



Processo de Recuperação de Compostos Bioativos do Bagaço Proveniente do Processamento do Suco de Uva

Natalia Barbosa Eitel

Monografia em Engenharia de Bioprocessos

Orientadores

Prof.^a. Suely Pereira Freitas, D. Sc.

Prof. Carlos Augusto G. Perlingeiro, D.Sc.

Março de 2013

**PROCESSO DE RECUPERAÇÃO DE COMPOSTOS
BIATIVOS DO BAGAÇO PROVENIENTE DO
PROCESSAMENTO DO SUCO DE UVA**

Natalia Barbosa Eitel

Monografia submetida ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Engenheiro de Bioprocessos.

Aprovado por:

Ana Lúcia do Amaral Vendramini, D. Sc.

Renata Valeriano Tonon, D. Sc.

Regina Cássia Mattos de Paula, M. Sc.

Orientado por:

Suely Pereira Freitas, D. Sc.

Carlos Augusto G. Perlingeiro, D. Sc.

Rio de Janeiro, RJ – Brasil
Março de 2013

Eitel, Natalia Barbosa.

Processo de recuperação de compostos bioativos do bagaço proveniente do processamento do suco de uva./ Natalia Barbosa Eitel. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2013.

x, 56 p.; il.

(Monografia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2013.

Orientadores: Suely Pereira Freitas e Carlos Augusto G. Perlingeiro.

1. Compostos bioativos. 2. Bagaço de uva. 3. Resíduos industriais. 4. Monografia (Graduação - UFRJ/EQ). 5. Suely Pereira Freitas e Carlos Augusto G. Perlingeiro. I. Engenheira de Bioprocessos.

Dedico essa grande conquista aos meus pais e à minha irmã que sempre me apoiaram e aos meus amigos que acreditaram em mim e nunca me deixaram desistir. Obrigada pela força!

**“Eu odiava cada minuto dos treinos, mas dizia para mim mesmo: Não desista!
Sofra agora e viva o resto de sua vida como um campeão.” (Muhammad Ali).**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Nair e Richard, que com todo amor, sabedoria e principalmente com muita paciência me deram total apoio em todas as minhas escolhas.

À minha irmã, Johanna, que mesmo longe nunca duvidou de mim.

A todos os meus tios e primos que me têm como exemplo.

Aos meus orientadores, principalmente a Prof.^a Suely, por acreditarem em mim e me passarem valiosos conhecimentos para a realização desse trabalho.

À banca examinadora por ter cedido seu tempo e pelos comentários e sugestões apresentadas com o objetivo de valorizar o trabalho;

A todos os professores da UFRJ que pacientemente passaram seus conhecimentos da melhor forma possível, possibilitando a formação de novos e competentes profissionais.

À EMBRAPA Agroindústria de Alimentos, em especial à pesquisadora Lourdes Cabral, pela oportunidade de estágio e responsáveis pela minha inserção no tema.

À Ana Paula Gil pelos indispensáveis ensinamentos; pelo imenso carinho e paciência a mim dedicados; e, pela confiança em mim depositada.

Aos funcionários da EMBRAPA, em especial ao William, Luis Fernando (Chorão) e Sérgio (Filé), por todo suporte e apoio dado durante todas as análises e processamentos.

A todos os meus amigos da Escola de Química, em especial à Erika, Karen, Tatiana, Isadora, Leticia e Rachel, sem os quais nunca teria conseguido alcançar essa sofrida conquista.

A todos os meus amigos da EMBRAPA (não citarei nomes, pois a lista é imensa e meu carinho é igualmente distribuído entre todos) pela amizade e imensa ajuda e, principalmente, pelas risadas compartilhadas e por todos os momentos inesquecíveis, possibilitando que 8h passassem num piscar de olhos.

A muitos outros que passaram pela minha vida e que certamente contribuíram para esta conquista.

Resumo da Monografia apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Engenheira de Bioprocessos.

PROCESSO DE RECUPERAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DO BAGAÇO PROVENIENTE DO PROCESSAMENTO DO SUCO DE UVA

Natalia Barbosa Eitel (nati.eitel@gmail.com)

Março, 2013

Orientador Responsável: Professora Suely Pereira Freitas, D. Sc.
Outros Orientadores: Professor Carlos Augusto G. Perlingeiro, D. Sc.

O objetivo desse trabalho foi o estudo do bagaço oriundo do processamento de suco de uva como fonte de compostos bioativos. O bagaço é o principal e o resíduo de maior volume de indústrias vitivinícolas, que quando descartado indevidamente implica em graves problemas ambientais. Foi proposto um processo para obtenção de um pó ricos nesses compostos. A melhor condição de extração sólido-líquido empregando uma solução hidroetanólica foi estudada. Após a extração, o extrato foi concentrado através de nanofiltração para em seguida sofrer atomização em *spray dryer*. Os valores encontrados para os compostos bioativos estudados se mostraram promissores se comparados com dados da literatura. A análise de atividade antioxidante resultou em $4126,68 \pm 135,15 \mu\text{mol Trolox} \cdot (100 \text{ g bagaço})^{-1}$, a de fenólicos totais em $601,71 \pm 31,79 \text{ mg ácido gálico} \cdot (100 \text{ g bagaço})^{-1}$, enquanto a de antocianinas totais e monoméricas em $155,84 \pm 1,62$ e $120,63 \pm 2,63 \text{ mg malvidina-3,5-diglicosídeo} \cdot (100 \text{ g bagaço})^{-1}$, respectivamente. Os pós microencapsulados se mostraram estáveis quando estocados em condições adequadas em ambiente com pressão e temperatura controladas. Um estudo de viabilidade foi realizado e o investimento se mostrou rentável.

ABSTRACT

PROCESS FOR RECOVERY OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM GRAPE MARC OBTAINED FROM THE PROCESSING OF GRAPE JUICE

Natalia Barbosa Eitel (nati.eitel@gmail.com)

March, 2013

The aim of this work was the study of grape marc as a source of bioactive compounds. Grape marc is the main waste from the winery industries, which can cause serious environmental problems, when improperly disposed. The best condition for a solid-liquid extraction with a hydroethanol solution has been studied. After the extraction, the extract has been concentrated per nanofiltration and afterward it has been atomized per spray dryer. The values found for the bioactive compounds studied were promising when compared to the literature. The analysis of antioxidant activity resulted in 4126.68 ± 135.15 $\mu\text{mol Trolox} \cdot (100 \text{ g marc})^{-1}$, the total phenolics in 601.71 ± 31.79 $\text{mg Gallic acid} \cdot (100 \text{ g marc})^{-1}$ and total and monomeric anthocyanins resulted in 155.84 ± 1.62 and 120.63 ± 2.63 $\text{mg malvidin-3-glucoside} \cdot (100 \text{ g marc})^{-1}$, respectively. The microencapsulated power showed high stabilization when stored under appropriate conditions in an environment with controlled temperature and pressure. An economic study was conducted and the investment proved itself profitable.

CONTEÚDO

ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABELAS	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Motivação	1
1.2 Objetivos.....	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Bagaço de uva.....	3
2.2 Compostos bioativos.....	4
2.2.1 Compostos fenólicos	4
2.2.2 Antocianinas	6
2.3 Extração sólido-líquido.....	7
2.4 Sistema de Separação por Membranas	10
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	12
3.1 Extração hidroalcoólica	12
3.2 Análises de teor de compostos bioativos	16
3.2.1 Atividade antioxidante (AA)	16
3.2.2 Compostos fenólicos totais (FT)	17
3.2.3 Antocianinas (AT/AM)	17
3.3 Processo de separação por membranas	18
3.4 Atomização por <i>Spray Dryer</i>	19
4. RESULTADOS OBTIDOS.....	21
5. PROCESSO DE RECUPERAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS	35
5.1 Fluxograma simplificado do processo proposto	35
6. AVALIAÇÃO ECONÔMICA	37
7. CONCLUSÕES	46
8. SUGESTÕES	47
9. BIBLIOGRAFIA	48
10. ANEXOS:.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1: Destinação da produção brasileira de uvas, em toneladas (2000-2011).	3
Figura 2.2: Esquema ilustrando a origem dos radicais livres e suas consequências.	4
Figura 3.1: Extração do bagaço de uva em escala semipiloto.	14
Figura 3.2: Agitador mecânico (A) do tanque encamisado (B) utilizado na extração em escala semipiloto.	14
Figura 3.3: Recolhimento do extrato obtido juntamente com o bagaço residual em escala semipiloto.	15
Figura 3.4: Exemplo de curva padrão de Trolox, lida em espectrofotômetro a 734 nm.	16
Figura 3.5: Exemplo de curva padrão de ácido gálico, lida em espectrofotômetro a 760nm.	17
Figura 3.6: Sistema de membrana plana em módulo espiral utilizado na nanofiltração do extrato obtido, em escala piloto, a partir do bagaço de suco de uva.	18
Figura 3.7: Rotaevaporador utilizado para remoção do etanol presente no concentrado obtido pelo processo de nanofiltração.	19
Figura 3.8: Spray dryer modelo B190 da marca Buchii.	20
Figura 4.1: Gráfico de Pareto para a variável AA.	24
Figura 4.2: Gráfico de Pareto para a variável FT 25	25
Figura 4.3: Gráfico de Pareto para a variável 'Antocianinas Totais'.	26
Figura 4.4: Gráfico de Pareto para a variável 'Antocianinas Monoméricas' 27	27
Figura 4.5: Processo de nanofiltração do extrato obtido a partir do bagaço de suco de uva, em escala semipiloto.	29
Figura 4.6: Fluxo de permeado (▲) e temperatura (■) em função do tempo de processo... 30	30
Figura 4.7: Processo de secagem por atomização do concentrado do extrato de bagaço de suco de uva.	32
Figura 4.8: Gráfico de barras referente às análises de estabilidade de compostos Fenólicos Totais (FT).	32
Figura 4.9: Gráfico de barras referente às análises de estabilidade da Atividade Antioxidante (AA).	33
Figura 4.10: Gráfico de barras referente às análises de estabilidade AT e AM.	34
Figura 5.1: Fluxograma simplificado do processo proposto.	35

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 Equações utilizadas nos diferentes métodos espectrofotométricos para quantificação de antocianinas.	7
Tabela 2.2: Dados comparativos ilustrando os diferentes métodos de extração de compostos bioativos encontrados na literatura.	8
Tabela 3.1: Matriz do planejamento composto central com triplicata no ponto central.	12
Tabela 4.1: Resultados obtidos experimentalmente e estimados pelo modelo matemático.	22
Tabela 4.2: Resultados das correntes da Nanofiltração.	31
Tabela 4.3: Resultados da corrente da atomização.	31
Tabela 6.1: Custo das principais matérias primas e utilidades.	37
Tabela 6.2: Massa de bagaço gerado na produção de 100 L de Vinho Branco e de Vinho Tinto.	38
Tabela 6.3: Produção de vinhos, sucos e derivados do Rio Grande do Sul, em litros.	38
Tabela 6.4: Custo das matérias primas em escala piloto, industrial e anual.	40
Tabela 6.5: Balanço de massa.	41
Tabela 6.6: Principais Máquinas e Equipamentos.	41
Tabela 6.7: Investimento total.	42
Tabela 6.8: Estimativa do custo total de produção.	43
Tabela 6.9: Influência dos diferentes preços de venda do pó microencapsulado rico em compostos bioativos.	45

1. INTRODUÇÃO

1.1 Motivação

Apesar dos crescentes avanços tecnológicos direcionados à industrialização de alimentos, há ainda dúvidas em como se deve lidar com o grande volume de resíduos gerados ao longo dos processos. Nesse quesito, um dos principais objetivos das pesquisas modernas é a reclassificação destes resíduos, principalmente os de fontes naturais, em subprodutos, de modo a diminuir o custo de um oneroso tratamento (Kosseva, 2009). Ao se tratar de indústrias produtoras de vinhos e sucos de uva, o principal resíduo e o de maior volume é o bagaço.

Nos últimos anos, 40-60% da produção brasileira de uvas é destinada para processamento. Segundo reportagem publicada em 13/10/2004 do Correio Riograndense, a produção de 100 litros de vinho branco envolve a geração de 17 kg de bagaço e 4 kg de engaço, enquanto a de vinho tinto gera 13,5 kg e 3 kg, respectivamente. Segundo Campos (2005), na produção de 100 L de vinho branco e tinto são gerados até 20 kg e 17 kg de bagaço, respectivamente.

No cenário nacional, o bagaço é utilizado como ração animal ou como adubo nos próprios vinhedos. Entretanto, esse bagaço, quando descartado de maneira incorreta, pode causar desequilíbrio ambiental, por ainda conter um alto teor de compostos fenólicos. Tais compostos são responsáveis pelo aumento da demanda química e bioquímica de oxigênio, DQO e DBO, respectivamente. Além disso, essa alta concentração fenólica pode inibir a germinação de outros vegetais, afetando assim diretamente o meio-ambiente, no qual ocorre seu descarte (Negro *et al.*, 2003). Assim como o bagaço, os engaços são muito usados na adubação. Na região da Serra Gaúcha criou-se um uso alternativo para este resíduo utilizando-os para nivelar terrenos e evitar a erosão da terra (CORREIO RIOGRANDENSE, 2004). Por outro lado, sabe-se que em consequência a outras características físico-químicas, como por exemplo, seu baixo pH e elevadas concentrações de compostos fitotóxicos (Bustamante *et al.*, 2008), o acúmulo desses resíduos pode gerar problemas ambientais ainda mais sérios. Tendo em vista este cenário, seria então de interesse não somente para a agroindústria nacional, como também para um bem estar

ambiental, um destino alternativo e mais nobre para o bagaço de uva que minimize os impactos negativos no meio ambiente.

1.2 Objetivos

Visando ao aproveitamento de um resíduo abundante e com grande potencial tecnológico, os principais objetivos desse trabalho foram:

- Determinar experimentalmente, em escalas de bancada e em semipiloto, a melhor condição de extração hidroetanólica dos compostos bioativos contidos no bagaço, tendo como parâmetros a atividade antioxidante e os teores de compostos fenólicos e antocianinas totais;
- Obter, utilizando a melhor condição de extração, um processo de recuperação de compostos bioativos do bagaço de uva;
- Fazer uma avaliação econômica do processo sugerido.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bagaço de uva

O bagaço de uva, que é basicamente constituído de cascas e sementes, é o principal resíduo e o de maior volume nos processos de produção de sucos e vinhos (Silva, 2003). Alguns autores estudaram possíveis aproveitamentos para esse bagaço. O processo mais promissor é a extração de compostos bioativos para uso na área de alimentos ou como insumo em processos bioquímicos visando à produção de enzimas e leveduras (Bustamante *et al.*, 2008). Brazinha *et al.* (2010) afirmam que o resíduo proveniente do processamento da uva pode alcançar altos preços quando usado como aditivos nutricionais, sendo de grande interesse os compostos fenólicos, principalmente flavonoides nas cascas e sementes; ou ainda, como matéria prima na indústria cosmética. Com objetivo de substituir os corantes artificiais, o aproveitamento desses flavonoides presentes nas cascas vem sendo alvo de muitos estudos. No Brasil, o principal destino do bagaço ainda são as indústrias de ração animal ou de fertilizantes, um destino pouco valorizado para um resíduo com alto potencial para gerar produtos de interesse industrial. É possível observar na Figura 2.1 a destinação da produção de uvas no Brasil dos últimos 12 anos.

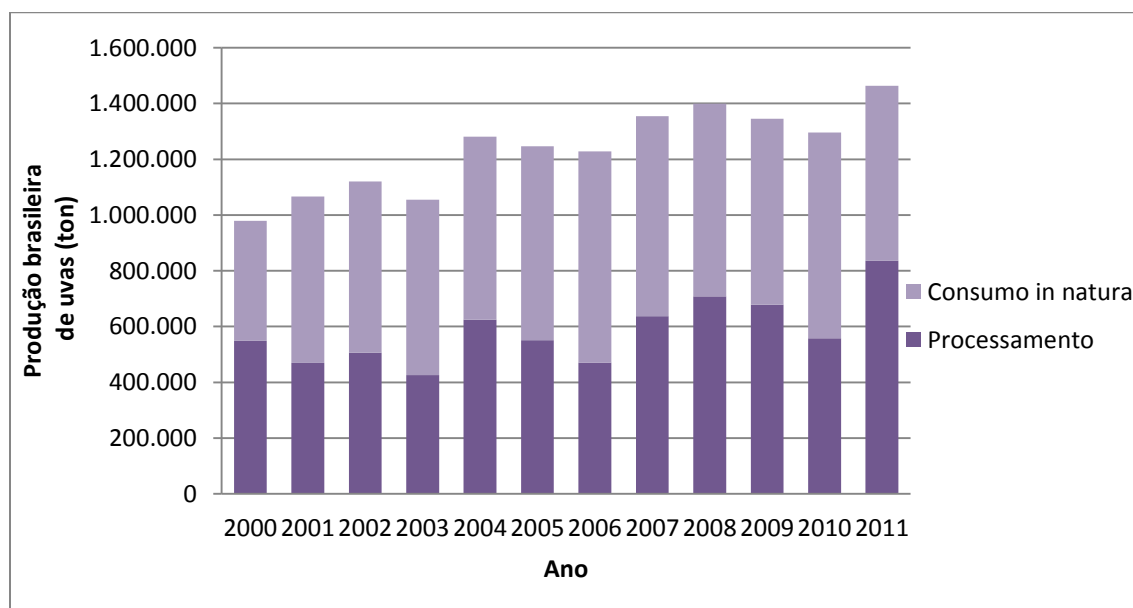


Figura 2.1: Destinação da produção brasileira de uvas, em toneladas (2000-2011).
(Adaptado de Mello (2005), Mello (2008), Mello (2012))

2.2 Compostos bioativos

Compostos bioativos são compostos que possuem alguma atividade benéfica à saúde, cujo consumo pode prevenir ou atenuar determinadas doenças. A capacidade antioxidante exercida por esses compostos neutralizam radicais livres gerados não somente durante os caminhos energéticos e reativos, ou seja, respiração e defesa imunológica, respectivamente, como também durante os caminhos metabólicos (Cornelli, 2009). Esses radicais são maléficos à saúde causando estresse oxidativo que pode se desenvolver para doenças cardiovasculares, câncer e desordens endócrinas e neurológicas, como ilustrado na Figura 2.2.

Lu *et al.* (2006) compararam entre si as atividades antioxidantes de derivados do ácido gálico. O grupo concluiu, em seu estudo, que a ingestão de alimentos que possuem esses compostos fenólicos pode ser a forma mais segura de prevenir doenças neurodegenerativas. Sabe-se que a uva é rica em compostos fenólicos, principalmente em flavonoides, que estão presentes na casca e que exercem função antioxidante.

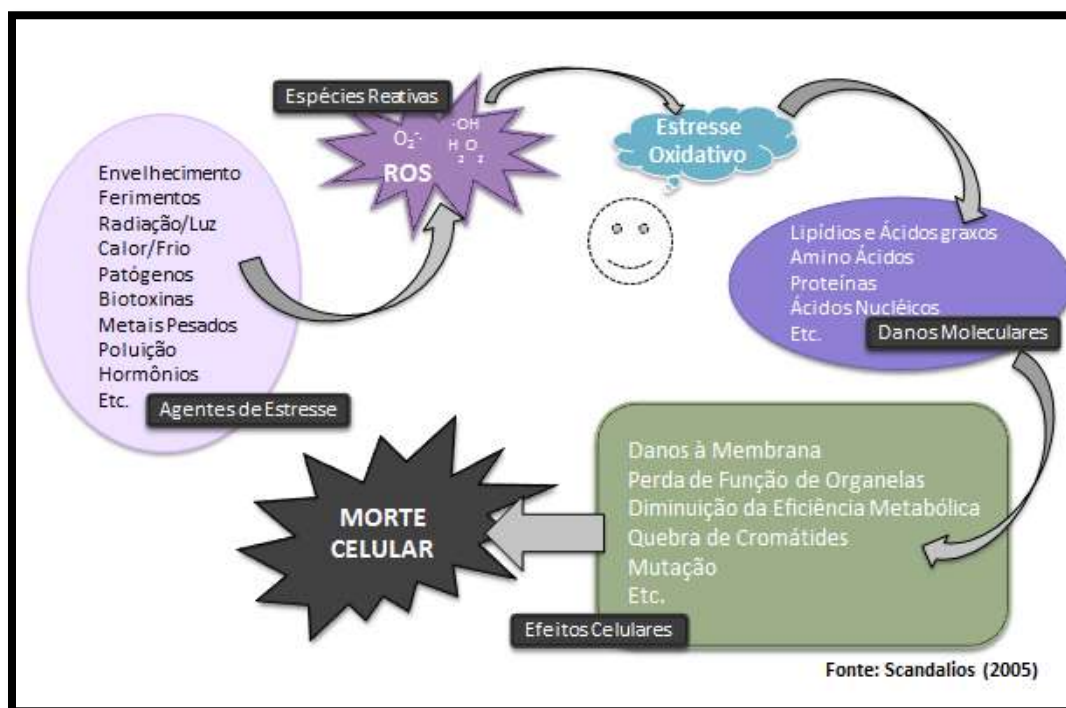


Figura 2.2: Esquema ilustrando a origem dos radicais livres e suas consequências.

2.2.1 Compostos fenólicos

Compostos fenólicos são metabólitos secundários, isto é, metabólitos que exercem funções não vitais à planta, porém funções benéficas, como, por exemplo, defesa ou uma característica atrativa sensorialmente. Metabólitos secundários geralmente são sintetizados pelos vegetais quando submetidos a alguma situação de estresse. Nas uvas está principalmente presente nas cascas na forma de polifenóis ou flavonoides.

Os compostos fenólicos são geralmente quantificados por métodos espectrofotométricos, já que, além de faltar no mercado padrões cromatográficos, ainda há o desconhecimento de muitas estruturas químicas de alguns desses compostos, dificultando e até impossibilitando sua quantificação por cromatografia (Georgé *et al.*, 2005). Ainda assim, estudos mais recentes vêm sendo realizados utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para identificação e quantificação de compostos fenólicos.

Gómez-Alonso *et al.* (2007) propuseram a análise de uvas e vinhos por CLAE com detector de fluorescência e DAD (detector por arranjo de diodos, um detector da faixa do UV). Optou-se por usar ambos os tipos de detectores, já que o detector por fluorescência possibilitou diminuir o limite de quantificação de flavonóis, além de evitar o fracionamento e preparação prévia da amostra, o que aumentaria o tempo necessário de análise. De um modo geral, a metodologia proposta obteve bons resultados, gerando cromatogramas com picos evidentes, bem separados e sem sobreposição. Por esse método foi possível identificar 48 compostos fenólicos através de uma única injeção direta.

Spáčil *et al.* (2008) dividiram 34 compostos fenólicos em diferentes grupos: ácidos fenólicos, flavonoides, catequinas e cumarinas, usando diferentes gradientes para testar sua análise em CLAE e cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE). Os padrões utilizados na cromatografia líquida sofreram diferentes diluições metanólicas de acordo com o grupo analisado e o tipo de cromatografia realizada. Amostras de vinhos branco e tinto e de chás preto e verde foram utilizadas para demonstrar a aplicabilidade da análise em amostras reais. Ambos os métodos se mostraram eficientes na detecção dos compostos fenólicos. Porém, comparando ambos os métodos, o CLUE obteve melhores resultados. Além de reduzir o tempo total de análise em até oito vezes, este foi mais eficiente na detecção de

alguns compostos, além de usar menor volume de reagente, se mostrando assim, no geral, menos oneroso.

Ainda fazendo uso de cromatografia líquida, Hollecker *et al.* (2009) analisaram cascas e sementes de uvas tintas e brancas quanto a sua composição fenólica. A análise utilizou diferentes solventes e adsorventes, possibilitando a identificação de 54 compostos fenólicos. As cascas e sementes das uvas frescas foram primeiramente liofilizadas e, a seguir, submetidas a uma extração metanólica acidificada seguida de secagem à vácuo a 30°C para finalmente sofrerem uma segunda extração em fase sólida (EFS). Esta etapa foi realizada com base no procedimento Bourzeix, usando água acidificada com ácido fórmico, ou no procedimento Kammerer, usando metanol. Os autores chegaram à conclusão que a análise do extrato metanólico sem purificação por EFS é o melhor método dentre os estudados, já que além de demandar menor tempo de análise, é o que envolve o menor custo.

2.2.2 Antocianinas

Antocianinas (do grego *anthos* = flor e *kianos* = azul) fazem parte do grupo dos flavonoides e são o maior grupo de corantes vegetais solúveis em água. Nas uvas, sua concentração varia de 30-750 mg. 100g⁻¹ dependendo da cultivar, época do ano e região em que foi plantada (Bridle & Timberlake, 1997).

As antocianinas são responsáveis pelas colorações rosadas, avermelhadas, violáceas e azuladas de flores, frutos e outras partes vegetais. São compostos altamente sensíveis ao pH que controla a estabilidade estrutural, variando assim a sua coloração. Em pHs ácidos, em torno de 1,0, as antocianinas se encontram na forma do cátion flavilium que favorece cores mais avermelhadas e arroxeadas, já em valores de 2,0 < pH < 4,0, a cor mais predominante é o azul. Em valores de pH mais neutros, entre 5,0 e 6,0, as antocianinas se encontram na forma de chalconas ou carbinol pseudobase que são estruturas incolores. Em pHs mais básicos, as antocianinas são instáveis e, portanto são degradadas de acordo com seus grupos substituintes (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009).

As antocianinas são quantificadas por métodos espectrofotométricos. Pode-se optar pela leitura em pH único (pH=1,0), no qual se quantificam as antocianinas totais, quando

não há a presença de interferentes, tais como antocianinas poliméricas, produtos de degradação, etc.; ou, pelo método do pH diferencial, no qual a leitura é realizada em pHs 1,0 e 4,5. Nesse último, a diferença de leituras é empregada para se quantificar ainda antocianinas monoméricas. Na Tabela 2.1, se encontram as equações envolvidas nos diferentes métodos espectrofotométricos utilizados.

Tabela 2.1 Equações utilizadas nos diferentes métodos espectrofotométricos para quantificação de antocianinas.

Método	Cálculo
pH único	$(Abs_{\lambda_{vis-max}} - Abs_{700nm})_{pH 1}$
pH diferencial	$(Abs_{\lambda_{vis-max}} - Abs_{700nm})_{pH 1} - (Abs_{\lambda_{vis-max}} - Abs_{700nm})_{pH 4.5}$
Índice de degradação	$[(Abs_{\lambda_{vis-max}} - Abs_{700nm})_{pH 1}] / [(Abs_{\lambda_{vis-max}} - Abs_{700nm})_{pH 1} - (Abs_{\lambda_{vis-max}} - Abs_{700nm})_{pH 4.5}]$
Densidade de cor (controle)	$(Abs_{420nm} - Abs_{700nm}) + (Abs_{\lambda_{vis-max}} - Abs_{700nm})$
Densidade polimérica (amostra tratada previamente bisulfito)	$(Abs_{420nm} - Abs_{700nm}) + (Abs_{\lambda_{vis-max}} - Abs_{700nm})$
Índice de escurecimento (amostra tratada previamente bisulfito)	$Abs_{420nm} - Abs_{700nm}$

É assumido em todas as equações um caminho ótico de 1 cm. $Abs_{\lambda_{vis-max}}$, Abs_{700nm} e Abs_{420nm} representam máximo de absorbância da amostra naquele comprimento de onda em certo.

Fonte: Giusti & Jing (2007)

2.3 Extração sólido-líquido

Como dito anteriormente, vários estudos vêm sendo realizados com o objetivo de aproveitar resíduos com alto valor agregado de uma maneira mais polida. Além de diminuir o custo de tratamento e de descarte, há uma valorização desse resíduo que passará a ser tratado como um subproduto do processo.

No caso do bagaço residual do processamento de uvas, diferentes métodos de extração são alvos de pesquisa e otimização. Dentre eles, o que mais se destaca é a extração sólido-líquido que utiliza principalmente álcoois diluídos e, em alguns casos, acidificados. Na Tabela 2.2 abaixo, estão descritas as principais metodologias de extração de compostos bioativos a partir de produtos e subprodutos da indústria vitivinícola que são encontradas atualmente na literatura.

Tabela 2.2: Dados comparativos ilustrando os diferentes métodos de extração de compostos bioativos encontrados na literatura.

Método de extração	Objetivo	Resultados obtidos	Conclusões	Referência
Extração sólido-líquido superaquecida da casca, previamente separada do bagaço da uva.	Análise da eficiência da extração com superaquecimento.	Foi estudada a extração hidroetanólica superaquecida, que aumentou a taxa de hidrólise de antocianinas e outros flavonóis glicosilados. Por outro lado, extração superaquecida obteve rendimento superior a processos empregando condições não extremas.	30 minutos de extração foram suficientes para total extração dos compostos.	(Luque-Rodríguez <i>et al.</i> , 2007)
Extração sólido-líquido dos engaços da uva liofilizados após remoção de sua clorofila com diclorometano.	Determinar a condição ótima de extração de polifenóis.	A melhor condição de extração obtida a partir da análise do planejamento fatorial completo 2 ³ depende do polifenol que se deseja extrair e da cultivar de uva utilizada.	Não é possível definir a melhor condição de extração sem considerar a cultivar e o composto fenólico a que se visa obter.	(Karvela <i>et al.</i> , 2009)
Extração sólido-líquido da semente da uva Muscadínea.	Foram estudadas as extrações da semente da uva Muscadínea em pó utilizando acetona, metanol ou etanol em diferentes concentrações como solventes em razão 10:1 solvente:substrato.	As soluções de acetona 50% ou 75% obtiveram melhores resultados do que soluções 60% etanol ou 70% metanol na extração de compostos fenólicos da semente de Muscadínea.	Solventes monocomponentes são insuficientes para total extração dos compostos fenólicos, obtendo, quando diluídos em água, melhores resultados.	(Yilmaza & Toledo, 2006)
Extração sólido-líquido do bagaço da uva tinta Barbera.	Otimizar a extração de compostos fenólicos do bagaço da uva tinta Barbera, considerando a cinética da extração a 45°C e 60°C e a concentração etanólica empregada.	Por motivos econômicos preferiu-se fazer a extração hidroetanólica do bagaço de uva a 60°C durante 5h em uma razão solvente:substrato 4:1. O rendimento aumentou ao diluir o etanol até 70%, se manteve constante até 50% e a concentrações abaixo de 50% houve uma queda.	A extração usando etanol 70% a 60°C durante 5h obteve os melhores rendimentos.	(Spigno <i>et al.</i> , 2007)

Método de extração	Objetivo	Resultados obtidos	Conclusões	Referência
Extração sólido-líquido do bagaço da uva tinta Barbera	Estudo da cinética da extração hidroetanólica 40% e da estabilidade dos extratos hidroetanólicos obtidos antes e após liofilização.	A cinética de extração seguiu tendência de primeira ordem. Os extratos se mantiveram estáveis durante 1 ano, quando armazenados a 4°C na forma de solução ou após a liofilização e armazenamento a 25°C. O teor de compostos fenólicos se manteve estável independente do pH durante 400 dias, apesar da capacidade antioxidante ser prejudicada em pHs mais ácidos.	O estudo da estabilidade é um indicativo de que os extratos obtidos podem ser potenciais ingredientes funcionais, principalmente pela alta estabilidade em uma faixa abrangente de pHs. O tempo de extração não altera a qualidade do extrato, apenas a concentração dos compostos extraídos.	(Amendola <i>et al.</i> , 2010)
Extração sólido-líquido do bagaço da uva tinta <i>Negro amaro</i>	Determinar a quantidade das diferentes classes de compostos fenólicos do extrato hidroetanólico acidificado com 0,5% 0,1N HCl com razão 1:30 p:v obtido a partir do bagaço de uva tinta <i>Negro amaro</i> , assim como de sua casca e semente.	Os extratos obtidos a partir da semente da uva eram mais ricos que os obtidos da casca ou do bagaço, alcançando 8,58, 3,33 e 4,19g compostos fenólicos·100g bagaço ⁻¹ , respectivamente, sendo mais de 94% desses compostos pertencentes à classe dos flavonoides.	Baseado nos resultados obtidos, os extratos poderiam ser usados como fonte natural de antioxidantes, podendo substituir antioxidantes sintéticos utilizados no mercado.	(Negro <i>et al.</i> , 2003)
Extração contínua aquosa	Analisar efeitos de três variáveis independentes: fluxo (de 2 a 3 mL·min ⁻¹), quantidade de amostra (entre 2,5 e 7,5g) e tamanho de partícula (entre 0,5 e 5,5mm) na eficiência da extração contínua.	O melhor resultado, tanto em relação ao teor de compostos fenólicos, quanto em relação à atividade antioxidante (AA) foi aquele em que todas as variáveis se encontravam no seu mínimo, i.e 2 ml·min ⁻¹ , 2,5g de amostra com partículas de 0,5mm. As primeiras 4h de extração se caracterizarão pela diminuição da AA com o tempo, até que, após 4h de extração, um platô foi alcançado.	O menor fluxo, quantidade de amostra e tamanho de partícula proporciona a maior extração de compostos fenólicos revelando uma maior capacidade antioxidante. É importante citar que essa conclusão pode variar de acordo com a matriz estudada.	(Pinelo <i>et al.</i> , 2005)

2.4 Sistema de Separação por Membranas

Sistemas de membranas têm a capacidade de não somente separar compostos, como também de concentrá-los e por isso é muito utilizado nas indústrias de alimentos, farmacêutica e de cosméticos.

Alguns trabalhos vêm sendo realizados utilizando diversos sistemas de membranas não somente com bebidas a base de uva, como também com extratos obtidos a partir do bagaço de uva com objetivo de separar ou concentrar compostos bioativos.

Em alguns países, o amadurecimento e a vindima ocorrem apenas uma vez por ano, dessa maneira os volumes de suco de uva produzidos são muito elevados, aumentando a necessidade de manter a qualidade do produto durante um período de tempo longo. Levando esse fato em consideração, Rektor *et al.* (2006) utilizaram o sistema de membranas com objetivo de aumentar o período de estabilização do mosto. Nesse estudo, os autores realizaram uma destilação por membranas (DM) e destilação osmótica (DO) para remover a água do suco, alcançando, dessa maneira, uma alta concentração de açúcar, próxima a 60°Brix. Foi possível através de ambos os tratamentos diminuir a atividade da água a ponto de ser possível armazenar o mosto à temperatura ambiente. Com os resultados positivos alcançados, os autores afirmam que seria possível aplicar esse processamento em outras matrizes.

Massot *et al.* (2008) avaliaram o emprego do sistema de membranas na indústria vitivinícola. O emprego da ultra e da nanofiltração na produção de vinhos teve como objetivo reduzir o teor alcoólico para até 6% v/v. Adicionalmente, o uso de osmose reversa em conjunto com uma resina de troca iônica possibilitou a redução da acidez volátil e de compostos *off flavour* do vinho.

DESENVOLVIMENTO DO PROJETO E RESULTADOS

Os próximos capítulos englobam o desenvolvimento do projeto propriamente dito e os resultados obtidos. O capítulo 3 foi subdividido em 4 subcapítulos. No primeiro abordou-se o procedimento experimental realizado na extração hidroetanólica em escala de bancada para definir a melhor condição de extração, e sua aplicação em escala piloto com posterior concentração em sistema de membranas e secagem por atomização. No segundo, por sua vez, descreveu-se como foram realizadas as análises de teor de compostos bioativos. Os dois últimos subcapítulos tratam dos processos unitários a que foi submetido o extrato obtido. No item 3.3, descreveu-se como o extrato foi concentrado em processo de separação por membranas, enquanto no 3.4 se relatou a etapa de atomização por *spray dryer*. No Capítulo 4 discutiu-se e analisou-se os resultados obtidos. Com base nos dados otimizados em escala de bancada e piloto, avaliou-se, no capítulo 5, o processo de recuperação de compostos bioativos. Nesse capítulo propõe-se um fluxograma simplificado para ampliação de escala visando obter um extrato rico em compostos bioativos. Um estudo de pré-viabilidade econômica, para estimar a lucratividade do processo, foi proposto no capítulo 6.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Extração hidroalcoólica

Um planejamento fatorial 2^3 com triplicata no ponto central foi conduzido em escala de bancada para analisar e selecionar a melhor condição de extração dos compostos bioativos. Os fatores avaliados foram o pH, a concentração da solução hidroetanólica e a razão solvente:substrato. As variáveis de resposta selecionadas foram: concentração de compostos fenólicos e de antocianinas e a atividade antioxidante total. Para as análises estatísticas, utilizou-se o programa *portable Statistica*® 8.0 (Statsoft, EUA).

Ao avaliar os resultados do planejamento fatorial 2^3 verificou-se que a curvatura foi estatisticamente significativa. Por esta razão um segundo planejamento, composto central rotacional, foi proposto conforme ilustrado na Tabela 3.1. Neste caso, seis novos experimentos referentes aos pontos axiais foram adicionados.

Tabela 3.1: Matriz do planejamento composto central com triplicata no ponto central.

Ensaio	pH		Concentração Etanol		Razão Solvente:substrato	
	Codificado	Real	Codificado	Real (%)	Codificado	Real
01	-1	2	-1	30	-1	3
02	-1	2	-1	30	+1	9
03	-1	2	+1	70	-1	3
04	-1	2	+1	70	+1	9
05	+1	4	-1	30	-1	3
06	+1	4	-1	30	+1	9
07	+1	4	+1	70	-1	3
08	+1	4	+1	70	+1	9
09	$-\alpha$	1,3	0	50	0	6
10	$+\alpha$	4,7	0	50	0	6
11	0	3	0	50	$-\alpha$	0,95
12	0	3	0	50	$+\alpha$	11,05
13	0	3	$-\alpha$	16,4	0	6
14	0	3	$+\alpha$	83,6	0	6
15 (C)	0	3	0	50	0	6
16 (C)	0	3	0	50	0	6
17 (C)	0	3	0	50	0	6

Nesse trabalho, uma extração sólido-líquido, empregando uma solução extratora alcoólica, foi utilizada. Optou-se por uma solução hidroetanólica ao invés da metanólica ou de hidrólises ácidas já que se objetiva obter um extrato com propriedades

antioxidantes ou de corantes para ser aplicado na própria indústria vitivinícola ou em outras indústrias alimentícias em substituição aos antioxidantes e corantes sintéticos. Pelo mesmo motivo, optou-se por utilizar o ácido cítrico, um acidulante muito utilizado em indústrias alimentícias, para se ajustar o pH da solução extratora.

Devido à intensa desidratação em que se encontrava o bagaço proveniente do processamento do suco de uva, foi necessária uma prévia hidratação com volume de água correspondente à metade de sua massa. Essa reidratação ocorreu durante uma hora, sob repouso à temperatura constante igual a 30°C. Em seguida, foi adicionada ao bagaço hidratado a solução extratora correspondente, e a extração foi, então, realizada em *shaker* a 60 RPM e 50°C durante 120 minutos. A escolha dessa temperatura foi baseada na temperatura ótima de extração encontrada por Pinelo *et al.* (2005), que concluíram que há uma direta proporcionalidade entre o coeficiente de extração promovido pelo aumento na solubilidade do soluto quando a temperatura aumenta. Por outro lado, temperaturas elevadas podem favorecer a desnaturação dos compostos bioativos a que se almeja extrair. Para uma remoção grosseira dos sólidos em suspensão, a mistura foi filtrada em funil de Buchner sem papel de filtro. O extrato filtrado foi então recolhido, pesado, armazenado em frascos devidamente identificados e congelados até o momento da análise. Para padronização dos diferentes resultados obtidos, foram consideradas as concentrações de compostos bioativos por 100 gramas de bagaço.

Os experimentos na unidade piloto foram conduzidos nas condições experimentais selecionadas em escala de bancada: pH ajustado para 4,0, 30 % etanol na solução e razão solvente: substrato 9:1. A etapa de hidratação, em escala semipiloto, não foi alterada, controlando-se a temperatura de 30°C e adicionando-se um o volume de água correspondente à metade da massa de bagaço. A extração (Figura 3.1) propriamente dita ocorreu a 50°C em um tanque encamisado com agitação mecânica (Figura 3.2) de 48 RPM durante 120 minutos.



Figura 3.1: Extração do bagaço de uva em escala semipiloto.

Em seguida, a mistura foi recolhida (Figura 3.3) e centrifugada com objetivo de separar o extrato do bagaço. O bagaço foi descartado, enquanto o extrato foi armazenado em câmara de congelamento para posterior processamento no sistema de membranas. Parte do extrato obtido foi armazenada em recipientes de amostra para realização de análises de teor de compostos bioativos, como descrito a seguir.



Figura 3.2: Agitador mecânico (A) do tanque encamisado (B) utilizado na extração em escala semipiloto.



Figura 3.3: Recolhimento do extrato obtido juntamente com o bagaço residual em escala semipiloto.

3.2 Análises de teor de compostos bioativos

3.2.1 Atividade antioxidante (AA)

A extração dos compostos antioxidantes foi realizada seguindo procedimento descrito por Rufino *et al.* (2007), que utiliza metanol 50% e acetona 70% como solventes extratores; e a análise de atividade antioxidante total foi baseada no método espectrofotométrico proposto por Re *et al.* (1999), utilizando como padrão o Trolox. A reação colorimétrica de oxirredução utiliza como reagentes o radical 2,29-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonicacid) (ABTS•⁺) e etanol 95%.

Nesse trabalho, a capacidade antioxidante foi expressa em $\mu\text{mol Trolox} \cdot (100 \text{ g bagaço})^{-1}$, no caso dos extratos, e, em $\mu\text{mol Trolox} \cdot (\text{g de extrato microencapsulado})^{-1}$ no caso dos pós. Esses valores foram calculados com base em uma curva padrão de Trolox, cuja absorvância é lida a 734 nm (Figura 3.4), conforme as Equações 1a e 1b, abaixo:

	$AA = (Abs_{734nm} \times coef. ang.^{-1}) \times c(\text{Amostra})^{-1} \quad [1a]$
	$AA_{extrato} = 100 * AA * (m_{extrato} \times m_{bagaço}^{-1}) \quad [1b]$
Nas quais:	Abs_{734nm} – Absorvância lida a 734nm; c(Amostra) – concentração da amostra; $m_{extrato}$ e $m_{bagaço}$ – massa do extrato e do bagaço, respectivamente.

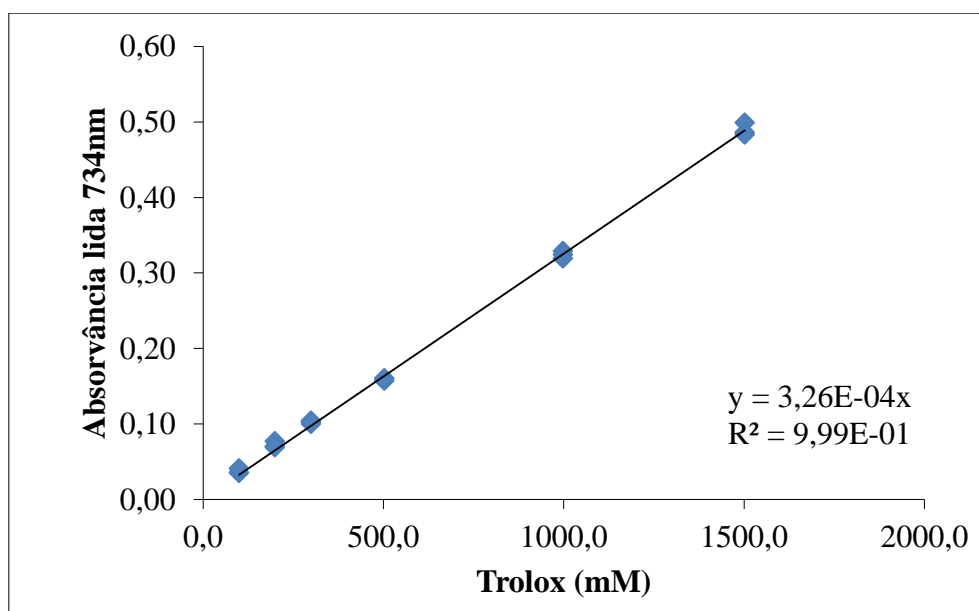


Figura 3.4: Exemplo de curva padrão de Trolox, lida em espectrofotômetro a 734 nm.

3.2.2 Compostos fenólicos totais (FT)

Para a análise de fenólicos totais, seguiu-se o método espectrofotométrico proposto por Singleton e Rossi (1965) e modificado por Georgé *et al.* (2005), em que o ácido gálico é utilizado como padrão. A reação colorimétrica fez uso dos reagentes *Folin-Ciocalteu* 10% e carbonato de sódio a 7,5%. Os resultados obtidos foram expressos em ácido gálico equivalentes ($\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de bagaço), no caso dos extratos obtidos e em $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de pó obtido após a microencapsulação, conforme os cálculos abaixo:

	$FT = (Abs_{760\text{nm}} \times coef. \text{ ang.}^{-1}) \times c(\text{Amostra})^{-1}$	[2A]
	$FT_{\text{extrato}} = 100 * FT * (m_{\text{extrato}} \times m_{\text{bagaço}}^{-1})$	[2B]
	$FT_{\text{microencapsulado}} = 100 * FT$	[2C]
Nas quais:	ABS _{760nm} – Absorbância lida a 760nm; c(Amostra) – concentração da amostra; m _{extrato} e m _{bagaço} – massa do extrato e do bagaço, respectivamente.	

Os coeficientes angulares utilizados nas equações acima são obtidos a partir da curva padrão de ácido gálico (Figura 3.5), cuja absorbância foi lida a 760 nm.

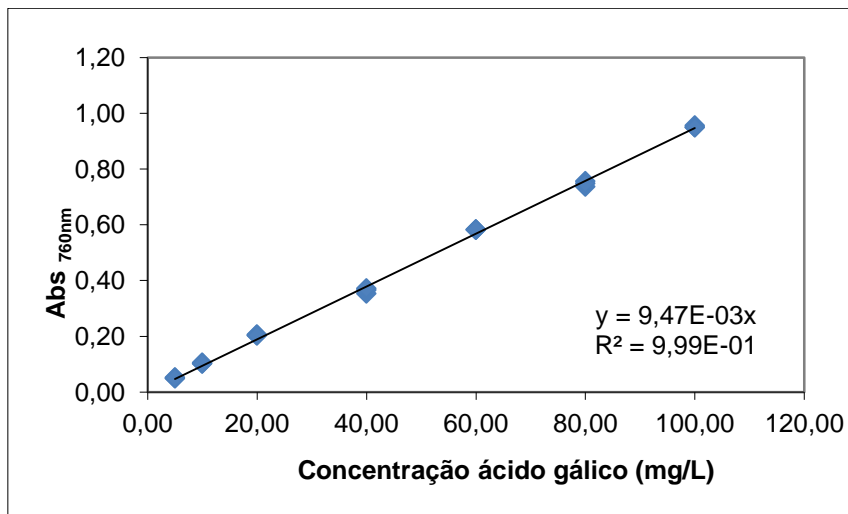


Figura 3.5: Exemplo de curva padrão de ácido gálico, lida em espectrofotômetro a 760nm.

3.2.3 Antocianinas (AT/AM)

A análise de antocianinas por pH diferencial teve por base a metodologista proposta por Giusti *et al.* (2001), sendo a leitura realizada a 520 nm, considerando a absorbância máxima para malvidina-3,5-diglicosídeo, e a 700 nm para descontar a turbidez da amostra.

3.3 Processo de separação por membranas

Como método de concentração do extrato hidroetanólico obtido a partir do bagaço de uva, optou-se, nesse trabalho, pela nanofiltração, que foi realizada em escala semipiloto. Para tanto, fez-se uso de um sistema de membrana plana em módulo espiral de poliamida com 2,5 m² de área filtrante total (Figura 3.6). Inicialmente, a permeabilidade hidráulica foi medida, mantendo-a superior a 90% da permeabilidade nominal da membrana. A nanofiltração foi conduzida a 40°C com pressão aplicada ao sistema de 12 bar, condição determinada previamente por avaliação do fluxo limite a 20, 30 e 40°C. O processo foi realizado em regime de batelada alimentada até que se atingisse um fator de concentração volumétrica (Equação 3) de no mínimo 10.



Figura 3.6: Sistema de membrana plana em módulo espiral utilizado na nanofiltração do extrato obtido, em escala piloto, a partir do bagaço de suco de uva.

$$FCV = \frac{V(\text{Retido})}{V(\text{Alimentação})} \quad [3]$$

Na qual: FCV – fator de concentração volumétrico;
V(Retido) e V(Alimentação) – volume da fração retida e da alimentação, respectivamente.

O permeado foi recolhido em sua totalidade e o fluxo de permeado medido em kg.h⁻¹m⁻² a cada 5 minutos (Equação 4). O objetivo desta etapa foi concentrar os compostos bioativos presentes no extrato.

$$J = \frac{m}{A_{\text{filtrante}} \times t}, \quad \text{em Kg} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2} \quad [4]$$

Na qual: J – fluxo de permeado;
m – massa;
A_{filtrante} – área filtrante;
t – tempo.

3.4 Atomização por *Spray Dryer*

Com objetivo de eliminar o etanol presente no concentrado, o extrato passou pelo processo de rotaevaporação (Figura 3.7) antes de seguir para a etapa de atomização. Esse processo ocorreu à temperatura constante de 50 °C, abrindo-se a válvula sempre que necessário para evitar a contaminação do etanol recuperado. O processo foi conduzido sob a forma de batelada alimentada até peso constante. A massa de etanol na mistura foi calculada por gravimetria.

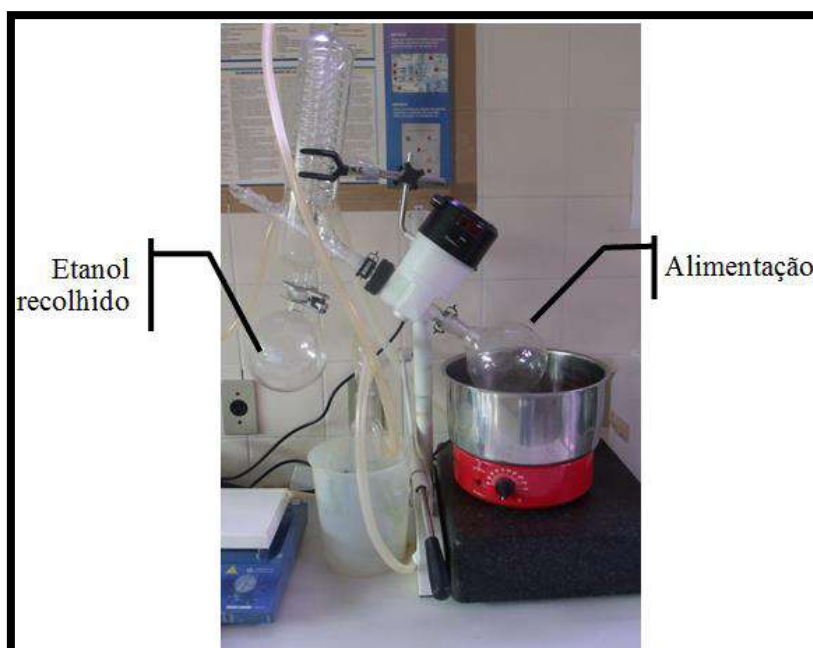


Figura 3.7: Rotaevaporador utilizado para remoção do etanol presente no concentrado obtido pelo processo de nanofiltração.

O equipamento utilizado na etapa de atomização foi o *minispray dryer* da marca Buchii, modelo B190 (Figura 3.8). A secagem foi realizada com corrente de ar a 170°C na entrada e temperatura de saída de 90°C. A formulação contendo maltodextrina, na proporção de uma parte do extrato para duas partes da mistura, encapsulante foram bombeados no atomizador do spray a uma vazão de 1040,33 g·h⁻¹. O material de parede, em excesso, foi um método para garantir que todas as partículas fossem corretamente microencapsuladas. A microencapsulação teve duração total de *ca.* 24 min. Embalagens do tipo *stand up pouch*, de alumínio e polietileno de baixa densidade (PEBD), seladas a vácuo foram utilizadas para armazenamento do produto em pó recolhido. A temperatura de armazenamento foi mantida a 25°C até serem retiradas alíquotas para análises.



Figura 3.8: Spray dryer modelo B190 da marca Büchi.

4. RESULTADOS OBTIDOS

Baseado nos resultados obtidos por meio do planejamento fatorial 2^3 (Tabela 4.1) foi possível ajustar modelos matemáticos de segunda ordem conforme descritos pelas Equações 5a a 5d, para prever as principais variáveis de resposta em função dos fatores analisados.

[5a]	$AA = -1228,72 + 435,26*(x_1) + 39,78*(x_2) - 122,62*(x_3) - 4,22*(x_1*x_2) + 42,28*(x_1*x_3) + 2,75*(x_2*x_3)$
[5b]	$FT = -412,712 + 119,485*(x_1) + 14,135*(x_2) - 18,022*(x_3) - 2,504*(x_1*x_2) + 7,683*(x_1*x_3) + 0,221*(x_2*x_3)$
[5c]:	$AT = -120,271 + 40,269*(x_1) + 3,542*(x_2) + 7,289*(x_3) - 0,816*(x_1*x_2) - 0,556*(x_1*x_3) + 0,001*(x_2*x_3)$
[5d]	$AM = -58,3108 + 24,5948*(x_1) + 2,4950*(x_2) + 0,5320*(x_3) - 0,7168*(x_1*x_2) + 0,8047*(x_1*x_3) + 0,0567*(x_2*x_3)$

onde: AA: Atividade Antioxidante; FT=Fenólicos Totais, AT= Antocianinas Totais; AM=Antocianinas Monoméricas; e, x_1 = pH, x_2 = concentração de etanol e x_3 = razão solvente/substrato.

Os valores previstos pelos modelos matemáticos estão comparados com os obtidos experimentalmente na Tabela 4.1. Pode-se concluir que o modelo de segunda ordem se ajusta bem aos dados experimentais, já que os desvios médios, quando ajustados para a AA, FT, AT e AM, respectivamente, foram aproximadamente 14%, 10%, 7% e 2%. O maior desvio, encontrado para a AA, provavelmente, é decorrente do acúmulo de erros analíticos na análise espectrofotométrica que envolve as etapas de extração, bem como uma reação de oxirredução na presença de um radical muito instável, o ABTS⁺.

Tabela 4.1: Resultados obtidos experimentalmente e estimados pelo modelo matemático.

Ensaio	pH	Etanol (%)	Razão s:s	AA (µmol Trolox)			FT (mg ác. gálico)			AT (mg malvidina 3,5-diglicosídeo)			AM (mg malvidina 3,5-diglicosídeo)		
				EST	EXP	Desvio (%)	EST	EXP	Desvio (%)	EST	EXP	Desvio (%)	EST	EXP	Desvio (%)
01	2	30	3	715,32	856,93 ^f ± 76,23	16,53	111,99	117,78 ^g ± 8,40	4,44	36,19	41,89 ⁱ ± 0,41	13,61	34,25	34,70 ^g ± 0,35	1,29
02	2	30	9	981,96	841,14 ^f ± 54,50	16,74	135,83	130,20 ^f ± 2,60	0,66	73,43	67,72 ^g ± 0,59	8,43	57,30	56,86 ^c ± 0,61	0,78
03	2	70	3	2298,92	2158,13 ^d ± 141,29	6,52	503,59	497,91 ^c ± 11,78	3,97	112,71	107,03 ^b ± 1,18	5,30	83,51	83,06 ^b ± 0,73	0,54
04	2	70	9	3225,56	3368,06 ^{b,c} ± 293,78	4,23	580,47	586,52 ^a ± 13,91	0,97	150,19	155,84 ^a ± 1,62	3,63	120,17	120,63 ^a ± 2,63	0,38
05	4	30	3	1586,32	1445,47 ^c ± 48,44	9,74	246,82	241,09 ^c ± 11,12	4,75	64,43	58,76 ^h ± 2,38	9,65	45,26	44,81 ^f ± 2,38	1,01
06	4	30	9	2360,32	2502,50 ^d ± 155,41	5,68	362,86	368,74 ^d ± 16,13	0,32	95,00	100,70 ^c ± 1,52	5,66	77,97	78,42 ^b ± 1,56	0,58
07	4	70	3	2832,32	2974,77 ^c ± 55,00	4,79	438,10	443,93 ^d ± 6,31	1,70	75,67	81,41 ^{e,f} ± 1,85	7,05	37,17	37,62 ^g ± 2,18	1,18
08	4	70	9	4266,32	4126,68 ^a ± 135,15	3,38	607,18	601,71 ^{a,b} ± 31,79	3,35	106,48	100,79 ^c ± 3,90	5,65	83,49	83,05 ^b ± 4,37	0,53
09 (C)	3	50	6	2283,38	2986,82 ^c ± 163,04	22,98	373,36	504,32 ^c ± 24,37	25,97	89,26	76,20 ^f ± 1,23	17,15	67,39	62,50 ^{d,e} ± 0,92	7,82
10 (C)	3	50	6	2283,38	3556,06 ^b ± 184,16	35,63	373,36	542,08 ^b ± 2,61	31,12	89,26	88,76 ^d ± 3,17	0,57	67,39	71,38 ^c ± 3,08	5,59
11 (C)	3	50	6	2283,38	3107,59 ^c ± 159,87	25,88	373,36	551,63 ^{a,b} ± 18,73	32,32	89,26	85,91 ^{d,e} ± 1,35	3,90	67,39	68,85 ^{c,d} ± 1,28	2,12

(C): ponto central; EXP: valor obtido experimentalmente; EST: valor estimado pelo modelo; Desvio (%) = $(|EXP - EST|/EXP) \times 100$

Letras iguais na coluna indicam valores estatisticamente iguais ($p \leq 0,05$ pelo teste de Tukey).

Resultados expressos por 100g de bagaço

É importante citar que os planejamentos fatorial 2^3 com triplicata no ponto central e o composto central rotacional, apresentaram diferenças importantes em relação ao coeficiente de ajuste (R^2) do modelo matemático proposto por ambos. A análise de dados para a atividade antioxidante total retornou primeiramente um valor alto para o coeficiente de regressão ($R^2=0,97$). Entretanto o coeficiente do ajuste do planejamento fatorial rotacional foi muito baixo ($R^2=0,45618$). A análise de compostos fenólicos também apresentou uma queda no coeficiente de ajuste de 0,99521 para 0,52272. O mesmo ocorre na análise de antocianinas totais e monoméricas: com quedas de 0,96099 para 0,61045 e de 0,99284 para 0,61075, respectivamente. Dessa maneira, o modelo matemático mais adequado para explicar a extração dos compostos bioativos presentes no bagaço de suco de uva foi o obtido no planejamento fatorial 2^3 . Ao avaliar o rendimento global pela ferramenta do programa estatístico identificou-se o maior rendimento empregando-se a condição contendo 70% de etanol com pH ajustado para 2,0 e razão solvente: substrato 9:1.

A análise de variância permite afirmar que os resultados obtidos para AA se aproximam com 97% de certeza dos valores estimados pelo modelo proposto. No gráfico de Pareto (Figura 4.1) é possível concluir quais variáveis são estatisticamente significativas. Observa-se que o teor de etanol no solvente é a variável à qual a eficiência de extração foi mais sensível. Esse resultado é similar ao encontrado pelos autores Karacabey e Mazza (2010), que estudavam a influência das variáveis ‘temperatura’, ‘concentração etanólica’ e ‘razão solvente:substrato’ na extração hidroetanólica do rebento de uva. Assim como nesse trabalho, eles chegaram à conclusão de que a concentração de etanol no solvente foi uma variável que apresentou diferenças significativas, enquanto a razão solvente:substrato foi menos relevante. A condição de melhor extração encontrada por eles empregava uma solução 58%_{v/v} etanol, em uma razão 70 mL·g⁻¹, a 83,6 °C, e resultou em uma AA de 238,6 μmol Trolox·g⁻¹ em base seca, analisada pelo método TEAC. Nesse trabalho, a AA variou de 841,14±54,50 μmol Trolox·100g⁻¹ bagaço a 4126,68±135,15 μmol Trolox·100g⁻¹ bagaço.

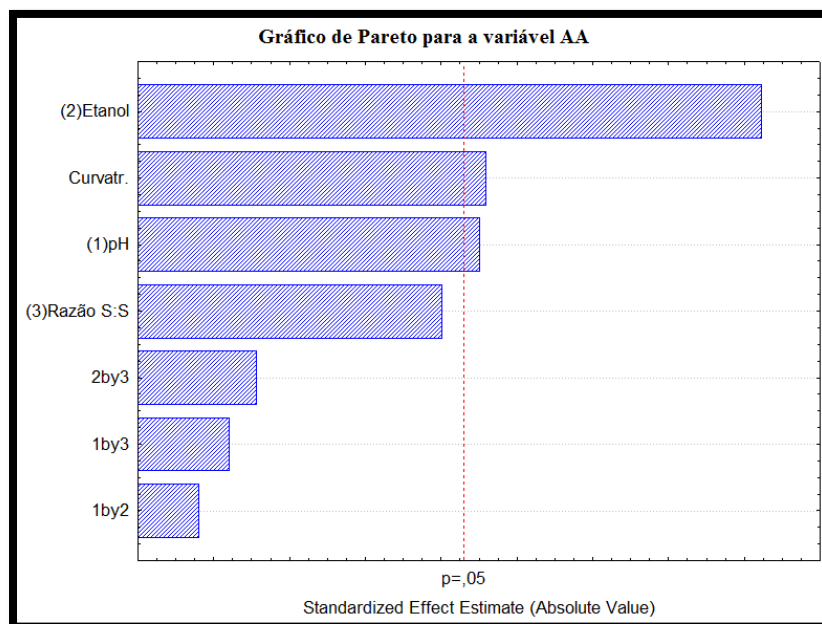


Figura 4.1: Gráfico de Pareto para a variável AA.

As superfícies de resposta para a capacidade antioxidante estão ilustradas nos Anexos. Ao plotar os resultados de pH x etanol, superfície B da Figura A 1, observa-se um aumento significativo da atividade antioxidante com o aumento do pH e da concentração de etanol no solvente. A condição ótima estimada pelo programa estatístico foi aquela que empregou solução 70% etanol, pH 4,0 em uma razão 9:1 solvente:substrato. Essa condição resultou em $4.126,68 \pm 135,15 \mu\text{mol Trolox} \cdot (100 \text{ g bagaço})^{-1}$. Esse resultado foi bem próximo ao encontrado por González-Paramás *et al.* (2004) para o bagaço proveniente do processamento do vinho tipo *Merlot*, $4.200 \mu\text{mol} \cdot (100 \text{ g bagaço})^{-1}$, que dentre as variedades de vinhos e uvas analisadas pelos autores foi a que resultou em melhores resultados de AA.

Ao compararmos esse resultado com alguns frutos brasileiros estudados por Rufino *et al.* (2010), a capacidade antioxidante do extrato obtido é bem próxima à encontrada para Murta ($4.910 \mu\text{mol Trolox} \cdot 100\text{g}^{-1}$), Puçá Coroa de Frade ($3.850 \mu\text{mol Trolox} \cdot 100\text{g}^{-1}$) e Jabuticaba ($3.750 \mu\text{mol Trolox} \cdot 100\text{g}^{-1}$), todos expressos em base fresca. Pellegrini *et al.* (2003) fizeram a análise de antioxidantes por diversos métodos a partir de algumas frutas e bebidas consumidas na Itália, dentre eles uvas e vinhos. Em suas análises pelo método do TEAC, os autores verificaram que uvas tintas e brancas apresentam atividade antioxidante de 385 e 248 $\mu\text{mol Trolox} \cdot 100\text{g}^{-1}$ em base fresca, respectivamente, atividade essa aproximadamente 1,43 e 2,22 vezes menor que a encontrada para o extrato hidroetanólico

aqui estudado, considerando o resultado obtido para o ensaio ótimo que empregou solução 70% etanólica, pH 4,0 em uma razão solvente:substrato 9:1, — 5,50 $\mu\text{mol Trolox}\cdot(\text{g extrato})^{-1}$. Já os vinhos apresentaram atividade entre 1.520 e 12.140 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, i.e. atividade 3,27 vezes menor a 2,45 vezes maior.

Xu *et al.* (2010) estudaram o teor de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante de diversas cultivares de uva cultivadas na China. Os valores de AA pelo método do TEAC variou de 7.633 a 64.985 $\mu\text{mol Trolox}\cdot(100 \text{ g})^{-1}$ em base seca nas sementes e 7.176 a 50.775 $\mu\text{mol Trolox}\cdot(100 \text{ g})^{-1}$ nas cascas. Considerando os menores teores, a capacidade antioxidante das sementes e cascas foi apenas 1,84 e 1,74 vezes maiores, respectivamente, que a relativa ao encontrado para o extrato hidroetanólico do bagaço de uva,.

No gráfico de Pareto (Figura 4.2) abaixo, observa-se, mais uma vez, que o teor de etanol no solvente foi a variável à qual a extração de fenólicos foi mais sensível. Foram ainda significativos a curvatura, o fator de interação do pH com a concentração hidroetanólica, a razão solvente:substrato e o pH.

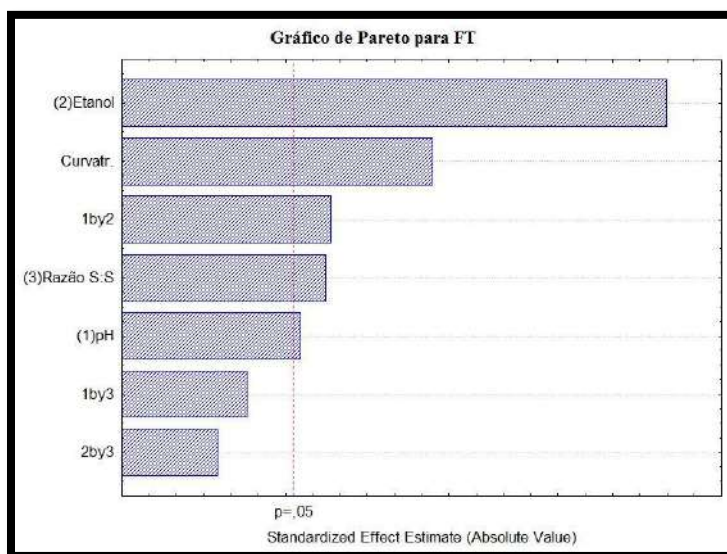


Figura 4.2: Gráfico de Pareto para a variável FT

Na superfície B da Figura A2, nos Anexos, é possível observar como independente do pH empregado, a extração dos FT é amplamente favorecida com soluções mais concentradas em etanol. O mesmo ocorre ao variar a razão solvente:substrato (superfície

C), comprovando assim sua importância na eficiência de extração. A análise estatística realizada também indicou que o fator de interação do pH com a concentração de etanol é significativa para a extração.

Como esperado, os valores obtidos de FT seguem o mesmo padrão obtido pela análise de AA, já que além dos compostos fenólicos apresentarem atividade antioxidante, ambas as metodologias analíticas baseiam-se em reações de oxirredução. O melhor resultado, mais uma vez, corresponde ao teste em que se usa solução 70% de etanol a pH 4,0 e razão solvente:substrato de 9:1 (601,71 mg ác. gálico·100 g⁻¹ bagaço). É possível observar ainda, que soluções a 30% etanol possuem uma menor capacidade de extração de fenólicos, sendo a média, 368,03 mg·100 g⁻¹. Além disso, a extração de FT obedece ao comportamento reportado por Spigno *et al.* (2007) com relação à concentração de etanol.

A análise de Antocianinas foi dividida, como já dito, entre as totais (AT) e as monoméricas (AM). É possível verificar nos gráficos de Pareto (Figura 4.3 e Figura 4.4) que o pH não foi significativo na extração das antocianinas.

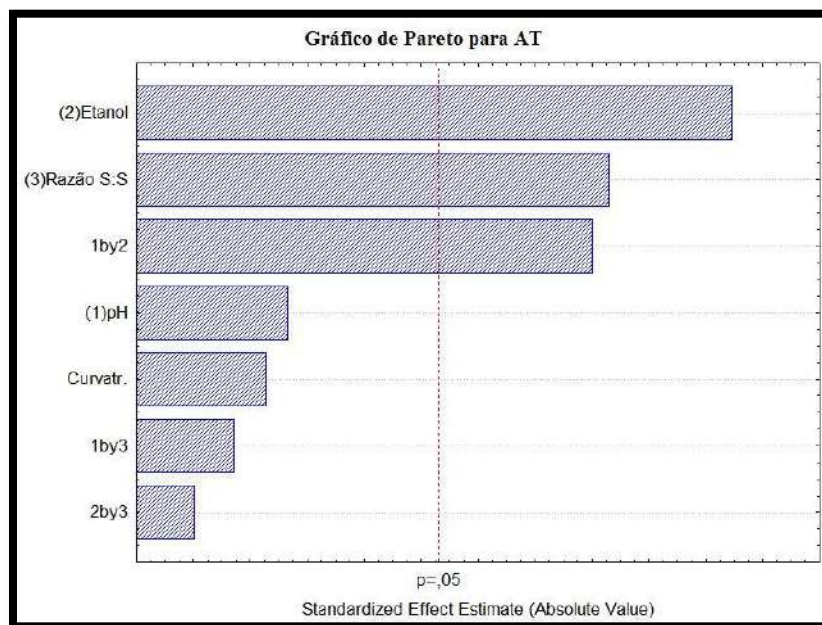


Figura 4.3: Gráfico de Pareto para a variável 'Antocianinas Totais'.

Novamente, no caso das AT, a concentração da solução hidroetanólica foi a variável a qual a extração foi mais sensível, reforçando sua importância na extração dos compostos

bioativos presentes no bagaço de uva. Já no caso das AM, observa-se que sua extração foi mais sensível à razão solvente:substrato.

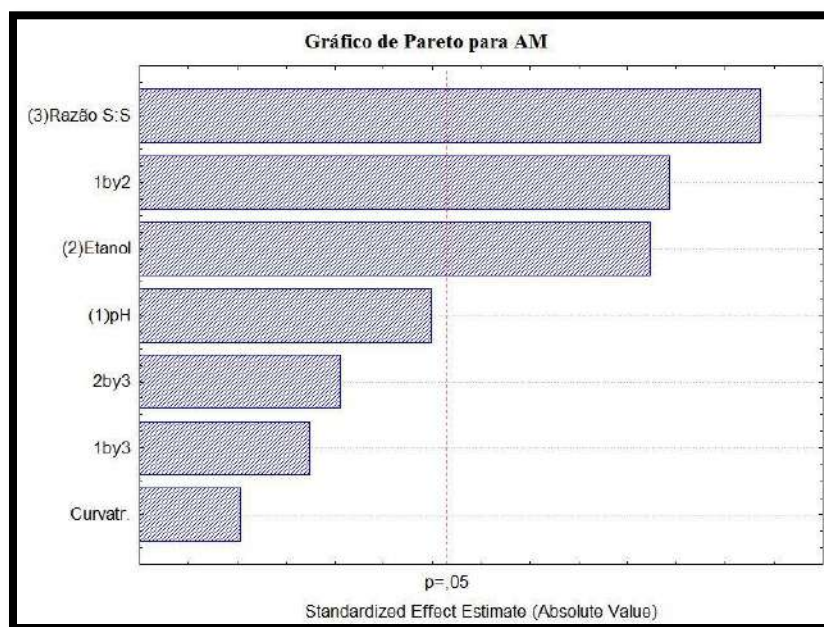


Figura 4.4: Gráfico de Pareto para a variável ‘Antocianinas Monoméricas’

Ao plotar os dados obtidos (Figura A 3 e Figura A 4), observa-se claramente que em pH 2,0 quanto mais concentrada a solução extratora de etanol, maior a concentração de antocianinas extraídas do bagaço, porém ao analisar a pH 4,0, a diferença não é tão explícita, comprovando, assim, como mostrado no gráfico de Pareto, que o fator de interação dessas variáveis é estatisticamente significativo. Adicionalmente, ficou claro que o ensaio que usou solução extratora 70% de etanol em pH 2,0 e com razão solvente:substrato 9:1 alcançou resultado de antocianinas mais expressivo. Nesse ensaio o teor de AM foi de $120,63 \pm 2,63$ mg malvidina-3,5-diglicosídeo $\cdot (100 \text{ g bagaço})^{-1}$. Ao compararmos esse dado com aqueles reportados na literatura, conclui-se que a faixa selecionada para avaliar a extração de antocianinas forneceu resultados mais promissores. Ao analisar o teor de AM de diferentes marcas de sucos de uva simples e reconstituídos do mercado de Belo Horizonte/MG, Malacrida e Motta (2005) encontraram uma média de $28,70 \pm 3,41$ e $17,31 \pm 1,90$ mg malvidina-3,5-diglicosídeo $\cdot L^{-1}$ em sucos de uva simples e reconstituído, respectivamente, valores aproximadamente 5,4 e 8,7 vezes menores que os encontrados nas melhores condições experimentais utilizadas para a extração de bagaço de suco de uva. Considerando que, na condição de 70% etanol, pH 2,0 e razão

solvente:substrato 9:1, utilizou-se 15,05 g de bagaço na extração, em escala de bancada, que renderam 120 mL de extrato, pesando 115,30 g, o teor de AM foi de 151,32 mg·L⁻¹ (Equação 6).

$$c(\text{AM no extrato}) = m(\text{AM no extrato}) \cdot V(\text{Extrato})^{-1}$$

$$= 15,0526 g_{\text{bagaço}} \times \frac{120,63 \text{ mg AM}}{100 g_{\text{bagaço}}} \times (0,120 L)^{-1} = \mathbf{151,32 \text{ mg} \cdot L^{-1}} \quad [6]$$

Esse resultado indica o quão eficiente foi a extração hidroetanólica do bagaço e que apenas 30 a 40% dos compostos coloridos da uva são extraídos durante a produção de suco de uva (Gómez-Plaza, Miñano, & López-Roca, 2006).

Por outro lado, ao compararmos o teor médio encontrado para FT em sucos de uva simples e reconstituídos, Malacrida e Motta (2005), obtiveram resultados superiores de 1,43±0,12 e 1,05±0,07 g·L⁻¹ respectivamente. Na melhor condição de extração para FT, 70% etanol, pH 4,0 em uma razão 9:1 solvente:substrato, utilizou-se 15,16 g de bagaço de suco de uva que renderam 126 mL de extrato com 113,70 g com um teor fenólico de 601,71 mg · (100 g bagaço)⁻¹, concentração aproximadamente 2 e 1,5 vezes menores que as médias reportadas para sucos de uva simples e reconstituídos, respectivamente.

$$c(\text{FT no extrato}) = m(\text{FT no extrato}) \cdot V(\text{Extrato})^{-1}$$

$$= 15,1562 g_{\text{bagaço}} \times \frac{601,71 \text{ mg AM}}{100 g_{\text{bagaço}}} \times (126 \text{ mL})^{-1} = \mathbf{0,72 g \cdot L^{-1}} \quad 7$$

Pode-se, portanto concluir que diferentes concentrações da solução extratora devem ser usadas para otimizar a extração dos diferentes compostos bioativos de interesse. Karvela *et al.* (2009) chegaram à mesma conclusão ao analisar as hastes do pé de uva como fonte de compostos bioativos. Soluções mais concentradas em etanol e com elevada razão solvente:substrato extraem mais compostos, sendo a mais ácida, pH 2,0, mais apropriada para extração de antocianinas, enquanto a de pH 4,0 melhor para extração de outros compostos fenólicos e antioxidantes. Isto pode ser explicado pelo aumento na solubilidade dos compostos de interesse quando se aumenta a proporção de etanol na solução e pelo aumento na força motriz de transporte de massa quando se aumenta a relação

solvente:substrato. Nesse caso, a solução ótima encontrada pelo programa estatístico foi a que empregou solução 70% etanol, pH 2,0 em uma razão solvente:substrato 9:1.

O fluxo permeado alcançado a partir do extrato obtido com a solução extratora contendo 70% de etanol foi muito baixo quando comparado com o fluxo típico para soluções aquosas já registradas no sistema de membranas utilizado (Figura 4.5). Essa queda é observada, já que a membrana utilizada, apesar de própria para alimentos, não é a ideal para soluções alcoólicas. Para superar esta dificuldade, selecionou-se a condição experimental cuja solução extratora continha a menor concentração de etanol (30%), obtendo-se um fluxo permeado cerca de seis vezes maior.



Figura 4.5: Processo de nanofiltração do extrato obtido a partir do bagaço de suco de uva, em escala semipiloto.

Pode-se observar na Figura 4.6, uma diminuição do fluxo de permeado ao longo do tempo de processo. Isso ocorre devido aos seguintes fatores: *fouling*, entupimento e polarização de concentração (Habert *et. al*, 2006). O fluxo de permeado inicial encontrado foi de $23,8 \text{ kg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$, sendo o fluxo médio de $14,9 \text{ kg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$.

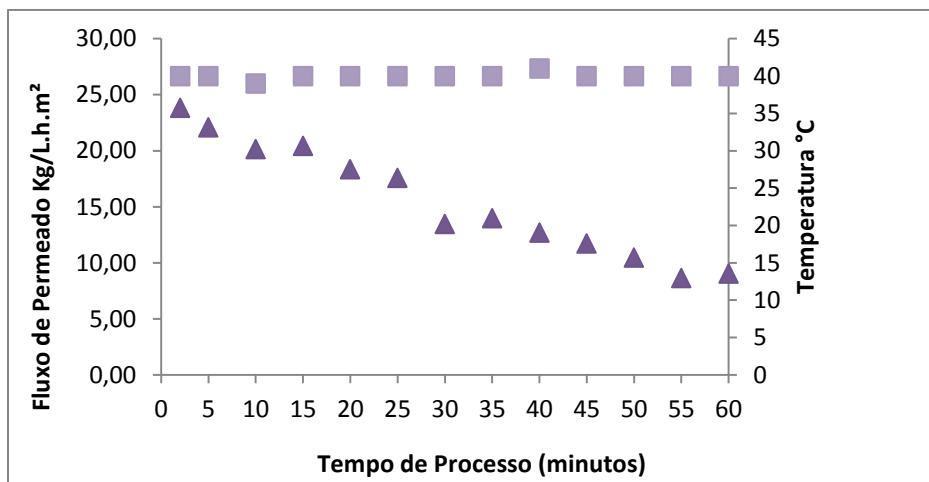


Figura 4.6: Fluxo de permeado (▲) e temperatura (■) em função do tempo de processo.

A nanofiltração promoveu um fator de concentração volumétrico (FCV) de 10,14. Pode se ver, na Figura 4,7, que esse fator se comportou exponencialmente com o tempo de processamento, com $FCV = 0,8341e^{0,038t}$ e $R^2 = 0,98$.

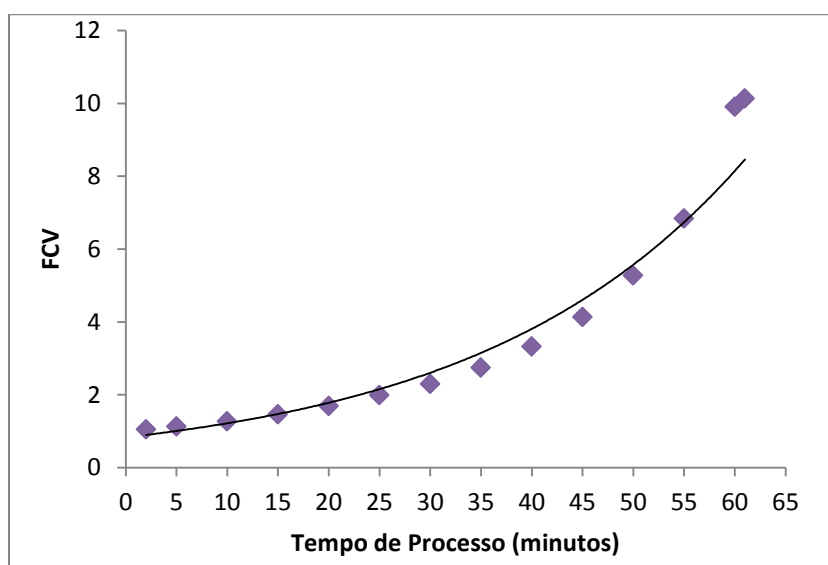


Figura 4.7: Fator de concentração do produto em função do tempo de processo.

Os resultados obtidos, FT, AT e AM, assim como a AA nas correntes do processo estão ilustrados na Tabela 4.2, abaixo.

Tabela 4.2: Resultados das correntes da Nanofiltração.

Correntes/ Análises	AA ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ extrato)	FT ($\text{mg}\cdot\text{100g}^{-1}$ extrato)	AT ($\text{mg}\cdot\text{100g}^{-1}$ extrato)	AM ($\text{mg}\cdot\text{100g}^{-1}$ extrato)
Alimentação	4,32 ± 0,13	55,40 ± 2,77	13,71 ± 0,07	10,90 ± 0,06
Permeado	N/D	N/D	N/D	N/D
Retido	49,02 ± 6,72	593,17 ± 25,64	155,23 ± 3,48	119,42 ± 4,13
FCV	10,14	10,14	10,14	10,14
FC_{analítico}	11,34	14,88	9,65	8,71

N/D – Não Detectado

Observa-se que enquanto o fator de concentração volumétrico foi de 10,14, o fator de concentração analítico variou de 8,71 a 14,88.

O extrato concentrado pela nanofiltração seguiu para a etapa de atomização (Figura 4.7) para ser microencapsulado. Na Tabela 4.3, abaixo, estão expostos os resultados das análises de compostos bioativos realizadas na corrente de alimentação do *spray dryer* e no pó obtido.

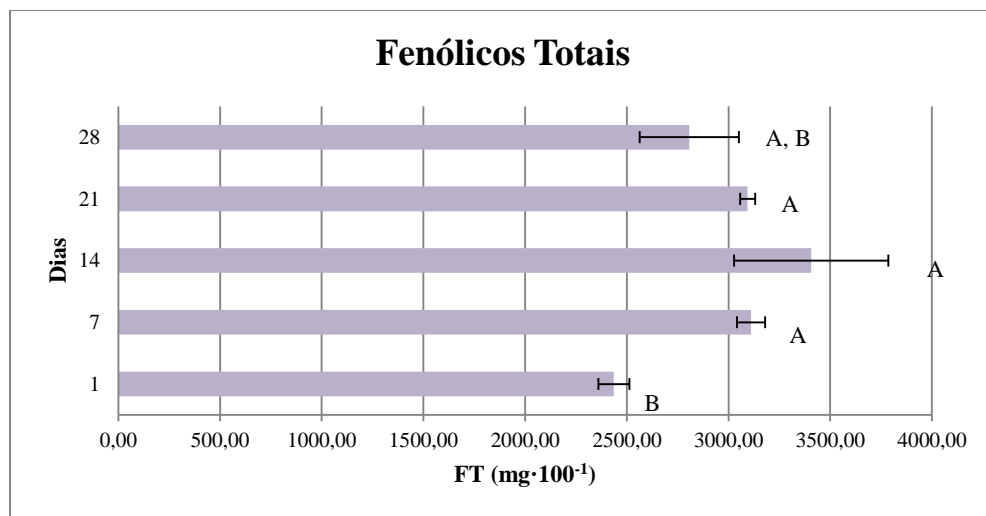
Tabela 4.3: Resultados da corrente da atomização.

Correntes/ Análises	AA ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$)	FT ($\text{mg}\cdot\text{100g}^{-1}$)	AT ($\text{mg}\cdot\text{100g}^{-1}$)	AM ($\text{mg}\cdot\text{100g}^{-1}$)
Alimentação	31,46 ± 3,39	788,07 ± 28,26	56,45 ± 2,73	38,86 ± 2,26
Microencapsulado	180,69 ± 16,76	2393,45 ± 24,25	403,94 ± 10,30	403,94 ± 10,30



Figura 4.7: Processo de secagem por atomização do concentrado do extrato de bagaço de suco de uva.

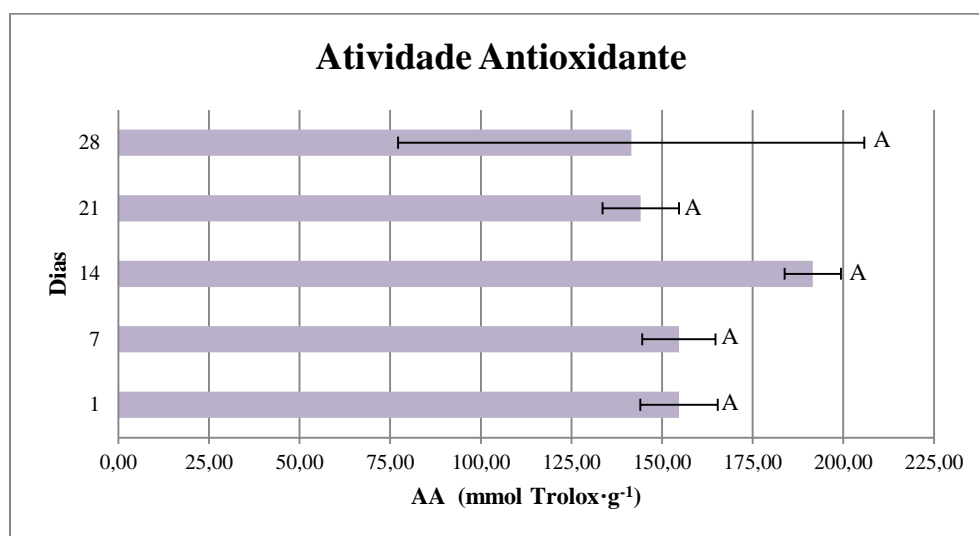
Foram realizadas análises de estabilidade em intervalos de sete dias durante um mês. Os resultados de estabilidade estão expostos na forma de gráficos de barras (Figura 4.8 a Figura 4.10), abaixo. É possível observar que, durante todo o tempo de análise, o teor de FT (Figura 4.8) se manteve estatisticamente constante. Apenas no primeiro dia de análise, o valor obtido foi inferior aos demais. Isso provavelmente está associado a uma má homogeneização da amostra, de modo que a alíquota retirada apresentasse menor quantidade de compostos fenólicos.



Letras iguais significam resultado estatisticamente igual pelo teste de Tukey com $p \leq 0,05$.

Figura 4.8: Gráfico de barras referente às análises de estabilidade de compostos Fenólicos Totais (FT).

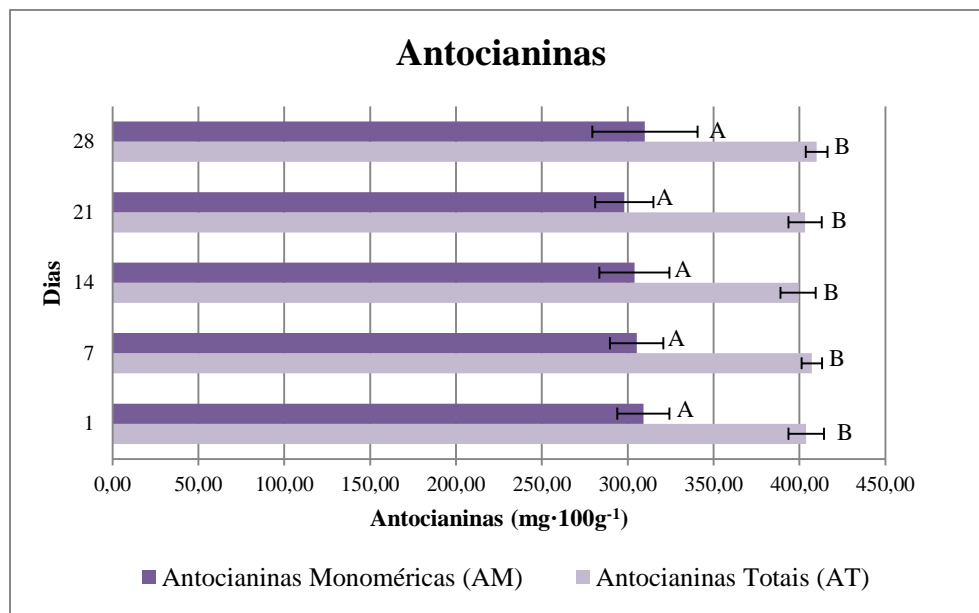
O mesmo é observado ao se tratar de capacidade antioxidante (Figura 4.9). Os valores, durante todo o período da análise, não apresentaram diferenças estatísticas. Novamente, é possível afirmar que o perfil antioxidante acompanha o comportamento dos FT, já que são estes os principais compostos que contribuem para uma elevada AA, como já descrito anteriormente.



Letras iguais significam resultado estatisticamente igual pelo teste de Tukey com $p \leq 0,05$.

Figura 4.9: Gráfico de barras referente às análises de estabilidade da Atividade Antioxidante (AA).

O perfil de estabilidade de antocianinas (Figura 4.10) foi o que apresentou melhor dispersão, pouco variando o seu teor ao longo das semanas analisadas. Esse fato comprova a estabilidade deste pigmento quando armazenado sob condições adequadas em ambiente com temperatura e pressão controlados.



Letras iguais significam resultado estatisticamente igual pelo teste de Tukey com $p \leq 0,05$.

Figura 4.10: Gráfico de barras referente às análises de estabilidade AT e AM.

5. PROCESSO DE RECUPERAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

5.1 Fluxograma simplificado do processo proposto

Hidratação: Devido à baixa umidade do bagaço proveniente das indústrias de derivados da uva, é necessária, antes da extração, uma prévia hidratação com volume de água correspondente a metade da massa alimentada. Essa reidratação dura uma hora e ocorre a temperatura constante e igual a 30°C, sob repouso.

Extração: Esta é a principal etapa, na qual os compostos bioativos ainda presentes no bagaço são extraídos. O processo envolve uma etapa de difusão destes solutos para a solução extratora devido ao gradiente de concentração do meio em relação à concentração de saturação ($C-C_{\text{saturação}}$) e uma etapa de convecção para o meio líquido promovido pela agitação. No caso da extração hidroetanólica, aqui discutida, é adicionada uma solução com pH 4,0, 70% etanol em uma razão solvente:substrato 9:1.

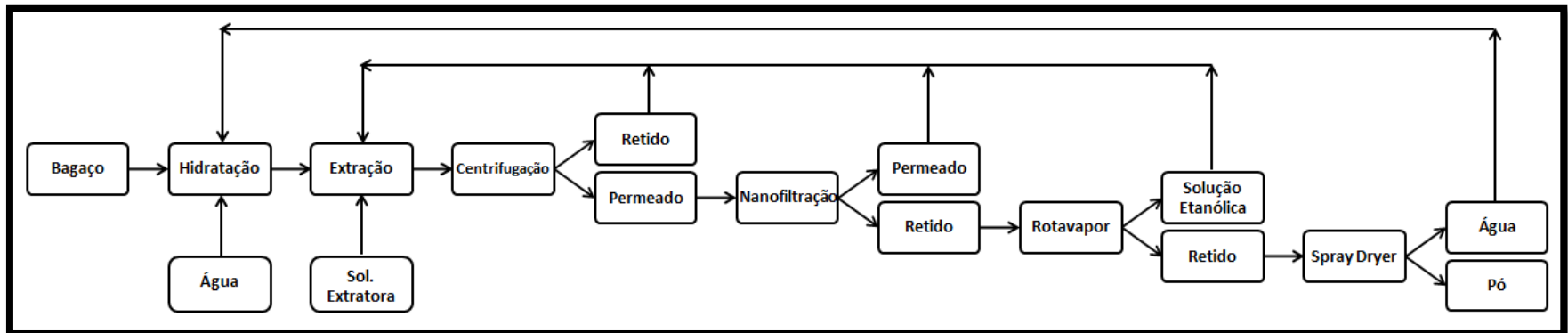


Figura 5.1: Fluxograma simplificado do processo proposto.

Separação Sólido Líquido: Etapa necessária para remoção dos componentes bioativos do bagaço da uva da solução extratora. Essa separação pode ser realizada por diferentes métodos. A centrifugação é a mais utilizada industrialmente para separar compostos insolúveis com diferença de densidade muito pequena.

Nanofiltração: Primeira etapa de concentração, na qual ocorre principalmente a eliminação do solvente (mistura etanol/água). Ocorre, portanto, a separação em duas correntes, o **retido** e o **permeado**. No retido, ficam concentrados os compostos de interesse, enquanto o permeado é constituído principalmente pelo solvente hidroalcoólico.

Evaporador à vácuo: Sistema necessário para recuperar o etanol do extrato. O etanol pode ser reciclado para a etapa de extração e o retido pode seguir para a etapa de secagem em spray-dryer.

Spray-Dryer: Etapa de secagem, em que o extrato líquido é microencapsulado com um material de parede por atomização. Esta etapa fornece um produto estável mais apropriado para comercialização, na forma de um pó rico em compostos bioativos. Com a atomização, há uma facilitação do transporte e da armazenagem do extrato pulverizado.

6. AVALIAÇÃO ECONÔMICA

Por ser um processo ainda não estabelecido e não implementado, não há informações na literatura quanto aos investimentos em máquinas, equipamentos e materiais de processo, assim como todos os fatores relacionados à montagem de uma unidade industrial; e, este englobando a geração e a distribuição de utilidades, a tancagem e estocagem para matérias-primas e produtos, o tratamento de efluentes e outras instalações complementares (IFT). Portanto, fica claro que é necessário o cálculo desses fatores para que se obtenha uma estimativa do investimento necessário para a construção de uma planta de recuperação de bagaço. Com base no estudo econômico realizado por Almeida, Amorim e Assunção (2010), foram calculados os parâmetros utilizados na análise de viabilidade econômica para uma planta de produção de pó microencapsulado rico em compostos bioativos obtidos a partir do bagaço de suco de uva. Além disso foi feita uma comparação com base no custo de matérias primas e utilidades das duas condições experimentais selecionadas para o processo em escala semipiloto.

Como já amplamente discutido ao longo do trabalho, as principais matérias-primas envolvidas na obtenção do extrato hidroetanólico de bagaço de suco de uva são o bagaço proveniente da produção de suco de uva, ácido cítrico, álcool etílico e água. Seus custos estão ilustrados na Tabela 6.1, abaixo.

Tabela 6.1: Custo das principais matérias primas e utilidades.

Matéria Prima	Unidade (un)	Preço/un	Marca	Fonte
Ácido cítrico anidro	500 g	10,08 R\$	Reagentes PA/ACS	Fornecedor: Quimibras Ind. Quim. S.A. Resolução CAMEX N° 52, DE 24/07/12
	1 ton	1600 US\$	n/a	
Etanol	1 L	11,88 R\$	VETEC	Preço referente à última cotação feita pela EMBRAPA ICIS (Ethanol (USA) Price Report - Chemical pricing information - ICIS Pricing, 2008)
	3,79 L	4,17 US\$	n/a	
H₂O	1 m ³	2,02 R\$	n/a	Tarifa Industrial cobrada pela Corsan

Com base nos dados das Tabela 6.2 e Tabela 6.3 foi calculado o volume de bagaço, proveniente do processamento de suco de uva, produzido anualmente apenas no estado do Rio Grande do Sul.

Tabela 6.2: Massa de bagaço gerado na produção de 100 L de Vinho Branco e de Vinho Tinto.

Referência	Vinho Branco		Vinho Tinto	
	(Campos L. M., 2005)	(CORREIO RIOGRANDENSE, 2004)	(Campos L. M., 2005)	(CORREIO RIOGRANDENSE, 2004)
Bagaço Gerado (kg)	20	17	17	13,5

Foram encontrados dados referentes aos bagaços gerados na produção de vinho branco e vinho tinto. A produção de bagaço proveniente do processamento de suco de uva teve como base a massa de bagaço gerado na produção de 100 L de vinho branco, ou seja, 20 kg·(100 L)⁻¹suco.

Tabela 6.3: Produção de vinhos, sucos e derivados do Rio Grande do Sul, em litros.

PRODUÇÃO	2008	2009	2010	2011
Vinho de mesa	287.506.811	205.399.206	195.267.979	257.840.749
Tinto	241.057.928	164.124.454	157.290.088	210.113.358
Branco	42.942.053	39.211.278	35.408.083	46.007.504
Rosado	3.506.830	2.063.474	2.569.809	1.719.887
Vinho fino	47.334.502	39.900.568	24.805.713	47.598.471
Tinto	27.583.032	18.209.043	11.401.406	24.104.740
Branco	18.812.571	21.366.975	13.013.027	22.739.426
Rosado	938.898	324.550	391.280	754.305
Suco de uva integral	11.817.941	16.034.003	26.887.259	39.487.800
Mosto Simples	53.683.415	53.418.555	45.912.040	77.285.998
Outros derivados	5.959.360	4.043.975	5.298.716	8.774.925
Total	521.375.259	433.828.592	414.365.132	578.809.563

Fonte: Mello, (2012)

Para o cálculo do custo variável anual, foi considerada a produção de suco de uva integral no ano de 2011 no Estado do Rio Grande do Sul. O bagaço gerado foi estimado de acordo com a Equação 8.

$$Bagaço_{gerado} = \frac{Volume_{Suco} \times 20kgBagaço}{100LSuco} = \frac{39487800L \times 20kg}{100L} \quad 8$$

$$Bagaço_{gerado} = 7897,560tBagaço.$$

O custo variável do processo foi calculado para as escalas de bancada, piloto, industrial e anual, como exposto na Tabela 6.4, considerando tanto uma solução extratora contendo 30% etanol, ajustado com ácido cítrico para pH 4,0, em uma razão solvente:substrato 9:1, quanto para a solução que emprega 70% etanol, pH 2,0 em uma razão solvente:substrato de 9:1. O custo da água foi calculado separadamente, já que não há

uma tarifa única para todo o território brasileiro. Para a conversão de moedas, foi utilizado o câmbio do dia 21/02/2013, fornecido pelo Banco Central do Brasil (1.97 R\$ por 1.00 US\$). Pode-se verificar que, além de ser a melhor condição para viabilizar tecnicamente o processo de nanofiltração, o custo de matérias-primas envolvidas na solução 70% de etanol, pH 4,0 que será empregada numa razão solvente:substrato 9:1 é bem inferior ao custo da outra solução, sendo aproximadamente 77%, 77% e 76% menor quando avaliada nas escalas de bancada, piloto e industrial, respectivamente. Em escala industrial o custo variável da produção a partir do extrato hidroetanólico 30% é de aproximadamente 2979,36 US\$.t⁻¹ bagaço.

Nesse estudo, visou-se a utilizar 40% do bagaço gerado na produção de suco de uva no Rio Grande do Sul. Os indicadores econômicos Valor Presente Líquido (VPL) e Taxa Interna de retorno (TIR) foram usados como critério de decisão no estudo de viabilidade econômica.

Tabela 6.4: Custo das matérias primas em escala piloto, industrial e anual.

Condição pH 2,0, EtOH 70%, S:S 9					Custos							
Escala	Bancada		Piloto		Industrial	Anual	Bancada	Piloto	Industrial	Anual		
Bagaço	15	g	5200	g	1	t	7897,560	t	n/a	n/a	n/a	n/a
Sol. Extrat.	0,14	L	46,800	L	9000	L	71078040	L	n/a	n/a	n/a	n/a
Ácido Cítrico	50,12	g	17374,101	g	3,34	T	26387,12	t	R\$ 1,01	R\$ 350,26	USD 5.345,88	USD 42.219.386,99
EtOH	0,1	L	32,760	L	6300	L	49754628	L	R\$ 1,12	R\$ 389,19	USD 6.931,66	USD 54.743.218,67
Sub Total =							R\$ 2,13	R\$ 739,45	USD 12.277,54	USD 96.962.605,66		
H ₂ O Total	0,05	L	16,640	L	3200	L	25.272.192	L	R\$ 0,00	R\$ 0,03	R\$ 6,46	R\$ 51.049,83
H ₂ O hidrat.	0,01	L	2,60	L	500	L	3.948.780	L	R\$ 0,00	R\$ 0,01	R\$ 1,01	R\$ 7.976,54
H ₂ O	0,04	L	14,04	L	2700	L	21.323.412	L	R\$ 0,00	R\$ 0,03	R\$ 5,45	R\$ 43.073,29
Sub Total =							R\$ 0,00	R\$ 0,03	R\$ 6,46	R\$ 51.049,83		
Total =							R\$ 2,13	R\$ 739,48	USD 12.280,82	USD 96.988.499,56		
Condição pH 4,00, EtOH 30%, S:S 9					Custos							
Escala	Bancada		Piloto		Industrial	Anual	Bancada	Piloto	Industrial	Anual		
Bagaço	30	g	5200	g	1	t	7897,56	t	n/a	n/a	n/a	n/a
Sol. Extrat.	0,27	L	46,80	L	9000	L	71078040	L	n/a	n/a	n/a	n/a
Ácido Cítrico	0,03	g	5,45	g	0,001	t	8280,29	t	R\$ 0,00	R\$ 0,11	USD 1,68	USD 13.248.460,65
EtOH	0,04	L	14,04	L	2700	L	21323412	L	R\$ 0,48	R\$ 166,80	USD 2.970,71	USD 23.461.379,43
Sub Total =							R\$ 0,48	R\$ 166,91	USD 2.972,39	USD 36.709.840,08		
H ₂ O Total	0,21	L	35,36	L	6800	L	53703408	L	R\$ 0,00	R\$ 0,07	R\$ 13,74	R\$ 108.480,88
H ₂ O hidrat.	0,02	L	2,60	L	500	L	3948780	L	R\$ 0,00	R\$ 0,01	R\$ 1,01	R\$ 7.976,54
H ₂ O sol. Ext.	0,19	L	32,76	L	6300	L	49754628	L	R\$ 0,00	R\$ 0,07	R\$ 12,73	R\$ 100.504,35
Sub Total =							R\$ 0,00	R\$ 0,07	R\$ 13,74	R\$ 108.480,88		
Total =							R\$ 0,48	R\$ 166,98	USD 2.979,36	USD 36.764.864,62		

Nesse estudo, foi considerada apenas a solução extratora contendo 30% de etanol. Inicialmente foi realizado um balanço de massa (Tabela 6.5) com as correntes de entrada e saída de todos os equipamentos envolvidos no processo.

Tabela 6.5: Balanço de massa

Material	ton/h	ton/ano
Bagaco de uva	0,681	3.159,02
Água	4,289	19.901,85
Etanol	1,838	8.529,36
Ácido cítrico	0,714	3.312,96
Extrato aquoso (corrente de saída do extrator)	7,149	33.169,75
Extrato aquoso (corrente de saída da NF)	0,572	2.653,58
Extrato aquoso (corrente de saída do rotavapor)	0,43	1.990,19
Pó microencapsulado	0,071	329,57

A partir da capacidade da planta foi possível estimar o investimento total necessário, que engloba o investimento de capital (IC) e o capital de giro (CG). Para o cálculo de IC foi necessário estimar o investimento fixo, partida (*start up*) e projeto, portanto foi necessário avaliar os custos de equipamentos (subtotal 1), das instalações (subtotal 2) e os custos de construção civil (subtotal 3) que considerou uma planta de 600m² instalada no Rio Grande do Sul (Tabela 6.7).

Os custos operacionais do sistema de membranas, do evaporador e do *spray dryer* foram calculados baseados na literatura (Almeida *et al.*, 2010; Sapekie & Renshaw,1983), conforme ilustrado na Tabela 6.6.

Tabela 6.6: Principais Máquinas e Equipamentos

Principais Máquinas e Equipamentos	Fornecedor	Potência (KW)
Extrator	Estimado	20
Encaixotadora	KOPEMPACK	2,5
Empacotadora/Enchedora	São Caetano – SACHET	15
Módulo de Membranas	Borges, et al, 2006	3
Evaporador 3 estágios	Caldeira SEMYA	-
Spray-dryer	NIRO ATOMIZER DO BRASIL	-
Custo Operacional Evaporador (R\$/ano)		125.320,99
Custo Operação do Spray-Dryer (R\$/ano)		576.205,40

Os custos envolvidos no cálculo do IC e CG estão ilustrados na Tabela 6.7, abaixo. Os custos de equipamentos, custos de partida e de projeto foram baseados na literatura referente a investimentos para a Indústria Química (Peters e Timmerhaus, 1991).

Com base no custo médio da mão de obra civil para o estado do Rio Grande do Sul (806,27 R\$) previsto no SINAPI (Sistema Nacional de Pesquisa de Custos e Índices de Construção Civil) pelo IBGE em janeiro de 2013, foi possível calcular o custo de obras civis.

Tabela 6.7: Investimento total

Custo de Equipamentos	
Módulo de Membranas	129.801,59 R\$
Extrator (20kw)	1.035.037,50 R\$
Encaixotadora, potência requerida 2,5KW	45.000,00 R\$
Empacotadora/Enchedora	50.000,00 R\$
Evaporador 3 estágios, potência requerida 15KW	264.000,00 R\$
Spray-dryer	1.067.673,67 R\$
Subtotal 1	2.591.512,76 R\$
Custo de Instalações	
Tubulações e válvulas (10%CE)	259.151,28 R\$
Instrumentos de controle (10%CE)	259.151,28 R\$
Instalações de equipamentos (35%CE)	907.029,47 R\$
Instalações de utilidades (20%CE)	518.302,55 R\$
Subtotal2	1.943.634,57 R\$
Custos Construção Civil	
Obras Civis	483.762,00R\$
Subtotal 3	483.762,00 R\$
Investimento Fixo	5.057.896,02 R\$
Partida (15% CE)	412.731,09 R\$
Projeto (15% CE)	412.731,09 R\$
Investimento de Capital (IC)	5.883.358,20 R\$
Capital de Giro (CG) (15% IC)	882.503,73 R\$

Os custos totais de produção englobam os custos variáveis e fixos, esse cálculo está ilustrado na Tabela 6.8, abaixo, na qual cada um desses custos é detalhadamente calculado. A partir dos valores anuais estimados para o custo fixo e o custo variável foi possível estimar o custo unitário do produto, que será utilizado na definição de preços. O custo unitário, nesse trabalho, se baseou na produção de 1 kg de pó microencapsulado rico em compostos bioativos obtidos a partir do bagaço de suco de uva e foi 17,33 R\$.kg⁻¹.

Tabela 6.8: Estimativa do custo total de produção

Estimativa do custo total de produção	Unidade	Quantidade Anual	Preço Unitário (R\$)	Custo Anual (R\$)
CUSTOS VARIÁVEIS				
Bagaço	ton	3.159,02	-	-
Etanol	L	8529,36	2,17	18.501,64
Ácido cítrico	ton	3312,960	3.154,40	10.450.401,02
Água tratada	m ³	19.901,85	0,27	5.373,50
Embalagem produto	Unidade	3.295.746,56	0,35	1.153.511,30
Produção	por hora			
16 operadores		2.592,00	4,77	197.821,44
9 assistentes		2.592,00	3,00	69.984,00
3 supervisores		2.592,00	12,00	93.312,00
Consumo de energia	kWh	187.920,00	0,05	9.396,00
Custo operação do evaporador				130.788,33
Custo operação do spray dryer				595.630,99
Custo da Membrana (troca 1/3 por ano)				20.000,00
TOTAL CUSTO VARIÁVEIS				12.744.720,23
CUSTOS FIXOS				
Administração (5% do custo variáveis)	-	-	-	637.236,01
Distribuição (3% custos variáveis)	-	-	-	382.341,61
Marketing (5% custos variáveis)	-	-	-	637.236,01
Depreciação (10% do investimento de capital fixo)	-	-	-	588.335,82
Manutenção (2% do investimento de capital fixo)	-	-	-	117.667,16
Despesas gerais (1% de investimento de capital fixo)	-	-	-	58.833,58
TOTAL CUSTO FIXO				2.406.681,35
TOTAL CUSTO PRODUÇÃO				15.036.256,62

O fluxo de caixa também se baseou no estudo de viabilidade econômica para o café realizada por Almeida *et al.* (2010). Em seu trabalho, as autoras fizeram as seguintes considerações:

- O investimento total foi realizado no ano zero;
- Receita Bruta foi calculada levando em consideração um fator de composição de 50% sobre o custo unitário do produto final;
- A Receita Líquida foi calculada como sendo a Receita Bruta descontando-se o Imposto sobre Operações Financeiras (IOF);
- O Custo Total corresponde ao custo total de produção;

- O Lucro Operacional (Bruto) foi calculado como a diferença entre a Receita Líquida e o Custo Total;
- O Lucro Tributável, ou seja, o lucro sobre o qual incidirá o imposto de renda, corresponde ao Lucro Operacional (Bruto) reduzido do valor da depreciação;
- O Imposto de Renda foi considerado com base em uma taxa de 30%;
- O Capital de Giro retorna no último ano do período considerado para o fluxo de caixa.

Considerando todos os itens acima, foi possível calcular o VPL (Valor Presente Líquido) e a Taxa Interna de Retorno (TIR) para diferentes preços de venda do pó microencapsulado. O VPL é calculado a partir do fluxo de caixa corrigido para o momento zero de investimento e indica se um investimento é economicamente rentável ou não. Quando positivo, indica que o investimento é rentável, se negativo, o investimento é economicamente inviável, sendo zero um investimento indiferente, quando o lucro é zero (Kaplan, 1983). A TIR está relacionada ao VPL, já que indica o valor da taxa de juros que zera o VPL.

Com base nesses dados foi possível avaliar a influência do preço de venda do pó microencapsulado (Tabela 6.9). Quando inferior a 27,33 R\$. kg⁻¹, a TIR é negativa. Preços de venda superiores a 32,81 R\$. kg⁻¹ retornam TIR e VPL positivos. É de interesse verificar a verdadeira rentabilidade desse investimento quando comparado a investimentos alternativos. Como alternativa de investimento, considerou-se nesse trabalho o Índice de Mercado da Andima (IMA), índice que indica a rentabilidade de títulos públicos, que teve taxa acumulada de 30,56% nos últimos 12 meses (Ministério da Fazenda). Optou-se pelo IMA, por ser um investimento “transparente, replicável, mensurável, apropriado, representativo, consistente e confiável” (Associação Brasileira das Entidades dos Mercados Financeiro e de Capitais, 2010). A TIR se iguala ao IMA, ao definir 31,94 R\$. kg⁻¹ como preço de venda, indicando então que a preços de venda mais altos, o investimento em uma unidade de recuperação de bagaço é mais rentável do que investir em títulos públicos.

Tabela 6.9: Influência dos diferentes preços de venda do pó microencapsulado rico em compostos bioativos.

Preço de venda (R\$. kg⁻¹)	Conclusão
27,33	TIR= 0,01% VPL= -5.085.574,34 R\$
31,94	TIR=IMA=30,56% VPL= -801.754,22 R\$
32,81	TIR= 35,84% VPL= 494,09 R\$

7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos em escala de bancada e semipiloto, foi possível afirmar que os objetivos do trabalho foram alcançados.

A melhor eficiência de extração, estimada estatisticamente, foi alcançada com solução hidroetanólica contendo 70% etanol, pH 2,0 em uma razão solvente:substrato 9:1. Entretanto com base nos testes feitos no Sistema de Separação por Membranas foi indicada outra condição de extração, - solução hidroetanólica contendo 30% etanol, pH 4,0 em uma razão 9:1 solvente:substrato. Nestas condições obteve-se fluxo permeado na etapa de nanofiltração seis vezes superior ao da solução contendo 70% de etanol com perda de apenas 12 % no rendimento de extração.

Os valores encontrados para os compostos bioativos estudados se mostraram promissores se comparados com dados da literatura. Tendo em vista os resultados de atividade antioxidante, seria interessante o seu emprego em alimentos funcionais em substituição a outros antioxidantes sintéticos, como já havia sugerido Negro *et al.* (2003) em seu trabalho. O comportamento dos compostos fenólicos observado acompanhou o da capacidade antioxidante, como esperado. A concentração de antocianinas se mostrou superior à encontrada em sucos de uva, indicando a aplicabilidade do extrato obtido em substituição a corantes sintéticos.

Os pós microencapsulados se mostraram estáveis quando estocados em condições adequadas em ambiente com pressão e temperatura controlados. Essa estabilidade é desejada quando o objetivo for a comercialização de ingredientes funcionais de derivados do bagaço de uva.

O estudo de viabilidade econômica foi realizado e o investimento se mostrou rentável como indicado pelo valor positivo de VPL, quando o preço de venda for superior a 32,81 R\$.kg⁻¹. Além disso, a TIR (30,56 %), foi superior a TMA para valores de venda acima de 27,33 R\$.kg⁻¹.

8. SUGESTÕES

Um desdobramento importante deste estudo seria as análises de estabilidade e sensorial do pó microencapsulado para avaliar a logística de comercialização do produto.

Para um estudo mais detalhado de qualidade, é recomendável realizar análises cromatográficas para identificação e quantificação dos diferentes compostos presentes no extrato hidroetanólico obtido. Através dessa análise também seria possível verificar se o ganho em atividade antioxidante observado nas correntes da nanofiltração é devido a modificações químicas dos compostos bioativos ao longo do processo. A partir dos resultados experimentais já obtidos, é possível fazer a modelagem, otimização e simulação do processo real através de softwares específicos para escala industrial.

Seria interessante, ainda, fazer um estudo econômico mais detalhado e uma análise do reaproveitamento de outros subprodutos compreendidos no processo proposto, de modo a diminuir ainda mais os custos de tratamento do bagaço do processamento de uva. Poderiam ser avaliados os reaproveitamentos da fração permeada obtida na nanofiltração, do etanol recuperado no rotaevaporador e da água eliminada na atomização e em outras etapas do processo.

9. BIBLIOGRAFIA

- Sapekie, S. F., & Renshaw, T. A. (1983). Economics of drying concentration. In: B. M. McKenna, *Engineering and Food* (Vol. 2, pp. 927-937). Londres.
- Ethanol (USA) Price Report - Chemical pricing information - ICIS Pricing*. (2008).
Acesso em 18 de Fevereiro de 2013, disponível em ICIS:
http://www.icispricing.com/il_shared/Samples/SubPage173.asp
- Almeida, T. A., Amorim, A. V., & Assunção, L. S. (2010). Viabilidade econômica do processo de produção de café solúvel com recuperação de aromas. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ.
- Amendola, D., De Faveri, D. M., & Spigno, G. (2010). Grape marc phenolics: Extraction kinetics, quality and stability of extracts. *Journal of Food Engineering*(97), pp. 384-392.
- Associação Brasileira das Entidades dos Mercados Financeiro e de Capitais. (2010). *IMA - Índice de Mercado ANBIMA e títulos públicos federais*. Rio de Janeiro: ANBIMA.
- Brazinha, C., & Crespo, J. (Março/Abril de 2010). Membrane processing: Natural antioxidants from winemaking by-products. *Filtration+Separation*, pp. 32-35.
- Bridle, P., & Timberlake, C. F. (1997). Anthocyanins as natural food colours-selected aspects. *Food Chemistry*.(58), pp. 103-109.
- Bustamante, M., Moral, R., Paredes, C., Pérez-Espinosa, A., Moreno-Caselles, J., & Pérez-Murcia, M. (2008). Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry. *Waste Management*, pp. 372–380.
- Campos, L. A. (2005). OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE BAGAÇO DE UVA CABERNET SAUVINGNON (*Vitis vinifera*): PARÂMETROS DE PROCESSO E MODELAGEM MATEMÁTICA. Florianópolis: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA (UFSC).
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, M., & Galán-Vidal, C. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, pp. 859–871.
- Cornelli, U. (2009). Antioxidant use in nutraceuticals. *Clinics in Dermatology*(27), pp. 175-194.

- CORREIO RIOGRANDENSE. (13 de outubro de 2004). Pesquisa indica uso de resíduo de uva.
- Georgé, S., Brat, P., & Alter, P. (2005). Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, pp. 1370-1373.
- Giusti, M. M., & Jing, P. (2007). Analysis of pigments and colorants: Analysis of anthocyanins. In: C. Socaciu (Ed.), *Food Colorants: Chemical and Functional Properties* (pp. 479-506). Boca Raton, FL, EUA: CRC Press.
- Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. Nova Iorque.
- Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2007). HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence. *Journal of Food Composition and Analysis*(20), pp. 618-626.
- Gómez-Plaza, E., Miñano, A., & López-Roca, J. M. (2006). Comparison of chromatic properties, stability and antioxidant capacity of anthocyanin-based aqueous extracts from grape pomace obtained from different vinification methods. *Food Chemistry*(97), pp. 87-94.
- González-Paramás, A. M., Esteban-Ruano, S., Santos-Buelga, C., Pascual-Teresa, S. d., & Rivas-Gonzalo, J. C. (2004). Flavanol Content and Antioxidant Activity in Winery Byproducts. *J. Agric. Food Chem.* (52), pp. 234-238.
- Habert, A., Borges, C. P., & Nobrega, R. (2006). *Processos de Separação por Membranas*. Rio de Janeiro: E-papers.
- Hollecker, L., Pinna, M., Filippino, G., Scrugli, S., Pinna, B., Argiolas, F., et al. (2009). Simultaneous determination of polyphenolic compounds in red and white grapes grown in Sardinia by high performance liquid chromatography–electron spray ionisation-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*(1216), pp. 3402-3408.
- Kaplan, S. (1983). *Energy Economics – Quantitative methods for energy and environmental decisions*.
- Karacabey, E., & Mazza, G. (2010). Optimisation of antioxidant activity of grape cane extracts using response surface methodology. *Food Chemistry*(119), pp. 343-348.

- Karvela, E., Makris, D. P., Kalogeropoulos, N., & Karathanos, V. T. (2009). Deployment of response surface methodology to optimise recovery of grape (*Vitis vinifera*) stem polyphenols. *Talanta*(79), pp. 1311-13221.
- Kosseva, M. R. (2009). Processing of Food Wastes. In: *Advances in Food and Nutrition Research*. 57-123.
- Lu, Z., Nie, G., Belton, P. S., Tang, H., & Zhao, B. (2006). Structure–activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives. *Neurochemistry International*(48), pp. 263–274.
- Luque-Rodríguez, J. M., Luque de Castro, M. D., & Pérez-Juan, P. (2007). Dynamic superheated liquid extraction of anthocyanins and other phenolics from red grape skins of winemaking residues. *Bioresource Technology*(98), pp. 2705-2713.
- Malacrida, C. R., & Motta, S. d. (Out.-Dez de 2005). COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E ANTOCIANINAS EM SUCO DE UVA. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, pp. 659-664.
- Massot, A., Mietton-Peuchot, M., Peuchot, C., & Milisic, V. (2008). Nanofiltration and reverse osmosis in winemaking. *Desalination*(231), pp. 283-289.
- Mello, L. R. (2005). *Produção e Comercialização de Uvas e Vinhos – Panorama 2004*. Bento Gonçalves, RS: EMBRAPA Uva e Vinho.
- Mello, L. R. (2008). *Vitivinicultura brasileira: panorama 2007*. Bento Gonçalves, RS: EMBRAPA Uva e Vinho.
- Mello, L. R. (Março de 2012). *Vitivinicultura brasileira: Panorama 2011*. Bento Gonçalves, RS: EMBRAPA Uva e Vinho.
- Ministério da Fazenda. (s.d.). *Tesouro Nacional - Vendas de Títulos para Pessoas Físicas*. Acesso em 07 de Março de 2013, disponível em Tesouro Nacional: http://www3.tesouro.fazenda.gov.br/tesouro_direto/rentabilidade.asp
- Negro, C., Tommasi, L., & Miceli, A. (2003). Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Bioresource Technology*, pp. 41–44.
- Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M., et al. (2003). Total Antioxidant Capacity of Plant Foods, Beverages and Oils Consumed in Italy Assessed by Three Different In Vitro Assays. *The Journal of Nutrition*(133), pp. 2812-2819.
- Peters, M. S., & Timmerhaus, K. D. (1991). *Plant Design and Economics for Chemical Engineers* (4^a ed.). Nova York: Mc Graw Hill International Editions.

- Pinelo, M., Del Fabbro, P., Manzocco, L., Nuñez, M. J., & Nicoli, M. C. (2005). Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts. *Food Chemistry*, pp. 109–117.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. *26*, pp. 1231-1237.
- Rektor, A., Vatai, G., & Békássy-Molnár, E. (2006). Multi-step membrane processes for the concentration of grape juice. *Desalination*(191), pp. 446-453.
- Rufino, M. M., Alves, R. E., Brito, E. S., Morais, S. M., Sampaio, C. d., Pérez-Jiménez, J., et al. (2007). Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS+. *Comunicado Técnico*(128). Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical.
- Rufino, M. S., Alves, R. E., Brito, E. S., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., & Mancini-Filho, J. (2010). Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*(121), pp. 996–1002.
- Scandalios, J. G. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*(38), pp. 995-1014.
- Silva, L. M. (Outubro de 2003). Caracterização dos Subprodutos da Vinificação. *Spectrum*, pp. 123-133.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*(16), pp. 144-168.
- Spáčil, Z., Novaková, L., & Solich, P. (2008). Analysis of phenolic compounds by high performance liquid chromatography and ultra performance liquid chromatography. *Talanta*(76), pp. 189–199.
- Spigno, G., Tramelli, L., & De Faveri, D. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*(81), pp. 200-208.
- Xu, C., Zhang, Y., Cao, L., & Lu, J. (2010). Phenolic compounds and antioxidant properties of different grape cultivars grown in China. *Food Chemistry*(119), pp. 1557-1565.

Yilmaza, Y., & Toledo, R. T. (2006). Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*(19), pp. 41-48.

CAMEX. Resolução N° 52, de 24 de julho de 2012. Dispõe sobre aplicação de direitos antidumping definitivos, por um prazo de até 5 (cinco) anos, às importações de ácido cítrico e determinados sais do ácido cítrico, originárias da República Popular da China e homologa compromisso de preço. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, n.143, p.7, 25 jul. 2012. Seção 1.

10. ANEXOS:

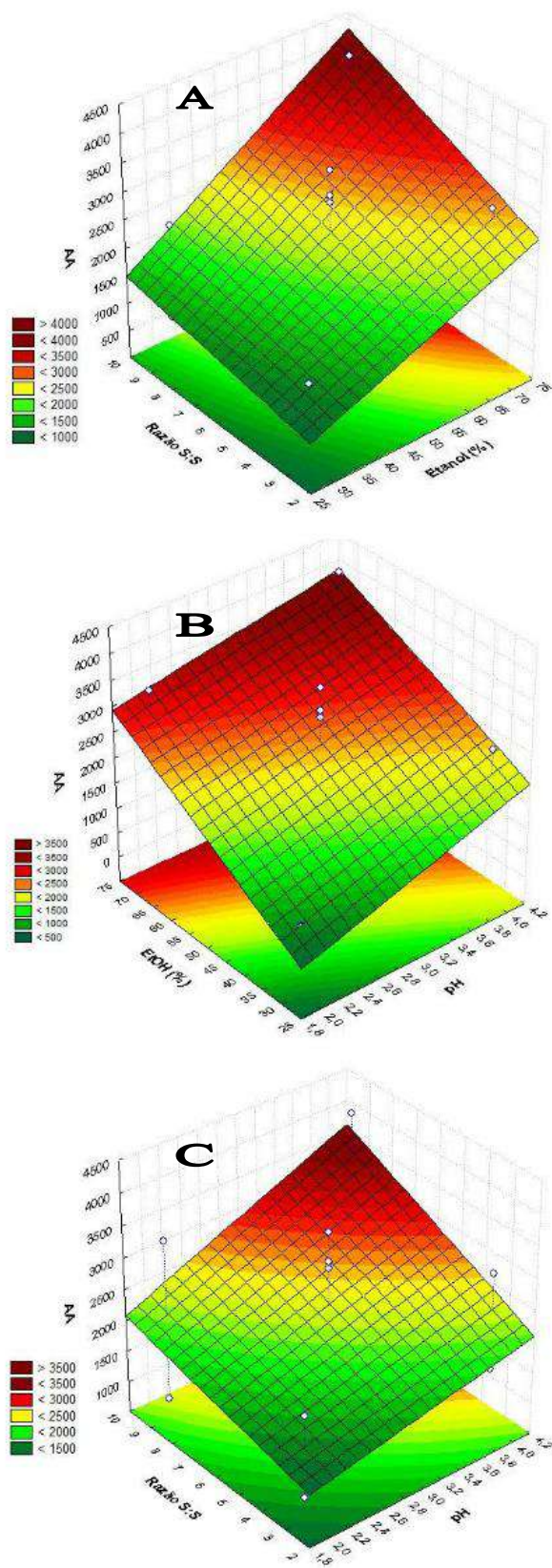


Figura A 1: Superfícies de resposta para a capacidade antioxidante em função da concentração etanólica e da razão solvente:substrato (A), do pH e da concentração etanólica (B), e, do pH e da razão solvente:substrato (C).

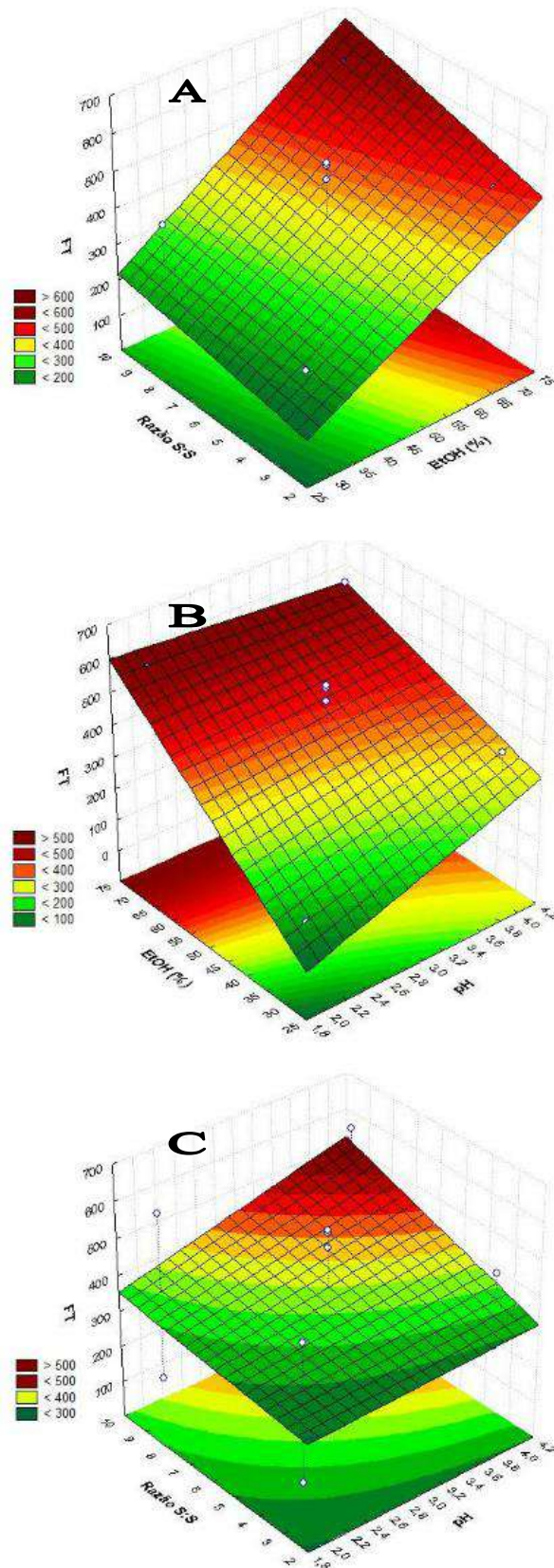


Figura A 2: Superfícies de resposta para fenólicos totais em função da concentração etanólica e da razão solvente:substrato (A), do pH e da concentração etanólica (B), e, do pH e da razão solvente:substrato (C).

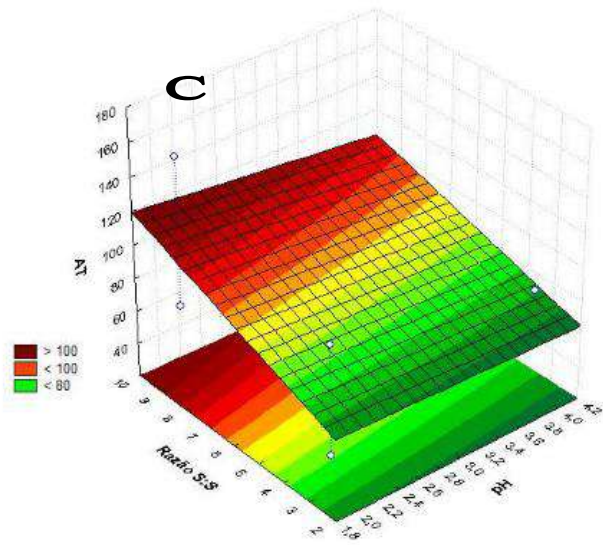
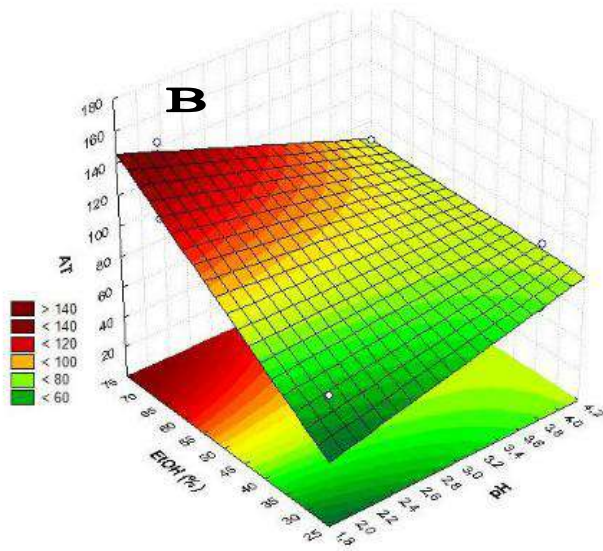
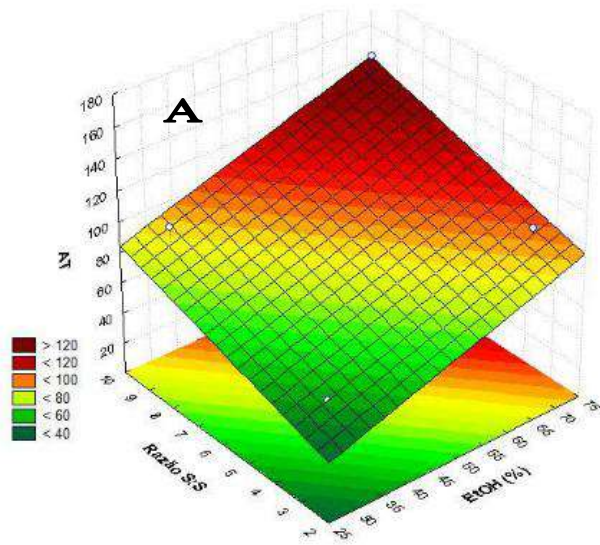


Figura A 3: Superfícies de resposta para antocianinas totais em função da concentração etanólica e da razão solvente:substrato (A), do pH e da concentração etanólica (B), e, do pH e da razão solvente:substrato (C).

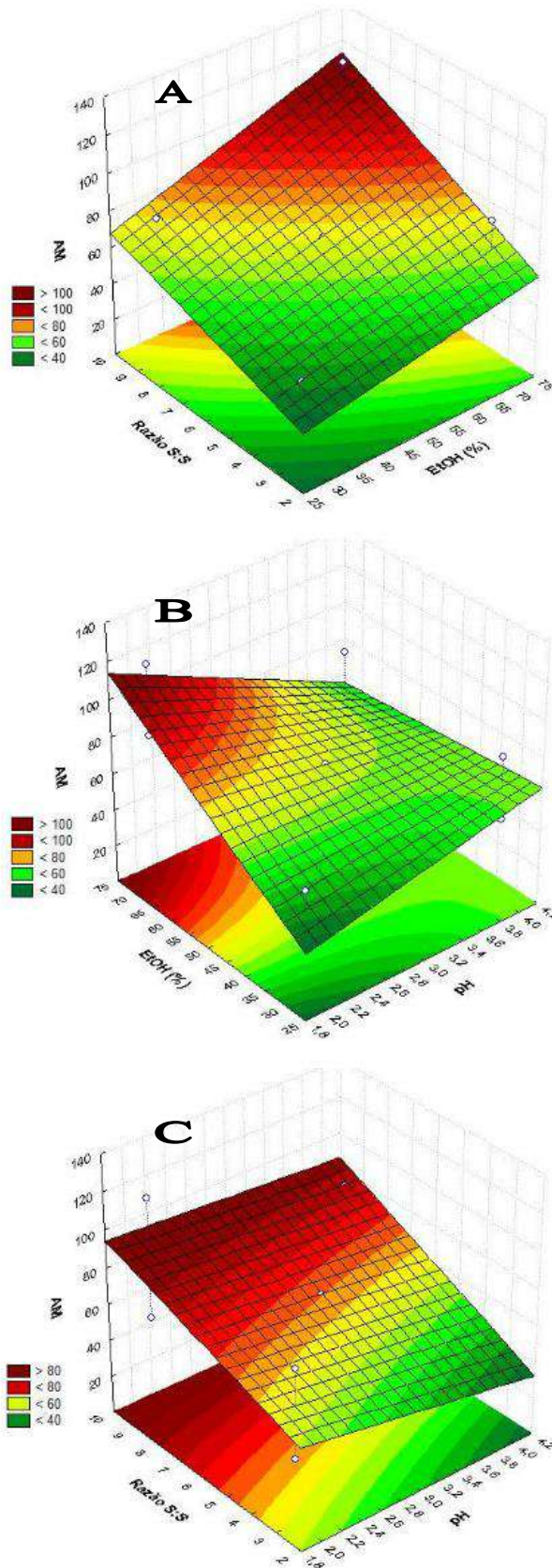


Figura A 4: Superfícies de resposta para antocianinas monoméricas em função da concentração etanólica e da razão solvente:substrato (A), do pH e da concentração etanólica (B), e, do pH e da razão solvente:substrato (C).