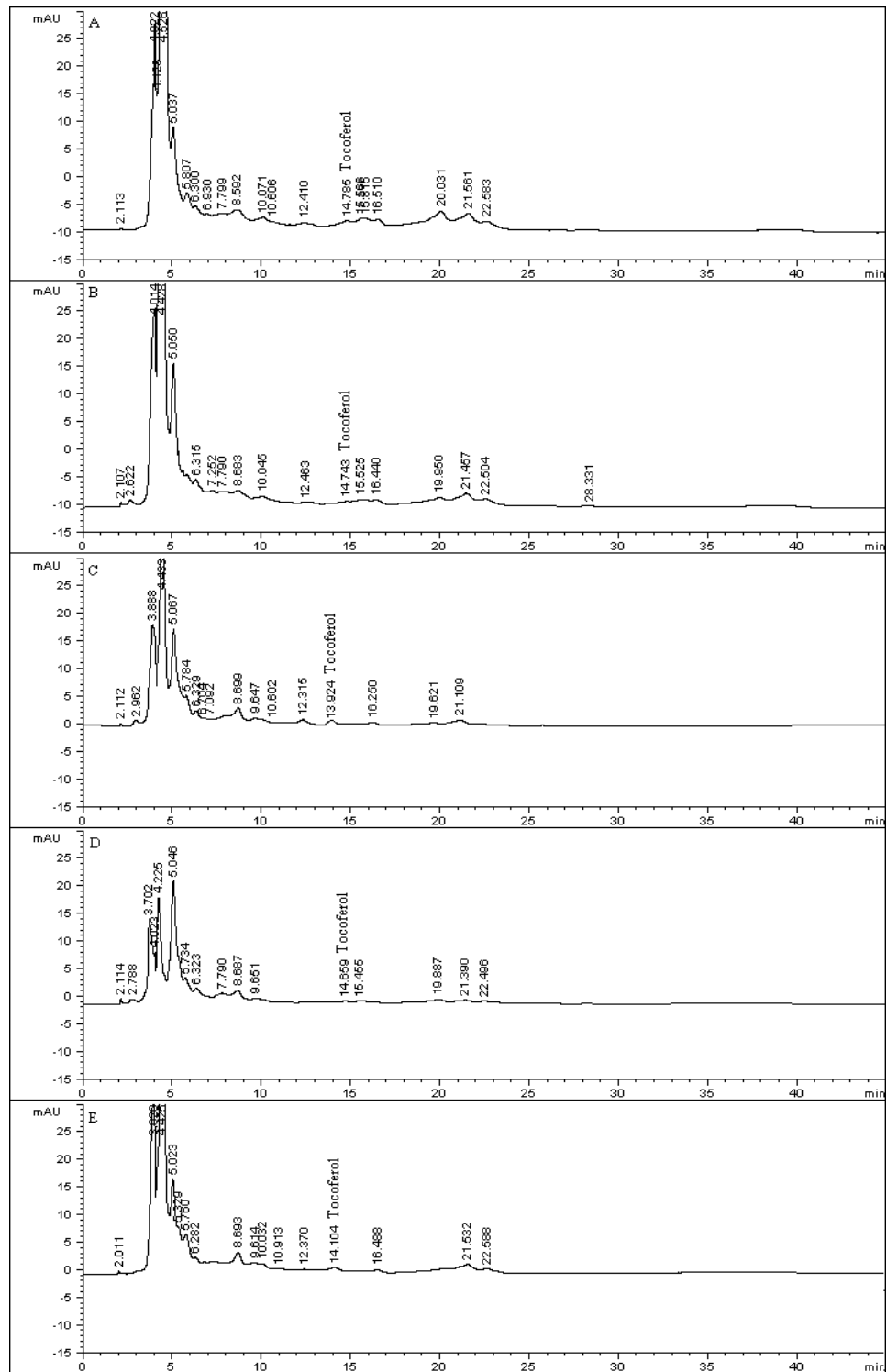


Figura 15: Cromatogramas de α -tocoferol nos óleos de sementes das variedades Bordô (A), Isabel (B), Cabernet Sauvignon (C), Merlot (D) e Moscato Giallo (E), safra de 2005, por HPLC.

A concentração de equivalentes de procianidinas (Tabela 10) apresentou um aumento de concentração apenas na variedade Bordô e na safra de 2005, as demais variedades não apresentaram diferenças significativas entre as safras. Na safra de 2005, também não se observou diferença significativa entre as variedades avaliadas e na safra de 2006, ocorreu uma diferença apenas nas variedades Isabel e Cabernet Sauvignon, que demonstram um valor um pouco inferior de concentração de equivalentes de proantocianidinas quando comparadas as demais variedades avaliadas neste estudo. As concentrações variaram de 0,19mg EPB2/100g SU na variedade Isabel, safra de 2005, a 0,54mg EPB2/100g SU na variedade Bordô, safra de 2006.

Em relação aos fenólicos totais (Tabela 10), não ocorreram mudanças significativas entre as safras, mas observou-se uma maior concentração em equivalentes de ácido gálico, nas variedades Bordô e Cabernet Sauvignon, na safra de 2005 e novamente nas variedades Bordô e Cabernet Sauvignon, além da variedade Merlot, na safra de 2006. As concentrações obtidas variaram de 1,23mg EAG/100g SU na variedade Moscato Giallo, safra de 2006, a 2,37mg EAG/100g SU na variedade Bordô, safra de 2005.

Sabe-se que as uvas são consideradas uma das maiores fontes de compostos fenólicos quando comparadas a outras frutas e vegetais, porém a grande diversidade genética entre as variedades resulta em uvas com diferentes características, tanto de sabor quanto de coloração, o que está associado com o conteúdo e o perfil dos polifenóis (Abe *et al.*, 2007). A concentração destes compostos fenólicos depende da variedade de videira e é influenciada por fatores ambientais e vitícolas (Montealegre *et al.*, 2006; Hatzidimitriou *et al.*, 2007). Provavelmente estas sejam as causas das diferenças observadas na concentração de fenólicos totais nas variedades avaliadas.

A partir dos dados obtidos com relação a óleo de sementes de uva extraídos por SFE, observa-se que da mesma forma que ocorreu em Soxhlet, a variedade Bordô destaca-se das demais variedades por apresentar altas concentrações de ácidos graxos, de proantocianidinas, de fenólicos totais e de α -tocoferol.

A Tabela 11 apresenta a concentração dos compostos avaliados no óleo das variedades estudadas, em mg de composto/100g de óleo ao invés de mg de composto/100g de sementes de uva, visando à verificação da qualidade do óleo em relação a estes compostos avaliados. Observando esta tabela, temos a confirmação da maior concentração de ácidos graxos, em geral, na variedade Bordô.

A maior concentração de α -tocoferol obtida neste estudo foi de 11,5mg/100g de óleo com a variedade Moscato Giallo safra de 2005 (Tabela 11), mostrando-se inferior a valores citados por Beveridge e colaboradores (2005), que avaliaram o óleo de oito diferentes variedades de uva com concentrações que variaram de 7,67 a 30,9mg/100g de óleo.

Bravi e colaboradores (2007), também apresentaram valores elevados de concentração de α -tocoferol para uma mistura de diferentes variedades de *V. vinifera* variando as condições da extração supercrítica, como a temperatura e obtendo de 3,60 a 26,5mg/100g de óleo.

Segundo Dalmolin e colaboradores (2010), a concentração de α -tocoferol de uma mistura das variedades Malbec e Cabernet Franc foi de 3,90mg/100g de óleo, estando de acordo com os valores obtidos neste estudo.

Estes dados de comparação sugerem que diferentes fatores interferem na concentração de α -tocoferol, como por exemplo, a variedade de uva empregada na extração de óleo ou a variação nas condições da extração supercrítica, o que pode ser comprovado através do estudo

realizado por Bravi e colaboradores (2007), que afirmam que a concentração de α -tocoferol em óleo extraído por SFE aumentou em função da temperatura.

Tabela 11: Concentração de ácidos graxos, α -tocoferol, fenólicos totais e procianidinas (mg/100g de óleo de sementes de uva) dos óleos de sementes de diferentes variedades de uva das safras de 2005 e 2006, pelo método extrativo SFE.

Concentração de compostos/100g de óleo de sementes de uva										
Composto químico	Bordô		Isabel		Cabernet Sauvignon		Merlot		Moscato Giallo	
	2005	2006	2005	2006	2005	2006	2005	2006	2005	2006
C16 ¹	3226Aa	2805Aa	2028Ab	2032Aab	1112Abc	1310Ac	750Bc	1917Abc	1607Ab	2230Aa
C18 ²	1264Aa	1307Aa	929Aa	347Bc	330Ab	276Ac	228Bb	920Aab	565Bb	1218Aa
C18:1 ³	5028Ba	6315Aa	3066Ab	2359Abc	1390Ac	741Ac	761Bc	2937Abc	1468Bc	3807Ab
C18:2 ⁴	15034Aa	19281Aa	8744Ab	2838Bb	3184Abc	1339Ab	2575Bbc	13309Aa	4385Bbc	16805Aa
Procianidinas ⁵	2,02Ba	4,78Aa	2,09Aa	2,89Ab	2,31Aa	2,96Ab	2,02Aa	2,53Ab	2,16Aa	3,18Ab
Fenólicos ⁶	15,3Bab	20,8Aa	18,5Aa	14,5Bb	16,0Bab	24,2Aa	15,1Aab	11,8Abc	13,7Ab	10,1Ac
α -tocoferol ⁷	8,56Ab	5,73Ba	4,21Ac	2,83Bb	1,93Acd	1,62Abc	1,63Ad	2,51Abc	11,5Aa	1,45Bc

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste AMOVA a 0,05%.

Letras maiúsculas correspondem às linhas nas colunas (entre safras diferentes) e minúsculas às linhas nas colunas de mesmo ano (referem-se aos compostos).

Legenda: ¹ácido palmítico em mg/100g de óleo de sementes de uva; ²ácido esteárico em mg/100g de óleo de sementes de uva; ³ácido oleico em mg/100g de óleo de sementes de uva; ⁴ácido linoleico em mg/100g de óleo de sementes de uva; ⁵mg de equivalentes de procianidina B2/100g de óleo de sementes de uva; ⁶mg de equivalentes de ácido gálico/100g de óleo de sementes de uva; ⁷mg/100g de óleo de sementes de uva.

4.4 Comparação entre as metodologias extrativas: Soxhlet x SFE nas variedades Bordô, Isabel, Merlot, Cabernet Sauvignon e Moscato Giallo

Este item refere-se às comparações realizadas entre as metodologias extrativas, no que diz respeito ao óleo. As comparações foram feitas em função dos compostos químicos presentes nas sementes de uva das diferentes variedades avaliadas neste estudo.

4.4.1 Rendimento de óleo de sementes de uva: Soxhlet x SFE

A comparação entre o rendimento de óleo de sementes de uva das diferentes variedades em função do método extrativo pode ser visualizada na Figura 16, onde se utilizou o Teste *t* para avaliar os resultados. Segundo este teste, todos os rendimentos obtidos são diferentes entre si, e com isso, percebe-se que com o uso da metodologia de extração em extrator Soxhlet tem-se um maior rendimento de óleo com as variedades Cabernet Sauvignon e Bordô, nas safras de 2005 e 2006 respectivamente, e, com a metodologia de extração supercrítica, os maiores rendimentos de óleo foram obtidos com as variedades Bordô, na safra de 2005 e Merlot, na safra de 2006. Entre as duas metodologias extrativas, o maior rendimento de óleo obtido foi com o método de extração em Soxhlet e com a variedade Bordô 2006.

Em geral, os maiores rendimentos de óleo foram obtidos com a extração em Soxhlet, mas não se pode dizer que este método de extração de óleo de sementes de uva seja melhor que a extração supercrítica porque o massivo uso de solventes orgânicos para extração de produtos naturais pelas indústrias representa uma séria ameaça ao meio ambiente (Herrero *et al.*, 2010). Processos de extração devem ser ecologicamente corretos e não devem criar poluição adicional e a extração por Soxhlet não cumpre esses requisitos, pois gera um grande volume de contaminantes além de emitir vapores tóxicos (Sahena *et al.*, 2009).

Gómez e colaboradores (1996), citam que extrações com hexano rendem maiores rendimentos de óleo quando comparadas a extrações com CO₂ supercrítico, por que o hexano, ao contrário do CO₂, não é seletivo para triglicerídeos, extraíndo ácidos graxos livres, fosfolipídeos, pigmentos e substâncias insaponificáveis junto com triglicerídeos, por isso, o rendimento de óleo extraído em Soxhlet normalmente será maior que aquele obtido em SFE.

Segundo Cao & Ito (2003), a eficiência da extração com CO₂ supercrítico é de cerca de 60% da extração com hexano em Soxhlet. Fazendo a mesma relação que os autores, neste estudo observamos que a eficiência da extração com CO₂ supercrítico em relação à extração com hexano em Soxhlet variou de 68,56% a 94,82%, mostrando-se superior aquela citada pelos autores. Gómez e colaboradores (1996) obtiveram 92% de eficiência na extração supercrítica em relação à extração com hexano em Soxhlet.

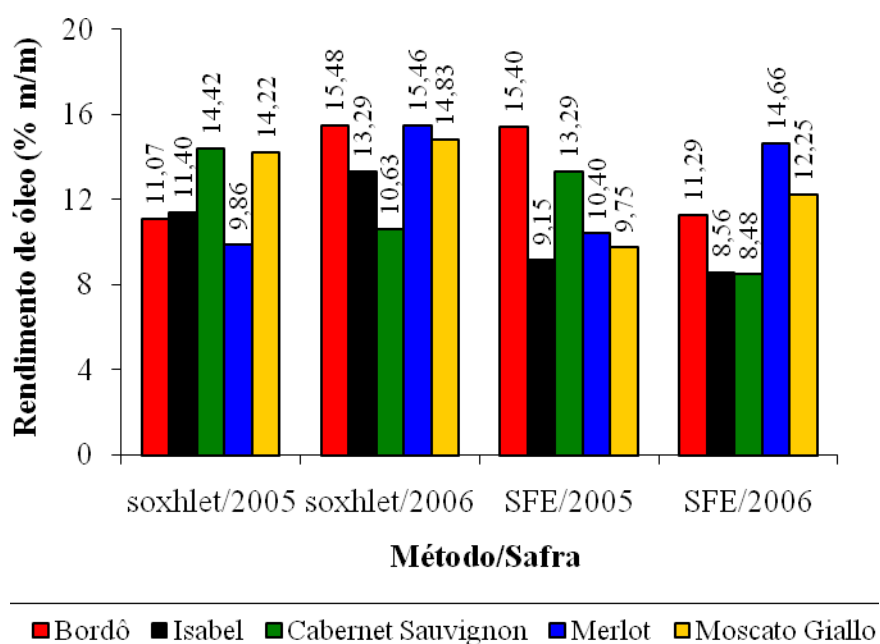


Figura 16: Comparação do rendimento (% m/m) de óleo de sementes de uva extraído por Soxhlet e por SFE, nas safras de 2005 e 2006.

4.4.1.1 Ácidos Graxos, α -Tocoferol, Fenólicos totais e Procianidinas: Soxhlet x SFE

As concentrações dos compostos químicos avaliados no óleo de sementes das diferentes variedades (Tabelas 12 e 13), apresentaram comportamento semelhante para os dois métodos extrativos.

Uma variação na concentração dos ácidos graxos entre os métodos foi verificada apenas nas variedades Bordô e Isabel, onde a extração supercrítica removeu uma maior quantidade de ácido palmítico, na safra de 2005, da variedade Bordô e menores concentrações de ácidos esteárico, oleico e linoleico, da variedade Isabel, na safra de 2005, além de uma menor concentração de ácido oleico, nesta mesma variedade, na safra de 2006. Não observou-se diferenças significativas entre os métodos, com relação à ácidos graxos, nas variedades Cabernet Sauvignon, Merlot e Moscato Giallo.

Segundo Dalmolin e colaboradores (2010), o menor conteúdo de ácidos graxos obtido em extração supercrítica é devido ao fato de que CO₂ supercrítico ser mais seletivo para triglicerídeos quando comparado aos ácidos graxos e uma temperatura de extração de 40°C é considerada suave, prevenindo a formação de ácidos graxos livres a partir de triglicerídeos durante a extração. Já, no presente estudo, com algumas exceções, não observamos menores concentrações de ácidos graxos, com o uso de CO₂ supercrítico em relação a extração em Soxhlet, provavelmente porque a temperatura utilizada em nossas extrações foi 80°C, o dobro daquela utilizada pelos autores citados. Este fato também pode ser embasado na citação de Gómez e colaboradores (1996), que afirmam que altas temperaturas aumentam a quantidade de ácidos graxos em sementes de uva porque quebram os triglicerídeos em ácidos graxos.

Tabela 12: Comparação da concentração de ácidos graxos, α -tocoferol, fenólicos totais e procianidinas, nos óleos de sementes das variedades de *V. labrusca* das safras 2005 e 2006, entre os métodos extrativos.

Compostos químicos	Bordô				Isabel			
	Safr 2005		Safr 2006		Safr 2005		Safr 2006	
	Soxhlet	SFE	Soxhlet	SFE	Soxhlet	SFE	Soxhlet	SFE
C16 ¹	338B	496A	285A	316A	247A	185A	219A	174A
C18 ²	202A	194A	167A	147A	156A	85,1B	62,9A	29,8A
C18:1 ³	704A	774A	694A	713A	560A	280B	359A	202B
C18:2 ⁴	2557A	2315A	2405A	2162A	1800A	800B	795A	243A
Procianidinas ⁵	0,37A	0,31A	0,63A	0,54A	0,23A	0,19A	0,22A	0,25A
Fenólicos ⁶	0,57B	2,37A	0,31B	2,36A	0,45B	1,70A	0,35B	1,25A
α -tocoferol ⁷	0,45B	1,32A	0,32B	0,65A	0,09B	0,39A	0,12A	0,24A

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste AMOVA a 0,05%.

Legenda: ¹ácido palmítico em mg/100g de sementes de uva; ²ácido esteárico em mg/100g de sementes de uva; ³ácido oleico em mg/100g de sementes de uva; ⁴ácido linoleico em mg/100g de sementes de uva; ⁵mg de equivalentes de procianidina B2/100g de sementes de uva; ⁶mg de equivalentes de ácido gálico/100g de sementes de uva; ⁷mg/100g de sementes de uva.

Tabela 13: Comparação da concentração de ácidos graxos, α -tocoferol, fenólicos totais e procianidinas, nos óleos de sementes das variedades de *V. vinifera* das safras 2005 e 2006, entre os métodos extrativos.

Compostos químicos	Cabernet Sauvignon				Merlot				Moscato Giallo			
	Safr 2005		Safr 2006		Safr 2005		Safr 2006		Safr 2005		Safr 2006	
	Soxhlet	SFE	Soxhlet	SFE	Soxhlet	SFE	Soxhlet	SFE	Soxhlet	SFE	Soxhlet	SFE
C16 ¹	121A	149A	110A	111A	47,5A	77,9A	187A	281A	90,6A	156A	252A	273A
C18 ²	47,4A	43,9A	29,1A	23,4A	18,4A	23,7A	159A	134A	50,8A	55,1A	145A	149A
C18:1 ³	181A	187A	69,2A	62,8A	67,1A	79,2A	454A	430A	140A	143A	397A	466A
C18:2 ⁴	536A	425A	160A	113A	138A	252A	2240A	1951A	483A	427A	1823A	2059A
Procianidinas ⁵	0,18A	0,31A	0,18A	0,25A	0,29A	0,21A	0,37A	0,37A	0,27A	0,21A	0,81A	0,39B
Fenólicos ⁶	0,55B	2,13A	0,40B	2,06A	0,37B	1,57A	0,20B	1,74A	0,41B	1,33A	0,26B	1,23A
α -tocoferol ⁷	0,22A	0,26A	1,12A	0,14B	0,13A	0,17A	0,22A	0,37A	0,20B	1,12A	0,26A	0,18A

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste AMOVA a 0,05%.

Legenda: ¹ácido palmítico em mg/100g de sementes de uva; ²ácido esteárico em mg/100g de sementes de uva; ³ácido oleico em mg/100g de sementes de uva; ⁴ácido linoleico em mg/100g de sementes de uva; ⁵mg de equivalentes de procianidina B2/100g de sementes de uva; ⁶mg de equivalentes de ácido gálico/100g de sementes de uva; ⁷mg/100g de sementes de uva.

Com relação a equivalentes de procianidinas (Tabelas 12 e 13), a única diferença significativa observada ocorreu para a variedade Moscato Giallo, onde a extração supercrítica

pareceu demonstrar uma menor eficácia em relação a extração contínua a quente em extrator Soxhlet.

A extração supercrítica parece ter sido mais eficaz, quando comparada a extração em Soxhlet, para todas as variedades avaliadas, com relação a concentração de fenólicos totais (Tabelas 12 e 13). Por fim, a obtenção de α -tocoferol, que também pode ser observada nas Tabelas 12 e 13, foi maior em extração supercrítica nas variedades Bordô, em ambas as safras, Isabel e Moscato Giallo, na safra de 2005, já, para a variedade Cabernet Sauvignon, na safra de 2006, a maior concentração deste composto ocorreu com a extração contínua a quente em extrator Soxhlet. Segundo Bravi e colaboradores (2007), a concentração de α -tocoferol no óleo de sementes de uva (mistura de diferentes variedades de *V. vinifera*) extraído por SFE foi superior aquela obtida em Soxhlet e o rendimento de óleo foi inferior.

Cabe ressaltar, que a extração supercrítica foi realizada durante 1 hora, e que a extração em Soxhlet foi realizada em um tempo de extração de 6 horas. Segundo Sahena e colaboradores (2009), o CO₂ supercrítico pode penetrar nos poros dos materiais sólidos mais eficientemente que solventes líquidos podendo causar uma transferência de massa maior, resultando em extrações mais rápidas.

Da mesma forma que observamos neste estudo, para Cao & Ito (2003), a composição em ácidos graxos dos óleos obtidos por SFE foi quase a mesma daqueles obtidos em extrator Soxhlet. Esse é um fator importante, porque o dióxido de carbono supercrítico é um solvente adequado para a produção de óleos, oferecendo numerosas vantagens, como o fato de não deixar praticamente nenhum vestígio, ser seguro e ter relativamente baixo custo (Dalmolin *et al.*, 2010), além de reduzir o impacto ambiental causado pelas atividades humanas (Herrero *et al.*, 2010).

Industrialmente, os óleos de sementes são obtidos por extração a partir de uma matriz sólida por prensagem mecânica e extração com solvente orgânico. Durante a prensagem, a maior parte do óleo é extraída das sementes, mas uma considerável quantidade permanece na torta final e um segundo passo de extração é necessário para sua total remoção, utilizando solvente. Tradicionalmente, o hexano tem sido empregado, mas apesar do processo ser muito eficiente, possibilita a degradação térmica do óleo e uma incompleta eliminação do resíduo do solvente, sendo estas as principais desvantagens deste processo (Dalmolin *et al.*, 2010).

Da mesma forma que a prensagem a frio, a extração em Soxhlet usa como solvente extrativo o hexano, resultando nos mesmos problemas encontrados na segunda etapa da extração por prensagem. Esses problemas não são observados com a extração supercrítica, pois não é necessário o uso de solvente para a remoção do óleo. Outro fato que favorece o uso de extração supercrítica, quando comparada a outras formas de extração de óleo de sementes de uva, é que usualmente, óleos vegetais tem que ser refinados para remover compostos indesejáveis antes do consumo. Durante este processo de refino, compostos preciosos presentes no óleo podem ser perdidos, assim, SFE tem sido sugerido como uma alternativa aos procedimentos de refino para obtenção de óleos enriquecidos com compostos de interesse (Herrero *et al.*, 2010).

Segundo Gómez e colaboradores (1996) e Temelli (2009), a qualidade do óleo extraído por SFE é similar aquela obtida do óleo por extração com solvente orgânico e posterior refino. Entretanto, o processo de refino não é necessário com SFE.

Considera-se que apesar do alto custo de operação, a extração supercrítica de óleo de sementes de uva pode ser mais econômica que a extração convencional com solvente, porque os estágios de destilação do solvente e de refino, que consomem muita energia, não são necessários (Gómez *et al.*, 1996; Temelli, 2009).

4.5 Extração de compostos fenólicos de sementes das variedades Bordô, Isabel, Merlot, Cabernet Sauvignon e Moscato Giallo com extrator Soxhlet e análise por cromatografia e espectrofotometria

Neste item são apresentados resultados de determinação de solvente extrativo em Soxhlet, além das extrações realizadas nas diferentes variedades estudadas por este método e com o uso do solvente selecionado, bem como, a avaliação cromatográfica e espectrofotométrica dos extratos obtidos.

4.5.1 Testes de extração de compostos fenólicos de sementes da variedade Merlot em extrator Soxhlet e caracterização dos componentes

Todos os extratos foram concentrados e os rendimentos obtidos podem ser visualizados na Figura 17, onde se observa que os rendimentos de extrato variaram de 4,27% com o uso do solvente acetona:água:ácido acético à 8,83% com o uso de metanol 100%.

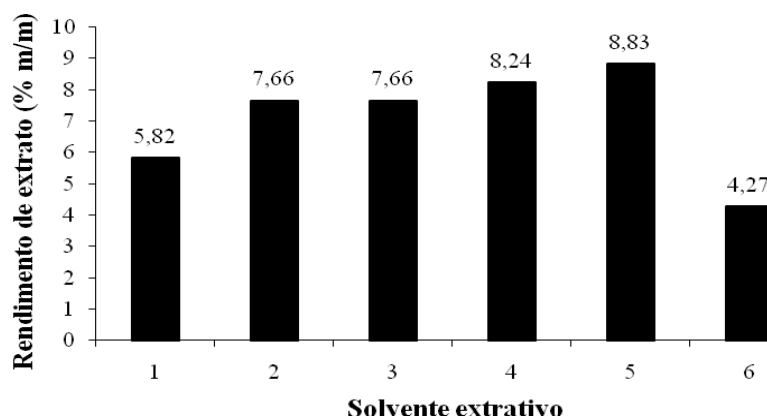


Figura 17: Rendimento (% m/m) de extrato bruto de sementes de uva Merlot obtido em Soxhlet, com diferentes solventes extrativos.

Legenda: 1 - acetato de etila:metanol:água (60:30:10); 2 - etanol 70%; 3 - metanol 80%; 4 - metanol 70%; 5 - metanol 100%; 6 - acetona:água:ácido acético (180:90:1).

Na Tabela 14, estão representadas as concentrações dos compostos avaliados nos extratos de sementes de Merlot obtidos a partir de diferentes solventes extrativos. Observa-se que todos os solventes testados parecem efetivos na extração dos compostos desejados, exceto para a procianidina B4. Os solventes mais eficazes neste caso, parecem ser o etanol 70%, o metanol 70% e as misturas de solventes acetona:água:ácido acético e acetato de etila:metanol:água.

Tabela 14: Determinação do melhor solvente extrativo para obtenção de extratos de sementes de Merlot, avaliados por HPLC, a partir da concentração de catequina, epicatequina, procianidina B1, B2, B3 e B4.

Solvente extrativo	Concentração (mg/L de solução)					
	B1	B2	B3	B4	Catequina	Epicatequina
Acetato de etila:metanol:água (60:30:10)	1,06	1,54	2,31	-	4,94	5,21
Etanol 70%	1,07	1,54	2,79	-	5,09	4,70
Metanol 80%	0,77	1,18	2,24	-	3,18	5,07
Metanol 70%	1,21	1,78	3,12	-	5,09	4,77
Metanol 100%	0,56	0,93	1,53	-	2,65	5,24
Acetona:água:ácido acético (180:19:1)	1,86	2,63	3,44	-	4,32	3,95

Fazendo um comparativo deste resultado (Tabela 14) com o rendimento de extrato (Figura 17), ambos com o uso de diferentes solventes extrativos, constata-se que as misturas de solventes acetona:água:ácido acético e acetato de etila:metanol:água resultaram em menor rendimento de extrato quando comparadas a etanol 70% e metanol 70%. A relação custo/benefício entre os solventes metanol e etanol, levou a escolha do etanol, por ser menos tóxico e ter menor custo. Segundo Nawaz e colaboradores (2006), o etanol como solvente de

extração, mostrou-se eficiente na remoção de compostos fenólicos a partir de sementes de uva. Desta forma, os experimentos de extração em Soxhlet foram conduzidos com o uso de etanol 70% como solvente extrativo.

4.5.2 Rendimento de extrato de sementes de uva extraído por Soxhlet nas variedades Bordô, Isabel, Merlot, Cabernet Sauvignon e Moscato Giallo

O rendimento de extrato bruto de sementes de diferentes variedades de uva obtido com auxílio de extrator Soxhlet (Tabela 15) variou entre 2,83% (Isabel) e 9,04% (Merlot) na safra de 2005 e de 2,90% (Merlot) a 7,54% (Cabernet Sauvignon) na safra de 2006. Estes dados estão de acordo com àqueles apresentados por Lee e colaboradores (2004), que citam rendimento de extrato de 4,5% para a variedade Campbell (*Vitis vinifera*), com o uso de metanol 80% como solvente de extração. Estes dados também estão de acordo com Pirniyazov e colaboradores (2003) que citam rendimento de 5,10% com o uso do solvente acetato de etila e de 3,80% com o uso de butanol, ambos para sementes de *Vitis vinifera*, mas, mostram-se inferiores aos dados apresentados por Baydar e colaboradores (2004), que citam um rendimento de 15,31% para a variedade Narince (*Vitis vinifera*), com o uso de acetona:água:ácido acético e de 16,21% com o uso de acetato de etila:metanol:água, para a mesma variedade. Bozan e colaboradores (2008) obtiveram, a partir de diferentes variedades de uva, rendimentos de extrato de 20,68% a 29,87%, bastante superior àqueles obtidos neste estudo. Cabe ressaltar que estes autores utilizam uma solução de acetona acidificada e água em banho-maria com agitação como forma de extração.

Tabela 15: Rendimento (% m/m) de extrato de sementes de diferentes variedades de uva das safras de 2005 e 2006, obtidos por extração em extrator Soxhlet.

Variedade	Rendimento (% m/m)	
	Safra de 2005	Safra de 2006
Bordô	3,28 Ab	3,14 Ab
Isabel	2,83 Ab	3,50 Ab
Cabernet Sauvignon	4,31 Bb	7,54 Aa
Merlot	9,04 Aa	2,90 Bb
Moscato Giallo	3,11 Ab	3,60 Ab

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste AMOVA a 5%.
Letras maiúsculas correspondem às linhas e minúsculas as colunas

Os rendimentos de extrato obtidos para Merlot e Cabernet Sauvignon foram inferiores aos obtidos por Bozan e colaboradores (2008) que citam rendimento de extrato, para as variedades Merlot e Cabernet Sauvignon, de 21,7% e 21,9% respectivamente. O estudo realizado por estes autores utilizou-se de variedades cultivadas na Turquia em ótimo estado de maturação, sendo que as sementes foram congeladas a -20°C até a utilização nas extrações que foram realizadas com uma solução de acetona:água (70:30) acidificada com ácido acético, após as sementes terem sido desengorduradas com hexano. Esta metodologia é bastante diferente da empregada em nosso estudo, provavelmente sendo responsável pela grande diferença de rendimento entre os estudos.

As diferenças no rendimento de extrato das variedades estudadas em relação à literatura podem ser devidas às particularidades de cada variedade, além das condições climáticas e culturais, como adubação, irrigação e poda. Kennedy e colaboradores (2000) já haviam indicado que práticas culturais e as condições ambientais como luminosidade, temperatura, bem como a umidade antes do início da maturação, afetam significativamente a composição fenólica das uvas.

Observa-se ainda, que o tipo de solvente utilizado na extração é muito importante, devido às diferentes propriedades físico-químicas, podendo afetar a quantidade e o tipo de composto fenólico extraído, reafirmando as diferenças observadas. O pH do meio de extração, o tamanho da partícula do material utilizado e a temperatura da extração também podem alterar a composição fenólica (Sun & Spranger, 2005).

Na safra de 2005 podemos destacar a variedade Merlot, que apresentou uma elevada porcentagem de extrato quando comparada às demais variedades. Na safra de 2006, observa-se um maior rendimento de extrato na variedade Cabernet Sauvignon que apresentou um aumento no rendimento de extrato de 2005 para 2006, já a variedade Merlot demonstrou uma redução no rendimento de extrato. As variedades Bordô, Isabel e Moscato Giallo permaneceram sem alterações significativas entre as duas safras estudadas.

4.5.2.1 Catequina, epicatequina, resveratrol, fenólicos totais e procianidinas nas variedades Bordô, Isabel, Merlot, Cabernet Sauvignon e Moscato Giallo

As curvas padrão, realizadas para a posterior análise por HPLC, resultaram em coeficientes de regressão linear (R^2) de 0,9996 para catequina, 0,9979 para epicatequina e 0,9997 para resveratrol.

Nas Figuras 18 e 19 pode-se visualizar o perfil cromatográfico das variedades estudadas, com relação a presença de catequina e epicatequina e de resveratrol respectivamente.

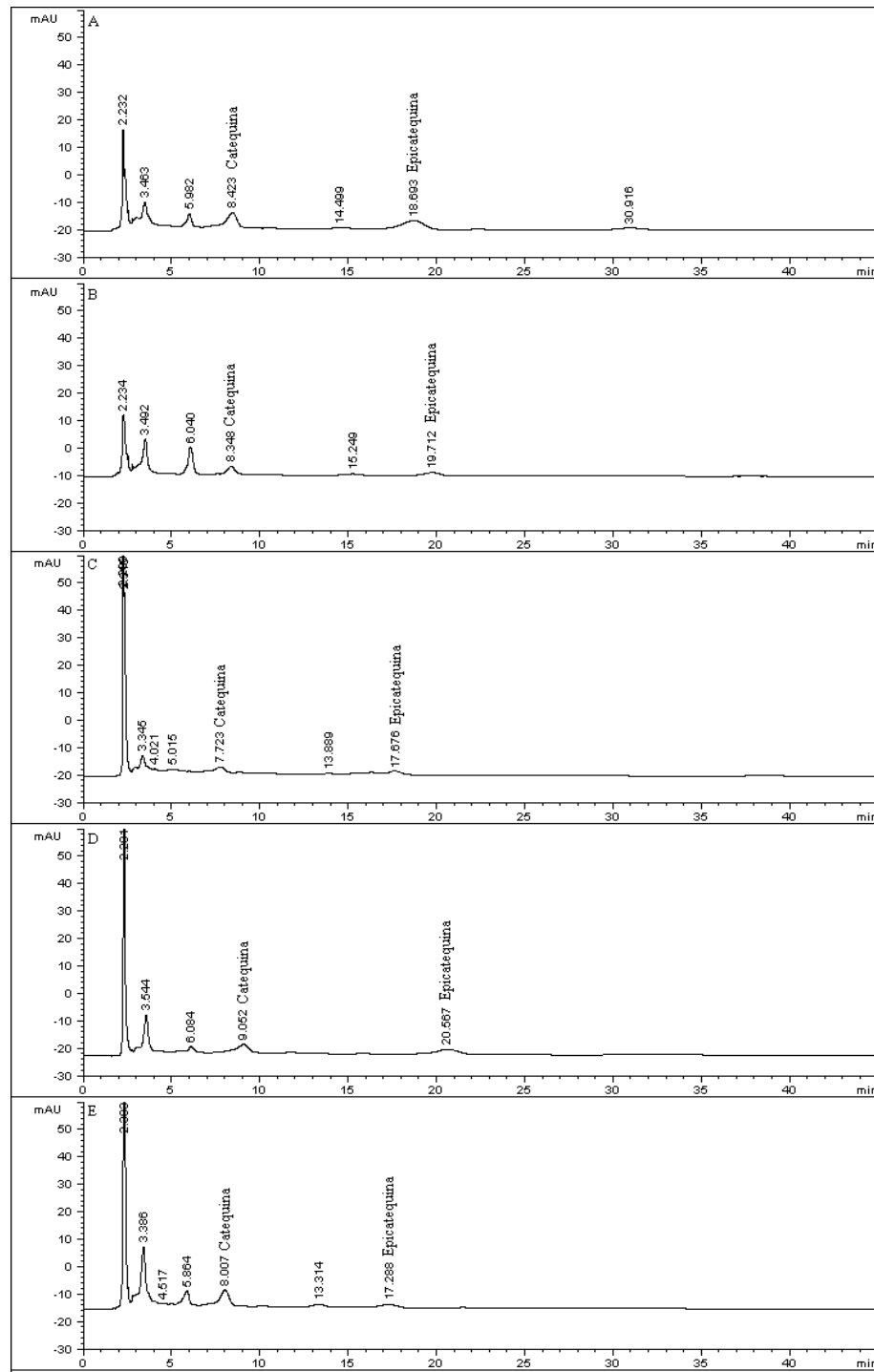


Figura 18: Análise de catequina e epicatequina nos extratos de sementes das variedades Bordô (A), Isabel (B), Merlot (C), Cabernet Sauvignon (D) e Moscato Giallo (E), safra de 2005, por HPLC.

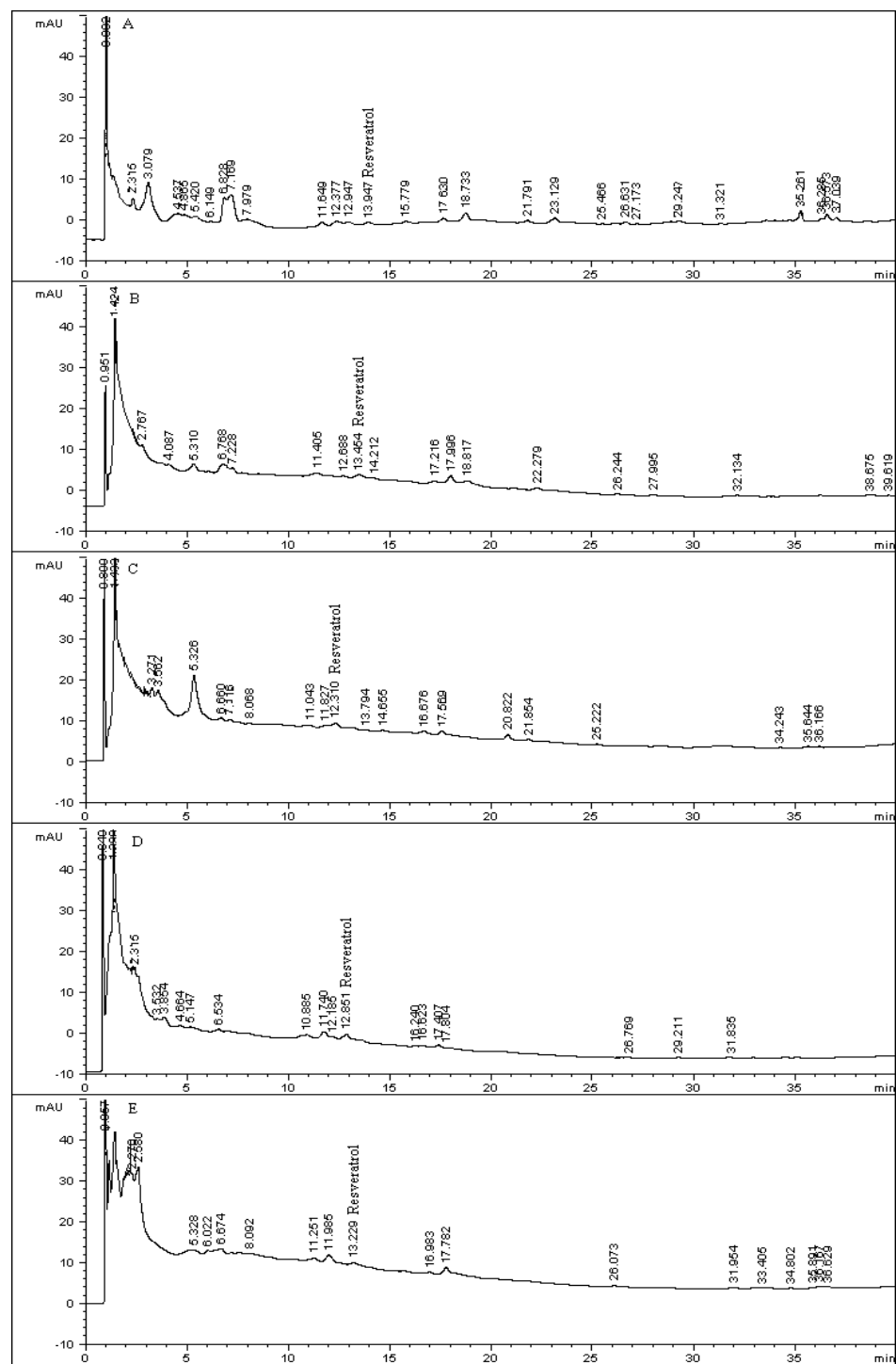


Figura 19: Análise de resveratrol nos extratos de sementes das variedades Bordô (A), Isabel (B), Merlot (C), Cabernet Sauvignon (D) e Moscato Giallo (E), safra de 2005, por HPLC.

Observando a Tabela 16 constata-se uma variação na concentração de catequina de 15,0mg/100g SU (Moscato Giallo) a 80,7mg/100g SU (Merlot) na safra de 2005 e de 16,1mg/100g SU (Merlot) a 173,1mg/100g SU (Isabel) na safra de 2006 e de epicatequina de 19,6mg/100g SU (Isabel) a 70,1mg/100g SU (Merlot) na safra de 2005 e de 21,8mg/100g SU (Moscato Giallo) a 130mg/100g SU (Isabel) na safra de 2006. Estes valores assemelham-se aos obtidos por Monagas e colaboradores (2003) e por Yilmaz e Toledo (2004b) que analisaram sementes de uva de variedades como Tempranillo, Graciano, Cabernet Sauvignon, Merlot, Muscadine e Chardonnay, obtendo valores de concentração de catequina que variaram de 12mg/100g SU a 358mg/100g SU e valores de concentração de epicatequina que variaram de 62mg/100g SU a 421mg/100g SU.

Outros autores como Iacopini e colaboradores (2008), Guendez e colaboradores (2005) e Maier e colaboradores (2009), também avaliaram a concentração de catequina e epicatequina em sementes de diferentes variedades de uva. As concentrações de catequina citadas por estes autores variaram de 36,7mg a 464mg/100g e as concentrações de epicatequina variaram de 17,5mg a 612mg/100g.

Concentrações de catequina e epicatequina superiores as obtidas neste estudo foram relatadas por Bozan e colaboradores (2008) que, a partir de diferentes variedades de uva, citam concentrações de catequina que variam de 471mg a 2580mg/100g SU, e de epicatequina que variam de 249mg a 1688mg/100g SU. Ainda segundo Bozan e colaboradores (2008), essas diferenças podem ser devidas aos diferentes solventes e processos empregados para a extração das sementes.

Na safra de 2005, a variedade Merlot apresentou a maior concentração de catequina e de epicatequina e na safra de 2006, a variedade que apresentou a maior concentração destes

compostos foi a Isabel. A variedade Merlot apresentou uma redução na concentração de catequina e de epicatequina de uma safra para a outra. As variedades Bordô e Isabel apresentaram um aumento na concentração de catequina e de epicatequina de uma safra para a outra. A variedade Cabernet Sauvignon apresentou aumento de concentração de catequina de uma safra para outra e permaneceu com concentração estável de epicatequina entre as safras. A variedade Moscato Giallo apresentou aumento de concentração de catequina de uma safra para outra e não apresentou epicatequina na safra de 2005.

Tabela 16: Concentração de catequina, epicatequina, resveratrol, fenólicos totais e proantocianidinas, nos extratos de sementes de diferentes variedades de uva das safras 2005 e 2006 pelo método extrativo Soxhlet.

Compostos químicos	Bordô		Isabel		Cabernet Sauvignon		Merlot		Moscato Giallo	
	2005	2006	2005	2006	2005	2006	2005	2006	2005	2006
Catequina ¹	23,7Bb	62,5Ab	25,1Bb	173Aa	15,8Bb	53,9Ab	80,7Aa	16,1Bc	15,0Bb	47,9Ab
Epicatequina ¹	29,3Bc	59,1Ab	19,6Bd	130Aa	44,0Ab	40,8Ac	70,1Aa	17,9Bd	ND	21,8Ad
Resveratrol ¹	0,06Bb	0,20Aa	0,05Bb	0,17Aab	0,08Bb	0,24Aa	0,40Aa	0,11Bb	0,08Ab	0,07Ab
Fenólicos ²	825Bd	1498Ac	521Be	2133Ab	1502Bc	4560Aa	8957Aa	1178Bd	1826Ab	1760Ac
Procianidinas ³	22,1Abc	122Abc	34,3Bbc	254Ab	218Bb	2328Aa	3744Aa	95,7Bbc	317Ab	405Ab

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste AMOVA a 0,05%.

Letras maiúsculas correspondem às linhas nas colunas (entre safras diferentes) e minúsculas às linhas nas colunas de mesmo ano (referem-se aos compostos).

Legenda: ¹mg/100g de sementes de uva; ²mg de equivalentes de ácido gálico/100g de sementes de uva; ³mg de equivalentes de procianidina B2/100g de sementes de uva. ND = não detectado.

Na Figura 20 pode-se observar que a safra de 2005 se caracterizou pela forte estiagem que ocorreu principalmente no subperíodo da maturação, mas que também foi marcante no subperíodo que antecede a maturação em Bento Gonçalves (Mandelli, 2005), podendo ter influenciado na concentração de catequina e epicatequina, quando comparada a safra de 2006,

que teve maior precipitação pluviométrica no subperíodo que antecede a maturação (Mandelli, 2006).

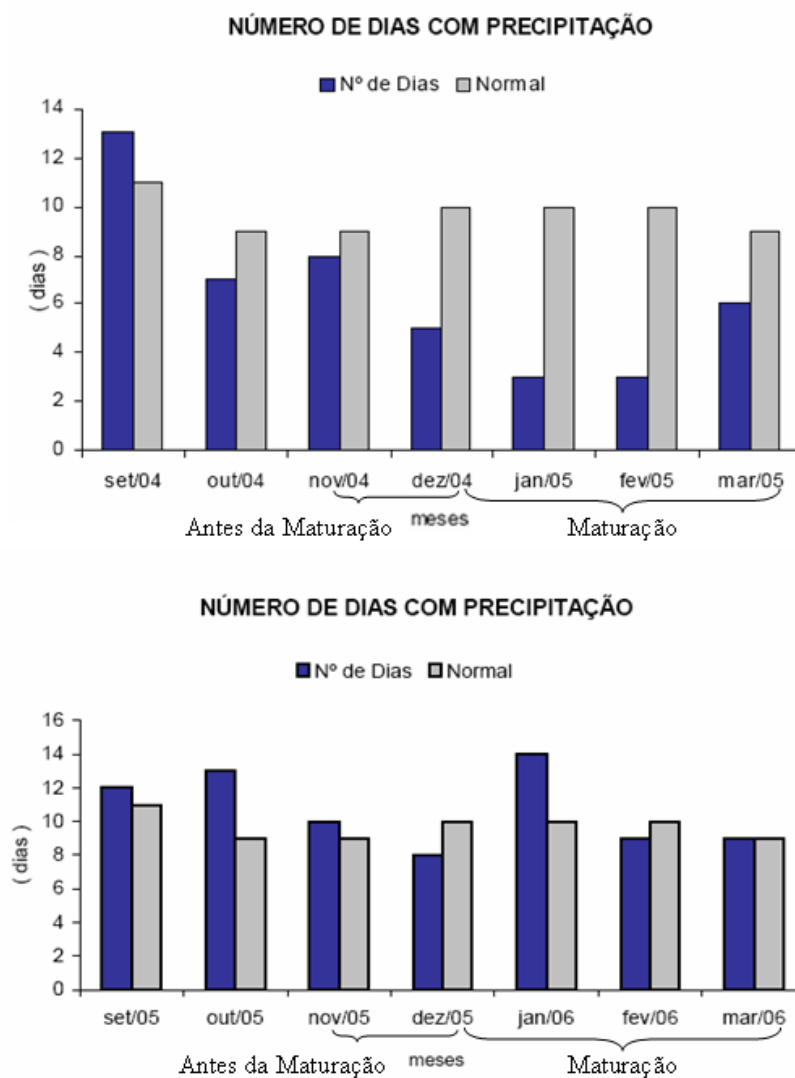


Figura 20: Número de dias de chuva nas safras de 2005 e 2006 em relação a normal climatológica (1961-1990) em Bento Gonçalves (Mandelli, 2005; Mandelli 2006).

Próximo do início da maturação, muitas das sementes estão com seu desenvolvimento completo. O desenvolvimento das sementes e a concentração de compostos fenólicos totais são menos sensíveis ao déficit de água que o desenvolvimento da baga e a concentração de açúcar. Não existem efeitos significantes do déficit de água sob as procianidinas ou sua polimerização, por outro lado, déficit de água diminui a quantidade de monômeros de flavan-3-ol (Kennedy *et al.*, 2000), o que foi observado na safra de 2005 quando comparada à safra de 2006.

Adams (2006) cita mudanças nas concentrações de catequina e epicatequina em sementes de uva, durante o amadurecimento dos frutos. Essas concentrações foram máximas logo após o início da maturação, seguidas por um declínio acentuado com a maturidade do fruto. Esta constatação também pode explicar, em parte, as diferenças observadas nas concentrações de catequina e epicatequina observadas neste estudo, visto que as variedades avaliadas atingem a maturidade em diferentes épocas.

A Tabela 16 também apresenta os resultados obtidos para o resveratrol nos extratos de sementes de uva das variedades avaliadas, onde se observa uma variação de 0,05mg/100g SU (Isabel) a 0,40mg/100g SU (Merlot) na safra de 2005 e de 0,07mg/100g SU (Moscato Giallo) a 0,24mg/100g SU (Cabernet Sauvignon) na safra de 2006. A concentração de resveratrol aumentou de uma safra para a outra nas variedades Bordô, Isabel e Cabernet Sauvignon e diminuiu na variedade Merlot. A maior concentração deste composto foi obtida com as variedades Merlot, safra 2005, além de Bordô e Cabernet Sauvignon, safra 2006.

Sun e colaboradores (2006) obtiveram concentração de resveratrol superior às obtidas neste estudo (0,58mg de resveratrol/100g de sementes secas), com sementes da variedade Castelão (*Vitis vinifera*), mas como a maioria dos estudos com resveratrol se refere a vinhos e sucos de uva, além de estudos que salientam a presença de resveratrol na casca, local onde é

sintetizado e onde se encontra a maior quantidade desta substância (Abe *et al.*, 2007), a baixa concentração de resveratrol observada neste estudo parece, ainda assim, ser interessante, visto a escassez de trabalhos que citam a presença de resveratrol em sementes de uva. Outro fator que se deve levar em conta é que segundo Iacopini e colaboradores (2008), está confirmado que o conteúdo de resveratrol é altamente dependente da variedade de uva avaliada.

Uma combinação de origem geográfica, variedade, métodos de cultivo e processos de vinificação parecem afetar a concentração de resveratrol em vinhos, consequentemente em bagas também. A concentração de resveratrol em bagas diminui durante o amadurecimento do fruto, sendo praticamente indetectável em bagas maduras (Tena *et al.*, 1998), por tanto o grau de maturação das diferentes variedades avaliadas neste estudo também pode estar associado às diferenças observadas nas concentrações de resveratrol.

Em resumo, muitas das diferenças observadas nas variedades estudadas podem ser devidas a diversos fatores como clima, déficit hídrico da planta, grau de maturação da uva ou vigor vegetativo da planta, entre outros (Montealegre *et al.*, 2006; Gómez-Alonso *et al.*; 2007).

Para a determinação de fenólicos totais (metodologia de Folin-Ciocalteu) foi primeiramente realizada uma curva padrão de ácido gálico, que resultou em um coeficiente de regressão linear (R^2) de 0,9987.

Os resultados das concentrações de fenólicos totais também estão dispostos na Tabela 16, onde se observa que a variação de concentração foi de 521mg EAG/100g SU (Isabel) a 8957mg EAG/100g SU (Merlot), na safra de 2005 e de 1178mg EAG/100g SU (Merlot) a 4560mg EAG/100g SU (Cabernet Sauvignon), na safra de 2006. Estes dados assemelham-se aos citados por Bucić-Kojić e colaboradores (2007) que obtiveram de 1472mg EAG/100g SU a 6681mg EAG/100g SU e por Guendez e colaboradores (2005), que obtiveram, a partir de

diferentes variedades de uva, concentrações de fenólicos totais que variaram de 143mg a 2228mg EAG/100g SU. Segundo Iacopini e colaboradores (2008), o conteúdo de compostos fenólicos de sementes de diferentes variedades variou de 5033mg a 8708mg EAG/100g SU.

Maier e colaboradores (2009) analisaram sete variedades de *Vitis vinifera* e obtiveram concentração de fenólicos totais de 10740mg a 22600mg EAG/100g de sementes e Bozan e colaboradores (2008) obtiveram, a partir de diferentes variedades de uva, concentrações de fenólicos totais de 7920mg a 15460mg EAG/100g SU, mostrando-se superiores as obtidas neste estudo. Já Cataneo e colaboradores (2008) obtiveram, a partir de extratos de resíduos de uvas Courdec e Pinot Gris, extraídos com acetona 80%, 171mg EAG/100g SU e 375mg EAG/100g SU, respectivamente, mostrando-se inferiores àqueles obtidos neste estudo.

Estas diferenças na concentração fenólica observada entre as variedades estudadas e a literatura podem estar relacionadas ao fato de que diferentes variedades apresentam diferenças na composição fenólica de suas sementes (Peng *et al.*, 2001), dependendo das condições de extração e do material utilizado, que pode ser polpa, cascas ou sementes (Palma & Taylor, 1999), como por exemplo, taninos de sementes e taninos de casca diferem com respeito ao peso molecular e a composição das subunidades (Herderich & Smith, 2005).

A escolha do solvente de extração também afeta a concentração de taninos, sendo este, um fator crítico na extração de compostos fenólicos (Yu & Dahlgren, 2000), visto que são utilizados tradicionalmente diferentes solventes orgânicos como metanol, etanol, acetato de etila e acetona, além disso, a adição de água a estes solventes pode aumentar a eficiência da extração (Ashraf-Khorassani & Taylor, 2004).

O conteúdo final de compostos fenólicos, também pode ser influenciado por fatores como a maturação, a espécie, as práticas de cultivo, a origem geográfica, o estágio de

crescimento, as condições de colheita e o processo de armazenamento (Soares *et al.*, 2008), mas segundo Xu e colaboradores (2010), o genótipo é o principal fator que determina essas variações.

É sabido também que a relação entre o desenvolvimento das sementes e a maturação dos frutos varia entre as variedades, e pode indicar diferenças (entre variedades) em polifenóis de sementes (Kennedy *et al.*, 2000). Sendo assim, diversos são os fatores que podem estar relacionados com as diferentes concentrações observadas.

A maior concentração de fenólicos totais, na safra de 2005, ocorreu na variedade Merlot, já, na safra de 2006 a maior concentração foi observada nas variedades Cabernet Sauvignon e Bordô. Segundo Montealegre e colaboradores (2006), sementes de Cabernet Sauvignon e Merlot apresentaram o maior conteúdo de fenólicos, em relação às demais variedades avaliadas em seu estudo, e Cosme e colaboradores (2009) afirmam que sementes de Cabernet Sauvignon têm maiores concentração de oligômeros e polímeros de flavan-3-ol quando comparadas às demais variedades de *V. vinifera* analisadas.

Bozan e colaboradores (2008) obtiveram para as variedades Merlot e Cabernet Sauvignon, 10570mg EAG/100g SU e 10370mg EAG/100g SU respectivamente, sendo concentrações superiores às obtidas neste estudo. Já Guendez e colaboradores (2005) obtiveram, para as variedades Merlot e Cabernet Sauvignon, 1689mg EAG/100g SU e 869mg EAG/100g SU respectivamente, sendo concentrações semelhantes às obtidas neste estudo.

Observa-se também na Tabela 16 que as variedades Bordô, Isabel e Cabernet Sauvignon tiveram sua concentração de fenólicos totais aumentada de 2005 para 2006, e que a variedade Merlot teve uma redução na concentração de fenólicos totais de uma safra para a outra.

A quantificação de procianidinas (Tabela 16) foi baseada na curva padrão feita com o composto procianidina B2, a qual resultou em um coeficiente de regressão linear (R^2) de 0,9963.

A partir dos resultados obtidos, se observa que a variação na concentração foi de 22,1mg EPB2/100g SU (Bordô) a 3744mg EPB2/100g SU (Merlot), na safra de 2005 e de 122mg EPB2/100g SU (Bordô) a 2328mg EPB2/100g SU (Cabernet Sauvignon), na safra de 2006. A maior concentração de procianidinas, na safra de 2005, foi observada na variedade Merlot, já, na safra de 2006 a variedade Cabernet Sauvignon se destacou em relação às demais variedades estudadas. Esta variedade, juntamente com a variedade Isabel, teve sua concentração de procianidinas aumentada de 2005 para 2006, ao contrário da variedade Merlot. As demais variedades não apresentaram diferenças significativas entre as safras avaliadas.

Existem evidências de que monômeros de flavan-3-ol e taninos de baixo peso molecular, de sementes de uva, sofrem decréscimo de concentração durante o amadurecimento do fruto (Kennedy *et al.*, 2000). Sendo assim, as mudanças na composição de procianidinas ocorrem com respeito à maturidade, além das práticas culturais, e das condições ambientais, que também podem estar associadas a estas mudanças (Kennedy *et al.*, 2000), podendo explicar as variações observadas nas duas safras avaliadas.

Em relação a concentração de equivalentes de ácido gálico, equivalentes de procianidinas, catequina, epicatequina e resveratrol, no geral, as variedades que apresentaram as maiores concentrações foram Merlot e Cabernet Sauvignon, seguidas da Isabel.

Muitas variáveis influenciam a composição fenólica das videiras e muitos destes fatores estão interrelacionados, sendo difícil de isolar experimentalmente, e em adição a isso, existe a variabilidade genética entre espécies e variedades. Apesar da variabilidade conferida por esses parâmetros, a maior influência no conteúdo de fenólicos de qualquer variedade é a localização da videira e a safra, sendo que a principal diferença sazonal é a climática, predominantemente a luz solar e a temperatura (Downey *et al.*, 2006).

4.6 Extração de compostos fenólicos de sementes das variedades Bordô, Isabel, Merlot, Cabernet Sauvignon e Moscato Giallo, com CO₂ supercrítico e análise por cromatografia e espectrofotometria

Este item trata dos resultados relacionados aos testes realizados para adaptação da metodologia extrativa em extrator supercrítico, para extrato de sementes de uva, bem como, dos resultados referentes à caracterização das variedades avaliadas neste estudo além da comparação entre elas.

4.6.1 Compostos fenólicos extraído por SFE: testes com a variedade Merlot, safra de 2006

Para extração de compostos fenólicos por SFE, foram realizados alguns testes prévios que indicaram o tipo e a porcentagem de cossolvente apropriados para as extrações, visto que o CO₂, por ser um solvente apolar, não extrai com eficácia os compostos fenólicos, sendo que, para isso, é necessária a adição de um cossolvente polar capaz de aumentar o poder de extração do CO₂ em relação a tais compostos. Os tipos de cossolventes testados foram água e etanol. Alguns autores citam o uso de metanol, mas devido a restrições do equipamento e por ser um solvente tóxico, não foi testado como cossolvente.

Na Figura 21 observa-se a comparação dos cossolventes água a 3% e etanol a 3%, com o uso do método de quantificação por Folin-Ciocalteu, onde se constata que o solvente etanol a 3% parece ser mais eficiente na remoção de compostos fenólicos em relação à água a 3%.

Segundo Murga e colaboradores (2000), o uso de etanol como cossolvente aumenta a solubilidade de ácido gálico, catequina e epicatequina.

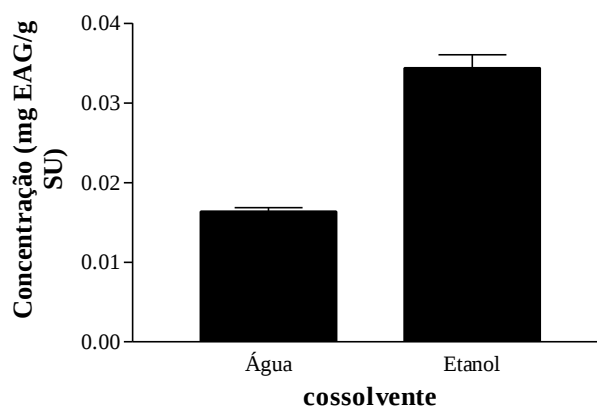


Figura 21: Teste de cossolvente para extrações de compostos fenólicos de sementes de uva Merlot, safra de 2006, com 30min de extração, 40°C de temperatura, vazão de CO₂ de 0,5mL/min, 200bar de pressão e análise espectrofotométrica por Folin-Ciocalteau.

Na Figura 22 observa-se o teste realizado com 3, 5, 10 e 15% de cossolvente etanol onde se observa que 3% parece extrair uma quantidade maior de compostos fenólicos, em relação às demais concentrações de etanol.

O composto utilizado como referência para a quantificação dos extratos por Folin-Ciocalteau foi o ácido gálico, um composto fenólico simples, com massa molecular menor que outros compostos fenólicos presentes nos extratos de sementes de uva, como catequinas ou proantocianidinas. Este fato pode ter sido responsável por uma maior concentração de fenólicos totais extraídos com o uso de uma menor porcentagem de etanol, já que segundo Murga e colaboradores (2000), misturas de CO₂ supercrítico e uma pequena porcentagem de cossolvente extraem alguns polifenóis de baixa massa molecular e que um progressivo aumento na pressão e na porcentagem de cossolvente aumenta a extração de fenólicos de maior massa molecular.

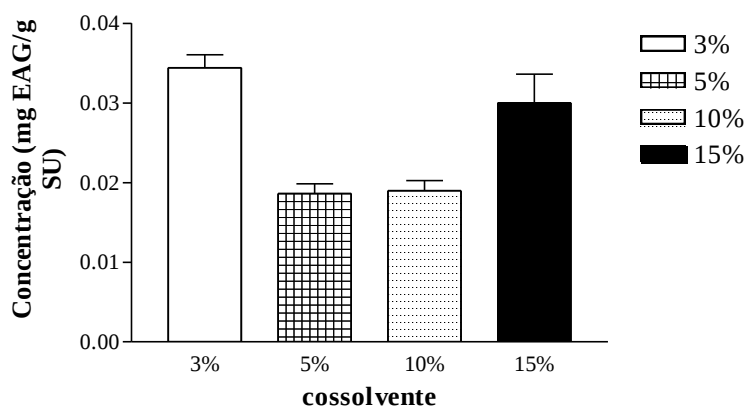


Figura 22: Teste de % de cossolvente etanol para as extrações de compostos fenólicos de sementes de uva Merlot, safra de 2006, com 30min de extração, 40°C de temperatura, vazão de CO₂ de 0,5mL/min, 200bar de pressão e análise espectrofotométrica por Folin-Ciocalteu.

Após a definição do melhor cossolvente, etanol a 3%, realizou-se uma matriz experimental (Tabela 17) para a escolha das melhores condições de extração de compostos fenólicos de sementes de uva. Todos os testes foram avaliados com o uso de espectrofotometria, através do reagente de Folin-Ciocalteu.

Nesta matriz constata-se que a variação na concentração de fenólicos totais foi de 1,25mg EAG/100g SU no teste 13 a 3,34mg EAG/100g SU no teste 9. Observa-se ainda, que da mesma forma que ocorreu com o óleo, ocorreu também neste caso, o fenômeno de difusão interna, justificando também o fato de que a maior concentração de compostos fenólicos solúveis ocorreu a 60°C, maior temperatura testada e a condição ótima de pressão foi o nível intermediário, 225 bar, com 0,5mL/min de CO₂. Analisando estes dados, optou-se por utilizar os parâmetros empregados no teste 9.

A maior temperatura testada na matriz foi 60°C porque os compostos fenólicos podem ser degradados em altas temperaturas de extração (Palma e Taylor, 1999).

Segundo Tena e colaboradores (1998), na extração de compostos fenólicos, aumentos na temperatura de extração diminuem o poder de solvatação do fluido supercrítico, mas aumentam a volatilidade do analito. Ainda segundo estes autores, a densidade do CO₂, a porcentagem do modificador e a temperatura de extração exibem pequenas influências na extração de compostos fenólicos, o que também foi observado neste estudo.

Para a determinação do melhor tempo de extração foi realizado um estudo, onde o extrato das sementes da variedade Merlot, safra de 2006, foi coletado em diferentes intervalos de tempo e avaliado em relação à concentração de fenólicos totais, por espectrofotometria. Este estudo pode ser observado na Figura 23, onde se constata que a extração de compostos fenólicos continua ocorrendo de forma constante, mesmo ao término de 4 horas de extração, o que indica que por serem compostos pouco solúveis em CO₂, os compostos fenólicos parecem ser extraídos de forma mais lenta, necessitando de tempos de extração mais longos. Porém o tempo de extração escolhido em nosso trabalho, em função da concentração de compostos fenólicos extraídos foi de 60min.

Tabela 17: Matriz experimental dos parâmetros utilizados nas extrações de compostos fenólicos de sementes de uva Merlot, safra de 2006, por SFE, com 30min de extração, com 3% de cossolvente etanol e análise espectrofotométrica por Folin-Ciocalteu.

<i>Corrida</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Vazão de CO₂ (mL/min)</i>	<i>Pressão (bar)</i>	<i>mg EAG/100g SU</i>
1	40	0,5	200	1,48
2	50	0,5	200	1,57
3	60	0,5	200	2,26
4	40	0,5	250	1,41
5	50	0,5	250	1,37
6	60	0,5	250	1,45
7	40	0,5	225	3,08
8	50	0,5	225	1,61
9	60	0,5	225	3,34
10	40	1,0	200	1,49
11	50	1,0	200	1,79
12	60	1,0	200	2,24
13	40	1,0	250	1,25
14	50	1,0	250	1,27
15	60	1,0	250	2,09
16	40	1,0	225	2,45
17	50	1,0	225	1,62
18	60	1,0	225	2,89
19	40	2,0	200	2,34
20	50	2,0	200	1,81
21	60	2,0	200	2,74
22	40	2,0	250	1,72
23	50	2,0	250	2,08
24	60	2,0	250	2,81
25	40	2,0	225	1,83
26	50	2,0	225	2,05
27	60	2,0	225	1,86

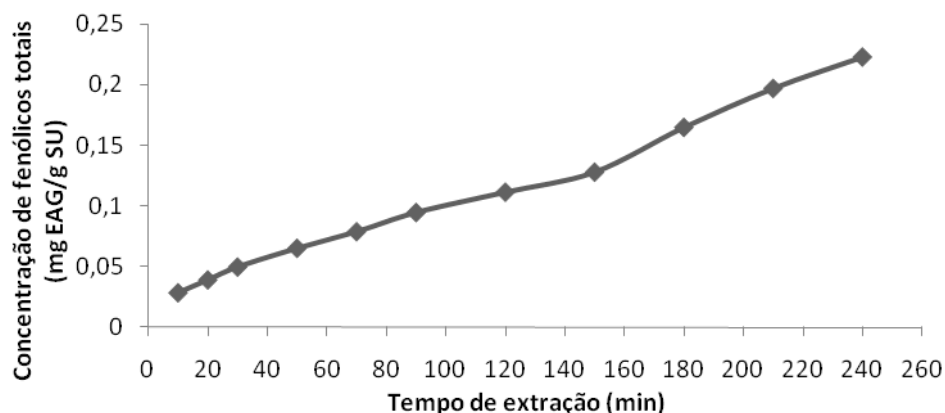


Figura 23: Perfil de tempo de extração de compostos fenólicos de sementes de uva Merlot, safra de 2006, 60°C de temperatura, vazão de CO₂ de 0,5mL/min, 225 bar de pressão, 3% de cossolvente etanol e análise espectrofotométrica por Folin-Ciocalteu.

Assim, as extrações de compostos fenólicos de sementes de uva das variedades Isabel, Bordô, Cabernet Sauvignon, Moscato Giallo e Merlot, nas safras de 2005 e 2006 foram realizadas com temperatura de 60°C, vazão de CO₂ de 0,5mL/min (76g/min), pressão de 225bar, 3% de cossolvente etanol e com 60min de extração.

4.6.2 Rendimento de extrato de sementes de uva extraído por SFE nas variedades Bordô, Isabel, Merlot, Cabernet Sauvignon e Moscato Giallo

O rendimento de extrato pode ser observado na Figura 24, onde se utilizou o Teste *t*. Segundo este teste, todos os rendimentos obtidos são diferentes entre as variedades nas duas safras analisadas. O maior rendimento de extrato foi obtido com a variedade Moscato Giallo (5,63%), na safra de 2005 e com a variedade Isabel (5,75%), na safra 2006, confirmando que os fatores ambientais interferem no rendimento de extrato nas diferentes variedades estudadas.

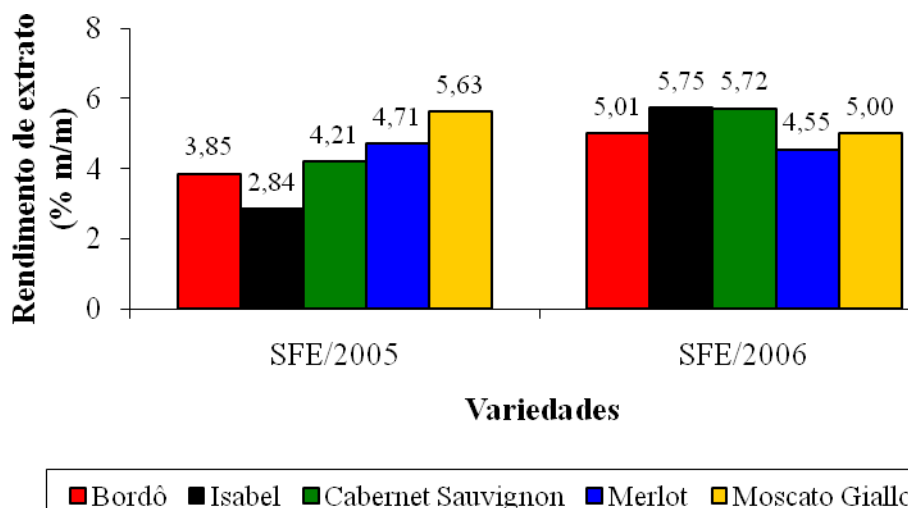


Figura 24: Rendimento (% m/m) de extrato de sementes de uva extraído por SFE.

4.6.2.1 Catequina, epicatequina, resveratrol, fenólicos totais e procianidinas nas variedades Bordô, Isabel, Merlot, Cabernet Sauvignon e Moscato Giallo

Os perfis cromatográficos de catequina e epicatequina, e de resveratrol podem ser visualizados nas Figuras 25 e 26 respectivamente.

As concentrações destes diferentes compostos (Tabela 18) não sofreram alterações significativas de uma safra para outra, e nem entre as variedades, provavelmente por ineficiência do tipo ou da quantidade de cossolvente utilizado ou ainda por processos de degradação durante o tempo de extração.

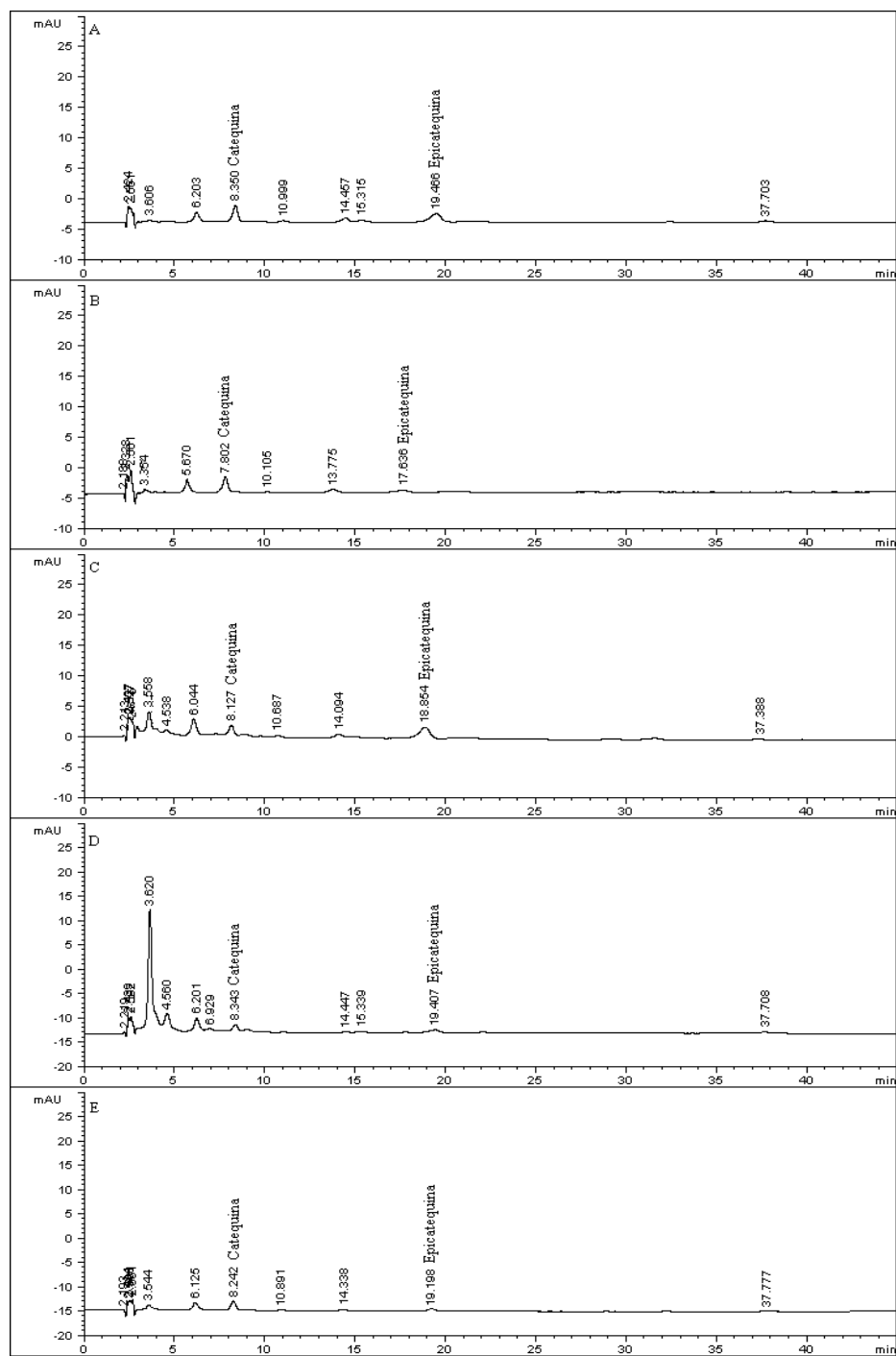


Figura 25: Cromatogramas de catequina e epicatequina nos extratos de sementes das variedades Bordô (A), Isabel (B), Cabernet Sauvignon (C), Merlot (D) e Moscato Giallo (E), safra de 2005, por HPLC.

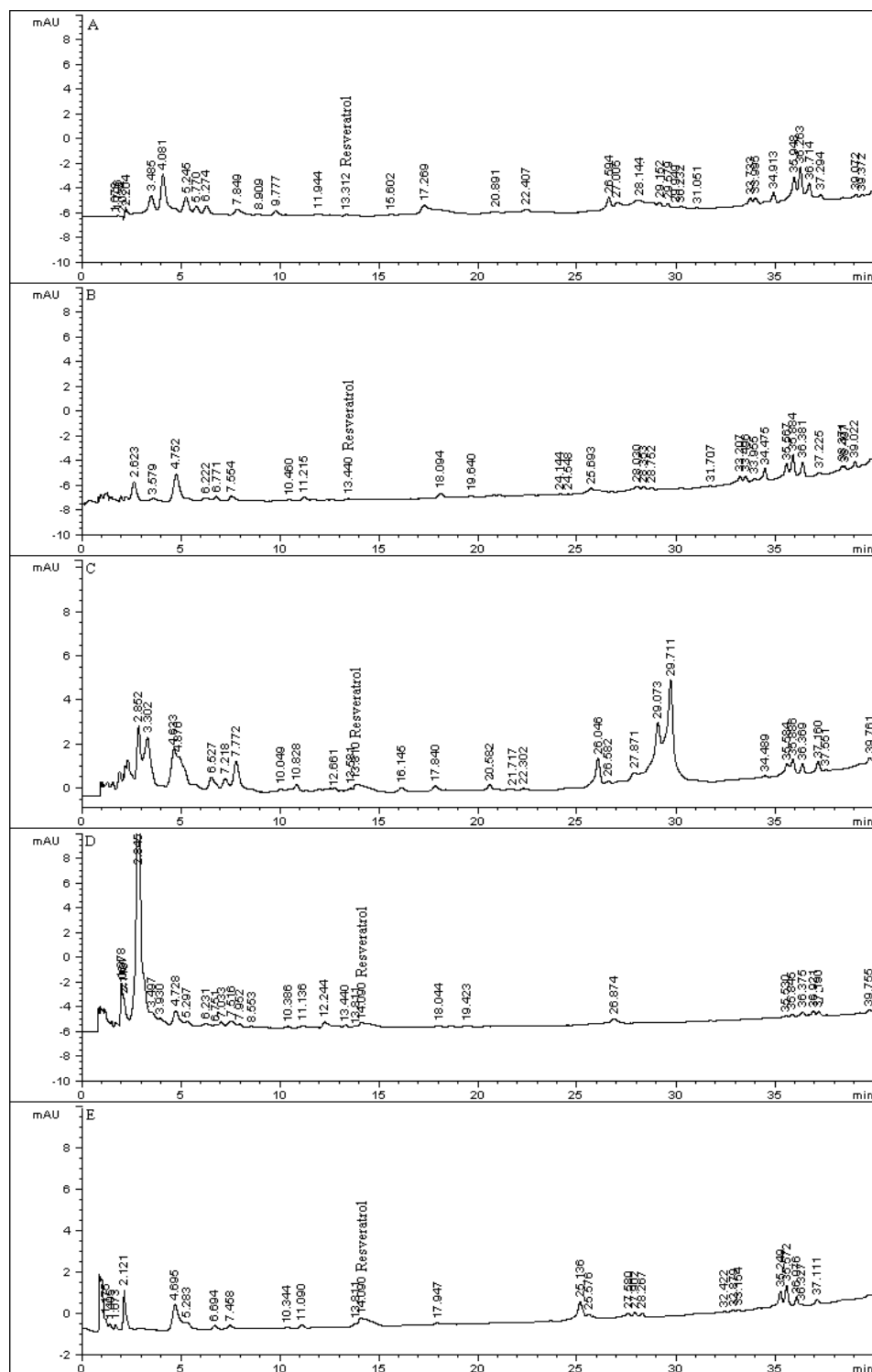


Figura 26: Cromatogramas de resveratrol nos extratos de sementes das variedades Bordô (A), Isabel (B), Cabernet Sauvignon (C), Merlot (D) e Moscato Giallo (E), safra de 2005, por HPLC.

Tabela 18: Concentração de catequina, epicatequina, resveratrol, fenólicos totais e proantocianidinas, nos extratos de sementes de diferentes variedades de uva das safras 2005 e 2006, pelo método extrativo SFE.

Compostos químicos	Bordô		Isabel		Cabernet Sauvignon		Merlot		Moscato Giallo	
	2005	2006	2005	2006	2005	2006	2005	2006	2005	2006
Catequina ¹	5,10Aa	4,57Aa	3,82Aa	5,29Aa	4,26Aa	4,10Aa	4,65Aa	9,35Aa	6,21Aa	6,87Aa
Epicatequina ¹	5,01Aa	3,63Aa	1,85Aa	3,42Aa	6,62Aa	7,01Aa	3,78Aa	4,20Aa	3,62Aa	ND
Resveratrol ¹	0,02Aa	0,03Aa	0,01Aa	0,03Aa	0,02Aa	0,05Aa	0,06Aa	0,04Aa	0,02Aa	0,03Aa
Fenólicos ²	16,0Aa	12,9Aa	14,1Aa	44,5Aa	20,6Aa	39,9Aa	34,7Aa	32,4Aa	31,1Aa	38,8Aa
Procianidinas ³	6,66Aa	6,37Aa	5,01Aa	6,19Aa	5,30Aa	8,93Aa	14,1Aa	6,48Aa	7,15Aa	8,54Aa

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste AMOVA a 0,05%.

Letras maiúsculas correspondem às linhas nas colunas (entre safras diferentes) e minúsculas às linhas nas colunas de mesmo ano (referem-se aos compostos).

Legenda: ¹mg/100g de sementes de uva; ²mg de equivalentes de ácido gálico/100g de sementes de uva; ³mg de equivalentes de procianidina B2/100g de sementes de uva. ND = não detectado.

As concentrações de catequina (Tabela 18) variaram de 3,82mg/100g SU na variedade Isabel 2005 a 9,35mg/100g SU na variedade Merlot 2006. Estas concentrações de catequina obtidas foram bastante baixas quando comparadas àquelas obtidas por Palma e Taylor (1999), que citam uma média de 77,6mg de catequina/100g de sementes de uva a partir da variedade Chardonay. As concentrações de epicatequina variaram de 1,85mg/100g SU na variedade Isabel 2005 a 7,01mg/100g SU na variedade Cabernet Sauvignon 2006.

Murga e colaboradores (2000), avaliaram a concentração de catequina e epicatequina a partir de resíduos industriais da extração de óleo, utilizando 40°C de temperatura e 200bar de pressão e obtiveram de 2 a 21mg de catequina/100g de sementes de uva com o uso de 10 e 15% de cossolvente metanol respectivamente. Epicatequina só foi obtida com o uso de 15% de metanol como cossolvente e sua concentração foi de 5mg/100g de sementes de uva.

Estes resultados, quando comparados aos obtidos neste estudo, sugerem que a concentração de cossolvente pode interferir na remoção de compostos de interesse e que a

escolha do cossolvente é de extrema importância na determinação dos compostos a serem extraídos. O que pode ser confirmado por Palma e Taylor (1999), que relatam que as diferenças nas concentrações de catequina podem ser devidas a ineficiência do cossolvente ou a processos de degradação durante o tempo de extração.

Com relação a fenólicos totais (Tabela 18), a variação na concentração foi de 12,9mg EAG/100g SU na variedade Bordô 2006 a 44,5mg EAG/100g SU na variedade Isabel 2006. Segundo Xu e colaboradores (2010), a concentração de fenólicos totais de sementes da variedade Cabernet Sauvignon foi de 9928mg de equivalentes de ácido gálico/100g se sementes secas, sendo muito maior que a concentração obtida neste estudo para esta mesma variedade, que ficou em torno de 30mg de equivalentes de ácido gálico/100g se sementes de uva.

Ainda observando a Tabela 18, percebe-se que a concentração de procianidinas totais foi de 5,01mg EPB2/100g SU na variedade Isabel 2005 a 14,1mg EPB2/100g SU na variedade Merlot 2005, e a concentração de resveratrol foi de 0,01mg/100g SU na variedade Isabel 2005 a 0,06mg/100g SU na variedade Merlot 2005. Segundo Dalmolin e colaboradores (2010), consideráveis quantidades de resveratrol permanecem nas sementes de uva após o processo de fermentação e podem ser extraídos com CO₂ supercrítico.

As baixas concentrações obtidas para todos os compostos avaliados, podem ser devidas a inúmeros fatores como a temperatura e a pressão aplicadas no processo extrativo, além do cossolvente empregado, que pode não ter sido o ideal.

Estas suposições podem ser embasadas por Saldaña e colaboradores (2007) que citam que devido a baixa pressão de vapor de muitos compostos fenólicos, altas temperaturas podem ser necessárias para que ocorra evaporação mensurável, e segundo Ghafoor e colaboradores (2010), altas pressões e temperaturas aumentam o poder de solvatação do CO₂. Embora um

aumento na temperatura favoreça a extração de compostos fenólicos por aumento de solubilidade do soluto e aumento do coeficiente de difusão, ela não pode ser aumentada indefinidamente, visto que ocorre desnaturação dos compostos fenólicos a temperaturas acima de 50°C.

Segundo Kamangerpour e colaboradores (2002), extratos de sementes de uva extraídos por CO₂ supercrítico rendem um grande número de compostos polares e apolares, mas o uso de cossolventes modificadores da polaridade do CO₂ possibilita um aumento da fração fenólica dos extratos. Porém, apesar da pressão de vapor ser um importante parâmetro físico-químico que causa impacto no comportamento da solubilidade em CO₂ supercrítico, esses dados para compostos fenólicos são escassos (Saldaña *et al.*, 2007).

4.7 Comparação entre as metodologias extrativas: Soxhlet x SFE nas variedades Bordô, Isabel, Merlot, Cabernet Sauvignon e Moscato Giallo

Este item refere-se às comparações realizadas entre as metodologias extrativas, no que diz respeito ao extrato de compostos fenólicos. As comparações foram feitas em função dos compostos químicos presentes nas sementes de uva das diferentes variedades avaliadas neste estudo.

4.7.1 Rendimento de extrato de sementes de uva: Soxhlet x SFE

A comparação entre o rendimento de extrato de sementes de uva das diferentes variedades pode ser visualizada na Figura 27, onde se utilizou o Teste *t* para análise dos, sendo que todos os rendimentos obtidos são diferentes entre si. Com o uso da metodologia de extração em extrator Soxhlet, percebe-se que os maiores rendimentos de extrato foram obtidos com as variedades Merlot e Cabernet Sauvignon, nas safras de 2005 e 2006 respectivamente. Com a metodologia de extração supercrítica, a variedade Moscato Giallo apresentou o maior rendimento de extrato na safra de 2005, porém, na safra de 2006 isso foi observado para a variedade Isabel, sendo que os rendimentos de extrato ficaram bastante semelhantes entre as variedades nesta safra. Entre as duas metodologias extrativas, o maior rendimento de extrato obtido foi com o método de extração em Soxhlet e com a variedade Merlot da safra de 2005.

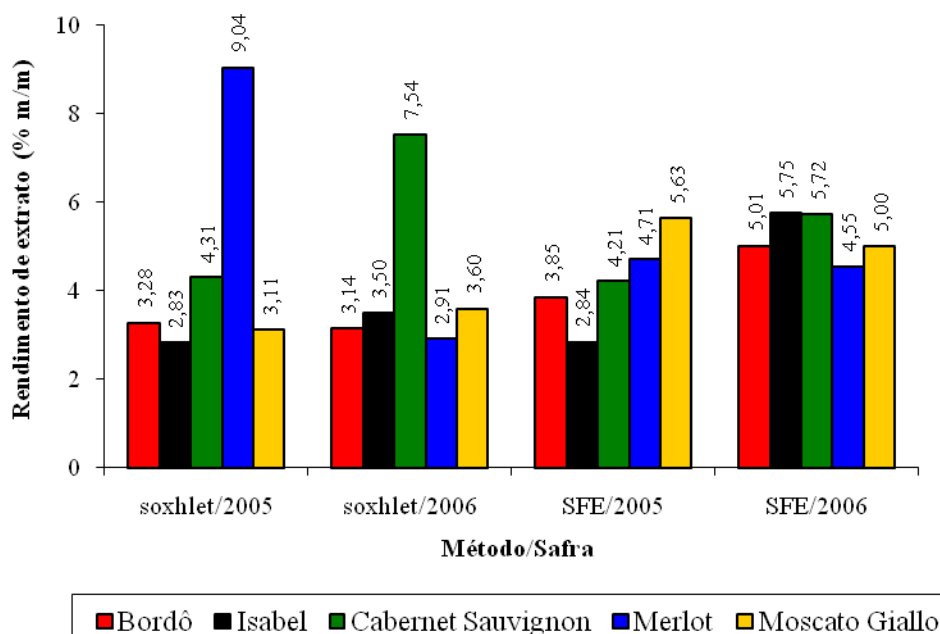


Figura 27: Comparação do rendimento (% m/m) de extrato de sementes de uva extraído por Soxhlet e por SFE.

4.7.1.1 Catequina, epicatequina, resveratrol, fenólicos totais e procianidinas: Soxhlet x SFE

A comparação da composição fenólica dos extratos de sementes de uva entre os dois métodos extrativos pode ser visualizada nas Tabelas 19 e 20. Percebe-se que o método extrativo mais eficiente na remoção de compostos fenólicos em geral, foi a extração contínua a quente em Soxhlet, pois diferiu significativamente da extração supercrítica em quase todos os compostos avaliados.

Observando separadamente cada composto, nota-se que para as variedades Cabernet Sauvignon e Moscato Giallo não houve diferença significativa na concentração de catequina entre os dois métodos extrativos, na safra de 2005, e, na safra de 2006, apenas para a variedade

Merlot não houve diferença significativa na concentração deste composto. A variedade Moscato Giallo não apresentou concentração de epicatequina, na safra de 2005, com o uso da extração em Soxhlet e, na safra de 2006, o mesmo ocorreu com a extração supercrítica. Em todas as variedades houve diferença significativa entre os métodos extrativos.

Tabela 19: Comparação da concentração de catequina, epicatequina, resveratrol, fenólicos totais e proantocianidinas, nos extratos de sementes das variedades de *V. labrusca* das safras 2005 e 2006, entre os métodos extrativos.

Compostos químicos	Bordô				Isabel			
	Safr 2005		Safr 2006		Safr 2005		Safr 2006	
	Soxhlet	SFE	Soxhlet	SFE	Soxhlet	SFE	Soxhlet	SFE
Catequina ¹	23,7A	5,10B	62,5A	4,57B	25,1A	3,82B	173A	5,29B
Epicatequina ¹	29,3A	5,01B	59,1A	3,63B	19,6A	1,85B	130A	3,42B
Resveratrol ¹	0,06A	0,02A	0,20A	0,03B	0,05A	0,01A	0,17A	0,03B
Fenólicos ²	825A	16,0B	1498A	12,9B	521A	14,1B	2133A	44,5B
Procianidinas ³	22,1A	6,66A	122A	6,37A	34,3A	5,01A	254A	6,19B

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste AMOVA a 0,05%.

Legenda: ¹mg/100g de sementes de uva; ²mg de equivalentes de ácido gálico/100g de sementes de uva; ³mg de equivalentes de procianidina B2/100g de sementes de uva.

Tabela 20: Comparação da concentração de catequina, epicatequina, resveratrol, fenólicos totais e proantocianidinas, nos extratos de sementes das variedades de *V. vinifera* das safras 2005 e 2006, entre os métodos extrativos.

Compostos químicos	Cabernet Sauvignon				Merlot				Moscato Giallo			
	Safr 2005		Safr 2006		Safr 2005		Safr 2006		Safr 2005		Safr 2006	
	Soxhlet	SFE	Soxhlet	SFE	Soxhlet	SFE	Soxhlet	SFE	Soxhlet	SFE	Soxhlet	SFE
Catequina ¹	15,8A	4,26A	53,9A	4,10B	80,7A	4,65B	16,1A	9,35A	15,0A	6,21A	47,9A	6,87B
Epicatequina ¹	44,0A	6,62B	40,8A	7,01B	70,1A	3,78B	17,9A	4,20B	ND	3,62	21,8	ND
Resveratrol ¹	0,08 ^a	0,02A	0,24A	0,05B	0,40A	0,06B	0,11A	0,04A	0,08A	0,02A	0,07A	0,03A
Fenólicos ²	1502A	20,6B	4560A	39,9B	8957A	34,7B	1178A	32,4B	1826A	31,1B	1760A	38,8B
Procianidinas ³	218A	5,30B	2328A	8,93B	3744A	14,1B	95,7A	6,48A	317A	7,15B	405A	8,54B

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste AMOVA a 0,05%.

Legenda: ¹mg/100g de sementes de uva; ²mg de equivalentes de ácido gálico/100g de sementes de uva; ³mg de equivalentes de procianidina B2/100g de sementes de uva. ND = não detectado

A concentração de fenólicos totais (Tabelas 19 e 20) foi maior em todas as variedades com o uso do método de extração em Soxhlet e a concentração de procianidinas foi maior com o uso de extração em Soxhlet nas variedades Isabel (safra de 2006), Cabernet Sauvignon (ambas as safras), Merlot (safra de 2005) e Moscato Giallo (ambas as safras).

O resveratrol foi o composto que apresentou a menor variação de concentração em relação aos métodos extrativos empregados neste estudo, quando comparado aos demais compostos avaliados, pois se observa que apenas a variedade Merlot, na safra de 2005, demonstrou diferença significativa entre os métodos e que as variedades Bordô, Isabel e Cabernet Sauvignon, apresentaram menores concentrações, na safra de 2006, para o método de extração SFE (Tabelas 19 e 20).

A principal causa da maior concentração de compostos fenólicos em geral, com o uso de extração em Soxhlet, parece ser a afinidade dos compostos pelo solvente extrativo, visto que nesta metodologia de extração utiliza-se etanol 70% para a remoção dos compostos fenólicos, sendo este, um solvente polar e assim removendo maior quantidade de compostos polares.

O tempo de extração também pode ter influenciado a quantidade de compostos fenólicos, já que na extração em Soxhlet utilizou-se 8h de extração e na extração supercrítica apenas 1h.

Segundo Murga e colaboradores (2000), CO₂ supercrítico não pode ser competitivo com extrações clássicas na remoção de compostos fenólicos, contudo, o CO₂ supercrítico tem uma vantagem quando comparado a solventes líquidos, pois o poder de solvatação pode ser ajustável pela variação da pressão e pela adição de cossolventes, entre outras variáveis, e segundo Dalmolin e colaboradores (2010), o cossolvente pode mudar as características da mistura de solventes (CO₂ e cossolvente), como a polaridade e interações específicas com o soluto,

formando ligações de hidrogênio ou interagindo com sítios ativos da matriz sólida, podendo aumentar ou não, a concentração de compostos fenólicos extraídos.

5 CONCLUSÕES

Os dados experimentais permitem concluir que:

A variedade Isabel, que representa 40% de toda a uva produzida no Rio Grande do Sul, sendo responsável por uma grande quantidade de resíduo disponível para a exploração industrial mostrou-se bastante promissora, apresentando concentração elevada de ácidos graxos insaturados em suas sementes e elevada concentração de monômeros de catequina e epicatequina, quando a extração ocorreu em Soxhlet. Na extração supercrítica também apresentou boas concentrações de ácidos graxos e de compostos fenólicos em geral, nas sementes.

A variedade Bordô apresentou elevada concentração de ácidos graxos e α -tocoferol, nas sementes, destacando-se também com relação aos compostos fenólicos e procianidinas presentes no óleo, mas a composição fenólica no extrato foi reduzida em relação às demais variedades avaliadas, pelo método de extração em Soxhlet. Esta variedade também se destaca das demais variedades por apresentar altas concentrações de ácidos graxos, de proantocianidinas, de fenólicos totais e de α -tocoferol, presentes no óleo extraído por SFE, e por apresentar boa concentração de compostos fenólicos em geral.

A variedade Moscato Giallo apresentou, em geral, valores inferiores às demais variedades, tanto para óleo obtido das sementes de uva quanto para o extrato de compostos fenólicos, extraídos em Soxhlet, já na extração supercrítica apresentou boas concentrações de ácidos graxos e de procianidinas, além de um extrato rico em compostos fenólicos.

As variedades Merlot e Cabernet Sauvignon apresentaram elevada concentração de compostos fenólicos no extrato das sementes, mas em relação a óleo, mostraram valores reduzidos quando comparadas às demais variedades avaliadas, com o uso da metodologia de

extração em Soxhlet. Na extração supercrítica, apresentaram um extrato rico em compostos fenólicos.

No geral, as variedades de *Vitis labrusca*, Bordô e Isabel apresentaram concentrações mais elevadas de ácidos graxos nas sementes, em relação às variedades Cabernet Sauvignon, Merlot e Moscato Giallo (*Vitis vinifera*), demonstrando o grande potencial destas variedades mais rústicas, que ainda é pouco explorado. Já, as variedades de *V. vinifera* apresentaram melhores concentrações de compostos fenólicos nas sementes, quando comparadas às variedades de *V. labrusca*.

Com relação aos métodos extrativos, a extração supercrítica de óleo de sementes de uva mostrou-se bastante semelhante à extração em Soxhlet, com a vantagem da ausência de solventes orgânicos no processo e menor tempo de extração, sendo um promissor método extrativo para óleo de sementes de uva das variedades testadas. Para a obtenção de um extrato rico em compostos fenólicos, o melhor método extrativo foi a extração contínua a quente em extrator Soxhlet.

Em geral, a safra de 2006 apresentou as maiores concentrações dos compostos avaliados quando comparada à safra de 2005.

Os dados experimentais sugerem como fonte alternativa de compostos fenólicos, vitamina E e ácidos graxos, a utilização da biomassa residual da indústria vitivinícola, abrindo espaço para uma série de perspectivas de sua exploração, principalmente na indústria de fitoterápicos, cosméticos e de alimentos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe, L.T.; Da Mota, R.V; Lajolo, F.M.; Genovese, M.I. (2007). Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas**. 27 (2): 394-400.

Adams, D.O. (2006). Phenolics and ripening in grape berries. **Am. J. Enol. Vitic.** 57(3): 249-256.

Adhikari, P.; Hwang, K.T.; Shin, M.K.; Lee, B.K.; Kim, S.K.; Kim, S.Y.; Lee, K.T.; Kim, S.Z. (2008). Tocols in caneberry seed oil. **Food Chemistry**. 111: 687-690.

Agostini-Costa, T.S., Lima, A., Lima, M.V. (2003). Determinação de tanino em pedúnculo de caju: Método vanilina *versus* método do butanol ácido. **Quim. Nova**. 26 (5): 763-765.

Amarante, J.O.A. (1986). **Vinhos e vinícolas do Brasil: Guia completo**. São Paulo: Summus. pp 10-11.

Appel, H.M., Govenor, H.L., Ascenzo, M.D., Siska, E., Schultz, J.C. (2001). Limitations of Folin Assay of foliar phenolics in ecological studies. **Journal of Chemical Ecology**. 27(4): 761-778.

Ashraf-Khorassani, M; Taylor, L.T. (2004). Sequential Fractionation of Grape Seeds into Oils, Polyphenols, and Procyanidins via a Single System Employing CO₂-Based Fluids. **J. Agric. Food Chem.** 52: 2440-2444.

Bail, S.; Stuebiger, G.; Krist, S.; Unterweger, H.; Buchbauer, G. (2008). Characterisation of various grape seed oils by volatile compounds, triacylglycerol composition, total phenols and antioxidant capacity. **Food Chemistry**. 108: 122-1132.

Baydar, N.G.; Akkurt, M. (2001). Oil content and oil quality properties of some grape seeds. **Turk J. Agric. For.** 25: 163-168.

Baydar, N.G.; Özkan, G.; Sagdiç, O. (2004). Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. **Food Control**. 15: 335-339.

Bertrand, A. (1981). Formation des substances volatiles au cours de la fermentation alcoolique. Incidence sur la qualité du vin. Colloque Société Française Microbiology, Reims:252-267.

Beveridge, T.H.; Girard, B.; Kopp, T.; Drover, J.C.G. (2005). Yield and composition of grape seed oils extracted by supercritical carbon dioxide and petroleum ether: varietal effects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 53: 1799-1804.

Bozan, B.; Tosun, G.; Özcan, D. (2008). Study of polyphenol content in the seeds of red grape (*Vitis vinifera* L.) varieties cultivated in Turkey and their antiradical activity. **Food Chemistry**. 109: 426-430.

Bravi, M.; Spinoglio, F.; Verdone, N.; Adami, M.; Aliboni, A.; D'Andrea, A.; De Santis, A.; Ferri, D. (2007). Improving the extraction of α -tocopherol-enriched oil from grape seeds by

supercritical CO₂. Optimization of the extraction conditions. **Journal of Food Engineering**. 78: 488-493.

Brum, A.A.S.; Arruda, L.F.; Reginato-d'Arce, M.A.B. (2009). Métodos de extração da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Quim. Nova**. 32 (4): 849-854.

Bucić-Kojić, A.; Planinic, M.; Tomas, S.; Bilic, M.; Velic, D. (2007). Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. **Journal of Food Engineering**. 81: 236-242.

Camargo, U.A. (2003). Uvas Americanas e Híbridas para Processamento em Clima Temperado. **Disponível (online)**. <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/uva/cultivar.htm>

Cao, X.; Ito, Y. (2003). Supercritical fluid extraction of grape seed oil and subsequent separation of free fatty acids by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**. 1021:117-124.

Casazza, A.A.; Aliakbarian, B.; Mantegna, S.; Cravotto, G.; Perego, P. (2010). Extraction of phenolics from *Vitis vinifera* wastes using non-conventional techniques. **Journal of Enginnering**. 100 (1): 50-55.

Carvalho, J.C.T.; Gosmann, G.; Schenkel, E.P. (2000). **Compostos fenólicos simples e heterosídicos**. In: Simões, C. M. O; Schenkel, E. P; Gosmann, G; Mello, J. C. P. De; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 2 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade/ UFRGS/ Ed. da UFSC. pp. 443-459.

Cataneo, C.B.; Caliari, V.; Gonzaga, L.V.; Kuskoski, E.M.; Fett, R. (2008). Atividade antioxidante e conteúdo fenólico do resíduo agroindustrial da produção de vinho. **Ciências Agrárias**. 29 (1): 93-102.

Charoensiri, R.; Kongkachuichai, R.; Suknicom, S.; Sungpuag, P. (2009). Beta-carotene, lycopene, and α -tocopherol contents of selected Thai fruits. **Food Chemistry**. 113: 202-207.

Cienfuegos, F.; Vaitsman, D. (2000). **Análise Instrumental**. Rio de Janeiro: Interciência. pp. 221-337.

Cosme, F.; Ricardo-da-Silva, J.M.; Laureano, O. (2009). Tannin profiles of *Vitis vinifera* L. cv. red grapes growing in Lisbon and from their monovarietal wines. **Food Chemistry**. 112: 197-204.

Dalmolin, I.; Mazutti, A.; Batista, E.A.C.; Meireles, M.A.A.; Oliveira, J.V. (2010). Chemical characterization and phase behaviour of grape seed oil in compressed carbon dioxide and ethanol as co-solvent. **J. Chem. Thermodynamics**. 42: 797-801.

Delaunay, J.C.; Castagnino, C.; Vercauteren, J. (2002). Preparative isolation of polyphenolic compound from *Vitis vinifera* by centrifugal partition chromatography. **J. Chromatogr.** 964 (1-2): 123-128.

Embrapa, (2007). Dados da viticultura. **Disponível (on line)**. <http://www.cnpuv.embrapa.br>. (07 de novembro).

Farias, M.R. (2001). **Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais**. In: Simões, C. M. O; Schenkel, E. P; Gosmann, G; Mello, J. C. P. De; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 2 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade/ UFRGS/ Ed. da UFSC. pp. 199-222.

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

Freitas, L.S.; Jacques, R.A.; Richter, M.F.; Silva, A.L.; Caramão, E.B. (2008). Pressurized liquid extraction of vitamin E from Brazilian grape seed oil. **Journal of Chromatography A**. 1200: 80-83.

Freitas, V.; Porto, P.S.; Assunção, M.; Cadete-Leite, A.; Andrade, J.P.; Paula-Barbosa, M.M. (2004). Flavonoids from grape seeds prevent increased alcohol-induced neuronal lipofuscin formation. **Alcohol & Alcoholism**. 39 (4): 303-311.

Fronza, E. (2003). Alternativas para a reutilização de resíduos de uvas (*Vitis labrusca* L.) cv. Isabel. **Monografia de conclusão de curso**. Universidade de Caxias do Sul. Bento Gonçalves, Brasil.

Gallander, J.F.; Peng, A.C. (1980). Lipid and fatty acid compositions of different grape types. **Am. J. Enol. Vitic**. 31 (1): 24-27.

García-Marino, M.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Ibáñez, E.; García-Moreno, C. (2006). Recovery of catechins and proanthocyanidins from winery by-products using subcritical water extraction. **Analytica Chimica Acta**. 563: 44-50.

Ghafoor, K.; Park, J.; Choi, Y. (2010). Optimization of supercritical fluid extraction of bioactive compounds from grape (*Vitis labrusca* B.) peel by using response surface methodology. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. 11 (3): 485-490.

Giovannini, E. (2005). **Produção de uvas para vinho, suco e mesa**. 2 ed. Porto Alegre: Renascença, 368 p.

Gómez, A.M.; López, C.P.; Martínez de la Ossa, E. (1996). Recovery of grape seed oil by liquid and supercritical carbon dioxide extraction: a comparison with conventional solvent extraction. **The Chemical Engineering Journal**. 61: 227-231.

Gómez-Alonso, S.; García-Romero, E.; Hermosín-Gutiérrez, I. (2007). HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence. **Journal of Food Composition and Analysis**. 20: 618-626.

Guendez, R.; Kallithraka, S.; Makris, D.P.; Kefalas, P. (2005). Determination of low molecular weight polyphenolic constituents in grape (*Vitis vinifera* sp.) seed extracts: Correlation with antiradical activity. **Food Chemistry**. 89: 1-9.

Guerrero, R.F.; Liazid, A.; Palma, M.; Puertas, B.; González-Barrio, R.; Gil-Izquierdo, A.; García-Barroso, C.; Cantos-Villar, E. (2009). Phenolic characterization of red grapes autochthonous to Andalusia. **Food Chemistry**. 112: 949-955.

Hagerman, A.E. (2002). Tannin Chemistry. **Disponível (online)**.
<http://www.users.muohio.edu/hagermae/tannin.pdf>

Hatzidimitriou, E.; Nenadias, N.; Tsimidou, M.Z. (2007). Changes in the catechin and epicatechin content of grape seeds on storage under different water activity (a_w) conditions. **Food Chemistry**. 105: 1504-1511.

Henry-Vitrac, C.; Desmoulière, A.; Girard, D.; Mérillon, J.M.; Krisa, S. (2006). Transport, deglycosylation, and metabolism of trans-piceid by small intestinal epithelial cells. **Eur. J. Nutr.** 45: 376-382.

Herderich, M.J.; Smith, P.A. (2005). Analysis of grape and wine tannins: methods, applications and challenges. **Australian Journal of Grape and Wine Research**. 11: 205-214.

Hong, N.; Yaylayan, V.A.; Raghavan, G.S.V.; Paré, J.R.J.; Bélanger, J.M.R. (2001). Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Grape Seed. **Natural Products Letters**. 15 (3): 197-204.

Hung, L.M.; Chen, J.K.; Huang, S.S.; Lee, R.S.; Su, M.J. (2000). Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. **Cardiovascular Research**. 47: 549-555.

Iacopini, P.; Baldi, M.; Storch, P.; Sebastiani, L. (2008). Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, *in vitro* antioxidant activity and interactions. **Journal of Food Composition and Analysis**. 21: 589-598.

IBRAVIN - Instituto Brasileiro do Vinho. (2002). Elaboração e Divulgação. **Relatório Anual**.
Fonte: Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado do Rio Grande do Sul -
Departamento de Produção Vegetal - Divisão de Enologia. 5 p.

IBRAVIN – Instituto Brasileiro do Vinho. (2004). **Disponível (on line)**.
<http://www.ibravin.org.br>. (15 de maio).

Kamangerpour, A.; Ashraf-Khorassani, M; Taylor, L.T.; McNair, H.M.; Chorida, L. (2002).
Supercritical Fluid Chromatography of polyphenolic Compounds in Grape Seed Extract.
Chromatographia. 55 (7/8): 417- 421.

Kennedy, J.A.; Matthews, M.A.; Waterhouse, A.L. (2000). Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. **Phytochemistry**. 55: 77-85.

Köhler, N.; Wray, V.; Winterhalter, P. (2008). Preparative isolation of procyanidins from grape seed extracts by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**. 1177: 114-125.

Lee, K.T.; Lee, J.Y.; Kwon, Y.J.; Yu, F.; Choi, S.W. (2004). Changes in functional constituents of grape (*Vitis vinifera*) seed by different heat pretreatments. **J. Food Science and Nutrition**. 9: 144-149.

Lee, W.Y.; Cho, Y.J.; Oh, S. L.; Park, J.H.; Cha, W.S.; Jung, J.Y.; Choi, Y.H. (2000). Extraction of grape seed oil by supercritical CO₂ and ethanol modifier. **Food Science and Biotechnology**. 9 (3): 174-178.

Li, W.; Fong, H.H.S.; Singletary, K.W.; Fitzoloff, J.F. (2002). Determination of catechins in commercial grape seed extract. **J. Liq. Chom. & Technol.** 25 (3): 397-407.

Luque-Rodríguez, J.M.; Luque de Castro, M.D.; Pérez-Juan, P. Extraction of fatty acids from grape seeds by superheated hexane. (2005). **Talanta**. 68: 126-130.

Madhavan, P.N.; Chithan, K.; Supriya, M.; Harikrishna, N.N.; Ram, C.; Thomas, S.; Stanley, A.S. (2002). Grape seed extract proanthocyanidins downregulate HIV-1 entry coreceptors, CCR2b, CCR3 and CCR5 gene expression by normal peripheral blood mononuclear cells. **Biol Res**. 35: 421-431

Maier, T.; Schieber, A.; Kammerer, D.R.; Carle, R. (2009). Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. **Food Chemistry**. 112: 551-559

Mandelli, F. (2005). Comportamento merendimentoológico e sua influência na vindima de 2005 na Serra Gaúcha. **Comunicado Técnico 58**.

Mandelli, F. (2006). Comportamento merendimentoológico e influência na vindima de 2006 na Serra Gaúcha. **Comunicado Técnico 67**.

Martinez, J.L.; Ashraf-Khorassani, M. (2004). Extraction and fractionation of active ingredients from grape seed using supercritical fluids and pressurized solvents. In: V Encontro Brasileiro de Fluidos supercriticos. **Resumo expandido**. pp. 50. Florianópolis, 2004.

Mattick, L.R.; Rice, A.C. (1976). Fatty acid composition of grape seed oil from native American and hybrid grape varieties. **Am. J. Enol. Viticult.** 27 (2): 88-90.

Medeiros, S.R. (2002). Ácido oleico conjugado: rendimentos nos alimentos e seu uso no aumento de produção de leite com maior rendimento de proteína e perfil do ácido graxo modificado. **Tese de Doutorado**. Escola Superior de Agricultura, Universidade de São Paulo: São Paulo. 114p.

Miranda, L.S. (2004). Estabilidade das vitaminas A e E em alimentos enriquecidos com diferentes fontes de ferro. **Tese Doutorado**. Departamento de Ciências de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas: Campinas. 119p.

Monagas, M.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B.; Laureano, O.; Da Silva, J.M.R. (2003). Monomeric, oligomeric and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* L. cv. Graciano, Tempranillo and Cabernet Sauvignon. **J. Agric. and Food Chem.** 51: 6475-6481.

Montealegre, R.R.; Peces, R.R.; Vozmediano, J.L.C.; Gascueña, J.M.; Romero, E.G. (2006). Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. **Journal of Food Composition and Analysis.** 19: 687-693.

Montgomery, D.C. (1997). **Three-level and mixed-level factorial and fractional factorial designs**. In: Montgomery, D.C. **Design and analysis of experiments**. 4. ed. New York: John Wiley & Sons, Tempe. pp 363-391.

Montsko, G.; Nikfardjam, M.S.P.; Szabo, Z.; Boddi, K.; Lorand, T.; Ohmacht, R.; Mark, L. (2008). Determination of products derived from trans-resveratrol UV photoisomerisation by means of HPLC-APCI-MS. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**. 196: 44-50.

Moraes, A.L. (2003). Produção da videira “Niagara Rosada” em função da desfolha após a colheita. **Dissertação Mestrado**. Escola Superior de Agricultura, Universidade de São Paulo: São Paulo. 67p.

Moyna, P; Heinzen, H. (2000). **Lipídios: química y productos naturales que los contienen**. In: Simões, C.M.O; Schenkel, E.P; Gosmann, G; Mello, J.C.P. De; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 2 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade/ UFRGS/ Ed. da UFSC. pp 365-396.

Muñoz, S.; Mestres, M.; Busto, O.; Guasch, J. (2008). Determination of some flavan-3-ols and anthocyanidins in red grape seed and skin extracts by HPLC-DAD: Validation study and response comparison of different standards. **Analytica Chimica Acta**. 628: 104-110.

Murga, R.; Ruiz, R.; Beltrán, S.; Cabezas, J.L. (2000). 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**, 48: 3408-3412.

Nakamura, Y., Tsuji, S., Tonogai, Y. (2003). Analysis of proanthocyanidins in grape seed extracts, health foods and grape seed oils. **Journal of Health Science**. 49(1): 45-54.

Nawaz, H.; Shi, J.; Mittal, G.S.; Kakuda, Y. (2006). Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration. *Separation and Purification Technology*. 48: 176-181.

Negro, C.; Tommasi, L.; Miceli, A. (2003). Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. **Bioresource Technology**. 87: 41-44.

Oh, H.I.; Hoff, J.E. (1979). Fractionation of grape tannins by affinity chromatography and partial characterization of the fractions. **Journal of Food Science**. 44 (1): 87-90.

Oliveira, B.H.; Nakashima, T.; Souza Filho, J.D.; Frehse, F.L. (2001). HPLC analysis of flavonoids in *Eupatorium littorale*. **J. Braz. Chem. Soc.** 12 (2): 243-246.

Oliveira, G.P.; Echevengua, M.M.; Messias, R.S.; Augusto-Ruiz, W. (2003). Extração do óleo de semente de uva por prensagem. **Vetor**. 13 (2): 93-105.

Oomah, B.D.; Liang, J.; Godfrey, D.; Mazza, G. (1998). Microwave Heating of Grapeseed: Effect on Oil Quality. **J. Agric. Food Chem.** 46: 4017-4021.

Palma, M.; Piñeiro, Z.; Barroso, C.G. (2002). In-line pressurized-fluid extraction-solid-phase extraction for determining phenolic compounds in grapes. **Journal of Chromatography A**. 968: 1-6.

Palma, M.; Taylor, L.T. (1999). Extraction of polyphenolic compounds from grape seeds with near critical carbon dioxide. **Journal Of Chromatography A**. 849: 117-124.

Pansera, M.R. (2002). Estudo da extração de taninos da casca de *Acacia mearnsii*. **Dissertação Mestrado**. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul: Caxias do Sul. 101p.

Passos, C.P.; Cardoso, S.M.; Domingues, M.R.M.; Domingues, P.; Silva, C.M.; Coimbra, M.A. (2007). Evidence for galloylated type-A procyanidins in grape seeds. **Food Chemistry**. 105: 1457-1467.

Passos, C.P.; Silva, R.M.; Da Silva, F.A.; Coimbra, M.A.; Silva, C.M. (2009). Enhancement of the supercritical fluids extraction of grape seed oil by using enzymatically pre-treated seed. **The Journal of Supercritical Fluids**. 48: 225-229.

Peng, Z.; Hayasaka, Y.; Iland, P.G.; Sefton, M.; Hoj, P.; Waters, E.J. (2001). Quantitative Analysis of Polymeric Procyanidins (Tannins) from Grape (*Vitis vinifera*) Seeds by Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography. **J. Agric. Food Chem.** 49: 26-31.

Pinto, A.C.; Silva, D.H.S.; Bolzani, V.S.; Lopes, N.P.; Epifanio, R.A. (2002). Produtos naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**. 25 (1): 45-61.

Pirniyazov, A.Z.; Abdulladzhanova, N.G; Mavlyanov, S.M.; Kamaev, F.G.; Dalimov, D.N. (2003). Polyphenols from *Vitis vinifera* Seeds. **Chemistry of Natural Compound**. 39 (4): 349-354.

Porter L.J.; Hrstich L.N; Chan B.G. (1986). The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. **Phytochemistry**. 25: 223–230.

Poudel, P.R.; Tamura, H.; Kataoka, I.; Mochioka, R. (2008). Phenolic compounds and antioxidant activities of skins and seeds of five wild grapes an two hybrids native to Japan. **Journal of Food Composition and Analysis**. 21: 622-625.

Prokop, J.; Abrman, P.; Seligson, A.L.; Sovak, M. (2006). Resveratrol and its glycon piceid are stable polyphenols. **Journal of Medicinal Food**. 9 (1): 11-14.

Rios, M.D.G.; Penteado, M.V.C. (2003). Determinação de α -tocoferol em alho irradiado utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). **Química Nova**. 26 (1): 10-12.

Rizzon, L.A.; Miele, A. (2002). Avaliação da cv Cabernet Sauvignon para elaboração de vinho tinto. **Ciênc. Tecnol. Aliment**. 22 (2): 192-198.

Rizzon, L.A.; Miele, A. (2003). Avaliação da cv Merlot para elaboração de vinho tinto. **Ciênc. Tecnol. Aliment**. 23: 156-161.

Roesler, R.; Malta, L.G.; Carrasco, L.C.; Holanda, R.B.; Sousa, C.A.S.; Pastore, G.M. (2007). Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciênc. Tecnol. Aliment**. 27 (1): 53-60.

Rombaldi, C.V.; Bergamasqui, M.; Lucchetta, L.; Zanuzo, M.; Silva, J.A. (2004). Produtividade e qualidade de uva, cv. Isabel, em dois sistemas de produção. **Rev. Bras. Frutic.** 26 (1): 89-91.

Roncero, A.V.; del Valle, C.J.; del Valle, M.L.J. (1973). Determinación de los polifenoles totales del aceite de oliva. **Grasas y Aceites.** 24 (6): 350-355.

Sahena, F; Zaidul, I.S.M.; Jinap, S.; Karim, A.A.; Abbas, K.A.; Norulaini, N.A.N.; Omar, A.K.M. (2009). Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – A review. **Journal of Food Enginnering.** 95: 240-253.

Saldaña, M.D.A.; Tomberli, B.; Guigard, S.E.; Goldman, S.; Gray, C.G.; Temelli, F. (2007). Determination of vapor pressure and solubility correlation of phenolic compounds in supercritical CO₂. **J. of Supercritical Fluids.** 40: 7-19.

Santos, A.C.A.; Fronza, E.; Paese, K.; Serafini, L.A. (2004). Extração de fenólicos em sementes de *Vitis labrusca* cultivar Isabel. In: V Encontro Brasileiro de Fluidos supercriticos. **Resumo expandido.** Florianópolis, 2004.

Santos, C.S.; Mello, J.C.P. (2000). **Taninos.** In: Simões, C.M.O; Schenkel, E.P; Gosmann, G; Mello, J.C.P. De; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento.** 2 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade/ UFRGS/ Ed. da UFSC. pp. 555-580.

Santos-Buelga, C.; Francia-Aricha, E.M.; Escribano-Bailón, M.T. (1995). Comparative flavan-3-ol composition of seeds from different grape varieties. **Food Chemistry.** 53: 197-201.

Saucier, C.; Mirabel, M.; Daviaud, F.; Longieras, A.; Glories, Y. (2001). Rapid fractionation of grape seed proanthocyanidins. **J. Agric. and Food Chem.** 49: 5732-5735.

Schwartz, H.; Ollilainen, V.; Piironen, V.; Lampi, A.M. (2008). Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats. **Journal of Food Composition and Analysis.** 21: 152-161.

Segura, M.A.M.; Marín, H.F.; Delgado, S.E.B. (2003). Bases farmacológicas y clínicas del extracto de *Vitis vinifera* en patologías asociadas al estrés oxidativo. **Revista de Fitoterapia.** 3(2): 135-144.

Serafini, L.A.; Cassel, E. (2001). **Produção de óleos essenciais: uma alternativa para a agroindústria nacional.** In: Serafini, L.A.; Barros, N.M.; Azevedo, J.L. **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria.** Guaíba: Agropecuária. pp. 333-377.

Silva, B.D. (2007). Vitamina E: Caracterização da atividade na resposta inflamatória induzida pelo LPS e relação com o receptor nuclear PPAR γ . **Dissertação Mestrado.** Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz: Rio de Janeiro. 62p.

Simões, C.M.O.; Spitzer, V. (2000). **Óleos voláteis.** In: Simões, C.M.O; Schenkel, E.P; Gosmann, G; Mello, J.C.P. De; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento.** 2 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade/ UFRGS/ Ed. da UFSC. pp. 397-425

Soares, M.; Welter, L.; Kuskoski, E.M.; Gonzaga, L.; Fett, R. (2008). Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas Niágara e Isabel. **Rev. Bras. Frutic.** 30 (1): 059-064.

Spranger, I.; Sun, B.; Mateus, A.M. (2008). Chemical characterization and antioxidant activities of oligomeric and polymeric procyanidin fractions from grape seeds. **Food Chemistry**. 108: 509-532.

Sun, B.; Belchior, G.P.; Ricardo-da-Silva, J.M.; Spranger, M.I. (1999). Isolation and purification of dimeric and trimeric procyanidins from grape seeds. **Journal of Chromatography A**. 841: 115-121.

Sun, B.; Ribes, A.M.; Leandro, M.C.; Belchior, A.P.; Spranger, M.I. (2006). Stilbenes: Quantitative extraction from grape skins, contribution of grape solids to wine and variation during wine maturation. **Analytica Chimica Acta**. 563: 382-390.

Sun, B.; Spranger, M.I. (2005). Review: Quantitative extraction and analysis of grape and wine proanthocyanidins and stilbenes. **Ciência Téc. Vitiv.** 20(2): 59-89.

Temelli, F. (2009). Perspectives on supercritical fluid processing of fats and oils. **The Journal of Supercritical Fluids**. 47: 583-590.

Tena, M.T.; Rios, A.; Valcárcel, M. (1998). Supercritical fluid extraction of t-resveratrol and other phenolics from a spiked solid. **Fresenius J. Anal. Chem.** 361: 143-148.

Tobar, P.; Moure, A.; Soto, C.; Chamy, R.; Zúñiga, M.E. (2005). Winery solid residue revalorization into oil and antioxidant with nutraceutical properties by an enzyme assisted process. **Water Science and Technology**. 51 (1): 47-52.

Ueda, T.; Igarashi, O. (1990). Determination of vitamin E in biological specimens and foods by HPLC – Pretreatment of samples and extraction of tocopherols. **Journal of Micronutrient Analysis**. 7: 79-96.

Vieira, F.C.V.; Pierre, C.T.; Catro, H.F. (2005). Influência da composição de ácidos graxos de diferentes óleos vegetais nas propriedades catalíticas de uma preparação comercial de lipase. In: VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. **Trabalho Completo**. 1-6p. São Paulo, 2005.

Waterhouse, A.L, Ignelzi, S., Shirley, J.R. (2000). A comparison of methods for quantifying oligomeric proanthocyanidins from grape seed extracts. **Am. J. Enol. Vitic.** 51(4): 383-389.

Xu, C.; Zhang, Y.; Cao, L.; Lu, J. (2010). Phenolic compounds an antioxidant properties of different grape cultivars grow in China. **Food Chemistry**. 119: 1557-1565.

Yamakoshi, J.; Saito, M.; Kataoka, S.; Kikuchi, M. (2002). Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. **Food and Chemical Toxicology**. 40: 599-607.

Yang Y.; Chien, M. (2000). Characterization of Grape Procyanidins Using High-Performance Liquid Chromatography/Mass spectrometry and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. **J. Agric. Food Chem.** 48: 3990-3996.

Yilmaz, Y.; Toledo, R.T. (2004a). Health aspects of functional grape seed constituents. **Trends in Food Science & Technology**. 15: 422-433.

Yilmaz, Y.; Toledo, R.T. (2004b). Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin and gallic acid. **J. Agric. and Food Chem.** 52: 255-260.

Yrjönmäki, T. (2004). Extraction and planar chromatographic separation techniques in the analysis of natural products. **Dissertação Mestrado**. Faculdade de Farmácia, Universidade de Helsinki: Helsinki. 64p.

Yu, Z., Dahlgren, A., (2000). Evaluation of methods for measuring polyphenols in conifer foliage. **Journal of Chemical Ecology**. 26(9): 2119-2140.