



UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**Concentração de extratos de pequi (*Caryocar
brasiliense Camb.*) por nanofiltração**

Mariana Teixeira da Costa Machado

Orientadora: **Prof^a. Dr^a. Miriam Dupas Hubinger**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
APRESENTADA À FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS UNICAMP
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE
EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS.

CAMPINAS, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
LUCIANA P. MILLA – CRB8/8129 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

M18c Machado, Mariana Teixeira da Costa, 1985-
Concentração de extratos de pequi (Caryocar
brasiliense Camb.) por nanofiltração / Mariana Teixeira da
Costa Machado. -- Campinas, SP: [s.n], 2011.

Orientador: Miriam Dupas Hubinger.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Caryocar brasiliense Camb. 2. Nanofiltração.
3. Antioxidantes. 4. Carotenóides. 5. Compostos
fenólicos. I. Hubinger, Miriam dupas. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de
Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Concentration of pequi (Caryocar brasiliense Camb.) extract
by nanofiltration

Palavras-chave em inglês (Keywords):

Caryocar brasiliense Camb.

Nanofiltration

Antioxidants

Carotenoids

Phenolic compounds

Área de concentração: Engenharia de Alimentos

Titulação: Mestre em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora:

Miriam Dupas Hubinger [Orientador]

Lourdes Maria Correa Cabral

Florência Cecilia Menegali

Marcia de Souza Araki

Flávio Luis Schimidt

Data da defesa: 23/08/2011

Programa de Pós Graduação: Engenharia de Alimentos

Essa dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do título de MESTRADO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS no Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, ____ de _____ de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Míriam Dupas Hubinger
(Orientadora)

Dr^a. Lourdes Maria Correa Cabral
(Membro Titular – EMBRAPA / Rio de Janeiro)

Prof. Dr^a. Florência Cecilia Menegalli
(Membro Titular – FEA / UNICAMP)

Prof^a. Dr^a. Márcia de Souza Araki
(Membro Suplente – Faculdade Pitágoras / Jundiaí)

Prof^a. Dr. Flávio Luis Schmidt
(Membro Suplente – FEA / UNICAMP)

*“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer
um novo começo, qualquer um pode
começar agora e fazer um novo fim.”*
Chico Xavier

*Dedico este trabalho aos meus pais, Oacy e
Mônica, à minha vó Ely, à minha irmã,
Carina, e ao meu namorado, Rafael, que
sempre me apoiaram, incentivaram e
compartilharam comigo todas as etapas
desta caminhada.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me ouvir, iluminar meus pensamentos e guiar meus passos.

Aos meus pais, Oacy e Mônica, minha irmã, Carina, e meu namorado, Rafael, pelo apoio, torcida, carinho e paciência em todos os momentos desta caminhada.

À minha avó e meu avô, Ely e Marcos, pelas centenas de orações realizadas... por se alegrar com as minhas conquistas e se preocupar com as minhas angústias.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) – UNICAMP, pela oportunidade e pela estrutura oferecida para a realização deste trabalho.

Ao CNPq, pela bolsa de mestrado e à FAPESP, pelo auxílio financeiro.

À Prof^a. Dr^a. Míriam Dupas Hubinger, pela orientação, paciência e oportunidade de aprendizado.

A todos os membros da banca examinadora, pelas valiosas sugestões e correções, que muito contribuíram para o enriquecimento deste trabalho.

A Professora Leila Peres por ter me concedido as membranas utilizadas neste trabalho.

Aos técnicos Joyce (LEP/FEA), Kelly e Adilson (LRAC/FEQ), Patrícia, Paulo e Camila (EXTRA/FEA) e Angélica (Bioaromas/FEA) pela ajuda todas as vezes que precisei, tanto na realização de análises como na utilização de equipamentos.

Aos amigos e companheiros de laboratório, Tina, Bia, Marcela, Gláucia, Vanessinha e Julio por toda amizade, conselhos, ajuda, correções, paciência e compreensão nas muitas horas de desespero.

A todo o pessoal do LEP (Aline, Fabi, Carol, Luiz, Rejane, Lizi, Aninha, Fezinha, Kátia, Mari, Paula, Luana, Mariana, Marcela, Fran, Margarita...) pela ajuda e amizade.

Às amigas de Piraí (Patrícia, Marcinha, Gabrielle, Flávia, Polliana, Danusa) por, apesar da distância, estarem sempre presentes de alguma forma.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xv
LISTA DE TABELAS.....	xvii
RESUMO.....	xix
ABSTRACT	xxi
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2. OBJETIVOS	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
3.1. Pequi	7
3.1.1. Aspectos gerais.....	7
3.1.2. Compostos fenólicos	11
3.1.3. Carotenóides.....	12
3.1.4. Atividade antioxidante	13
3.2. Extratos Vegetais.....	16
3.3. Processos De Separação Por Membranas	17
3.3.1. Aspectos gerais.....	17
3.3.2. Fenômenos que limitam o processo	20
3.3.3. Microfiltração.....	21
3.3.4. Ultrafiltração	22
3.3.5. Nanofiltração.....	23
3.3.6. Osmose inversa	24
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1. Matéria-prima.....	25
4.2. Membranas	25
4.3. Etapas do trabalho	26
4.4. Processos	27
4.4.1. Extrações aquosas e alcoólicas de pequi	27
4.4.2. Processo de Concentração.....	29
4.4.2.1. Célula de membrana laboratorial	29

4.4.2.2. Procedimento experimental	30
4.4.2.3. Determinação das variáveis do processo	31
a) Cálculo do fluxo de permeado	31
b) Índice de retenção (R)	32
c) Fator de concentração (F)	32
4.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	32
4.6. Métodos Analíticos	33
a) Determinação de diâmetro e comprimento	34
b) Teor de umidade	34
c) Atividade de água	35
d) Cinzas	35
e) Fibras	35
f) Proteínas	35
g) Lipídios	35
h) Acidez titulável	35
i) pH	36
j) Vitamina C	36
l) Cor	36
m) Carotenóides	36
n) Substâncias fenólicas totais	37
o) Avaliação da atividade antioxidante	38
o.1) DPPH	38
o.2) FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power – Poder Antioxidante de Redução do Ferro):	39
p) Determinação da viscosidade das soluções	39
q) Determinação da densidade das soluções	40
r) Caracterização das partículas da alimentação	40
4.7. Análise estatística	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1. Caracterização da Matéria-Prima	43
5.2. Estudo da extração aquosa e alcoólica de pequi	45

5.3. Estudo da concentração dos extratos por processos com membranas	53
5.3.1. Caracterização das partículas da alimentação	53
5.3.2. Morfologia das Membranas	55
5.3.3. Fluxo de permeado e número de Reynolds	60
5.3.4. Concentração dos compostos bioativos por membranas.....	68
5.3.1.4. Caracterização do melhor extrato concentrado	83
5.3.3. Ensaio adicional	85
6. CONCLUSÕES.....	87
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	89
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
APÊNDICE A.....	107
CURVAS DE FLUXO DE PERMEADO <i>versus</i> TEMPO PARA ÁGUA E ÁLCOOL 95%	107
APÊNDICE B.....	109
PADRÕES DE COLORAÇÃO	109

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. (A) O pequi e (B) A flor do pequi.....	7
Figura 3.2. (A) O fruto do pequi partido e (B) O caroço do pequi partido.	8
Figura 3.4. Estrutura básica de um fenol.....	11
Figura 3.5. Esquemas ilustrativos das filtrações (A) convencional e (B) tangencial e seus respectivos comportamentos do fluxo e da resistência causada pelo acúmulo de material na superfície da membrana em função do tempo, onde J é o fluxo de permeado e R_t é a resistência ao fluxo causada pelo acúmulo (CHERYAN, 1998).	18
Figura 3.6. Esquema de formação de camada polarizada na membrana (adaptado de CHERYAN, 1998)	21
Figura 4.1. Pequi congelado utilizado.	25
Figura 4.2. Esquema da unidade laboratorial de membrana (Adaptado de SILVA, 2010).....	29
Figura 4.3. Unidade laboratorial de membrana.	30
Figura 4.4. Equipamentos utilizados para análise de microscopia eletrônica de varredura: (A) microscópio eletrônico de varredura e (B) aparelho metalizador para recobrimento com camada de ouro.	33
Figura 4.5. Dimensões do caroço de pequi.....	34
Figura 5.1. Variação do teor de compostos fenólicos (A) e carotenóides (B) com a temperatura e o tempo de extração para o extrato alcoólico (1) e aquoso (2).	47
Figura 5.2. Imagens microscópicas da alimentação aquosa no momento que foi dispersa (A) e após dez minutos de repouso (B).	54
Figura 5.3. Imagens microscópicas da alimentação alcoólica no momento que foi dispersa (A) e após dez minutos de repouso (B).	54
Figura 5.4. Microscopia da fratura da membrana de ultrafiltração, seção transversal antes do processo de filtração. Barra da escala = 100 μ m. Aumento na magnitude de 500x.	56
Figura 5.5. Microscopia da fratura da membrana de nanofiltração (NF 90), seção transversal antes do processo de filtração. Barra da escala = 100 μ m. Aumento na magnitude de 500x....	56
Figura 5.6. Microscopia da fratura da membrana de nanofiltração (NF 270), seção transversal antes do processo de filtração. Barra da escala = 100 μ m. Aumento na magnitude de 500x....	57

Figura 5.7. Microscopias da superfície das membranas (1) UF, (2) NF 90 e (3) NF 270 utilizadas (A) antes e (B) depois do processo de filtração do extrato aquoso. Barra da escala = 20µm. Aumento na magnitude de 3000x.	58
Figura 5.8. Microscopias da superfície das membranas (1) UF, (2) NF 90 e (3) NF 270 utilizadas antes (A) e depois (B) do processo de filtração do extrato alcoólico. Barra da escala = 20µm. Aumento na magnitude de 3000x.	59
Figura 5.9. Gráfico da deformação versus cisalhamento para extrato aquoso (concentrado).	62
Figura 5.10. Gráfico da deformação versus cisalhamento para extrato alcoólico (alimentação).	62
Figura 5.11. Curva de fluxo pontual de permeado. (▲) Extrato aquoso, UF, T = 25 °C, P = 7 bar; (◆) Extrato aquoso, NF 90, T = 25 °C, P = 8 bar; (■) Extrato aquoso, NF 270, T = 25 °C, P = 8 bar; (○) Extrato alcoólico, NF 90, T = 25 °C, P = 8 bar; (+) Extrato alcoólico, NF 270, T = 25 °C, P = 8 bar.	64
Figura 5.12. Curva de fluxo acumulado de permeado. (▲) Extrato aquoso, UF, T = 25 °C, P = 7 bar; (◆) Extrato aquoso, NF 90, T = 25 °C, P = 8 bar; (■) Extrato aquoso, NF 270, T = 25 °C, P = 8 bar; (○) Extrato alcoólico, NF 90, T = 25 °C, P = 8 bar; (+) Extrato alcoólico, NF 270, T = 25 °C, P = 8 bar.	64
Figura 5.13. Fotografia dos produtos inicial (alimentação, A) e finais (permeado, P, e concentrado, C) dos processos de concentração de extrato aquoso e alcoólico de pequi com as diferentes membranas, de nanofiltração (1) NF 90 e (2) NF 270 e (3) ultrafiltração.	71
Figura 5.14. Representação do ângulo Hue dos diferentes produtos aquosos obtidos no processo de concentração, alimentação, concentrado e permeado.	74
Figura 5.15. Representação do C* (croma) dos diferentes produtos aquosos obtidos no processo de concentração, alimentação, concentrado e permeado.	74
Figura 5.16. Representação do ângulo Hue dos diferentes produtos alcoólicos obtidos no processo de concentração, alimentação, concentrado e permeado.	76
Figura 5.17. Representação do C* (croma) dos diferentes produtos alcoólicos obtidos no processo de concentração, alimentação, concentrado e permeado.	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Composição química centesimal da polpa de pequi. Valores médios e seus respectivos desvios padrões.	9
Tabela 3.2. Composição química centesimal da amêndoa de pequi. Valores médios e seus respectivos desvios padrões.	10
Tabela 3.3. Processos de separação por membranas (adaptada de HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006).	19
Tabela 4.1. Membranas utilizadas nos ensaios.	26
Tabela 5.1. Composição química centesimal da polpa e amêndoa de pequi congelado. Valores médios e seus respectivos desvios padrão.	43
Tabela 5.2. Características físicas da polpa e amêndoa de pequi congelado. Valores médios e seus respectivos desvios padrão.	44
Tabela 5.3. Massa, teor de carotenóides e cor do endocarpo espinhoso de pequi. Valores médios e seus respectivos desvios padrão.	44
Tabela 5.4. Teor de compostos fenólicos e carotenóides totais, em base úmida e seca, da primeira extração e re-extração para o processo aquoso e alcoólico.	50
Tabela 5.5. Teor de compostos fenólicos, carotenóides totais e atividade antioxidante, em base úmida e seca, apresentada pelo extrato final aquoso e alcoólico.	50
Tabela 5.6. Coeficientes de correlação de Pearson das atividades antioxidantes, fenóis totais e carotenóides.	52
Tabela 5.7. Medida de densidade (Kg/m^3) para as amostras de permeado, alimentação e concentrado dos experimentos com extrato aquoso e alcoólico.	60
Tabela 5.8. Medida de viscosidade (mPa.s) para as amostras de permeado, alimentação e concentrado dos experimentos com extrato aquoso e alcoólico.	61
Tabela 5.9. Fluxo médio de permeado (L/h.m^2) dos extratos aquosos e alcoólicos nas diferentes membranas, UF, NF 90 e NF 270.	65
Tabela 5.10. Teor de carotenóides (μg de β -caroteno /ml de extrato) para as amostras de permeado, alimentação e concentrado dos experimentos com extrato aquoso e alcoólico.	69
Tabela 5.11. Análise instrumental de cor pelo sistema CIELab para as amostras de permeado, alimentação e concentrado dos experimentos com extrato aquoso.	72

Tabela 5.12. Análise instrumental de cor pelo sistema CIELab para as amostras de permeado, alimentação e concentrado dos experimentos com extrato alcoólico.	75
Tabela 5.13. Teor de compostos fenólicos (μg de ácido gálico/ml de extrato) para as amostras de permeado, alimentação e concentrado dos experimentos com extrato aquoso e alcoólico.	78
Tabela 5.14. Atividades antioxidantes, avaliadas pelo método FRAP e DPPH, para as amostras de permeado, alimentação e concentrado dos experimentos com extrato aquoso.....	81
Tabela 5.15. Composição físico-química centesimal obtida para os produtos da concentração pela membrana NF 90.....	83
Tabela 5.16. Composição físico-química centesimal obtida para o extrato alcoólico.	84
Tabela 5.17. Teor de carotenóides (μg de β -caroteno /ml de extrato), fenóis totais (μg de ácido gálico/ml de extrato) e viscosidade (mPa.s) para as amostras de permeado, alimentação e concentrado dos experimentos com extrato alcoólico (70%).	86

RESUMO

O pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) é uma fruta do cerrado de grande importância econômica, que apresenta alto teor de compostos fenólicos e carotenóides e alta atividade antioxidante. Este trabalho teve como objetivo desenvolver produtos ricos em compostos funcionais, principalmente compostos fenólicos e carotenóides, a partir de extratos aquosos e alcoólicos de pequi concentrados por processos de membranas. Inicialmente, as principais variáveis relativas ao processo (tempo e temperatura) foram avaliadas, para definir a melhor forma de extração aquosa e alcoólica dos compostos bioativos da polpa, do endocarpo espinhoso e da semente do fruto. A partir das condições selecionadas nessa primeira etapa (temperatura de 25 °C durante 1 hora de extração para o extrato aquoso e 40°C durante 24 horas para o extrato alcoólico), foram produzidos extratos concentrados utilizando-se uma unidade de membrana de pequeno porte, que faz a simulação de escoamento transversal com diferentes tipos de membranas: uma de ultrafiltração (UF com *cut-off* de 100 KDa) e duas de nanofiltração (NF 90 e NF 270, com *cut-off* de 200-300 Da e diferentes materiais). Durante os processos, os fluxos de permeado foram calculados, as membranas foram submetidas a uma caracterização morfológica antes e depois do processo de concentração e os produtos obtidos (alimentação, concentrado e permeado) de cada processo foram caracterizados em relação às seguintes propriedades: densidade, viscosidade, cor, polifenóis totais, carotenóides e atividade antioxidante. Os fluxos de permeado dos processos de ultra e nanofiltração para os extratos alcoólicos e aquosos variaram de 7,06 a 9,17 L/h.m², e não apresentaram diferença significativa. O processo de concentração por membranas para o extrato alcoólico de pequi mostrou-se ineficiente para concentrar os compostos bioativos, uma vez que todas as condições apresentaram coeficientes de retenção menores que 15% tanto para compostos fenólicos, quanto para carotenóides. Para o extrato aquoso, as membranas de nanofiltração apresentaram 100% de retenção de carotenóides e 93% (NF 270) e 97% (NF 90) de retenção de polifenóis. Concordando com estes resultados, o concentrado aquoso obtido com a membrana NF 90 mostrou-se rico em compostos bioativos e alta atividade antioxidante.

Palavras-chaves: *Caryocar brasiliense* Camb., nanofiltração, antioxidantes, carotenóides, compostos fenólicos.

ABSTRACT

Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) is a fruit of Cerrado Brazilian region with great economic importance and contains high levels of phenolics compounds and carotenoids as well as high antioxidant activity. This work aimed at developing products rich in functional compounds, mainly phenolic compounds and carotenoids, from aqueous and alcoholic pequi extracts concentrated by membrane processes. Initially, the main variables of the process (time and temperature) were evaluated, to define the best form of alcohol and water extraction of bioactive compounds from the pulp, prickly endocarp and seed fruit. From the conditions selected in this first step (25 °C for 1 h to extract the aqueous extract and 40 °C for 24 h for the alcohol extract), concentrated extracts were produced using a laboratorial membrane unit, which makes the simulation of cross flow with different types of membranes: one of ultrafiltration (UF with cut-off of 100 KDa) and two of nanofiltration (NF 90 and NF 270, with cut-off of 200-300 Da and different materials). During the process, the permeate fluxes was calculated, the membranes were subjected to a morphological characterization before and after the concentration process and the products obtained (feed, concentrate and permeate) from each process were characterized by the following properties: density, viscosity, color, total polyphenols, carotenoids and antioxidant activity. The permeate fluxes of ultra and nanofiltration process for alcoholic and aqueous extracts varied from 7.06 to 9.17 L/h.m², and they did not presented significant difference. The concentration membrane process of the alcoholic pequi extract was ineffective to concentrate the bioactive compounds, since all conditions showed retention coefficient lower than 15% for both, phenolic compounds and carotenoids. For the aqueous extract, the nanofiltration membranes process showed 100% retention of carotenoids and 93% (NF 270) and 97% (NF 90) the retention of polyphenols. According to these results, the aqueous concentrate obtained with the NF 90 membrane showed rich in bioactive compounds and higher antioxidant activity.

Keywords: *Caryocar brasiliense* Camb., nanofiltration, antioxidants, carotenoids, phenolics compounds.

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Compostos bioativos ou compostos com propriedades funcionais são substâncias como polifenóis, vitaminas, carotenóides, oligofructose, entre outras, que normalmente estão presentes nos alimentos em pequenas quantidades e afetam benéficamente uma ou mais funções alvo no organismo. Estes compostos não são remédios e não apresentam efeitos terapêuticos, eles possuem os efeitos nutricionais, de maneira que sejam tanto relevantes para o bem-estar e a saúde quanto para redução dos riscos e prevenção de problemas de saúde e melhoramento do metabolismo do corpo humano (KRIS-ETHERTON et al., 2002; ROBERFROID, 2002; BIESALSKI et al., 2009).

Alto teor de compostos bioativos (compostos fenólicos, β -caroteno, zeaxantina, violaxantina, luteína e vitamina C) é encontrado em uma típica fruta do cerrado brasileiro: o pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) (AZEVEDO-MELEIRO, 2003; LIMA et al., 2007). Estes compostos são antioxidantes naturais que vem apresentando um crescente interesse de consumidores e da comunidade científica, devido à grande ênfase dada à atividade antioxidante como modo de ação contra doenças crônicas e degenerativas, incluindo o câncer. Além disso, estudos mostram que os antioxidantes também estão envolvidos no processo de envelhecimento (BARREIROS, DAVID e DAVID, 2000; MCCORD, 1994; KRINSKY, 1994).

O pequi também apresenta alto valor nutricional, é fonte de energia, proteínas, fibras e minerais, possuindo principalmente zinco, cobre e fósforo (OLIVEIRA et al., 2010). Atua como fonte de renda para diversos sertanejos da região e é bastante apreciado e largamente consumido nas regiões produtoras, apesar de ainda ser pouco conhecida em todo território nacional e não ter ampla exploração comercial (OLIVEIRA et al., 2008).

Pesquisas científicas como as realizadas por Grisolia et al. (2006); Roesler et al. (2007); Lima (2008); Porto (2008); entre outros, indicam que os compostos com propriedades funcionais do fruto pequi podem ser extraídos utilizando diferentes solventes. O álcool etílico, por extrair grande quantidade de compostos bioativos e ser adequado a indústria de alimentos, é um dos solventes mais utilizados para o processo de extração em vegetais. Entretanto, esse possui alto sabor residual (KONISHI et al., 2004, LAPORNIK; PROSEK; WONDRA, 2005). Assim, um solvente alternativo que está sendo muito estudado recentemente é a água, que vem se mostrando

muito eficiente para a extração, sendo mais vantajosa principalmente por não ter contra indicações e não apresentar sabor residual. Os compostos fenólicos são hidrossolúveis. Os carotenóides apesar de lipossolúveis, podem ser extraídos em água, em menor quantidade, como é o caso do α e β -caroteno, licopeno, luteína e zeaxantina (SÁNCHEZ et al., 2008). Desta maneira, é interessante o estudo da extração dos compostos bioativos por ambos os solventes.

No entanto, na extração sólido-líquido de produtos naturais (vegetais, ervas, etc.) normalmente se obtém um extrato muito diluído, fazendo-se necessária sua concentração para posteriores aplicações. Os processos tradicionalmente utilizados para concentrar este tipo de extrato incluem a destilação a vapor simples ou a vácuo, que geralmente requer altas temperaturas e elevado consumo de energia, tornando-se inapropriados para esta aplicação, já que os compostos biologicamente ativos são termossensíveis (TYLKOWSKI et al., 2010a).

O processo de separação por membranas (ultra, nanofiltração e osmose inversa) tem sido bastante utilizado para concentrar compostos biologicamente ativos (XU; WANG, 2005; JESUS et al., 2007; PATIL; RAGHAVARAO, 2007; TSUI; CHERYAN, 2007; ONGARATTO, 2009; GURAK et al. 2010; MELLO; PETRUS; HUBINGER, 2010; SILVA, 2010; TYLKOWSKI et al., 2010b; PESHEV et al., 2010). Este método baseia-se na utilização de membranas sintéticas como barreira seletiva, que restringem total ou parcialmente o transporte de uma ou várias espécies químicas presentes em uma solução. Assim, a tecnologia promove a separação dos compostos sem a utilização de altas temperaturas (RIJN, 2005, HABERT; BORGES; NÓBREGA, 2006).

Portanto, a utilização de processos de separação por membranas em extratos vegetais preserva os compostos bioativos. Seus produtos conservam as propriedades nutricionais e antioxidantes dos extratos frescos, além de manterem a cor e o *flavor* do produto inicial, o que não é observado nos processamentos térmicos (CASSANO et al., 2003)

Os processos de separação por membranas devem ser testadas para cada solução de trabalho, pois a eficiência desta técnica é diretamente afetada por alguns fatores do processo, como características da solução de alimentação, tipo de membrana, velocidade tangencial, pressão, temperatura, turbulência e tamanho das partículas.

Desta maneira, é de interesse estudar os processos de extração dos compostos biologicamente ativos de pequi e sua concentração por processo de separação por membranas,

ultra e nanofiltração, para a obtenção de extratos concentrados que podem viabilizar o uso desta fruta como ingrediente nas indústrias cosmética, farmacêutica e alimentícia. Espera-se com isto, aumentar suas perspectivas de comercialização e agregar valor ao produto nacional, além de proporcionar o desenvolvimento social, econômico e ambiental do cerrado, gerando renda para as populações locais e a proteção ambiental.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo principal estudar a viabilidade do uso do processo de separação por membranas para a concentração de extratos alcoólicos e aquosos de polpa, endocarpo e sementes de pequi, de forma a obter um produto concentrado, com alto teor de compostos bioativos.

Os objetivos específicos foram:

- Caracterizar nutricionalmente a polpa e a semente do pequi;
- Estudar a extração aquosa e alcoólica, em escala de bancada, da polpa, endocarpo e semente de pequi, avaliando-se as principais variáveis relativas ao processo, para se obter um extrato com maior teor de compostos fenólicos e carotenóides;
- Estudar a concentração do extrato da polpa, endocarpo e semente de pequi por processos de ultra e nanofiltração;
- Analisar os extratos de pequi e os produtos obtidos no processo de separação por membranas em relação à atividade antioxidante, teor de carotenóides e compostos fenólicos, verificando a preservação de tais compostos após o processo de concentração.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Pequi

3.1.1. Aspectos gerais

O fruto pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), pertencente à família botânica Caryocaceae, é uma espécie nativa do cerrado brasileiro. Tem ocorrência no Pará, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais, Bahia, Piauí, Ceará e Maranhão, onde é conhecido popularmente como pequi, piqui, pequiá-bravo, amêndoa de espinho, grão de cavalo ou amêndoa do Brasil (ALMEIDA et al., 1998; LIMA et al., 2007).

O pequizeiro (Figura 3.1A) é uma árvore com tronco tortuoso de casca áspera e rugosa e pode chegar a 10m de altura. Suas folhas são formadas por três folíolos com as bordas recortadas e suas flores (Figura 3.1B) são grandes e amarelas, surgindo durante os meses de setembro a dezembro (SILVA; TASSARA, 2001).



Figura 3.1. (A) O pequizeiro e (B) A flor do pequizeiro.

Cada árvore pode fornecer em média 6 mil frutos por ano, entre os meses de janeiro e março. É considerado maduro quando sua casca, que permanece sempre da mesma cor verde-amarelada, amolece. Partida a casca, encontram-se o mesocarpo externo e de um a quatro caroços reniformes (Figura 3.2A). Cada um é constituído de polpa, de coloração amarelo-intensa, que, por sua vez, envolve um caroço duro (endocarpo), que contém uma semente (Figura 3.2B). Ao redor do caroço encontra-se grande quantidade de pequenos espinhos, os quais são responsáveis pelo nome do fruto originado do tupi, “pyqui”, no qual “py” significa casca, e “qui”, espinho (ALMEIDA; SILVA, 1994; SILVA; TASSARA, 2001).

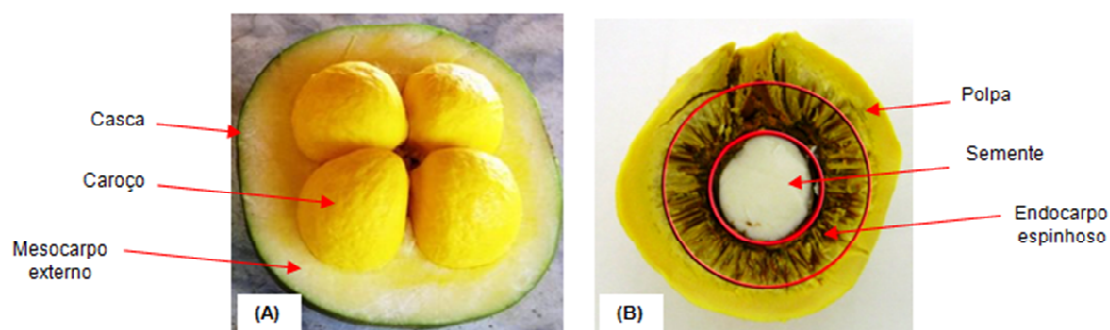


Figura 3.2. (A) O fruto do pequi partido e (B) O caroço do pequi partido.

Atualmente, a exploração econômica do pequi é considerada uma prática ambientalmente sustentável, que acontece de forma extrativista e envolve principalmente os sertanejos habitantes da região de coleta, que vendem o fruto *in natura* e seus derivados no mercado local e nas cidades circunvizinhas ou em cooperativas (SILVA; TASSARA, 2001). No Brasil em 2006, conforme registros do IBGE, foram colhidas 5.351 toneladas de pequi, das quais a produção dos Estados brasileiros encontra-se na Figura 3.3 (ROCHA et al., 2008).

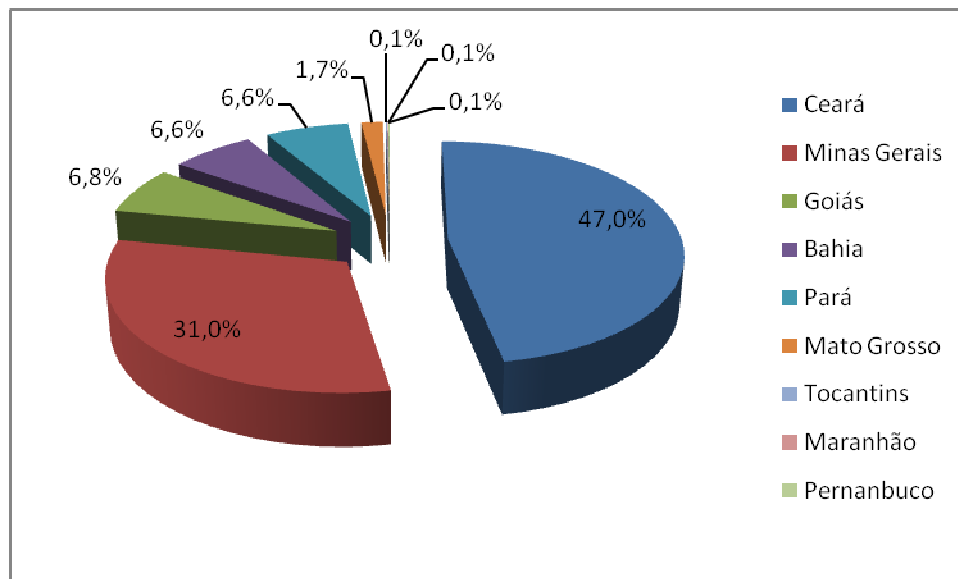


Figura 3.3. Produção de pequi dos Estados Brasileiros (ROCHA et al., 2008).

Existem vários produtos derivados do pequi com aplicações em diferentes segmentos da atividade humana. A polpa do fruto é muito apreciada na forma de licor e é amplamente utilizada na cozinha regional, fazendo parte da elaboração de diferentes pratos, como: arroz com pequi,

feijão com pequi, frango com pequi e o tradicional baião de três: arroz, feijão e pequi (LIMA et al., 2007). O óleo extraído da polpa além de ser utilizado na culinária, é empregado na indústria cosmética e como produto da medicina popular, já que seu efeito tonificante combate a bronquite, a gripe e o resfriado. A amêndoa ou castanha é comestível e muito saborosa, sendo utilizada como ingrediente de farofas, doces e paçocas, além de ser consumida salgada como petisco (OLIVEIRA et al., 2008). A indústria de cosméticos também a utiliza, produzindo a partir de seu óleo, sabonetes e cremes fortificantes para pele (SILVA; TASSARA, 2001). Da casca do pequi é fabricada uma farinha, que possui sabor distinto e característico, além de aumentar o teor de fibra do alimento em que foi empregada (BIDERMAN, 2009).

A polpa de pequi é rica em fibras e minerais, possuindo principalmente zinco, cobre e fósforo. Destaca-se ainda, entre as frutas tropicais, quanto ao teor de lipídios, tanto da polpa, quanto da amêndoa. A polpa e a amêndoa de pequi são capazes de suprir cerca de 15% e 22% das necessidades calóricas de uma dieta de 2000Kcal de um indivíduo adulto, respectivamente (OLIVEIRA et al., 2010). Nas Tabelas 3.1 e 3.2 encontra-se a composição química média da polpa e amêndoa de pequi, respectivamente, apresentada por diferentes autores.

Tabela 3.1. Composição química centesimal da polpa de pequi. Valores médios e seus respectivos desvios padrões.

Constituintes	TACO (2006) ¹	Lima et al. (2007) ²	Oliveira et al. (2010) ³
Umidade (%)	65,9	41,50 ± 2,00	55,00 ± 4,73
Acidez (%)	-*	-*	1,50 ± 0,63
Cinzas (g)	0,8	0,63 ± 0,01	0,63 ± 0,06
Proteínas (g)	2,3	3,00 ± 0,13	2,00 ± 0,49
Lipídios (g)	18	33,40 ± 3,76	23,00 ± 4,90
Vitamina C (mg)	8,3	-*	-*
Fibra alimentar (%)	19	10,02 ± 0,2	-*
Carboidratos (g)	13	11,45	18,00 ± 2,27

*Constituintes não analisados.

¹ Dados analíticos médios para a variedade *Caryocar brasiliense* Camb. na fruta fresca (base úmida).

² Dados analíticos médios para a variedade *Caryocar brasiliense* Camb. na fruta seca (base seca).

³ Dados analíticos médios para a variedade *Caryocar coriaceum* Wittm. na fruta fresca (base úmida).

Tabela 3.2. Composição química centesimal da amêndoa de pequi. Valores médios e seus respectivos desvios padrões.

Constituintes	Lima et al. (2007)¹	Oliveira et al. (2010)²
Umidade (%)	8,68 ± 0,08	35,00 ± 3,96
Cinzas (g)	4,01 ± 0,51	3,50 ± 0,40
Proteínas (g)	25,27 ± 0,74	_*
Lipídios (%)	51,51 ± 0,35	34,00 ± 4,15
Fibra alimentar (%)	2,20 ± 0,1	_*
Carboidratos (g)	8,33	_*

*Constituintes não analisados.

¹ Dados analíticos médios para a variedade *Caryocar brasiliense* Camb. na fruta seca (base seca).

² Dados analíticos médios para a variedade *Caryocar coriaceum* Wittm. na fruta fresca (base úmida).

Além disso, ultimamente o fruto vem recebendo grande atenção pelo seu alto teor de compostos com propriedades antioxidantes (compostos fenólicos e carotenóides). Dois fatores favorecem a biossíntese de tais compostos: sua região de ocorrência, onde as árvores recebem alta incidência de raios solares, o que promove a geração de radicais livres, e o fato da polpa e da amêndoa serem ricas em lipídios, com predomínio dos ácidos graxos insaturados (61,35% e 52,17%, respectivamente), que são altamente susceptíveis à oxidação (LIMA et al., 2007).

Alguns autores estudaram a extração dos compostos bioativos de pequi. Roesler et al. (2007) demonstraram que os extratos alcoólico e aquoso de polpa e semente (processados por 20 minutos à 25°C) possuem alto conteúdo de compostos fenólicos; Lima (2008) também encontrou alta atividade antioxidante em extratos aquosos e alcoólicos de polpa e semente de pequi (processados por 1h à 25°C); e Porto (2008) relatou que o extrato alcoólico da polpa (processado por 24h à 25°C) apresentou alto teor de carotenóides, além de polifenóis.

Os compostos fenólicos abrangem várias substâncias orgânicas, sendo metabólitos secundários presentes naturalmente em frutas e vegetais. Sua ocorrência em tecidos animais é geralmente devido à ingestão de alimentos vegetais (SHAHIDI; NACZK, 2006). Por sua vez, os carotenóides constituem um grupo de compostos lipossolúveis, amplamente distribuídos na natureza, em quantidades apreciáveis, e são responsáveis pela pigmentação do pequi (OLIVEIRA et al., 2008).

Estes compostos apresentam vários benefícios à saúde humana, decorrentes de sua atividade antimicrobiana, antitumor, agentes de proteção contra a radiação ultravioleta (UV),

além da atividade antioxidante, sua principal característica (SHAHIDI; NACZK, 2006; RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008).

3.1.2. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são formados no metabolismo secundário dos vegetais, nos quais estão envolvidos em várias funções: propriedades sensoriais (cor, aroma, sabor, adstringência), crescimento, processos germinativos da semente, defesas contra praga, entre outras. Em animais e humanos, tem-se observado que são capazes de reagir com radicais livres, neutralizando-os. O poder de bloqueio das estruturas radiculares pelos compostos polifenólicos deve-se à estrutura química destes, formada por pelo menos um anel aromático, ligado a uma ou mais hidroxilas (Figura 3.4) (BRAVO, 1998; LIU, 2007).

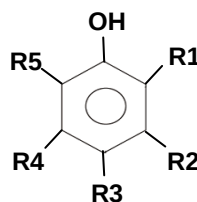


Figura 3.4. Estrutura básica de um fenol

A quantificação dos compostos fenólicos totais presentes em um alimento geralmente é realizada de forma simples, podendo ser realizada por métodos espectrofotométricos baseados em medições simples de absorbância em comprimentos de onda adequados. Quando se deseja separar e identificar os compostos, os métodos cromatográficos são os mais utilizados, sendo que a mais rápida e eficiente separação de misturas complexas dos compostos é feita por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (ANTOLOVICH et al., 2000; SHAHIDI; NACZK, 2006).

Lima (2008) encontrou 209,0 mg de fenóis totais/100g de polpa e 122,0 mg/100g de amêndoa de pequi. Além disso, o mesmo autor identificou ácido gálico, elágico e p-cumárico no extrato aquoso da polpa, sendo o ácido elágico o mais abundante, e no extrato da amêndoa, além dos compostos fenólicos encontrados na polpa, procianidina também foi detectada. Roesler et al.

(2007) relataram altas concentrações de compostos fenólicos totais principalmente no extrato obtido da casca do pequi, sendo superior ao teor encontrado no extrato preparado a partir da semente e da polpa do fruto, resultados que podem aumentar as possibilidades de uso do pequi. Os compostos fenólicos encontrados no extrato da casca do pequi foram ácido gálico, ácido quínico e quercetina (ROESLER et al., 2008).

A elevada capacidade antioxidante dos compostos fenólicos encontrados no pequi pode ser evidenciada pelo estudo de Fernández-Pachón et al. (2006), em que os autores relataram alta atividade antioxidante avaliada pelo método ORAC para o ácido gálico, p-cumárico, e a procianidina. Além disso, Vatten e Shetty (2005) relataram que o ácido elágico possui potentes efeitos antimutagênico, anticancerígeno, e hepatoprotetor, entre outros.

3.1.3. Carotenóides

Os carotenóides estão amplamente distribuídos na natureza, em quantidades apreciáveis, sendo responsáveis pelas pigmentações de amarelo ao vermelho de muitas frutas, hortaliças, gema de ovo, crustáceos cozidos e alguns peixes. Constituem um grupo de compostos lipossolúveis, altamente instáveis à luz e em temperaturas elevadas (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008).

A importância dos carotenóides vai além do seu papel pigmentante; enquanto alguns são precursores de vitamina A, outros atuam no fortalecimento do sistema imunológico e exibem ação antioxidante, como já mencionado, sendo considerados compostos com propriedades funcionais (OLIVEIRA et al., 2008, RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008).

A quantificação dos carotenóides totais presentes em um alimento geralmente é realizada por métodos espectrofotométricos baseados em medições simples de absorbância em comprimentos de onda do carotenóide predominante no alimento analisado. Deste modo, a correta identificação da composição de carotenóides presente no alimento é o pré-requisito desta quantificação. Para separar e identificar os compostos, a técnica analítica atualmente preferida para os carotenóides é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008).

O pequi é rico em carotenóides e dentre os frutos do cerrado seu teor é superado apenas pela polpa de buriti (LIMA et al., 2007). Os carotenóides encontrados por Azevedo-Meleiro (2003) na polpa de pequi foram a violaxantina, luteína, zeaxantina, β -criptoxantina, β -caroteno e neoxantina, sendo, segundo Rodrigues-Amaya, Kimura e Amaya-Farfan (2008), a zeaxantina o carotenóide predominante.

Além disso, Porto (2008) demonstrou que os extratos alcoólicos preparados de polpa de pequi apresentam alto conteúdo de carotenóides, sendo, juntamente com os compostos fenólicos, provavelmente as principais substâncias responsáveis pela atividade antioxidante do pequi.

3.1.4. Atividade antioxidante

A oxidação é um processo metabólico que leva à produção de energia necessária para as atividades vitais celulares. Entretanto, o metabolismo do oxigênio nas células provoca uma produção de radicais livres, cujo excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios da membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA (MCCORD, 1994; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). O excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta, que protegem o sistema biológico contra os efeitos nocivos de processos ou reações que possam causar oxidação excessiva (KRINSKY, 1994). O *stress* oxidativo tem sido associado ao desenvolvimento de muitas doenças crônicas e degenerativas, incluindo o câncer, e está envolvido no processo de envelhecimento.

Diversos estudos têm sugerido que os antioxidantes naturais na dieta diária humana podem aumentar a capacidade antioxidante do plasma, protegendo, desta maneira, o organismo contra o dano oxidativo e reduzindo o risco de alguns tipos de câncer, arteriosclerose e outras doenças degenerativas. Estas propriedades são atribuídas a uma variedade de constituintes, como vitaminas, minerais, fibras e numerosos fitoquímicos, incluindo os compostos fenólicos e os carotenóides (WANG; CAO; PRIOR, 1996; MIRANDA-VILELA; RESCK; GRISOLIA, 2008).

O comportamento dos compostos fenólicos como antioxidantes provavelmente está relacionado com sua capacidade para quelar metais, inibir a ação da enzima lipoxigenase e capturar radicais livres, sendo mais efetivos que as vitaminas C e E, pois os polifenóis possuem

estrutura ideal para seqüestrar radicais. A atividade antioxidante dos compostos fenólicos depende de sua estrutura e pode ser determinada por alguns fatores: reatividade como agente doador de hidrogênio e elétrons, reatividade frente a outros antioxidantes, capacidade de quelar metais de transição e solubilidade e interação com as membranas. Em geral, quanto maior o número de hidroxilas, maior a atividade como agente doador de hidrogênio e de elétrons (BARREIROS, DAVID; DAVID, 2006; TONON, 2009).

As propriedades e funções antioxidantes dos carotenóides são devidas a um sistema extenso de duplas ligações conjugadas presentes em suas moléculas, que conferem a capacidade de desativação do oxigênio singlete e interação com radicais livres (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006, RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008). Formam um tipo incomum de agentes redutores biológicos, pois são mais efetivos em baixas concentrações de oxigênio, e em altos níveis deste podem ser destruídos. Como na maioria dos tecidos biológicos o nível de oxigênio é baixo, os carotenóides adquirem grande importância como antioxidantes (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos e carotenóides é interessante desde o ponto de vista tecnológico até o nutricional, uma vez que estes compostos intervêm como antioxidantes naturais dos alimentos e desta forma, a preparação de alimentos com um alto conteúdo destes supõe uma redução na utilização de antioxidantes sintéticos, resultando em alimentos mais saudáveis, que podem ser incluídos dentro da classe dos alimentos funcionais (MARTINEZ-VALVERDE; PERIAGO; ROS, 2000).

Devido à grande ênfase dada à atividade antioxidante como modo de ação contra doenças, a capacidade antioxidante dos alimentos tem sido largamente determinada *in vitro*, por vezes correlacionada às concentrações das substâncias bioativas no alimento, de forma a predizer o seu efeito na saúde humana (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008). Atualmente, existe um grande número de métodos para a determinação da capacidade antioxidante *in vitro* de um alimento. Estes métodos podem ser baseados na captura do radical peroxila (ORAC, TRAP), do radical hidroxila (método de desoxirribose) e do radical orgânico (ABTS, DPPH), no poder de redução de um metal (FRAP, CUPRAC), na quantificação de produtos formados durante a peroxidação de lipídios (TBARS, oxidação do LDL, co-oxidação do b-caroteno), entre outros (FRANKEL; MEYER, 2000; SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

O método DPPH (atividade sequestrante de radicais DPPH) tem sido bastante utilizado na avaliação da atividade antioxidante em frutas e se baseia na reação de um composto antioxidante com um radical estável, DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). O radical DPPH que apresenta uma cor violeta escuro, tende a clarear durante a reação com o composto antioxidante. A redução do radical é monitorada pelo decréscimo na absorbância da solução de DPPH a 517 nm (comprimento de onda em que o radical DPPH em etanol apresenta absorbância máxima). Uma vantagem deste método é que o radical livre, DPPH, está disponível comercialmente, o que evita sua geração por distintas formas (o que ocorre em alguns métodos), além de facilitar seu uso (LIMA, 2008).

O método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) – Poder Antioxidante de Redução do Ferro – foi desenvolvido para determinar a redução do ferro em fluidos biológicos e soluções aquosas de compostos puros. O método pode ser aplicado não somente para estudos da atividade antioxidante em extratos de alimentos e bebidas, mas, também, para o estudo da eficiência antioxidante de substâncias puras, com resultados comparáveis àqueles obtidos com outras metodologias mais complexas (PULIDO et al., 2000). Além disso, o método mostra-se eficiente e reprodutível para quantificação da atividade antioxidante total de extratos de frutas (THAIPONG et al., 2006; RUFINO et al., 2010). Ele é baseado na capacidade de reduzir Fe^{3+} para Fe^{2+} , em meio ácido, surgindo uma coloração azul intensa na presença de antioxidantes e causando um aumento na absorbância a 593 nm.

Roesler et al. (2007) e Lima (2008) avaliaram a atividade antioxidante *in vitro* de extratos aquosos e alcoólicos de amêndoa e polpa de pequi e encontraram alta capacidade destes extratos em sequestrar radicais livres. Além disso, Lima (2008) estudou a capacidade antioxidante *in vivo* dos extratos aquosos da polpa de pequi e verificou que os extratos não exerceram nenhum efeito antinutricional que comprometesse o crescimento dos animais estudados e diminuíram significativamente a lipoperoxidação do tecido cerebral e hepático, confirmando o potencial efeito protetor do extrato.

A propriedades funcionais presentes no pequi também podem ser evidenciadas pelo registro de patente (GRISOLIA et al., 2006) de desenvolvimento de cápsulas gelatinosas de pequi a partir da extração da polpa com água destilada, seguida de liofilização e encapsulação, utilizadas como suplemento vitamínico, agente antioxidante e antimutagênico.

3.2. Extratos Vegetais

Devido à crescente demanda por produtos naturais, os extratos vegetais estão cada vez mais em foco. São encontrados nos mais diversos tipos de produtos e atraem, particularmente, as pessoas que buscam uma alimentação saudável. Podem ser utilizados nas indústrias cosmética, farmacêutica e alimentícia, nesta última sendo empregados na composição de aromas e para enriquecer sucos, água mineral, bebidas quentes, lácteas ou energéticas, alimentos funcionais e suplementos alimentares (PORTO, 2008; FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2010).

Além disso, os extratos vegetais, que possuem polifenóis, carotenóides, ácidos fenólicos, flavonóides, taninos, vitaminas, entre outros, apresentam atividade antioxidante, podendo melhorar a estabilidade oxidativa dos produtos alimentícios e aumentar a vida útil dos mesmos. Desta maneira, os extratos vegetais apresentam uma excelente alternativa para substituir total ou parcialmente os antioxidantes sintéticos, comumente utilizados nas indústrias de alimentos, com o intuito de preservar a degradação lipídica e que, atualmente, estão sendo associados ao desenvolvimento em ratos de alguns tipos de câncer, como os de próstata, mama e estômago (HIROSE et al., 1986).

Os extratos são definidos como preparações concentradas, de diversas consistências possíveis, obtidas a partir de matérias primas vegetais, que passam ou não por tratamento prévio (inativação enzimática, moagem, etc.) e preparados por processos envolvendo o uso de solvente. Isso implica basicamente em duas etapas no processo de fabricação: a separação dos compostos específicos de um meio complexo (a planta utilizada, raiz, polpa, semente, caule, folha) com a utilização de um solvente; e a concentração, por eliminação mais ou menos completa dos solventes (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2010).

O álcool etílico é o solvente mais utilizado para a extração em vegetais, pois muitos estudos mostram que este extrai grande quantidade de compostos bioativos e é mais adequado à indústria de alimentos que outros solventes, como o metanol, excelente extrator. Entretanto, esse solvente possui alto sabor residual (KONISHI et al., 2004; LAPORNIK; PROSEK; WONDRA, 2005). Assim, um solvente alternativo que está sendo muito estudado recentemente é a água, e vem se mostrando muito eficiente para a extração, sendo mais vantajosa principalmente por não ter contra indicações e não apresentar sabor.

Os processos tradicionalmente utilizados para se concentrar os extratos vegetais incluem a destilação a vapor simples ou a vácuo, que geralmente requer altas temperaturas e elevado consumo de energia, tornando-se inapropriados para esta aplicação, já que os compostos biologicamente ativos são termos sensíveis (TYLKOWSKI et al., 2010a). Os processos de concentração por membranas possuem a vantagem de serem não-térmicos e poderem proporcionar uma excelente separação de componentes em peso molecular estreito, se bem escolhidas às membranas utilizadas.

Nesta área, pode-se citar a concentração de compostos bioativos de extratos de própolis (MELLO; PETRUS; HUBINGER, 2010; TYLKOWSKI et al., 2010a), extrato de chá verde com remoção da cafeína (NWUHA, 2000), extrato de resíduo de groselha vermelha (HODÚR et al., 2009), extrato do vegetal *Sideritis ssp.* (TYLKOWSKI et al., 2010), entre outros.

3.3. Processos de Separação por Membranas

3.3.1. Aspectos gerais

A tecnologia de membranas surge como uma alternativa, ou complemento, à maioria dos processos convencionais de separações, como a destilação, extração, fracionamento, adsorção etc. Suas principais vantagens são: alta seletividade, baixo consumo energético, possibilidade de separação de forma contínua, simplicidade de operação, fácil aumento de escala e uso de baixas temperaturas (ou temperatura ambiente, não danificando compostos termossensíveis) (RIJN, 2005; HABERT; BORGES; NÓBREGA, 2006).

Esta tecnologia se baseia no princípio de permeação seletiva de moléculas de soluto em membranas semipermeáveis, permitindo assim a passagem de certos componentes presentes na solução e retendo outros (CHERYAN, 1998).

Dois tipos de configurações podem ser utilizadas no processo de separação por membranas, representados na Figura 3.5: o método de filtração estático (convencional), utilizado em processos de pequena escala, e a filtração tangencial.

Na filtração frontal (Fig. 3.5 A), a alimentação se dá perpendicularmente à posição do meio de separação (filtro ou membrana), o soluto, ou os materiais em suspensão, são retidos, acumulando-se na superfície da membrana com o passar do tempo, diminuindo

consideravelmente o fluxo do permeado, aumentando a resistência ao fluxo e, exigindo, assim, freqüentes paradas no processamento para limpeza ou troca do filtro (operação transiente) (DZIEZAK, 1990; HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006). Para minimizar este acúmulo de material na superfície da membrana pode ser realizada a agitação da alimentação nos processos de pequena escala.

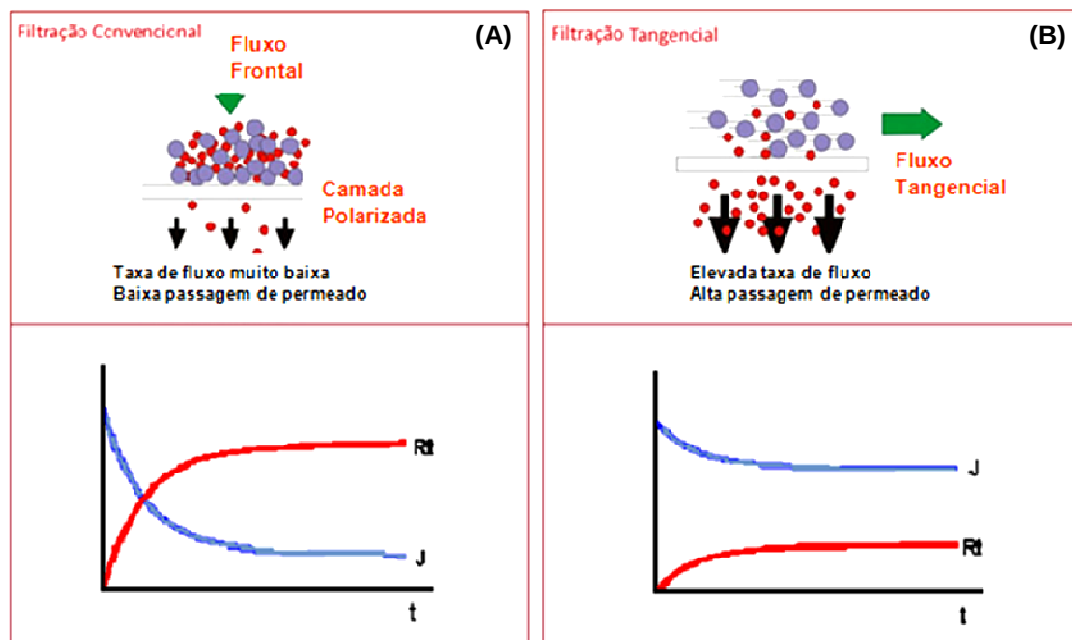


Figura 3.5. Esquemas ilustrativos das filtrações (A) convencional e (B) tangencial e seus respectivos comportamentos do fluxo e da resistência causada pelo acúmulo de material na superfície da membrana em função do tempo, onde J é o fluxo de permeado e R_t é a resistência ao fluxo causada pelo acúmulo (CHERYAN, 1998).

No caso da filtração tangencial (Fig. 3.5 B), em processos de maiores escalas, a solução ou a suspensão escoam paralelamente à superfície da mesma, desta maneira, as partículas depositadas sobre a membrana são constantemente arrastadas pela própria corrente tangencial da alimentação, o acúmulo de materiais na superfície e a resistência ao fluxo são minimizados e o fluxo se mantém a um patamar mais alto ao longo do tempo, tornando possível a concentração da alimentação com alto teor de solutos, o trabalho com maior volume de matéria-prima e a operação do sistema em regime contínuo (PAULSON et al., 1984; DZIEZAK, 1990; HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006).

Nos processos de micro, ultra, nanofiltração e osmose inversa, a força motriz utilizada para promover o escoamento através da membrana é a diferença de pressão entre o lado da alimentação e o lado do permeado (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006). A pressão hidráulica necessária para que ocorra o processo de transporte distingue os diversos processos de separação por membrana. Além disso, a diferença de seletividade de cada membrana está relacionada com o tamanho das partículas retidas e o tamanho do poro da mesma (Tabela 3.3) (CHERYAN, 1998).

Tabela 3.3. Processos de separação por membranas (adaptada de HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006).

Processo	Força Motriz (ΔP)	Tamanho do poro	Material Retido	Material que permeia
Microfiltração	(0,5 – 2 bar)	10^2 - 10^4 nm	Material em suspensão, bactérias. MM >500 kDa.	Água e sólidos dissolvidos
Ultrafiltração	(1 – 7 bar)	1–100nm	Colóides, macromoléculas. MM >5000 Da	Água, sais solúveis de baixa MM
Nanofiltração	(5 – 25 bar)	8 – 15 Å	Moléculas de MM média $500 < MM < 2000$ Da	Água, sais e moléculas de baixa MM
Osmose Inversa	(15 – 81 bar)	1 – 12 Å	Todo material solúvel ou em suspensão.	Água

MM = Massa Molecular

O desempenho das membranas depende do tipo de compostos contidos nos fluidos de alimentação (causadores da polarização de concentração) e das propriedades dos materiais da membrana (características de retenção, estrutura dos poros, tendência de incrustações, hidrofobicidade e estrutura química) (SCHÄFER; FANE; WAITE, 2005).

Um benefício do processo por membranas que deve ser destacado é sua total adequação no que diz respeito às questões ambientais. A menor produção de efluentes e a possibilidade de seu tratamento, a redução no consumo de energia e de produtos químicos, além das vantagens já

citadas, constituem fatores atrativos para a transferência da tecnologia de membrana para a prática industrial (COUTINHO et al., 2009).

3.3.2. Fenômenos que limitam o processo

Nos processos de separação por membranas, particularmente naqueles que utilizam membranas porosas, é normal ocorrer uma queda do fluxo do permeado com o tempo, mesmo em escoamento tangencial. Este declínio é um motivo crítico para a aceitação da tecnologia de membranas na indústria. São conhecidos os fenômenos que limitam o fluxo de permeado: a polarização da concentração e incrustação dos poros da membrana durante o processamento (HABERT; BORGES; NÓBREGA, 2006).

Segundo Cheryan (1998), os sólidos são arrastados para a superfície da membrana por transporte convectivo e, sendo parcialmente ou totalmente rejeitados, tendem a se concentrar na interface ao longo do processo, formando um gradiente de concentração, já que, a concentração de solutos próximos à superfície da membrana torna-se maior que no seio da solução. A este aumento da concentração dá-se o nome de polarização da concentração. Ela é responsável pelo desvio do fluxo comparado ao fluxo de água pura, pois provoca o contra-fluxo de solutos em direção à alimentação, em virtude da difusão, formando a região de polarização ou polarização da concentração (Figura 3.6).

Quando a retenção de solutos é muito alta, forma-se uma camada polarizada na membrana, que oferece uma resistência adicional ao fluxo. Esse fenômeno não pode ser evitado, mas pode-se minimizar a sua formação, controlando-se as condições operacionais, como a redução da pressão de aplicação, aumento da turbulência na superfície da membrana (Cheryan, 1998).

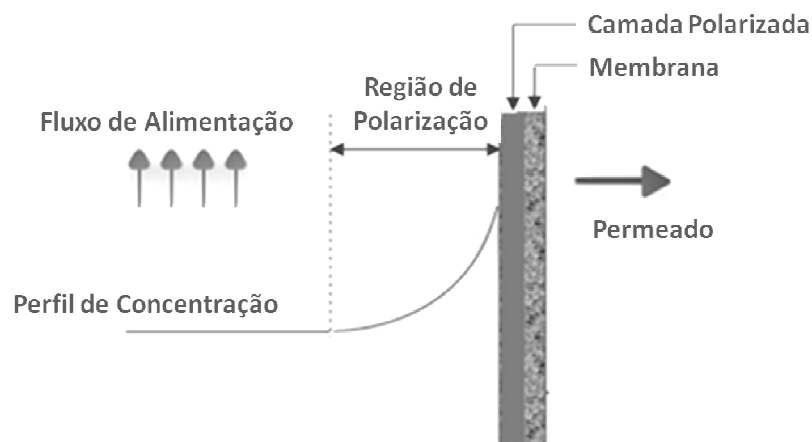


Figura 3.6. Esquema de formação de camada polarizada na membrana (adaptado de CHERYAN, 1998)

A incrustação dos poros é um fenômeno no qual a membrana adsorve ou interage de alguma maneira com o soluto da corrente de alimentação, resultando numa diminuição do fluxo e/ou aumento da rejeição de soluto pela membrana. Como resultado da interação entre a membrana e diversos solutos presentes na solução, ou até mesmo entre solutos adsorvidos na membrana e solutos presentes na corrente de alimentação, a incrustação pode ser resultado de três fatores principais, ou da interação entre eles: as propriedades do material constituinte da membrana, as propriedades do soluto e os parâmetros operacionais (CHERYAN, 1998).

O fenômeno de polarização da concentração é reversível; uma vez terminada a operação e a limpeza da membrana, a permeabilidade da membrana é recuperada (a integridade e eficiência da membrana à passagem do solvente retornam a sua condição anterior à operação) (HABERT; BORGES; NÓBREGA, 2006). Já a incrustação possui uma remoção mais complicada, sendo eliminado apenas nas operações de limpeza química, com substâncias detergentes, soluções alcalinas ou ácidas e agentes oxidantes (PETRUS, 1997; RODRIGUES, 2002).

3.3.3. Microfiltração

A microfiltração é o processo de separação com membranas mais próximo da filtração clássica. As membranas possuem maiores poros, de modo que o solvente e todo o material

solúvel permeiam através das mesmas, apenas o material em suspensão é retido. Os maiores mercados da microfiltração são: esterilização de líquidos e gases; aplicações na medicina; aplicações na biotecnologia e na clarificação de fluidos (HABERT; BORGES; NÓBREGA, 2006).

A esterilização bacteriana é particularmente útil na indústria alimentícia, farmacêutica e biotecnologia uma vez que o processo é operado em temperatura ambiente, adequada ao processamento de substâncias termolábeis. Por este motivo, este tipo de membrana também é muito utilizado para clarificação de vinhos, cervejas e sucos, pois além de preservar os compostos ativos (termolábeis), esta tecnologia não altera as propriedades organolépticas desses produtos (HABERT; BORGES; NÓBREGA, 2006). Alguns trabalhos podem ser citados nesta área como: esterilização a frio e clarificação de suco de abacaxi (CARNEIRO et al., 2002), esterilização a frio de extrato *Hibiscus sabdariffa* L. (CISSE et al., 2011), clarificação de suco de caju, de acerola, de tamarindo, de vinho de abacaxi (CAMPOS et al., 2002; MATTA; MORETTI; CABRAL, 2004; WATANABE; USHIKUBO; VIOTTO, 2006, YOURAVONG; LI; LAORKO, 2010).

3.3.4. Ultrafiltração

A ultrafiltração é um processo de separação por membranas utilizado quando se deseja clarificar, concentrar e fracionar soluções contendo macromoléculas (MULDER, 1997; HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006).

Dentre as aplicações da ultrafiltração na área de alimentos estão a concentração do leite na fabricação de queijo e recuperação das proteínas do soro na indústria de laticínios; a concentração de gelatina, clara de ovo e sucos de fruta, vinho e cerveja na indústria de bebidas (PORTER, 1990). Podem ser também concentrados por ultrafiltração; pigmentos naturais de extrato de casca de uva (PHILIP, 1984) e de extrato de rabanete vermelho (PATIL; RAGHAVARAO, 2007) (antocianinas), de suco de beterraba (PHILIP, 1984) e de polpa de figo da índia (CASSANO; CONIDI; DRIOLI, 2010) (betanina), de polpa de mamão (SILVA, 2010) e de suco de pitanga (ONGARATTO, 2009) (carotenóides).

3.3.5. Nanofiltração

A nanofiltração é caracterizada, normalmente, pelas separações de sais divalentes e solutos orgânicos de massa molar média (entre 500 e 2000 Dalton), apresentando seletividade intermediária entre a ultrafiltração e a osmose inversa. Os sistemas de nanofiltração, de modo geral, requerem pressões de operação (da ordem de 5-25 bar) muito menores que às aquelas solicitadas na osmose inversa. Por esta razão, processos onde se utiliza nanofiltração podem ser considerados economicamente favorecidos, se comparados à osmose inversa (SCHÄFER; FANE; WAITER, 2005; HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006).

Essa tecnologia permite diversas aplicações: recuperação dos solventes da filtração de óleos, separação e reuso de catalisadores na indústria farmacêutica, troca de solventes na indústria química (GEENS et al., 2006), concentração de vinhos (BANVOLGYI et al., 2006) e sucos de frutas (VINCZE; STEFANOVITS-BÁNYAIB; VATAI, 2006). Além disso, nos últimos anos, a nanofiltração vem se destacando como ótima opção para separar compostos de massa molecular menor que 1000 Da, com reduzido custo e baixas temperaturas de operação, sendo excelente alternativa para concentrar compostos bioativos de produtos naturais, que são termossensíveis. Como exemplo desta concentração pode-se citar: concentração de compostos fenólicos de extratos de própolis (MELLO; PETRUS; HUBINGER, 2010; TYLKOWSKI et al., 2010a), de extrato do vegetal *Sideritis ssp.* (TYLKOWSKI et al., 2010b) e de extrato de semente de cacau (SARMENTO et al., 2008), flavonóides de extrato de *Ginkgo biloba* (XU; WANG, 2005), carotenóides de óleo de palmeira (TSUI; CHERYAN, 2007; CHIU; COUTINHO; GONÇALVES, 2009), ácido rosmarínico de extrato de alecrim (PESHEV et al., 2010), entre outros.

O tipo de membrana empregada no processo e sua taxa de recuperação (que é definida como a eficiência da membrana em remover sais e outros compostos da solução após sua limpeza) são os fatores que mais interferem nos custos de investimento e manutenção do processo de nanofiltração, pois afetam o tamanho e a potência dos equipamentos utilizados (PILIPOVIK; RIVEROL, 2005).

3.3.6. Osmose inversa

As membranas de osmose inversa possuem características intermediárias entre as membranas porosas e as membranas densas, alguns autores afirmam que estas podem ser consideradas densas, pois não apresentam poros discretos. Neste processo a capacidade seletiva da membrana depende da afinidade das diferentes espécies com o material desta (etapa de natureza termodinâmica) e da difusão das mesmas através do filme polimérico (etapa de natureza cinética). O fluxo permeado possui natureza difusiva, uma vez que a membrana não apresenta poros próximos a superfície que se encontra em contato com a solução a ser processada. Assim, apresenta uma maior resistência à permeação e, conseqüentemente, necessita de pressões de operação mais elevadas do que as utilizadas em nanofiltração (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006).

A aplicação tradicional da osmose inversa é a dessalinização de águas salobras e do mar, também tem sido utilizada no tratamento de águas, na produção de água ultrapura, no tratamento de águas duras, na indústria alimentícia, entre outras. O processo pode também ser usado em combinação com a ultrafiltração, pervaporação, destilação e outros processos de separação, mais eficientes do que cada uma dessas técnicas isoladamente (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006). Como exemplo desta aplicação pode-se citar o trabalho realizado por Matta, Moretti e Cabral (2004), no qual os autores clarificaram o suco de acerola por microfiltração e após utilizaram a osmose inversa para concentrar o suco, mantendo a qualidade nutricional devido à preservação e concentração do ácido ascórbico. Ramarethinam, Anitha e Latha (2006) também clarificaram extrato de chá verde por ultrafiltração antes de submetê-lo à osmose inversa para concentração de polifenóis. Do mesmo modo, outros autores avaliam a osmose inversa para concentrar compostos ativos de produtos, como ácido ascórbico de suco de camu-camu (*Myrciaria dubia*) (RODRIGUES et al., 2004) e de suco de laranja (SILVA; JARDINE; MALTA, 1998; JESUS et al., 2007), antocianinas e polifenóis de suco de uva (GURAK et al., 2010) e de extrato de folhas e talos de *Perilla frutescens* (MENG et al., 2006).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Matéria-prima

Como matéria-prima, foi utilizado pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) branqueado e congelado (fruta descascada com polpa e endocarpo íntegros), adquirido na Cooperativa Grande Sertão (Montes Claros, MG, Brasil). Não foi possível trabalhar com o fruto *in natura*, pois este se encontra disponível apenas nos meses de janeiro, fevereiro e março e é muito perecível.



Figura 4.1. Pequi congelado utilizado.

As frutas congeladas foram armazenadas em uma câmara frigorífica, a -18°C , sendo descongelada de acordo com as quantidades necessárias para cada ensaio.

4.2. Membranas

Os compostos de interesse deste trabalho apresentam massas moleculares distintas, os carotenóides possuem massa molecular entre 530 e 570 Da, enquanto os polifenóis são menores, tendo cerca de 200 a 220 Da. Dessa forma, as membranas foram escolhidas de acordo com estudos já realizados para concentração dos compostos fenólicos e carotenóides. Foram testadas membranas de ultrafiltração e nanofiltração, que estão apresentadas na Tabela 4.1.

Conforme dados fornecidos pelos fabricantes, a membrana Microdyn-NADIR de ultrafiltração é hidrofílica, apresenta alta estabilidade química e fluxo de água pura maior que 300 L/h.m^2 nas condições de teste de 3 bar a 20°C e velocidade de rotação de 700 rpm, em unidade

de membrana que faz simulação do escoamento tangencial. As membranas Dow são destinadas a diferentes aplicações, a membrana NF 90 apresenta alta remoção de sal (NaCl 85-95%, $\text{MgSO}_4 > 97\%$), alta remoção de nitrato, ferro e pesticida, e a membrana NF270 apresenta baixa remoção de sal (NaCl 40%, $\text{MgSO}_4 < 3\%$), remoção mediana de cálcio (CaCl_2 40-60%) e alta remoção de compostos orgânicos (DOW LIQUID SEPARATIONS – FILMTEC MEMBRANES, 2007). De acordo com Nghiem e Hawkes (2007), as membranas NF 90 e NF 270 possuem permeabilidade a água pura de 6,4 e 13,5 $\text{L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}.\text{bar}^{-1}$.

Tabela 4.1. Membranas utilizadas nos ensaios.

Membranas	UF	NF 90	NF 270
Fabricante	Microdyn-NADIR	Filmtec Dow	Filmtec Dow
Tipo	Ultrafiltração	Nanofiltração	Nanofiltração
Material	Polissulfona	Poliamida e Polissulfona	Polipiperazina Poliamida e Polissulfona
Top. ¹ (°C)	95	45	45
Faixa de pH	1 - 14	3 - 10	3 - 10
Pop. ² (bar)	-	41	41
MWCO ³ (Da)	100000	200 - 300	200 - 300

¹ Top.: temperatura máxima de operação.

² Pop.: pressão máxima de operação.

³ MWCO: *Molecular weight cut-off* (Massa molecular de corte).

4.3. Etapas do trabalho

a) Caracterização físico-química das frações do pequi: O caroço do pequi foi caracterizado pelas medidas de diâmetro e comprimento. A polpa e a semente do pequi, partes comestíveis do fruto, foram caracterizadas em relação à massa, teor de umidade, cinzas, fibras, proteínas, lipídeos, atividade de água, pH, acidez titulável, vitamina C, carotenóides e cor (de acordo com o

item 4.2.3.1). Para fração não comestível do mesmo, endocarpo espinhoso, somente foram realizadas as análises de massa, carotenóides totais e cor.

b) Extrações aquosas e alcoólicas de pequi: Os ensaios da extração aquosa e alcoólica dos compostos bioativos de pequi foram realizados conforme o item 4.2.1, apresentado na seção subsequente. Inicialmente, foi realizado o estudo da influência do tempo (20 minutos, 1, 12 e 24 h) e da temperatura (25, 30 e 40 °C) na extração aquosa e alcoólica das substâncias fenólicas e carotenóides do pequi e foi selecionada a condição de extração aquosa e alcoólica que apresentou maiores valores destes compostos. Na etapa seguinte, foi realizada uma repetição nestas condições, porém com re-extração do resíduo gerado nos mesmos tempos e temperatura escolhidos. Enfim, no produto final (mistura da primeira extração com a re-extração) foi avaliada, além dos compostos já citados, a atividade antioxidante.

c) Concentração dos extratos aquosos e alcoólicos por ultra e nanofiltração: Nesta etapa do trabalho, foram produzidos os extratos aquosos e alcoólicos, nas condições de extração definidas na primeira etapa do trabalho. Em seguida, foi feita a concentração destes extratos, utilizando uma célula de membrana laboratorial (com área da membrana de 0,00159 cm²) e três diferentes tipos de membrana, uma de ultrafiltração e duas de nanofiltração (NF 90 e NF 270), conforme descrito no item 4.2.2.2. O teor de carotenóides, compostos fenólicos, atividade antioxidante, cor, viscosidade e densidade foram analisados nos produtos obtidos nos processos (alimentação, concentrado e permeado). Além disso, foi medido o fluxo de permeado do processo e as membranas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura. Os produtos do processo que apresentaram melhor desempenho foram caracterizados em termos de composição química.

4.4. Processos

4.4.1. Extrações aquosas e alcoólicas de pequi

Foram produzidos extratos a partir da polpa, endocarpo espinhoso e semente de pequi. Estas frações do fruto foram escolhidas para se obter maior aproveitamento do mesmo e porque o

endocarpo espinhoso apresentou boa quantidade de carotenóides totais, como foi verificado na caracterização do fruto e apresentado no item subsequente 5.1.

O preparo dos extratos foi baseado na metodologia descrita por Roesler et al. (2007), que obtiveram o extrato a 25 °C por 20 min. Foi realizado o estudo da extração aquosa e alcoólica do pequi, em escala de bancada, avaliando-se as principais variáveis relativas ao processo, tempo (20 min, 1 h, 12 h e 24 h) e temperatura (25, 30 e 40 °C), com a finalidade de se verificar a melhor condição de obter os extratos e aumentar o aproveitamento total dos compostos fenólicos e carotenóides. Foram feitas todas as combinações possíveis deste binômio.

Etapas do procedimento: As frutas foram primeiramente descongeladas e separadas em polpa, semente e endocarpo. A seguir, foram homogeneizadas em liquidificador com água destilada na proporção de 1:3 (m/m) fruta:água. A mistura obtida continuou sendo homogeneizada com a utilização de agitador magnético (modelo RH basic I, marca IKA, Artur Nogueira, SP) com velocidade de 750 rpm, por 24 h, sendo retiradas alíquotas desta em 20 min, 1 h, 12 h e 24 h. Em seguida, o material foi centrifugado a 10000 rpm por 10 min (centrifuga modelo Allegra 25R Centrifuge, marca Beckman Coulter, São Bernardo do Campo, SP) e o sobrenadante foi filtrado a vácuo em papel filtro para remoção das gotículas de óleo. Estas extrações foram realizadas em béquer encamisado, protegido da luz, com a temperatura controlada por um banho termostático (modelo MA 184/6, marca Marconi, Piracicaba, SP) à 25 °C, 30 °C ou 40 °C. Os extratos foram armazenados à 5 °C até sua utilização. O mesmo procedimento foi realizado substituindo-se a água destilada por etanol 95% para o preparo do extrato alcoólico.

Em cada extração foram realizadas análises de carotenóides e fenóis, conforme os itens 4.2.3.2a e 4.2.3.2b, respectivamente, a fim de se avaliar qual situação foi a mais eficiente. Todas as determinações foram realizadas por meio da média $\pm$ desvio padrão de, pelo menos, três replicatas.

Nas condições mais eficientes para as extrações aquosas e alcoólicas, foi realizada uma repetição, porém com re-extração do resíduo gerado nas mesmas condições escolhidas, a fim de se verificar o maior aproveitamento dos compostos de interesse.

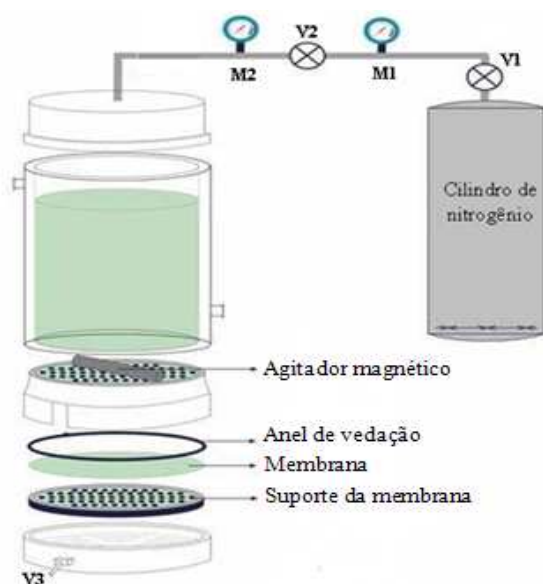
Foram avaliados o teor de carotenóides e compostos fenólicos da primeira extração, da re-

extração e do produto final (mistura das duas) de acordo com os itens 4.2.3.2a e 4.2.3.2b. Além disso, no produto final foi avaliada a atividade antioxidante de acordo com as metodologias descritas no item 4.2.3.2c.

4.4.2. Processo de Concentração

4.4.2.1. Célula de membrana laboratorial

Neste trabalho foi utilizada uma célula de membrana de escala laboratorial (ARTINOX, São José, SC, Brasil), que faz a simulação de escoamento transversal, cujo esquema e fotografia estão apresentados na Figura 4.2 e 4.3, respectivamente.



V1 – Válvula abre/fecha do cilindro de nitrogênio

M1 – Manômetro 1: fornece a leitura da pressão interna do cilindro de nitrogênio quando V1 está aberta

V2 – Válvula de regulação: regula a pressão no interior da célula

M2 – Manômetro 2: fornece a leitura da pressão no interior da célula

V3 – Válvula de saída de permeado

Figura 4.2. Esquema da unidade laboratorial de membrana (Adaptado de SILVA, 2010).

É construída em aço inox, composta de um cilindro encamisado de diâmetro interno de 0,035 m e altura de 0,225 m, tendo capacidade de 0,250 L. A célula opera até uma pressão de 8 bar. A parte inferior deste cilindro é composta por uma base, que contém uma saída para permeado. Sobre a base é montado um suporte que serve de apoio ao disco de membrana, que tem área de permeação de 0,00159 m². Anéis de vedação impedem o vazamento entre as partes. Abaixo da base é acoplado um agitador magnético (modelo RH basic I, marca IKA, Artur

Nogueira, SP), que promove a agitação da alimentação, com o intuito de aumentar o fluxo de permeado, diminuindo o efeito da resistência devido à camada polarizada que se forma sobre a membrana. Na parte superior do cilindro, existe a entrada de gás nitrogênio para criar a pressão no interior da célula gerando a força motriz do processo. A temperatura é controlada por meio da circulação de água na camisa do equipamento, através de um banho termostático (modelo MA 184/6, marca Marconi, Piracicaba, SP).



Figura 4.3. Unidade laboratorial de membrana.

4.4.2.2. Procedimento experimental

Os experimentos foram realizados na célula de membrana laboratorial do Departamento de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP.

Foram realizados dois ensaios para cada membrana. Fixou-se a temperatura de processo em 25 °C e velocidade tangencial em 750 rpm. Inicialmente, a pressão de entrada na célula para todos os processos foi fixada em 8 bar, de acordo com a limitação da célula. Porém, ao realizarem-se os ensaios no extrato alcoólico com a membrana de ultrafiltração, o fluxo de permeado foi muito alto, não havendo controle do término do processo. Portanto, a pressão apenas para o processo de ultrafiltração foi reduzida para 7 bar, tanto para o extrato aquoso quanto para o alcoólico.

Durante o processo, o volume de permeado coletado foi registrado em intervalos regulares. Quando o fator de concentração atingiu o valor de 1,5, o experimento foi finalizado. Retirou-se o concentrado do sistema e recolheram-se as amostras de permeado e concentrado para posteriores análises do teor de compostos fenólicos e carotenóides, atividade antioxidante, determinação da viscosidade, densidade, cor e morfologia das soluções, de acordo com o item 4.2.3.2. A membrana utilizada foi armazenada em dessecador para futura análise da morfologia da superfície, conforme o item 4.2.4.

4.4.2.3. Determinação das variáveis do processo

a) Cálculo do fluxo de permeado

As soluções de pequi foram colocadas em cilindro encamisado e processadas em sistema aberto. Amostras do produto permeado foram colhidas em intervalos regulares, medindo-se o seu volume. Este mesmo procedimento foi realizado para água e álcool 95% puros.

O fluxo do permeado (J) é definido pelo volume de permeado que atravessa a área da membrana em um determinado tempo, conforme a equação 4.1.

$$J = \frac{v_p}{t.A_p} \quad [4.1]$$

onde: v_p = volume do permeado coletado (L)

t = tempo (h)

A_p = área da membrana (m²)

As curvas do fluxo do permeado *versus* tempo foram calculadas de duas maneiras, uma com o fluxo pontual (J_p) e outra com o fluxo acumulado (J_a). O fluxo pontual foi calculado pelo volume de permeado recolhido no intervalo entre duas leituras e o fluxo acumulado pelo volume total de permeado recolhido sobre o tempo total decorrido de experimento.

O fluxo pontual representa um valor mais real no momento da medição. A curva de fluxo acumulado, por outro lado, fornece uma visão geral do processamento, reduzindo as variações pontuais, ocasionadas por pequenas variações nas condições operacionais, precisão na medição

de volume e do tempo.

O fluxo médio do permeado foi calculado de acordo com metodologia descrita por Tylkowski et al. (2010a). Um gráfico da função $V_i = f(A_p t_i)$ foi construindo, onde V_i é volume acumulado (L), A_p é área da membrana (m²) e t_i é tempo (h). O fluxo médio correspondeu ao coeficiente angular da equação linear encontrada, que se ajustou aos dados e obteve valor de coeficiente de correlação linear maior que 0,99.

b) Índice de retenção (R)

O índice de retenção fornece a capacidade da membrana em reter um determinado componente, sob condições de operação pré-estabelecidas (CHERYAN, 1998), definido pela equação 4.2.

$$\% R = \left(1 - \frac{C_p}{C_a} \right) \times 100 \quad [4.2]$$

onde: C_p = concentração do permeado
 C_a = concentração da alimentação

c) Fator de concentração (F)

O fator de concentração (F) determina a relação entre a massa da alimentação e do concentrado, segundo a equação 4.3.

$$F = \frac{m_a}{m_r} \quad [4.3]$$

onde: m_a = massa da alimentação
 m_r = massa do concentrado

4.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para avaliação da morfologia da membrana, antes e após a filtração por membranas, foi realizada a microscopia eletrônica de varredura (MEV).

A microanálise foi feita no Departamento de Engenharia Química da Unicamp. O equipamento utilizado foi o MEV com detector de energia dispersiva de raios-X (EDX), da marca LEO Electron Microscopy/Oxford (Inglaterra), o modelo do MEV é Leo 440i e o modelo do EDX é 6070 (Figura 4.4 A). Utilizou-se tensão de aceleração igual a 15 kV e corrente do feixe igual a 150 pA com aumento na magnitude de 3000x.

Antes da obtenção das imagens, as amostras foram recobertas com uma camada de ouro, uma vez que as membranas são constituídas de materiais poliméricos que são maus condutores de elétrons. O equipamento utilizado para este fim foi um metalizador (Sputter Coater POLARON, marca VG Microtech, modelo SC7620, Inglaterra) (Figura 4.4 B).

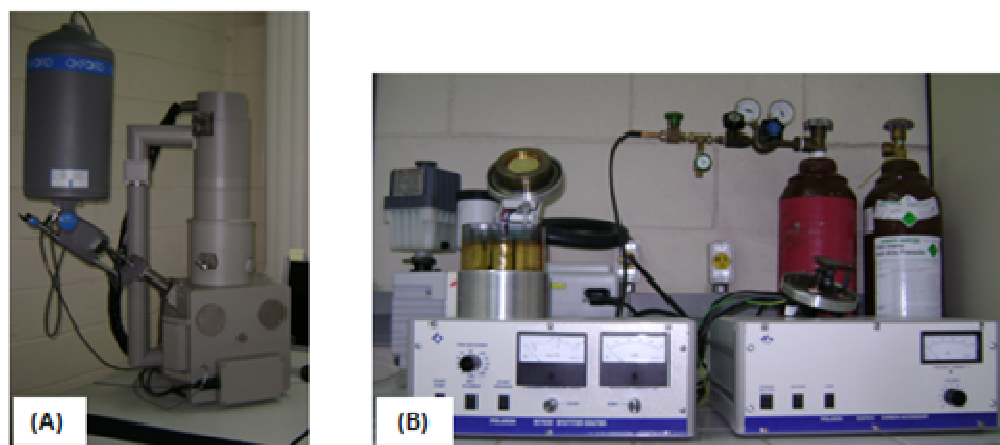


Figura 4.4. Equipamentos utilizados para análise de microscopia eletrônica de varredura: (A) microscópio eletrônico de varredura e (B) aparelho metalizador para recobrimento com camada de ouro.

4.6. Métodos Analíticos

Na caracterização da matéria-prima, as análises físico-químicas foram realizadas em pelo menos cinco replicatas nas amostras de polpa e semente de pequi, que são as partes comestíveis do fruto. Na fração não comestível do mesmo, endocarpo espinhoso, somente foram realizadas as análises de carotenóides totais e cor, importantes para o presente estudo. As análises de medidas de comprimento, diâmetro e massa no caroço da fruta, assim como da massa das frações (polpa,

endocarpo espinhoso e semente) foram feitas em 50 pequis de um lote.

Na avaliação da influência do tempo e da temperatura sobre a extração de compostos fenólicos e carotenóides do pequi, os extratos foram caracterizados em relação o teor de carotenóides e compostos fenólicos e atividade antioxidante.

Na etapa de concentração dos compostos bioativos por membranas, nos produtos obtidos pelos processos (alimentação, concentrado e permeado) foram analisados o conteúdo de carotenóides, compostos fenólicos, atividade antioxidante, cor, viscosidade e densidade. Além disso, somente na alimentação, foi realizada a caracterização da morfologia das partículas da solução. Os produtos do processo mais eficiente, que apresentou maior fluxo de permeado e retenção de carotenóides e polifenóis, foram caracterizados físico-quimicamente, determinando-se o teor de sólidos sol, pH, acidez titulável, teor de umidade, proteínas, lipídeos e vitamina C.

a) Determinação de diâmetro e comprimento

As medidas foram realizadas no caroço inteiro através da utilização do paquímetro digital (modelo CD-6", marca Mitutoyo, GS, Japão). O comprimento corresponde à medida longitudinal da fruta (C) e o diâmetro (D), ao valor medido no equador do caroço (Figura 4.5).



Figura 4.5. Dimensões do caroço de pequi.

b) Teor de umidade

A umidade das amostras foi determinada por método gravimétrico, em estufa a 105 °C por 24 h, e após, em estufa a vácuo a 70 °C por 3 h, segundo o método oficial da AOAC (1998) n° 934.06, com modificação.

c) Atividade de água

A atividade de água foi determinada por leitura direta à temperatura de 25 °C, por meio do equipamento Aqualab (modelo Series 3 TE, Decagon Devices Inc, Pullman, WA).

d) Cinzas

O teor de cinzas foi determinado por incineração em mufla a 525 °C, de acordo com o método de Cinzas de Frutas e Produtos de Frutas, segundo método oficial da AOAC (1998) nº 940.26.

e) Fibras

O teor de fibras foi determinado pelo método de digestão: Fibra (bruta) em plantas, segundo método oficial da AOAC (1998) nº 930.10, com modificação.

f) Proteínas

O teor de proteínas foi determinado pelo método Kjeldahl para Proteína em Produtos de Frutas, segundo método oficial da AOAC (1998) nº 960.52.

g) Lipídios

O teor de lipídios foi determinado por extração com éter de petróleo e éter etílico para a polpa e hexano para a amêndoa utilizando o equipamento Soxhlet, segundo metodologia adaptada de IAL (2005).

h) Acidez titulável

A acidez titulável foi determinada por titulação com NaOH (0,1N) com indicador fenolftaleína e expressa em termos de g de ácido cítrico / 100g do produto, segundo método descrito pela AOAC (1998).

i) pH

O pH foi determinado em um potenciômetro, utilizando-se o pHmetro Tecnalise, modelo pH 300.

j) Vitamina C

O teor de vitamina C foi determinado apenas na polpa de pequi por titulação com solução 2,6-diclorofenolindofenol, segundo método oficial da AOAC (1998) nº 985.33, com modificação.

l) Cor

A cor da polpa, semente e endocarpo espinhoso de pequi foi analisada por reflectância, através de colorímetro Ultra Scan Vis 1043 (Hunter Lab, Reston, EUA), em escala CIELab (L^* , a^* , b^*), na temperatura de 25 °C. As medidas foram expressas em termos dos parâmetros: luminosidade L^* ($L^*=0$ preto e $L^*=100$ branco), cromaticidade a^* ($+a^*$ =vermelho e $-a^*$ =verde) e b^* , ($+b^*$ =amarelo e $-b^*$ =azul). Com esses parâmetros, foram avaliadas as coordenadas cilíndricas C^* e H^* , onde C^* define o croma e H^* o tom (ou ângulo Hue), a partir das equações 4.4 e 4.5.

$$C^* = \sqrt{(a^{*2} + b^{*2})} \quad [4.4]$$

$$H^* = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad [4.5]$$

O sistema CIELab é baseado na percepção apenas das diferenças de cor observáveis nas coordenadas cilíndricas do sistema. Assim, através do software Adobe Photophop 7.0.1[®] e dos valores de L^* , a^* e b^* obtidos no colorímetro, foram feitos padrões que representam a coloração composta pela média dos valores lidos na amostra com caráter apenas ilustrativo. O Apêndice B apresenta os padrões de coloração das amostras.

m) Carotenóides

A medida de carotenóides totais foi feita com base no teor de β -caroteno. A determinação do teor de carotenóides foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Rodriguez Amaya (1999), baseada na extração dos carotenóides com acetona, seguida por separação em éter de

petróleo, diluição em balão volumétrico. Em seguida foi realizada a leitura da absorbância máxima em espectrofotômetro (modelo SQ-2800 UV/VIS, marca UNICO, United Products & Instruments Inc., Nova Jersey, Estados Unidos) em comprimento de onda igual a 450 nm, utilizando o éter de petróleo puro como branco. Para quantificação dos carotenóides foi utilizado a absorbância obtida e a equação 4.6.

$$Carotenóides_{\text{ totais}} = \frac{Abs \cdot V \cdot 10^6}{A_{1cm}^{1\%} \cdot m \cdot 100} \quad [4.6]$$

onde: Carotenóides_totais são expressos em [µg/g];

V = Volume da diluição [ml];

Abs = Máxima absorbância medida;

$A_{1cm}^{1\%}$ = Absorvidade para a β-caroteno em éter de petróleo, 2592;

m = Massa da amostra [g].

n) Substâncias fenólicas totais

A determinação de polifenóis totais nos extratos foi feita pelo método colorimétrico de Folin Ciocalteau (SWAIN e HILLIS, 1959), que se baseia no princípio da reação de redução dos ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico, em meio alcalino a óxidos de tungstênio e molibdênio pelos compostos fenólicos, formando um complexo de cor azul.

As amostras foram diluídas em seus respectivos solventes na proporção de 1:10, extrato: solvente. Uma alíquota de 0,5 ml da amostra diluída foi adicionada a 2,5 ml de solução aquosa do reativo Folin Cicalteau a 10%. Decorridos três minutos, foram acrescentados 2 ml de solução aquosa de carbonato de sódio a 7,5%. Após uma hora as absorbâncias das soluções foram lidas em espectrofotômetro (modelo SQ-2800 UV/VIS, marca UNICO, United Products & Instruments Inc., Nova Jersey, Estados Unidos) a 760 nm. Como branco, para calibrar o espectrofotômetro, foi utilizada uma alíquota de 0,5 ml do solvente do extrato acrescida de solução de Folin Cicalteau e de carbonato de sódio nas mesmas concentrações e condições citadas anteriormente. Para a quantificação dos compostos fenólicos totais foi construída uma curva padrão utilizando ácido gálico na faixa de concentração de 0,5 – 100 µg/ml. A quantidade de compostos fenólicos

foi expressa em μg de ácido gálico/ml de extrato. A quantificação dos compostos fenólicos nos extratos de pequi foi realizada por meio da média $\pm$ desvio padrão de pelo menos três replicatas.

o) Avaliação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi analisada utilizando-se duas metodologias distintas, DPPH e FRAP, para melhor quantificação e comparação.

o.1) DPPH

Foi utilizada a metodologia descrita por Rufino et al. (2007), sendo a atividade sequestrante de radicais livres dos extratos determinada utilizando-se 1,1-difenil-2-picrilidrazil (DPPH). O DPPH é um radical livre estável que aceita um elétron ou um radical hidrogênio podendo ser reduzido na presença de um antioxidante.

O método baseia-se na redução do DPPH (que tem coloração púrpura) pela ação de antioxidantes presentes na amostra, formando difenilpicril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da sua coloração original e redução da absorção, podendo a mesma ser monitorada pela leitura em espectrofotômetro a 517 nm. A partir das leituras de absorção obtidas determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou a porcentagem de DPPH remanescente no meio reacional.

No procedimento, as amostras foram dissolvidas no respectivo solvente de extração na proporção de 1:10 extrato: solvente. Uma alíquota de 0,3 ml da amostra diluída foi adicionada a 0,3 ml de solução DPPH na concentração de 0,5 mM/L e a 2,4 ml de etanol (99,5%). Após 40 minutos de reação, sob abrigo de luz, foi realizada a leitura das absorbâncias das amostras em espectrofotômetro (modelo SQ-2800 UV/VIS, marca UNICO, United Products & Instruments Inc., Nova Jersey, Estados Unidos) a 517 nm. Como controle foi utilizada uma alíquota de 0,3 ml do solvente do extrato acrescida de solução DPPH e etanol nas mesmas concentrações. O etanol foi usado com branco, para calibrar o espectrofotômetro. A determinação da atividade antioxidante foi realizada por meio da média $\pm$ desvio padrão de pelo menos três replicatas.

A capacidade de sequestrar radicais livres foi expressa como percentual de inibição de oxidação do radical e calculado conforme a equação 4.7.

$$PI(\%inibição) = \left[\frac{A(0) - A(t)}{A(0)} \right] \times 100 \quad [4.7]$$

onde: A(0) = Absorbância do controle (solução de DPPH sem antioxidante)

A(t) = Absorbância da amostra em solução

o.2) FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power – Poder Antioxidante de Redução do Ferro):

Foi utilizada a metodologia descrita por Rufino et al. (2006). Este método foi escolhido por mostrar-se eficiente e reprodutível para quantificação da atividade antioxidante em frutas. É baseado na habilidade de redução do ferro. Em meio ácido, o complexo férrico tripiridiltriazina é reduzido a sua forma ferrosa de intensa cor azul na presença de antioxidantes, causando um aumento na absorbância a 595 nm.

Para preparo do reagente FRAP misturou-se 25 ml de tampão acetato 0,3 M (pH 3,6), 2,5 ml de uma solução de TPTZ 10 mM (preparada com HCl 40 mM) e 2,5 ml de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mM.

As amostras foram diluídas em seus respectivos solventes na proporção de 1:10, amostra: solvente. Uma alíquota de 100 µl de cada extrato diluído foi transferida para tubos de ensaio, juntamente com 3 ml do reagente FRAP recém preparado. Esta mistura foi homogeneizada e mantida em banho-maria a 37 °C. Decorridos 30 minutos, foi realizada a leitura a 593 nm em espectrofotômetro (modelo SQ-2800 UV/VIS, marca UNICO, United Products & Instruments Inc., Nova Jersey, Estados Unidos). O reagente FRAP foi utilizado como branco para calibrar o espectrofotômetro. Para a quantificação da atividade antioxidante foi construída uma curva padrão, utilizando soluções aquosas de Fe (II) na faixa de concentração de 100 – 1000µM. A determinação da atividade antioxidante foi realizada por meio da média ± desvio padrão de pelo menos três replicatas, e foi expressa em µM sulfato ferroso/ml de extrato.

p) Determinação da viscosidade das soluções

Foi feita a determinação da viscosidade da alimentação, do concentrado e do permeado obtido após o processo de concentração. A viscosidade de cada uma das soluções foi medida com

o auxílio do reômetro Physica MCR301 (Anton Paar, Graz, Áustria). As medidas foram feitas em triplicata, em geometria de placa lisa de 75 mm de diâmetro, com temperatura controlada em 25 °C por sistema Peltier e Gap de 0,2 mm para o extrato aquoso e 0,5 para o extrato alcoólico. A viscosidade das soluções foi calculada como a relação entre a tensão (σ) e a taxa de deformação ($\dot{\gamma}$).

q) Determinação da densidade das soluções

A determinação da densidade da alimentação, do concentrado e do permeado foi feita utilizando-se picnômetro de 10 ml, previamente calibrado com água destilada à 25 °C. Foram medidas as massas dos picnômetros vazios e posteriormente, com água destilada. O volume foi calculado pela relação $V=m/\rho$, onde m representa a massa de água destilada no picnômetro e ρ sua densidade, 997,08 kg/m³ (PERRY; CHILTON, 1973). Posteriormente, o picnômetro foi completado com as amostras e pesado. Tendo-se o conhecimento da massa do picnômetro vazio e de seu volume, foi feito o cálculo da densidade dos extratos.

r) Caracterização das partículas da alimentação

A fim de visualizar o material em suspensão da alimentação alcoólica e aquosa e a aglomeração deste material, estas soluções foram caracterizadas através de um estereomicroscópio, que trata-se de um microscópio de visão binocular com uma câmara clara acoplada, a qual torna possível a visão do objeto sobreposto numa superfície plana e lisa. Esta análise permite distinguir características morfológicas das fases do material avaliado, bem como: cor, transparência e brilho.

As soluções foram depositadas e dispersas em placa de Petri e observadas no estereomicroscópio (Citoval 2; Zeiss, Jena, Thüringen, Germany) equipado com uma câmera digital zoom Kodak modelo EasyShare DX4530 (Eastman Kodak Company, Rochester, MN, USA). As imagens foram capturadas em quintuplicata para cada amostra, no momento em que as soluções foram depositadas na placa de Petri e após dez minutos de repouso.

4.7. Análise estatística

Os resultados das análises foram submetidos a um teste de diferença de médias (Teste de Duncan), utilizando-se o *software* Statistica 8.0 (Statsoft, Tulsa, EUA), para um nível de confiança de 95% ($p \leq 0,05$).

Para analisar a correlação existente entre os compostos fenólicos, carotenóides e a atividade antioxidante foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson (r), para um nível de confiança de 95% ($p \leq 0,05$), usando teste de t de Student.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização da Matéria-Prima

Na primeira etapa do trabalho foi realizada a caracterização do pequi. Verificou-se que o fruto possui alta variabilidade em sua composição. Este fato já foi reportado por outros pesquisadores da fruta, como Oliveira et al. (2010), que afirmam que isto é uma tendência comumente observada em frutos de plantas oriundas de propagação por sementes.

Os caroços de pequi utilizados neste trabalho apresentaram uma massa média de $33,40 \pm 3,72$ g, $35,38 \pm 3,77$ mm de diâmetro e $48,03 \pm 5,21$ mm de comprimento, sendo que a polpa representou $30,58 \pm 2,52$ % do caroço, a amêndoa $7,40 \pm 0,84$ % e o endocarpo espinhoso $60,71 \pm 5,93$ %.

As características físicas e químicas da polpa e da amêndoa de pequi encontram-se nas Tabelas 5.1 e 5.2, respectivamente. A cor e o teor de carotenóides do endocarpo espinhoso são apresentados na Tabela 5.3. Os dados apresentados correspondem a uma média de, no mínimo, cinco determinações, com seus respectivos desvios padrão.

Tabela 5.1. Composição química centesimal da polpa e amêndoa de pequi congelado. Valores médios e seus respectivos desvios padrão.

Características Químicas	Polpa	Amêndoa
Umidade (%)	$51,17 \pm 3,78$	$32,13 \pm 2,23$
Cinzas (%)	$0,29 \pm 0,04$	$3,27 \pm 0,36$
Acidez (g)	$0,14 \pm 0,01$	$0,45 \pm 0,04$
Proteínas (%)	$2,83 \pm 0,47$	$17,52 \pm 1,64$
Lipídios (%)	$26,30 \pm 1,47$	$8,80 \pm 0,46$
Vitamina C (mg)	$6,63 \pm 1,02$	-*
Carotenóides (mg)	$10,64 \pm 0,29$	$0,11 \pm 0,72$
Fibra alimentar (%)	$17,86 \pm 2,08$	$2,07 \pm 0,17$

*quantidade não expressiva

Os resultados apresentados nas Tabelas 5.1 e 5.2 mostram que a polpa de pequi possui alto teor de lipídios, fibras e proteínas, quando comparado a outras frutas, e a amêndoa também é rica em lipídeos e proteínas. Estes resultados estão de acordo com os publicados por TACO

(Tabela Brasileira de Composição de Alimentos, 2006), Lima et al. (2007) e Oliveira et al. (2010) sendo que as variações em comparação com os valores obtidos podem ser atribuídas ao estado de maturação, diferentes condições climáticas, localização geográfica da produção, estação do ano, condições de plantio e o manuseio pós-colheita, que podem afetar a composição química dos frutos.

Tabela 5.2. Características físicas da polpa e amêndoa de pequi congelado. Valores médios e seus respectivos desvios padrão.

Características Físicas		Polpa	Amêndoa
Atividade de água		0,984 ± 0,01	0,984 ± 0,00
pH		5,38 ± 0,18	6,60 ± 0,09
Cor	L*	51,13 ± 1,08	64,18 ± 3,30
	a*	13,85 ± 3,54	-0,53 ± 0,15
	b*	59,21 ± 1,15	8,53 ± 0,45
	C*	60,89 ± 0,45	8,25 ± 0,45
	H*	76,83 ± 3,47	-86,31 ± 1,03

Tabela 5.3. Massa, teor de carotenóides e cor do endocarpo espinhoso de pequi. Valores médios e seus respectivos desvios padrão.

Características Físicas		Endocarpo
Carotenóides (mg/100g)		8,20 ± 0,36
Cor	L*	44,86 ± 0,98
	a*	9,87 ± 1,20
	b*	36,87 ± 1,89
	C*	37,69 ± 2,32
	H*	75,45 ± 0,88

O alto teor de lipídios e proteínas apresentado pelo pequi e a alta quantidade de fibras da polpa podem influenciar as etapas do processo subsequentes de preparo dos extratos, pois maior manipulação é necessária para que estes constituintes sejam eliminados ou reduzidos dos extratos.

O conteúdo de vitamina C (6,63 mg/100g) encontrado na polpa analisada estava ligeiramente abaixo dos valores apresentados na literatura. De acordo com a TACO (2006) a polpa *in natura* possui 8,3 mg de vitamina C/100g. Este resultado é provavelmente devido ao pré-

processamento (branqueamento e congelamento) e ao tempo de estocagem (aproximadamente oito meses) do pequi utilizado neste trabalho. A redução de vitamina C causada por estes fatores foi relatada em outros trabalhos. Souza Filho et al. (1999) verificaram que o pedúnculo de caju após o branqueamento apresentou redução de 23,3% no teor de ácido ascórbico em relação ao pedúnculo *in natura*. Além disso, Campelo et al. (1998), analisando a polpa de acerola pasteurizada, congelada e armazenada, relataram que houve uma redução de cerca de 23% no teor de vitamina C após oito meses, com constante redução deste nutriente após este período.

O teor de carotenóides encontrado na polpa de pequi (10,64 mg/100g) foi superior ao verificado por Lima et al. (2007) (7,25 mg/100g). Já na amêndoa, o valor quantificado pelos mesmos autores (0,30 mg/100g) foi maior que o encontrado neste trabalho (0,11 mg/100g). O endocarpo espinhoso apresentou teor de carotenóides (8,20 µg/100g), um pouco inferior ao da polpa, porém elevado para ser desconsiderado.

Os valores dos parâmetros de cor concordaram com o teor de carotenóides de cada fração. Verificou-se que a polpa apresenta coloração amarelada intensa, com valores de b^* e L^* em torno de 59 e 51, respectivamente, e levemente avermelhada, com valor de a^* de 14. Já a amêndoa, com baixo teor de carotenóides, apresentou-se levemente amarelada, com valor de b^* em torno de 8,5, e com maior luminosidade, L^* de 64,2. O endocarpo com menor quantidade de carotenóides que a polpa, possuía cor amarela mais fraca que a mesma, b^* de 37, e levemente avermelhada, a^* de 10, porém com uma menor luminosidade, L^* de 45, devido aos espinhos escuros.

O Apêndice B apresenta os padrões de coloração das frações de pequi (polpa, endocarpo e amêndoa). Os padrões, feitos no software Adobe Photophop 7.0.1® através dos valores de L^* , a^* e b^* obtidos no colorímetro, representam a coloração composta pela média dos valores lidos na amostra e têm caráter apenas ilustrativo.

5.2. Estudo da extração aquosa e alcoólica de pequi

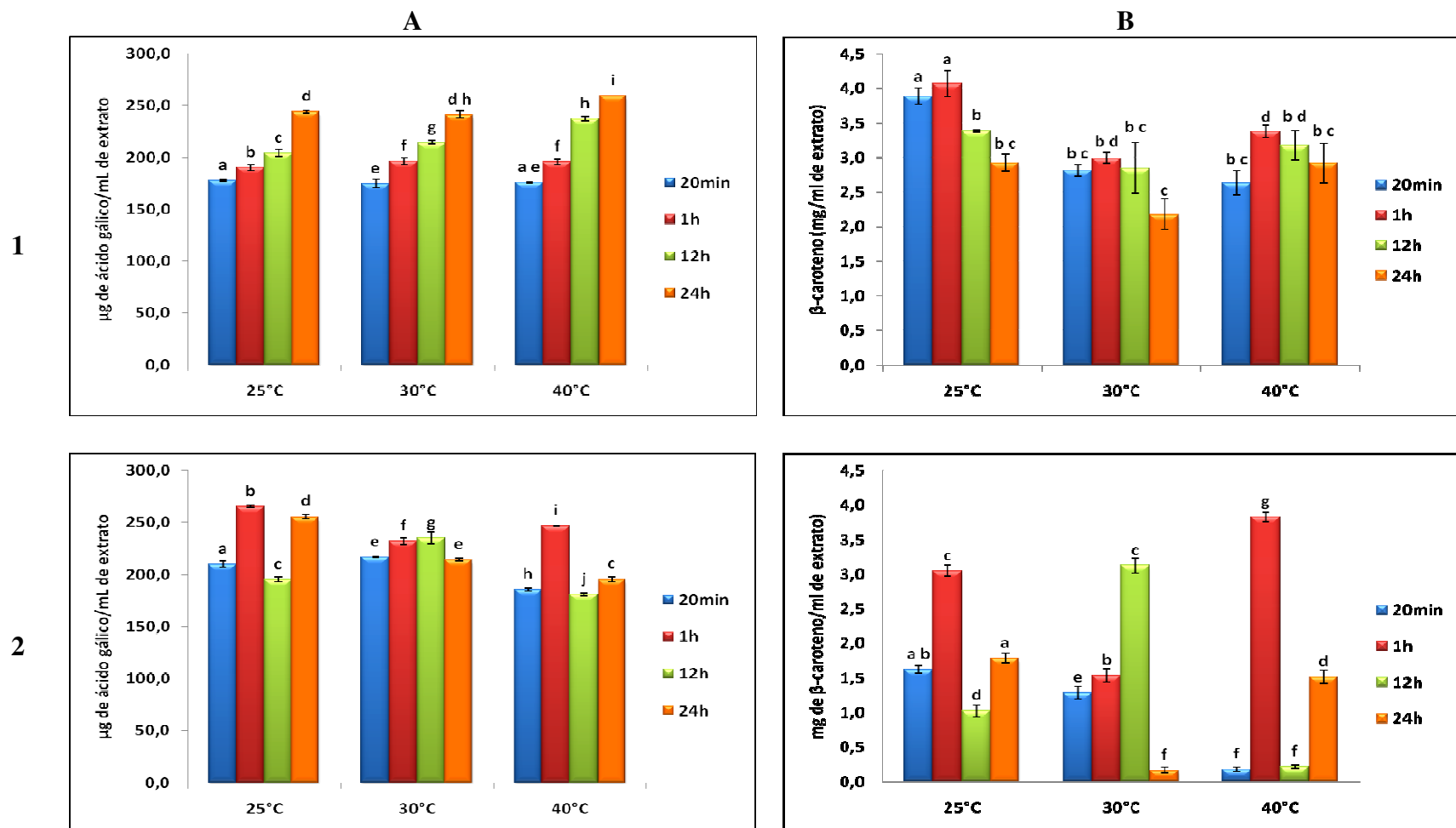
Nesta etapa do trabalho foi realizado um estudo para obter a melhor condição de extração dos compostos fenólicos e dos carotenóides do fruto pequi, usando água e etanol como solventes e diferentes temperaturas e tempos de extração. As variáveis influenciaram as duas respostas,

sendo que a variação do teor de compostos fenólicos foi de 177,87 a 261,73 µg de equivalente de ácido gálico /ml para o extrato alcoólico e de 183,79 a 334,87 µg de equivalentes de ácido gálico/ml para o extrato aquoso (Figura 5.1.A1 e 5.1.A2, respectivamente). Já o teor de carotenóides totais variou de 2,41 a 4,49 mg/ml para o extrato alcoólico e de 0,18 a 4,23 mg/ml para o extrato aquoso (Figura 5.1.B1 e 5.1.B2, respectivamente).

A Figura 5.1.A1 mostrou que o teor de compostos fenólicos para o extrato alcoólico aumentou com o tempo de extração, em todas as temperaturas, sendo maior em 40 °C (259,45 µg de ácido gálico/ml). Este resultado é similar ao encontrado por outros autores que utilizaram soluções hidroalcoólicas com diferentes concentrações de álcool para extração de compostos fenólicos em resíduo de uva, folhas de *Inga edulis* e madeira de castanheira (SILVA et al., 2007; SPIGNO; TRAMELLI; FAVERI, 2007; GIRONI; PIEMONTE, 2010). Estes trabalhos reportaram que o aumento da temperatura pode melhorar a extração de compostos fenólicos, pois possibilita maior difusão e solubilidade destes compostos. Além disso, o aumento de temperatura favorece a desagregação dos componentes celulares vegetais, o que leva à liberação dos polifenóis ligados e ao aumento da permeabilidade da membrana celular (WANG et al., 2008).

Alguns trabalhos relataram que temperaturas ainda mais altas (60 a 80 °C) apresentam maior eficiência para extrair os compostos fenólicos, necessitando de um tempo menor para mesma extração, pois longos tempos, a altas temperaturas podem degradar os compostos (MAJHENIC; SKERGET; KNEZ, 2007; SILVA et al., 2007; SPIGNO; TRAMELLI; FAVERI, 2007; GIRONI; PIEMONTE, 2010; THOO et al., 2010). Como neste trabalho a temperatura máxima utilizada foi de 40 °C (para não provocar degradação dos compostos fenólicos nem carotenóides), necessitou de maior tempo de processamento para ocorrer a difusão dos compostos, cerca de 24 h de processo.

O extrato aquoso apresentou maior teor de compostos fenólicos que o sistema alcoólico. Este fato pode ser explicado pelas substâncias fenólicas serem, em sua maioria, polares, portanto solúveis em água (CHIRINOS et al., 2007; LIMA, 2008). Deste modo, estas se difundem mais rapidamente neste solvente, tendo maior extração em menor tempo de processo, o que pode ser observado na Figura 5.1.A2. Os extratos aquosos apresentaram maior teor de compostos fenólicos em 1 h de extração a 25 °C, 1 h e 12 h a 30 °C, e 1 h a 40 °C, sendo que em 1 h e a 25 °C houve a maior concentração de compostos fenólicos (265,43 µg de ácido gálico/ml).



Letras diferentes na mesmo gráfico indicam diferença estatisticamente significativa entre os conteúdos de fenóis totais ou carotenóides do extrato aquoso e alcoólico ($p \leq 0,05$).

Figura 5.1. Variação do teor de compostos fenólicos (A) e carotenóides (B) com a temperatura e o tempo de extração para o extrato alcoólico (1) e aquoso (2).

A redução do teor de compostos fenólicos com o tempo no sistema aquoso pode ser atribuída à exposição prolongada à temperatura e oxigênio, degradação química e enzimática, polimerização e desnaturação dos compostos, e interação dos polifenóis com outros constituintes da fruta (SILVA et al., 2007; SPIGNO; TRAMELLI; FAVERI, 2007; YIM et al., 2011).

Ainda não existe trabalho na literatura que relate o estudo de otimização do processo de extração de compostos fenólicos de pequi. Entretanto, existem três trabalhos sobre extração de compostos fenólicos de pequi (*Caryocar brasiliense* Camp.) realizados por Roesler et al. (2007), Lima, (2008) e Porto (2008): à temperatura ambiente, em tempos de processamento de 20 min, 1 h e 24 h, respectivamente, com frutos de diferentes estados brasileiros (Goiás, Piauí e Minas Gerais).

Roesler et al. (2007) também trabalharam com duas extrações sucessivas da polpa e amêndoa de pequi. O extrato final (extrato da primeira extração com a re-extração) foi liofilizado e o conteúdo de compostos fenólicos desses extratos apresentaram em torno de 20,9 e 27,2 mg equivalentes de ácido gálico/g de massa seca de extrato aquoso e alcoólico, respectivamente. Lima (2008) que trabalhou com extratos aquosos de polpa e amêndoa de pequi não realizou a quantificação de compostos fenólicos totais. O autor identificou e quantificou os compostos presentes nos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência. Os fenóis presentes na polpa foram: ácido gálico (9,56 µg/g de matéria seca), ácido p-cumárico (27,43 µg/g) e ácido elágico (32,2 µg/g). E na amêndoa: ácido gálico (13,81 µg/g de matéria seca), ácido p-cumárico (34,71 µg/g), ácido elágico (38,4 µg/g) e procianidina B2 (1,51 µg/g). E o extrato alcoólico preparado por Porto (2008) apresentou 9,01 mg equivalentes de ácido gálico/g de massa seca.

Devido aos valores reportados na literatura, para o conteúdo de fenóis em extratos, diferem em valores e formas de expressar os resultados, e à fruta apresentar grande variabilidade entre as regiões, época de colheita, estágio de maturação, condições de plantio e o manuseio pós-colheita, a comparação com os resultados obtidos no presente trabalho foi muito difícil.

Em relação aos carotenóides, pode-se observar na Figura 5.1.B1 que em todas as temperaturas, as maiores concentrações foram em 1 h de extração alcoólica, sendo que à 25 °C foi obtido o melhor desempenho (4,50 mg de β-caroteno/ml).

Os carotenóides são moléculas com a estrutura altamente insaturada, o que os torna muito

susceptíveis à oxidação e isomerização. Sua estabilidade depende da exposição à luz e alta temperatura e da matriz do alimento, pois a oxidação e a isomerização são promovidas pela presença de enzimas liberadas nos cortes e trituração dos mesmos, presença de radicais livres, metais, ácidos orgânicos e lipídeos insaturados (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; RODRIGUEZ-AMAYA KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008). A prolongada exposição dos carotenóides na solução pode ter desencadeado sua degradação, verificando-se sua redução ao longo do tempo de processo. Apesar da presença dos compostos fenólicos aumentar a estabilidade dos carotenóides, protegendo-os da oxidação (UNTEN; KOKETSU; KIM, 1997), neste sistema, a presença de maior quantidade de polifenóis em 24 h de processo não foi suficiente para impedir sua degradação.

No extrato aquoso, como mostra a Figura 5.1.B2, as extrações a 25 e 40 °C por 1 h foram as melhores (3,37 e 4,23 mg de β -caroteno/ml, respectivamente), porém à 30 °C o melhor processamento durou 12 h (3,45 mg de β -caroteno/ml). A proteção contra oxidação promovida pelos polifenóis pode ser uma possível explicação para o fato do maior teor de carotenóides ter sido acompanhado pela maior quantidade de compostos fenólicos nos extratos aquosos (SILVA; ROGEZ; LARONDELLE, 2007).

De modo geral, o sistema alcoólico foi mais eficiente em extrair os carotenóides que o aquoso, o que pode ser atribuído ao fato de que em frutas, os carotenóides estão protegidos pela estrutura celular e o álcool é mais eficiente na destruição desta barreira, liberando mais carotenóides para a solução (LAPORNIK; PROSEK; WONDRA, 2005; RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008). Além disso, os carotenóides são lipossolúveis, tendo melhor solubilidade no álcool.

Para escolha das melhores condições de extração foram considerados os teores de carotenóides e compostos fenólicos, buscando avaliar o melhor processamento para a extração de ambos compostos. No sistema alcoólico foi escolhida a temperatura de 40 °C e tempo de 24 h, condição que se mostrou a mais eficiente em extrair os compostos fenólicos e também apresentou bom desempenho na extração de carotenóides. Para a extração aquosa, 25 °C por 1 h foi a condição escolhida, visto que apresentou maior extração de compostos fenólicos e extraiu muito bem os carotenóides.

Nestas condições de extração escolhidas foi realizada uma re-extração para cada extrato, nas mesmas condições. Em cada extrato obtido de duas extrações separadas (extrato da primeira

extração e da re-extração), foi determinado o conteúdo de carotenóides e compostos fenólicos. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.4. No extrato final (mistura do extrato obtido na primeira extração com o da re-extração), além do teor de carotenóides e compostos fenólicos, foi analisada a atividade antioxidante, conforme o item 4.2.3.2c. Estes resultados estão apresentados na Tabela 5.5.

De acordo com a Tabela 5.4, o teor de compostos fenólicos extraído na re-extração alcoólica foi menor, representando apenas 32% do teor da primeira extração, porém o aumento dos carotenóides extraídos foi significativo, 52% maior que na primeira extração. No sistema aquoso, a re-extração apresentou uma remoção de polifenóis de cerca de 48% e de carotenóides de 63% em relação à primeira extração. Deste modo, a re-extração dos resíduos gerados na primeira extração foi considerada eficiente para melhorar o aproveitamento dos compostos de interesse.

Tabela 5.4. Teor de compostos fenólicos e carotenóides totais, em base úmida e seca, da primeira extração e re-extração para o processo aquoso e alcoólico.

	Extrato alcoólico		Extrato aquoso	
	1ª extração	Re-extração	1ª extração	Re-extração
Fenóis (μg ác.Gal./ml)	232,09 $\pm$ 1,05	73,47 $\pm$ 6,03	258,30 $\pm$ 1,74	124,74 $\pm$ 2,11
β -caroteno ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	3,89 $\pm$ 0,37	5,90 $\pm$ 0,28	3,28 $\pm$ 0,16	2,06 $\pm$ 0,08

Tabela 5.5. Teor de compostos fenólicos, carotenóides totais e atividade antioxidante, em base úmida e seca, apresentada pelo extrato final aquoso e alcoólico.

	Extrato alcoólico	Extrato aquoso
Fenóis (μg ác.Gal./ml)	138,99 $\pm$ 10,05 ^a	213,70 $\pm$ 1,44 ^b
β -caroteno ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	4,42 $\pm$ 0,15 ^a	2,55 $\pm$ 0,07 ^b
DPPH (% inib.)	21,90 $\pm$ 0,54 ^a	23,03 $\pm$ 0,36 ^b
FRAP (mM sulfato ferroso/ml)	2,47 $\pm$ 0,05 ^a	2,62 $\pm$ 0,01 ^b

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa entre os conteúdos de fenóis totais, carotenóides, atividade antioxidante medida pelo método FRAP ou DPPH do extrato aquoso e alcoólico ($p \leq 0.05$).

Conforme apresentado na Tabela 5.5, o extrato alcoólico final apresentou menor conteúdo de compostos fenólicos e maior teor de carotenóides em relação ao extrato aquoso, que, por sua vez, apresentou maior atividade antioxidante medida por ambos os métodos, DPPH e FRAP.

Tanto o extrato alcoólico quanto o aquoso são capazes de seqüestrar o radical DPPH e reduzir o Fe^{+3} . Os resultados obtidos para capacidade antioxidante dos extratos, por ambos os métodos, são atribuídos ao diferente conteúdo dos compostos bioativos (polifenóis e carotenóides) em cada extrato e à interação de cada componente presente neste com o mecanismo de reação envolvido em cada método. O método FRAP detecta compostos com potencial redox menores que 0,7 V (o potencial redox Fe^{3+} -TPTZ), atua mediante um mecanismo de transferência simples de elétrons, porém possui reduzida capacidade de detectar compostos que agem por transferência de hidrogênio. Entretanto o método DPPH detecta os compostos que podem atuar tanto por redução direta, via transferência de elétrons, quanto por captura de radicais via transferência de átomos de hidrogênio (PRIOR et al., 2005). Assim se faz necessária a utilização de mais de um método para medir a capacidade antioxidante em sistemas distintos e confirmar o potencial antioxidante dos extratos.

Devido aos valores reportados na literatura, para a capacidade antioxidante de extratos vegetais de diversas fontes, diferirem em valores, formas de cálculo e formas de expressar os resultados, a comparação com os resultados obtidos no presente trabalho foi bastante difícil.

Porto (2008), trabalhando com extrato aquoso e alcoólico de pequi, obteve, pelo método DPPH, 20% de inibição utilizando concentração de 10 μg de extrato alcoólico seco/ μl de etanol e 15% de inibição utilizando 10 μg de extrato aquoso seco/ μl de água. Lima (2008), utilizando o mesmo método, encontrou 5% de inibição para o extrato alcoólico e 55% de inibição para o extrato aquoso, utilizando a mesma concentração de Porto (2008), porém dissolvendo o extrato seco em metanol. Estes autores não analisaram a atividade antioxidante dos extratos pelo método FRAP.

Tuberoso et al. (2010) trabalharam com extrato alcoólico e aquoso de *Myrtus communis* L., fruta vermelha típica da região mediterrânea. Os autores obtiveram em torno de 4579,0 μg de ácido gálico/ml de extrato alcoólico e 570,0 μg de ácido gálico/ml de extrato aquoso e encontraram 84,70 mM sulfato ferroso/ml de extrato alcoólico e 7,60 mM sulfato ferroso/ml de extrato alcoólico. Valores superiores ao encontrado no presente trabalho, que pode ser atribuído

ao fruto ter alto valor de antocianinas que são bem extraídas em água e álcool e quantificadas juntamente com os compostos fenólicos totais.

Para analisar a correlação existente entre os compostos fenólicos, carotenóides e a atividade antioxidante foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson (r), que permite avaliar as variáveis duas a duas e verificar se uma é explicada pela outra. O seu valor é um número compreendido entre -1 e 1. Se $r = 1$ significa uma correlação perfeita positiva entre as duas variáveis. Se $r = -1$ significa uma correlação negativa perfeita entre as duas variáveis, isto é, se uma aumenta, a outra sempre diminui. E se $r = 0$ significa que as duas variáveis não dependem linearmente uma da outra, porém, pode existir uma dependência não linear, sendo necessários outros meios de investigação (Figueiredo Filho; Silva Júnior, 2009).

Neste trabalho foram determinados os coeficientes de correlação de Pearson do conteúdo de fenóis totais, carotenóides e atividade antioxidante dos extratos obtidos na melhor condição com a re-extração. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.6.

Tabela 5.6. Coeficientes de correlação de Pearson das atividades antioxidantes, fenóis totais e carotenóides.

	Compostos fenólicos	Carotenóides	FRAP
Carotenóides	-0,99		
FRAP	0,88	-0,95	
DPPH	0,89	-0,81	0,62

Pode-se verificar que o conteúdo de carotenóides e compostos fenólicos tem forte correlação negativa, o que pode ser explicado pelo extrato aquoso possuir maior teor de compostos fenólicos em relação à quantidade de carotenóides e o extrato alcoólico apresentar o oposto. Thaipong et al. (2006), trabalhando com extrato de goiaba em metanol, também relataram forte correlação negativa entre o β -caroteno e os compostos fenólicos.

Os compostos fenólicos e a atividade antioxidante, avaliada pelos dois métodos, DPPH e FRAP, possuem forte correlação positiva, podendo-se atribuir aos compostos fenólicos a atividade antioxidante exibida pelos dois métodos. Este fato pode explicar a maior atividade

antioxidante apresentada pelo extrato aquoso, visto que este extraiu maior quantidade de polifenóis. A correlação apresentada entre os dois métodos antioxidantes foi moderada e positiva, indicando que os métodos mostraram similar capacidade de predizer a atividade antioxidante dos extratos de pequi obtidos. Resultados similares entre esses dois métodos ($r > 0,92$) e a correlação destes com o teor de compostos fenólicos ($r > 0,85$) já foram relatados por diversos autores em extrato de goiaba em metanol, extratos aquosos de *Picrorhiza kurroa* (erva medicinal), extratos aquosos e alcoólicos de mirta (*Myrtus communis* L.) e extrato de lentilha em metanol (Thaipong et al., 2006; Rajkumar; Guha; Kumar, 2010; Tuberoso et al., 2010; Zou et al., 2011).

Já entre os carotenóides e a atividade antioxidante verifica-se forte correlação negativa, que explica a menor capacidade antioxidante do extrato alcoólico, que teve maior teor de carotenóides. Thaipong et al. (2006) também reportaram forte correlação negativa entre o β -caroteno e a atividade antioxidante descrita pelos métodos FRAP e DPPH ($r < -0,70$). Já Prasad et al. (2010), trabalhando com a fruta típica da Malásia *Canarium odontophyllum* Miq., observaram baixa correlação positiva ($0,02 < r < 0,3$) do β -caroteno e luteína com a atividade antioxidante analisada pelo método DPPH.

5.3. Estudo da concentração dos extratos por processos com membranas

Nesta etapa do trabalho foi realizado um estudo para definir a melhor membrana para concentração dos compostos fenólicos e dos carotenóides do extrato aquoso e alcoólico de pequi. Foram utilizadas uma membrana de ultrafiltração (UF) e duas de nanofiltração (NF 90 e NF 270) para a realização do processo.

5.3.1. Caracterização das partículas da alimentação

As partículas da alimentação aquosa e alcoólica foram caracterizadas por imagens obtidas no estereomicroscópio. As Figuras 5.2 e 5.3 mostram as microscopias para a alimentação aquosa e alcoólica, respectivamente.

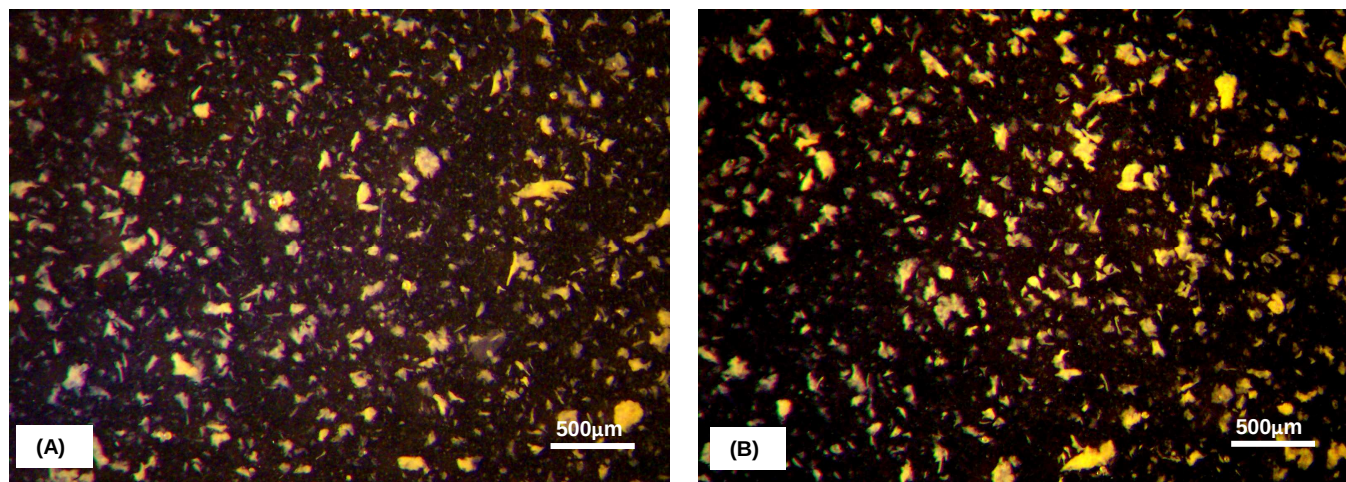


Figura 5.2. Imagens microscópicas da alimentação aquosa no momento que foi dispersa (A) e após dez minutos de repouso (B).

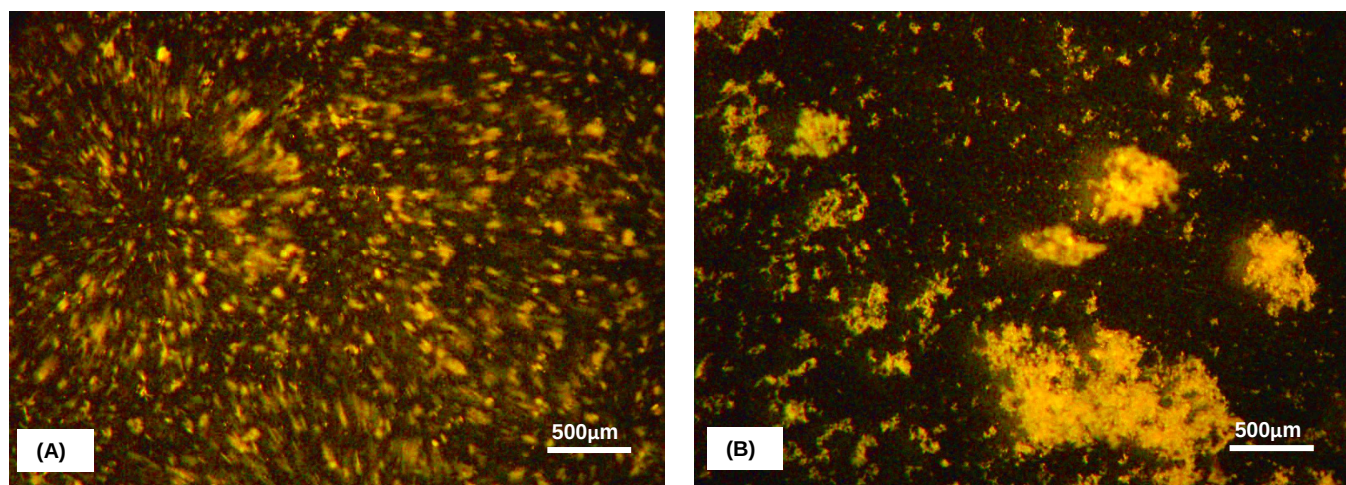


Figura 5.3. Imagens microscópicas da alimentação alcoólica no momento que foi dispersa (A) e após dez minutos de repouso (B).

Nas Figura 5.2A e 5.2B, as partículas não apresentaram formato e tamanho definidos. Além disso, não foi observada aglomeração com o tempo decorrido. Na Figura 5.3A, percebeu-se que as partículas presentes na solução alcoólica são pequenas, menores que as encontradas na solução aquosa. A falta de definição da fotografia deve-se ao movimento contínuo das partículas, que somente ficaram estáveis após alguns minutos de repouso. Após dez minutos decorridos, foi observada intensa aglomeração das mesmas (Figura 5.3B).

Este fato pode ser explicado pela constante dielétrica da água e do álcool etílico. A água tem uma alta constante dielétrica (78,5 à 25 °C), assim a força de atração entre moléculas protéicas contendo radicais com cargas opostas é baixa, predominando a interação proteína-água em vez da interação proteína-proteína. O álcool etílico, em temperaturas superiores a 0 °C, promove o rompimento de pontes de hidrogênio e interações apolares, desestabilizam as conformações protéicas e, assim, desnaturando-as. Além disso, este solvente tem constante dielétrica baixa (24,3 à 25 °C), levando à agregação e precipitação das moléculas protéicas (WEIL, 2000; NELSON; COX, 2002).

5.3.2. Morfologia das Membranas

A análise microscópica através do MEV permite a visualização estrutural das membranas. A Figura 5.4 mostra a seção transversal da membrana de ultrafiltração em detalhe, antes do processo de filtração. Foi possível identificar uma fina camada polimérica (polissulfona), o suporte fibroso, que exerce papel de sustentação mecânica da estrutura das membranas, e o provável agente compatibilizante que melhora a aderência do polímero depositado sobre a membrana. Esta observação está de acordo com Ongaratto (2009), que estudou a ultrafiltração de suco de pitanga com a mesma membrana deste trabalho.

As Figuras 5.5 e 5.6 mostram as seções transversais das membranas de nanofiltração, NF 90 e NF 270, respectivamente, antes do processo de filtração. Estas são compostas por uma fina camada superficial de pele filtrante e subestrutura fibrosa. Silva (2007) também identificou estas estruturas na membrana NF 270, quando estudou a recuperação de lignossulfonatos de baixa massa molar por nanofiltração. Estas observações estão de acordo com os fabricantes que afirmam que as membranas NF 90 e NF 270 são compostas por uma fina camada de poliamida e por uma camada microporosa de sustentação de polissulfona.

Deve-se ressaltar que, não foi possível realizar a comparação da seção transversal das membranas de ultra e nanofiltração antes e depois do processo de filtração, visto que as mesmas não fraturaram utilizando-se nitrogênio líquido. Isso ocorreu devido às fibras possivelmente presentes no suporte da membrana.

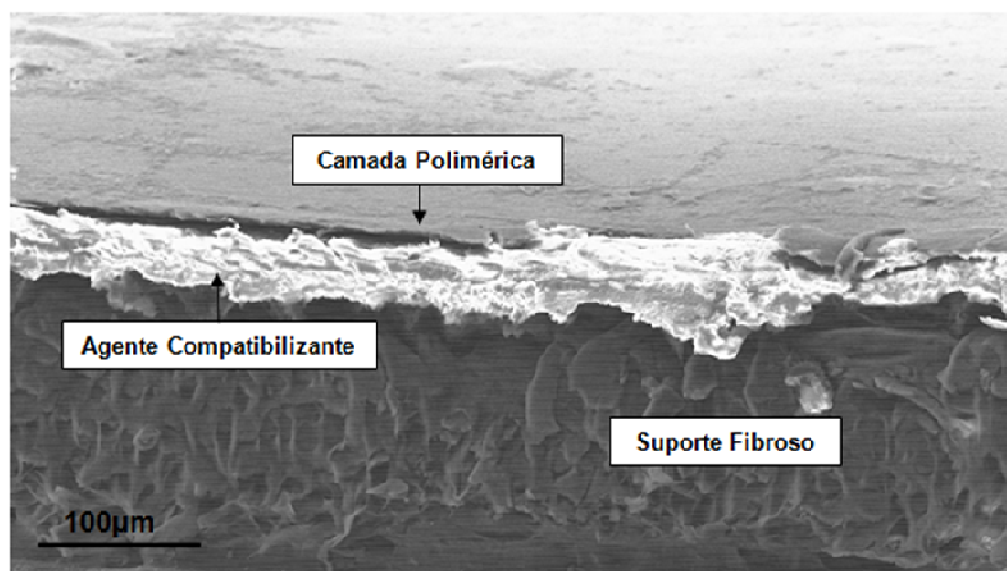


Figura 5.4. Microscopia da fratura da membrana de ultrafiltração, seção transversal antes do processo de filtração. Barra da escala = 100µm. Aumento na magnitude de 500x.

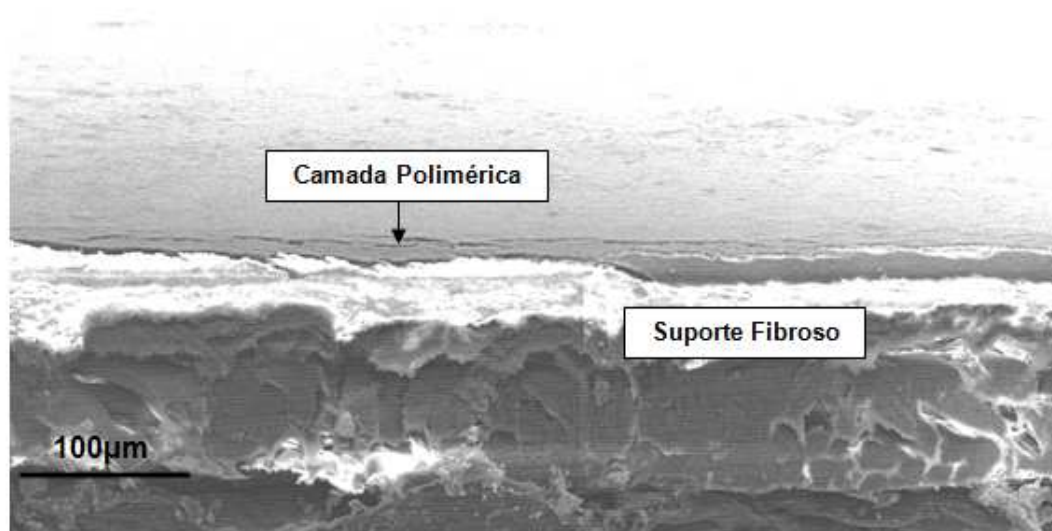


Figura 5.5. Microscopia da fratura da membrana de nanofiltração (NF 90), seção transversal antes do processo de filtração. Barra da escala = 100µm. Aumento na magnitude de 500x.

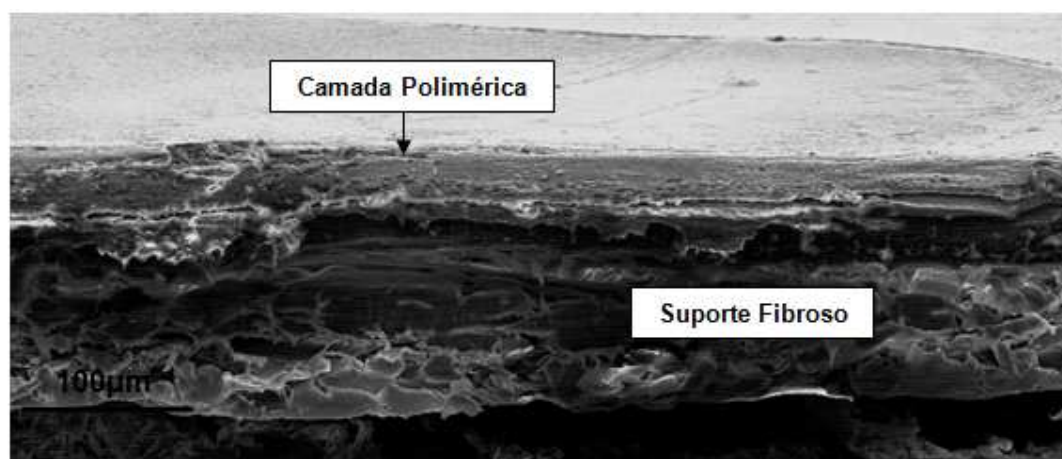


Figura 5.6. Microscopia da fratura da membrana de nanofiltração (NF 270), seção transversal antes do processo de filtração. Barra da escala = 100µm. Aumento na magnitude de 500x.

As Figuras 5.7 e 5.8 apresentam as imagens da superfície das membranas, antes e depois da filtração para o extrato aquoso e alcoólico. Observa-se nas micrografias que as membranas virgens possuem superfície lisa, sem depósito de matéria orgânica, enquanto as membranas após o processo apresentam as superfícies heterogêneas, devido à deposição de partículas na superfície das membranas durante a filtração. Estas partículas podem ser atribuídas à presença de lipídios, proteínas e minerais extraídos do pequi.

Ongaratto (2009) verificou, após o processo de ultrafiltração, utilizando 2 bar, a presença de partículas depositadas sobre a membrana, provenientes do suco de pitanga e as atribuiu à formação da camada polarizada e da incrustação da membrana. Tylkowski et al. (2010a) observaram depósito de partículas na superfície da membrana após a nanofiltração de extrato de própolis e relataram que esta deposição poderia ser atribuída a ceras, lipídios, óleos essenciais, pólen e minerais extraídos do própolis. Sohrabi et al. (2010) também verificaram a deposição de moléculas orgânicas na superfície da membrana após a nanofiltração de extrato aquoso de raiz de licorice (*Gliciriza glabra*).

Na Figura 5.8, verificou-se que as superfícies das membranas após a filtração da solução alcoólica apresentaram com maior aglomeração de partículas que as superfícies após a filtração da solução aquosa. Isso pode ser atribuído a aglomeração das partículas observada na

alimentação alcoólica ao longo do tempo, como apresentado no item 5.3.1.

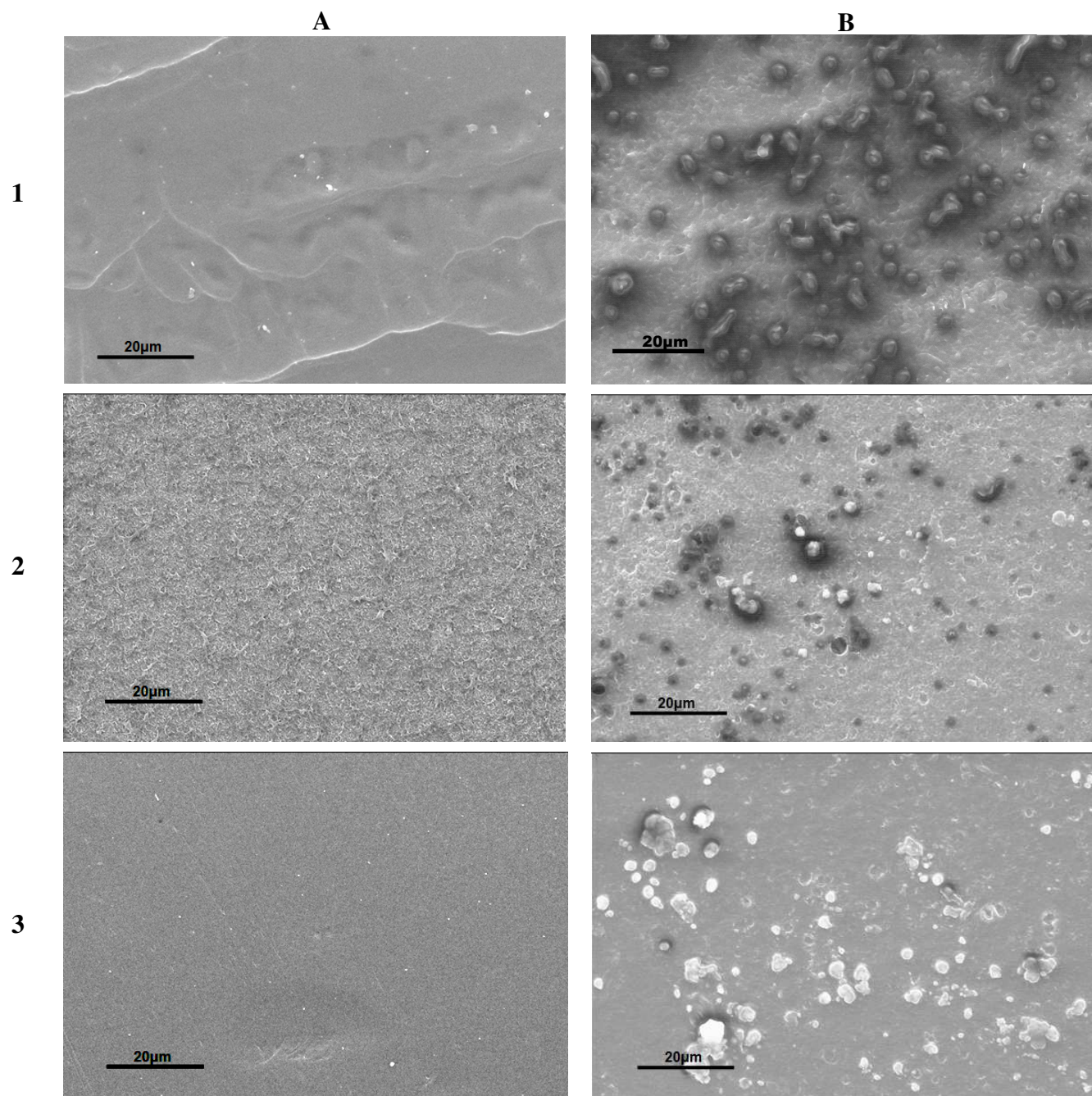


Figura 5.7. Microscopias da superfície das membranas (1) UF, (2) NF 90 e (3) NF 270 utilizadas (A) antes e (B) depois do processo de filtração do extrato aquoso. Barra da escala = 20µm. Aumento na magnitude de 3000x.

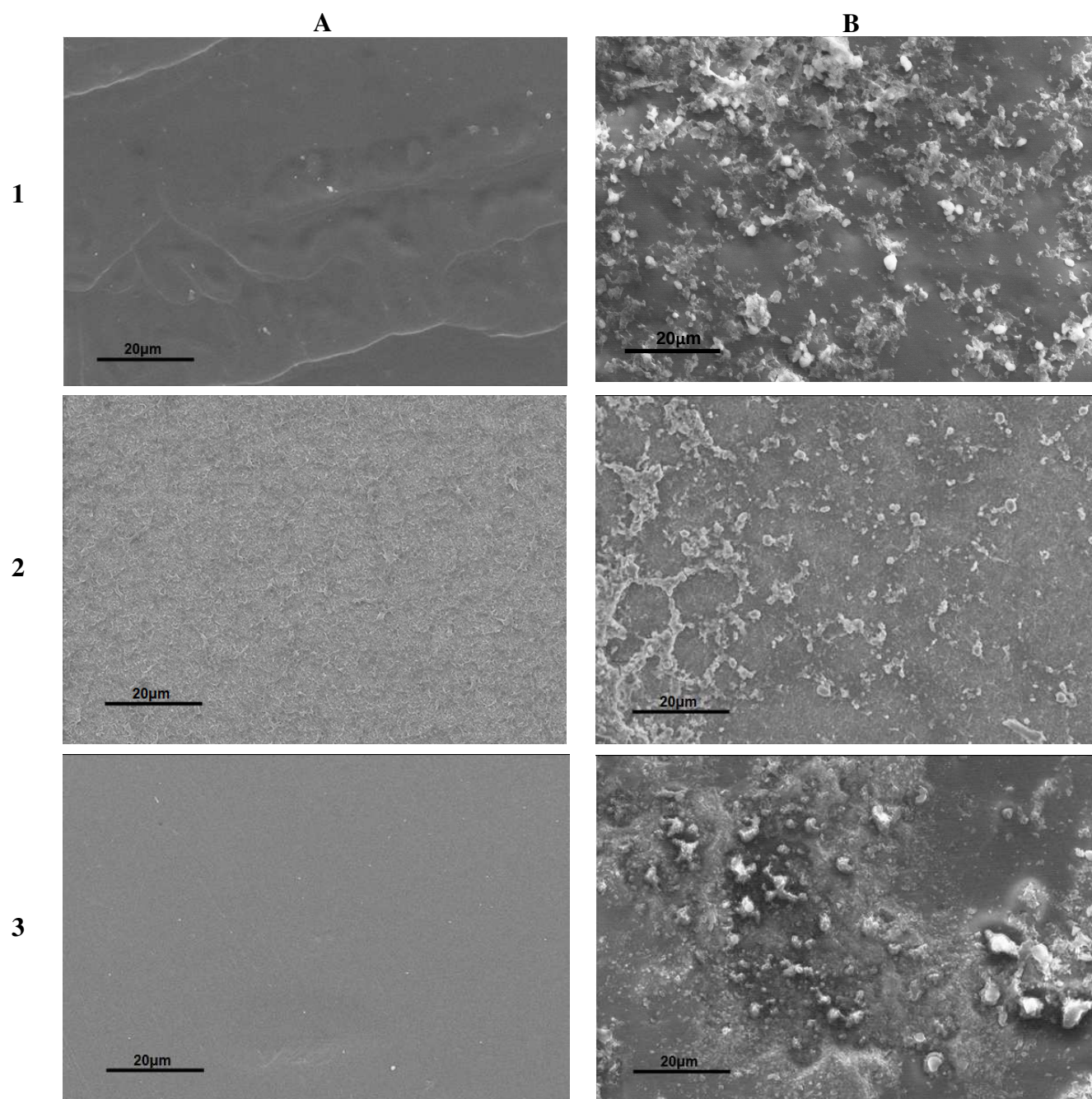


Figura 5.8. Microscopias da superfície das membranas (1) UF, (2) NF 90 e (3) NF 270 utilizadas antes (A) e depois (B) do processo de filtração do extrato alcoólico. Barra da escala = 20μm. Aumento na magnitude de 3000x.

5.3.3. Fluxo de permeado e número de Reynolds

A densidade e a viscosidade dos produtos obtidos nos processos de concentração por membranas foram analisadas. Na Tabela 5.7 pode ser observada a densidade da alimentação, do concentrado e do permeado dos extratos aquosos e alcoólicos. A densidade do concentrado aquoso obtido na ultrafiltração não diferiu da densidade da alimentação, porém as densidades dos concentrados de nanofiltração tiveram um leve aumento em relação à mesma (entre 0,1 e 0,5%), o que pode ser explicado pela maior retenção dos compostos. Por sua vez, os permeados obtidos apresentaram uma leve redução na densidade (entre 0,3% e 0,5%) em relação à alimentação.

Já no extrato alcoólico, somente a densidade do concentrado obtido no processo utilizando a membrana NF 270 diferiu significativamente da densidade da alimentação, e a densidade dos permeados obtidos por nanofiltração diferiram da densidade da mesma.

Tabela 5.7. Medida de densidade (Kg/m^3) para as amostras de permeado, alimentação e concentrado dos experimentos com extrato aquoso e alcoólico.

		Densidade		
	Membranas	UF	NF 90	NF 270
Extrato Aquoso	Concentrado	$1003,14 \pm 0,08^a$	$1007,67 \pm 1,56^a$	$1005,67 \pm 0,28^a$
	Alimentação	$1002,87 \pm 0,09^a$	$1002,87 \pm 0,09^b$	$1002,87 \pm 0,09^b$
	Permeado	$1000,12 \pm 1,07^b$	$997,69 \pm 0,40^c$	$998,08 \pm 0,05^c$
Extrato Alcoólico	Concentrado	$838,24 \pm 0,88^a$	$840,44 \pm 0,41^a$	$839,32 \pm 0,61^a$
	Alimentação	$837,27 \pm 0,31^{ab}$	$839,88 \pm 0,15^a$	$837,27 \pm 0,31^b$
	Permeado	$836,80 \pm 0,52^b$	$838,24 \pm 0,28^b$	$836,02 \pm 0,49^c$

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa entre a densidade dos produtos aquosos ou alcoólicos (alimentação, concentrado e permeado) ($p \leq 0,05$).

A medida da viscosidade das soluções foi realizada através do reômetro, o resultado encontra-se na Tabela 5.8. Os concentrados aquosos tanto do processo de ultrafiltração quanto de nanofiltração, apresentaram a mesma viscosidade, sendo esta 10% maior que a viscosidade da

alimentação. O mesmo comportamento foi observado nos permeados, que tiveram uma redução de 20% em suas viscosidades com relação à alimentação. Portanto, o processo de concentração realizado, com fator de concentração de apenas 1,5, causou baixo efeito sobre a viscosidade das soluções aquosas, pois a redução da quantidade de solvente em solução e o aumento na concentração de compostos de maior massa molecular não foram grandes o suficiente para ocasionar significativo aumento na densidade e viscosidade.

Já no extrato alcoólico não houve aumento da viscosidade das soluções com o processo de membranas, pois a concentração de compostos não aconteceu efetivamente, como apresentado no item subsequente.

Tabela 5.8. Medida de viscosidade (mPa.s) para as amostras de permeado, alimentação e concentrado dos experimentos com extrato aquoso e alcoólico.

		Viscosidade		
	Membranas	UF	NF 90	NF 270
Extrato Aquoso	Concentrado	1,10 ± 0,00	1,10 ± 0,00	1,10 ± 0,00
	Alimentação	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
	Permeado	0,80 ± 0,00	0,80 ± 0,00	0,80 ± 0,00
Extrato Alcoólico	Concentrado	1,50 ± 0,00	1,60 ± 0,00	1,50 ± 0,00
	Alimentação	1,50 ± 0,00	1,60 ± 0,00	1,50 ± 0,00
	Permeado	1,50 ± 0,00	1,60 ± 0,00	1,50 ± 0,00

Laorko et al. (2010) clarificaram suco de abacaxi por ultrafiltração e verificaram que o permeado obtido apresentou densidade e viscosidade ($1019,71 \text{ Kg/m}^3$ e $1,42 \text{ mPa.s}$, respectivamente) menor que da alimentação ($1024,58 \text{ Kg/m}^3$ e $2,07 \text{ mPa.s}$, respectivamente).

Mello (2008) concentrou extratos aquosos e alcoólicos de própolis por nanofiltração, obtendo, respectivamente, concentrados 30 e 60% mais viscosos que as alimentações, e permeados 4 e 22% menos viscosos que as mesmas. A densidade também foi modificada, entre os

1 e 5%. O autor obteve fator de concentração igual a 4, alcançando maior concentração que o presente trabalho. Assim, a maior redução da quantidade de solvente em solução, ocasionou um maior aumento na densidade e viscosidade da mesma.

Além da análise de viscosidade, avaliou-se através do reômetro o comportamento das soluções e verificou-se que todas as soluções aquosas e alcoólicas apresentam comportamento newtoniano, comprovado pela reta obtida no gráfico de deformação *versus* cisalhamento (Figura 5.9 e 5.10).

Mello (2008) também analisou através do reômetro, o comportamento dos extratos de própolis e verificou que as soluções apresentaram comportamento newtoniano.

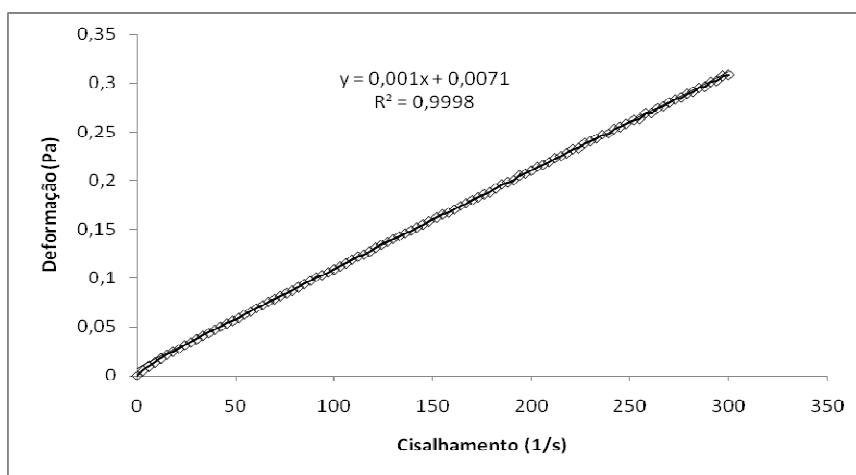


Figura 5.9. Gráfico da deformação versus cisalhamento para extrato aquoso (concentrado).

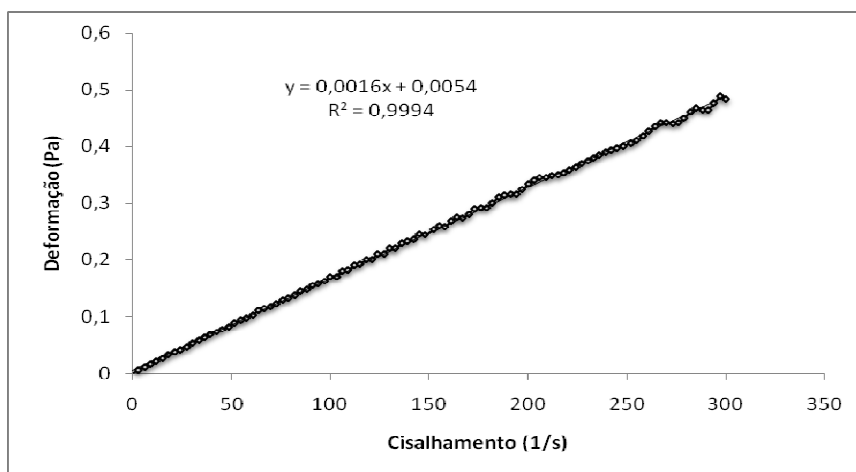


Figura 5.10. Gráfico da deformação versus cisalhamento para extrato alcoólico (alimentação).

A partir dos dados apresentados foram realizados os cálculos do número de Reynolds, a fim de verificar o regime de escoamento do extrato aquoso e alcoólico sobre uma superfície da membrana.

Os números de Reynolds encontrados foram 5014,35 e 2700,9, para o extrato aquoso e alcoólico, respectivamente. Estes caracterizaram regime de escoamento turbulento (Reynolds > 1000), de acordo com o gráfico apresentado por Foust et al. (1982) para agitador tipo pá de duas hastes.

As curvas do fluxo de permeado *versus* o tempo para as soluções aquosas e alcoólicas estão mostradas na Figura 5.11 (fluxo pontual) e na Figura 5.12 (fluxo acumulado).

O fluxo pontual, que representa um valor mais real no momento da medição, foi muito variável durante o processo, devido a pequenas variações nas condições operacionais, precisão na medição de volume e do tempo. Por outro lado, a curva do fluxo acumulado forneceu uma visão geral do processamento e reduziu as variações pontuais.

Pode-se observar na Figura 5.12 que o fluxo de permeado decresce rapidamente no período inicial de processo, devido à concentração da polarização, se tornando mais estável ao longo do mesmo. Nas Figuras 5.7 e 5.8, pode-se verificar que as superfícies das membranas apresentaram material depositado, causando a polarização da concentração e redução do fluxo inicial.

De acordo com Cheryan (1998), os sólidos são arrastados para a superfície da membrana por transporte convectivo, são parcial ou totalmente rejeitados e tendem a se concentrar na interface da mesma, formando a polarização da concentração. Segundo Marshall and Munro (1993) o declínio do fluxo de permeado pode ser dividido em três etapas: inicialmente, este é resultado da polarização da concentração, depois do fenômeno de adsorção, e por último da deposição da incrustação.

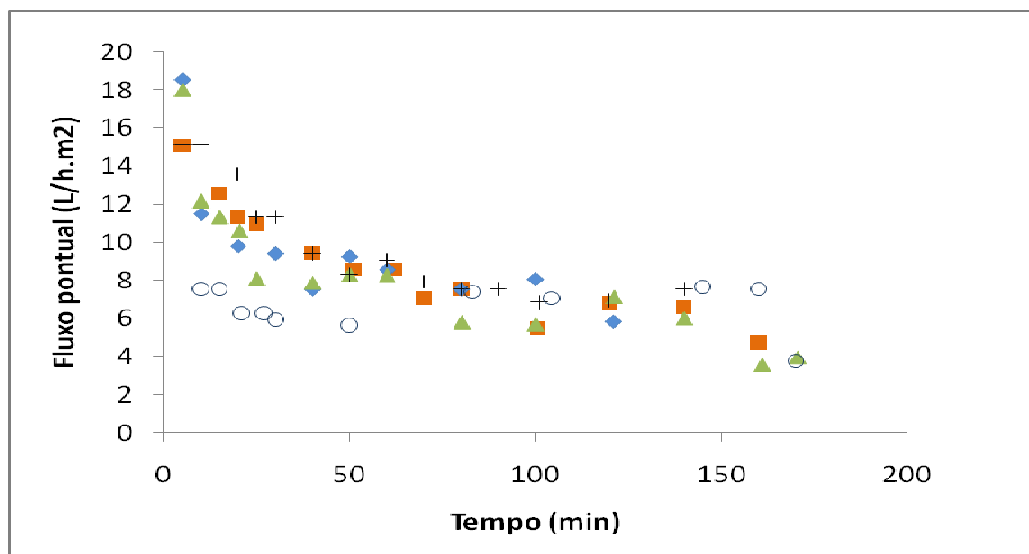


Figura 5.11. Curva de fluxo pontual de permeado. (▲) Extrato aquoso, UF, $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P = 7\text{ bar}$; (◆) Extrato aquoso, NF 90, $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P = 8\text{ bar}$; (■) Extrato aquoso, NF 270, $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P = 8\text{ bar}$; (○) Extrato alcoólico, NF 90, $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P = 8\text{ bar}$; (+) Extrato alcoólico, NF 270, $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P = 8\text{ bar}$.

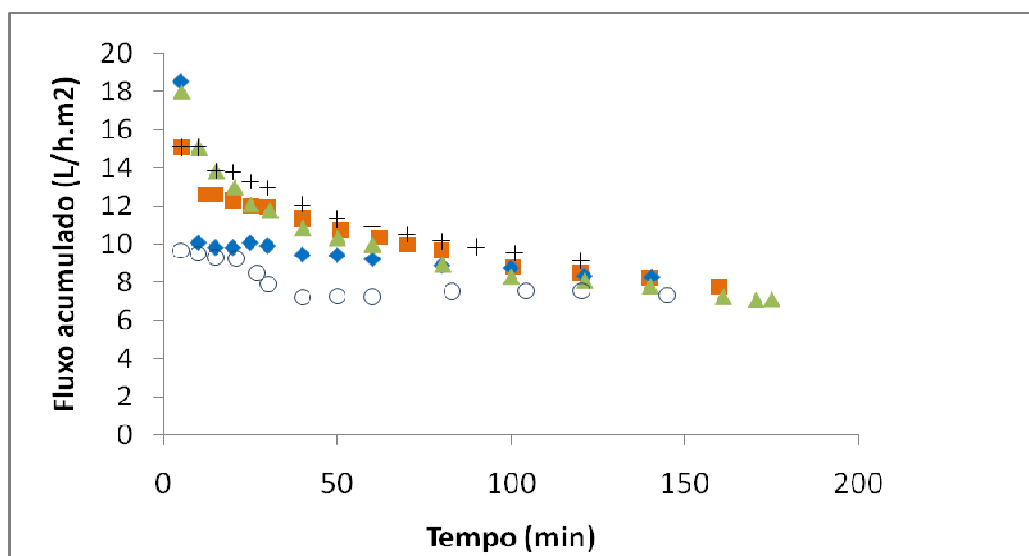


Figura 5.12. Curva de fluxo acumulado de permeado. (▲) Extrato aquoso, UF, $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P = 7\text{ bar}$; (◆) Extrato aquoso, NF 90, $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P = 8\text{ bar}$; (■) Extrato aquoso, NF 270, $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P = 8\text{ bar}$; (○) Extrato alcoólico, NF 90, $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P = 8\text{ bar}$; (+) Extrato alcoólico, NF 270, $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P = 8\text{ bar}$.

O fluxo médio de permeado dos processos em unidade de escoamento tangencial foi medido de acordo com o item 4.4.2.3 a. As curvas para cálculo do fluxo médio de permeado apresentaram coeficientes de correlação linear maiores que 0,99, os resultados encontram-se na Tabela 5.9. Os fluxos de permeado não diferiram estatisticamente ($p \leq 0,05$), pelo teste de Duncan.

Tabela 5.9. Fluxo médio de permeado (L/h.m²) dos extratos aquosos e alcoólicos nas diferentes membranas, UF, NF 90 e NF 270.

Membranas	Extrato aquoso	Extrato alcoólico
UF	7,83 ± 0,75 ^a	-
NF 90	8,38 ± 0,28 ^a	7,06 ± 0,70 ^a
NF 270	8,08 ± 0,72 ^a	9,17 ± 0,94 ^a

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os fluxos médios de permeado ($p \leq 0,05$).

O fluxo de permeado do processo de ultrafiltração foi medido pela equação 4.1, pois mesmo com alteração da pressão de entrada do processo (para 7 bar), não foi possível a coleta do permeado ao longo do tempo, o fluxo ainda se manteve alto, em torno de 226,36 L/h.m², finalizando o processo (com fator de concentração 1,5) em cinco minutos.

Os fluxos de permeado do processo de ultra e nanofiltração não apresentaram diferença significativa, quando se filtrou o extrato aquoso, devido a dois possíveis fatores: a pressão aplicada no processo de ultrafiltração ter sido menor e as propriedades do material desta membrana. A membrana de ultrafiltração é composta por polissulfona, que possui caráter hidrofóbico, sendo, assim, seu fluxo de água baixo (CHEN; CHIAO; TSENG, 1996) e alguns solutos, como as proteínas, são mais susceptíveis de se depositarem na superfície e nos poros da membrana (BLANK et al., 1998), causando, conseqüentemente, concentração da polarização e incrustação, e também reduzindo o fluxo.

Quando se utilizou o extrato alcoólico, o solvente mais apolar com maior afinidade com a membrana de ultrafiltração hidrofóbica pode ser a causa do alto fluxo de permeado encontrado. Já os fluxos de permeado nas membranas de nanofiltração, mais hidrofílicas, não diferiram do

fluxo quando foi utilizada a alimentação aquosa, o que não era esperado já que o extrato alcoólico apresentou maior viscosidade.

Para melhor compreensão dos fenômenos relacionados com o processo de concentração, as membranas foram submetidas ao escoamento com água e álcool 95%. As curvas do fluxo de permeado *versus* tempo estão apresentadas no Apêndice A. O fluxo de permeado com álcool 95% foi mais alto que o de água em todas as membranas. O álcool possui maior viscosidade (1,19 mPa.s) que a água (1,0 mPa.s) (Perry; Chilton, 1973), assim poderia se esperar que o fluxo de permeado do álcool seria menor, porém foi o contrário. No caso da membrana de ultrafiltração, este fato é explicado pela maior afinidade desta (hidrofóbica) com o álcool. Já as membranas de nanofiltração são mais hidrofílicas, possuindo boa afinidade com a água, assim os diferentes fluxos de água e álcool 95% podem ser atribuídos a uma possível interação entre estes solventes e as membranas.

Duas hipóteses são viáveis de serem feitas para explicar este fato: A primeira é que o transporte de misturas líquidas através de membranas poliméricas pode ser fortemente influenciado por um fenômeno conhecido como fluxo acoplado, decorrente dos efeitos de plastificação da membrana. Normalmente, um componente da mistura que apresenta uma maior interação com o polímero, incha a membrana, aumenta a permeabilidade e facilita o transporte de outros compostos através da membrana (NOBREGA; GARCIA; HABERT, 1991; ISMAIL; LORNA, 2002). A segunda hipótese é que membranas poliméricas possuem superfícies carregadas quando entram em contato com uma solução aquosa. A água e o álcool possuem constante dielétrica distinta, influenciando as cargas das partículas diferentemente. A membrana de ultrafiltração possui grupamentos sulfona, enquanto as membranas de nanofiltração possuem grupos amina e carboxílicos, estes grupos podem ser carregados e influenciar na distribuição de íons na interface membrana-solução, podendo haver interações eletrostáticas na superfície e nos poros das membranas. Estas podem, por sua vez, mudar o tamanho dos poros e influenciar no transporte de solventes e solutos através da membrana (CHEN; CHIAO; TSENG, 1996; CHILDRESS; ELIMELECH, 1996; CHILDRESS; ELIMELECH, 2000).

Como o fluxo de álcool 95% foi maior, assim, poderia ser esperado que o fluxo de permeado do extrato alcoólico acompanhasse o comportamento do álcool 95%. Entretanto, este fato só foi verificado na membrana de ultrafiltração; nas membranas de nanofiltração, como já

citado, o fluxo de permeado do extrato alcoólico não diferiu do fluxo de permeado do extrato aquoso. Isso pode ser explicado pela maior viscosidade do extrato alcoólico em relação ao álcool 95% e por uma maior polarização da concentração e incrustação dos poros que reduz o fluxo de permeado nas membranas de nanofiltração.

Os valores de fluxo de permeado obtidos neste trabalho foram semelhantes ou superiores aos obtidos em outros processos reportados na literatura, que utilizam célula de membrana de pequeno porte que faz simulação do escoamento tangencial. Isso indica que a pressão adotada neste trabalho (8 bar) foi suficiente para realização deste procedimento de concentração, evidenciando, deste modo, sua viabilidade, visto que se gasta menor energia para gerar menor pressão de processamento.

Ferrarini, Versari e Galassi (2001) estudando a concentração de suco de uva por nanofiltração relataram 3,6 a 5,4 L/h.m² de fluxo de permeado, trabalhando de 32 a 45 bar. Warczok et al. (2004) concentraram suco de pêra por nanofiltração, trabalhando com pressão transmembrana à 12 bar, e obtiveram fluxo de permeado de 7 L/h.m².

O extrato de *Ginkgo biloba* concentrado por nanofiltração obteve fluxo de permeado de 5,9; 6,8 e 9,5 L/h.m² à 12 bar utilizando membranas com *cut-off* de 100 Da e 250 Da, respectivamente (XU; WANG, 2005). Tylkowski et al. (2010a) utilizaram membrana de nanofiltração para concentrar extrato alcoólico de própolis e obtiveram fluxo médio de permeado de 4,05 L/h.m², trabalhando à 50 bar.

Maiores fluxos podem ser ainda alcançados, se o extrato for trabalhado na unidade filtração tangencial de escala piloto. Nesta unidade, maior vazão é obtida graças à maior área de permeação na membrana. Além disso, utilizam-se grandes volumes de alimentação, acima de um litro, e é possível a recirculação do produto concentrado que mantém uma alta vazão de alimentação, permitindo aumentar o fator de concentração do extrato e a eficiência da separação.

Hossain (2003) estudou a concentração de antocianinas do extrato de bagaço de groselha por ultrafiltração, em unidade de filtração tangencial em escala piloto, e obteve fluxo de permeado de 17,3 L/h.m² a 1,4 bar. Mello, Petrus e Hubinger (2010), utilizando nanofiltração para o processamento de soluções aquosa e alcoólica de própolis, trabalharam apenas a 5 bar, porém esta pressão foi suficiente para ocorrer a filtração, obtendo fluxo de 12 e 25 L/h.m² para o

extrato alcoólico e aquoso, respectivamente.

Tsui e Cheryan (2007) utilizaram nanofiltração para purificar extratos alcoólicos de milho para produção de xantofilas e obtiveram fluxo de permeado em torno de 10 L/h.m^2 , trabalhando a 27 bar. Banvolgyi et al. (2006), utilizando nanofiltração para concentrar compostos como açúcares, ácidos totais e ácidos sulfurosos do vinho tinto, a 20 bar, obtiveram 20 L/h.m^2 . Logo, pode-se notar o aumento no fluxo de permeado quando se utiliza unidade de filtração tangencial em escala piloto.

5.3.4. Concentração dos compostos bioativos por membranas

Além das análises de viscosidade e densidade, os produtos obtidos nos processos de concentração por membranas de extrato aquoso e alcoólico de pequi foram caracterizados em relação ao teor de carotenóides totais, cor, compostos fenólicos e atividade antioxidante.

Na Tabela 5.10 encontram-se os conteúdos de carotenóides do extrato aquoso e alcoólico de pequi. Para o extrato aquoso verifica-se que as membranas apresentaram boa retenção de carotenóides, somente cerca de 2% do total deste composto passou pela membrana de ultrafiltração, enquanto não foi detectado conteúdo de carotenóides no permeado de nanofiltração. Entretanto, para o extrato alcoólico, tanto as membranas de ultra quanto as de nanofiltração não apresentaram boa retenção para carotenóides (1,8 a 9,81%), este fato será discutido mais adiante.

Quando se concentrou o extrato aquoso, os carotenóides, que são compostos orgânicos com massa molecular entre 530 e 570 Da, foram bem retidos pela membrana de ultrafiltração (*cut-off* de 100 KDa). Como já citado, a membrana de ultrafiltração é composta por polissulfona, que possui caráter hidrofóbico, desta maneira, alguns solutos, como as proteínas, são mais susceptível de se depositarem na superfície e nos poros da membrana (BLANK et al., 1998), interagindo e causando, conseqüentemente, concentração da polarização e incrustação, formando de uma barreira secundária, que agiu como uma membrana e impediu a passagem de outras moléculas, o que aumentou a rejeição de solutos permeáveis. Cheryan (1998) e Sohrabi et al. (2010) relataram que a presença de moléculas orgânicas no extrato podem causar interações soluto-membrana e concentração da polarização, que aumentam a rejeição de solutos permeantes.

Assim, se o objetivo do presente trabalho fosse somente a concentração dos carotenóides, a ultrafiltração seria o processo escolhido para a concentração de carotenóides no extrato aquoso, pois este processo permitiu remover o solvente de extração e concentrar os compostos, podendo utilizar uma pressão de processamento mais baixa e economizar energia.

Tabela 5.10. Teor de carotenóides (μg de β -caroteno /ml de extrato) para as amostras de permeado, alimentação e concentrado dos experimentos com extrato aquoso e alcoólico.

Teor de carotenóides				
	Membranas	UF	NF 90	NF 270
Extrato Aquoso	Concentrado	$3,77 \pm 0,03$	$3,83 \pm 0,05$	$3,82 \pm 0,02$
	Alimentação	$2,55 \pm 0,07$	$2,55 \pm 0,07$	$2,55 \pm 0,07$
	Permeado	$0,05 \pm 0,02$	0,00	0,00
	% rejeição	$97,91 \pm 0,59^a$	100^b	100^b
Extrato Alcoólico	Concentrado	$4,86 \pm 0,01$	$4,14 \pm 0,01$	$4,67 \pm 0,19$
	Alimentação	$4,43 \pm 0,02$	$4,04 \pm 0,14$	$4,43 \pm 0,02$
	Permeado	$4,35 \pm 0,04$	$3,64 \pm 0,02$	$4,30 \pm 0,01$
	% rejeição	$1,80 \pm 0,85^a$	$9,81 \pm 0,44^b$	$2,88 \pm 0,23^a$

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa entre a % de rejeição de carotenóides ($p \leq 0,05$).

Ongaratto (2009) clarificou suco de pitanga e Silva (2010) concentrou licopeno de polpa de mamão, ambos utilizaram membranas poliméricas de micro e ultrafiltração (de 500 a 10 KDa). Todos os experimentos realizados por ambos obtiveram rejeição de 100% dos carotenóides.

Chiu, Coutinho e Gonçalves (2009) utilizaram nanofiltração (membrana com *cut-off* de 200 Da) a 25 bar e 40°C, para concentrar carotenóides de óleo de palma, obtiveram rejeição de 75% de β -caroteno.

Sessa et al. (2003) trataram extrato alcoólico (70%) de proteínas de milho utilizando ultrafiltração (membrana com *cut-off* de 5 KDa), com o objetivo de descolorir as proteínas, as retendo, enquanto os carotenóides eram permeados. A retenção de xantofilas (luteína e zeaxantina) obtida foi de apenas 6%. Os autores justificaram a baixa retenção de carotenóides pelo menor tamanho dos mesmos, aproximadamente 530 a 570 Da, em relação ao *cut-off* da membrana 5 KDa.

Krupa et al. (2010) verificaram 60% de retenção de cantaxantina parcialmente saturada em álcool (99%), trabalhando com membrana de nanofiltração com *cut-off* de 250 Da. Tsui e Cheryan (2007) também trabalharam com extrato de milho alcoólico (85%), porém para concentrar xantofilas por nanofiltração (com membranas de 200 e 300 Da), e relataram 98-99% de rejeição para as duas membranas utilizadas, valores superiores que os encontrados no presente trabalho.

O teor de carotenóides apresentado pelas soluções está diretamente associado à cor das mesmas. Na Figura 5.13 pode-se visualizar o produto inicial (alimentação) e os obtidos no processo de concentração por membranas (permeado e concentrado), para o extrato aquoso e alcoólico, respectivamente. Para o extrato aquoso, percebeu-se que o processo de ultrafiltração gerou um permeado límpido, transparente e com coloração amarelada, enquanto que os processos de nanofiltração, um permeado sem coloração. Todos os concentrados obtidos mostraram-se opacos, de cor amarela um pouco mais intensa que a da alimentação.

Entretanto no extrato alcoólico, os processos de filtração geraram produtos com diferença de cor visualmente imperceptível, a alimentação, o permeado e o concentrado mostraram-se brilhantes, transparentes e de cor amarela intensa.

As observações visualizadas na Figura 5.13 são confirmadas pela análise instrumental de cor mostrada nas Tabelas 5.11 e 5.12 que apresentam as propriedades ópticas (luminosidade L^* , a^* e b^*) dos produtos aquosos e alcoólicos, respectivamente.

Todos os permeados aquosos tem luminosidade intensa, com L^* em torno de 90 (escala de L^* varia de 0 para preto a 100, para branco), e não apresentam tonalidades verdes ou vermelhas (a^* varia de -80, que indica cor verde, a +100, caracterizando cor vermelha), pois seus valores de a^* foram próximos de zero (entre -0,56 e -1,51). O permeado do processo de ultrafiltração

apresenta cor levemente amarelada, com b^* em 3,06 (b^* varia de -100, caracterizando cor azul, a +70, que caracteriza cor amarela), enquanto os permeados dos processos de nanofiltração mostram-se ligeiramente azulados, com b^* iguais a -1,30 e -0,98.

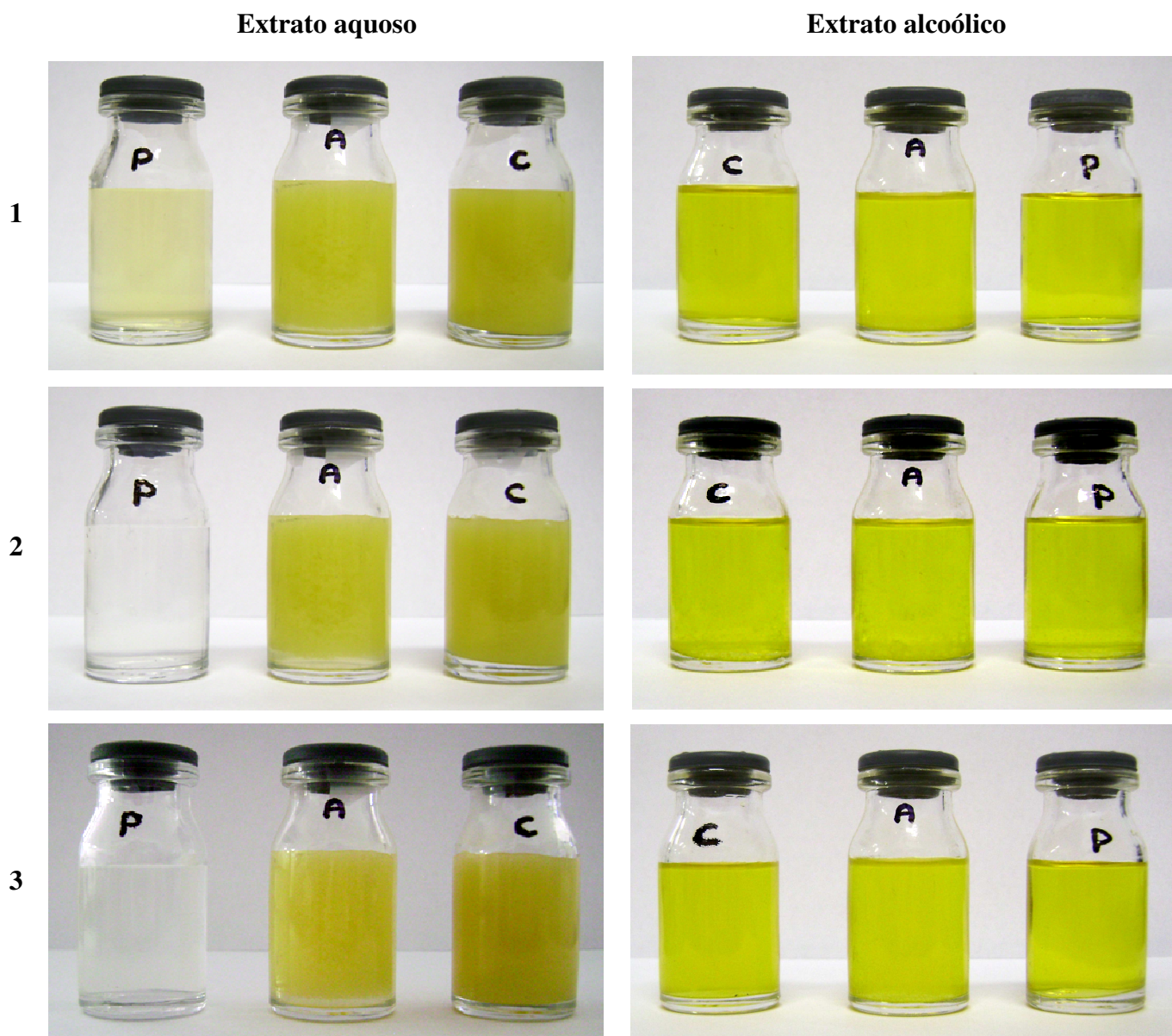


Figura 5.13. Fotografia dos produtos inicial (alimentação, A) e finais (permeado, P, e concentrado, C) dos processos de concentração de extrato aquoso e alcoólico de pequi com as diferentes membranas, de nanofiltração (1) NF 90 e (2) NF 270 e (3) ultrafiltração.

Tabela 5.11. Análise instrumental de cor pelo sistema CIELab para as amostras de permeado, alimentação e concentrado dos experimentos com extrato aquoso.

Parâmetro cromático	Membranas	Concentrado	Alimentação	Permeado
L*	UF	37,43 ± 0,49 ^{aA}	30,80 ± 0,18 ^b	91,86 ± 2,45 ^{cA}
	NF 90	35,51 ± 0,41 ^{aB}	30,80 ± 0,18 ^b	90,80 ± 0,77 ^{cA}
	NF 270	35,35 ± 0,52 ^{aB}	30,80 ± 0,18 ^b	89,40 ± 0,51 ^{cA}
a*	UF	-2,23 ± 0,06 ^{aA}	-2,66 ± 0,05 ^b	-1,51 ± 0,15 ^{cA}
	NF 90	-2,44 ± 0,02 ^{aA}	-2,66 ± 0,05 ^b	-0,56 ± 0,05 ^{cB}
	NF 270	-2,41 ± 0,10 ^{aA}	-2,66 ± 0,05 ^b	-0,59 ± 0,03 ^{cB}
b*	UF	19,19 ± 0,45 ^{aA}	13,31 ± 0,25 ^b	3,06 ± 0,56 ^{cA}
	NF 90	18,63 ± 0,77 ^{aB}	13,31 ± 0,25 ^b	-1,30 ± 0,13 ^{cB}
	NF 270	17,77 ± 0,20 ^{aB}	13,31 ± 0,25 ^b	-0,98 ± 0,16 ^{cB}
C* (croma)	UF	19,31 ± 0,46 ^{aA}	13,58 ± 0,23 ^b	3,41 ± 0,67 ^{cA}
	NF 90	18,79 ± 0,93 ^{aA}	13,58 ± 0,23 ^b	1,41 ± 0,11 ^{cB}
	NF 270	17,93 ± 0,16 ^{aA}	13,58 ± 0,23 ^b	1,15 ± 0,13 ^{cB}
H* (ângulo Hue)	UF	-83,38 ± 0,37 ^{aA}	-78,72 ± 0,41 ^b	-63,44 ± 2,35 ^{cA}
	NF 90	-82,54 ± 0,37 ^{aA}	-78,72 ± 0,41 ^b	66,65 ± 4,43 ^{cB}
	NF 270	-82,27 ± 0,37 ^{aA}	-78,72 ± 0,41 ^b	58,51 ± 5,57 ^{cB}

Letras diferentes na mesma linha (letras minúsculas) indicam diferença estatisticamente significativa entre a cor dos produtos (concentrado, alimentação e permeado) ($p \leq 0.05$). Letras diferentes na mesma coluna de um método (letras maiúsculas) indicam diferença estatisticamente significativa entre a cor dos produtos (concentrado ou permeado) ($p \leq 0.05$).

Todos os concentrados aquosos apresentaram menor luminosidade que o permeado (L^* entre 35,35 e 37,43), porém levemente maior que a da alimentação (30,80), e cor amarela mais intensa (b^* entre 17,77 e 19,19) que a da alimentação (13,31). Os concentrados e a alimentação apresentaram uma leve coloração verde, com o parâmetro a^* variando de -2,23 a -2,66.

Com os parâmetros apresentados (a^* e b^*), as coordenadas cilíndricas C^* (croma) e H^* (ângulo hue) foram calculadas e suas mudanças nos diferentes produtos aquosos obtidos estão mostradas nas Figuras 5.14 e 5.15, respectivamente. O ângulo Hue é o atributo que normalmente se identifica com o nome da cor como vermelho (0°), amarelo (90°), verde (180°) e azul (270°).

O croma é a intensidade e a pureza da cor, independente do quão clara ou escura é a cor. Uma cor com alto valor de croma parece luminosa ou concentrada, enquanto uma cor de baixo croma parece pálida, acizentada ou diluída.

Os concentrados aquosos (com ângulo Hue entre $-82,3^\circ$ e $-83,4^\circ$) não diferiram estatisticamente ($p \leq 0.05$) e apresentaram-se mais amarelos que a alimentação ($-78,7^\circ$), concordando com o aumento da concentração de carotenóides no concentrado. O permeado da ultrafiltração apresentou ângulo Hue de $-63,4^\circ$, sendo menos amarelado que a alimentação, devido à baixa concentração de carotenóides. Por sua vez, os permeados da nanofiltração apresentaram H^* entre $66,6^\circ$ e $58,5^\circ$, mostrando-se ligeiramente azulados, por causa da ausência de carotenóides.

Os valores de croma dos concentrados aquosos não diferiram estatisticamente e mostraram-se mais intensos (entre 17,9 e 19,3) que o da alimentação (13,6). O valor de C^* do permeado da ultrafiltração foi de 3,4, sendo mais diluído, e o da nanofiltração, por sua vez, ainda mais diluído, com valores de C^* entre 1,1 e 1,4.

O Apêndice B apresenta os padrões de coloração das amostras obtidas nos diferentes processos de concentração, ultra e nanofiltração. Os padrões, feitos no software Adobe Photophop 7.0.1® através dos valores de L^* , a^* e b^* obtidos no colorímetro, representam a coloração composta pela média dos valores lidos na amostra e têm caráter apenas ilustrativo.

O aumento da luminosidade e a coloração levemente amarela e verde apresentada pelo permeado obtido na ultrafiltração foi observado por Ushikubo (2006), Silva (2010) e Laorko et al. (2010), durante a filtração de polpa de umbu diluída, polpa de mamão e suco de abacaxi, respectivamente. Além disso, Ushikubo (2006) e Silva (2010) relataram um concentrado com menor luminosidade que a da alimentação, cor amarela mais intensa e uma leve coloração verde.

Ongaratto (2009) concentrou suco de pitanga por ultrafiltração; os concentrados obtidos apresentaram cor alaranjada tendendo ao amarelo ($45 < H^* < 60$) e saturação (C^*) em torno de 30, enquanto os permeados, mostraram-se claros (L^* superior a 93), com cor no quadrante do amarelo tendendo ao vermelho ($83 < H^* < 90$) e diluídos com valores de C^* entre 9 e 13.

Mello (2008) não realizou análise instrumental de cor, porém pela fotografia apresentada em seu trabalho de concentração de extrato de própolis por nanofiltração, pode-se notar que o

processo gerou um permeado límpido, transparente e sem coloração, como o observado no presente trabalho.

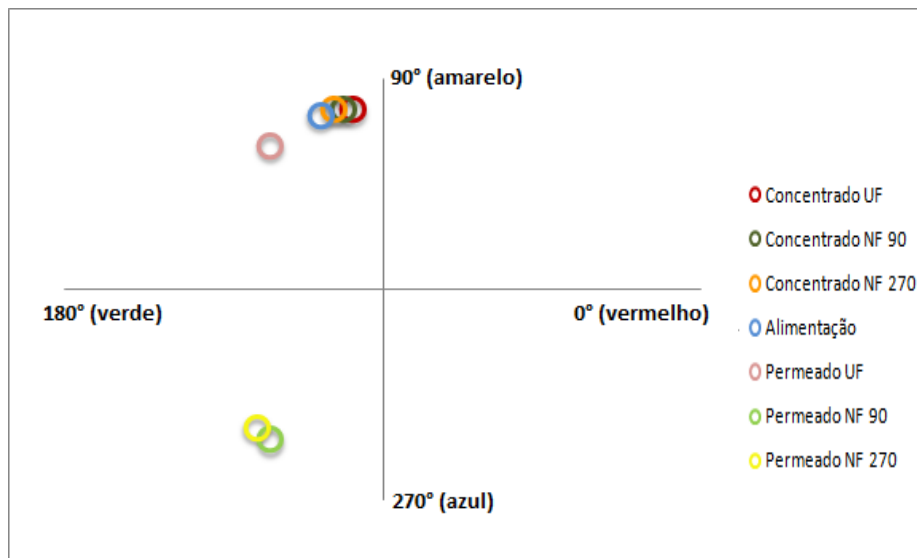


Figura 5.14. Representação do ângulo Hue dos diferentes produtos aquosos obtidos no processo de concentração, alimentação, concentrado e permeado.

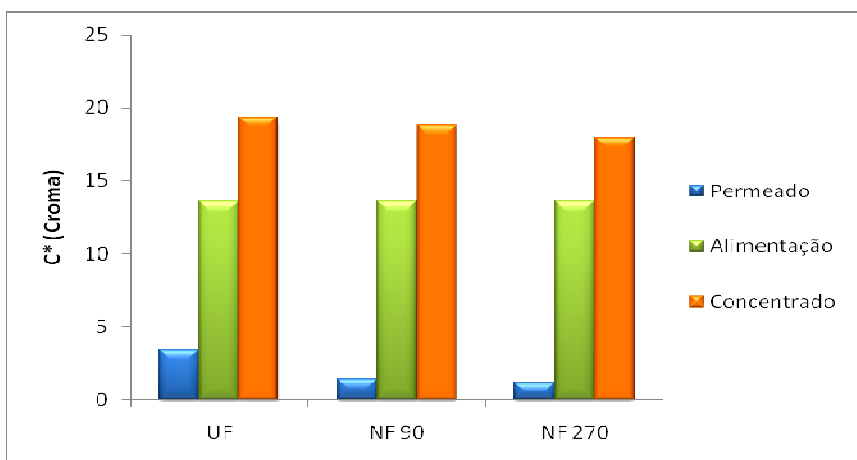


Figura 5.15. Representação do C* (croma) dos diferentes produtos aquosos obtidos no processo de concentração, alimentação, concentrado e permeado.

A análise instrumental de cor para as soluções alcoólicas está apresentada na Tabela 5.12. Os permeados apresentaram luminosidade intensa, com L^* entre 93,06 e 97, não apresentaram tonalidades verdes ou vermelhas, pois os valores de a^* obtidos foram próximos de zero (entre -

0,66 a -0,76), e mostraram cor amarelada, com b^* variando entre 8,15 e 9,78.

Tabela 5.12. Análise instrumental de cor pelo sistema CIELab para as amostras de permeado, alimentação e concentrado dos experimentos com extrato alcoólico.

Parâmetro cromático	Membranas	Concentrado	Alimentação	Permeado
L*	UF	93,51 ± 1,51 ^{aA}	90,15 ± 0,47 ^{aA}	96,96 ± 0,71 ^{bA}
	NF 90	89,76 ± 0,75 ^{aA}	87,97 ± 0,38 ^{bB}	93,06 ± 0,00 ^{cB}
	NF 270	91,28 ± 0,34 ^{aA}	90,15 ± 0,47 ^{aA}	97,20 ± 0,37 ^{bA}
a*	UF	0,44 ± 0,13 ^{aA}	0,29 ± 0,25 ^{bA}	-0,76 ± 0,14 ^{aA}
	NF 90	-0,14 ± 0,10 ^{aAB}	-0,54 ± 0,07 ^{bB}	-0,32 ± 0,10 ^{abB}
	NF 270	0,01 ± 0,06 ^{aB}	0,29 ± 0,25 ^{aA}	-0,69 ± 0,05 ^{bA}
b*	UF	13,23 ± 0,22 ^{aA}	11,74 ± 0,06 ^{aA}	9,78 ± 0,74 ^{bA}
	NF 90	10,79 ± 0,65 ^{aB}	10,23 ± 0,25 ^{aB}	8,15 ± 0,37 ^{bA}
	NF 270	13,02 ± 0,25 ^{aA}	11,74 ± 0,06 ^{aA}	9,20 ± 0,32 ^{bA}
C* (croma)	UF	13,24 ± 0,22 ^{aA}	11,74 ± 0,07 ^{abA}	9,78 ± 0,74 ^{bA}
	NF 90	10,79 ± 0,65 ^{aB}	10,24 ± 0,25 ^{aB}	8,15 ± 0,37 ^{bA}
	NF 270	13,02 ± 0,25 ^{aA}	11,74 ± 0,07 ^{aA}	9,22 ± 0,31 ^{bA}
H* (ângulo Hue)	UF	88,10 ± 0,26 ^{aA}	88,61 ± 1,20 ^{aA}	-85,78 ± 0,55 ^{bA}
	NF 90	-89,24 ± 0,56 ^{aA}	-86,98 ± 0,32 ^{aB}	-87,73 ± 0,80 ^{aA}
	NF 270	89,56 ± 0,26 ^{aB}	88,61 ± 1,20 ^{aA}	-85,73 ± 0,41 ^{bA}

Letras diferentes na mesma linha (letras minúsculas) indicam diferença estatisticamente significativa entre a cor dos produtos (concentrado, alimentação e permeado) ($p \leq 0,05$). Letras diferentes na mesma coluna de um método (letras maiúsculas) indicam diferença estatisticamente significativa entre a cor dos produtos (concentrado ou permeado) ($p \leq 0,05$).

A luminosidade dos concentrados obtidos dos processos de UF e NF 270 e sua alimentação não diferiram significativamente ($p \leq 0,05$) (com L^* entre 89,76 e 93,51) e apresentaram menores valores que o permeado. O concentrado da NF 90 (com L^* de 89,76) diferiu significativamente ($p \leq 0,05$) da alimentação (de L^* igual a 87,97) e ambos apresentaram valores menores que o permeado.

Os concentrados e alimentação não apresentaram tonalidades verdes ou vermelhas, tendo

valores de a^* variando entre -0,56 e 0,01. Os mesmos não diferiram significativamente ($p \leq 0,05$), possuindo cor amarela (b^* entre 10,23 e 13,23) mais intensa que os permeados.

Com os parâmetros apresentados (a^* e b^*), as coordenadas cilíndricas C^* (croma) e H^* (ângulo hue) foram calculadas e suas mudanças nos diferentes produtos alcoólicos obtidos estão mostradas nas Figuras 5.16 e 5.17, respectivamente.

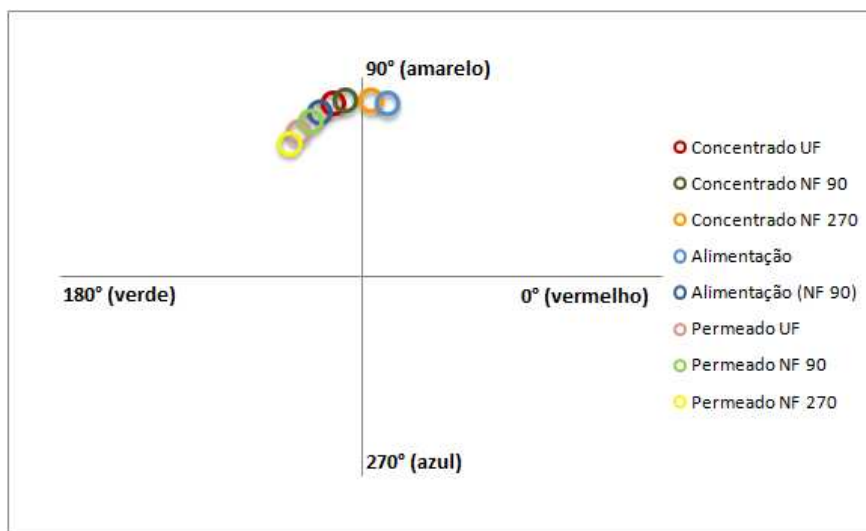


Figura 5.16. Representação do ângulo Hue dos diferentes produtos alcoólicos obtidos no processo de concentração, alimentação, concentrado e permeado.

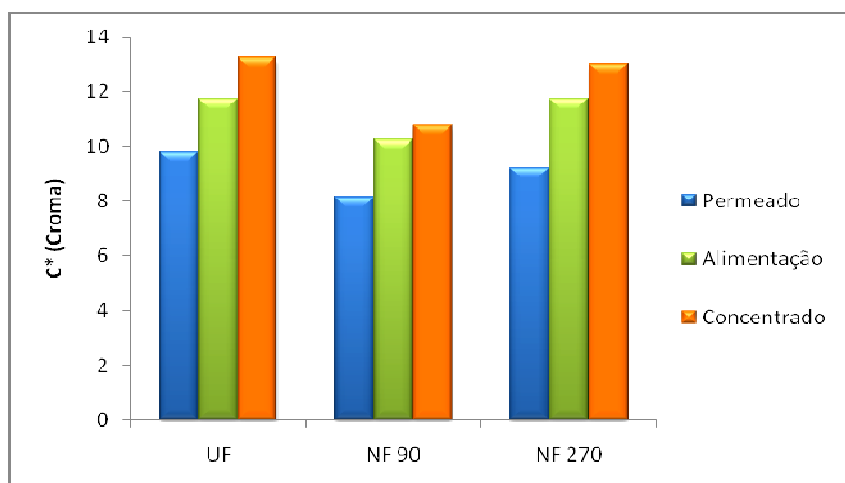


Figura 5.17. Representação do C^* (croma) dos diferentes produtos alcoólicos obtidos no processo de concentração, alimentação, concentrado e permeado.

Os concentrados alcoólicos (com ângulo Hue entre $-89,24^{\circ}$ e $89,56^{\circ}$) não diferiram entre si e não diferiram estatisticamente da alimentação (com ângulo Hue de $-86,61^{\circ}$ e $88,61^{\circ}$). Os permeados também não diferiram entre si, porém os obtidos dos processos de UF e NF 270 apresentaram ângulos Hue negativos, diferindo significativamente da alimentação e o concentrado, que mostraram ângulos Hue positivo. O permeado da NF 90 não diferiu da alimentação e do concentrado. Estes resultados concordam com a baixa concentração de carotenóides obtida nos processos.

Os valores de croma dos concentrados alcoólicos obtidos não diferiram estatisticamente da alimentação, e mostraram-se mais intensos (entre 10,24 e 13,24) que os permeados (8,15 e 9,78).

O Apêndice B apresenta os padrões de coloração das amostras obtidas nos diferentes processos de concentração, ultra e nanofiltração. Os padrões, feitos no software Adobe Photophop 7.0.1® através dos valores de L^* , a^* e b^* obtidos no colorímetro, representam a coloração composta pela média dos valores lidos na amostra e têm caráter apenas ilustrativo.

Em relação aos compostos fenólicos (Tabela 5.13), para extrato aquoso, as membranas de nanofiltração apresentaram boa rejeição, 93,20 (NF 270) e 97,06% (NF 90), sendo mais eficientes para concentração do extrato aquoso de pequi que a membrana de ultrafiltração, que apresentou apenas 65,45% de rejeição aos polifenóis. Estes são compostos orgânicos com massa molecular entre 200 e 220 Da. Como as membranas de ultrafiltração e nanofiltração possuem *cut-off* (MWCO) especificado em 100 KDa e 200-300 Da, respectivamente, era esperado que apenas estas últimas os rejeitariam, o que foi o observado no extrato aquoso.

Além disso, as membranas NF 90 e NF 270 possuem diâmetro médio de poro de 0,68 e 0,84 nm, respectivamente (NGHIEM; HAWKES, 2007), o que explica a maior retenção dos compostos observada pela NF 90.

Mello (2008), trabalhando com concentração de extrato aquoso de própolis, alcançou aproximadamente 56 e 84% de retenção de polifenóis por ultrafiltração e nanofiltração (com a membrana NF 90), respectivamente.

Tabela 5.13. Teor de compostos fenólicos (μg de ácido gálico/ml de extrato) para as amostras de permeado, alimentação e concentrado dos experimentos com extrato aquoso e alcoólico.

Teor de compostos fenólicos				
	Membranas	UF	NF 90	NF 270
Extrato Aquoso	Concentrado	292,49 $\pm$ 2,90	338,40 $\pm$ 6,93	319,09 $\pm$ 2,34
	Alimentação	216,38 $\pm$ 1,42	216,38 $\pm$ 1,42	216,38 $\pm$ 1,42
	Permeado	74,76 $\pm$ 1,13	6,29 $\pm$ 0,10	14,53 $\pm$ 0,77
	% rejeição	65,45 $\pm$ 0,52 ^a	97,06 $\pm$ 0,05 ^b	93,20 $\pm$ 0,36 ^c
Extrato Alcoólico	Concentrado	168,24 $\pm$ 0,73	263,09 $\pm$ 2,26	189,89 $\pm$ 0,56
	Alimentação	166,02 $\pm$ 3,62	243,04 $\pm$ 4,55	166,02 $\pm$ 3,62
	Permeado	156,91 $\pm$ 0,97	206,70 $\pm$ 1,45	151,32 $\pm$ 1,13
	% rejeição	5,49 $\pm$ 0,58 ^a	14,95 $\pm$ 0,60 ^b	8,85 $\pm$ 0,68 ^c

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa entre a % de rejeição de compostos fenólicos ($p \leq 0,05$).

Conidi, Cassano e Drioli (2011) concentraram suco de bergamota (*Citrus Bergamia* Risso) e obtiveram 2 e 84 % de retenção de compostos fenólicos por ultra e nanofiltração (membrana com *cut-off* de 100 KDa e 450 Da), respectivamente.

Cassano, Conidi e Drioli (2010), Onsekizoglua, Bahcecib e Acar (2010) e Laorko et al. (2010) utilizaram ultrafiltração (membranas com *cut-off* de 200 a 10 KDa) para clarificação de suco de figo da índia, maçã e abacaxi, respectivamente e obtiveram coeficiente de retenção de compostos fenólicos entre 4 e 28 %.

Comparando o presente estudo com os trabalhos citados, o processo de ultrafiltração, para o extrato aquoso, apresentou superiores resultados para rejeição de polifenóis (65%). Como já citado, as partículas presentes na alimentação podem ter causado interações soluto-membrana, concentração da polarização e inscrustações, formando de uma barreira secundária, que agiu como uma membrana e impediu a passagem de outras moléculas, o que aumentou a rejeição de solutos permeáveis, como os polifenóis. Outro fato reportado por Laorko et al (2010) que pode

ter ocorrido no presente trabalho é os polifenóis terem se associado a outros solutos da solução, tornando-se partículas maiores que ficaram retidas na camada filtrante da membrana, tendo, assim, alta rejeição.

Para o extrato alcoólico, todas as membranas apresentaram baixa rejeição aos polifenóis (5,49 a 14,95%). Comparando os coeficientes de rejeição obtidos neste extrato para os carotenóides (1,8 a 9,81%) e os compostos fenólicos (5,49 a 14,95%) e considerando que a seletividade de cada membrana está relacionada com o tamanho das partículas retidas e o tamanho do poro da mesma, os resultados de retenção destes compostos apresentaram-se invertidos. Os carotenóides, que possuem maior massa molecular e são maiores que os poros das membranas de nanofiltração, deveriam apresentar maiores rejeições que os polifenóis. Este fato indica mais uma vez que além do tamanho dos compostos e do poro da membrana, outros fatores governam a rejeição dos compostos orgânicos através da camada filtrante da membrana.

Estes compostos podem ter sido arrastados pelo solvente (álcool) que possuiu maior permeabilidade em todas as membranas, como citado anteriormente. O fenômeno de polarização e incrustações que possivelmente reduziram o fluxo, o igualando ao fluxo de extrato aquoso, não foram suficientes para aumentar a rejeição dos compostos.

Mello (2008) obteve aproximadamente 1% de retenção de compostos fenólicos concentrando extrato de própolis alcoólico (80%) por ultrafiltração, ao passo que filtrando o mesmo extrato por nanofiltração, com a membrana NF 90, obteve 53% de retenção de polifenóis. Tylkowski et al. (2010a) também analisaram a concentração de extrato de própolis alcoólico (70%) por nanofiltração, com membranas de *cut-off* de 200 and 220 Da, e obtiveram 95 e 88% de retenção de compostos fenólicos, com as respectivas membranas. Utilizando nanofiltração (com mesma membrana do trabalho anteriormente citado com *cut-off* de 200 Da), Tylkowski et al. (2010b) e Peshev et al. (2010) concentraram polifenóis de extratos alcoólicos (99%) de *Sideritis ssp.* L. e de alecrim, respectivamente, e obtiveram rejeição destes compostos em torno de 99%.

Nghiem e Hawkes (2007) estudaram a retenção de compostos ativos farmacêuticos (sulfametoxazol, carbamazepina, ibuprofeno) em metanol com as membranas NF 90 e NF 270. Relataram que a NF 90 apresentou elevada rejeição (aproximadamente 99%) destes compostos em todos os pH testados (4 a 10); já a rejeição da membrana NF 270 variou com os compostos e os pH trabalhados. Para o sulfametoxazol apresentou rejeição de aproximadamente 30% em pH 4

e 99% em pH 10, para o ibuprofeno a rejeição variou de 90 a 99%, e para a carbamazepina a rejeição se manteve constante, próxima à 80%, na mesma faixa de pH (4 – 10).

Nwuha (2000) estudou seis diferentes membranas de nanofiltração para concentrar extratos de chá verde, em diferentes concentrações de álcool (10, 20, 50 e 80%). Foi verificado que, para todas as membranas, as maiores rejeições de polifenóis (entre 78 e 96%) se deram nos extratos com 10% de álcool. Em apenas uma das membranas foi verificado 82% de retenção de polifenóis com o extrato contendo 80% de álcool; nas demais membranas a retenção variou de 25 a 58% de polifenóis para o mesmo extrato.

Como se pode notar existe uma grande variação entre os valores de retenção de carotenóides e polifenóis nos trabalhos citados. Esses valores mudam com a alimentação e a membrana utilizada, pois como já citado anteriormente, o mecanismo de transporte dos compostos orgânicos através da camada filtrante da membrana vai além do tamanho dos compostos e poros da mesma. Esse pode ser modificado de acordo com propriedades físico-químicas dos solutos e solventes, tipo e material da membrana, polarização da concentração e interação eletrostática da superfície e dos poros da membrana com o solvente e solutos da solução. Estas propriedades podem determinar o transporte do solvente em um certo sistema e afetar a rejeição da membrana (CHILDRESS; ELIMELECH, 1996; CHILDRESS; ELIMELECH, 2000; NGHIEM; HAWKES, 2007).

Deste modo, para o extrato aquoso, pode-se atribuir a retenção dos compostos em grande parte pela exclusão por tamanho de partículas e poros das membranas. Porém para o extrato alcoólico, a retenção não ocorreu, evidenciando uma interação entre as membranas, solvente e solutos da alimentação. Como já citado no item 5.3.3, há duas hipóteses que podem explicar este fato: o efeito de plastificação da membrana e/ou uma interação eletrostática, pois as soluções de alimentação podem interagir diferentemente com a membrana, alterando o transporte de solvente e compostos através de sua camada filtrante.

Como a concentração por processo de separação por membrana dos compostos bioativos do extrato alcoólico de pequi não foi eficiente, não foi realizada a atividade antioxidante dos produtos obtidos nestes processos. Entretanto, para o extrato aquoso, a avaliação da capacidade antioxidante foi realizada e os resultados encontram-se na Tabela 5.14.

Tabela 5.14. Atividades antioxidantes, avaliadas pelo método FRAP e DPPH, para as amostras de permeado, alimentação e concentrado dos experimentos com extrato aquoso

Membranas	UF	NF 90	NF 270
DPPH (% de inibição)			
Concentrado	24,53 ± 0,20 ^{aA}	29,48 ± 0,66 ^{aB}	26,25 ± 0,87 ^{aC}
Alimentação	23,03 ± 0,36 ^b	23,03 ± 0,36 ^b	23,03 ± 0,36 ^b
Permeado	7,44 ± 0,83 ^{cA}	3,07 ± 0,19 ^{cB}	4,02 ± 0,20 ^{cC}
FRAP (mM de sulfato ferroso/ml de extrato)			
Concentrado	3,16 ± 0,070 ^{aA}	3,71 ± 0,050 ^{aB}	3,47 ± 0,057 ^{aC}
Alimentação	2,62 ± 0,007 ^b	2,62 ± 0,007 ^b	2,62 ± 0,007 ^b
Permeado	1,42 ± 0,006 ^{cA}	0,54 ± 0,013 ^{cB}	0,73 ± 0,005 ^{cC}

Letras diferentes na mesma linha (letras maiúsculas) indicam diferença estatisticamente significativa entre a atividade antioxidante dos produtos (concentrado ou permeado) ($p \leq 0.05$). Letras diferentes na mesma coluna de um método (letras minúsculas) indicam diferença estatisticamente significativa entre a atividade antioxidante dos produtos (concentrado, alimentação e permeado) ($p \leq 0.05$).

A diferença entre os valores de capacidade antioxidante obtidos pelos métodos FRAP e DPPH pode ser associada aos diferentes mecanismos de reação envolvidos, como já citado anteriormente, na seção 5.2.

Na Tabela 5.14, pode-se observar que foi detectada baixa atividade antioxidante em todos os permeados obtidos (3,07 a 7,44 % de inibição no método DPPH e 0,54 a 1,42 mM de sulfato ferroso/ml pelo método FRAP). Os permeados dos processos de nanofiltração apresentaram valores menores de capacidade antioxidante que os de ultrafiltração, devido à maior passagem de compostos fenólicos e carotenóides por esta última membrana. Os concentrados obtidos apresentaram maior atividade antioxidante (24,53 a 29,48 % de inibição no método DPPH e 3,16 a 3,71 mM de sulfato ferroso/ml pelo método FRAP) que a alimentação (23,03 % de inibição no método DPPH e 2,62 mM de sulfato ferroso/ml pelo método FRAP), consequência da maior concentração obtida de carotenóides e polifenóis. Os concentrados obtidos pela nanofiltração apresentaram valores maiores que os obtidos pela ultrafiltração, pois, como já foi citado, as

membranas de nanofiltração retiveram mais compostos fenólicos e carotenóides.

Mais uma vez, a membrana NF 90 mostrou ser a mais eficiente para concentrar os compostos bioativos, uma vez que seu concentrado apresentou maior capacidade antioxidante em relação aos outros processos realizados.

Peshev et al. (2010) concentraram extrato de alecrim por nanofiltração, utilizando fator de concentração igual a 3 e alimentação com atividade antioxidante de 7% de inibição, pelo método DPPH, e obtiveram um concentrado com 19% e permeado 0,5% de inibição. A diferença da porcentagem de inibição do concentrado e da alimentação (de 7 para 19%) foi bem maior que a do presente trabalho (de 23 para 29,5%), o que é explicado pelo maior fator de concentração utilizado pelos autores (3) enquanto a do presente trabalho foi 1,5.

Tylkowski et al. (2010b) concentraram extrato de *Sideritis* ssp. L. por nanofiltração e relataram que o seqüestro de radicais livres DPPH aumentou de 84% nos extratos para 99% nos concentrados obtidos.

Vincze, Bányai-Stefanovits e Vatai (2007) trabalharam com nanofiltração de suco da fruta de espinheiro-marinho (*Hippophae rhamnoides* L.). Analisados pelo método FRAP, o suco inicial, o concentrado e o permeado apresentaram capacidade antioxidante de cerca de 12,0, 19,0 e 4,0 µM de ácido ascórbico/ml, respectivamente.

Laorko et al. (2010) clarificaram suco de abacaxi por ultrafiltração (com membrana de *cut-off* de 100 KDa), tendo como produto de interesse o permeado. As atividades antioxidante apresentadas na alimentação e no permeado foram cerca de 26,0 e 24,0 mg ácido ascórbico/100 ml, respectivamente, obtendo boa permeação de compostos com atividade antioxidante. No presente trabalho, a capacidade antioxidante apresentada pelo permeado de ultrafiltração (7,44 % de inibição no método DPPH e 1,42 mM de sulfato ferroso/ml pelo método FRAP) foi bem menor que a atividade da alimentação (23,03 % de inibição no método DPPH e 2,62 mM de sulfato ferroso/ml pelo método FRAP), confirmando que neste trabalho a membrana de ultrafiltração apresentou boa retenção de compostos bioativos, como citado anteriormente.

5.3.1.4. Caracterização do melhor extrato concentrado

Para a escolha do melhor processo de concentração por membranas foram considerados os coeficientes de retenção dos compostos e a atividade antioxidante apresentada pelos concentrados. O fluxo de permeado dos processos não foi considerado, uma vez que não houve diferença significativa entre os mesmos.

Deste modo, a membrana de nanofiltração NF 90 mostrou-se mais eficiente em reter carotenóides (100%) e polifenóis (97%) na solução aquosa e seu concentrado apresentou maior capacidade antioxidante. Portanto, a caracterização de seus produtos, alimentação, concentrado e permeado, foi realizada e está apresentada na Tabela 5.15.

Porém, a concentração do extrato alcoólico de pequi por processo de separação por membranas não foi viável, assim, foi realizada somente a caracterização da alimentação, que está apresentada na Tabela 5.16.

Os resultados da caracterização físico-química do extrato alcoólico e do extrato aquoso (alimentação) foram próximos. O extrato alcoólico apresentou umidade maior que o aquoso (alimentação). O concentrado aquoso apresentou menor umidade que a alimentação, que por sua vez, apresentou menor umidade que o permeado.

Tabela 5.15. Composição físico-química centesimal obtida para os produtos da concentração pela membrana NF 90.

Análises	Concentrado	Alimentação	Permeado
Umidade (%)	97,92 ± 0,01 ^a	98,55 ± 0,03 ^b	99,97 ± 0,00 ^c
pH	5,53 ± 0,02 ^a	5,94 ± 0,03 ^b	6,86 ± 0,03 ^c
Acidez (g)	0,03 ± 0,01 ^a	0,02 ± 0,01 ^a	n.d.
°Brix	3 ± 0,01 ^a	2,3 ± 0,01 ^b	0,4 ± 0,01 ^c
Proteínas (%)	0,59 ± 0,07 ^a	0,45 ± 0,06 ^b	n.d.
Lipídios (%)	0,30 ± 0,02 ^a	0,23 ± 0,04 ^a	n.d.
Vitamina C (mg)	3,71 ± 0,13 ^a	3,57 ± 0,13 ^a	2,35 ± 0,29 ^b

n.d. = não detectado, abaixo do limite de detecção do método

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa entre as amostras de permeado, alimentação e concentrado ($p \leq 0,05$).

Tabela 5.16. Composição físico-química centesimal obtida para o extrato alcoólico.

Análises	Extrato alcoólico
Umidade	98,91 ± 0,01
pH	5,53 ± 0,03
Acidez (g)	0,03 ± 0,01
Proteínas (%)	0,47 ± 0,02
Lipídios (%)	0,28 ± 0,01
Vit C (mg)	3,60 ± 0,02

O pH do extrato alcoólico apresentou-se abaixo e a acidez titulável um pouco acima dos do extrato aquoso (alimentação). Percebe-se que as soluções aquosas (alimentação, concentrado e permeado) apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,05$) quanto ao pH, tendo o permeado pH próximo ao neutro. As soluções de alimentação e concentrado não diferiram significativamente ($p \leq 0,05$) com relação à acidez, cujo valor inicial foi, em média, 0,02 g de ácido cítrico/ 100g. No permeado não foi possível verificar o valor de acidez, pois estava abaixo do limite de detecção do método. Esses resultados indicam que no processo de nanofiltração do extrato aquoso de pequi ocorreu uma concentração de íons de hidrogênio, sem alterar a concentração de ácidos não-dissociados.

Cissé et al. (2011) e Conidi, Cassano e Drioli (2011), concentrando por nanofiltração extrato aquoso de *Hibiscus sabdariffa* L. (chamado por vinagreira, caruru-azedo ou quiabo-roxo) e suco de bergamota, respectivamente, obtiveram valores muito próximos de pH (2,30 e 2,27 ; 7,8 e 8,0) e acidez titulável (184,0 e 189,0 ; 41,6 e 40,0) para alimentação e o concentrado, do extrato e do suco, respectivamente.

Quanto à concentração de sólidos solúveis, houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre a alimentação, o permeado e o concentrado. O teor de sólidos solúveis, inicialmente a 2,3 °Brix, aumentou no concentrado (3 °Brix), e diminuiu no permeado (0,4 °Brix), representando redução de aproximadamente 80% sobre o valor inicial.

No permeado não foi possível verificar a presença de lipídios e proteínas, pois estava abaixo do limite de detecção do método. As soluções de alimentação e concentrado não diferiram significativamente ($p \leq 0,05$) com relação ao valor de lipídios encontrados e diferiram em relação ao teor de proteínas. A quantidade de lipídios e proteínas encontrada na alimentação, no

concentrado e no extrato alcoólico foi muito baixa, menor que 0,6%, mostrando assim, que a centrifugação e filtração da alimentação no preparo dos extratos foram eficientes para retirada destes constituintes.

A concentração de vitamina C no extrato alcoólico e no extrato aquoso foi muito próxima. Além disso, no concentrado aquoso e na alimentação, esta concentração não apresentou diferença significativa. A retenção deste componente pela membrana de nanofiltração foi de apenas 34,2%. Esta baixa retenção de vitamina C deve-se à massa molecular do ácido ascórbico, cerca de 180 Da, que é menor que o *cut-off* (MWCO) da membrana, especificado em 200-300 Da. Assim, já era esperado que compostos com massa molecular menor de 200 Da fossem permeados pela mesma.

Conidi, Cassano e Drioli (2011) obtiveram cerca de 7% de retenção de vitamina C. Além disso, Cissé et al. (2011) encontraram valores muito próximo para o conteúdo de vitamina C na alimentação e concentrado (10,0 e 9,2, respectivamente).

5.3.3. Ensaio adicional

De acordo com os resultados obtidos, a concentração por processo de separação por membranas de compostos bioativos de extrato de pequi alcoólico (95%) foi ineficiente e a concentração do extrato aquoso altamente viável. Isso sugere que o uso de concentrações menores de álcool no extrato poderia resultar em produtos com maior retenção dos compostos. Dessa forma, realizou-se ensaio com extrato alcoólico a 70%, nas mesmas condições de temperatura e pressão, 25°C a 8 bar, com a membrana que apresentou a melhor retenção de carotenóides e fenóis nos ensaios anteriores, a membrana de nanofiltração NF 90.

Para a obtenção do extrato alcoólico a 70%, o extrato a 95% foi diluído com água destilada com o auxílio de um alcoômetro. O fluxo do processo de nanofiltração foi monitorado e medido conforme o item 4.2.2.3a, nos produtos obtidos pelo processo (alimentação, concentrado e permeado) foram determinados o conteúdo de carotenóides e compostos fenólicos, segundo as metodologias descritas nos itens 4.2.3.2a e 4.2.3.2b. O ensaio foi realizado em duplicata e as análises em triplicata. Os resultados desses ensaios estão apresentados na Tabela 5.17.

O fluxo médio de permeado da nanofiltração foi $1,36 \pm 0,30 \text{ L/h.m}^2$, tendo as curvas para cálculo destes coeficientes de correlação linear maiores que 0,98. O fluxo obtido foi muito inferior aos apresentados anteriormente, tanto para o extrato aquoso, quanto para o alcoólico 95%, em torno de 8 L/h.m^2 . Por este motivo, foi realizada também a medida da viscosidade das soluções, conforme o item 4.2.3.2e, e está apresentada na Tabela 5.17.

A viscosidade das soluções sofreu pouca alteração com o processo por membrana, apenas a viscosidade do concentrado teve um leve aumento. Comparando as viscosidades obtidas para o extrato aquoso, cerca de 1,00 mPa.s, e para o alcoólico 95%, 1,50 Pa.s, o extrato alcoólico 70% apresentou a maior viscosidade, o que pode ter influenciado em seu fluxo.

Tabela 5.17. Teor de carotenóides (μg de β -caroteno /ml de extrato), fenóis totais (μg de ácido gálico/ml de extrato) e viscosidade (mPa.s) para as amostras de permeado, alimentação e concentrado dos experimentos com extrato alcoólico (70%).

	Concentrado	Alimentação	Permeado	% rejeição
Teor de carotenóides	$5,10 \pm 0,09$	$4,09 \pm 0,14$	$0,36 \pm 0,02$	$91,16 \pm 0,80$
Teor de fenóis totais	$217,19 \pm 2,46$	$204,99 \pm 1,81$	$74,42 \pm 0,68$	$63,70 \pm 0,48$
Viscosidade	$2,00 \pm 0,00$	$1,90 \pm 0,00$	$1,90 \pm 0,00$	

Conforme a Tabela 5.17, houve boa rejeição aos carotenóides pela membrana, 91,16 %, e ainda baixa retenção para polifenóis, 63,70%. Estes resultados foram superiores aos encontrados com o extrato alcoólico a 95% de álcool, que apresentou coeficiente de retenção de 9,81% e 14,95% para carotenóides e polifenóis, respectivamente. Este fato evidencia mais uma vez que a membrana possui comportamento distinto, variando com a concentração de álcool, e apresentando melhor comportamento em água. Assim, um estudo mais aprofundado sobre a interação entre as soluções de alimentação e as membranas, a resistência ao escoamento oferecida pelas membranas e polarização da concentração e incrustação formados é necessário para se compreender melhor a rejeição observada dos compostos em relação às membranas e as soluções.

6. CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos, este trabalho apresenta as seguintes conclusões:

- Os extratos aquoso e alcoólico de pequi apresentaram elevado teor de compostos fenólicos e carotenóides. O conteúdo dos compostos extraídos variou em resposta à utilização de diferentes solventes, temperatura e tempo de extração.
- Para todas as temperaturas os extratos aquosos apresentaram maior teor de compostos fenólicos em 1 h de extração, sendo que à 25 °C foi encontrada maior concentração destes compostos. Já para os carotenóides, as extrações a 25 °C e 40 °C por 1 h foram as melhores.
- Nos extratos alcoólicos, para todas as temperaturas, com o aumento do tempo, eleva-se a concentração de compostos fenólicos, sendo esta maior em 40 °C. Já a composição de carotenóides foi maior a 25 °C em 20 min e 1 h.
- As condições que proporcionaram maior extração dos compostos funcionais foram: 25 °C por 1 h de extração aquosa e 40 °C por 24 h de extração alcoólica, com uma re-extração nas mesmas condições.
- O extrato alcoólico proporcionou maior extração de carotenóides que o extrato aquoso, que por sua vez, extraiu maior quantidade de polifenóis e apresentou maior capacidade antioxidante.
- O processo de separação por membranas para concentração dos extratos alcoólicos (95% de álcool) não foi viável, uma vez que a retenção obtida para os compostos de interesse não ultrapassou 15%; os carotenóides e os polifenóis foram permeados pela camada filtrante da membrana juntamente com o solvente.
- O processo de concentração por nanofiltração (NF 90) do extrato alcoólico a 70% obteve retenção de 91% e 64% para carotenóides e polifenóis, respectivamente.
- Para o extrato aquoso de pequi, o processo de nanofiltração utilizando a membrana NF 90 mostrou ser uma excelente alternativa para concentração dos compostos bioativos, pois, além do bom fluxo de permeado obtido, pode-se considerar que o processo não

apresentou perdas de carotenóides e compostos fenólicos para o permeado, tendo 100% e 97% de retenção destes compostos, respectivamente.

- No processo de ultrafiltração, a retenção de carotenóides foi excelente (98%), porém houve perda dos compostos fenólicos (65%) do extrato aquoso. Partículas depositadas na superfície e nos poros da membrana impediram a passagem de pequenas moléculas, aumentando a rejeição.
- A concentração por nanofiltração preservou a alta atividade antioxidante do extrato, que pode ser utilizado como fonte concentrada de compostos biologicamente ativos. O seqüestro de radicais livres DPPH aumentou de 23% nos extratos para 29,5% nos concentrados obtidos. E a capacidade antioxidante, analisada pelo método FRAP, aumentou de 2,62 para 3,71 mg de equivalente de sulfato ferroso/ml.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar esta extração dos compostos fenólicos e carotenóides nos diferentes tempos e temperatura avaliando os compostos de degradação formados durante o processo.
- Realizar as extrações hidroalcoólicas de pequi, variando a porcentagem do álcool na solução, a fim de se verificar a melhor concentração para extração de carotenóides e polifenóis. De forma que esta concentração também apresente boa retenção dos compostos quando tratada por membranas.
- Avaliar o efeito de outras variáveis de processo, como razão fruta/solvente, número de re-extrações e alteração de pH, possibilitando resultar em produtos com melhor aproveitamento dos compostos funcionais do pequi.
- Avaliar o efeito do processo de extração dos compostos biologicamente ativos do pequi utilizando o permeado do processo de concentração por membranas como solvente extrator, não obtendo desta forma qualquer tipo de resíduo.
- Processar as soluções aquosas de pequi em unidade de filtração tangencial em escala piloto, resultando em um aumento do fluxo e do fator de concentração do processo e comprovando a viabilidade do mesmo.
- Estudar a estabilidade dos carotenóides e compostos fenólicos nos extratos obtidos.
- Estudar a interação ocorrida entre as membranas e as soluções de alimentação.
- Calcular a resistência ao escoamento oferecida pela membrana e polarização da concentração e incrustação ocorridos.
- Aplicar o extrato de pequi produzido como ingrediente em alimentos (iogurtes, bolos, bebidas, sorvete) e avaliar a estabilidade e a biodisponibilidade dos carotenóides e compostos fenólicos nestes produtos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S.P.; SILVA, J.A. **Piqui e buriti: importância alimentar para a população dos Cerrados**. Planaltina: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária do Brasil (EMBRAPA), 1994. 38 p.

ALMEIDA, S.P.; PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M.; RIBEIRO, J.R. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária do Brasil (EMBRAPA), 1998. 464 p.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.; ROBARDS, K.; RYAN, D. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. **The Analyst Critical Review**, v.125, p.989–1009, 2000.

AOAC. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists** (AOAC), 16th. ed., 4. rev., 2v., Gaithersburg, 1998.

AZEVEDO-MELEIRO, C.H. **Análise de carotenóides em alimentos brasileiros por cromatografia líquida de alta eficiência – espectrometria de massas**. 2003. 246p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

BANVOLGYI, S.; KISS, I.; BEKASSY-MOLNAR, E.; VATAI, G. Concentration of red wine by nanofiltration. **Desalination**, v.198, p.8-15, 2006.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.P.; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e a defesa do organismo. **Química Nova**, v.29, n.1, p.113-123, 2006.

BIDERMAN, I. Frutas do Cerrado. **Revista Nestlé Bionutrição e Saúde**, ano 3, n.10, p.41-45, 2009.

BIESALSKI, H.; DRAGSTED, L.O.; ELMADFA, I.; GROSSKLAUS, R.; MÜLLER, M.; SCHRENK, D.; WALTER, P.; WEBER, P. Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. **Nutrition**, v.25, p.1202–1205, 2009.

BLANK, R.; MUTH, K.-H.; PROSKE-GERHARDS, S.; STAUDE, E. Electrokinetic investigations of charged porous membranes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.140, p.3–11, 1998.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v.28, n.1, p.25-31, 1995.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v.56, n.11, p.317-333, 1998.

CAMPELO, E.C.S.; MARTINS, M.H.B.; CARVALHO, I.T.; PEDROSA, E.M.R. Teores de vitamina “C” em polpas de acerola (*Malpighia glabra* l.) congeladas. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.16, n.1, p.107-113, 1998.

CAMPOS, D.C.P.; SANTOS, A.S.; WOLKOFF, D.B.; VIRGINIA MARTINS MATTA, V.M.; CABRAL, L.M.C.; COURI, S. Cashew apple juice stabilization by microfiltration. **Desalination**, v.148, p.61-65, 2002.

CARNEIRO, L.; SA, I.S.; GOMES, F.S.; MATTA, V.M.; CABRAL, L.M.C. Cold sterilization and clarification of pineapple juice by tangential microfiltration. **Desalination**, v.148, p.93-98, 2002.

CASSANO, A.; DRIOLI, E.; GALAVERNA, G.; MARCHELLI, R.; DI SILVESTRO, G.; CASSANO, P. Clarification and concentration of citrus and carrot juices by integrated membrane process. **Journal of Food Engineering**, v.57, p.153–163, 2003.

CASSANO, A.; CONIDI, C.; DRIOLI, E. Physico-chemical parameters of cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) juice clarified by microfiltration and ultrafiltration processes. **Desalination**, v.250, p.1101-1104, 2010.

CHEN, M.H.; CHIAO, T.C.; TSENG, T.W. Preparation of Sulfonated Polysulfone/Polysulfone and Aminated Polysulfone/Polysulfone Blend Membranes. **Journal of Applied Polymer Science**, v.61, p.1205-1209, 1996.

CHERYAN, M. **Ultrafiltration and microfiltration handbook**. New York: CRC Press, 1998. 527p.

CHILDRESS, A.E.; ELIMELECH, M. Effect of solution chemistry on the surface charge of polymeric reverse osmosis and nanofiltration membranes. **Journal of Membrane Science**, v.199, p. 253-268, 1996.

CHILDRESS, A.E.; ELIMELECH, M. Relating Nanofiltration Membrane Performance to Membrane Charge (Electrokinetic) Characteristics. **Environmental Science & Technology**, v.34, p.3710-3716, 2000.

CHIRINOS, R., ROGEZ, H., CAMPOS, D., PEDRESCHI, R., LARONDELLE, Y. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Trapaeolum tuberosum* Ruiz and Pavón) tubers. **Separation and Purification Technology**, v.55, n.2, p.217–225, 2007.

CISSÉ, M.; VAILLANT, F.; PALLET, D.; DORNIER, M. Selecting Ultrafiltration and Nanofiltration Membranes to Concentrate Anthocyanins from Roselle Extract (*Hibiscus sabdariffa* L.). **Food Research International**, doi: 10.1016/j.foodres.2011.04.046, 2011.

CISSE, M.; VAILLANT, F.; SORO, D.; REYNES, M.; DORNIER, M. Crossflow microfiltration for the cold stabilization of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. **Journal of Food Engineering**, v.106, p.20–27, 2011.

CONIDI, C.; CASSANO, A.; DRIOLI, E. A membrane-based study for the recovery of polyphenols from bergamot juice. **Journal of Membrane Science**, v.375, p.182-190, 2011.

COUTINHO, C. M.; CHIU, M. C.; BASSO, R. C.; RIBEIRO, A. P. B.; GONÇALVES, L. A. G.; VIOTTO, L. A. State of art of the application of membrane technology to vegetable oils: A review. **Food Research International**, v.42, p.536–550, 2009.

CHIU, C. M.; COUTINHO, C. M.; GONÇALVES, L. A.G. Carotenoids concentration of palm oil using membrane technology. **Desalination**, n.245, p.783-786, 2009.

DOW FILMTEC. **DOW FILMTEC Reverse Osmosis and Nanofiltration Elements**. Disponível em <<http://www.dowwaterandprocess.com/products/ronf.htm>>. Acesso em 15/05/2011.

DZIEZAK, J. D. Membrane separation technology offers processors unlimited potential. **Food Technology**, v.44, n.9, p.108-113, 1990.

FERNANDEZ-PACHÓN, M.S.; VILLANO, D.; TRONCOSO, A.M.; GRACÍA-PARRILLA, M.C. Determination of the phenolic composition of sherry and table white wines by liquid chromatography and their relation with antioxidant activity. **Analytica Chimica Acta**, v.563, p.101-108, 2006.

FERRARINI, R.; VERSARI, A.; GALASSI, S. A preliminary comparison between nanofiltration and reverse osmosis membranes for grape juice treatment. **Journal of Food Engineering**, v.50, p.113-116, 2001.

FIGUEIREDO FILHO, D.B.; SILVA JÚNIOR, J.A. Desvendando os Mistérios do Coeficiente de Correlação de Pearson (r). **Revista Política Hoje**, v.18, n.1, 2009.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. Extratos Vegetais. **Food Ingredients Brasil**, n.11, p. 16-20, 2010. Disponível em <<http://www.revista-fi.com/materias/120.pdf>>. Acesso em 02/04/2010.

FOUST, A.S.; WENZEL, L.A.; CLUMP, C.W.; MANS, L.; ANDERSEN, L.B. **Princípios das Operações Unitárias**. 2 ed. Guanabara Dois, 1082. 670p.

FRANKEL, E.N.; MEYER, A.S. The problem of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, n.13, p.1925-1941, 2000.

GEENS, J.; BOUSSU, K.; VANDECASTEELE, C.; VAN DER BRUGGEN, B. Modelling of solute transport in non-aqueous nanofiltration. **Journal of Membrane Science**, v.281, p.139-148, 2006.

GIRONI, F.; PIEMONTE, V. Temperature and solvent effects on polyphenol extraction process from chestnut tree wood. **Chemical Engineering Research and Design**, doi:10.1016/j.cherd.2010.11.003, 2010.

GRISOLIA, C. K.; OLIVEIRA, A.B.B.; RESCK, I.; KHOURI, J.; SILVEIRA, D. **Cápsulas gelatinosas de polpa de pequi (*Caryocar brasiliense*), como suplemento vitamínico, antioxidante e antimutagênico, um novo nutracêutico**. Registro na RPI numero 1922. Depósito de patente número PI0601631-6. 2006. Disponibilidade: Restrita; Cidade: Brasília; Inst. promotora/financiadora: Universidade de Brasília.

GURAK, P.D.; CABRAL, L.M.C.; ROCHA-LEÃO, M.H.M.; MATTA, V.M.; FREITAS, S.P. Quality evaluation of grape juice concentrated by reverse osmosis. **Journal of Food Engineering**, v.96, p.421–426, 2010.

HABERT, A. C.; BORGES, C. P.; NOBREGA, R. **Processos de separação por membranas**. Rio de Janeiro: E-papers, 2006. 180p.

HIROSE, M.; HAGIWARA, A.; HASUI, K.; INOVE, K.; ITO, N. Combined effects of BHA and other antioxidants in induction of forestomach lesions in rats. **Cancer Letters**, v.30, n.2, p.169-174, 1986.

HODÚR, C.; KERTÉSZ, Sz.; BESZÉDES, S.; LÁSZLÓ, Zs.; SZABÓ, G. Concentration of marc extracts by membrane techniques. **Desalination**, v.241, p.265-271, 2009.

HOSSAIN, M. M. Concentration of anthocyanin pigments in blackcurrant pomace by ultrafiltration. **Food Australia**, v.55, n.6, p.263-266, 2003.

IAL – Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico químicos para análise de alimentos**. 4ed. Brasília: IAL, 2005. 1018p.

ISMAIL, A.F., LORNA, W. Penetrant-Induced Plasticization Phenomenon in Glassy Polymers for Gas Separation Membrane. **Separation and Purification Technology**, v.27, p.173-194, 2002.

JESUS, D.F.; LEITE, M.F.; SILVA, L.F.M.; MODESTA, R.D.; MATTA, V.M.; CABRAL,

L.M.C. Orange (*Citrus sinensis*) juice concentration by reverse osmosis. **Journal of Food Engineering**, v.81, p.287–291, 2007.

KONISHI, S.; SAWAYA, A.; CUSTÓDIO, A.R.; CUNHA, I.; SHIMIZU, M. Análise da influência de agentes solubilizantes na atividade antimicrobiana de extratos de própolis e de uma formulação de spray hidroalcoólico. **Mensagem Doce** 75, p.22–25, 2004. Disponível em <<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/75/artigo.htm>>. Acesso em 02/04/2011.

KRINSKY, N. Y. The biological properties of carotenoids. **Pure and Applied Chemistry**, v. 66, n.5, p.1003-1010, 1994.

KRIS-ETHERTON, P.M.; HECKER, K.D.; BONANOME, A.; COVAL, S.M.; BINKOSKI, A.E.; HILPERT, K.F.; GRIEL, A.E.; ETHERTON, T.D. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **The American Journal of Medicine**, v.113 (9B), 2002.

KRUPA, D.; NAKKEERAN, E.; KUMARESAN, N.; VIJAYALAKSHMI, G.; SUBRAMANIAN, R. Extraction, purification and concentration of partially saturated canthaxanthin from *Aspergillus carbonarius*. **Bioresource Technology**, v.101, p.7598–7604, 2010.

LAORKO, A.; LI, Z.; TONGCHITPAKDEE, S.; CHANTACHUM, S.; YOURAVONG, W. Effect of membrane property and operating conditions on phytochemical properties and permeate flux during clarification of pineapple juice. **Journal of Food Engineering**, v.100, p.514–521, 2010.

LAPORNIK, B.; PROSEK, M.; WONDRA, A.G. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. **Journal of Food Engineering**, v.71, p.214–222, 2005.

LIMA, A.; SILVA, A. M. O.; TRINDADE, R. A.; TORRES, R. P.; MANCINI-FILHO, J. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.). **Revista Brasileira Fruticultura**, v.29, p.695-698. 2007.

LIMA, A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, e identificação dos compostos fenólicos presentes no Pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.).** 2008. 199p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

LIU, R. H. Whole grain phytochemicals and health. **Journal of cereal Science**, v.46, p.207-219. 2007.

MAJHENIC, L.; SKERGET, M.; KNEZ, Z. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. **Food Chemistry**, v.104, p.1258–1268, 2007.

MARSHALL, A.D.; MUNRO, G.T. The effect of protein fouling in microfiltration and ultrafiltration on permeate flux, protein retention and selectivity: a literature review. **Desalinisation**, v.11, p.65-80, 1993.

MARTINEZ-VALVERDE, I.; PERIAGO, M.J.; ROS, G. Nutritional meaning of the phenolic compounds from the diet. **Archivos Latinoamericanos de nutricion**, v.50, n.1, p.5-18, 2000.

MATTA, V.M.; MORETTI, R.H.; CABRAL, L.M.C. Microfiltration and reverse osmosis for clarification and concentration of acerola juice. **Journal of Food Engineering**, v.61, p.477–482, 2004.

MCCORD, J. M. Free radicals and pro-oxidants in health and nutrition. **Food Technology**, v.48, n.3, p.106-110, 1994.

MELLO, B.C.B.S. **Concentração de extratos de própolis através de membranas poliméricas.** 2008. 109p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

MELLO, B.C.B.S.; PETRUS, J.C.C.; HUBINGER, M.D. Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic propolis extracts through nanofiltration. **Journal of Food Engineering**, v.96, p.533–539, 2010.

MENG, L.; LOZANO, Y.; BOMBARDA, I.; GAYDOU, E.; LI, B. Anthocyanin and Flavonoid Production from *Perilla frutescens*: Pilot Plant Scale Processing Including Cross-Flow Microfiltration and Reverse Osmosis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.4297-4303, 2006.

MIRANDA, K. F. **Estudo da concentração de licopeno por ultrafiltração a partir de suco de melancia (*Citrullus vulgaris* Schard)**. 2005. 174p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

MIRANDA-VILELA, A. L.; RESCK, I.S.; GRISOLIA, C. K. Antigenotoxic activity and antioxidant properties of organic and aqueous extracts of pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, n.4, p.956-963. 2008.

MULDER, M. **Basic Principles of Membrane Technology**. 2. ed. Dordrecht : Kluwer Academic Publishers, 1997. 564p.

NADIR Spiral Modules (MF/UF/NF) **Properties and Applications of NADIR Membranes**. Disponível em: <http://www.daicen.co.jp/english/membrane/mem_spec/nadir_spec.html>. Acesso em: 15/05/2011.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3 ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 975p.

NGHIEM, L.D.; HAWKES, S. Effects of membrane fouling on the nanofiltration of pharmaceutically active compounds (PhACs): Mechanisms and role of membrane pore size. **Separation and Purification Technology**, v.57, p.176–184, 2007.

NOBREGA, R., GARCIA, M.E.F.; HABERT, A.C. Síntese e Caracterização de Membranas Poliméricas Para Uso na Desidratação de Etanol por Pervaporação. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, p.18-26, 1991.

NWUHA, V. Novel studies on membrane extraction of bioactive components of green tea in organic solvents: part I. **Journal of Food Engineering**, v.44, p.233-238, 2000.

OLIVEIRA, M. E.B.; GUERRA, N. B.; BARROS, L. N.; ALVES, R. E. **Aspectos Agrônomicos e de Qualidade do Pequi**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. 2008. Disponível em: <http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/cd/jss/acervo/Dc_113.pdf>. Acesso em: 02/04/2011.

OLIVEIRA, M.E.B.; GUERRA, N.B.; MAIA, A.H.N.; ALVES, R.E.; MATOS, N.M.S.; SAMPAIO, F.G.M.; LOPES, M.M.T. Características químicas e físico-químicas de pequis da Chapada do Araripe, Ceará. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.32, n.1, p.114-115, 2010.

ONGARATTO, R. S. **Micro e ultrafiltração de suco de pitanga: estudo dos parâmetros de operação e do mecanismo de incrustação**. 2009. 207p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

ONSEKIZOGLU, P.; BAHCECI, K.S.; ACAR, M.J. Clarification and the concentration of apple juice using membrane processes: A comparative quality assessment. **Journal of Membrane Science**, v.352, p.160–165, 2010.

PATIL, G.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. Integrated membrane process for the concentration of anthocyanin. **Journal of Food Engineering**, v.78, p.1233-1239, 2007.

PAULSON, D. J.; WILSON, R. L.; SPATZ, D. D. Crossflow membrane technology and its applications. **Food Technology**, v.38, n.12, p.77-87; 111, 1984.

PERRY R. H.; CHILTON, C.H. **Chemical Engineers' Handbook**. Fifth edition. New York: McGraw-Hill, 1973.

PESHEV, D.; PEEV, L.G.; PEEV, G.; BAPTISTA, I.I.R.; BOAM, A.T. Application of organic solvent nanofiltration for concentration of antioxidant extracts of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). **Chemical Engineering Research and Design**, v.89, p.318–327, 2010.

PETRUS, J. C. C. **Preparação, Modificação e Caracterização de Membranas Assimétricas para Clarificação de Suco de Frutas**. 1997. 139p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

- PHILIP, T. Purification and concentration of natural colorants by membranes. **Food Technology**, v.38, p.107-108, 1984.
- PILIPOVIK, M. V.; RIVEROL, C. Assessing dealcoholization systems based on reverse osmosis. **Journal of Food Engineering**, v.69, p.437-441, 2005.
- PORTER, M.C. **Handbook of Industrial Membrane Technology**. New Jersey: Noyes Publications, 1990. 604 p.
- PORTO, C. S. **Potencial antioxidante de extratos de frutos e folhas do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.)**. 2008. 32p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, Minas Gerais, 2008.
- PRASAD, K.N.; CHEW, L.Y.; KHOO, H.E.; YANG, B.; AZLAN, A.; ISMAIL, A. Carotenoids and antioxidant capacities from *Canarium odontophyllum* Miq. fruit. **Food Chemistry**, v.124, p.1549–1555, 2011.
- PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.4290-4302, 2005.
- PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary as determined by a modified ferric reducing/ antioxidant power assay. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v.48, p.3396-3402, 2000.
- RAJKUMAR, V.; GUHA, G.; KUMAR, R.A. Antioxidant and anti-neoplastic activities of *Picrorhiza kurroa* extracts. **Food and Chemical Toxicology**, v.49, p.363–369, 2011.
- RAMARETHINAM, S.; ANITHA, G.R.; LATHA, K. Standardization of conditions for effective clarification and concentration of green tea extract by membrane filtration. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v.65, p.821-825, 2006.
- RIJN C.J.M, **Nano and Micro Engineered Membrane Technology**. Amsterdam: Elsevier, 2005. 384 p.

ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, v.34, Suppl. 2, p.105-10, 2002.

ROCHA, M.G.; ROCHA, T.C., AGUIAR, J.L.P.; JUNQUEIRA, N.T.V. **Dinâmica da produção extrativista de pequi no Brasil. Anais do IX Simpósio Nacional do Cerrado**, IX Simpósio Nacional Cerrado e II Simpósio Internacional Savanas Tropicais, Brasília, 2008. Disponível em <http://www.cpac.embrapa.br/publicacoes/search_pbl/1?q=Extrativismo>. Acesso em 24/03/2010.

RODRIGUES-AMAYA, L.G. **A Guide to Carotenoid Analysis in Food**. Washington: ILSI Human Nutrition Institute, 1999.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. **A Guide to Carotenoid Analysis in Foods**. Washington: ILSI Human Nutrition Institute, 2001. 64p.

RODRIGUES, R.B. **Aplicação dos processos de separação por membranas para produção de suco clarificado e concentrado de camu camu (*Myrciaria dubia*)**. 2002. 146p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

RODRIGUES, R.B.; MENEZES, H.C.; CABRAL, L.M.C.; DORNIER, M.; RIOS, G.M.; REYNES, M. Evaluation of reverse osmosis and osmotic evaporation to concentrate camu–camu juice (*Myrciaria dubia*). **Journal of Food Engineering**, v.63, p.97–102, 2004.

RODRIGUES-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes Brasileiras de Carotenóides - Tabela Brasileira de Composição de Carotenóides em Alimentos**. Brasília MMA/SBF, 100p. 2008.

ROESLER, R.; MALTA, L.G.; CARRASCO, L.C.; HOLANDA, R.B.; SOUSA, C.A.S.; PASTORE, G.M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.1, p.53-60, 2007.

ROESLER, R.; CATHARINO, R. R.; MALTA, L. G.; EBERLIN, M. N.; PASTORE, G.M. Antioxidant activity of *Caryocar brasiliense* (pequi) and characterization of components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v.110, p.711–717, 2008.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.D. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP)**. Comunicado técnico on-line, 125. EMBRAPA, Fortaleza, 2006.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.E.; SAURA-CALIXTO, F.D. **Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH**. Comunicado técnico on-line. EMBRAPA, Fortaleza, 2007.

RUFINO, M.; ALVES, R.E.; BRITO, E. S.; PEREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.D.; MANCINI FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of eighteen non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v.121, p.996-1002, 2010.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, v.8, p.121-137, 2002.

SÁNCHEZ, A.M.; CARMONA, M.; PRODANOV, M.; ALONSO, G.L. Effect of centrifugal ultrafiltration on the composition of aqueous extracts of saffron spice (*Crocus sativus* L.). **Journal of Food Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.7293–7301, 2008.

SARMENTO, L.A.V.; MACHADO, R.A.F.; PETRUS, J.C.C.; TAMANINI, T.R.; BOLZAN, A. Extraction of polyphenols from cocoa seeds and concentration through polymeric membranes. **Journal of Supercritical Fluids**, v.45, p.64–69, 2008.

SCHÄFER, A.I.; FANE, A.G.; WAITE, T.D. **Nanofiltration – Principles and Applications**. Inglaterra: Elsevier Advanced Technology, 2005. 560 p.

SESSA, D.J.; ELLER, F.J.; PALMQUIST, D.E.; LAWTON, J.W. Improved methods for

decolorizing corn zein. **Industrial Crops and Products**, v.18, p.55-65, 2003.

SHAHIDI, F.; NACZAK, M. **Phenolics in Food and Nutraceuticals**. Boca Raton CRC Press, 2004. 566p.

SILVA, F.T.; JARDINE, J.G.; MATTA, V.M. Concentração de suco de laranja (*Citrus sinensis*) por osmose inversa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.1, 1998.

SILVA, S; TASSARA, H. **Frutas no Brasil**. São Paulo: Nobel. 2001.

SILVA, P.; HAN, S.; LIVINGSTON, A.G. Solvent transport in organic solvent nanofiltration membranes. **Journal of Membrane Science**, v.262, p.49–59, 2005.

SILVA, E.M., ROGEZ, H.; LARONDELLE, Y. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. **Separation and Purification Technology**, v.55, p.381–387, 2007.

SILVA, D. **Estudo da recuperação de lignossulfonatos de baixa massa molar por nanofiltração**. 2007. 122p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

SILVA, F.C. **Aplicação de membranas poliméricas para obtenção de licopeno concentrado a partir de polpa de mamão (*Carica papaya* L.)**. 2010. 122p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

SOHRABI, M.R.; MADAENI, S.S.; KHOSRAVI, M.; GHAEDI A.M. Concentration of licorice aqueous solutions using nanofiltration and reverse osmosis membranes. **Separation and Purification Technology**, v.75, p.121–126, 2010.

SOUZA FILHO, M.S.M.S.; LIMA, J.R.; SOUZA, A.C.R.; SOUZA NETO, M.A.; COSTA, M.C. Efeito do branqueamento, processo osmótico, tratamento térmico e armazenamento na estabilidade da vitamina C de pedúnculos de caju processados por métodos combinados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.19, n.2, 1999.

SPIGNO, G.; TRAMELLI, L.; FAVERI, D.M. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. **Journal of Food Engineering**, v.81, p.200–208, 2007.

SWAIN, T.; HILLIS, W.E.; The phenolic constituents of *Prunus domestica*. The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.10, p.63-68, 1959.

TACO – **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. Campinas: NEPA – Núcleo de Estudos e Pesquisa em Alimentação / UNICAMP. 2 ed. 2006. 42 p.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K; CISNEROSZEVALLOS, L.; BYRNE, D.H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.19, p.669-675, 2006.

TONON, R.V. **Secagem por atomização do suco de açaí: Influência das variáveis de processo, qualidade e estabilidade do produto**. 2009. 212p. Tese (Doutorado em Engenharia dos Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

THOO, Y.Y.; HO, S.K.; LIANG, J.Y.; HO, C.W.; TAN, C.P. Effects of binary solvent extraction system, extraction time and extraction temperature on phenolic antioxidants and antioxidant capacity from mengkudu (*Morinda citrifolia*). **Food Chemistry**, v.120, p.290–295, 2010.

TSUI, E.M.; CHERYAN, M. Membrane processing of xanthophylls in ethanol extracts of corn. **Journal of Food Engineering**, v.83, p.590-595, 2007.

TUBEROSO, C.I.G.; ROSA, A.; BIFULCO, E.; MELIS, M.P.; ATZERI, A.; PIRISI, F.M.; DESSÌ, M.A. Chemical composition and antioxidant activities of *Myrtus communis* L. berries extracts. **Food Chemistry**, v.123, p.1242–1251, 2010.

TYLKOWSKI, B.; TRUSHEVA, B.; BANKOVA, V.; GIAMBERINI, M.; PEEV, G.; NIKOLOVA, A. Extration of biologically active compounds from propolis and concentration of extract by nanofiltration. **Journal of Membrane Science**, v.348, p.124-130, 2010a.

TYLKOWSKI, B.; TSIBRANSKA, I.; KOCHANOV, R.; PEEV, G.; GIAMBERINI, M. Concentration of biologically active compounds extracted from *Sideritis* ssp. L. by nanofiltration. **Food and Bioproducts Processing**, doi:10.1016/j.fbp.2010.11.003, 2010b.

UNTEN, L.; KOKETSU, M.; KIM, M. Antidiscoloring activity of green tea polyphenols on β -carotene. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.2009-2012, 1997.

USHIKUBO, F.Y. **Efeito do tratamento enzimático, da velocidade tangencial e da pressão transmembrana na microfiltração da polpa diluída de umbu (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.)**. 2006. 117p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

USHIKUBO, F. Y., WATANABE, A. P., VIOTTO, L.A. Microfiltration of umbu (*Spondias tuberosa*, Arr. Cam.) juice. **Journal of Membrane Science**, v.288, p.61–66. 2007.

VATTEN, D.A.; SHETTY, K. Biological functionality of ellagic acid: a review. **Journal of Food Biochemistry**, v.20, p.234-266, 2005.

VINCZE, I.; STEFANOVITS-BÁNYAIB, E.; VATAI, G. Using nanofiltration and reverse osmosis for the concentration of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) juice. **Desalination**, v.200, p.528-530, 2006.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R.L. Total antioxidant capacity of fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, n.3, p.701-705, 1996.

WANG, J., SUN, B., CAO, Y., TIAN, Y., LI, X. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. **Food Chemistry**, v.106, n.2, p.804–810, 2008.

WARCZOK, J.; FERRANDO, M.; LÓPEZ, F.; GÜELL, C. Concentration of apple and pear juices by nanofiltration at low pressures. **Journal of Food Engineering**, v.63, p.63–70, 2004.

WATANABE, A.P.; USHIKUBO, F.Y.; VIOTTO, L.V. Evaluation of permeate flux in microfiltration of Tamarind (*Tamarindus indica* L.) juice using polypropylene membrane. **Desalination**, v.200, p.337–338, 2006.

WEIL, J.H. **Bioquímica Geral**. 8 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2000. 787p.

XU, L.; WANG, S. The *Ginkgo biloba* extract concentrated by nanofiltration. **Desalination**, v.184, p.305-313, 2005.

YIM, H.S.; CHYE, F.Y.; KOO, S.M.; MATANJUN, P.; HOW, S.E.; HO, C.W. Optimization of extraction time and temperature for antioxidant activity of edible wild mushroom, *Pleurotus porrigens*. **Food and Bioproducts Processing**, doi:10.1016/j.fbp.2011.04.001, 2011.

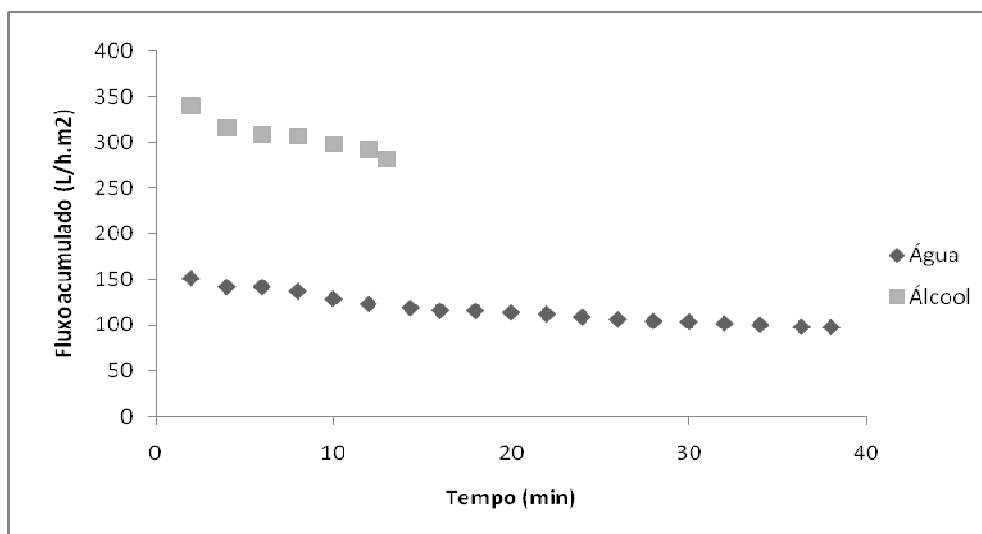
YOURAVONG, W.; LI, Z.; LAORKO, A. Influence of gas sparging on clarification of pineapple wine by microfiltration. **Journal of Food Engineering**, v.96, p.427–432, 2010.

ZOU, Y.; CHANG, S.C.; GU, Y.; QIAN, S.Y. Antioxidant Activity and Phenolic Compositions of Lentil (*Lens culinaris* var. Morton) Extract and Its Fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, p.2268–2276, 2011.

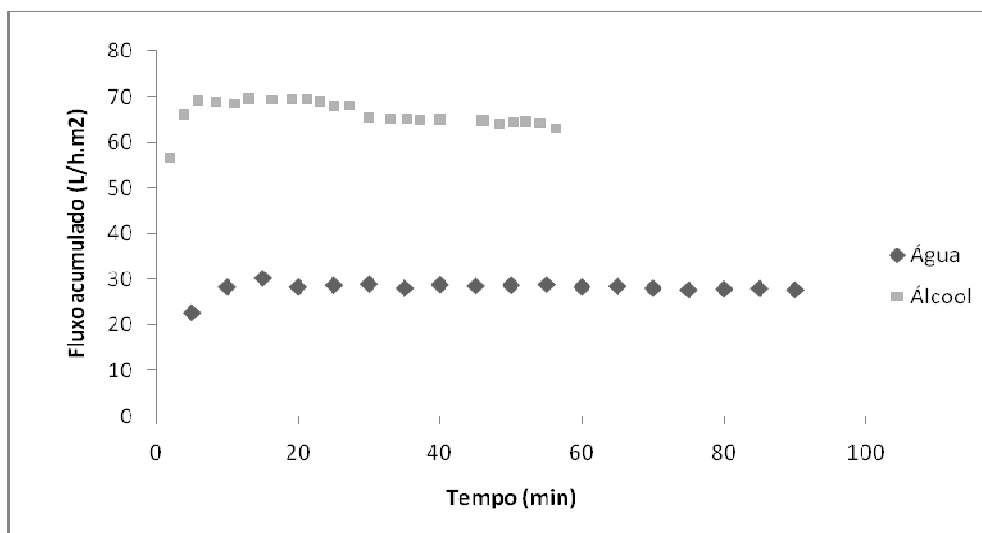
APÊNDICE A

CURVAS DE FLUXO DE PERMEADO *versus* TEMPO PARA ÁGUA E ÁLCOOL 95%

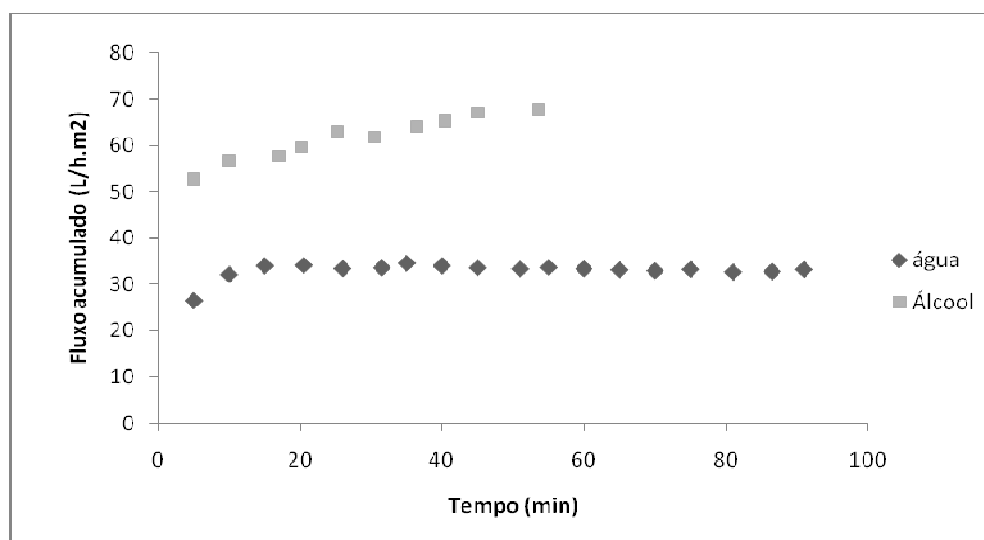
*Curvas de fluxo de permeado versus tempo para a água e álcool 95% utilizando a membrana
UF*



*Curvas de fluxo de permeado versus tempo para a água e álcool 95% utilizando a membrana
NF 90*



Curvas de fluxo de permeado versus tempo para a água e álcool 95% utilizando a membrana NF 270



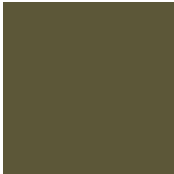
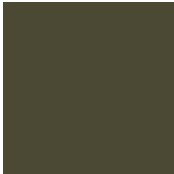
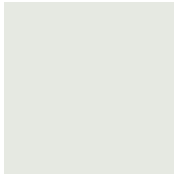
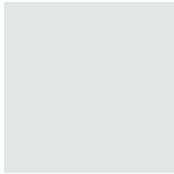
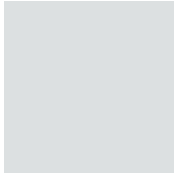
APÊNDICE B

PADRÕES DE COLORAÇÃO

Padrões para frações de pequi, polpa, amêndoa e endocarpo espinhoso.

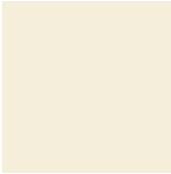
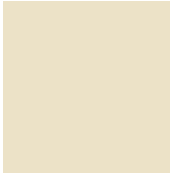
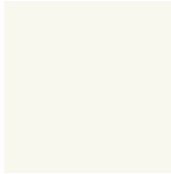
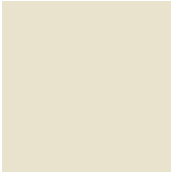
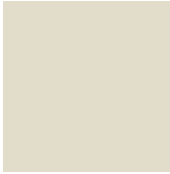
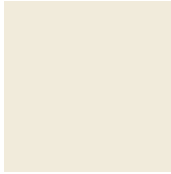
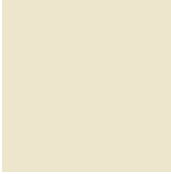
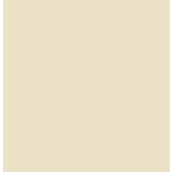
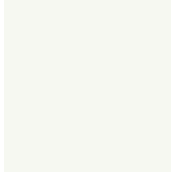
Polpa	Amêndoa	Endocarpo espinhoso
		

Padrões para extratos aquosos tratados por membranas.

Membranas	Concentrado	Alimentação	Permeado
UF			
NF 90			
NF 270			

* a transparência não foi considerada para formar esses padrões

Padrões para extratos alcoólicos tratados por membranas.

Membranas	Concentrado	Alimentação	Permeado
UF			
NF 90			
NF 270			

* a transparência não foi considerada para formar esses padrões