

Eixo Temático: Inovação e Sustentabilidade

**EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA DE ANTOCIANINAS EM BAGAÇO DE UVA DO
CULTIVAR MERLOT E PINOT NOIR**

**ENZYMATIC EXTRACTION OF ANTHOCYANINS FROM MERLOT AND PINOT
NOIR GRAPE POMACE**

Maria Jara Montibeller, Agathe Lea Nathalie Persegol, Patric De Lima Monteiro, Marianna Pozzatti
Martins De Siqueira, Alessandro De Oliveira Rios e Vitor Manfroi

RESUMO

O processo de vinificação produz altas quantidades de resíduos que contem diversos compostos bioativos que podem ser valorizados como aditivos alimentares. Este trabalho teve como objetivo realizar a extração enzimática de compostos bioativos a partir de bagaço das uvas de cultivares Merlot e Pinot Noir (*Vitis vinifera*), com quantificação das antocianinas presentes e caracterização físico-química da casca e do extrato. O extrato foi produzido a partir das cascas de uva em solução de tampão acetato e diversas porcentagens da preparação enzimática. Segundo os resultados os extratos antociânicos obtidos a partir da variedade Merlot apresentaram maior quantidade de antocianinas monoméricas totais em relação com o Pinot Noir. O cultivar Merlot possuiu um rendimento do extrato antociânico de 37,90% e Pinot Noir de 24,06%.

Palavras-chave: extração enzimática, bagaço de uva, antocianinas.

ABSTRACT

The process of vinification releases important quantities of residues which contain a lot of bioactive compounds. These ones could be recovered like food additives, in particular, coloring agent. The objective of this study is to realize an enzymatic extraction of bioactive compounds from grape varieties of Merlot and Pinot Noir (*Vitis Vinifera*), to quantify present anthocyanins and physicochemical characterization skin and extract. The extract was produced with grape skins in acetate buffer and different percentages of enzymatic preparation. This study contributes to evaluate total and individual monomeric anthocyanins concentration. According to the results, the grape variety Merlot contains the higher quantity of total monomeric anthocyanins compared with Pinot Noir. The yield of the enzymatic extraction realized with Merlot was 37.90% and 24.06% with Pinot Noir.

Keywords: enzymatic extraction, grape pomace, anthocyanins.

1 INTRODUÇÃO

A produção de vinhos gera altas quantidades de resíduos, sendo que um dos principais é o bagaço, que representa cerca de 13% do peso total das uvas. Este contém diversos compostos bioativos que podem ser usados para diferentes aplicações entre elas, como aditivos na indústria alimentar na forma de corantes (Beye, Tounkara, Seck, Thonart & Fickers, 2015).

A técnica de extração com uso de enzimas pectolíticas visa acessar mais facilmente os materiais intracelulares das cascas de uva. A quebra ou o enfraquecimento da parede celular pela ação de enzimas proporciona a liberação dos compostos bioativos (Bhanja, Rout, Banerjee, & Bhattacharyya, 2008; Li, Smith, & Hossain, 2006; Robledo et al.). Este método já é comumente usado no processo de vinificação para obter vinhos mais estruturados e com um maior rendimento de prensagem, além disso, pode ser aplicado similarmente a seus resíduos, já que os mesmos permanecem com cerca de 60% das antocianinas presentes na matéria prima (Munhoz, Marcelo Brando, 2014, Guerrand & Gervais, 2001).

Este trabalho teve como objetivo realizar a extração enzimática de compostos bioativos a partir de bagaço das uvas de cultivares Merlot e Pinot Noir (*Vitis vinifera*), com quantificação das antocianinas presentes e caracterização físico-química da casca e do extrato.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O bagaço de uva tinta do cultivar Merlot e Pinot Noir, provenientes do processo de vinificação, foi gentilmente fornecido pela Vinícola Don Giovanni, empresa localizada em Pinto Bandeira-RS. As amostras foram armazenadas a -18°C até o momento das análises.

2.1 Produção do extrato enzimático

Adaptado de Fernández, Vega, & Aspé, (2015), para cada 5,0 g da amostra de casca das respectivas cultivares foram adicionados 25 mL de tampão acetato (pH 4,0). As variáveis temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e porcentagem de enzima Pectinex Ultra Color foram avaliadas de acordo com um planejamento experimental completo 2^2 (Tabela 1). Em cada ensaio as amostras permaneceram sob agitação em shaker (150 rpm) por 30 minutos. Posteriormente, o resíduo foi resfriado em banho de gelo, prensado e extrato obtido armazenado (ao abrigo de luz e de calor) até o momento das análises.

Tabela 1 – Fatores independentes e níveis do planejamento fatorial 2^2 com ponto central.

Fatores independentes	Níveis		
	-1	0	+1
Temperatura($^{\circ}\text{C}$)(x1)	40	45	50
Porcentagem de preparado enzimático(%E/S)(x2)	0,25	0,75	1,25

2.2 Total de antocianinas monoméricas por análise de pH diferencial

Com base em protocolo de Giusti & Wrolstad (2001), as leituras foram feitas em espectrofotômetro a 520 nm e 700 nm (UV-Vis - 3000 PRO, Amersham, Biosciences) com uso de tampões a pH 1,0 e 4,5. Os parâmetros foram representados na equação de Lambert-Beer (Equação 1), a fim de calcular a concentração da amostra diluída, considerando o fator de diluição (D) e o coeficiente de extinção molar (M):

$$C = \{[(A_{\lambda 520} - A_{\lambda 700})_{pH1,0}] - [(A_{\lambda 520} - A_{\lambda 700})_{pH4,5}]\} * D * F \quad (\text{Equação 1})$$

A concentração total de antocianinas monoméricas na amostra original foi estimada com base em cianidina-3-o-glicosídeo. Os resultados foram expressos em g/100g de bagaço seco. A manipulação das amostras foi realizada sob a luz fraca e temperatura ambiente (25 °C).

2.3 Análises cromatográficas

A extração exaustiva de antocianinas do bagaço de uva foi feita de acordo com o método de Zanatta, Cuevas, Bobbio, Winterhalter, & Mercadante (2005). Uma amostra de 0,25 g foi extraída com 75 mL de 0,5 % de HCl em metanol. A suspensão foi filtrada e os sólidos foram lavados com 0,5% de HCl em metanol.

Para quantificação das antocianinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) os compostos foram separados em uma coluna de fase reversa C18 Shim-pak CLC-ODS (5 µm, 250 × 4,6 mm) utilizando como fase móvel um gradiente linear de eluição com ácido fósfórico aquoso a 4% e acetonitrila a proporção 15:85 (v:v), sendo mantida essa proporção isocrática por 15 min. O fluxo da fase móvel foi de 1,0 mL/min e a temperatura da coluna mantida a 25° C (Zanatta, Cuevas, Bobbio, Winterhalter, & Mercadante, 2005).

Os cromatogramas foram processados em comprimento de onda fixo de 520 nm. A identificação do composto malvidina-3-glicosídeo foi efetuada comparando os tempos de retenção dos picos da amostra e do controle (padrão) nas mesmas condições.

2.4 Análise estatística

Os resultados foram analisados por meio da Análise de Delineamento Experimental com um nível de significância de 5% (P < 0,05) usando programa Statistica 7.0 e Análise de Médias com três repetições (n = 3) ± desvio padrão.

2.5. Características físico-químicas da casca e do extrato

As cascas de uvas foram analisadas em relação a umidade, e os extratos foram caracterizados em relação ao pH. A umidade da casca foi determinada pela técnica de gravimetria, a 105°C, até a obtenção de um peso constante das amostras, enquanto que o pH dos extratos foi avaliado usando um potenciômetro DM-22 (Digimed, Brazil) as 25°C (Adolfo Lutz, 1985)

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foram obtidos resultados significativos em relação as variáveis estudadas pelo planejamento fatorial. Porém, o cultivar Merlot apresentou uma quantidade mais elevada de antocianinas monoméricas totais (1,72± 0,05 g/100g de bagaço seco) em relação a Pinot Noir (1,09± 0,05 g/100g de bagaço seco). O rendimento da extração enzimática apresentou resultados mais elevados para o Merlot que o Pinot Noir, com respectivamente 37,90% e 24,06% de recuperação.

Para realizar a extração exaustiva utiliza-se como solvente metanol acidificado com 1 % de HCl. Tal extrato não pode ser aplicado na área de alimentos, pois não possui grau alimentício, dessa forma, essa análise somente permite realizar uma comparação como total de antocianinas passíveis de extração no bagaço. Segundo a *Food and Drug Administration* (FDA) (2015) o extrato de casca de uva enzimático é considerado uma enocianina, ou seja, pode ser usada na indústria de alimentos.

Com base nos resultados obtidos, sugere-se que tais características apresentadas são devido aos diferentes cultivares de uva, o *terroir*, as características edafoclimáticas, o estado sanitário da planta, as práticas de cultivo e o grau de maturação da uva (Hanlin, Kelm, Wilkinson, & Downey, 2011; Moreno-Pérez et al., 2013; Jordão, Correia, & Gonçalves, 2012; Rapisarda et al., 1999; Tomás-Barberán & Espín, 2001).

Tabela 2 – Características físico-químicas da casca e do extrato obtido dos cultivares Merlot e Pinot Noir

Análises físico-químicas		Merlot	Pinot Noir
Casca	Umidade (%)	72,47 ± 1,23 ^a	69,94 ± 2,73 ^a
Extrato	pH	3,85 ± 0,01 ^a	3,72 ± 0,01 ^b

*Letras iguais na mesma linha significam que não houve diferença estatística significativa nos tratamentos entre as médias ao nível de 5%

Na tabela 2 foram apresentados resultados obtidos na caracterização da casca e do extrato que apresentou maiores valores de antocianinas de acordo com o planejamento fatorial. Não houve diferença significativa entre a umidade dos dois cultivares, o que condiz com a umidade do bagaço, que varia entre 50% e 72% de acordo com o cultivar analisado (Botella et al., 2005).

O cultivar Pinot Noir obteve além de menores valores de antocianinas e um valor de pH no extrato significativamente menor. Esses fatores podem estar relacionados com uma diferença na estabilidade das antocianinas entre os dois cultivares. Um estudo realizado por Cheynier et al.(2005) indicou que as antocianinas aciladas apresentam uma melhor estabilidade da cor e são mais resistentes as variações de pH, sendo que de acordo com Cliff et al. (2006) o cultivar Pinot Noir apresenta alta quantidade destes compostos. Além disso, as antocianinas presentes no Pinot Noir não podem formar antocianinas copigmentadas, responsáveis por facilitar a extração antociânica durante a maturação e aumentar a intensidade da cor.

3 CONCLUSÃO

A extração enzimática apresenta-se como um método interessante para recuperação de compostos bioativos como corantes na indústria alimentar, de forma a valorizar resíduos da vinificação. Dessa forma, é recomendado o uso da cultivar Merlot, a qual obteve um rendimento mais elevado com uma quantidade de antocianinas monoméricas totais mais elevada.

REFERÊNCIAS

ADOLFO LUTZ, INSTITUTO. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 3a ed. São Paulo– **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**.v.1, 1985.

BHANJA, T., ROUT, S., BANERJEE, R., & BHATTACHARYYA, B. C. Studies on the performance of a new bioreactor for improving antioxidant potential of rice. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41(8), p. 1459-1465, 2008.

BOTELLA, C., DE ORY, I., WEBB, C., CANTERO, D., & BLANDINO, A. Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. **Biochemical Engineering Journal**, v. 26(2-3), p. 100-106, 2005.

CHEYNIER, V., DUEÑAS-PATON, M., SALAS, E., MAURY, C., SOUQUET, J. M., SARNI-MANCHADO, P., & FULCRAND, H. Structure and properties of wine pigments and tannins. **American Journal of Enology and Viticulture** v. 57(3), p. 298-305, 2006.

CLIFF, M. A., KING, M. C., & SCHLOSSER, J. Anthocyanin, phenolic composition, colour measurement and sensory analysis of BC commercial red wines. **Food Research International**, v. 40(1), p. 92-100, 2007.

FDA. CFR - **Code of Federal Regulations Title 21**, 2015.

FERNÁNDEZ, K., VEGA, M., & ASPÉ, E. An enzymatic extraction of proanthocyanidins from País grape seeds and skins. **Food Chemistry**, 168, 7-13, 2015.

GUERRAND, D. Impact of a new pectinase formulation on extraction of intracellular compounds during red grapes maceration. **Revue Française d'Oenologie**. 2001.

GIUSTI, M. M., & WROLSTAD, R. E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. In W. O. Library (Ed.), **Current Protocols in Food Analytic Chemistry**, 2001.

HANLIN, RACHEL L., ET AL. Detailed characterization of proanthocyanidins in skin, seeds, and wine of Shiraz and Cabernet Sauvignon wine grapes (*Vitis vinifera*). **Journal of agricultural and food chemistry**. v. 59.24, p. 13265-13276, 2011.

JORDÃO, A. M., ET AL. Antioxidant activity evolution during Portuguese red wine vinification and their relation with the proanthocyanidin and anthocyanin composition. **Journal of Food Processing and Preservation**. v. 36.4, p. 298-309, 2012.

LI, B. B., SMITH, B., & HOSSAIN, M. Extraction of phenolics from citrus peels: II. Enzyme-assisted extraction method. **Separation and Purification Technology**. v. 48(2), p. 189-196, 2006.

MORENO-PÉREZ, ANA, ET AL. Influence of winemaking techniques on proanthocyanidin extraction in Monastrell wines from four different areas. **European Food Research and Technology**. v. 236.3, p. 473-481, 2013.

MUNHOZ, MARCELO BRANDO. Microencapsulação de compostos antociânicos obtidos do bagaço da produção de suco de mirtilo. 2014.

RAPISARDA, PAOLO, ET AL. Antioxidant effectiveness as influenced by phenolic content of fresh orangejuices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.47.11, p. 4718-4723, 1999.

ROBLEDO, A., AGUILERA-CARBO A FAU - RODRIGUEZ, R., RODRIGUEZ R FAU - MARTINEZ, J. L., MARTINEZ JL FAU - GARZA, Y., GARZA Y FAU - AGUILAR, C. N., & AGUILAR, C. N. Ellagic acid production by *Aspergillus niger* in solid state fermentation of pomegranate residues. p. 1367-5435, 2008.

TOMASBARBERAN, FRANCISCO A., AND JUAN CARLOS ESPIN. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81.9, p. 853-876, 2001.

ZANATTA, C. F., CUEVAS, E., BOBBIO, F. O., WINTERHALTER, P., & MERCADANTE, A. Z. Determination of anthocyanins from Camu-camu (*Myrciaria dubia*) by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 53(24), p. 9531–9535, 2005.