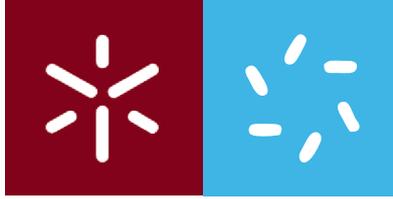


Universidade do Minho
Escola de Ciências

Tiago José Alves Domingues

Influência do electro-aquecimento na extração de compostos de valores acrescentados de resíduos de uva (*Vitis vinifera* L.)



Universidade do Minho

Escola de Ciências

Tiago José Alves Domingues

**Influência do electro-aquecimento na
extração de compostos de valores
acrescentados de resíduos de uva (*Vitis
vinifera* L.)**

Tese de Mestrado

Mestrado em Biologia Molecular, Biotecnologia e
Bioempreendedorismo em Plantas

Trabalho efetuado sob a orientação do

Professor Doutor Rui Manuel Peixoto Tavares

e do

Professor Doutor José António Teixeira

DECLARAÇÃO

Nome: Tiago José Alves Domingues

Endereço eletrónico: tiagosin@gmail.com Telefone: 910190888/253679059

Cartão do Cidadão: 14355828

Título da dissertação: Influência do electro-aquecimento na extração de compostos de valores acrescentados de resíduos de uva (*Vitis vinifera* L.)

Orientadores:

Professor Doutor Rui Manuel Peixoto Tavares

Professor Doutor José António Teixeira

Ano de conclusão: 2017

Mestrado em Biologia Molecular, Biotecnologia e Bioempendedorismo em Plantas

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Universidade do Minho, ____/____/____

Assinatura:

Agradecimentos

A elaboração de uma Tese de Mestrado faz parte de um percurso composto por inúmeros desafios, incertezas, surpresas, deceções, alegrias e vitórias. Trilhar este caminho só foi possível com a mobilização de uma grande energia, vontade e perseverança que trazem consigo força, vigor e paz, indispensáveis em cada momento deste percurso, para encontrar o melhor rumo, fazer as melhores opções e tomar as melhores decisões. Este caminho não é percorrido na solidão. É um trabalho coletivo, embora a sua redação e responsabilidade o sejam, predominantemente, um ato individual. Algumas pessoas participaram nesta trajetória, deixando impressa a sua marca. Na impossibilidade de falar de todas, às quais expresse a minha profunda gratidão, realço aquelas que merecem maior destaque:

- Ao meu coorientador, Ricardo Pereira, pela elevada competência na orientação e confiança depositada, pelo apoio e encorajamento incondicional que ajudou a tornar este trabalho uma válida e agradável experiência de aprendizagem.

- Aos meus orientadores, Professor Doutor Rui Manuel Peixoto Tavares e Professor Doutor José António Teixeira, por contribuírem para a elaboração desta tese e por toda a confiança depositada.

- Ao Professor Doutor António Vicente pelo tempo que dedicou a análise dos resultados experimentais principais e pelos valiosos comentários.

- A todas as pessoas que direta ou indiretamente participaram nesta investigação. Um especial agradecimento aos colegas do Laboratório de Indústria e Processo (LIP) que ajudaram a enriquecer todo o decurso de construção do conhecimento, contribuições críticas e pelo ambiente de confiança e convívio único. Aos órgãos de gestão do Departamento de Engenharia Biológica.

Resumo

Influência do electro-aquecimento na extração de compostos de valores acrescentados de resíduos de uva (*Vitis vinifera* L.)

A valorização de resíduos agroalimentares em subprodutos de valor acrescentado é uma necessidade premente numa sociedade que visa a sustentabilidade ambiental, social e económica. Deste modo, promove-se a redução dos lixos a tratar, obtendo-se mais-valias onde predominava despesa.

O estudo que se apresenta utilizou a semente de uva, um subproduto da indústria vinícola (com reduzido valor ou até em alguns casos sem valor acrescentado), como possível fonte de compostos bioativos com ação antioxidante.

Estudou-se o efeito das principais variáveis que afetam os rendimentos de extração e a atividade antioxidante dos extratos, nomeadamente o estado da semente, o tratamento por aquecimento óhmico, a polaridade dos solventes, a temperatura e o tempo de extração.

Quantificou-se o teor em compostos fenólicos totais, flavonoides e taninos, bem como a atividade antioxidante, por métodos espectrofotométricos. A atividade antioxidante foi determinada pelo método do poder antioxidante por ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) e pela capacidade de neutralização do radical DPPH• (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo).

Os resultados mostraram que a composição dos extratos variou significativamente com as condições utilizadas. No entanto, é possível obter uma solução de compromisso entre as diferentes abordagens de extração e os parâmetros estabelecidos: o tratamento óhmico com 95 °C e exposição de 15 min, seguido de uma extração com solução de etanol a 30%, durante 24 horas, à temperatura ambiente. É assim possível a obtenção de extratos mais ricos em compostos fenólicos e, simultaneamente, com uma elevada capacidade antioxidante. Estas condições permitem, comparativamente com outras mais eficazes para um ou outro parâmetro, uma redução de custos, por economia de tempo e de energia.

Palavras – chave: semente de uva, compostos bioativos, atividade antioxidante, sustentabilidade.

Abstract

Influence of electro-heating in the extraction of compounds of added values from grape residues (*Vitis vinifera* L.)

Recovery of waste and added value by-products in the food industry is mandatory in a society that aims environmental, social and economic sustainability. It promotes waste reduction, and gains instead of expenses.

In the present study, we used grape seeds, a by-product (with reduced/no added value) of wine industry, as a possible source of bioactive compounds with antioxidant activity.

The effect of the main variables affecting extraction yields and antioxidant activity of the extracts, health status, solvent polarity, temperature and extraction time were studied.

The content of total phenolic compounds, flavonoids and tannins, as well as antioxidant activity, were quantified by spectrophotometric methods. An antioxidant activity was determined by the method of antioxidant power by ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) and the neutralizing capacity of the radical DPPH • (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl).

The results showed the composition of the extracts varied significantly as conditions. However, it is possible to obtain a compromise between the extraction methods and the established parameters: 95 °C ohmic treatment and 15 min exposure, followed by extraction with 30% ethanol and 70% water for 24 hours, at room temperature. It is thus like obtaining extracts richer in phenolic compounds and simultaneously with a high antioxidant capacity. These conditions, compared to other "more effective" for one or the other parameter, a reduction of costs, saving time and energy.

Keywords: grape seeds, bioactive compounds, antioxidant activity, sustainability.

ÍNDICE

Agradecimentos	iii
Resumo.....	v
Abstract	vii
Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xv
Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos.....	xvii
1. Introdução.....	1
1.1. Indústria vitivinícola e a sua importância socioeconómica (Enquadramento teórico).....	1
1.2. Vinho	2
1.3. Subprodutos do vinho	3
1.3.1. Semente	5
1.4. Compostos fenólicos.....	8
1.6. Atividade antioxidante	14
1.7. Extração de compostos bioativos	16
1.7.1. Métodos convencionais.....	18
1.7.2. Métodos inovadores/ tecnológicos	18
1.8. Estratégias baseadas na tecnologia de aquecimento óhmico	27
1.9. Objetivos	29
2. Material e Métodos.....	31
2.1. Material Biológico.....	31
2.2. Reagentes.....	31
2.3. Equipamentos	31
2.4. Extração de polifenóis	32
2.4.1. Pré-tratamento por aquecimento óhmico.....	32
2.4.2. Difusão no processo de extração	33
2.5. Quantificação dos compostos fenólicos totais	34
2.6. Determinação da atividade antioxidante	34
2.6.1. ABTS / Determinação da Capacidade Antioxidante Equivalente de Trolox (TEAC) ...	34
2.6.2. DPPH - Atividade de eliminação de radicais livres	35
2.7. Determinação de compostos fenólicos por HPLC.....	35
2.8. Análise estatística	36
3. Resultados e Discussão.....	37
3.1. Otimização das condições de extração	37
3.1.1. Extração em semente moída.....	37

3.1.2. Extração em semente intacta.....	39
3.2. Tratamento térmico preliminar	41
3.3. O tempo de pré-tratamento afeta o processo de extração	43
3.4. Tratamentos térmicos padrão (binómios tempo/temperatura em semente intacta e moída) ⁴⁴	
3.5. Extração em água.....	47
3.6. As tecnologias no tratamento	49
3.6.1. Influência do campo elétrico.....	49
Extração em água.....	50
Extração em etanol.....	51
3.6.2. Influência do campo elétrico na atividade antioxidante.....	53
3.6.3. Eficiência energética	54
3.7. Extração do conteúdo proteico.....	56
4. Conclusões e perspectivas futuras.....	61
5. Bibliografia	63
6. Anexos.....	73

Lista de Figuras

Figura 1. Bagaço de uva composto por cascas, engaços e sementes (variedade de uva branca da casta Alvarinho, *Vitis vinifera* L.).

Figura 2. Corte transversal da semente na época de colheita. A seção transversal da área mediana da semente permite distinguir o integumento externo (OI), tegumento médio (MI) e albumina (AI). O rafe (R) é visível. DF = face dorsal. Barra = 2,5 mm (adaptado de Cadot et al., 2006).

Figura 3. Observação macroscópica de sementes na época de colheita. Barra = 2,5 mm (adaptado de Cadot et al., 2006).

Figura 4. Estrutura de sementes na colheita. Micrografia de luz das células de sementes de uva com coloração azul de toluidina. A seção transversal mediana da semente serviu para distinguir cinco zonas: cutícula (Cu) e epiderme (Ep), tegumento externo (OI) composto por grandes células parenquimatosas; integumento médio (MI) composto por duas camadas de células; integumento interno (II) com três camadas de células; endosperma e embrião. Como em algumas sementes, nesta seção, o endosperma foi substituído por um espaço vazio (Em). A espessura das camadas celulares do OI é maior na face ventral (VF) do que na face dorsal (DF). As células do tecido celular externo do OI tornaram-se deformadas e plasmolisadas (Pl-Pa); as células em turgescência do tecido celular interno e os vacúolos dessas células são inteiramente e intensamente coloridos (Ta-Pa). Fo = Saliência; R = Rafe. Barra = 10 μ m (adaptado de Cadot et al., 2006).

Figura 5. Representação esquemática do sistema envolvido no processo de aquecimento de uma amostra.

Figura 6. Representação esquemática de um sistema de tratamento contínuo de Campos Elétricos Pulsados (Pulsed Electric Fields - PEF) (adaptado de Barba et al., 2016).

Figura 7. a. Representação esquemática de uma célula HVED de escala laboratorial utilizada para processamento de sementes de uva. b. Representação esquemática da evolução da descarga dielétrica de alta tensão durante o tratamento com HVED e fenômenos associados.

Figura 8. Representação esquemática de um sistema de aquecimento aquecimento ôhmico pulsado (Pulsed ohmic heating - POH) em escala de laboratório.

Figura 9. Sistema ôhmico utilizado neste estudo.

Figura 10. Exemplo do aspeto apresentado após extração ocorrida em sementes intactas (os dois frascos da esquerda) e moídas respetivamente (dois frascos da direita). É visível o impacto do estado da semente na turbidez da solução.

Figura 11. Concentração de etanol na extração de polifenóis em semente moída. a-b diferentes letras são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Figura 12. Curvas para o efeito do rácio sólido/líquido na extração de polifenóis a 30% de etanol em semente moída ao longo do tempo.

Figura 13. Efeito da concentração de etanol em água na extração total de polifenóis ao longo do tempo em semente intacta.

Figura 14. Efeito do rácio sólido/líquido na extração total de polifenóis em semente moída ao longo do tempo em solução aquosa de 30 % de etanol.

Figura 15. Evolução da temperatura em ambas as tecnologias ao longo do tratamento.

Figura 16. Efeito do tratamento na extração (50 mL de água) de polifenóis, antes da moagem (intacta) e após (moída).

Figura 17. Efeito do tempo de pré-tratamento aplicado a semente intacta e posterior reflexo na extração em semente moída.

Figura 18. Diferentes condições de pré-tratamento aplicadas a semente moída (20 min e 24 h de extração).

Figura 19. Resultado das diferentes condições de pré-tratamento aplicadas a semente intacta (20 min e 24 h de extração).

Figura 20. Evolução da temperatura em esterilização (autoclave).

Figura 21. Efeito do tempo e tecnologia na extração de polifenóis em semente intacta utilizando água.

Figura 22. Efeito do tempo e tecnologia na extração de polifenóis em semente moída utilizando água.

Figura 23. Incremento da % de extração de fenólicos (em comparação com extração convencional) com utilização de campos elétricos no tratamento das sementes e posterior extração em água.

Figura 24. Compostos fenólicos presentes nas diferentes condições de tratamento e posterior extração em água.

Figura 25. Incremento da % de extração de fenólicos (em comparação com extração convencional) com utilização de campos elétricos no tratamento das sementes e posterior extração em etanol.

Figura 26. Compostos fenólicos presentes nas diferentes condições de tratamento e posterior extração em 30% etanol.

Figura 27. Incremento da % de extração de fenólicos (em comparação com extração convencional) com utilização de campos elétricos no tratamento das sementes e posterior extração em água e etanol na atividade antioxidante determinada pelo método ABTS.

Figura 28. Incremento da % de extração de fenólicos (em comparação com extração convencional) com utilização de campos elétricos no tratamento das sementes e posterior extração em água e etanol na atividade antioxidante determinada pelo método DPPH.

Figura 29. Perfil da potência utilizada pelo sistema de aquecimento convencional ao longo do tempo em três ensaios.

Figura 30. Perfil da potência utilizada pelo sistema de aquecimento óhmico ao longo do tempo em três ensaios.

Figura 31. Energia utilizada pelo sistema de aquecimento convencional e sistema óhmico no tratamento das sementes na condição definida (95 °C 30 min).

Figura 32. Intensidade de proteína extraída após os diferentes tratamentos.

Figura 33. Processo aplicado as sementes para obtenção em simultâneo de polifenóis e proteínas.

Figura 34. Exemplo de um pico de 100 °C aplicado nos tratamentos da semente intacta no equipamento óhmico.

Figura 35. Total de polifenóis extraído pelo efeito do respetivo tratamento em semente intacta (I). Re-extração em semente moída (M) através da moagem da semente intacta previamente tratada.

Figura 36. Resultados da análise HPLC dos diferentes tratamentos.

Figura 37. Quantidade de proteína extraída pelo efeito do respetivo tratamento em semente intacta (I). Re-extração em semente moída (M).

Lista de Tabelas

Tabela 1. Conteúdo em ácido fenólico (mg/kg de matéria seca) de películas e sementes do bagaço de uvas brancas (*V. vinifera* L. Cv. Merzling) (Adaptado de Kammerer et al., 2004).

Tabela 2. Conteúdo em antoxantinas e estilbenos (mg/kg de matéria seca) de películas e sementes do bagaço de uvas brancas (*V. vinifera* L. Cv. Weisser Riesling) (Adaptado de Kammerer et al., 2004).

Tabela 3. Disposição dos diferentes testes em microplaca de 96 poços.

Tabela 4. Resultados da análise HPLC dos diferentes tratamentos.

Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos

EAG – Equivalentes ácido gálico

HPLC – *High-performance liquid chromatography* ou cromatografia líquida de alta eficiência em português

OH – *Ohmic Heating* ou aquecimento óhmico em Português

DPPH• - Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo

EC – Epicatequina

RFC - Reagente Folin-Ciocalteu

1. Introdução

1.1. Indústria vitivinícola e a sua importância socioeconómica (Enquadramento teórico)

Em Portugal, o cultivo da vinha representa um dos principais sectores económicos. Em 2016, a área cultivada com vinha ascendeu a 190 467 ha, originando uma produção de 6009 toneladas de vinho (Instituto Nacional de Estatística, 2017). As vinhas (*Vitis vinifera* L.) estão entre as maiores culturas de fruto do mundo com uma produção global de cerca de 74 milhões de toneladas representando a europa 26 milhões de toneladas em 2014 (FAOSTAT, 2014). Uma vez que cerca de 80 % do montante total é utilizado na vinificação, cerca de 10 milhões de toneladas de bagaço de uva surgem todas as semanas na época de colheita. O principal subproduto da vinificação é o bagaço de uva, constituindo 13 % do peso total da uva (10 milhões de toneladas) contendo 38-52 % (em relação à matéria seca) de sementes de uva (Maier et al., 2009), que são então produzidos em várias toneladas por ano (FAOSTAT, 2011). As sementes constituem um desperdício da indústria e agricultura significativo (Freitas et al., 2008; Kim et al., 2008; Luque-Rodríguez et al., 2005; Lutterodt et al., 2011).

Geralmente, as sementes de uva são vendidas à indústria de alimentos para animais, compostagem, aditivos, produção de cor natural e extração de óleo, contudo nos últimos anos tornaram-se o centro das atenções para os setores alimentares, cosméticos e farmacêuticos essencialmente a utilização como fonte de antioxidantes naturais (Fiori et al., 2014). Da quantidade gerada apenas é utilizada uma pequena fração para a extração de óleo de sementes e muito menor até uma extração de antioxidantes (Arvanitoyannis et al., 2006).

Pesquisas realizadas nas últimas décadas mostraram que as possibilidades de valorização desses subprodutos para a recuperação de óleo, compostos fenólicos e fibras (Baile et al., 2008; Furiga et al., 2009), na Itália, Espanha e França (Crews et al., 2006), são enormes (Shrikhande, 2000).

Nos últimos anos a preocupação com a diminuição do impacto ambiental dos desperdícios/resíduos industriais tem sido objeto de preocupação crescente. O impacto negativo de muitas indústrias vinícolas deve-se essencialmente a presença de resíduos de fenóis da matéria-prima vegetal que utilizam. Em águas residuais industriais, estes

compostos aumentam consideravelmente a necessidade química de oxigénio, com efeitos prejudiciais na fauna e flora das zonas de descarga, enquanto nos resíduos sólidos utilizados como fertilizantes, podem inibir as propriedades de germinação (Spigno & De Faveri, 2007).

Além da preocupação ambiental, também está na moda a corrida por produtos saudáveis e naturais. O interesse na investigação de componentes bioativos, especialmente compostos fenólicos, de fontes naturais, como frutas e vegetais, aumentou muito nos últimos anos. A razão para este interesse crescente é o uso restrito de antioxidantes sintéticos em alimentos devido aos possíveis efeitos indesejáveis na saúde humana (Jayaprakasha et al., 2003).

Assim, a possibilidade de utilização das sementes de uva é promissora. Por outro lado, o facto de estarmos face a uma sociedade que enfrenta problemas ambientais (problemas de eliminação de resíduos) e as questões económicas (a necessidade de investir em áreas mais vulneráveis), a recuperação e reutilização de sementes de uva são de grande importância, contribuindo para diminuir os custos de produção vinícola, aumentar os lucros do produtor e criar novos produtos para consumo humano (Baydar & Ozkan, 2006).

1.2. Vinho

A produção de vinho é atualmente uma das atividades agrícolas mais importantes do mundo. Não há dúvida de que as uvas constituem uma abundante cultura em todo o mundo, sendo *Vitis vinifera* L. a espécie mais cultivada para a produção de vinho em todo o mundo (Grimplet et al., 2007).

As regiões vinícolas mais competitivas estão localizadas principalmente na Europa (Itália, Espanha, França, Alemanha e Portugal) e América (EUA, Argentina e Chile), mas também na Austrália e na África do Sul. Em 2013, a produção mundial representou 281 milhões de toneladas (Mateo & Maicas, 2015). Entre os países produtores de vinho a Itália, França e Espanha geram cerca de 46% da produção mundial (Da Ros et al., 2014).

Em Portugal há produções significativas de variedades de vinhos tintos e brancos um pouco por todo o território. Esses vinhos são produzidos a partir de uvas tintas de diferentes variedades, em alguns casos podem ocorrer combinações. Após a colheita, as uvas tintas são esmagadas e fermentadas durante um período de tempo adequado, após terminar a fermentação o vinho é separado do bagaço por processos mecânicos podendo este passar por uma prensa onde aumenta a recolha do vinho. No caso das variedades que dão origem a vinho branco o processo poderá ser diferente em que o sumo da uva é separado de todos os elementos sólidos do cacho no conjunto denominados por bagaço de uva (cangalho, película do vago e semente) passando por um processo de trituração, compressão e separação em que apenas o sumo de uva será fermentado, ao terminar a fermentação passará por diversos processos na preparação do produto final, o vinho. Neste estudo será utilizada a semente proveniente da casta Alvarinho, variedade de vinho branco da sub-região de Monção e Melgaço.

Os vinhos brancos apresentam um conteúdo fenólico inferior ao dos vinhos tintos, contendo menor atividade antioxidante, contudo, alguns compostos fenólicos presentes nesses vinhos são mais eficazes na inibição *in vitro* do processo de oxidação da lipoproteína de baixa densidade (Baderschneider et al., 2001). O tipo e concentração de compostos fenólicos nos vinhos é influenciado pela composição química da matéria-prima (uvas) que é influenciada, por sua vez, pela variedade de origem, fase de amadurecimento, condições atmosféricas durante a maturação e tipo de solo. As técnicas utilizadas durante o processo de produção do vinho e as condições de envelhecimento também são importantes (De Gaulejac et al., 2001; Viñas et al., 2000).

1.3. Subprodutos do vinho

O processo de vinificação utiliza cerca de 80 % do peso total da matéria vegetal da colheita. Durante o processamento do vinho é gerado o bagaço composto por cascas, engaços e sementes (Figura 1.), um resíduo sólido resultado da compressão para obtenção do sumo de uva, constituindo aproximadamente 13 % do peso total da uva nos quais 38-52 % são de sementes de uva (Maier et al., 2009), que são então produzidos em várias toneladas por ano (FAOSTAT, 2011).



Figura 1. Bagaço de uva composto por cascas, engaços e sementes (variedade de uva branca da casta Alvarinho, *Vitis vinifera* L.).

As uvas e os produtos obtidos a partir daí, como o vinho, o sumo de uva, e as uvas passas, constituem um fator economicamente importante, no entanto os subprodutos que são gerados podem acrescentar valor à matéria-prima. Atualmente o bagaço é um subproduto de baixo custo e de enriquecido conteúdo em fibras, proteínas e compostos bioativos. Antocianinas, catequinas, flavonóis, glicosídeos, ácidos fenólicos, alcoóis e estilbenos são os principais componentes fenólicos do bagaço de uva (Schieber et al., 2001). A sua composição depende de diversos fatores, um fator que representa alguma influência será o teor de água que pode variar consideravelmente, dependendo da variedade da uva e maioritariamente da tecnologia de vinificação (Schieber et al., 2001). Além disso, o conteúdo de fenólicos no vinho e no bagaço oscila consideravelmente quando são utilizados todos os constituintes do cacho ou parte. No caso das sementes após processamento da uva para o vinho, o conteúdo de compostos fenólicos permanece elevado sem grandes alterações devido à extração ser menos eficiente em comparação com outras partes da uva, como a pele e a polpa da uva (Anđelković et al., 2014).

1.3.1. Semente

Embora as sementes representem até 6 % do peso do bago, são uma grande fonte de compostos fenólicos (Gonzalez-Manzano et al., 2004). São compostas por lignina, lípidos, proteínas, carboidratos e polifenóis, no entanto, a sua composição oscila dependendo da variedade. As sementes de uva contêm 5-8 % de polifenóis (Shi et al., 2003). Os principais polifenóis isolados de sementes de uva são as catequinas (catequina, epicatequina e epigallocatequina) e os seus polímeros (Prieur et al., 1994).

As sementes contribuem com catequinas e procianidinas para o vinho tinto, mas o teor de flavonoides depende da maturidade da uva e das práticas de maceração. A maioria deles são mesmo flavano-3-ol monoméricos (catequinas) e procianidinas ou taninos condensados (Cheynier et al., 1997). As maiores concentrações de flavonóis estão na fase *veraison*, diminuindo lentamente até quase à maturidade, altura em que permaneceram relativamente constantes (Kennedy 2000; Downey et al., 2003; De Freitas et al., 1999).

Poucos estudos foram direcionados para determinar a localização do conteúdo de flavonoides nas sementes de uva. Thorngate et al. (1994) observou uma maior quantidade de flavano-3-ol no revestimento externo macio do que no endosperma e sugeriu que as procianidinas na camada de semente são perdidas na maturidade da semente quando esta apresenta uma cor castanha na colheita (Thorngate et al., 1994).

As sementes são constituídas por uma cutícula, uma epiderme e dois integumentos ao redor da albumina e do embrião (Figura 2.). A mudança de cor e o endurecimento das sementes são concomitantes com a oxidação de fenólicos no processo.

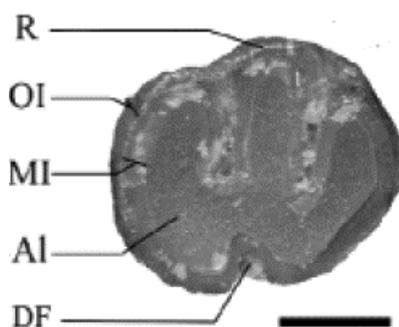


Figura 2. Corte transversal da semente na época de colheita. A seção transversal da área mediana da semente permite distinguir o integumento externo (OI), tegumento médio (MI) e albumina (AI). O rafe (R) é visível. DF = face dorsal. Barra = 2,5 mm (adaptado de Cadot et al., 2006).

Nas variedades *Vitis vinifera* L., as sementes têm uma forma específica. São em forma de pera e a seção transversal é um triângulo. Além disso, a cor não é uniforme. Visualmente as sementes poderiam ser divididas em duas partes: a ponta e a base (Figura 3.).

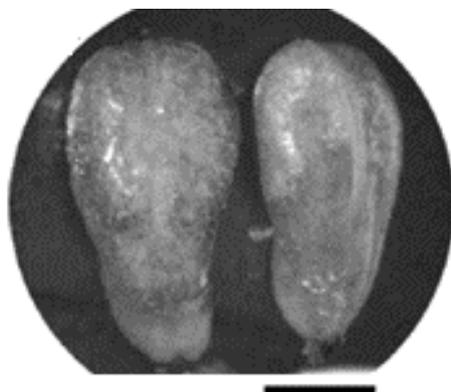


Figura 3. Observação macroscópica de sementes na época de colheita.
Barra = 2,5 mm (adaptado de Cadot et al., 2006).

A secção transversal da área central da semente revelou cinco zonas (Figura 4): (i) cutícula e epiderme; (ii) tegumento externo ou casaco de semente macio, composto por células parenquimatosas de grandes dimensões; (iii) tegumento médio ou casaco duro da semente, composto por duas camadas de células; (iv) tegumento interno com três camadas de células; (v) endosperma e embrião.

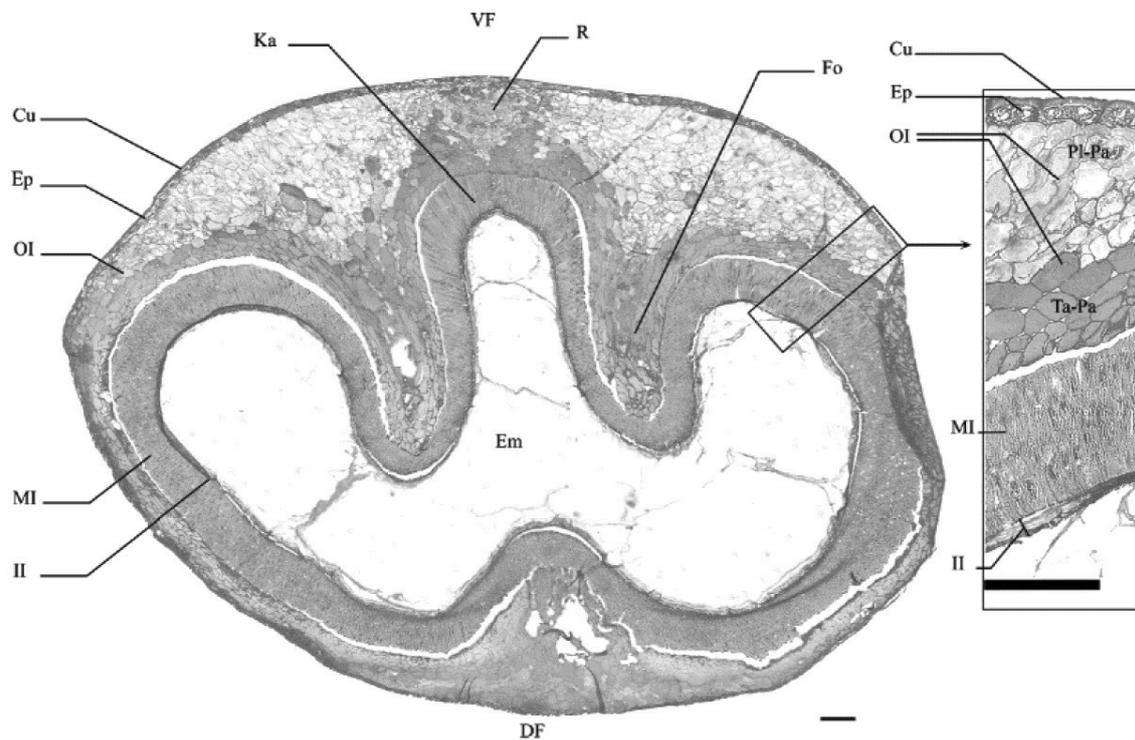


Figura 4. Estrutura de sementes na colheita. Micrografia de luz das células de sementes de uva com coloração azul de toluidina. A seção transversal mediana da semente serviu para distinguir cinco zonas: cutícula (Cu) e epiderme (Ep), tegumento externo (OI) composto por grandes células parenquimatosas; integumento médio (MI) composto por duas camadas de células; integumento interno (II) com três camadas de células; endosperma e embrião. Como em algumas sementes, nesta seção, o endosperma foi substituído por um espaço vazio (Em). A espessura das camadas celulares do OI é maior na face ventral (VF) do que na face dorsal (DF). As células do tecido celular externo do OI tornaram-se deformadas e plasmolisadas (Pl-Pa); as células em turgescência do tecido celular interno e os vacúolos dessas células são inteiramente e intensamente coloridos (Ta-Pa). Fo = Saliência; R = Rafe. Barra = 10 μ m (adaptado de Cadot et al., 2006).

Os compostos fenólicos foram observados em três tecidos: epiderme, uma grande parte do tegumento externo e a camada interna do integumento interno. É descrito que os flavano-3-ol foram concentrados no tegumento externo. Numa perspectiva de vinificação, esta observação é importante porque os compostos desta região seriam parcialmente extraídos durante o processo de fermentação da uva. Estudos histológicos não revelaram compostos de flavano-3-ol no endosperma. Esta observação não coincide com a de Thorngate et al., (1994) em que encontraram flavano-3-ol no endosperma, mas em quantidades inferiores às da estrutura externa mais macia da semente. Pode-se argumentar que os compostos fenólicos encontrados no endosperma por estudos bioquímicos podem ser atribuídos simplesmente à contaminação do endosperma com o material do revestimento da semente, especialmente os flavano-3-ol da última camada celular do integumento interno.

No processo de fermentação em que a semente se encontra intacta oferece alguma resistência a extração de taninos devido à estrutura das células que na colheita a sua maturidade pode afetar a aptidão para a extração dos compostos. Acabando por se detetar uma quantidade reduzida de taninos da semente atribuída às dificuldades na extração (Kennedy et al., 2000 b).

Outra barreira será a presença do tegumento médio, que é impermeável, e assim impede que os compostos fenólicos do tegumento interno sejam extraídos durante a vinificação. As proteínas estão em grande parte presentes no endosperma. Neste tecido, as proteínas estão contidas nos vacúolos em estruturas globulares, estando bastante condensadas. O tamanho e número variara de acordo com as células. O endosperma é um tecido macio protegido pelo tegumento interno. Em sementes maduras, o revestimento da semente oferece uma proteção mecânica reforçada para o endosperma e embrião o que contribui para a manutenção do estado de dormência da semente (Ristic et al., 2005).

1.4. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são divididos em dois grupos: flavonoides (antocianinas, flavano-3-ol, flavonóis) e compostos não flavonóides (ácido hidroxibenzoico e hidroxicinâmico, estilbenos). No entanto, os flavano-3-ol são os principais polifenóis nas sementes (Bourzeix, 1986; Cheynier and Rigaud, 1986; Makris et al., 2006).

No entanto, os dados revelam grandes diferenças em antocianinas, ácido fenólico, antoxantina e no conteúdo de estilbeno no bagaço, dependendo principalmente da variedade e da colheita (Lu et al., 1999). Além disso, o conteúdo em polifenóis na semente de uva varia com o grau de maturidade alcançado até a colheita (Kennedy et al., 2000). A sua investigação fornece informações úteis para selecionar os compostos com potencial e adequados a uma extração rentável (Kammerer et al., 2004).

As sementes de uva são uma rica fonte de catequinas e procianidinas (PC). Foram identificados nas sementes os monómeros (+)-catequina (Cat), (-)-epicatequina (Ec) e (-)-epicatequina 3-O-galato, 14 dimérico, 11 trimérico e um tetramérico PC. Nove dessas

PC são esterificadas com uma ou duas moléculas de ácido gálico ligadas a uma unidade Ec. Quantidades substanciais de PC altamente polimerizadas também estão presentes. Priehur et al. (1994) descobriram que 55 % das PC em sementes de uva constituem mais de cinco unidades de monómeros. Somente as PC do tipo de proantocianidinas foram detetadas nas sementes (Escribano-Bailón et al., 1995). Além das PC, quatro taninos hidrolisáveis não identificados foram encontrados nas sementes de uva (Santos-Buelga et al., 1995).

Em 17 variedades de castas, 10 apresentam concentrações de Cat e Ec mais elevadas do que qualquer PC individual, observações semelhantes foram relatadas na literatura (Bourzeix et al., 1986b; Kovac et al., 1990; Dumon et al., 1991; Escribano-Bailón et al., 1992a; Santos-Buelga et al., 1995). A concentração detetada de epicatequina foi maior que a de catequina em 12 variedades. Romeyer et al. (1986) descobriram que este era o caso de metade das variedades examinadas, enquanto outros relatam que a catequina estava presente em maior concentração do que a epicatequina na maioria das cultivares (Bourzeix et al., 1986b; Santos-Buelga et al., 1995).

Os estudos suspeitam que as quantidades de catequinas e procianidinas são influenciadas por fatores genéticos. Em geral, as sementes de variedades de uvas tintas contêm quantidades superiores desses compostos do que as uvas de variedades brancas. A maior capacidade das variedades tintas para sintetizar compostos fenólicos poderá explicar essa tendência. Entre as variedades tintas foi descrito que a casta Pinot Noir tinha a maior quantidade de catequina e conteúdo total analisado de flavano-3-ol.

O fracionamento dos compostos fenólicos do bagaço de uva é importante para a identificação e quantificação inequívoca destes devido ao perfil complexo de polifenóis presentes no bagaço de uva, que inclui as antocianinas, ácidos fenólicos, antoxantinas e estilbenos (Oszmianski et al., 1988).

Antocianinas

As sementes, contêm normalmente menores quantidades de antocianinas. Esta conclusão é suportada pela falta de antocianinas nas sementes de variedades de uvas brancas e algumas uvas tintas. Assim, a presença de pigmentos nas sementes deve ser atribuída à difusão das antocianinas provenientes das películas para as sementes durante os processos de vinificação.

É descrito na literatura que as sementes da casta Cabernet Mitos demonstram quantidades mais elevadas de antocianinas, isto deve-se a esta variedade apresentar antocianinas não apenas na pele, mas também na polpa, aumentando assim a difusão de pigmentos. Os fatores climáticos e microclimáticos são também responsáveis pela variabilidade das concentrações de pigmentos.

Ácidos fenólicos

O teor de ácidos fenólicos das sementes varia de 115,9 (Trollinger, 2002) para 528,6 mg / kg de matéria seca (Spatburgunder, 2001) para sementes de uvas tintas e de 167,8 (Weisser Riesling, 2001) para 326,6 mg / kg de matéria seca (Muller-Thurgau, 2002) para sementes de uva branca. Sendo os níveis geralmente maiores nas sementes em comparação com as películas em todas as variedades de uvas brancas Spatburgunder (2002). Os extratos de sementes mostraram predominância de ácido gálico e ácido protocatecuico (Tabela 1.).

Tabela 1. Conteúdo em ácidos fenólicos (mg/kg de matéria seca) de películas e sementes do bagaço de uvas brancas (*V. vinifera* L. Cv. Merzling) (Adaptado de Kammerer et al., 2004).

	Películas	Sementes
ácido gálico	15,0±0,2	106,5±8,8
ácido protocatecuico	42,8±0,5	102,8±25,5
ácido caftárico	61,0±2,8	9,3±3,4
ácido p-hidroxibenzoico	31,1±0,1	13,8±0,9
ácido coutarico	54,5±1,4	30,3±16,3
ácido cafeico	1,7±0,2	1,9±0,6
ácido tartárico	17,3±1,1	3,0±0,1
ácido siríngico	1,0±1,2	1,1±0,1
ácido p-cumárico	nd ^a	7,2±0,1
ácido ferúlico	2,6±0,0	3,9±0,1
ácido sinapínico	nd ^a	1,0±0,1

^a Não detetado

Antoxantinas e estilbenos

O conteúdo em antoxantinas e estilbenos entre películas e sementes varia consideravelmente (Tabela 2.), estes compostos são frequentes em extratos de semente com o objetivo de preparação de suplementos alimentares.

Tabela 2. Conteúdo em antoxantinas e estilbenos (mg/kg de matéria seca) de películas e sementes do bagaço de uvas brancas (*V. vinifera* L. Cv. Weisser Riesling) (Adaptado de Kammerer et al., 2004).

	Películas	Sementes
catequina	226,7±24,6	790,2±11,2
epicatequina	134,6±12,1	674,5±24,9
epicatequina galato	35,5±3,6	457,9±35,8
procionidina B1	191,5±6,6	1053,7±29,3
procionidina B2	91,0±2,5	506,2±41,1
quercetina	nd ^a	nd ^a
quercetina-3-O-glicosídeo	156,7±9,3	14,7±0,9
quercetina-3-O-glucosídeo	351,7±23,3	32,6±3,0
quercetina-3-O-glicuronídeo	509,9±30,4	38,0±0,8
quercetina-3-O-ramnosídeo	57,7±3,5	14,4±1,0
kaempferol	nd ^a	nd ^a
kaempferol-3-o-glucosídeo	nd ^a	20,0±1,4
trans-resveratrol	247,6±15,6	14,2±1,8
trans-polidatina	15,5±0,1	4,7±0,2
Isorhamnetina-3-O-glucosídeo	35,5±0,1	nd ^a

^a Não detetado

As sementes geralmente apresentam maior teor de polifenóis do que as películas. O seu conteúdo oscila de 2,28 a 18,76 g / kg de matéria seca para uvas tintas e de 3,52 a 13,63 g / kg de matéria seca para uvas brancas (Kammerer et al., 2004). As diferenças entre as sementes de variedades de uvas tintas e brancas não foram significativas. Isso pode estar relacionado com o facto de que os compostos fenólicos só são extraídos das sementes de uva após a formação de etanol no vinho tinto durante a fermentação (Peyrot des Gachons & Kennedy, 2003). Assim, os diferentes conteúdos fenólicos de sementes não refletem linearmente as diferentes variedades. No entanto, o conteúdo em polifenóis demonstra que dependem do estágio e maturidade (Kennedy et al., 2000). O perfil fenólico das sementes foi dominado por flavonóis, enquanto que as antoxantinas e os estilbenos foram detetados em menores quantidades devido a estes constituintes estarem presentes na polpa que adere as sementes.

Em geral, os principais compostos em sementes de uva são as catequinas e epicatequina (Fuleki & Ricardo da Silva, 1997; Revilla & Ryan, 2000). Quanto à presença de catequina e epicatequina na película e sementes, é comum que flavano-3-ol estejam localizados tanto na pele de uva como nas sementes; no entanto, a pele contém menores concentrações de flavano-3-ol do que as sementes (Revilla & Ryan, 2000; Gonzalez-Manzano et al., 2004; Rodriguez Montealegre et al., 2006). Sun et al. (2006) quantificaram o trans-resveratrol nas sementes, detetando uma baixa concentração (6,8 mg/kg). Yilmaz & Toledo, (2004) também detetaram trans-resveratrol em amostras de sementes.

Dinâmica do conteúdo fenólico

Os polifenóis contêm vários grupos hidroxilo (-OH) que são antioxidantes doadores de hidrogênio e aprisionam o oxigênio singlete (Middleton & Kandaswami, 1994), o que os torna agentes redutores. Também são agentes quelantes de metais muito potentes. Podem capturar e extinguir os radicais livres e quebrar as reações em cadeia. Os potenciais antioxidantes são quatro a cinco vezes superiores aos da vitamina C ou E.

Os polifenóis das sementes de uva são muito sensíveis ao oxigênio, luz, ácidos, e meios alcalinos, mas relativamente menos sensível ao calor. Polifenóis incolores como a catequina e a epicatequina são facilmente oxidados em frutos e vegetais devido à presença da polifenoloxidase. Uma forma de desativar a polifenol oxidase passa pela curta exposição a uma temperatura entre 70 °C e 90 °C (Macheix et al., 1990).

Interação polifenóis – proteínas

Os polifenóis das sementes de uva têm uma afinidade especial para algumas proteínas e certas estruturas de proteínas (por exemplo, proteínas ricas em prolina) (Asano et al., 1982; Johnson et al., 1968; Pollock et al., 1959). Essas reações entre polifenóis e proteínas podem ser utilizadas na extração de polifenóis e proteínas do material vegetal. As interações polifenóis - proteínas também reduzem a precipitação de enzimas à medida que a proteína reage com açúcares, reduzindo assim a turbidez. Os polifenóis podem-se combinar reversivelmente com proteínas por ligação de

hidrogénio, ou irreversivelmente por oxidação seguida de condensações covalentes. Um estudo sobre a natureza da interação proteína-polifenóis nos vinhos mostrou que a interação envolve ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e algumas ligações covalentes (Hagerman, 1992; Siebert, 1999).

Mais de 33 % do peso seco da proteína é constituído por compostos fenólicos, conectados por ligações de hidrogênio (Loomis, 1969). As quinonas são compostos que reagem de forma não enzimática com outras substâncias. Estas podem ser polimerizadas, reduzidas ou até mesmo sofrer ataques nucleofílicos por substâncias com grupos amino, tiol e metileno ativo (Pierpoint, 1970). Portanto, a combinação de ligações de hidrogênio e reações de quinona ocorrem em produtos que contenham proteínas e polifenóis.

1.5. Os polifenóis para a saúde humana

Os compostos fenólicos dos subprodutos do vinho têm atraído cada vez mais atenção devido às suas propriedades antioxidantes e aos seus efeitos benéficos para a saúde humana (Shirkande, 2000). Por esta razão, o extrato de sementes de uva nos últimos anos aparece como um suplemento nutricional (Waterhouse et al., 2000).

Dado o conteúdo das sementes, estas são consideradas uma fonte de fibra dietética (Bravo & Saura, 1998; Martin-Carron et al., 1997; Valiente et al., 1995). Os extratos de sementes de uva ricos em procianidinas têm sido alvo de investigações mais detalhadas relativamente aos feitos benéficos para a saúde humana. Diferentes estudos indicam uma vasta gama de atividades biológicas, como por exemplo: propriedades antioxidantes e efeitos radioprotectores (Castillo et al., 2000), prevenção de cataratas (Yamakoshi et al., 2002), efeitos anti-hiperglicémicos (Pinent et al., 2004), aumento da lipemia pós-prandial (Del Bas et al., 2005), manipulação da expressão de sistemas de enzimas antioxidantes (Puiggròs et al., 2005), melhoria da sensibilidade à insulina e prevenção da hipertrigliceridemia (Al-Awwadi et al., 2005), inibição da aromatase e supressão da expressão da aromatase, inibição da atividade da proteína quinase do receptor envolvido no crescimento epidérmico, efeitos protetores contra danos

oxidativos em células cerebrais de ratos (Guo et al., 2007), e efeitos anti-inflamatórios (Terra et al., 2007).

O óleo produzido a partir da semente pode também representar uma boa opção, com numerosos benefícios para a saúde associados à sua composição, principalmente em relação à vitamina E e ácidos gordos, em particular o ácido linoleico. Este ácido gordo é referido na literatura como um protetor contra doenças cardiovasculares (Wijendran & Hayes, 2004), enquanto que a vitamina E presente tem propriedades neuroprotetoras e anti-tumorais; sendo capaz de baixar o nível de colesterol e adicionalmente pela sua atividade antioxidante (Choi & Lee, 2009). Recentemente, alguns estudos indicam que extratos aquosos preparados a partir das sementes de uva podem ter atividades antibacterianas e antioxidantes notáveis com elevado valor (Adámez et al., 2012).

1.6. Atividade antioxidante

O conteúdo em compostos fenólicos na semente de uva anteriormente discutido tem levado também a investigação de vários métodos para avaliar a atividade antioxidante de extratos vegetais e compostos isolados. Assim, foram realizados ensaios *in vitro* utilizados para determinar a capacidade antioxidante baseada na inativação de radicais estáveis sintéticos, tais como o 2,2-difenil-1-picrilidrazilo (DPPH), método desenvolvido por Blois (1958). Além disso, embora seja demonstrado que vários extratos apresentam notável atividade antioxidante em vários ensaios *in vitro*, muito poucos estudos foram efetuados utilizando compostos fenólicos isolados que exercem individualmente esse efeito e o estudo da sua interação (Meyer et al., 1998; Guarnieri et al., 2007).

Em investigações recentes (Lotito & Frei, 2004; Guarnieri et al., 2007), há um interesse crescente na compreensão de como os compostos fenólicos podem interagir e em fornecer mais conhecimento sobre a matéria. Em certos estudos a atividade antioxidantes dos polifenóis contidos na fibra das sementes mostraram ser quatro a cinco vezes maiores que o das vitaminas C ou E (Uchida, 1980).

Estudos posteriores confirmam a elevada capacidade antioxidante das sementes de uva. Identificando-se atividade antioxidante *in vitro* contra a oxidação do LDL a partir

de diferentes variedades de uva. Nos resultados deste estudo foi indicado também a importância do solvente utilizado para a extração dos compostos. A utilização de apenas um solvente como o caso da acetona ou metanol leva a uma maior extração contudo com baixa atividade antioxidante e um baixo poder redutor, por outro lado, as misturas como por exemplo de etanol e água resultam em menores quantidades de extração mas apresentam elevada atividade antioxidante e elevado poder redutor, assim uma mistura de solvente apropriada é muito importante na obtenção de uma fração com elevada atividade antioxidante (Jayaprakasha et al., 2001).

Conforme relatado por diferentes autores (Choi et al., 2002; Heijnen et al., 2001; Ketsawatsakul et al., 2000; Pannala et al., 1997; Sadeghipour et al., 2005) a quercetina, a catequina e a epicatequina foram os inibidores de peroxinitrito mais ativos. Dentro dos quais a quercetina apresenta maior atividade contra o radical livre DPPH, conforme descrito por Villano et al. (2007) e tendo sido referido ter a maior atividade antioxidante avaliada pelo ensaio fluorimétrico (Lo'pez et al., 2003). A catequina e epicatequina são equivalentes mais fracos contra ambos os radicais, comparativamente a quercetina em testes DPPH. Já o trans-resveratrol e a rutina apresentam normalmente diferentes tendências em relação aos dois radicais. Este facto também é confirmado por diferentes autores que, utilizando sistemas diferentes de determinação da atividade antioxidante, detetaram baixa ou insignificante correlação estatística entre a capacidade de eliminação de radicais livres e o conteúdo fenólico, sugerindo que a presença de mais componentes fenólicos ou as interações podem estar envolvidas no potencial antioxidante do extrato (Kallithraka et al., 2005; Ruberto et al., 2007).

Estes resultados indicam que os compostos fenólicos presentes no extrato podem interagir entre si e que as suas interações podem afetar a sua capacidade antioxidante. Isto pode-se dever à forma como os compostos fenólicos são capazes de eliminar diferentes radicais, neste caso o DPPH e radicais gerados a partir da degeneração de peroxinitrito. Contudo estas interações foram avaliadas em poucos trabalhos utilizando diferentes sistemas.

Entre alguns autores, concluíram que, com duas e três combinações de compostos fenólicos, o efeito antioxidante dos hidroxifenóis testados foram aditivos em que o ácido elágico exerceu um efeito antagonista significativo sobre a atividade

antioxidante de todas as combinações que continham catequina. Esse efeito foi atribuído as ligações de hidrogénio entre catequina o-dihidroxis e carbonatos de ácido elágico. Num estudo mais recente Heo et al. (2007) mediram a capacidade antioxidante utilizando o teste do radical ABTS, selecionando combinações de dois ou três compostos fenólicos em várias concentrações, contudo, não detetaram nenhum efeito sinérgico entre os fenólicos, apenas se observou o efeito aditivo, assim demonstraram que as interações entre compostos são importantes para a atividade biológica de extratos brutos. Contudo, os compostos fenólicos investigados, demonstraram forte atividade antioxidante interessante para atividades biológicas e farmacológicas, como agentes antioxidantes.

1.7. Extração de compostos bioativos

A extração é o primeiro passo na utilização dos polifenóis a partir de fontes naturais para preparação de suplementos dietéticos ou nutracêuticos, ingredientes alimentares, produtos farmacêuticos e cosméticos (Dai & Mumper, 2010).

A extração é uma etapa muito importante no isolamento, identificação e utilização dos compostos fenólicos (Lapornik et al., 2005). Dado que a extração sólido-líquido é uma operação heterogénea e multi-componente que envolve transferência de massa instável de uma matriz sólida para o líquido, onde os solutos podem ser extraídos a diferentes taxas, dependendo da sua localização (superfície externa, poros, vacúolos, etc.) e solubilidade (Díaz-Reinoso et al., 2006). Para descrever o mecanismo de extração por difusão na literatura geralmente é utilizada a segunda lei de Fick (Herodež et al., 2003). A recuperação desses componentes é normalmente realizada através de um procedimento de extração por solvente com uma determinada concentração de solvente, tempo e temperatura devendo estes parâmetros importantes serem otimizados (Spigno et al., 2007).

A extração sólido-líquido é um fenómeno de transporte de massa em que os sólidos contidos numa matriz migram para o solvente colocado em contato com a matriz. Este fenómeno de transporte de massa pode ser melhorado com mudanças nos

coeficientes de difusão induzidos por métodos convencionais e não convencionais (Corrales et al., 2009).

Bucić-Kojić et al. (2009) mostraram que a extração dos compostos fenólicos das sementes de uva depende do solvente utilizado e da temperatura de extração. Demonstrando que o conteúdo fenólico nos extratos aumenta com a temperatura de extração, atingindo o maior rendimento de extração a 80 °C e com 50 % de etanol. Deste modo é evidente que a resistência à transferência de massa desempenhe um papel importante na extração de compostos fenólicos a partir da semente de uva.

Tradicionalmente, os polifenóis são extraídos de produtos naturais utilizando solventes orgânicos (Latoui et al., 2012). A extração convencional através de um solvente é a técnica aplicada e difundida a escala industrial para extrair compostos bioativos de matrizes de plantas. No entanto, estas técnicas requerem tempos de extração longos e resultam em baixos rendimentos de extração (Singh & Saldaña, 2011). Para além de que, o tempo de extração prolongado ou a temperatura mais elevada produzem efeitos negativos nos componentes alvo. Podem causar a degradação de compostos fenólicos (Anđelković et al., 2014). Para ultrapassar estas limitações, tem sido aplicado um esforço considerável na investigação da extração de constituintes de plantas utilizando técnicas não convencionais tais como a extração por aquecimento óhmico, que será abordada no presente estudo.

Mesmo que estas técnicas permitam melhorar o rendimento de extração e reduzir o tempo de extração, elas ainda utilizam solventes convencionais (etanol, metanol, etc.) e o desejo de encontrar um método amigo do ambiente continua desafiador (Duba, 2015).

O objetivo de recuperação de polifenóis de subprodutos da indústria dos vinhos utilizando diferentes métodos não convencionais tem atraído bastante interesse por parte de investigadores e da indústria. Verificando-se que a concentração de compostos antioxidantes no extrato pode variar muito dependendo da tecnologia aplicada para a extração. A maioria dos estudos que avaliaram o potencial de métodos não convencionais para a valorização de resíduos e subprodutos da uva focaram-se maioritariamente nos compostos bioativos com atividade antioxidantes para fins médicos (Teixeira et al., 2014).

Com o objetivo de melhorar a eficiência e eficácia na extração, no presente trabalho devemos ter uma noção do que já foi testado, analisando assim os pontos fortes ou fraquezas de diferentes métodos convencionais e não convencionais.

1.7.1. Métodos convencionais

Os métodos tradicionais baseiam-se principalmente no processo de aquecimento (Figura 5.), que embora facilite a transferência de massa entre as diferentes fases do sistema, consome muita energia e pode resultar na degradação dos compostos termolábeis. A extração industrial de polifenóis é realizada com uma mistura de álcool e água. No entanto, é necessário um tempo de difusão bastante longo, 3-20 horas para a extração (Boussetta, 2010).

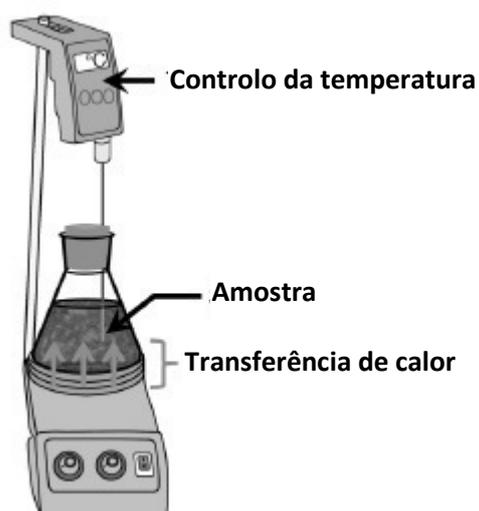


Figura 5. Representação esquemática do sistema envolvido no processo de aquecimento de uma amostra (adaptado de Barba et al., 2016).

1.7.2. Métodos inovadores/ tecnológicos

Hoje em dia, as tecnologias emergentes estão a atrair cada vez mais interesse por parte de várias indústrias alimentares, devido ao seu potencial para recuperar compostos de valor de forma efetiva e sustentável utilizando menos energia entre outros recursos, substituindo assim os métodos convencionais de processamento à base de calor (Boussetta, 2010).

Para superar diferentes problemas, as tecnologias inovadoras estão a ser também adotadas nas indústrias alimentares, com finalidade de satisfazer o aumento da procura pelos consumidores por alimentos e subprodutos menos processados e atendendo aos requisitos de um conceito de extração verde (Galanakis, 2013).

O etanol é o solvente mais abundante utilizado para substituir os convencionais solventes com maiores impactos, apresentado vantagens tais como ser permitido na indústria alimentar, abundância relativamente a outros solventes tradicionalmente utilizados e fácil de eliminar do extrato por evaporação à temperatura ambiente.

Contudo, este conceito visa evitar/minimizar a utilização de solventes orgânicos, juntamente com outros benefícios, como reduzir o tempo de tratamento, diminuir a temperatura de processamento, intensificar o processo de transferência de massa, aumentar os rendimentos de extração, preservar a alta qualidade do extrato e reduzir o consumo de energia (Chemat et al., 2012, 2015; Rombaut et al., 2014).

Ultra-sons

O aumento na extração obtido pela utilização dos ultra-sons é atribuído principalmente ao efeito de cavitações acústicas produzidas no solvente pela passagem de uma onda de ultra-som (Wang et al., 2008). O ultra-som oferece um efeito mecânico que permite maior penetração do solvente na matriz da amostra, aumentando a área de superfície de contato entre a fase sólida e líquida e, como resultado, o soluto difunde-se rapidamente da fase sólida para o solvente (Rostagno et al., 2003)

Devido ao efeito cavitacional melhora a transferência do calor e de massa através dos danos nas paredes celulares, os ultra-sons são cada vez mais utilizados como um processo autónomo ou como parte do procedimento para a extração de compostos valiosos. Este tratamento oferece benefícios como maior penetração do solvente em material celular, menor tempo de processamento e residência, maior rendimento e reprodutibilidade do processo, baixo consumo de solventes e emulsificantes, elevado processamento, diminuição do risco de contaminação, extração de componentes termolábeis, economia significativa na manutenção, eficiência energética no processamento e finalmente, devido aos factos mencionados, um processamento mais

económico e amigo do ambiente (Roselló-Soto et al., 2015b). Assim, os ultra-sons podem ser facilmente implementados para melhorar a eficiência de extração de polifenóis, flavonóides, flavonóis, açúcares, minerais e carotenóides em sucos (Abid et al., 2014; Bhat et al., 2011; Rawson et al., 2011).

Corrales et al. (2008) estudaram os efeitos dos ultra-sons comparando com um tratamento térmico (70 °C) para recuperar compostos bioativos com actividade antioxidante a partir de subprodutos de uva e observaram um aumento significativo nos compostos fenólicos totais dos extratos obtidos após a aplicação de tratamentos por ultra-sons em comparação com a extração de água convencional.

Rajha et al. (2014a) também investigaram os efeitos dos ultra-sons (1010 kJ / kg) na recuperação de proteínas e polifenóis a partir de subprodutos da uva e obtiveram um aumento significativo na extração de polifenóis. No entanto, é descrito que o consumo de energia para alcançar níveis semelhantes de polifenóis recuperados com outros tratamentos físicos alternativos foi incrementalmente maior, em comparação com a tecnologia HVED (10 kJ / kg) e PEF (50 kJ / kg).

Extração assistida por micro-ondas (EAM)

A extração assistida por micro-ondas é outro método de extração verde e é baseado no impacto direto nos compostos polares. A energia eletromagnética, na faixa de frequência de 300 MHz - 300 GHz, é transferida para gerar calor após a condução iónica e a rotação do dipolo (Jain et al., 2009). O processo de EAM é suposto envolver três etapas sequenciais (Alupului et al., 2012): i) separação dos solutos dos locais ativos da matriz da amostra sob aumento de temperatura e pressão, ii) difusão do solvente através da matriz da amostra e iii) liberação dos solutos da matriz da amostra para o solvente.

Esta tecnologia apresenta vantagens, tais como o aquecimento mais rápido para a extração de substâncias bioativas a partir de materiais vegetais, gradientes térmicos reduzidos, tamanho reduzido do equipamento e maior produção de extrato (Chemat e Cravotto, 2012, 2013; Cravotto et al., 2008). O tratamento com micro-ondas é investigado para extração e valorização de compostos naturais a partir de materiais

vegetais e subprodutos. A viabilidade da utilização do processo EAM em escala industrial tem captado atenção para uma extração verde de compostos valiosos das matrizes de plantas e subprodutos industriais (Díaz-Ortiz et al., 2007; James Mason et al., 2011; Li et al., 2012; Tatke & Jaiswal, 2011). Por exemplo, Liazid et al. (2011) estudaram o EAM na extração de antocianinas a partir da película de uva. Os resultados obtidos mostraram uma redução notável no tempo de extração de 5 horas para 5 minutos, alcançado com o EAM em comparação com o método convencional de extração sólido-líquido.

Extração de fluido sub- e supercrítico

O fluido mais utilizado para processos de extração supercrítica é CO₂. Tem uma baixa temperatura crítica (31,1 °C), sem toxicidade e seguro de utilizar. Além dessas características, os processos de extração que utilizam CO₂ supercrítico ocorrem na ausência de luz e ar, minimizando as reações de degradação. No entanto, devido ao seu caráter não polar, o CO₂ não é utilizado preferencialmente sozinho para extrair polifenóis polares, mas misturado com co-solventes orgânicos (por exemplo, etanol, metanol, acetona) também denominados modificadores. Estes solventes aumentam o poder de solvatação do CO₂ e, portanto, a solubilidade e extrabilidade dos polifenóis. A temperatura crítica de uma mistura de CO₂ e co-solvente é superior à dos solventes separados, resultando assim numa menor utilização de co-solvente após a extração na gama de 40-60 °C. Adicionar 5, 10, 14, 17, 20 e 100 % de etanol ao CO₂ aumenta a temperatura crítica da mistura para 42,5, 53,7, 62,8, 69,5, 76,1, 403 e 243,3 °C, respetivamente (Adil et al., 2007). Portanto, numa extração supercrítica utilizando uma mistura de CO₂ + etanol poderia ser realizada a 200 bar, 50 °C e 5 % de etanol, podendo diminuir assim a temperatura para 40 °C.

A extração de CO₂ subcrítica com etanol e / ou metanol como co-solvente tem sido utilizada para recuperar polifenóis de subprodutos da indústria do vinho. Na mesma linha, Palma & Taylor (1999) desenvolveram uma metodologia para extrair polifenóis de sementes de uvas brancas. Para este efeito, otimizaram as condições de processamento (densidade do CO₂, co-solvente, concentração do co-solvente e temperatura de extração) e obtiveram um extrato rico em ácido gálico, catequina e epicatequina como compostos fenólicos predominantes.

A extração de fluido supercrítico também foi amplamente investigada para a recuperação de compostos com elevado valor associado. Esta tecnologia é de grande importância principalmente devido à pureza dos extratos fornecidos. A maioria dos estudos que avaliaram o potencial deste tipo de extração para recuperar compostos valiosos de subprodutos de uva focaram-se na recuperação do resveratrol.

Murga et al., (2000) avaliaram o potencial de misturas de CO₂ e álcool sob condições supercríticas para extrair seletivamente compostos fenólicos de sementes de uva e detetaram um aumento significativo na capacidade do solvente quando aumentaram a pressão e a quantidade de álcool utilizado como co-solvente.

Processamento de alta pressão

O processamento de alta pressão (AP) é outra tecnologia que mostrou boas perspectivas para extrair compostos bioativos antioxidantes de materiais alimentares de plantas (Barba et al., 2015). Muitos estudos obtiveram um significativo aumento do teor total de antocianinas e individual após o processamento em comparação com métodos de extração convencionais. No geral, verifica-se que a AP pode ser uma ferramenta útil para extrair compostos termolábeis, como a antocianina dos subprodutos de uva. Foi avaliado o potencial de alta pressão / alta temperatura para extrair compostos fenólicos de subprodutos de uva (Casazza et al., 2010a, 2012) e, em particular, o resveratrol das películas de uva (Casazza et al., 2010b), apresentando resultados promissores.

Extração por água quente pressurizada

A extração por água quente pressurizada é um método não convencional baseado na extração de moléculas utilizando água quente no estado líquido como solvente. A principal propriedade desta técnica é utilizar valores de temperatura acima de 100 °C e pressão para além dos 0,1 MPa (o ponto de ebulição atmosférico da água) e abaixo dos valores do ponto crítico (374 °C; 22,1 MPa). Quando a água é utilizada como solvente, a tecnologia também pode ser designada como extração subcutânea de água, extração líquida super-aquecida e extração líquida pressurizada ou extração acelerada de solvente (Plaza & Turner, 2015).

Extração assistida por solventes hidrotrópicos

Os solventes hidrotrópicos são sais orgânicos altamente solúveis em água, o que pode melhorar a solubilidade dos compostos não solúveis ou pouco solúveis a dissolverem-se na água. Em relação a resíduos e subprodutos da uva, num trabalho recente, Rajha et al. (2015) avaliaram o potencial de β -ciclodextrina, um solvente hidrotrópico, na extração de polifenóis.

Campos Elétricos Pulsados (*Pulsed Electric Fields* - PEF)

O tratamento por campos elétricos pulsados é um método promissor para a recuperação de compostos valiosos a partir de resíduos alimentares e subprodutos (Deng et al., 2015; Galanakis, 2012; Koubaa et al., 2015). Este tratamento é aplicado ao material colocado entre dois elétrodos. A amplitude do pulso no equipamento varia de 100-300 V/cm a 20-80 kV/cm (Koubaa et al., 2015). Normalmente é conduzido a temperatura ambiente ou ligeiramente superior à temperatura ambiente e com um tempo de tratamento inferior a 1 s (μ s ou ms) (Barbosa-Cánovas et al., 2000). Quando as células da planta são expostas a um determinado campo elétrico, as membranas celulares podem ser danificadas, levando à formação de poros temporários (reversíveis) ou permanentes (irreversíveis) (Figura 6.). Esse fenómeno de dano celular é chamado de "eletroporação".

Numerosas indústrias de processamento alimentar adquiriram equipamentos de PEF para ampliar os processos de extração e o pré-tratamento de matrizes de alimentos (Jaeger et al., 2009; Mohamed & Amer Eiss, 2012). Várias câmaras de tratamento foram testadas em relação à homogeneidade do campo, à capacidade de limpeza e ao comportamento do fluxo. Equipamentos com nível de potência médio de 5, 30 e 80 kW, têm capacidade de processar até 10.000 L/h (Töpfl, 2011).

A força do campo elétrico é um dos fatores mais importantes que influenciam a concentração dos compostos extraídos. Por exemplo, Balasa et al., (2006) avaliaram os efeitos do PEF de baixa intensidade na extração de polifenóis de uvas para vinho (*Vitis vinifera*) e descobriram que o tratamento com PEF em campo elétrico muito baixo (0,5 kV/cm, 50 pulsos, 0,1 kJ/kg) aumentou o teor total de polifenóis (TP) em 13 % no suco de uva recém esmagado em comparação com o suco esmagado não tratado. Com um

aumento adicional de intensidade (2,4 kV/cm, 50 pulsos 2,3 kJ/kg), um maior aumento de conteúdo de TP (28 %) foi detetado devido ao maior grau de permeabilização da membrana celular. No entanto, a aplicação de maior intensidade de PEF ao aumentar a força do campo elétrico, não resultou numa melhor extração de TP dos resíduos de uvas. Por exemplo, a aplicação de PEF a 0,5 kV/cm proporcionou um aumento maior do teor de TP (24 %) em uvas do que a sua aplicação a 2,4 kV/cm (Balasa et al., 2006). O aumento do conteúdo de TP com baixa intensidade de PEF pode estar relacionado a uma indução de stresse nas células de uva e posterior produção de polifenóis como metabólitos secundários.

Outro estudo, testou o impacto do PEF (0,8-5 kV/cm, 1-100 ms, 42-53 kJ/kg) na recuperação de fenólicos das uvas Cabernet Franc durante a fermentação do vinho tinto sendo avaliado e comparado com tratamento convencional por aquecimento (50 °C, 15 min, 125 kJ/kg) (El Darra et al., 2013a). O estudo mostrou uma melhoria significativa na extração de fenólicos (teores de antocianina e taninos), intensidade de cor e atividade antioxidante das amostras durante a fermentação do vinho tinto após a aplicação de PEF (51-62 %) em comparação com os tratamentos térmicos (20 %). Foi demonstrado que o tratamento com PEF foi mais eficaz para a recuperação de antocianinas. Utilizando esta tecnologia, os rendimentos de extração aumentaram até 22 % em comparação com extração por ultra-sons e 55 % com tratamento por descargas elétricas de alta tensão (HVED).

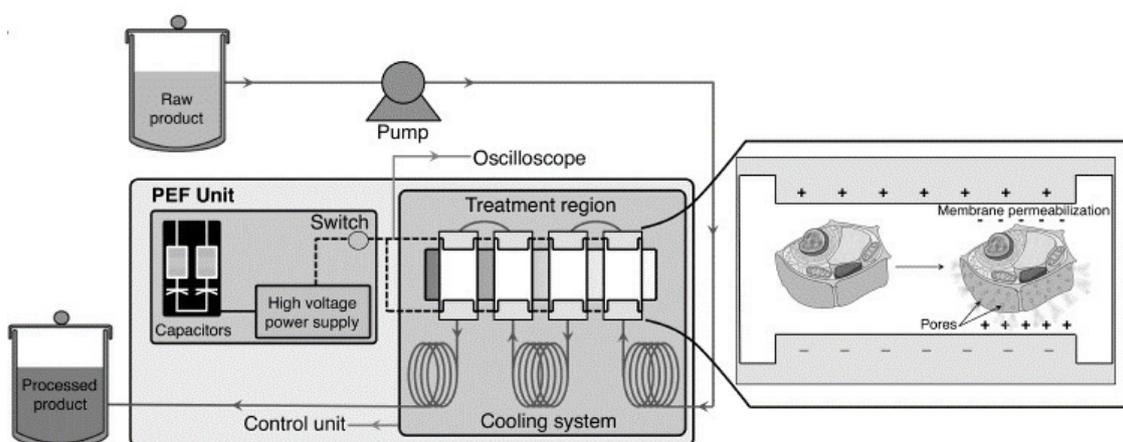


Figura 6. Representação esquemática de um sistema de tratamento contínuo de Campos Elétricos Pulsados (Pulsed Electric Fields - PEF) (adaptado de Barba et al., 2016).

Descargas elétricas de alta tensão (High Voltage Electrical Discharges - HVED)

A tecnologia de descargas elétricas de alta tensão tem sido utilizada por diferentes investigadores para recuperar compostos de alto valor de várias plantas e materiais alimentares, devido à descarga elétrica que provoca a ruptura celular dos tecidos (Boussetta & Vorobiev, 2014). Se o campo elétrico for intenso o suficiente (até 40 kV e 10 kA), a avalanche de elétrons propaga-se, desde o eletrodo até ao eletrodo de massa (Figura 7.) gerando grande impacto no meio. Esta descarga elétrica é acompanhada por vários fenômenos secundários, como ondas de choque de elevada amplitude de pressão, cavitação de bolhas, criação de turbulência líquida e produção de espécies ativas. Consequentemente, todos esses fenômenos levam à fragmentação das partículas e ao dano da estrutura celular, facilitando a libertação dos compostos intracelulares.

Já foi investigada a escala piloto (35 L) a extração de polifenóis assistida por esta tecnologia a partir do bagaço de uva. Após o tratamento, a intensificação da extração de polifenóis totais aumentou sete vezes em bagaço de uva (sementes, películas e hastes). No entanto foi descrita a necessidade de aumentar a energia de tratamento em escala piloto para obter taxas equivalentes de polifenóis em comparação com a escala laboratorial (Boussetta et al., 2012). Os principais trabalhos resumem o impacto na recuperação de compostos de alto valor associado aos subprodutos da indústria do vinho.

Mais tarde, Boussetta et al., (2013) investigaram o potencial de HVED (40 kV) para extrair polifenóis das sementes de uva e compararam esta eficiência de extração com o PEF (8 - 20 kV/cm, 0 - 20 μ s) e um processo de moagem (180 W, 40 s). Os resultados mostraram que HVED e moagem, com posterior extração em solvente contendo etanol a 30 %, aumentaram o rendimento de polifenóis até um máximo de 9 g EAG / 100 g de matéria seca.

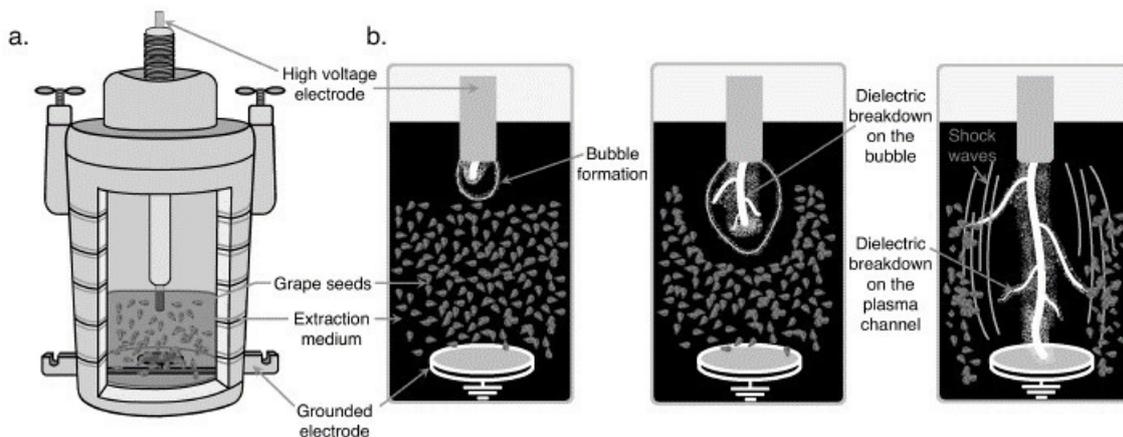


Figura 7. a. Representação esquemática de uma célula HVED de escala laboratorial utilizada para processamento de sementes de uva. b. Representação esquemática da evolução da descarga dielétrica de alta tensão durante o tratamento com HVED e fenômenos associados (adaptado de Barba et al., 2016).

Aquecimento ôhmico pulsado (Pulsed ohmic heating - POH)

Em alguns casos, a aplicação de campos elétricos moderados à temperatura ambiente não é suficiente para danificar as células localizadas em estruturas rijas da uva, como as sementes. Portanto, a aplicação de POH, que consiste em aumentar a temperatura por movimentos iônicos (Figura 8.) após a aplicação do tratamento com PEF, pode ser uma ferramenta útil para recuperar compostos intracelulares em campo elétrico moderado (<math><1000\text{ V/cm}</math>) e temperaturas moderadas (20-50 °C) (Praporscic, 2005).

Tem sido avaliados os efeitos de POH (20-800 V / cm) em diferentes percentagens de etanol em água (0-50 % p/p) na recuperação de polifenóis do bagaço de uva tinta (El Darra et al., 2013) e foi descrito que o tratamento com POH é capaz de induzir a destruição da membrana celular, aumentando assim a extração de polifenóis do bagaço de uva, aumentando em 36% a recuperação de polifenóis do que a amostra não tratada, quando o tratamento com POH foi aplicado a 400 V / cm seguido de um passo de difusão de 60 min a 50 °C e com solvente de 30 % de etanol em água.

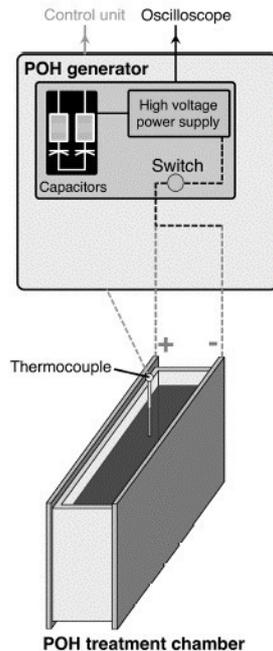


Figura 8. Representação esquemática de um sistema de aquecimento aquecimento óhmico pulsado (Pulsed ohmic heating - POH) em escala de laboratório (adaptado de Barba et al., 2016).

Durante a pesquisa bibliográfica verificou-se a existência de inúmeros estudos acerca da extração de compostos bioativos. Contudo, também se verificou que a maior parte desses estudos valorizava apenas a quantidade de compostos extraídos, utilizando diferentes tipos de solventes. Estudos mais recentes procuram um tratamento mais amigável ao ambiente e com menor consumo energético favorecendo a extração de compostos com água, contudo, alguns destes métodos tornam-se dispendiosos, tendo em conta o equipamento necessário (Smith, 2002).

1.8. Estratégias baseadas na tecnologia de aquecimento óhmico

O aquecimento é um dos meios mais antigos de processamento e preservação de alimentos e tem sido utilizado pela humanidade por muitos anos. As tecnologias de aquecimento têm sofrido avanços com o desenvolvimento de tecnologias como o aquecimento óhmico, aquecimento dielétrico (que inclui o aquecimento micro-ondas e aquecimento por radiofrequência) e o aquecimento por indução. Todos estes métodos inovadores no processamento são extremamente eficientes energeticamente, pois o calor é gerado diretamente dentro na matriz do conteúdo.

O aquecimento ôhmico, também chamado de aquecimento Joule, aquecimento pela resistência elétrica, aquecimento de resistência elétrica direta, electro aquecimento, ou aquecimento electro-condutor, é definido como um processo onde o calor é gerado internamente devido à resistência à passagem da corrente elétrica através da matriz a processar (Alwis & Fryer, 1990). O aquecimento ôhmico distingue-se dos outros métodos elétricos de aquecimento já que os elétrodos estão em contato com a matriz ao contrário do micro-ondas e do aquecimento indutivo, onde os elétrodos estão ausentes, a frequência aplicada é menor em comparação com faixa de frequência do micro-ondas, e também a forma de onda é diversificada, embora tipicamente sinusoidal.

Existem vários fatores que afetam o aquecimento ôhmico, como a condutividade elétrica, a intensidade do campo elétrico, tamanho das partículas, concentração, concentração iônica e os elétrodos, estes fatores foram descritos como tendo impacto no processo de aquecimento ôhmico. Contudo, o parâmetro mais importante no aquecimento ôhmico é a condutividade elétrica (Fryer & Li, 1993). Quando mais do que uma fase está presente, esses parâmetros podem exercer a sua influência através da condutividade efetiva da mistura, que é o caso do tamanho e concentração de partículas, que podem influenciar diretamente a taxa de aquecimento de diferentes constituintes.

Campos elétricos com intensidade do campo elétrico inferior a 100 V/cm permitem melhorar o processo de extração em diferentes materiais (Wang & Sastry, 2002; Kulshrestha & Sastry, 2003; Zhong & Lima, 2003). Sendo necessário ter atenção ao tempo que é fornecida esta intensidade na ordem de 1-100 segundos. Foi assumido que este processo tem um efeito de eletroporação por diferentes investigações realizadas em processos de extração (Wang & Sastry, 2002; Kulshrestha & Sastry, 2003; Sensoy & Sastry, 2004). Praporscic et al. (2006) concluíram nas suas investigações que o grau de desintegração do tecido e o rendimento do suco dependem da intensidade do campo elétrico, temperatura, duração do tratamento e tipo de matriz vegetal. Foi explicado também que a combinação do efeito da eletroporação de membranas celulares aliado as condições térmicas permitem o amolecimento do tecido vegetal.

O aquecimento óhmico apresenta algumas vantagens incontornáveis de acordo com Parrott (1992) e Castro et al. (2002): 1. Produção contínua sem superfícies de transferência de calor. 2, tratamento rápido e uniforme de fases líquidas e sólidas com danos térmicos mínimos e perdas de nutrientes (ao contrário do aquecimento por micro-ondas, que tem uma penetração finita em materiais sólidos), 3. Processo ideal para produtos sensíveis ao cisalhamento devido a baixa velocidade do fluxo, 4. Otimização do capital de investimento e segurança do produto, 5. redução da incrustação quando comparada com o aquecimento convencional, 6. melhor controlo sobre o processo como uma simples manutenção e com custos reduzidos, 7. sistema amigo do meio ambiente, 8. manutenção da cor e valor nutricional dos alimentos, 9. Menos requisitos de limpeza, 10. aquecimento de alimentos em partículas e partículas misturadas em líquidos, 11. baixo risco de danos ao produto devido à queima, e 12. elevada eficiência de conversão de energia.

Contudo, existem desvantagens associadas a limitações do sistema, manifestando-se dificuldades em conteúdos com gordura, em que não sendo esta condutora não é efetivamente aquecido todo o conteúdo (Rahman, 1999). Se essa gordura estiver presente numa matriz com uma condutividade elétrica elevada a esse conteúdo pode aquecer mais lentamente devido à falta de condutividade elétrica passando a estar sobre aquecimento por contacto. Em consequência qualquer patogenicidade ou bactérias presentes nesses locais podem receber menos tratamento térmico do que o resto da matriz (Sastry, 1992). Como a temperatura do sistema aumenta, a condutividade elétrica também aumenta devido a movimento mais rápido de eletrões podendo gerar alguma instabilidade no sistema. O maior custo do sistema em comparação com outros métodos convencionais de aquecimento limita a sua utilização comercial em processamentos de maior dimensão.

1.9. Objetivos

Com o intuito de valorizar o subproduto disponível, o objetivo primordial deste trabalho consistiu na aplicação de uma tecnologia amiga do ambiente no processamento, neste caso, o sistema por electro aquecimento facilitando a extração

para obtenção de extratos com elevado teor de compostos bioativos e/ou atividade antioxidante, com viabilidade de utilização futura na indústria alimentar (aplicação em suplementos alimentares/alimentos funcionais) ou outras indústrias (por ex. cosmética).

Os objetivos deste trabalho consistem na otimização de um protocolo de extração de compostos de valores acrescentado dos resíduos, mais precisamente da semente de uva da casta Alvarinho da região Demarcada dos Vinhos Verdes, recorrendo o processamento térmico por electro-aquecimento como pré-tratamento. A relevância do presente trabalho advém da elevada importância industrial de valorizar um subproduto. Neste âmbito tem sido conduzidos diversos estudos para a otimização do processo.

Para isso, selecionaram-se solventes de baixa toxicidade e reduzido custo desenvolvendo-se um conjunto de tarefas laboratoriais, articuladas entre si, procurando respostas sequenciais e cumulativas para os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar o efeito das principais variáveis que afetam o rendimento de extração e a atividade antioxidante dos extratos, nomeadamente as capacidades do solvente, a temperatura e o tempo de extração;
- Quantificar o teor em compostos fenólicos totais, flavonoides e taninos dos extratos obtidos;
- Avaliar a capacidade antioxidante dos extratos obtidos, utilizando duas metodologias diferentes e complementares (DPPH e ABTS);
- Selecionar o método de tratamento e extrativo mais eficaz com base nos parâmetros avaliados.

Os resultados mostram que esta tecnologia representa um procedimento rápido, sensível e eficiente para a extração dos compostos.

Em semente intacta e moída serão aplicadas diversas condições de tratamento sendo também aplicados métodos analíticos de quantificação de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante, por último, será explorada a presença de proteína num cenário de co-extração.

2. Material e Métodos

2.1. Material Biológico

As amostras biológicas consistem no bagaço de uva, obtidas na adega comercial (Quintas de Melgaço, Melgaço, Portugal). Na adega, as hastes foram separados de sementes e películas. As amostras de sementes e películas foram recolhidas após a prensagem do cacho e seladas em sacos de polietileno para transporte. Posteriormente as amostras foram secas superficialmente à temperatura ambiente durante 48 horas, posteriormente películas e sementes foram separadas por meio de peneiras vibratórias passando por uma limpeza manual e de seguida armazenadas a -20 °C no laboratório. A utilização de sementes ainda frescas apresenta melhores condições para a extração de compostos em comparação com o bagaço de uva desidratado ou seco (Bucic-Kojic et al., 2009).

Para ensaios de semente moída procedeu-se a trituração por um moinho (Moinho de café Tristar KM2270, potência máxima de 150 W) imediatamente antes do tratamento/extração. Para evitar a degradação da amostra por sobreaquecimento, a semente (5 g) foi moída ainda congelada com intervalos de pelo menos 10 s, em seguida a moagem foi interrompida e a amostra foi moída durante mais 10 s, repetindo-se o processo de moagem até aos 2 minutos.

2.2. Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico:

DPPH• (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) (SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A)
Etanol absoluto (Merck, Darmstadt, Alemanha)
Folin–Ciocalteu (SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A)
Hidróxido de sódio (Merck, Darmstadt, Alemanha)
Trolox (SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A)

2.3. Equipamentos

Moinho de café Tristar KM2270
Agitador orbital
Fluke 125 Industrial Scopemeter 40Mhz

2.4. Extração de polifenóis

2.4.1. Pré-tratamento por aquecimento óhmico

O sistema de aquecimento óhmico é composto por uma célula de aquecimento, eletrodos, sistema de recolha de dados, fonte de alimentação (gerador de frequência e amplificador do sinal), termopares e controlo da corrente elétrica e voltagem. A célula utilizada é construída em vidro contendo um orifício na parte superior onde é instalado o termopar. Os eletrodos de aço inoxidável com diâmetro de 1.5 cm são inseridos paralelamente na célula e fixados em ambas as extremidades a uma distância entre si de aproximadamente 3 cm comportando um volume de 20 ml (Figura 9.).



Figura 9. Sistema óhmico utilizado neste estudo.

As características do campo elétrico fornecido foram ajustadas conforme as necessidades e objetivos de cada ensaio, contudo, devido a fatores mecânicos do equipamento fixou-se a frequência em 25 KHz.

Entre os eletrodos são colocadas as sementes (5 ou 10 g) a tratar adicionando 5 ml de solução de NaCl com uma condutividade pretendida para o respetivo ensaio, normalmente 20 $\mu\text{s/cm}$.

2.4.2. Difusão no processo de extração

Após o pré-tratamento através do aquecimento óhmico a suspensão de sementes e respetivo meio é transferida para frascos de vidro de 250 mL sendo adicionado o solvente desenvolvido para cada ensaio à temperatura ambiente (Figura. 10). Após este processo inicia-se a fase de extração na qual os frascos são colocados no agitador orbital a uma velocidade fixa de aproximadamente 250 rpm ($1570,8 \text{ rad/min}^{-1}$) e ao longo de um intervalo de tempo ajustado conforme o objetivo. Para evitar qualquer evaporação e degradação do conteúdo sob o impacto do ar ou da luz, os frascos são fechados e cobertos com folha de alumínio ao longo de todo o processo de extração.

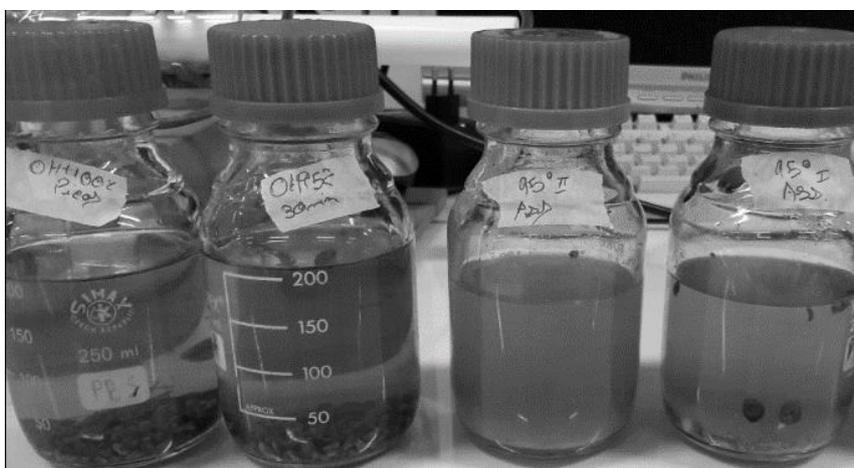


Figura 10. Exemplo do aspeto apresentado após extração ocorrida em sementes intactas (os dois frascos da esquerda) e moídas (dois frascos da direita). É visível o impacto do estado da semente na turbidez da solução.

As condições de extração são importantes para a obtenção de um bom resultado, é nesta fase que ocorre a difusão dos compostos ainda presentes na matriz celular para o solvente. De forma a transportar/retirar o máximo possível devemos criar condições que desloquem esses compostos, um fluxo turbulento do solvente no frasco será o ideal. O diâmetro do frasco é importante (aproximadamente 5 cm). É descrito que um diâmetro menor do frasco para a mesma frequência de agitação, reduz drasticamente a velocidade relativa entre o líquido rotativo e a parede do frasco, reduzindo assim o número de Reynolds utilizado para descrever esta cinética (Buchs et al., 2000). Um número de Reynolds superior a 104 corresponde a condições de fluxo turbulento. O número de Reynolds para a agitação é definido por Buchs et al., (2000).

2.5. Quantificação dos compostos fenólicos totais

A determinação dos fenólicos totais foi realizada pelo método colorimétrico de “Folin-Ciocalteu” (Waterhouse, 2002). Para cada condição, a cada extração em particular foi retirado 9 mL. De seguida, as amostras foram centrifugadas a 18000 g durante 10 min e o sobrenadante foi recuperado. A 5 µL de sobrenadante foi adicionado 60 µL de solução de carbonato de sódio (70 g/L) e 15 µL de reagente Folin adicionando-se no final 200 µL de água desionizada, seguindo-se uma incubação na estufa a 45 °C durante 15 min ao abrigo da luz.

Após incubação, a absorvância das amostras foram medidas a 750 nm utilizando um leitor de microplacas Multiskan Spectrum (Synergy HT, BIOTECH). A concentração dos fenólicos totais foi determinada aplicando a curva de calibração do ácido gálico [EAG].

2.6. Determinação da atividade antioxidante

2.6.1. ABTS / Determinação da Capacidade Antioxidante Equivalente de Trolox (TEAC)

Este ensaio como descrito anteriormente foi realizado com pequenas alterações ao original apresentado por Zhu et al., (2009). Em resumo, os catiões dos radicais ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) foram preparados misturando um volume igual de ABTS (7 mM em água destilada) e persulfato de potássio (4,9 mM em água destilada) e a solução foi colocada no escuro durante 12 - 16 h à temperatura ambiente, a solução foi então diluída com etanol a 80% até atingir uma absorvância de cerca de $0,7 \pm 0,01$ a 734 nm. Foram adicionados 10 µL de amostras adequadamente diluídas para metade a 190 µL de solução ABTS para um poço da placa de 96 poços e a absorvância foi registada a 734 nm após 30 min de incubação à temperatura ambiente. O Trolox foi utilizado como padrão, e a curva de calibração foi obtida com o Trolox em concentrações de 15,63, 31,25, 62,5, 125, 250 e 500 µM. O TEAC das amostras foi calculado a partir da curva padrão de Trolox e expresso em micromoles de equivalentes de Trolox (TE) por grama de amostra (µmol TE/g).

2.6.2. DPPH - Atividade de eliminação de radicais livres

A atividade de eliminação dos extratos contra o radical livre de DPPH foi medida utilizando o método de Brand-Williams et al., (1995) ligeiramente modificado, aplicando-se da seguinte forma: 10 μL de amostras adequadamente diluídas (1:10) ou soluções de Trolox (31,25, 62,5, 125, 250, 500, 750 e 1000 μM) como padrão sendo adicionados 190 μL de solução de DPPH (com concentração final de 0,1 mM em etanol) a cada poço da placa de 96 poços. A mistura foi agitada suavemente e deixada em repouso à temperatura ambiente no escuro durante 30 min.

Posteriormente, a absorvância foi medida a 517 nm utilizando um leitor de microplacas Multiskan Spectrum (Synergy HT, BIOTECH). A atividade de eliminação de radicais DPPH dos extratos foi calculada a partir da curva padrão de Trolox e expressa como micromoles de equivalentes Trolox (TE) por grama de amostra ($\mu\text{mol TE / g}$). Foram preparados controlos contendo solução a 30 % de etanol em vez de amostras. O Trolox foi utilizado como controlo positivo, disposto como apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Disposição dos diferentes testes em microplaca de 96 poços.

	1 (Branco)	2 (Controlo)	3 (Amostra 1)	4 (Amostra 2)
A B C	200 μL solvente	10 μL solvente + 190 μL solução DPPH	10 μL amostra + 190 μL solução DPPH	...
E F G (Padrão)	1000 μM (10 μL Trolox + 190 μL DPPH)	750 μM	500 μM	...
H (Diluições)	300 μL Trolox	75 μL Trolox + 25 μL solvente

2.7. Determinação de compostos fenólicos por HPLC

Através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC do inglês: *High performance liquid chromatography*) é um método amplamente utilizado como ferramenta na análise, identificação e quantificação de compostos bioativos (Hayes et al., 2014).

As amostras foram analisadas por um cromatógrafo Shimadzu Nexpera X2 uHPLC equipado com detetor *Diode Array* (Shimadzu, SPD-M20A). A separação foi realizada numa coluna Aquity UPLC BEH C18 de fase reversa (2,1 mm × 100 mm, tamanho das partículas de 1,7 µm, de Waters) e uma pré-coluna do mesmo material a 40 °C. A taxa de fluxo foi de 0,4 mL/min. Os solventes de HPLC utilizados foram a água / ácido fórmico (0,1%) como solvente A e acetonitrilo como solvente B. O gradiente de eluição para o solvente B foi o seguinte: de 0,0 a 5,5 min eluente B a 5%, de 5,5 a 17 min um aumento linear para 60%, de 17,0 a 18,5 min, um aumento linear para 100%, então o equilíbrio da coluna de 18,5 a 30,0 min a 5%. Os compostos fenólicos foram identificados comparando os seus espectros de UV e tempos de retenção com os padrões correspondentes. Os compostos foram quantificados e identificados em diferentes comprimentos de onda.

O volume de injeção da amostra foi de 10 µL e a injeção foi realizada manualmente. O extrato de sementes foi dissolvido para metade utilizando o respetivo solvente água ou água + etanol. Todos os extratos foram filtrados através de filtros de *nylon* com o tamanho de poro de 0,45 µm antes de serem injetados no sistema de HPLC.

2.8. Análise estatística

Cada experiência foi repetida pelo menos três vezes. As médias e os desvios padrão dos dados foram calculados. As barras de erro em todas as figuras correspondem aos erros padrão.

3. Resultados e Discussão

3.1. Otimização das condições de extração

Sendo a extração um passo importante para a viabilidade do processo e muitos artigos evidenciam isso, têm sido descritas diferentes técnicas que manipulam algumas variáveis que influenciam diretamente ou indiretamente a sua eficiência como a concentração de etanol, o rácio sólido/líquido, o tempo de extração entre outras.

Em detrimento da otimização destas condições foram realizados ensaios de extração de fenólicos em semente moída e semente intacta.

3.1.1. Extração em semente moída

Tendo conhecimento que as sementes moídas expressariam melhores resultados e satisfazendo as metas iniciais de otimização optou-se assim por testar também o potencial máximo de toda a matriz. A partir da mesma quantidade de semente moída, fixando em 5 gramas para cada ensaio.

Ajustando a concentração de solvente como um parâmetro importante foram testadas três concentrações de etanol em água (30 %, 50 % e 70 %) e a sua ausência (0 %). Verificou-se uma resposta de acordo com as investigações efetuadas por Shi et al., (2003), nos ensaios realizados foram analisados os polifenóis totais nas referidas concentrações ao longo do tempo obtendo-se os dados que permitiram traçar o perfil da Figura 11. Os 30 % de etanol representam uma extração eficiente comparativamente a outras concentrações superiores. Verificou-se também a diminuição da extração na exposição a elevadas concentrações, isto pode-se dever a degradação de alguns compostos fenólicos.

A seleção do etanol como solvente orgânico deveu-se a sua capacidade em melhorar a solubilidade dos compostos bioativos quando misturado com água aumentando a solubilidade dos compostos bioativos quando comparado com a utilização de apenas água para extração (Nwuha, 2000).

Assim, nos resultados obtidos pode-se verificar que o rendimento da extração é inferior na ausência de etanol, apresentando metade da capacidade de extração comparativamente à condição ótima.

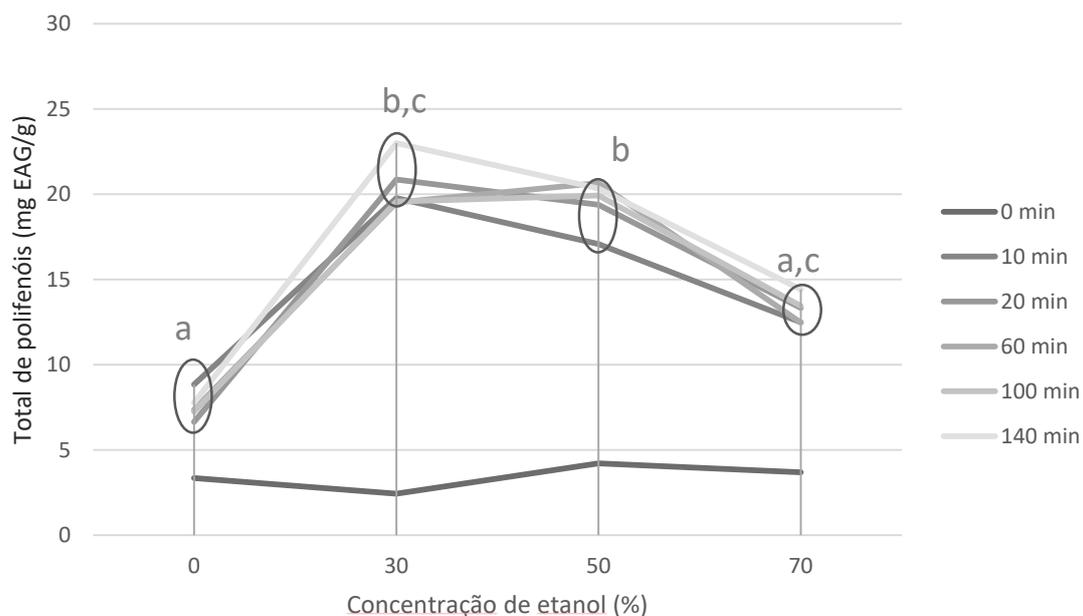


Figura 11. Concentração de etanol na extração de polifenóis em semente moída. a-b diferentes letras são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

O efeito do rácio sólido/líquido foi explorado após a otimização da concentração de etanol. Aplicando diferentes volumes (50, 100, 200 e 300 mL) de solução aquosa de etanol com concentração de 30 % para a mesma quantidade de semente, 5 g. Esta otimização foi efetuada durante o período de extração até as 24 h com recolha e análise em intervalos de tempo adequados as características da matriz.

Os resultados na Figura 12. indicam que temos maior estabilidade e rendimento com um volume igual ou superior a 200 mL. Contudo, os benefícios na utilização de maiores volumes não são significativos face a resposta e se tivermos em conta outros fatores do processo, como por exemplo a nível ambiental e económico. Assim para os futuros ensaios foi utilizado o volume de 200 mL para as extrações.

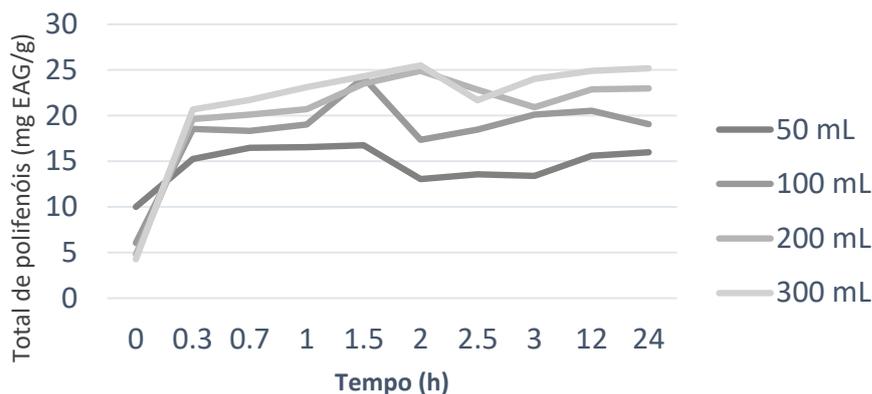


Figura 12. Curvas para o efeito do rácio sólido/liquido na extração de polifenóis a 30% de etanol em semente moída ao longo do tempo.

No seguimento desta análise é possível estabelecer as condições de extração ótimas a aplicar, que consistem em 5 g de sementes em contacto com 200 mL de solução de etanol com uma concentração de 30 % durante 20 min.

3.1.2. Extração em semente intacta

Nestes ensaios foi utilizada novamente a mesma quantidade de semente, 5 g. As sementes intactas representam algumas vantagens no processo, como, por exemplo, o menor consumo energético associado ao processo de moagem, simplificação do processo, manutenção e menor investimento inicial.

Assim, como na condição anterior, foram testadas três concentrações de solução aquosa de etanol (30 %, 50 % e 70 %) e a sua ausência (0 %).

Como se pode constatar na Figura 13. foi alcançado o máximo de extração em compostos fenólicos nos ensaios que continham uma solução 50 % de etanol, contudo a diferença para os resultados em 30 % de etanol não é significativa. Assim, podemos ajustar para um valor inferior, os 30 % que representam uma extração eficiente comparativamente a concentrações superiores em que o valor acrescentado não justifica os custos, além de que a percentagem é igual à extração em semente intacta o que permite comparações futuras. Verificou-se mais uma vez diminuição da extração na exposição a concentrações superiores a 50 %.

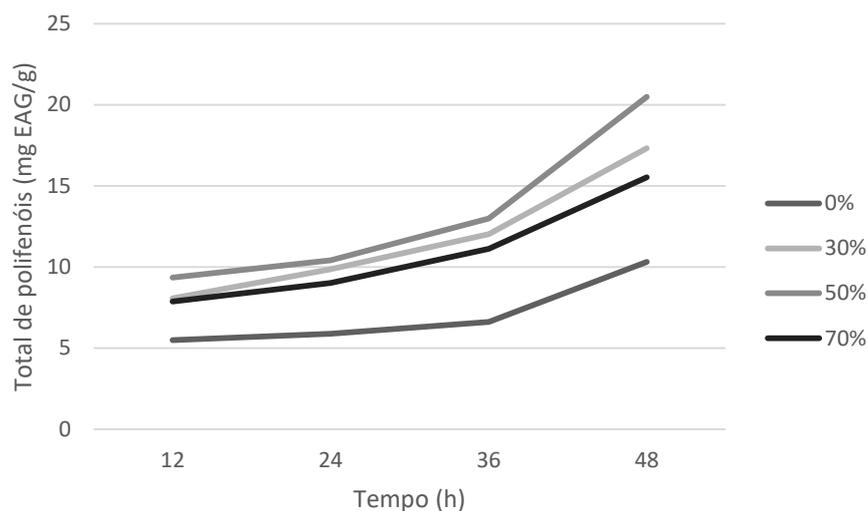


Figura 13. Efeito da concentração de etanol em água na extração total de polifenóis ao longo do tempo em semente intacta.

O efeito do rácio sólido/líquido foi testado nas mesmas condições anteriormente referidas para o efeito. Contudo são ajustados os tempos de extração adequados as características de difusão em semente intacta em que é necessário degradar e ultrapassarem as estruturas celulares presentes. Sendo a otimização efetuada durante o período de extração até 48 horas com recolha e análise em intervalos de tempo mais espaçados, com efeito visível.

Os resultados obtidos (Figura 14.) indicam que temos maior estabilidade e sucesso com um volume igual ou superior a 200 mL. Contudo os benefícios na utilização de maiores volumes não são significativos face a resposta.

No seguimento desta análise é possível estabelecer as condições de extração que permitem atingir um rendimento ótimo para sementes intactas, condições essas num rácio sólido líquido de 0,025 g/mL, que envolve 200 mL de solução aquosa de etanol com uma concentração de 30 % durante pelo menos 24 horas.

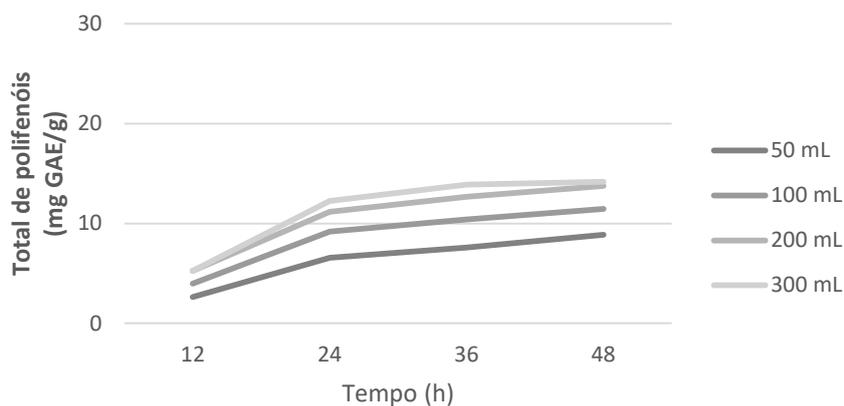


Figura 14. Efeito do rácio sólido/líquido na extração total de polifenóis em semente moída ao longo do tempo em solução aquosa de 30 % de etanol.

3.2. Tratamento térmico preliminar

De modo a testar a resposta do aquecimento óhmico face a tecnologias de aquecimento convencional foram definidas algumas condições a testar inicialmente para explorar o potencial desta tecnologia. Um teste simples e direto com o intuito de poder verificar os efeitos desta tecnologia seria o objetivo. Assim, definiu-se um tratamento agressivo com uma temperatura elevada próxima de 95 °C com a duração de 15 minutos para ambas as tecnologias (Figura 15.), utilizando nesta situação 10 g de sementes intactas em cada ensaio.

Sendo assim executadas três situações representadas por um controlo, ou seja a temperatura ambiente, tratamento pelo OH e tratamento através de uma placa de aquecimento. Nestes ensaios a placa de aquecimento representa uma tecnologia convencional. Posteriormente foi recolhido e analisado o conteúdo em polifenóis totais na fração da solução de NaCl adicionada para o tratamento da semente onde esta desempenha um papel fundamental na condução da corrente elétrica que por sua vez conduz energia térmica uniforme às sementes envolvidas.

Após este pré-tratamento a semente é imediatamente moída sendo colocada no solvente, nestes passos iniciais foi selecionada a água como solvente reduzindo assim o impacto ambiental sem prejudicar o resultado. Esta semente moída fica em extração durante 20 minutos num agitador orbital a temperatura ambiente estas condições minimizam a degradação dos compostos fenólicos. Após terminar este período procede-se a recolha e análise qual do conteúdo em polifenóis totais presentes.

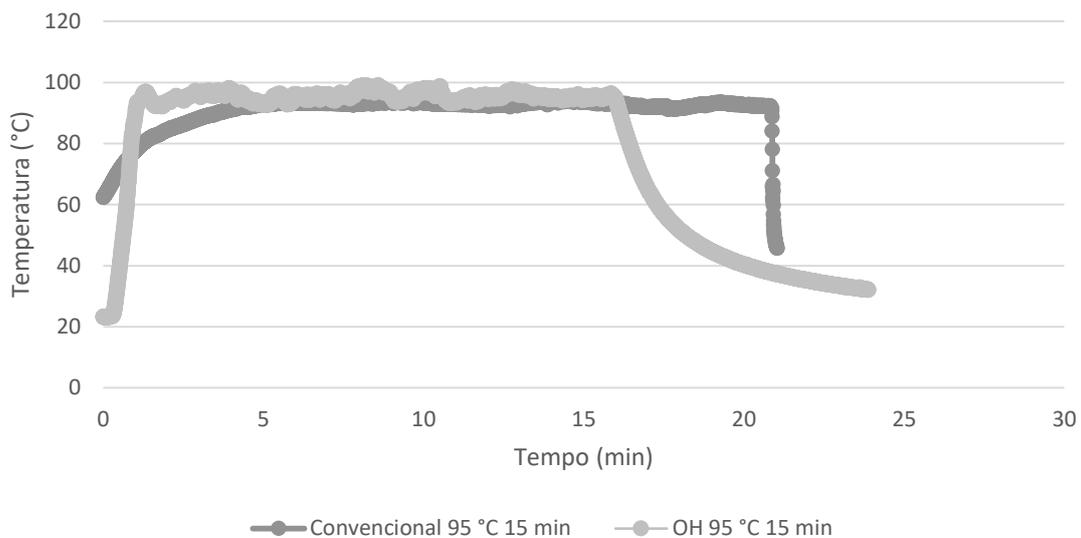


Figura 15. Evolução da temperatura em ambas as tecnologias ao longo do tratamento.

O pré-tratamento por aquecimento óhmico ou convencional potencia a extração de polifenóis considerando a extração em semente intacta mais extração da moída em comparação a situação de controlo (Figura 16.), este facto pode-se dever a degradação das estruturas celulares e a uma capacidade de estabilização da amostra no tratamento térmico. Também se verifica que a situação controlo expressa um aumento considerável na quantidade de polifenóis presente quando as sementes são moídas mesmo não tendo sido submetidas a um pré-tratamento. Pode-se concluir que a degradação da matriz através do processo mecânico de moagem expõe os polifenóis facilitando a difusão destes para a solução.

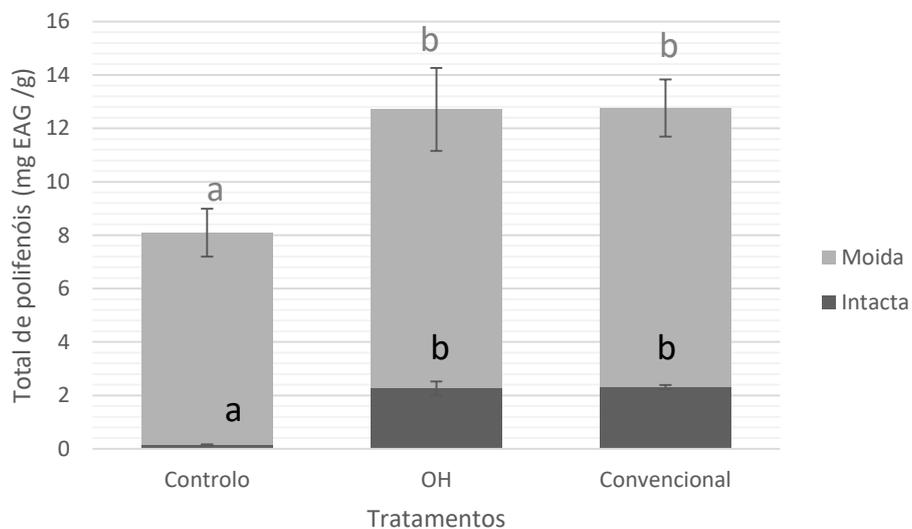


Figura 16. Efeito do tratamento na extração (50 mL de água) de polifenóis, antes da moagem (intacta) e após (moída).

3.3. O tempo de pré-tratamento afeta o processo de extração

Com o objetivo de alcançar o melhor resultado na fase de extração de polifenóis totais efetuaram-se inicialmente alguns ensaios térmicos com a presença de um pré-tratamento que visa suavizar os tecidos da semente e enfraquecer as interações fenólicos-proteína e fenólicos-polissacarídeos e assim migrarem mais polifenóis para o solvente (Shi et al., 2003).

No entanto, ao utilizar uma temperatura intermédia em semente intacta verificou-se que ocorre a extração de proteínas, no entanto, ao aumentarmos a temperatura estamos a degradar não só a estrutura celular representada por fibras para facilitar a migração dos compostos mas também são deterioradas as macromoléculas contidas na matriz. Assim, com base em métodos anteriormente testados por alguns autores em distintas situações experimentais com outras tecnologias, definiu-se uma temperatura de 95 °C para estes pré-tratamentos com o aquecimento óhmico. A temperatura estabelecida foi então cronometrado o tempo de tratamento desde os 0 segundos (um pico de térmico) até aos 15 minutos. Estes tratamentos foram efetuados na semente intacta. Posteriormente recolheu-se a solução do pré-tratamento onde foi quantificado o total de polifenóis. De seguida, a semente tratada é moída e transferida para a extração de 20 minutos no agitador orbital, sendo quantificado novamente o conteúdo em polifenóis.

Verificou-se assim que a exposição das sementes intactas sob temperaturas elevadas ao longo do tempo (Figura 17.) produz efeitos significativos na extração de polifenóis diretamente na semente intacta como potencia a extração no caso de esta ser moída. Contudo, no caso da semente ser moída verifica-se uma estabilização da quantidade extraída ao longo do tempo. Este comportamento pode-se dever a rápida difusão dos compostos colocados em suspensão. No entanto, se for considerada a soma da quantidade total extraída pelos dois passos verifica-se uma vantagem para o tratamento mais prolongado, nestes ensaios entre os 10 - 15 min.

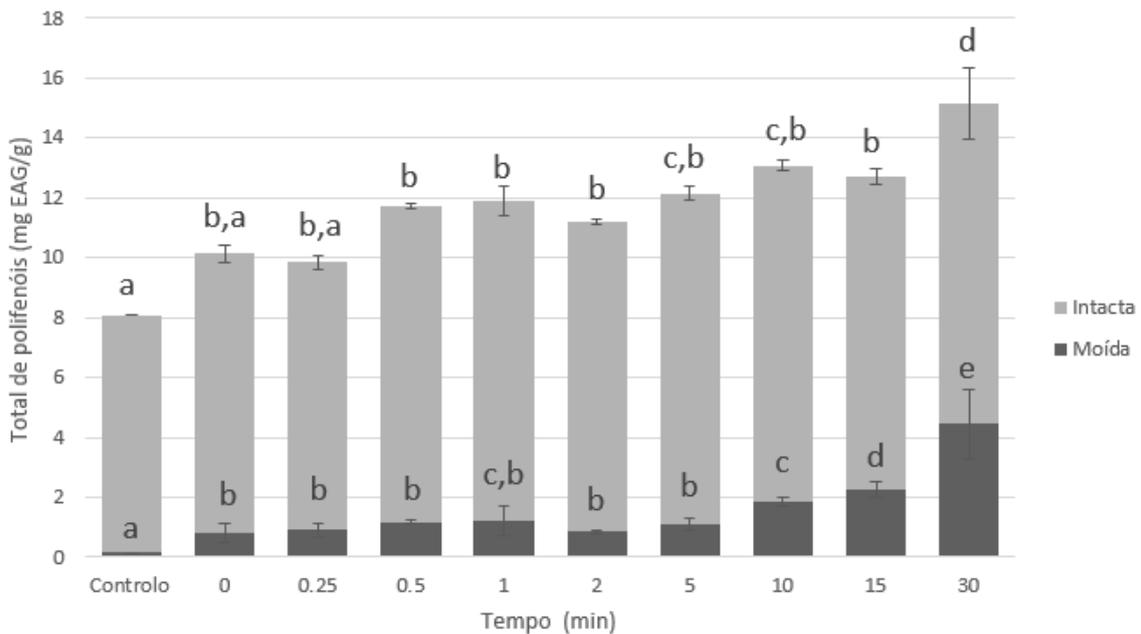


Figura 17. Efeito do tempo de pré-tratamento aplicado a semente intacta e posterior reflexo na extração em semente moída.

3.4. Tratamentos térmicos padrão (binómios tempo/temperatura em semente intacta e moída)

Tendo em conta a aplicação das propriedades presentes nas sementes como aditivo/conservante em alguns produtos alimentares, procedeu-se a simulação das condições utilizadas na indústria alimentar aplicadas como um pré-tratamento neste estudo.

Foram selecionados cinco tratamentos térmicos que envolveram um aumento de temperatura para simular as condições utilizadas na indústria alimentar por diferentes técnicas na criação, transformação e/ou método de preservar esse produto, através da pasteurização ou esterilização. As condições utilizadas foram as seguintes.

- Pasteurização a baixa temperatura e tempo prolongado (LTLT – *low-temperature long-time*) As amostras foram mantidas em banho-maria até aos 65 ± 2 °C durante 30 min, e depois colocaram-se em gelo .
- Pasteurização a alta temperatura e tempo curto (HTST – *high-temperature short-time*) As amostras foram mantidas em banho-maria até aos 75 ± 1 °C durante 20 s, de seguida colocaram-se em gelo.
- Cozinhar (*Cooking*) As amostras foram mantidas em banho-maria até atingir 93 ± 2 °C durante 30 min.

- Esterilização As amostras foram esterilizadas numa autoclave sob pressão com água a 120 °C durante 20 min.

Os tratamentos foram aplicados em semente moída e intacta sendo aplicado a tecnologia de aquecimento óhmico em todos os testes exceto no tratamento 120 °C 20 min realizado em frascos de vidro colocados numa autoclave. Após este passo as sementes são colocadas em 200 mL de solução aquosa com 30 % de etanol para extração, no caso das sementes moídas acresce o passo de moagem (nas condições previamente definidas) sendo determinado aos 20 min e 24 h de extração o total de polifenóis.

Na semente moída verificou-se uma evolução significativa após 24 h de extração, entre os tratamentos. Os 95 °C durante 30 min foi a condição que potenciou as condições necessárias para uma extração de maiores quantidades de polifenóis (Figura 18.). Este resultado pode-se dever a estabilização da amostra. Em contrapartida a amostra submetida a temperaturas mais elevadas e com exposição prolongada promove a degradação da mesma como se verifica no processo de esterilização. Tratamentos mais rápidos produzem efeitos não significativos para a extração de polifenóis, no entanto verifica-se em comparação com o controlo que as amostras que passaram pelo processo de aquecimento demonstram uma evolução positiva as 24 h de extração facto possivelmente relacionado com os efeitos de estabilização.

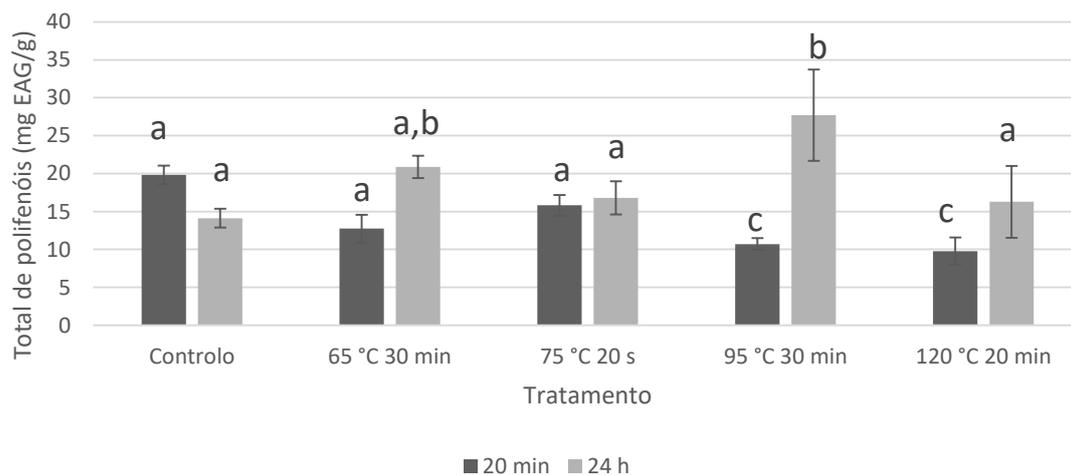


Figura 18. Diferentes condições de pré-tratamento aplicadas a semente moída (20 min e 24 h de extração).

Na semente intacta os resultados seguiram a mesma tendência da condição em que a semente é moída. Contudo destaca-se a esterilização que apresentou resultados

acima da média (Figura 19.). Existem dois fatores que potenciaram este resultado (estado da semente e tempo), devido à morfologia das sementes estas ao estarem intactas o seu conteúdo em polifenóis e outros compostos estão aprisionados, o que se traduz num menor contacto com o exterior podendo estar menos suscetíveis as temperaturas mais elevadas, que por outro lado fragilizam as paredes celulares facilitando a difusão dos compostos melhorando assim a extração. Outro fator que contribui para o aparente sucesso prende-se com as limitações de manipulação de uma autoclave, demora a atingir a temperatura desejada e após atingir o programado prolonga-se com temperatura elevada durante um intervalo de tempo muito maior do que o pretendido (Figura 20.). Pelo facto de não dar resposta aos objetivos estabelecidos esta condição não poderá ser considerada.

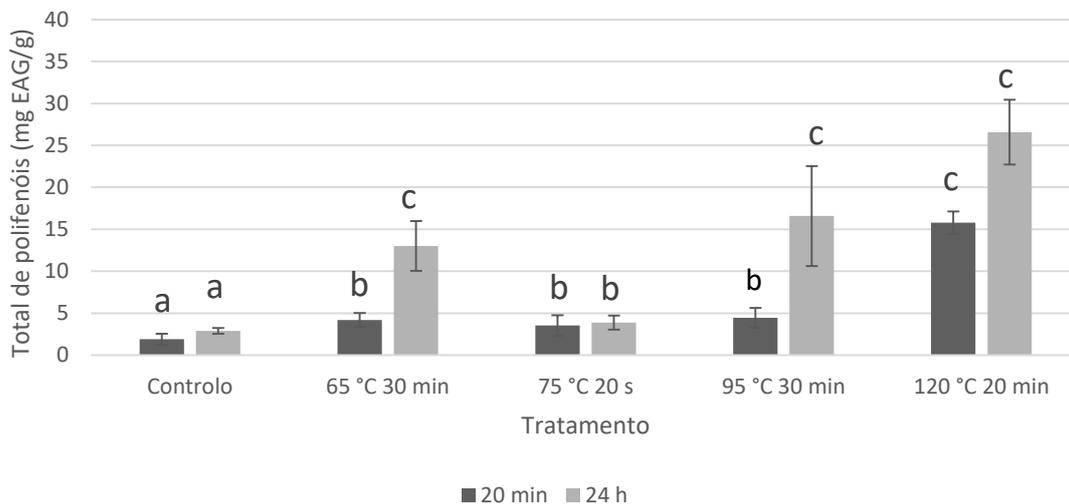


Figura 19. Resultado das diferentes condições de pré-tratamento aplicadas a semente intacta (20 min e 24h de extração).

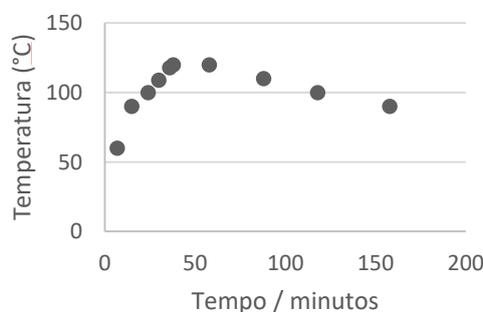


Figura 20. Evolução da temperatura em esterilização (autoclave).

De modo a verificar qual das condições de tratamento oferece um melhor desempenho procedeu-se a determinação de compostos fenólicos por uHPLC. Os resultados da determinação apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Resultados da análise HPLC dos diferentes tratamentos.

Compostos fenólicos (mg/L)	Semente moída				Semente intacta			
	Controlo	65 °C 30 min	75 °C 20 s	95 °C 30 min	Controlo	65 °C 30 min	75 °C 20 s	95 °C 30 min
catequina	16,8	24,0	23,7	33,8	5,0	16,3	12,3	41,2
ácido gálico	1,6	1,7	1,6	1,7	nd ^a	2,3	1,5	1,8
ácido p-cumárico+epicatequina	2,7	3,1	3,0	3,2	1,6	2,5	2,4	4,1
ácido o-cumárico	1,4	1,3	1,3	1,3	nd ^a	nd ^a	nd ^a	1,5
ácido elágico	nd ^a	3,2	4,7	2,3	nd ^a	nd ^a	nd ^a	13,4
naringenina	nd ^a	1,4						
rutina	nd ^a	2,3	2,2	2,3	2,2	nd ^a	2,2	3,0
Total	22,5	35,7	36,5	44,7	8,8	21,1	18,3	66,3

^a Não detetado

No caso do total para cada ensaio verifica-se desde logo que a melhor reposta a nível de quantidade extraída de compostos fenólicos foi atingida na condição de semente intacta no tratamento 95 °C durante 30 min (66,3 mg/L), além do mais demonstra maior diversidade de compostos, alguns deles em quantidades bem superiores. No caso de a semente ser moída obtem-se quantidades superiores comparativamente a semente intacta submetidas a tratamentos menos agressivos, o mesmo acontece no caso do controlo. Os composto principal detetado foi a catequina, em todos os tratamentos. Estes resultados coincidem com o reportado por outros autores (Kennedy et al., 2000).

3.5. Extração em água

A extração em água representa inúmeras vantagens assim é importante verificar a viabilidade desta condição inserida nos objetivos do trabalho. Com esse intuito a

semente intacta foi sujeita a um pré-tratamento de 95 °C com duração de 30 minutos condição essa que já apresentou bons resultados. Após este passo foram submetidas a extração no rácio sólido/líquido definido em água destilada, o intervalo de tempo de extração foi ajustado conforme a condição da semente abrindo-se exceccionalmente a janela de tempo desde o momento em que se coloca a semente ou seja 0 min para a semente moída até as 72 horas no caso da semente intacta.

Em semente intacta a quantidade de compostos extraídos tende a aumentar até as 72 horas nas diferentes condições de tratamento (Figura 21.). Neste caso verifica-se que o controlo segue a mesma tendência o que nos indica que existem variáveis desconhecidas associadas possivelmente com a degradação dos compostos fenólicos e a sua interação. Também é perceptível que o aquecimento óhmico produz um ligeiro ganho em relação ao convencional, no entanto as diferenças não são significativas.

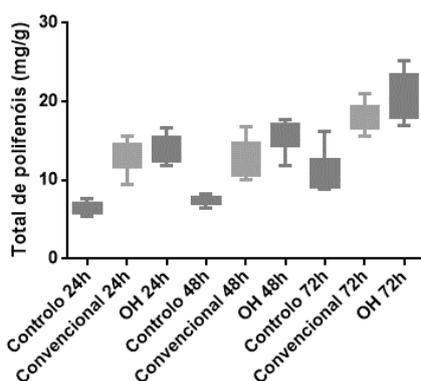


Figura 21. Efeito do tempo e tecnologia na extração de polifenóis em semente intacta utilizando água.

Em semente moída a tendência inverte-se tendendo o total de polifenóis a diminuir demonstrando uma oscilação no tratamento convencional e diminuição com estabilização no caso do pré tratamento com aquecimento óhmico (Figura 22.). Verifica-se também a diminuição do total de polifenóis no caso do controlo, dado que as condições são iguais ao ensaio anterior exceto o estado da semente, pode-se aqui afirmar que o conteúdo quando está todo fora da matriz celular interage entre si degradando-se ou “mascarando” os polifenóis contidos.

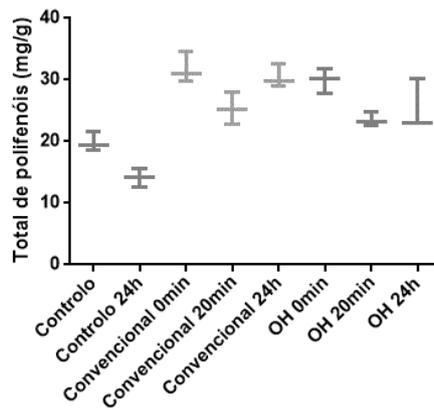


Figura 22. Efeito do tempo e tecnologia na extração de polifenóis em semente moída utilizando água.

3.6. As tecnologias no tratamento

3.6.1. Influência do campo elétrico

Com o objetivo de explorar o efeito do campo elétrico no aquecimento óhmico, foi necessário criar condições que permitissem estabelecer campos elétricos distintos, um campo elétrico elevado onde a condutividade do meio que contem as sementes é baixa devido a dificuldade da passagem da corrente elétrica, consequentemente é necessário aumentar o campo elétrico para atingir a mesma temperatura que a condição oposta, ou seja um campo elétrico baixo em que a condutividade do meio que rodeia as sementes é elevada, pelo que é facilitada a passagem da corrente elétrica pela diminuição da resistência elétrica do meio atingindo rapidamente e de forma equivalente a temperatura desejada no tratamento das sementes.

Nestes ensaios foram novamente utilizadas porções de 5 g de semente, transferidas para o reator óhmico e adicionado então o meio de condução elétrica previamente preparado, neste caso duas soluções salinas com condutividades de 5 ms/cm e 40 ms/cm, que geram um campo elétrico elevado e baixo respetivamente.

De forma a testar novamente as capacidades da água como solvente, serão efetuados ensaios com extração em água e de forma a atingir desempenhos superiores foram também efetuados ensaios com a fase de extração em solução de aquosa de etanol a 30 %.

Extração em água

Os efeitos do campo elétrico no pré-tratamento na extração em água são significativos após 24 horas de extração com um incremento da % de extração de fenólicos superior no caso do campo elétrico baixo (90 V/cm) (Figura 23.). Contudo, este efeito anula-se às 48 horas de extração o que permite concluir que um campo elétrico elevado tem um maior impacto na matriz conseguindo-se obter maior quantidade em menor tempo de extração. Assim, após 48 horas verifica-se uma diminuição no incremento de 90 V/cm em que grande parte do conteúdo já foi extraído.

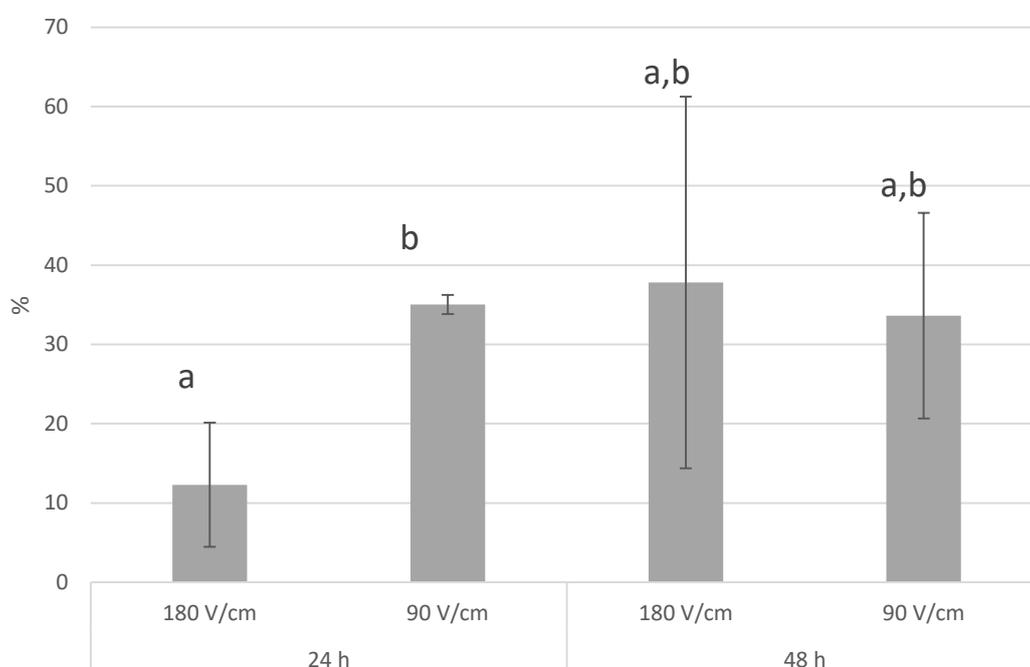


Figura 23. Incremento da % de extração de fenólicos (em comparação com extração convencional) com utilização de campos elétricos no tratamento das sementes e posterior extração em água.

A determinação de compostos fenólicos por uHPLC para as extrações efetuadas em água não revelou diferenças significativas quer entre tratamentos ou mesmo entre os diferentes campos elétricos para a maioria dos compostos (Figura 24.). Contudo, a catequina, o composto dominante nas amostras apresenta ser uma exceção verificando-se que os tratamentos térmicos promovem a sua extração.

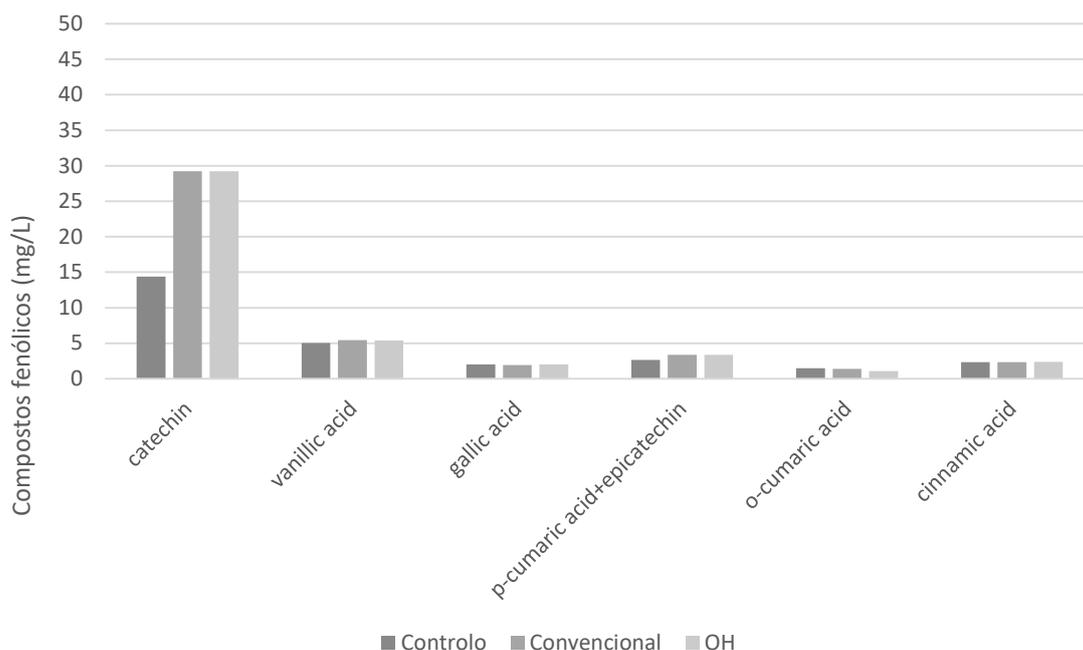


Figura 24. Compostos fenólicos presentes nas diferentes condições de tratamento e posterior extração em água.

Extração em etanol

Os efeitos do campo elétrico no pré-tratamento na extração em etanol não são significativos após 24 e 48 horas de extração (Figura 25.). No caso das 24 horas verifica-se um incremento da percentagem de extração de fenólicos contudo, não se verifica efeito do campo elétrico, provavelmente o resultado foi diluído pelo maior poder de extração deste solvente. Como estamos também a comparar estes resultados com uma espécie de controlo (ausência do campo elétrico) constituído pelo tratamento por aquecimento convencional fornecido pela placa de aquecimento verificamos que após 48 horas o incremento da percentagem de extração de fenólicos passa a negativo, isto indica-nos que o método convencional ultrapassou apenas as 48 horas de extração o efeito do tratamento óhmico. Aqui apesar de não se distinguir o efeito do campo elétrico mais elevado ou inferior, verifica-se a sua ação numa extração mais rápida.

Além do mais, os compostos deveriam estar presentes após as 48 horas nas extrações provenientes de semente tratada no óhmico a diminuição sugere que estes compostos podem-se ter degradado prematuramente especialmente no caso da extração em etanol.

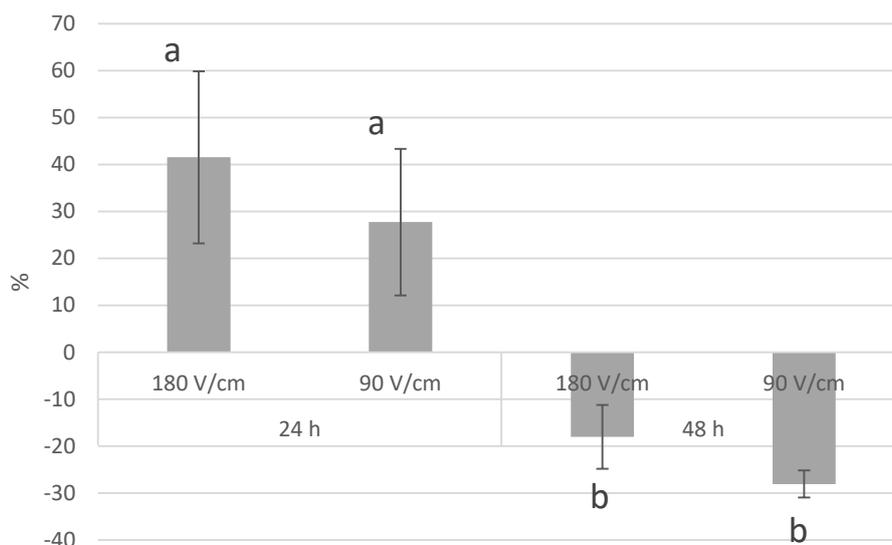


Figura 25. Incremento da % de extração de fenólicos (em comparação com extração convencional) com utilização de campos elétricos no tratamento das sementes e posterior extração em etanol

A determinação de compostos fenólicos por uHPLC para as extrações efetuadas em etanol não revelou diferenças significativas quer entre tratamentos ou mesmo entre os diferentes campos elétricos para a maioria dos compostos (Figura 26.). Contudo, a catequina, o composto dominante nas amostras apresenta ser mais uma vez exceção verificando-se que os tratamentos térmicos promovem a sua extração.

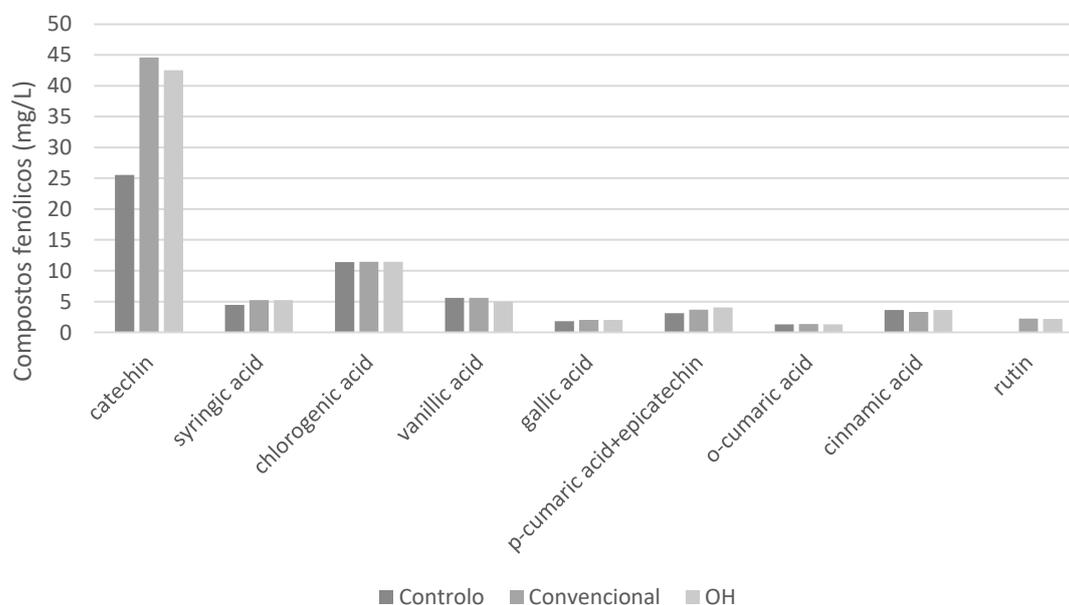


Figura 26. Compostos fenólicos presentes nas diferentes condições de tratamento e posterior extração em 30% etanol.

3.6.2. Influência do campo elétrico na atividade antioxidante

É detetada atividade antioxidante nas diferentes soluções resultantes da extração. Contudo, a atividade antioxidante das amostras obtidas dos tratamentos com campos elétricos distintos e tipos de solvente de extração não apresentam diferenças significativas detetáveis pelo método ABTS (Figura 27.).

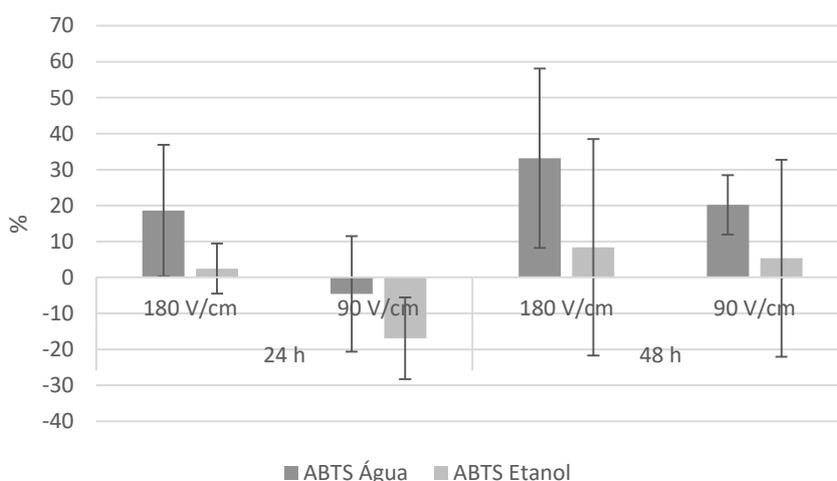


Figura 27. Incremento da % de extração de fenólicos (em comparação com extração convencional) com utilização de campos elétricos no tratamento das sementes e posterior extração em água e etanol na atividade antioxidante determinada pelo método ABTS.

Nos resultados do método DPPH já se verifica uma atividade antioxidante predominante na extração com etanol e em pré-tratamento com campo elétrico de 90 V/cm em ambos os tempos de extração aumentando visivelmente as 48 horas (Figura 28.).

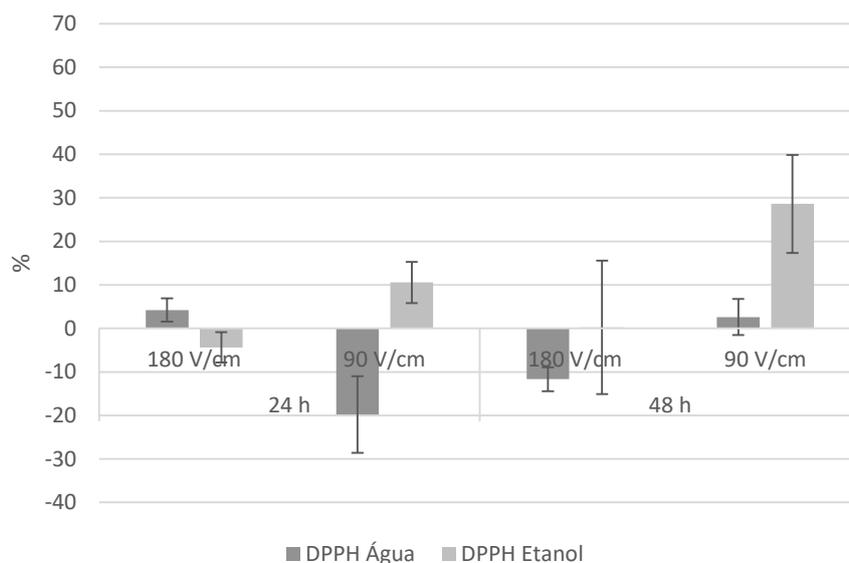


Figura 28. Incremento da % de extração de fenólicos (em comparação com extração convencional) com utilização de campos elétricos no tratamento das sementes e posterior extração em água e etanol na atividade antioxidante determinada pelo método DPPH.

Não ocorre sobreposição dos resultados de ambos os métodos possivelmente pela fração de compostos que cada um deles testa ser distinta.

3.6.3. Eficiência energética

O consumo energético do processo de tratamento representa a nível industrial e ambiental grande importância. A tecnologia de aquecimento óhmico apresenta uma elevada eficiência no processo, contudo, é possível aumentar e com este intuito de otimizar o tratamento, foi monitorizado o consumo de energia (utilizando o equipamento OWL CM 160 para registar a potencia instantânea) para a manutenção da temperatura de 95 °C em ambas as tecnologias. No caso da placa de aquecimento obteve-se uma média de 855 W quando a resistência elétrica está ativa (Figura 29.), no caso do sistema óhmico o consumo médio foi de 200 W (Figura 30.). Nos dois valores não foi considerada a energia dissipada pelo sistema, contudo o aquecimento óhmico consome um quarto da energia utilizada pelo sistema convencional expectando-se também neste equipamento menor energia dissipada.

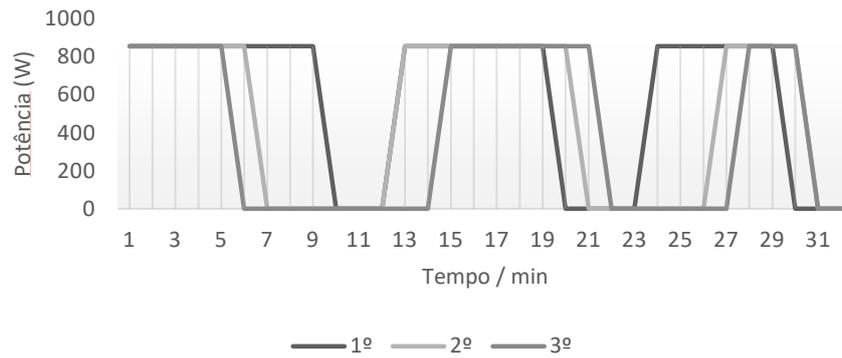


Figura 29. Perfil da potência utilizada pelo sistema de aquecimento convencional ao longo do tempo em três ensaios.

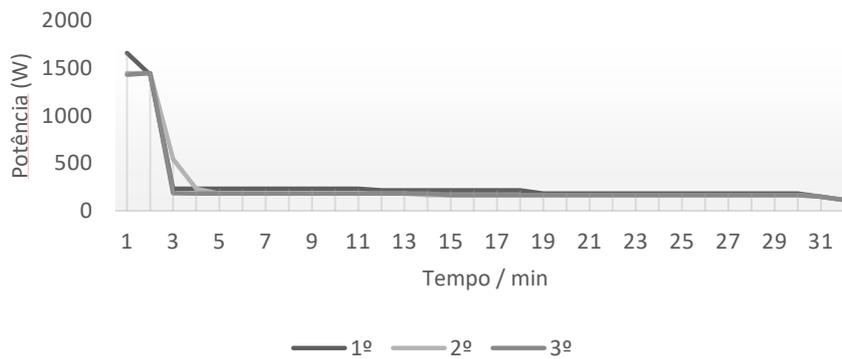


Figura 30. Perfil da potência utilizada pelo sistema de aquecimento ôhmico ao longo do tempo em três ensaios.

Dado que o aquecimento ôhmico é mais rápido comparativamente com sistemas convencionais transporta-se para os primeiros minutos desta situação uma grande fatia da exigência energética (Figura 29.), após esta fase a manutenção da temperatura representa uma pequena fração da potência até então consumida.

Verifica-se assim, que a energia utilizada para o tratamento de 5 g de semente pelo equipamento ôhmico é de aproximadamente metade do valor utilizado pelo aquecimento convencional (Figura 31.).

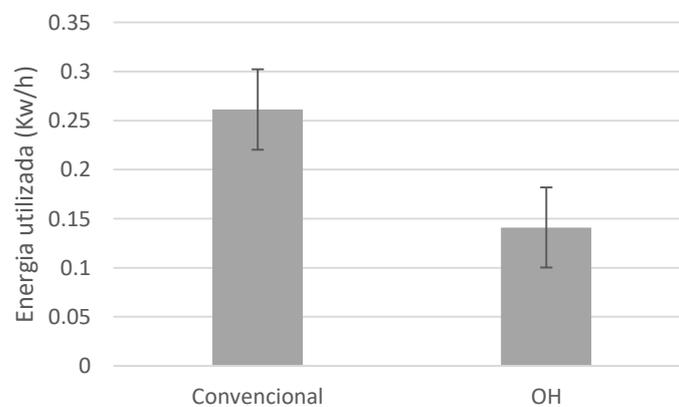


Figura 31. Energia utilizada pelo sistema de aquecimento convencional e sistema ôhmico no tratamento das sementes na condição definida (95 °C 30 min).

3.7. Extração do conteúdo proteico

Com o objetivo de rentabilizar a extração de polifenóis, pode ser interessante explorar a extração do conteúdo proteico em simultâneo. Como já foi descrito existem fortes interações entre ambos os conteúdos proteico e fenólico. Procedeu-se assim a elaboração de um processo que permitisse extrair também proteínas das sementes de forma a rentabilizar o processo de extração de fenólicos e desta forma aproveitar a diminuir o consumo energético do pré-tratamento descrito anteriormente. Da semente intacta submetida previamente ao pré-tratamento e já com a extração de 48 horas direcionada ao conteúdo em polifenóis concluída mediu-se a quantidade de proteína. Dado que o conteúdo proteico está maioritariamente contido no interior da semente, foi adicionado um passo de moagem desta semente colocando-se posteriormente a extrair em água. Após aplicação um intervalo de 24 a 48 horas que garantisse uma extração efetiva, foi então medido a presença de proteína.

De acordo com os resultados obtidos verificou-se um efeito negativo dos tratamentos térmicos na quantidade de proteína detetável (Figura 32.). A exposição térmica do conteúdo proteico a temperaturas elevadas leva a degradação das proteínas e possivelmente o facto de existirem na solução outras moléculas como proteases ao ser aplicado um tempo de extração prolongado a quantidade tende a diminuir ainda mais. No entanto é visível que a quantidade de proteína apresentada pelo controlo é elevada, resultado que comprova o potencial conteúdo em proteína nestas sementes.

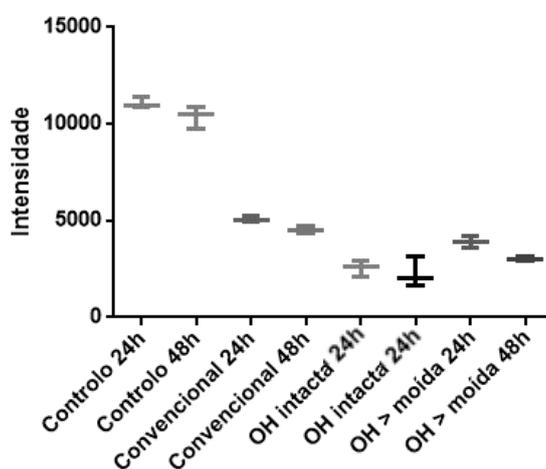


Figura 32. Intensidade de proteína extraída após os diferentes tratamentos.

Com o objetivo de melhorar a extração de proteínas foi aplicada uma nova abordagem (Figura 33.) onde se ajustam as condições de tratamento da semente que representam ser um fator chave. Tirando partido das potencialidades do aquecimento ôhmico foi aplicado um tratamento através de picos/pulsos de 100 °C de temperatura. Assim, definiu-se aplicar um tratamento de um pico (p100) (Figura 34.) e outro ensaio em que se testa um tratamento com dois picos (pp100). Após estes tratamentos aplicou-se uma extração em 200 mL de água até as 48 h de onde se quantificaram o total de polifenóis e intensidade de proteínas. As sementes intactas até então utilizadas passam por um passo de moagem e são colocadas novamente em extração em 200 mL de água durante 24 h. Após este período é novamente medido o conteúdo de ambos os compostos.

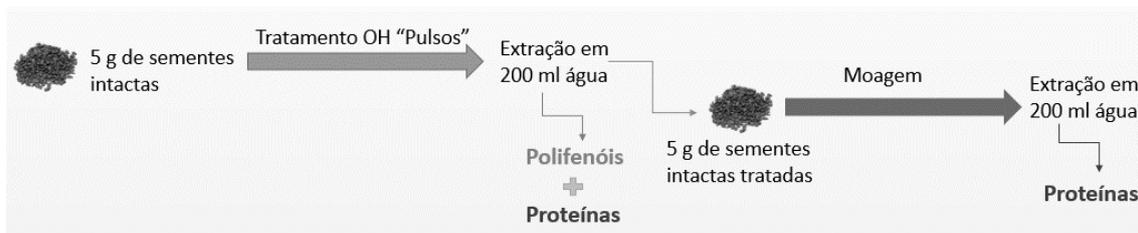


Figura 33. Processo aplicado as sementes para obtenção em simultâneo de polifenóis e proteínas.

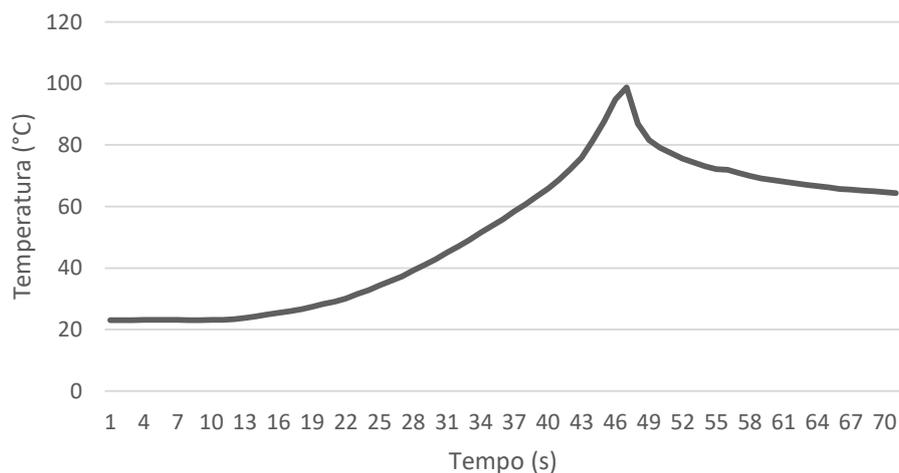


Figura 34. Exemplo de um pico de 100 °C aplicado nos tratamentos da semente intacta no equipamento ôhmico.

O total de polifenóis obtido por estes tratamentos apresenta uma boa resposta dos tratamentos p100 e pp100 aplicados, quando comparados a um tratamento mais dispendioso e moroso como é o caso da condição de aquecimento óhmico a 95 °C 30 min, não se verificando diferenças significativas quer após extração de 24 horas quer após extração de 48 horas em semente intacta (Figura 35.). Depois de a semente ser moída é efetuada a re-extração, no entanto ainda se consegue extrair quantidades significativas, se considerarmos a soma da primeira extração e segunda extração obtemos perto do dobro da quantidade extraída potenciada por um pré-tratamento mais longo.

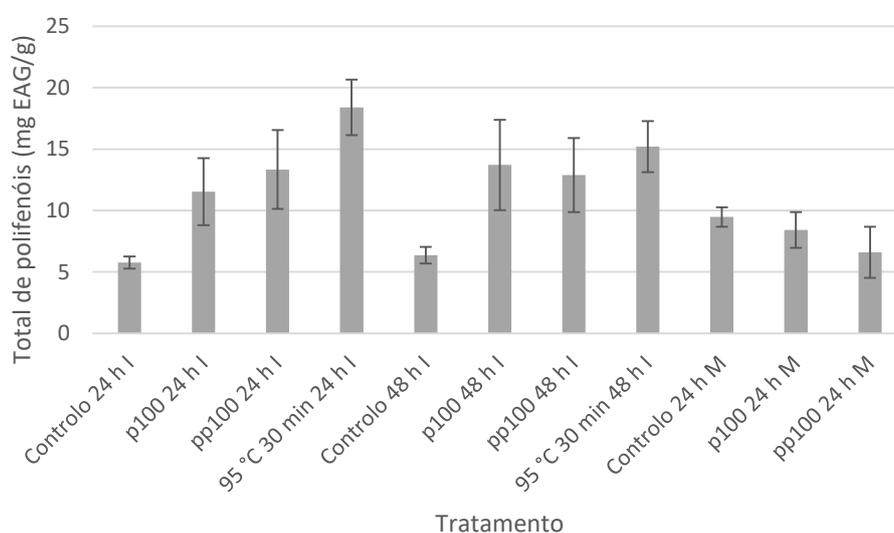


Figura 35. Total de polifenóis extraído pelo efeito do respetivo tratamento em semente intacta (I). Re-extração em semente moída (M) através da moagem da semente intacta previamente tratada.

Nos resultados da determinação por HPLC (Figura 36.), verifica-se a mesma tendência, contudo perdem-se alguns compostos na segunda extração destinada a recolha de proteína, possivelmente já foram extraídos na primeira. Entre os tratamentos mais rápidos, p100 e pp100 não apresentam o composto ácido gálico e ácido cinâmico. A catequina continua a ser o composto dominante.

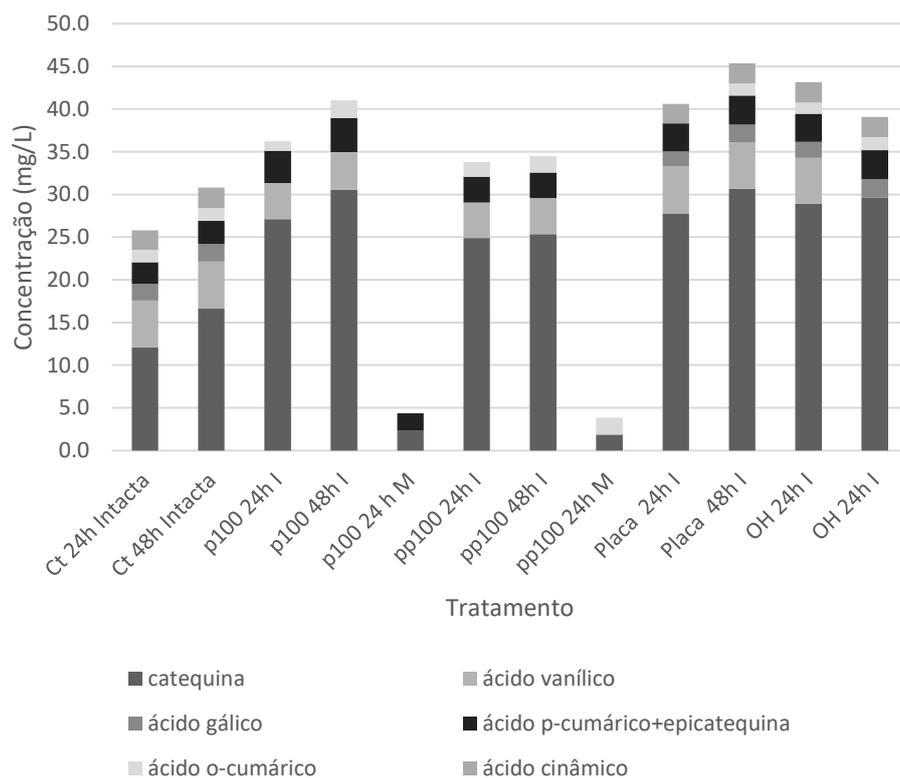


Figura 36. Resultados da análise HPLC dos diferentes tratamentos.

No caso da extração de proteína, os tratamentos térmicos diminuem a quantidade de proteína detetável, provavelmente deve-se a sua degradação. Ficando os resultados destes tratamentos térmicos muito longe das quantidades que se conseguem obter no controlo especialmente na semente moída (Figura 37.). No entanto como o objetivo não é extrair apenas proteínas poderá ser viável a utilização do pré tratamento p100 para na primeira fase de extração recuperar uma quantidade razoável de proteína e nas duas condições a extração simultânea de fenólicos.

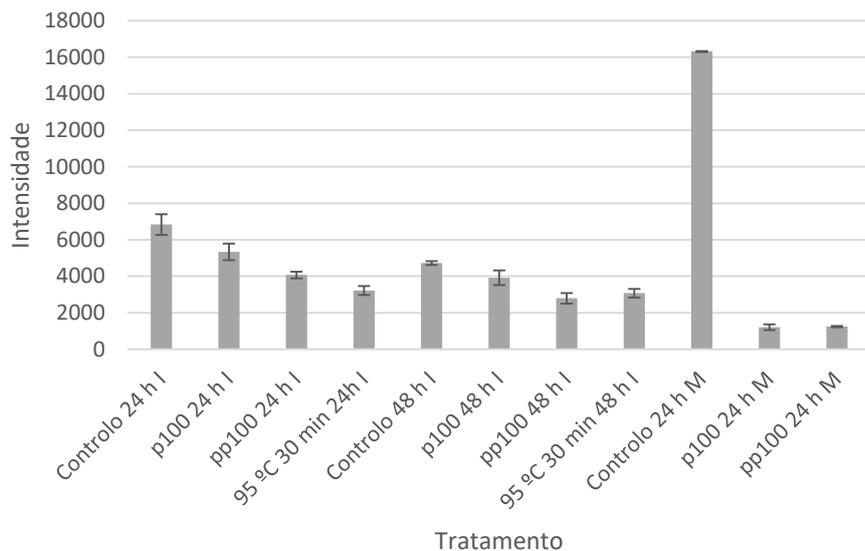


Figura 37. Quantidade de proteína extraída pelo efeito do respetivo tratamento em semente intacta (I). Re-extração em semente moída (M).

Assim, podemos considerar o tratamento por picos p100 como o mais adequado na extração simultânea para além que representa um processo rápido e extremamente eficiente.

4. Conclusões e perspectivas futuras

Os resultados obtidos neste estudo mostram que a extração de compostos fenólicos das sementes de uva a temperaturas elevadas, como é o caso do tratamento térmico realizado sob a aplicação de um pré-tratamento sob a condição 95 °C 30 min em semente intacta apresenta uma boa resposta, essencialmente a nível da sua constituição em compostos, quantificados por HPLC. Este tipo de tratamento mais agressivo torna estas substâncias mais acessíveis contidas na região superficial da semente melhorando o processo de difusão para a superfície e posteriormente para o meio de extração, além do mais a extração torna-se mais rápida e eficaz mesmo com a utilização de água como solvente, podendo-se considerar que existe uma estabilização da amostra evitando assim a sua degradação ou até contaminação. As castas de uvas brancas podem, portanto, ser consideradas como uma fonte de fenóis não-antociânicos para utilização como compostos antioxidantes naturais que representam uma crescente importância industrial. Ao estarmos a utilizar as sementes de variedades brancas não comprometemos a aplicação destes resultados a sementes de variedades tintas que apresentam uma composição qualitativa e quantitativa muito parecida à das variedades de uvas brancas em termos de polifenóis exceto a nível das antocianinas, facto descrito por Montalegre et al., (2006). Este estudo também indica que a semente de uva, mais precisamente da variedade Alvarinho, é uma boa fonte de compostos importantes.

De acordo com estudos anteriores (Jayaprakasha et al., 2001), os resultados apresentados vão ao seu encontro permitindo concluir que as sementes de uva têm geralmente conteúdo fenólico muito elevado, tornando a sua utilização mais uma vez viável, permitindo apoiar a produção agrícola e torna-la mais sustentável.

A tecnologia de aquecimento óhmico apresenta maior eficiência energética face aos sistemas convencionais, permitindo obter no pior dos casos os mesmos rendimentos de extração. A interação entre campo elétrico e compostos fenólicos necessita de ser melhor elucidada.

A principal vantagem do pré-tratamento utilizando o aquecimento óhmico versus pré-tratamento convencional e moagem explica-se essencialmente pela eficiência energética e rapidez no tratamento diminuindo os riscos de degradação dos compostos. A fase de pós tratamento assinalada pela difusão dos compostos tem

também a sua importância para o sucesso de todo o processo devendo as condições serem devidamente otimizadas evitando o desperdício de recursos.

A extração de proteína aliada a de polifenóis após tratamento óhmico é possível e aumenta o rendimento do processo.

5. Bibliografia

- Adil, İ. H., Çetin, H. İ., Yener, M. E., & Bayındırlı, A. (2007). Subcritical (carbon dioxide + ethanol) extraction of polyphenols from apple and peach pomaces, and determination of the antioxidant activities of the extracts. *The Journal of Supercritical Fluids*, 43(1), 55–63.
- Adámez, J. D., Samino, E. G., Sánchez, E. V., & González-Gómez, D. (2012). In vitro estimation of the antibacterial activity and antioxidant capacity of aqueous extracts from grape-seeds (*Vitis vinifera* L.). *Food Control*, 24, 136–141.
- Alupului, A., Calinescu, I., & Lavric, V. (2012). Microwave extraction of active principles from medicinal plants. *U.P.B. Sci. Bull., Series B*, 74(2), 129–142.
- Al-Awwadi, N. A., Araiz, C., Bornet, A., Delbosc, S., Cristol, J. P., Linck, N., ... & Cros, G. (2005). Extracts enriched in different polyphenolic families normalize increased cardiac NADPH oxidase expression while having differential effects on insulin resistance, hypertension, and cardiac hypertrophy in high-fructose-fed rats. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(1), 151-157.
- Anđelković, M. Z., Milenković-Andjelković, A. S., Radovanović, B., & Radovanović, A. (2014). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenols from seeds of grape pomace. *Acta Chimica Slovenica*, 61(4), 858-865.
- Bail, S., Stuebiger, G., Krist, S., Unterweger, H., & Buchbauer, G. (2008). Characterisation of various grape seed oils by volatile compounds, triacylglycerol composition, total phenols. *Food Chemistry*, 108, 1122–1132.
- Baderschneider, B., & Winterhalter, P. (2001). Isolation and characterization of novel benzoates, cinnamates, flavonoids, and lignans from Riesling wine and screening for antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6), 2788-2798.
- Banco de Dados Estatísticos da FAO, <http://www.fao.org>.
- Barba, F. J., Terefe, N. S., Buckow, R., Knorr, D., & Orlie, V. (2015). New opportunities and perspectives of high pressure treatment to improve health and safety attributes of foods. A review. *Food Research International*, 77(4), 725–742.
- Balasa, A., Toepfl, S., & Knorr, D. (2006). Pulsed electric field treatment of grapes. Food factory of the future 3, Gothenburg, Sweden. In *Food Factory of the Future 3*, Gothenburg, Sweden.
- Barbosa-Cánovas, G. V., Pierson, M. D., Zhang, Q. H., & Schaffner D.W. (2000). Pulsed electric fields. *Journal of Food Science*, 65(S8), 65-79.
- Baydar, N. G., & Özkan, G. (2006). Tocopherol contents of some Turkish wine by-products. *European Food Research and Technology*, 223(2), 290-293.

Bourzeix, M. (1986). Etude des catéchines et des procyanidols de la grappe de raisin, du vin et d'autres dérivés de la vigne. *Bull. OIV*, 669, 1171-1254.

Boussetta, N. (2010). Intensification of polyphenols extraction by electrotechnologies for the valorization of grape pomace (Intensification de l'extraction des polyphénols par électrotechnologies pour la valorisation des marcs de Champagne) (p. 249) Compiègne: University of Technology of Compiègne.

Boussetta, N., Vorobiev, E., Reess, T., De Ferron, A., Pecastaing, L., Ruscassié, R., & Lanoisellé, J.-L. (2012). Scale-up of high voltage electrical discharges for polyphenols extraction from grape pomace: Effect of the dynamic shock waves. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 16, 129–136.

Boussetta, N., Turk, M., De Taeye, C., Larondelle, Y., Lanoisellé, J. L., & Vorobiev, E. (2013). Effect of high voltage electrical discharges, heating and ethanol concentration on the extraction of total polyphenols and lignans from flaxseed cake. *Industrial Crops and Products*, 49, 690–696.

Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.

Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (1998). Characterization of dietary fiber and the in vitro indigestible fraction of grape pomace. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49(2), 135-141.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.

Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Jakobek, L., & Šeruga, M. (2009). Influence of solvent and temperature on extraction of phenolic compounds from grape seed, antioxidant activity and colour of extract. *International journal of food science & technology*, 44(12), 2394-2401.

Buchs, J., Maier, U., Milbradt, C., & Zoels, B. (2000). Power consumption in shaking flasks on rotary shaking machines: I. Power consumption measurement in unbaffled flasks at low liquid viscosity. *Biotechnology Bioengineering*, 68, 589-593.

Cadot, Y., Miñana-Castelló, M. T., & Chevalier, M. (2006). Anatomical, histological, and histochemical changes in grape seeds from *Vitis vinifera* L. cv Cabernet franc during fruit development. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(24), 9206-9215.

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

Casazza, A. A., Aliakbarian, B., Montoya, E. Y. O., & Perego, P. (2010b). t-resveratrol recovery from grape skins using high pressure and temperature extraction. *Journal of Biotechnology*, 150, 333-333.

Casazza, A. A., Aliakbarian, B., Sannita, E., & Perego, P. (2012). High-pressure high-temperature extraction of phenolic compounds from grape skins. *International Journal of Food Science and Technology*, 47(2), 399–405.

Castillo, J., Benavente-Garcia, O., Lorente, J., Alcaraz, M., Redondo, A., Ortuno, A., & Del Rio, J. A. (2000). Antioxidant activity and radioprotective effects against chromosomal damage induced in vivo by X-rays of flavan-3-ols (Procyanidins) from grape seeds (*Vitis vinifera*): comparative study versus other phenolic and organic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1738-1745.

Cheyrier, V., Prieur, C., Guyot, S., Rigaud, J., & Moutounet, M. (1997). The structures of tannins in grapes and wines and their interactions with proteins.

Cheyrier, V., & Rigaud, J. (1986). HPLC separation and characterization of flavonols in the skins of *Vitis vinifera* var. Cinsault. *American Journal of Enology and Viticulture*, 37(4), 248-252.

Chemat, F., Vian, M. A., & Cravotto, G. (2012). Green extraction of natural products: concept and principles. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8615–8627.

Chemat, F., & Cravotto, G. (2012). Microwave-assisted extraction for bioactive compounds: theory and practice. In F. Chemat & G. Cravotto (Eds.), Springer Science & Business Media.

Chemat, F., & Cravotto, G. (2013). Microwave-assisted extraction for bioactive compounds. (F. Chemat & G. Cravotto, Eds.). Springer US.

Chemat, F., Fabiano-Tixier, A. S., Vian, M. A., Allaf, T., & Vorobiev, E. (2015). Solvent-free extraction of food and natural products. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 71, 157–168.

Choi, Y., & Lee, J. (2009). Antioxidant and antiproliferative properties of a tocotrienol-rich fraction. *Food Chemistry*, 114, 1386–1390.

Corrales, M., Toepfl, S., Butz, P., Knorr, D., & Tauscher, B. (2008b). Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(1), 85–91.

Corrales, M., García, A. F., Butz, P., & Tauscher, B. (2009). Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Engineering*, 90(4), 415-421.

Cravotto, G., Boffa, L., Mantegna, S., Perego, P., Avogadro, M., & Cintas, P. (2008). Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(5), 898–902.

Da Ros, C., Cavinato, C., Pavan, P., & Bolzonella, D. (2014). Winery waste recycling through anaerobic co-digestion with waste activated sludge. *Waste Management*, 34(11), 2028–2035.

Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15, 7313–7352.

De Freitas, V. A. P., & Glories, Y. (1999). Concentration and compositional changes of procyanidins in grape seeds and skin of white *Vitis vinifera* varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(12), 1601-1606.

De Gaulejac, N. V., Vivas, N., Nonier, M. F., Absalon, C., & Bourgeois, G. (2001). Study and quantification of monomeric flavan-3-ol and dimeric procyanidin quinonic forms by HPLC/ESI-MS. Application to red wine oxidation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(12), 1172-1179.

Del Bas, J. M., Fernández-Larrea, J., Blay, M., Ardèvol, A., Salvadó, M. J., Arola, L., & Bladé, C. (2005). Grape seed procyanidins improve atherosclerotic risk index and induce liver CYP7A1 and SHP expression in healthy rats. *The FASEB journal*, 19(3), 479-481.

Deng, Q., Zinoviadou, K. G., Galanakis, C. M., Orlie, V., Grimi, N., Vorobiev, E., ... Barba, F. J. (2015). The effects of conventional and non-conventional processing on glucosinolates and its derived forms, isothiocyanates: Extraction, degradation, and applications. *Food Engineering Reviews*, 7(3), 357-381.

Diaz-Reinoso, B., Moure, A., Dominguez, H., & Parajo, J. C. (2006). Supercritical CO₂ extraction and purification of compounds with antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2441–2469.

Díaz-Ortiz, A., de la Hoz, A., Alcázar, J., Carrillo, J. R., Antonia Herrero, M., Fontana, A., & de Mata Muñoz, J. (2007). Reproducibility and scalability of solvent-free microwave-assisted reactions: from domestic ovens to controllable parallel applications. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 10(3), 163–169.

DOWNEY, M. O., HARVEY, J. S., & Robinson, S. P. (2003). Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 9(1), 15-27.

Duba, K. S., Casazza, A. A., Mohamed, H. B., Perego, P., & Fiori, L. (2015). Extraction of polyphenols from grape skins and defatted grape seeds using subcritical water: experiments and modeling. *Food and Bioproducts Processing*, 94, 29-38.

El Darra, N., Grimi, N., Vorobiev, E., Louka, N., & Maroun, R. (2013). Extraction of polyphenols from red grape pomace assisted by pulsed ohmic heating. *Food and Bioprocess Technology*, 6(5), 1281–1289.

Escribano-Bailón, M. T., Guerra, M. T., Rivas-Gonzalo, J. C., & Santos-Buelga, C. (1995). Proanthocyanidins in skins from different grape varieties. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 200(3), 221-224.

FAOSTAT (2011). Banco de Dados Estatísticos da FAO, <<http://www.fao.org>>.

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.

Fuleki, T., Ricardo da Silva, J.M., 1997. Catechin and Procyanidin composition of seeds from grape cultivars grown in Ontario. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 1156–1160.

Furiga, A., Lonvaud-Funel, A., & Badet, C. (2009). In vitro study of antioxidant capacity and antibacterial activity on oral anaerobes of a grape seed extract. *Food Chemistry*, 113, 1037–1040.

Galanakis, C. M. (2012). Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science & Technology*, 26(2), 68–87.

Galanakis, C. M. (2013). Emerging technologies for the production of nutraceuticals from agricultural by-products: A viewpoint of opportunities and challenges. *Food and Bioproducts Processing*, 91(4), 575–579.

Grimplet, J., Deluc, L. G., Cramer, G. R., & Cushman, J. C. (2007). Integrating functional genomics with salinity and water deficit stress responses in wine grape - *Vitis Vinifera*. In M. A. Jenks, P. M. Hasegawa, & S. M. Jain (Eds.), *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops* (pp. 643–668). Springer Netherlands.

Guo, L., Wang, L. H., Sun, B., Yang, J. Y., Zhao, Y. Q., Dong, Y. X., ... & Wu, C. F. (2007). Direct in vivo evidence of protective effects of grape seed procyanidin fractions and other antioxidants against ethanol-induced oxidative DNA damage in mouse brain cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(14), 5881-5891.

Ghafoor, K., Choi, Y. H., Jeon, J. Y., & Jo, I. H. (2009). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(11), 4988-4994.

Hayes, R., Ahmed, A., Edge, T., & Zhang, H. (2014). Core–shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1357, 36-52.

Herodež, Š. S., Hadolin, M., Škerget, M., & Knez, Ž. (2003). Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. *Food Chemistry*, 80(2), 275-282.

Jaeger, H., Balasa, A., & Knorr, D. (2009). Food Industry Applications for Pulsed Electric Fields. In *Electrotechnologies for Extraction from Food Plants and Biomaterials* (pp. 181–216). Springer New York.

Jain, T., Jain, V., Pandey, R., Vyas, A., & Shukla, S. S. (2009). Microwave assisted extraction for phytoconstituents - An overview. *Asian J. Research Chem.*, 2(1), 19–25.

James Mason, T., Chemat, F., & Vinatoru, M. (2011). The extraction of natural products using ultrasound or microwaves. *Current Organic Chemistry*, 15(2), 237–247.

Jayaprakasha, G. K., Singh, R. P., & Sakariah, K. K. (2001). Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food chemistry*, 73(3), 285–290.

Jayaprakasha, G. K., Selvi, T., & Sakariah, K. K. (2003). Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food research international*, 36(2), 117–122.

Kammerer, D., Claus, A., Carle, R., & Schieber, A. (2004). Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(14), 4360–4367.

Kaur, N., & Singh, A. K. (2016). Ohmic Heating: Concept and Applications—A Review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(14), 2338–2351.

Kijima, I., Phung, S., Hur, G., Kwok, S. L., & Chen, S. (2006). Grape seed extract is an aromatase inhibitor and a suppressor of aromatase expression. *Cancer research*, 66(11), 5960–5967

Kim, H., Kim, S. G., Choi, Y., Jeong, H. S., & Lee, J. (2008). Changes in tocopherols, tocotrienols, and fatty acid contents. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85, 487–489.

Kennedy, J. A., Matthews, M. A., & Waterhouse, A. L. (2000). Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochemistry*, 55(1), 77–85.

KENNEDY, J. A., TROUP, G. J., PILBROW, J. R., HUTTON, D. R., HEWITT, D., HUNTER, C. R., & JONES, G. P. (2000). Development of seed polyphenols in berries from *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6(3), 244–254.

Koubaa, M., Roselló-Soto, E., Šic Žlabur, J., Režek Jambrak, A., Brnčić, M., Grimi, N., & Barba, F. J. (2015b). Current and new insights in the sustainable and green recovery of nutritionally valuable compounds from *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 6835–6846.

Lapornik, B., Prošek, M., & Wondra, A. G. (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of food engineering*, 71(2), 214–222.

- Latoui, M., Aliakbarian, B., Casazza, A. A., Seffen, M., Converti, A., & Perego, P. (2012). Extraction of phenolic compounds from *Vitex agnus-castus* L. *Food and bioproducts processing*, 90(4), 748-754.
- Li, Y., Radoiu, M., Fabiano-Tixier, A.-S., & Chemat, F. (2012). From laboratory to industry: scale up, quality, and safety consideration for microwave-assisted extraction. In F. Chemat & G. Cravotto (Eds.), *Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds* (pp. 207–229). Springer US.
- Liazid, A., Guerrero, R. F., Cantos, E., Palma, M., & Barroso, C. G. (2011). Microwave assisted extraction of anthocyanins from grape skins. *Food Chemistry*, 124(3), 1238–1243.
- Lu, Y., & Foo, L. Y. (1999). The polyphenol constituents of grape pomace. *Food Chemistry*, 65(1), 1-8.
- Luque-Rodríguez, J. M., Castro, M. D. L., & Pérez-Juan, P. (2005). Extraction of fatty acids from grape seed by superheated hexane. *Talanta*, 68, 126–130.
- Lutterodt, H., Slavin, M., Whent, M., Turner, E., & Yu, L. (2011). Fatty acid composition, oxidative stability, antioxidant and antiproliferative properties of selected cold-pressed grape seed oils and flours. *Food Chemistry*, 128, 391–399.
- Macheix, J. J., & Fleuriet, A. (1990). *Fruit phenolics*. CRC press.
- 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.
- Martin-Carron, N., Garcia-Alonso, A., Goni, I., & Saura-Calixto, F. (1997). Nutritional and physiological properties of grape pomace as a potential food ingredient. *American journal of enology and viticulture*, 48(3), 328-332.
- Makris, D. P., Kallithraka, S., & Kefalas, P. (2006). Flavonols in grapes, grape products and wines: Burden, profile and influential parameters. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(5), 396-404.
- Mateo, J. J., & Maicas, S. (2015). Valorization of winery and oil mill wastes by microbial technologies. *Food Research International*, 73, 13–25.
- Monrad, J. K., Srinivas, K., Howard, L. R., & King, J. W. (2012). Design and optimization of a semicontinuous hot–cold extraction of polyphenols from grape pomace. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(22), 5571-5582.
- Montealegre, R. R., Peces, R. R., Vozmediano, J. 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(6), 687-693.

- Mohamed, M. E. A., & Amer Eiss, A. H. (2012). Pulsed electric fields for food processing technology. In A. Amer Eissa (Ed.), *Structure and Function of Food Engineering*. InTech.
- Murga, R., Ruiz, R., Beltran, 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(8), 3408–3412.
- Nwuha, V. (2000). Novel studies on membrane extraction of bioactive components of green tea in organic solvents: part I. *Journal of food engineering*, 44(4), 233-238.
- Oszmianski, J., Ramos, T., & Bourzeix, M. (1988). Fractionation of phenolic compounds in red wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39(3), 259-262.
- Palma, M., & Taylor, L. T. (1999). Extraction of polyphenolic compounds from grape seeds with near critical carbon dioxide. *Journal of Chromatography A*, 849(1), 117–124.
- Peyrot des Gachons, C., & Kennedy, J. A. (2003). Direct method for determining seed and skin proanthocyanidin extraction into red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(20), 5877-5881.
- Pinent, M., Blay, M., Blade, M. C., Salvado, M. J., Arola, L., & Ardevol, A. (2004). Grape seed-derived procyanidins have an antihyperglycemic effect in streptozotocin-induced diabetic rats and insulinomimetic activity in insulin-sensitive cell lines. *Endocrinology*, 145(11), 4985-4990.
- Plaza, M., & Turner, C. (2015). Pressurized hot water extraction of bioactives. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 71, 39–54.
- Puiggròs, F., Llopiz, N., Ardévol, A., Bladé, C., Arola, L., & Salvadó, M. J. (2005). Grape seed procyanidins prevent oxidative injury by modulating the expression of antioxidant enzyme systems. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(15), 6080-6086.
- Prieur, C., Rigaud, J., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1994). Oligmeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry*, 36, 781e784.
- Rajha, H.N., Boussetta, N., Louka, N., Maroun, R. G., & Vorobiev, E. (2014a). A comparative study of physical pretreatments for the extraction of polyphenols and proteins from vine shoots. *Food Research International*, 65, 462–468.
- Rajha, H.N., Chacar, S., Afif, C., Vorobiev, E., Louka, N., & Maroun, R. G. (2015b). β -Cyclodextrin-assisted extraction of polyphenols from vine shoot cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(13), 3387–3393.
- Revilla, E., & Ryan, J. M. (2000). Analysis of several phenolic compounds with potential antioxidant properties in grape extracts and wines by high-performance liquid chromatography–photodiode array detection without sample preparation. *Journal of Chromatography A*, 881(1), 461-469.

- Ristic, R., & Iland, P. G. (2005). Relationships between seed and berry development of *Vitis vinifera* L. cv Shiraz: developmental changes in seed morphology and phenolic composition. *Australian Journal of grape and wine research*, 11(1), 43-58.
- Rombaut, N., Tixier, A.-S., Bily, A., & Chemat, F. (2014). Green extraction processes of natural products as tools for biorefinery. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 8(4), 530–544.
- Rostagno, M. A., Palma, M., & Barroso, C. G. (2003). Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A*, 1012(2), 119-128.
- 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(2), 197-201.
- Singh, P. P., & Saldaña, M. D. (2011). Subcritical water extraction of phenolic compounds from potato peel. *Food Research International*, 44(8), 2452-2458.
- Schieber, A., Stintzing, F. C., & Carle, R. (2001). By-products of plant food processing as a source of functional compounds—recent developments. *Trends in Food Science & Technology*, 12(11), 401-413.
- Shi, J., Yu, J., Pohorly, J., Young, J. C., Bryan, M., & Wu, Y. (2003). Optimization of the extraction of polyphenols from grape seed meal by aqueous ethanol solution. *J. Food Agric. Environ*, 1(2), 42.
- Shrikhande, A. J. (2000). Wine by-products with health benefits. *Food Research International*, 33(6), 469-474.
- Spigno, G., & De Faveri, D. M. (2007). Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. *Journal of Food Engineering*, 78(3), 793-801.
- Spigno, G., Tramelli, L., & De Faveri, D. M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of food engineering*, 81(1), 200-208.
- Tatke, P., & Jaiswal, Y. (2011). An overview of microwave assisted extraction and its applications in herbal drug research. *Research Journal of Medicinal Plant*, 5(1), 21–31.
- Teixeira, A., Baenas, N., Dominguez-Perles, R., Barros, A., Rosa, E., Moreno, D. A., & Garcia-Viguera, C. (2014). Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: a review. *International journal of molecular sciences*, 15(9), 15638-15678.
- Terra, X., Valls, J., Vitrac, X., Mérrillon, J. M., Arola, L., Ardèvol, A., ... & Blay, M. (2007). Grape-seed procyanidins act as antiinflammatory agents in endotoxin-stimulated RAW 264.7 macrophages by inhibiting NFκB signaling pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(11), 4357-4365.

- Thorngate, J. H., & Singleton, V. L. (1994). Localization of procyanidins in grape seeds. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45(2), 259-262.
- Töpfl, S. (2011). Pulsed electric field food treatment - scale up from lab to industrial scale. *Procedia Food Science*, 1, 776–779.
- Uchida, S. (1980). Condensed tannins scavenging active oxygen radicals. *Med Sci Res*, 15, 831-832.
- Valiente, C., Arrigoni, E., Esteban, R. M., & Amado, R. (1995). Grape pomace as a potential food fiber. *Journal of Food Science*, 60(4), 818-820.
- Viñas, P., López-Erroz, C., Marín-Hernández, J. J., & Hernández-Córdoba, M. (2000). Determination of phenols in wines by liquid chromatography with photodiode array and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 871(1), 85-93.
- Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y., & Li, X. (2008). Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chemistry*, 106(2), 804-810.
- Waterhouse, A. L., Ignelzi, S., & Shirley, J. R. (2000). A comparison of methods for quantifying oligomeric proanthocyanidins from grape seed extracts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51(4), 383-389.
- Wijendran, V., & Hayes, K. C. (2004). Dietary n-6 and n-3 fatty acid balance and cardiovascular health. *Annual Review of Nutrition*, 24, 597–615.
- Yamakoshi, J., Saito, M., Kataoka, S., & Tokutake, S. (2002). Procyanidin-rich extract from grape seeds prevents cataract formation in hereditary cataractous (ICR/f) rats. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(17), 4983-4988.
- Zhu, F., Cai, Y. Z., Sun, M., Ke, J., Lu, D., & Corke, H. (2009). Comparison of major phenolic constituents and in vitro antioxidant activity of diverse Kudingcha genotypes from *Ilex kudingcha*, *Ilex cornuta*, and *Ligustrum robustum*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(14), 6082-6089.

6. Anexos

Anexo I. Resultados da influência do campo elétrico na extração em água.

Tratamento	Tempo de extração (horas)	Condutividade (ms/cm)	TP (mg EAG/g)	ABTS (µmol Trolox)	DPPH (µmol Trolox)	Compostos fenólicos (mg/L)						Total
						Catechin	Vanillic acid	Gallic acid	p-cumaric acid+epicatechin	o-cumaric acid	Cinnamic acid	
Controlo	24	5	6.1	116.5	7781.1	14.6	5.5	2.0	2.7	1.5	2.3	28.6
		40	5.6	130.3	7703.3	9.5	3.6	1.9	2.4	1.4	2.3	21.1
Controlo	48	5	6.2	174.3	7681.1	17.7	5.5	2.1	2.8	1.5	2.4	32.0
		40	6.0	141.2	7842.2	15.6	5.5	2.0	2.6	1.5	2.4	29.6
Convencional	24	5	12.1	259.1	18314.4	29.4	5.5	1.8	3.4		2.3	42.4
		40	10.4	302.2	20747.8	26.2		1.7	3.1		2.3	33.4
Convencional	48	5	11.6	242.2	18897.8	32.5	5.4	2.1	3.5	1.4	2.4	47.3
		40	8.1	232.7	19197.8	28.9		2.1	3.3	1.4	2.4	38.0
OH	24	5	13.7	307.3	19088.5	29.1	5.4	1.9	3.3	1.3	2.4	43.5
		40	13.7	301.6	18888.5	28.0	5.4	1.8	3.2	0.7	2.4	41.4
OH	48	5	14.3	324.7	17977.4	28.4	5.4	1.8	3.2	0.4	2.4	41.6
		40	15.2	288.4	16640.4	28.7	5.4	1.8	3.3		2.4	41.5
Controlo		6.0	140.6	7751.9	14.4	5.0	2.0	2.6	1.5	2.3	27.8	
Convencional		10.5	259.0	19289.4	29.2	5.5	1.9	3.4	1.4	2.3	43.7	
OH		13.3	297.9	18079.3	29.2	5.4	2.0	3.4	1.1	2.4	43.7	

Anexo II. Resultados da influência do campo elétrico na extração em etanol.

Tratamento	Tempo de extração (horas)	Condutividade (ms/cm)	Compostos fenolicos (mg/L)												
			TP (mg EAG/g)	ABTS (μ mol Trolox)	DPPH (μ mol Trolox)	catechin	syringic acid	chlorogenic acid	vanillic acid	gallic acid	p-cumaric acid+epicatechin	o-cumaric acid	cinnamic acid	rutin	Total
Controlo	24	5	9.1	152.7	17147.8	24.9	5.0	11.4	5.5	1.8	3.0	1.3	3.6		56.5
		40	8.4	217.4	16920.0	24.0	4.3	11.4	5.6	1.8	2.9	1.3	3.6		55.0
	48	5	12.2	216.2	16192.2	26.4	4.3		5.6	1.9	3.3	1.3	3.7		46.4
		40	11.2	190.8	17070.0	26.9	4.4		5.6	1.9	3.2	1.3	3.7		46.9
Convencional	24	5	13.0	389.8	14475.6	44.0	4.7	11.4	5.6	2.0	4.0	1.3	3.6		76.7
		40	15.2	396.0	13575.6	45.3	5.4	11.5	5.6	2.0	4.0	1.4	3.0	2.3	80.4
	48	5	18.7	395.0	12992.2	44.6	5.6	11.4	5.6	2.1	4.0	1.4	3.6	2.2	80.5
		40	20.1	402.3	11547.8	44.4	5.6	11.4	5.6	2.0	2.7	1.3	3.0	2.2	78.3
OH	24	5	18.4	397.0	13840.4	37.7	5.0		5.6	2.0	4.1	1.3	3.6		59.3
		40	19.4	328.4	15003.3	39.7	5.6		5.6	2.0	3.7	1.3	3.6		61.5
	48	5	15.2	407.9	12784.8	48.6	5.9	11.4	3.1	2.1	4.2	1.3	3.6	2.2	82.5
		40	14.5	410.4	14792.2	44.2	4.5	11.4	5.6	2.0	4.1	1.3	3.7	2.1	79.1
Controlo			10.2	194.3	16832.5	25.6	4.5	11.4	5.6	1.8	3.1	1.3	3.6		56.9
Convencional			16.8	395.8	13147.8	44.6	5.3	11.4	5.6	2.0	3.7	1.3	3.3	2.2	79.4
OH			16.9	385.9	14105.2	42.5	5.3	11.4	5.0	2.0	4.0	1.3	3.6	2.2	77.4