



## CONCENTRAÇÃO DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS ATRAVÉS DE MEMBRANAS POLIMÉRICAS

Beatriz Camargo Barros de Silveira Mello

Engenheira de Alimentos

Profa. Dra. Miriam Dupas Hubinger

Orientadora

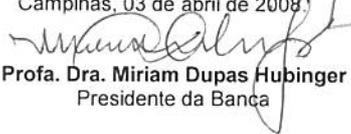
Prof. Dr. José Carlos Cunha Petrus

Co-Orientador

### PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação defendida por **Beatriz Camargo Barros Silveira Mello** aprovado pela Comissão Julgadora em 03 de abril de 2008.

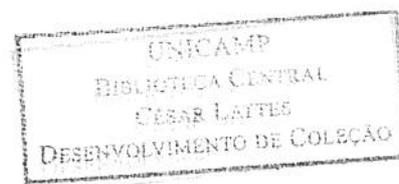
Campinas, 03 de abril de 2008

  
Profa. Dra. Miriam Dupas Hubinger  
Presidente da Banca

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, da Universidade estadual de Campinas, para a obtenção de título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

CAMPINAS – SÃO PAULO

2008



UNIDADE BC  
º CHAMADA: \_\_\_\_\_  
T/UNICAMP M489c  
EX. \_\_\_\_\_  
COMBO BCC 76475  
ROC 16-12-08  
D X  
REÇO 11.00  
DATA 22-4-08  
IB-ID 432915

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

M489c	<p>Mello, Beatriz Camargo Barros de Silveira Concentração de extrato de própolis através de membranas poliméricas / Beatriz Camargo Barros de Silveira . -- Campinas, SP: [s.n.], 2008.</p> <p>Orientador: Miriam Dupas Hubinger Co-orientador: José Carlos Cunha Petrus Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos</p> <p>1. Própolis. 2. Nanofiltração. 3. Membranas. 4. Flavonóides. I. Hubinger, Miriam Dupas. II. Petrus, José Carlos Cunha. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">(cars/fca)</p>
-------	--

Titulo em inglês: Concentration of propolis extracts through polymeric membranes  
Palavras-chave em inglês (Keywords): Propolis, Nanofiltration, Membranes, Flavonoids  
Titulação: Mestre em Engenharia de Alimentos  
Banca examinadora: Miriam Dupas Hubinger  
Celso Costa Lopes  
Luis Antonio Viotto  
Sílvia Silveira Clareto  
Programa de Pós Graduação: Programa em Engenharia de Alimentos

**BANCA EXAMINADORA**



---

Profa. Dra. Miriam Dupas Hubinger  
**(Orientadora – DEA/FEA/UNICAMP)**



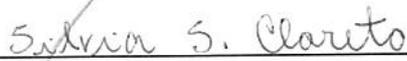
---

Prof. Dr. Celso Costa Lopes  
**(Membro – DEA/FEA/UNICAMP)**



---

Prof. Dr. Luis Antonio Viotto  
**(Membro – DEA/FEA/UNICAMP)**



---

Prof. Dra. Silvia Silveira Clareto  
**(Membro – Dep. Farmácia/UNIFAL-MG)**

200806935



## ERRATA

MELLO, Beatriz Camargo Barros de Silveira. **Concentração de extratos de própolis através de membranas poliméricas.** Dissertação de Mestrado - Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas: Universidade Estadual de Campinas. 110 p. 2008.

<i>Folha</i>	<i>Parágrafo</i>	<i>Linha</i>	<i>Onde se lê</i>	<i>Leia-se</i>
30	2	3	massa do permeado	volume do permeado
33	1	2	liquidificador convencional	liquidificador marca Walita, modelo RI1774 em função “quebrar gelo”
41	1	2	N2 pressurizado	ar comprimido
42	1	3	membrana de nanofiltração	membrana de nanofiltração, modelo HL 2514TF
48	1	8	30°C	25°C
57	1	5	... aponta que o extrato alcoólico, preparado...	... aponta que o extrato aquoso, preparado...



## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus  
pais, Maria Cecília e  
Waldomiro, sempre tão  
amorosos e dedicados, a quem  
devo tudo que sou.*





## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo amor, carinho, dedicação e apoio.

Aos meus irmãos, que junto com meus pais, formam minha família.

Ao Alan, meu namorado e amigo que sempre esteve presente me ajudando em todos os momentos.

À Profa. Dra. Miriam pela orientação e amizade.

À Profa. Dra. Florência pelo auxílio a obtenção do auxílio PROCAD, que viabilizou o trabalho em Florianópolis.

Ao Prof. Dr. Petrus pela co-orientação e hospitalidade em Santa Catarina.

Às novas amigas que fiz em Florianópolis, que me receberam de braços abertos.

Aos membros da banca pelas sugestões propostas para o enriquecimento do trabalho.

Aos colegas e técnicas do laboratório pela ajuda na resolução de problemas e pelos momentos de descontração.

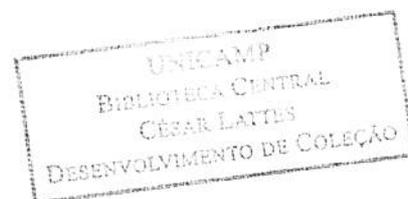
À Unicamp e à Faculdade de Engenharia de Alimentos pela contribuição na minha formação.

Ao Cnpq pelo auxílio financeiro para realização deste trabalho.



# Índice

Índice de Figuras.....	viii
Índice de Tabelas.....	ix
Resumo.....	x
Abstract.....	xi
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	4
2.1. Objetivo Geral.....	4
2.2. Objetivos Específicos.....	4
3. Revisão Bibliográfica.....	5
3.1. Própolis.....	5
3.1.1. Atividades Biológicas da Própolis.....	7
3.1.2. Composição Química.....	9
3.2. Avaliação da qualidade da própolis.....	15
3.3. Métodos de Extração.....	16
3.4. Tecnologia de Membranas.....	19
3.4.1. Fenômenos envolvidos no processo.....	24
3.4.2. Nanofiltração.....	26
3.4.3. Principais parâmetros de processo.....	29
4. Material e Métodos.....	32
4.1. Própolis.....	32
4.2. Preparo dos extratos .....	33
4.3. Caracterização físico-química dos extratos obtidos.....	35
4.3.1. Determinação da viscosidade e densidade das soluções.....	35
4.3.2. Determinação de flavonóides totais.....	36
4.3.3. Determinação de substâncias fenólicas totais.....	38
4.3.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	39
4.3.5. Determinação da influência do pH na composição dos extratos.....	39
4.4. Processo de Concentração.....	40
4.4.1. Ensaio Preliminares.....	40
4.4.2. Membrana.....	42
4.4.3. Etapas do Processamento .....	43
4.4.4. Cálculo do fluxo de permeado .....	44
4.4.5. Efeito da pressão sobre o fluxo de permeado.....	45
4.4.6. Efeito da temperatura no fluxo de permeado.....	45
4.4.7. Avaliação da histerese.....	46
4.5. Avaliação das soluções obtidas pós concentração.....	46
4.5.1. Determinação da viscosidade e densidade das soluções.....	47



4.5.2. Análise de flavonóides e compostos fenólicos.....	47
4.6. Análise dos resultados.....	47
5. Resultados e Discussão.....	48
5.1. Caracterização das soluções iniciais.....	48
5.1.1. Determinação da viscosidade das soluções.....	48
5.1.2. Influência do pH na extração de flavonóides.....	49
5.2. Ensaio preliminares.....	55
5.3. Parâmetros do Processo.....	58
5.3.1. Fluxo de permeado.....	58
5.3.2. Efeito da pressão no fluxo de permeado.....	61
5.3.3. Efeito da temperatura no fluxo de permeado.....	62
5.3.4. Efeito do tempo de processamento no teor de flavonóides e compostos fenólicos.....	64
5.3.5. Efeito da velocidade tangencial no fluxo de permeado.....	67
5.3.6. Histerese.....	68
5.4. Caracterização das soluções pós-concentração.....	70
5.4.1. Viscosidade e Densidade.....	70
5.4.2. Teor de flavonóides e compostos fenólicos.....	72
6. Conclusões.....	82
7. Sugestões para trabalhos futuros.....	84
8. Bibliografia.....	85

## Índice de Figuras

Figura 3.1- Estrutura básica de um fenol.....	10
Figura 3.2- Estrutura química de alguns flavonóides. ....	12
Figura 3.3- Alguns flavonóides presentes na própolis.....	12
Figura 3.4- Alguns compostos presentes na própolis.....	13
Figura 3.5- Processos com membranas, limites de separação e compostos retidos.....	21
Figura 3.6- Tamanho de partículas separadas por cada processo .....	22
Figura 3.7- Pressão de operação para cada processo .....	22
Figura 3.8- Esquema de formação de camada gel na membrana.....	25
Figura 3.9- Esquema de um processo de separação por membranas.....	29
Figura 4.1- Fluxograma de processamento e análise dos extratos de própolis.....	34
Figura 4.2- Viscosímetro Canon-Fenske.....	35
Figura 4.3- Formação do complexo flavonóide-alumínio.....	37
Figura 4.4- Esquema da unidade usada nos ensaios preliminares .....	41
Figura 4.5- Esquema de módulo de membrana na configuração espiral.....	43
Figura 4.6- Esquema de unidade de filtração tangencial.....	44
Figura 5.1- Cromatograma obtido por HPLC de extrato aquoso inicial de própolis.....	52
Figura 5.2- Cromatograma obtido por HPLC do extrato aquoso a pH 6,0.....	52
Figura 5.3- Cromatograma obtido por HPLC do extrato aquoso a pH 8,0.....	53
Figura 5.4- Fluxo de permeado em função do tempo de processamento para as diferentes soluções.....	59
Figura 5.5- Fluxo do permeado em função da pressão de processamento.....	61
Figura 5.6- Fluxo do permeado em função da temperatura de processamento.....	63
Figura 5.7- Fluxo do permeado em função da velocidade tangencial.....	67
Figura 5.8- Histerese na membrana com solução a 30°C.....	68
Figura 5.9- Histerese na membrana com solução a 40°C.....	69
Figura 5.10- Deformação versus cisalhamento para solução aquosa concentrada.....	72
Figura 5.11- Solução aquosa nas diferentes etapas do processamento.....	74
Figura 5.12- Cromatograma da solução aquosa inicial.....	75
Figura 5.13- Cromatograma da solução aquosa concentrada.....	75
Figura 5.14- Cromatograma do permeado da solução aquosa.....	76
Figura 5.15- Cromatograma da solução alcoólica inicial.....	78
Figura 5.16- Cromatograma da solução alcoólica concentrada .....	78
Figura 5.17- Cromatograma do permeado da solução alcoólica.....	79



## Índice de Tabelas

Tabela 3.1- Teores de polifenóis e flavonóides em própolis de diferentes países .....	11
Tabela 3.2- Massa molar de alguns compostos presentes na própolis.....	13
Tabela 4.1- Dados das membranas usadas nos ensaios preliminares.....	42
Tabela 5.1- Dados de densidade e viscosidade para soluções a diferentes concentrações..	49
Tabela 5.2- Variação na composição do extrato aquoso em diferentes pHs.....	50
Tabela 5.3- Variação na composição do extrato alcoólica em diferentes pHs.....	50
Tabela 5.4- Compostos identificados nos extratos aquosos de própolis e suas concentrações. .....	53
Tabela 5.5- Teores de flavonóides e compostos fenólicos no permeado.....	55
Tabela 5.6- Comparação entre os teores de flavonóides e compostos fenólicos para extratos de própolis comerciais e aqueles obtidos no presente trabalho.....	56
Tabela 5.7- Influência do tempo de processamento no teor de flavonóides e compostos fenólicos para solução aquosa.....	64
Tabela 5.8- Influência do tempo de processamento no teor de flavonóides e compostos fenólicos para solução alcoólica. ....	65
Tabela 5.9- Densidade e viscosidade das soluções obtidas por nanofiltração.....	70
Tabela 5.10- Comparação da viscosidade da solução aquosa.....	71
Tabela 5.11- Teor de flavonóides e fenólicos após concentração por membrana.....	73
Tabela 5.12- Concentração de alguns compostos identificados por HPLC nas soluções aquosas.....	76
Tabela 5.13- Concentração de alguns compostos identificados por HPLC nas soluções alcoólicas.....	79
Tabela 5.14- Índice de retenção dos compostos avaliados.....	80



## Resumo

A própolis é um produto natural rico em flavonóides e ácidos fenólicos, além de outros grupos químicos, incluindo minerais e vitaminas. Seu extrato é comercialmente encontrado em solução alcoólica que apresenta alguns inconvenientes, tanto para o consumo direto quanto para o uso na indústria de alimentos, como o alto sabor residual proveniente da extração feita com álcool. Uma forma de viabilizar o seu uso é a concentração do extrato, que além de ser necessária para o uso industrial, reduz a quantidade de solvente na solução. Em vista disso, este trabalho visa desenvolver uma nova técnica de concentração do extrato da própolis. A técnica utilizada é a de concentração por nanofiltração, e foi aplicada em dois tipos de extratos de própolis: o alcoólico e o aquoso. A concentração feita com cada um dos extratos teve por finalidade verificar qual dos solventes (água ou álcool) produz extrato concentrado com maior potencial de utilização pela indústria alimentícia. O estudo deste processo é de grande utilidade industrial, comercial e científica, uma vez que a própolis apresenta importantes características que podem agregar valor aos alimentos, como os efeitos anti-bacteriano, anti-oxidante, anti-fúngico e anti-cariogênico. Uma outra vantagem da técnica é a utilização de baixas temperaturas que leva a uma maior preservação dos componentes químicos em relação aos métodos tradicionais que fazem uso de altas temperaturas para a concentração. Foram testadas membranas de nanofiltração, ultrafiltração e osmose reversa em ensaios preliminares. Durante o processamento, foram avaliados o fluxo de permeado, bem como a retenção de compostos de interesse e a variação destes parâmetros ao se modificar a temperatura, pressão e velocidade tangencial durante a concentração através de membranas. Os resultados foram positivos, já que houve grande retenção de flavonóides sendo de aproximadamente 100% para a solução aquosa e 94% para a solução alcoólica. Análises por cromatografia líquida de alta eficiência comprovaram estes resultados. Desta forma, o bom fluxo permeado obtido, aliado às altas taxas de retenção e baixa colmatagem das membranas tornam o processo viável e promissor para uso industrial.

*Palavras-chave: Própolis, Concentração, Nanofiltração, Membranas, Flavonóides.*



## Abstract

Propolis is a natural product rich in flavonoids and phenolic acids, among others chemical groups, including minerals and vitamins (pro vitamin A and B complex vitamins). Most common form of propolis for commercial use can be find as a alcoholic extract, but this kind of extract has some problems, like the strong taste of alcohol, that practically forbids its use in the food industry. One method to avoid such restrictions is concentrating such extract, reducing the rate of solvent in solution. In this context, this project targets developing a new concentration technique for green extract of propolis produced by Brazilian's bees. The technique is named concentration by nanofiltration and was applied in two different extracts of propolis: alcoholic and aqueous.. The concentration resulting from each one of the extracts was studied to verify which solvent produced the concentration with higher potencial for use in food industry. The study and results of this process is extremely important in a commercial, industrial and scientific point of view, once that propolis has important characteristics which can add therapeutic properties in aliments, as antimicrobial, antioxidant, anti fungal and anti caries effects, aggregating value for all type of products. As another advantage of this study, the use of cold method allows higher retention of the chemical components in comparison of traditional methods that use elevated temperatures for the extraction. It was tested nanofiltration, ultrafiltration and reverse osmose membrane in preliminary studies. In the process, it had been analyzed the permeate's flux, retention of studied components and the variation in differents pressures and temperatures. The results were positives, once that was possible to observe a big retention of flavonoids, approximately 100% for aqueous solution and 94% for alcoholic one. Liquid chromatography of high efficiency was made to quantify and qualify retained phenolic components. Beside that, the high flux, linear variation with pressure and temperature and low fowling also demonstrate the viability of the process.

*Keywords: Propolis, Concentration, Nanofiltration, Membranes, Flavonoids.*



## **1. Introdução**

Com o aumento da preocupação com hábitos de vida e alimentares mais saudáveis, o consumo de alimentos com propriedades funcionais têm crescido consideravelmente. Neste contexto, os produtos apícolas vêm despertando um grande interesse, tanto nos consumidores quanto nos pesquisadores, graças à sua rica composição química. A própolis em especial, destaca-se quanto às suas propriedades terapêuticas (antimicrobiana, antiinflamatória, cicatrizante, anestésica, dentre outras) e quanto à possibilidade de aplicação em indústrias de alimentos.

Os compostos fenólicos correspondem a cerca de 50% dos constituintes da própolis (KRELL, 1996), variando de acordo com a região de coleta do produto, já que a própolis é derivada das plantas da região. Os seus efeitos terapêuticos têm sido atribuídos justamente aos diversos compostos fenólicos que estão presentes, principalmente os flavonóides (PARK et al., 1998).

O interesse no estudo da própolis é justificado de duas formas: primeiro devido às suas características de panacéia, que podem também atrapalhar o seu consumo, já que muitas pessoas tendem a desconfiar de um produto ao qual se atribuem tantas atividades biológicas simultaneamente; segundo, devido ao seu alto valor agregado (PEREIRA; SEIXAS; NETO, 2002). Um frasco do extrato alcoólico é vendido no Brasil por cerca 10 reais, mas pode chegar a custar 70 dólares em Tóquio. Os japoneses são os maiores consumidores e os maiores estudiosos do produto.

Não existem estatísticas confiáveis sobre a produção de própolis mundial, mas sabe-se que os maiores produtores mundiais são a China, Brasil, Estados Unidos, Austrália e Uruguai, e que o processamento mensal de própolis é de cerca de 200 toneladas. O maior

consumidor mundial é o Japão , seguido da Nova Zelândia, que consome cerca de nove milhões de doses diárias. No Brasil ela é consumida principalmente como suplemento alimentar ou como remédio, geralmente combinado com o mel na elaboração de xaropes (SEBRAE, 2006).

O uso do álcool como solvente extrator apresenta muitas desvantagens, como forte sabor e contra-indicações, assim, é grande o interesse no estudo de formas alternativas da extração da própolis. O extrato aquoso vêm sendo estudado como substituto da forma tradicional, mas apresenta a desvantagem de extrair menor quantidade de componentes que o extrato alcoólico. O processo de concentração do extrato aquoso poderia ser mais aceito, ser mais barato e promover seu uso como produto comercial alternativo.

Atualmente os principais usos da própolis estão na medicina e nas indústrias de cosméticos, e a principal forma de consumo é o extrato alcoólico. Dependendo da aplicação, o solvente utilizado deve ser reduzido ou eliminado, geralmente por liofilização, destilação a vácuo ou evaporação (KRELL, 1996). Estes processos de concentração apresentam alguns entraves, como uso de alta temperatura que pode degradar alguns flavonóides da própolis e alto consumo de energia. A validação de um processo de concentração alternativo que não apresente as mesmas desvantagens, seria de grande importância para a indústria alimentícia e farmacêutica. Assim, surge o interesse no estudo da tecnologia de membranas na concentração dos extratos alcoólico e aquoso da própolis.

O processo de concentração por membranas vem crescendo ao longo dos anos graças às vantagens de levar à uma purificação ou concentração de soluções utilizando baixas temperaturas, e possibilitando, inclusive, a reutilização de solventes (GEANKOPOLIS, 2003). A técnica começou a ser utilizada com a dessalinização da água do mar, e com o estudo de novos tipos de membranas, principalmente as membranas compostas, a capacidade de utilização desse processo vem crescendo de forma intensa para

muitas aplicações industriais. A eficiência dos processos com membranas é diretamente afetada pela ocorrência de *fouling* na membrana e por alguns fatores do processo, como velocidade tangencial, pressão, temperatura, turbulência, tamanho das partículas e características da membrana. No entanto, a técnica de concentração por membranas ainda não foi testada para solução de própolis, podendo revelar-se mais vantajosa que as outras técnicas utilizadas para a concentração do extrato.

## **2. Objetivos**

### ***2.1. Objetivo Geral***

Estudar a viabilidade do uso do processo de membranas poliméricas de ultrafiltração, nanofiltração e osmose inversa no processamento do extrato aquoso e alcoólico de própolis, de forma a obter um produto concentrado com menores perdas nutricionais e sensoriais em comparação com os processos tradicionais de concentração.

### ***2.2. Objetivos Específicos***

- Verificar a influência da variação de pH durante a extração da própolis no teor de flavonóides e compostos fenólicos obtidos em solução;
- Verificar a influência da viscosidade na viabilidade do processo de concentração por membranas dos extratos de própolis;
- Avaliar o processo de nanofiltração na concentração de extratos de própolis, levando-se em consideração o teor de flavonóides e compostos fenólicos nos permeados e nos retidos;
- Avaliar a influência da pressão, temperatura e velocidade tangencial em relação ao fluxo de permeado do processamento com membranas e em relação à retenção dos flavonóides e compostos fenólicos.

### 3. Revisão Bibliográfica

#### 3.1. Própolis

Entende-se por própolis o produto oriundo de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, colhidas pelas abelhas de brotos, flores e exsudados de plantas, que são transformadas dentro da colméia com a adição de cera, pólen e a enzima 13-glicosidase presente na saliva das abelhas. Neste processo, os flavonóides glicosilados são transformados em flavonóides agliconas, através de hidrólise (PARK et al., 1998). Sua composição é de aproximadamente 55% de resinas vegetais e bálsamos, 30% de cera de abelhas, 8 a 10% de óleos essenciais e 5% de pólen e outros compostos orgânicos. Como é um produto proveniente das plantas, sua composição depende dos tipos de plantas acessíveis às abelhas. A própolis pode mudar de cor, odor, faixa de fusão (60° - 70°C) e de composição, de acordo com a região e estação do ano (BRASIL, 2001; KRELL, 1996). Encontra-se no estado sólido, sendo dura a 15°C e maleável a partir dos 30°C (MARCUCCI, 1996; PRÓPOLIS, 2002).

A própolis é usada pelas abelhas dentro da colméia para preencher cavidades e frestas, reparar danos, como regulador térmico, mantendo a temperatura ideal para suas crias, para reduzir o tamanho da entrada, desinfetar a colméia e os alvéolos onde é feita a postura dos ovos e cobrir qualquer animal ou inseto morto que seja grande demais para ser carregado para fora, para evitar que sua putrefação contamine a colméia. Estes usos são importantes, pois aproveitam os efeitos anti-bacterianos e anti-fúngicos para proteger a colônia de doenças (KRELL, 1996; PRÓPOLIS, 2002).

Desde a antiguidade, a própolis já era utilizada como medicamento popular no tratamento de feridas e infecções. A história da medicina das civilizações chinesa, tibetana, egípcia e também a greco-romana contém, em seus escritos antigos, centenas de receitas onde entram principalmente mel, própolis, larvas de abelhas e às vezes as próprias abelhas, para curar ou prevenir enfermidades. A própolis era usada pelos egípcios como um dos materiais para embalsamar os mortos; os romanos a consideravam um medicamento capaz de reduzir inchaços e dores e os gregos a usavam como cicatrizante. Foram estes últimos que deram o nome ao produto: pro (em defesa de) e polis (cidade), ou seja, em defesa da cidade (ou da colméia) (PEREIRA; SEIXAS; NETO, 2002; MARCUCCI, 1996).

Apesar do uso ancestral da própolis, somente nas últimas décadas foram intensificados os estudos de suas propriedades, sendo que o número de publicações sobre o assunto teve um crescimento quase exponencial, com início nas décadas de 80 e 90, além do grande número de patentes registradas sobre o tema. Estas pesquisas foram intensificadas nos últimos 30 anos, assim, os artigos científicos sobre a própolis ainda são relativamente escassos. Além disso, muitos trabalhos foram publicados em países do Leste Europeu como Bulgária, Polônia, Romênia e antiga União Soviética, tornando-se de difícil acesso (KOO, 1996). A quantidade de patentes registradas sobre a própolis evidencia as regiões com maior interesse no produto. Até o final da década de 80, as patentes eram dominadas pela antiga URSS e seus países satélites, principalmente a Romênia. No final da década de 90, o Japão já era o país com maior número de patentes referentes ao assunto (98) e o Brasil possuía somente cerca de 3 patentes. No entanto, o país ocupa posição de destaque na produção e comercialização do produto e a produção científica sobre este tema vêm aumentando consideravelmente (PEREIRA; SEIXAS; NETO, 2002).

### 3.1.1. Atividades Biológicas da Própolis

Vários ensaios biológicos destacam as propriedades da própolis como anti-inflamatória, bactericida, fungicida, antioxidante, hepatoprotetora, cicatrizante, antiúlcera, anti-cárie e anestésica, além de sua toxicidade contra células cancerígenas. O uso da própolis pode aumentar a resistência natural a infecções e diminuir a pressão arterial e nível de colesterol (BURDOCK, 1998).

Além de suas propriedades terapêuticas, existe grande interesse na aplicação da própolis nas indústrias farmacêutica e alimentícia na forma de alimentos funcionais. Além do interesse crescente em alimentos funcionais com origem natural, a própolis ainda atua como preservativo do alimento, graças as suas atividades anti-microbianas e anti-oxidante (GÓMEZ-CARAVACA et al., 2006). Atualmente existem diversos produtos contendo própolis comercializados em todo mundo, tais como balas, chocolates, doces, xampus, cremes para pele, soluções anti-sépticas, pastas de dente, etc, principalmente no Japão, que é o maior consumidor de própolis do mundo e onde os estudos da própolis são mais intensos (PEREIRA; SEIXAS; NETO, 2002; PARK et al., 1998).

Muitas pesquisas foram feitas para se testar a atividade antimicrobiana da própolis e verificou-se que as bactérias mais sensíveis a própolis foram as dos grupos gram positivos e ácido tolerante. Além disso, o extrato de própolis pode potencializar o efeito de alguns antibióticos, como por exemplo a combinação com a furangina contra *Escherichia coli* (KOO, 1996).

Bonvehí et al. (1993 apud MOURA, 2000) estudaram os diversos compostos da própolis isoladamente para tentar verificar quais compostos apresentariam atividade bacteriostática, mas concluíram que o seu potencial biológico é potencializado devido ao sinergismo que ocorre entre os seus componentes, como os flavonóides e os compostos

fenólicos. Ao estudar a própolis proveniente de várias regiões do Brasil, Silva et al. (2006) concluíram que a presença de flavonóides é um fator importante para a existência de atividade antimicrobiana, mas essa relação sofre interferência de outros compostos fenólicos no extrato.

Vários estudos foram realizados para se verificar as propriedades anti-oxidantes da própolis de várias regiões. Kumazawa; Hamasak; Nakayama (2004) compararam as atividades de própolis de vários países e verificaram a presença de baixa atividade na própolis brasileira. Contudo, ressaltam que já foram isolados na própolis brasileira muitos compostos com atividade anti-oxidante. Há uma grande variação na composição em função da região de produção, dessa forma, a própolis brasileira foi classificada em 12 grupos diferentes de acordo com a região de coleta. A maioria dos grupos correspondem a amostras de própolis das regiões sul e sudeste do país, sugerindo uma maior diversidade de própolis nestas regiões, como um reflexo da diversidade da vegetação. Além disso, foi observada grande variação da composição química da própolis entre os grupos, resultando em variação nas suas atividades biológicas. A amostra proveniente do estado de São Paulo (própolis do grupo 12) apresentou grande quantidade de substâncias solúveis, atividade anti-microbiana para *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans* e atividade anti-inflamatória elevada em relação às amostras de outras regiões, associada às altas concentrações de flavonóides e compostos fenólicos encontrados (PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002; MORAES, 2007).

Park et al. (1998) estudaram as atividades anti-microbiana e anti-oxidante para extratos de própolis preparados com diferentes proporções de solvente e constataram que essas atividades foram maiores para extratos feitos com etanol a 70 ou 80% do que extratos preparados com concentrações menores de etanol em água ou do que o extrato aquoso.

A própolis preparada utilizando como solvente tanto o etanol quanto o

propilenoglicol apresentou boa atividade antifúngica mesmo em grandes diluições, provocando a inibição das leveduras estudadas proporcionalmente à concentração de própolis utilizada nos testes inibitórios (LONGHINI et al., 2007).

Além dessas propriedades, a própolis em solução aquosa mostrou-se bastante eficaz na redução de tamanho do tumor provocado em ratos, além de diminuir também o número total de células infectadas (ORSOLIC; BASIC, 2005). Testes feitos com Artepelin C, importante composto fenólico isolado da própolis, mostraram-se eficazes na prevenção de tumores por prevenir danos oxidativos provocados pelo tumor, fazendo da própolis um importante alimento funcional com atividades anti-carcinogênicas (KIMOTO et al., 2000).

### **3.1.2. Composição Química**

A composição química da própolis é muito variada e complexa, não podendo ser definida de uma maneira geral, já que está relacionada com a vegetação de cada região de coleta das abelhas. Mais de 200 compostos químicos já foram identificados na própolis, sendo em sua maioria compostos fenólicos. Como principais compostos ativos podem-se citar flavonóides, ácidos aromáticos, terpenóides, aldeídos, álcoois, ácidos alifáticos e ésteres, aminoácidos, esteróides, açúcares, etc. (ADELMANN, 2005). A família de compostos fenólicos abrange várias substâncias orgânicas que são compostas por um anel aromático e pelo menos um grupo hidroxila, ligado diretamente ao núcleo (GARDZIELLA; PILATO; KNOP, 2000) como pode ser visto na Figura 3.1:

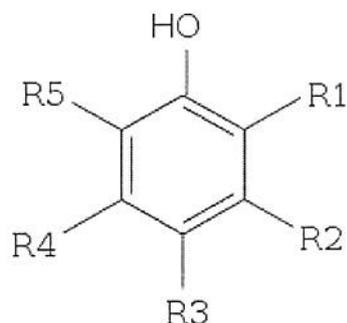


Figura 3.1- Estrutura básica de um fenol

Os principais grupos de compostos fenólicos encontrados na própolis são os flavonóides agliconas, os ácidos fenólicos e os ésteres fenólicos (KOO, 1996 apud BANKOVA et al., 1992). Os constituintes solúveis da própolis, utilizando-se solventes orgânicos, dividem-se em materiais cerosos (em média 30%), bálsamos, óleos essenciais e derivados fenólicos (em média 60%) (MARCUCCI, 1996).

As principais substâncias químicas encontradas na própolis européia são o ácido benzóico e seus ésteres, os ácidos e ésteres fenólicos substituídos, flavonóides, carboidratos, ácidos graxos, terpenos, além de outros. Já a própolis brasileira tem uma composição química bastante distinta da européia e das do restante do mundo. Ela possui ácidos fenólicos prenilados, ligninas, terpenos e álcoois terpênicos e pequenas quantidades de flavonóides em relação ao produto de outros países. A sua ação farmacológica deve-se, em grande parte, à presença dos ácidos fenólicos e derivados (MARCUCCI; WOISKY; SALATINO, 1998). Na Tabela 3.1, encontram-se listados o teor de polifenóis e de flavonóides de amostras de própolis analisadas de alguns países, demonstrando a grande variabilidade do produto.

Tabela 3.1- Teores de polifenóis e flavonóides em própolis de diferentes países

(Adaptado de Kumazawa, 2004)

Pais	Teor polifenóis <sup>a</sup> (mg/g)	Teor flavonóides <sup>b</sup> (mg/g)
Argentina	212,0 ± 9,2	130,0 ± 5,5
Brasil	120 ± 5,6	51,9 ± 2,4
Austrália	269,0 ± 16,3	145,0 ± 6,5
China	298,0 ± 8,7	147,0 ± 9,3
Nova Zelândia	237,0 ± 6,0	152,0 ± 12,6
África do Sul	99,5 ± 4,4	50,8 ± 0,8

<sup>a</sup> equivalentes de quercetina<sup>b</sup> equivalentes de ácido gálico

Os flavonóides são quimicamente classificados de acordo com a presença ou não de um anel central, de uma dupla ligação no anel e de um grupo hidroxila a ele ligado. O termo “flavonóide” é geralmente usado para descrever vários compostos naturais constituídos por 15 carbonos dispostos numa configuração C6-C3-C6, formando 2 anéis aromáticos unidos por uma unidade de 3 carbonos que pode ou não formar um terceiro anel.

Diferem entre si pelo grau de saturação do anel heteroatômico, pela posição (C2 ou C3) do anel aromático B e pelos diferentes graus de hidroxilação. Essas variações estão indicadas na Figura 3.2, onde as setas cheias indicam carbonos de mais fácil hidroxilação e setas duplas indicam presença mais frequente de outros radicais (MARAIS et al., 2006). Na natureza, são encontrados basicamente em duas formas: glicosídicas, quando um ou mais grupos hidroxila estão ligados a um açúcar, e agliconas. Na própolis normalmente encontram-se flavonóides agliconas, devido a ação da  $\beta$ -glucosidase, secretada pelas abelhas, que hidrolisa a parte glicosídica dos flavonóides (KOO, 1996 apud BONVEHI et al., 1993).

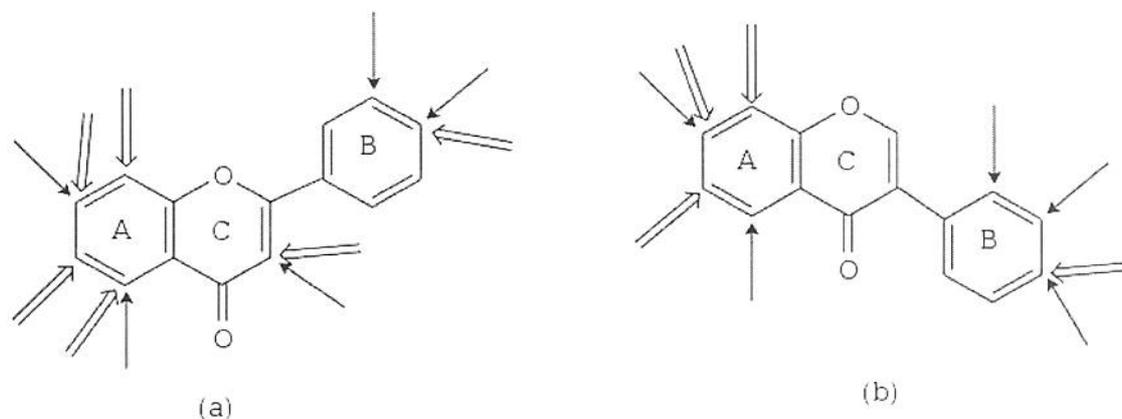


Figura 3.2- Estrutura química de alguns flavonóides.

(a) Flavonas e Flavonóis. (b) Isoflavonas. (adaptado de Stobiecki et al., 2006)

Alguns flavonóides comumente encontrados em própolis são o campferol, a quercetina, a isoramnetina e a galangina que pertencem à classe dos flavonóis; a apigenina, a luteolina, a crisina e a tectocrisina são exemplos de flavonas; a pinocembrina é uma flavanona e a pinobancsina é um diidroflavonol (MARCUCCI; WOISKY; SALATINO, 1998). Alguns destes compostos estão ilustrados na Figura 3.3:

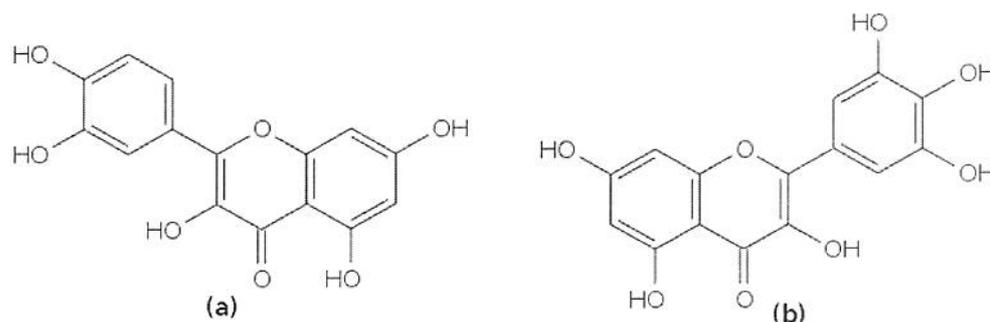


Figura 3.3- Alguns flavonóides presentes na própolis.

(a) quercetina, (b) miricetina

Outro grupo de compostos largamente encontrados na própolis são os ácidos fenólicos, que apresentam um grupo carboxílico ligado a um anel benzênico e possuem um



De acordo com Longhini et al. (2007), as substâncias presentes na própolis possuem caráter ácido, considerando-se que elas provocam uma diminuição no pH dos solventes usados na extração, como comprovado em testes realizados com etanol e com propilenoglicol. Entretanto, não há estudos que relacionam o aumento da extração de compostos fenólicos e flavonóides em diferentes pHs do meio de extração.

Atualmente, a própolis é usada, principalmente, pelas indústrias de cosméticos e farmacêutica. Apesar de o Brasil responder por cerca de 15% da produção mundial, sendo que aproximadamente 75% da própolis produzida é exportada, em sua maioria para o Japão. Segundo dados de 2002, a produção anual de própolis no Brasil era de cerca de 150 toneladas por ano, incluindo o país entre os oito maiores produtores. A produção mundial é de cerca de 10 mil toneladas anuais. No entanto, a própolis brasileira é considerada uma das melhores do mundo devido às suas características sensoriais e ao menor teor de metais pesados e demais poluentes ambientais (Produção de mel, 2002; Portal da Cidadania, 2002; ADELMANN, 2005). Dados da Federação de Apicultores de Minas Gerais revelam que a própolis produzida no Estado é considerada a melhor do mundo pelo mercado japonês (PEREIRA; SEIXAS; NETO, 2002). Devido à alta informalidade e segregação do setor apícola nacional, é difícil a obtenção de dados estatísticos mais recentes e precisos relacionados a produção de própolis no território nacional. Além disso, as principais análises feitas no setor têm como foco o mel produzido pelas abelhas que ainda é o principal produto do setor.

Em 2005, segundo dados da SECEX (Secretaria de comércio exterior), o valor das exportações foi da ordem de US\$ 3,52 milhões, sendo que do total comercializado, 63,4% foi destinado ao Japão e 36,1% à China. A liderança na exportação foi do estado de São Paulo (US\$ 2,4 milhões), seguido de Minas Gerais (US\$ 886,3 mil). O preço médio foi

de US\$ 95,34/kg, próximo dos US\$ 94,10/kg praticado em igual período de 2005.

### **3.2. Avaliação da qualidade da própolis**

Segundo Instrução normativa nº3 publicada no diário oficial da república (BRASIL, 2001) a própolis é classificada quanto ao seu teor de flavonóides: baixo teor (até 1,0% m/m), médio teor (entre 1 e 2,0%) e alto teor (acima de 2,0%). Deve possuir aroma característico (balsâmico e resinoso); cor variando entre amarelada, parda, esverdeada, marrom e outras; sabor característico variando de suave balsâmico a forte e picante; e sua consistência à temperatura ambiente deve estar entre maleável a rígida. As variações em suas características se devem à dependência da origem botânica. Deve apresentar granulometria heterogênea e os seguintes requisitos físico-químicos:

- Perda por dessecação: máximo de 8% (m/m);
- Cinzas: máximo de 5% (m/m);
- Cera: máximo de 25% (m/m);
- Compostos fenólicos: mínimo de 5% (m/m);
- Flavonóides: mínimo de 0,5% (m/m);
- Atividade de oxidação: máximo de 22 segundos;
- Massa mecânica: máximo de 40% (m/m);
- Solúveis em etanol: mínimo de 35% (m/m).

No teste de espectro de absorção de radiações ultravioleta e visível, a própolis deverá apresentar picos característicos das principais classes de flavonóides entre 200 e 400 nm.

Como a própolis é um produto de origem vegetal, a variação da sua composição de acordo com fatores ambientais pode ser considerado um empecilho à sua utilização. Dessa forma, têm sido estudadas formas práticas e rápidas de análise da própolis em laboratório para fins de controle de qualidade. Uma das técnicas utilizadas é a determinação de flavonóides totais por espectrofotometria através do uso do cloreto de alumínio. Esse método é preciso, mas apresenta desvios em relação ao teor real de flavonóides. Os valores medidos por este método e o valor real são mais próximos quanto maior a concentração de flavonóides na amostra. No entanto, essa limitação não invalida o método para fins de controle de qualidade (MARCUCCI; WOISKY; SALATINO, 1998). Amostras de própolis coletadas no estado de São Paulo foram analisadas por este método e foi encontrado teor de flavonóides na faixa de 2,5% (WOISKY, 1996).

O grande potencial de uso da própolis faz aumentar o interesse em controle de qualidade e padronização das preparações. Para as análises, geralmente são usadas as técnicas de cromatografia gasosa, espectrofotometria de massa e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) que são métodos analíticos complexos, dependem de padrões e caros (BRUSCHI; FRANCO; GREMIÃO, 2003).

### ***3.3. Métodos de Extração***

A própolis bruta contém substâncias solúveis em óleo, em água e também aquelas solúveis em óleo e água, mas a maioria dos componentes da própolis são substâncias solúveis em óleo, por isso, o método de extração de própolis mais utilizado é o que utiliza o álcool etílico hidratado como solvente, já que a própolis apresenta baixa solubilidade em água (JUN, 2006). No entanto, esse extrato possui várias desvantagens como o alto sabor residual, pode causar reações adversas e contra indicações, como

também a restrição do comércio deste produto em alguns países (KONISHI et al., 2004). Além da extração convencional com álcool etílico, outro método que tem sido considerado promissor na extração de flavonóides da própolis é o que usa alta pressão hidrostática a frio (100 a 800 Mpa), que além de usar baixas temperaturas ainda proporciona maior extração em menor tempo (XI; SHOUQIN, 2007).

Apesar da baixa solubilidade, diversos estudos têm sido feitos na tentativa de viabilizar o uso da água como extrator da própolis. Entretanto, a própolis em solução aquosa apresenta menor quantidade de flavonóides, sendo que essa concentração aumenta conforme o aumento do teor alcoólico até o nível de 80% de álcool no solvente; não apresenta atividade anti-microbiana; possui baixa atividade anti-oxidante (ligada ao teor de flavonóides) e não apresenta atividade inibitória da enzima hialuronidase, que está relacionada com o processo inflamatório em tecido animais (PARK et al., 1998).

Assim, é grande o interesse dos pesquisadores em produzir um extrato de própolis com as mesmas qualidades do extrato alcoólico, mas sem as desvantagens do mesmo. Uma opção que tem sido usada é a adição de tensoativo ou substância com uma extremidade polar e a outra formada por uma cadeia parafínica longa, diminuindo a tensão interfacial entre as substâncias presentes na própolis e o meio, ajudando a solubilizá-las (KONISHI et al., 2004). Panciera et al. (2004) fizeram um estudo do uso de goma xantana, goma guar e de lecitina de soja como emulsificantes da própolis em solução aquosa, obtendo uma melhora significativa na extração aquosa de flavonóides e compostos fenólicos, quando se utilizou a lecitina de soja na concentração de 5 mg/mL. No entanto, acredita-se que seja possível uma extração melhor com o uso desse emulsificante após testá-lo com outras concentrações e diferentes pHs.

Konishi et al. (2004) estudaram o uso de água e tensoativos como forma de substituir a maior parte do álcool utilizado como extrator. Estes autores utilizaram

polissorbato, laurilsulfato de sódio, propilenoglicol, polietilenoglicol e água deionizada em diferentes combinações como substitutos do álcool na extração. Todas as amostras testadas foram eficientes na extração dos princípios ativos presentes na própolis e na atividade antimicrobiana, testada pela inibição de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*.

Outro método usado, mas em menor escala, é o de extração com gás carbônico liqüefeito. Como o gás carbônico liqüefeito apresenta a propriedade de dissolver bem as substâncias oleosas, a solução obtida irá apresentar maior quantidade desses componentes oleosos em comparação com a própolis convencional, mas sem o cheiro forte característico, uma vez que o processo não utiliza o álcool, eliminando assim um dos problemas da própolis de solução alcoólica (SUZUKI, 2000). Outra forma de extração que vem sendo estudada utiliza altas pressões hidrostáticas combinada com a extração etanólica que propicia um tempo de extração muito menor, em comparação à extração em condições ambiente (um minuto em relação à sete dias no processo convencional) e produz um extrato com níveis equivalentes de flavonóides, compostos fenólicos e atividade antioxidante (XI; SHOUQIN,2007). Além destes métodos ainda existe o método de extração com propilenoglicol, que só difere da extração alcoólica em relação ao solvente utilizado (KRELL, 1996).

Para diminuir o tempo de extração, alguns fabricantes e pesquisadores fazem a extração a quente. Porém, algumas classes de flavonóides, principalmente os acilados, são sensíveis à temperatura e podem sofrer degradação durante o processo (STOBIECKI; KACHLICKI, 2006). Esse fator também deve ser levado em consideração ao se fazer a escolha pelo melhor método de concentração do extrato.

### **3.4. Tecnologia de Membranas**

Os processos de separação por membranas representam um novo tipo de operação unitária, substituindo alguns processos mais convencionais de separação, como a evaporação e a destilação. Membranas podem complementar ou ser uma alternativa para vários processos químicos como destilação, extração, adsorção, entre outros. Algumas vantagens da filtração com membranas são: baixo consumo de energia, separação contínua, simplicidade de aumento de escala e a tecnologia pode ser usada praticamente para todo tipo de separação ( DZIEZAK, 1990; BITTER, 1991; RIJN, 2005).

Em sistemas convencionais de filtração, o fluido esco perpendicularmente ao elemento filtrante, aumentando o tempo de processo e depósito de solutos sobre a superfície da membrana, sendo necessária limpeza mais freqüente e manutenção. Em sistemas tangenciais, o escoamento é paralelo à membrana, possibilitando o arraste dos solutos acumulados sobre a membrana. Neste sistema, a corrente de entrada é separada em duas correntes de saída chamadas de correntes de permeado e corrente de retentado que representam, respectivamente, a parte da solução que atravessa a membrana e a parte da solução concentrada com os solutos, que não permeia a membrana. A formação das duas correntes ocorre sem mudança de fase (RAUTENBACH; ALBRECHT,1989; RIJN, 2005).

A separação por membranas pode ocorrer de duas formas: diferença na interação dos compostos em solução com o material que compõe a membrana, caracterizando um mecanismo de sorção-difusão ou devido à diferença de tamanho entre as partículas. No caso do mecanismo de sorção, as membranas são consideradas densas e no caso da diferença de tamanho das partículas, as membranas são consideradas porosas, e o transporte do permeado ocorre através dos poros, caracterizando um transporte convectivo (OLIVEIRA, 2007).

Esse processo é baseado no princípio da permeação seletiva de moléculas de soluto em membranas semi-permeáveis poliméricas ou inorgânicas. Dessa forma, a membrana permite a passagem de certos componentes e retem outros presentes na solução. A diferença de seletividade de cada membrana está relacionada com o tamanho das partículas da solução, ao tamanho do poro da membrana e às suas interações, como a difusividade do soluto e cargas elétricas. A força motriz para a transferência de massa através da membrana é a pressão mecânica (MAROULIS; SARAVACOS, 2003).

Apesar do uso de membranas ter começado a ser utilizado no meio científico desde o século dezoito para comprovação de teorias físicas e químicas, foi apenas em meados de 1960 que alguns elementos da tecnologia de membrana foram relatados. Mesmo assim, por ser um processo inseguro, muito lento, pouco seletivo e muito caro, era utilizado apenas em pequenos laboratórios e aplicações industriais especializadas. O descobrimento de novas membranas com o passar dos anos fez com que esse processo tivesse validade e viabilidade tanto em aplicações laboratoriais como industriais (BAKER, 2004).

A escolha dentre os vários métodos de separação por membranas é arbitrária e depende muitas vezes do uso e convenção do processamento. Pode-se distinguir os vários métodos – microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração e osmose reversa - pela pressão hidráulica necessária para que ocorra o processo de transporte. Entretanto, a natureza da membrana também controla os componentes da solução que serão permeados e quais serão retidos, conforme ilustrado na Figura 3.5. Idealmente, a osmose reversa retém todos os componentes, permeando apenas o solvente, enquanto a ultrafiltração retém apenas macromoléculas ou partículas maiores que  $0,01 \mu\text{m}$ . Dessa forma, a osmose reversa é caracterizada como um processo de recuperação de solvente enquanto a ultrafiltração é considerada um método de purificação, concentração e fracionamento de macromoléculas ou suspensões coloidais. A microfiltração é normalmente usada para clarificação e

separação de partículas suspensas. Nanofiltração é um processo compreendido entre a osmose reversa e a ultrafiltração em que ocorre a permeação apenas do solvente e de pequenos íons monovalentes (MANNAPPERUMA, 1997, CHERYAN, 1998, RIJN, 2005).

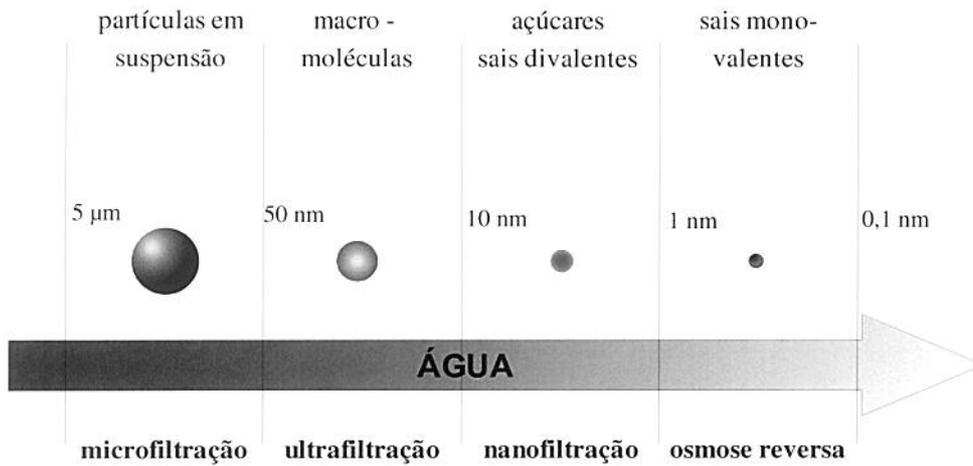


Figura 3.5- Processos com membranas, limites de separação e compostos retidos

Adaptado de Petrus (1997), Cheryan (1998) e Rijn (2005)

O tamanho médio do poro da membrana é dado na literatura e pelos fabricantes através da massa molecular de corte, representando a massa molar do menor componente retido (CHERYAN, 1998).

Em resumo, esses processos podem ser classificados de acordo com a pressão utilizada no processo ou com o tamanho da molécula ou partícula a ser separada da solução ou suspensão, variando assim o tamanho do poro da membrana. As Figuras 3.6 e 3.7 indicam as faixas de trabalho para cada processo (MAROULIS; SARAVACOS, 2003).

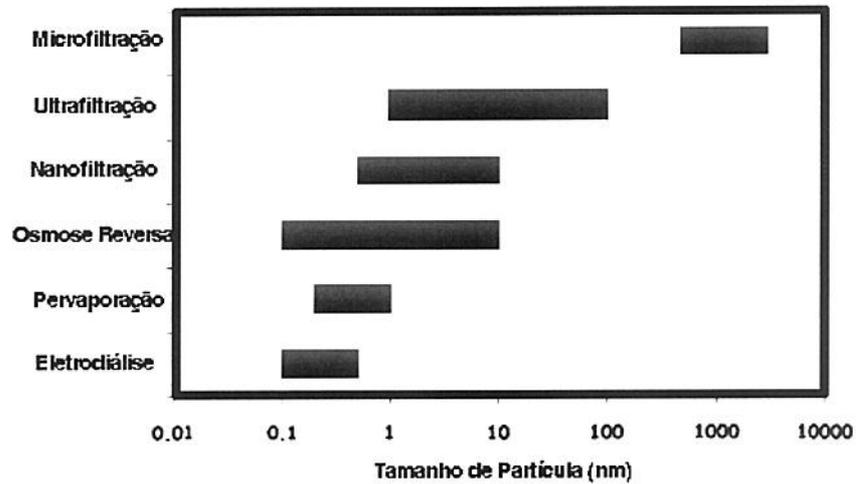


Figura 3.6- Tamanho de partículas separadas por cada processo  
(Adaptado de MAROULIS; SARAVACOS., 2003)

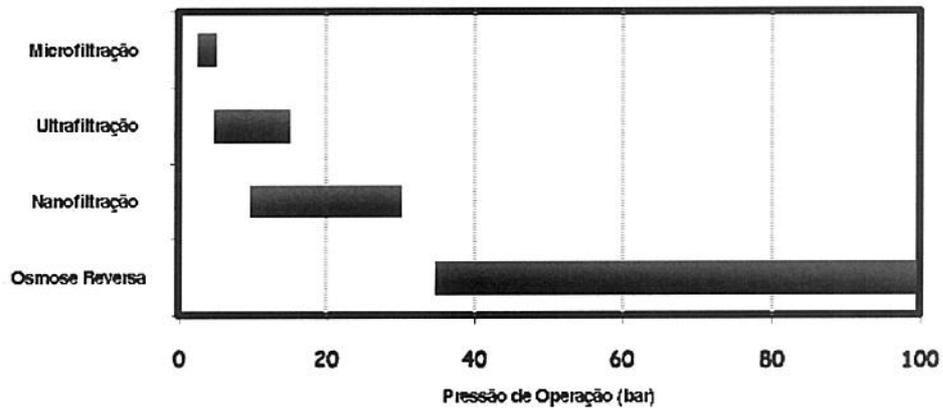


Figura 3.7- Pressão de operação para cada processo  
(Adaptado de MAROULIS; SARAVACOS, 2003)

Normalmente as membranas são confeccionadas a partir de diferentes materiais como polímeros, materiais inorgânicos, compostos de metais e cerâmicas. Além disso, elas

podem ser divididas em gerações, de acordo com a sua evolução. As membranas de primeira geração são as mais utilizadas em osmose reversa para dessalinização da água do mar e são preparadas a partir de acetato de celulose e são mais sensíveis ao pH, temperatura e agentes químicos de limpeza, além de apresentar sensibilidade a alguns microorganismos (biodegradabilidade). As de segunda geração são compostas por polímeros sintéticos e são mais resistentes à ação de ácidos e bases fortes, e também a temperaturas mais altas, até 100°C. A desvantagem desse tipo de membrana é a baixa resistência a desinfetantes à base de cloro e à compactação mecânica. As membranas de terceira geração são constituídas de materiais cerâmicos; são termicamente estáveis (até 400°C), tolerância a toda a faixa de pHs, são mais resistentes ao desgaste físico. Em todas as gerações, pode ocorrer o entumescimento da membrana provocado pela água absorvida, problema em muitos materiais constituintes de membranas, já que a água provoca um aumento no tamanho do poro, provocando menor retenção e mudança na seletividade. (PETRUS, 1997, CHERYAN, 1998, RIJN, 2005).

Os dois principais tipos de membranas são as isotrópicas, que possuem material estrutural homogêneo, tendo poros e material uniformes em toda a membrana e as anisotrópicas, que não são homogêneas. Na tecnologia de nanofiltração são usadas as membranas anisotrópicas. Os principais exemplos de membranas anisotrópicas são as membranas assimétricas (usualmente de acetato de celulose) e as membranas compostas (usualmente de poliamida) (SILVA, 1995).

As membranas podem ser classificadas em homogêneas e heterogêneas de acordo com a estrutura dos poros paralela e perpendicularmente à superfície da membrana ou em simétricas e assimétricas, de acordo com a simetria presente perpendicularmente à superfície da membrana. Além dessas classificações, a configuração do módulo, que dá suporte e condiciona a membrana, representa mais uma variável importante. As formas

mais comuns de módulos são: tubular, pratos (plate-and-frame), espiral, e capilares (OSADA; NAKAGAWA, 1992). Cada um dos tipos de módulos apresenta vantagens e desvantagens, que devem ser analisados de acordo com o tipo de processamento e material processado.

A limpeza e sanitização da membrana garantem as condições higiênico-sanitárias do processo e também servem para impedir o crescimento microbiano e restabelecer o seu fluxo inicial, otimizando o processo. A frequência da limpeza depende do processo e deve ser feita de forma a restituir o fluxo inicial. No entanto, a recomendação é que seja feita no mínimo a cada final de processo. (CHERYAN, 1998).

### **3.4.1. Fenômenos envolvidos no processo**

Nos processos de separação por membranas, normalmente ocorre um declínio do fluxo de permeado com o tempo. Esse declínio geralmente é resultado de alguns fenômenos decorrentes do processo, como a polarização da concentração, formação de camada de gel e entupimento dos poros (MIRANDA, 2005).

A polarização por concentração é um fenômeno reversível resultado do acúmulo de solutos na superfície da membrana, aumentando sua concentração de acordo com o tempo de processo. O fenômeno, ilustrado na Figura 3.8, pode ser definido pelo gradiente de concentração formado entre a região próxima a membrana, com alta concentração de solutos e a região por onde passa a solução de alimentação. Esse gradiente formado é compensado por uma difusão desses solutos no sentido contrário ao do solvente, formando a zona de polarização provocando diminuição no fluxo. A retenção de solutos pode ser tão alta que é formada uma camada de gel na membrana, principalmente em soluções que envolvem proteínas. A camada de gel é caracterizada quando não há mais

variação na concentração de partículas junto à membrana. O fenômeno é reversível pois ao se reduzir o fluxo a zero, o gradiente de concentrações deixa de existir (SCHÄFER; FANE; WAITE, 2006).

A polarização é mais acentuada nos processos de ultrafiltração e microfiltração, devido aos altos fluxos e baixos coeficientes de transferência de massa. Esse efeito não pode ser evitado, mas a redução de fluxo pode ser minimizada ao se controlar as condições operacionais, como baixa pressão e alta turbulência na superfície da membrana (PETRUS, 1997; RODRIGUES, 2002; MIRANDA, 2005; SCHÄFER; FANE; WAITE, 2006).

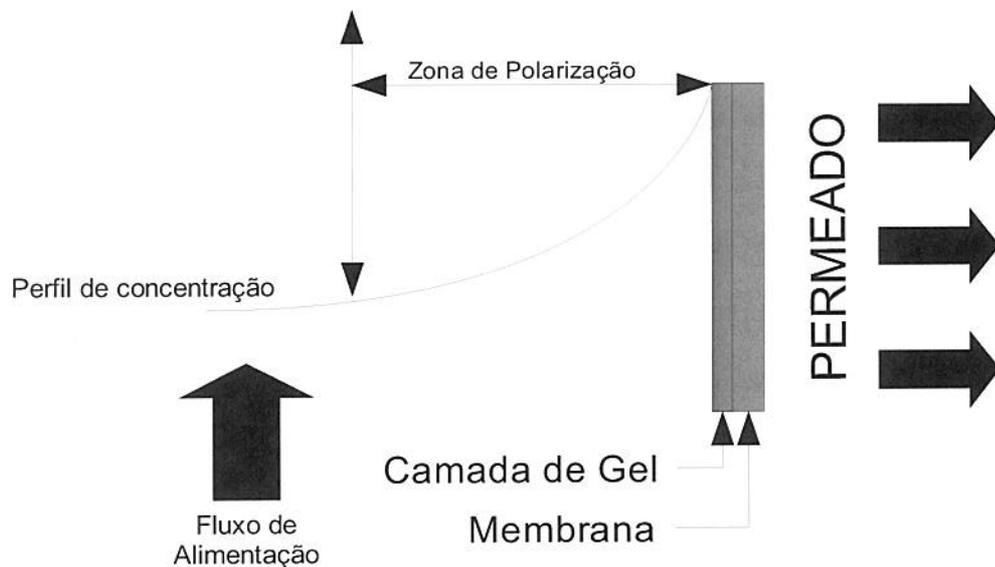


Figura 3.8- Esquema de formação de camada gel na membrana  
(Adaptado de Petrus, 1997; Cheryan, 1998)

O entupimento dos poros, ou *fouling*, ocorre pela penetração de solutos nos poros da membrana. Esse fenômeno relaciona-se à polarização por concentração, apesar de serem fenômenos diferentes, já que o *fouling* é resultado de um acúmulo de solutos na membrana de forma irreversível, ou seja, não é removido ao se zerar o fluxo (SCHÄFER; FANE; WAITE, 2006). A intensidade do *fouling* depende do tipo de membrana,

concentração e solutos presentes na solução, temperatura, pH e tempo de operação. A colmatagem só pode ser eliminada nas operações de limpeza, com substâncias detergentes, soluções alcalinas ou ácidas e agentes oxidantes (PETRUS, 1997; RODRIGUES, 2002).

### **3.4.2. Nanofiltração**

A nanofiltração é uma operação unitária de separação por membrana que permite uma grande variedade de usos: recuperação dos solventes da filtragem de óleos; separação e reuso de catalisadores na indústria farmacêutica; troca de solventes na indústria química (GEENS et al., 2006), concentração e purificação de extrato etanólico de xantofila, que apresenta grande importância para a indústria farmacêutica e alimentícia (TSUI; CHERYAN., 2007) e concentração de vinhos (BANVOLGYI et al., 2006) e sucos (VINCZE; STEFANOVITS-BÁNYAIB; VATAI, 2006) na indústria de alimentos. Algumas aplicações típicas de nanofiltração são a remoção de sais polivalentes de soluções e a separação de ácidos de soluções de açúcares, resultando em produtos mais puros e com maiores concentrações (RIJN, 2005).

A força motriz que provoca o escoamento através da membrana é a diferença de pressão efetiva entre o lado da retenção e o lado do permeado. A pressão efetiva é a diferença entre a pressão hidrostática ( $P$ ) e a pressão osmótica ( $\Pi$ ).

A osmose é um processo no qual um solvente é transportado através de uma membrana, como resultado de uma diferença na concentração trans-membrana. Se o sistema não sofrer influência externa como uma remoção do excesso de solvente, então a diferença de pressão hidrostática será estabilizada até o ponto em que o transporte de solução seja zero. Esta condição é conhecida como equilíbrio osmótico e a correspondente diferença de pressão é chamada de pressão osmótica. O equilíbrio osmótico é um equilíbrio

hidrodinâmico: o solvente continua passando através da membrana, mas o fluxo é o mesmo em ambas as direções (RAUTENBACH; ALBRECHT, 1989).

Se for aplicada uma diferença de pressão trans-membrana maior que a correspondente ao equilíbrio osmótico, o fluxo de solvente é revertido, ou seja, a solução com maior concentração será ainda mais concentrada. (RAUTENBACH; ALBRECHT, 1989).

A taxa de solução que passa através da membrana depende das propriedades da membrana, da temperatura da solução, da diferença entre a pressão aplicada e a pressão osmótica das solução concentrada e diluída. A pressão osmótica é proporcional à concentração da solutos e depende das espécies iônicas presentes (AMJAD, 1993, RAUTENBACH; ALBRECHT, 1989).

O desenvolvimento de membranas assimétricas e a fabricação de membranas seletivas feitas a partir de uma variedade de materiais são as duas principais razões do sucesso do processo de filtração e concentração por membranas e do aumento dos processos industriais que puderam ser desenvolvidos com essa tecnologia (RIJN, 2005).

Os parâmetros mais importantes que afetam os custos de investimento e operação em nanofiltração são a taxa de recuperação, que expressa a eficiência da membrana em remover sais e outros componentes da solução e afeta diretamente o tamanho, custo e potência dos equipamentos usados no processo; e a membrana utilizada (PILIPOVIK; RIVEROL, 2005).

As membranas para um sistema de nanofiltração são feitas para concentrar componentes com peso molares maior que 300Da e são mais seletivas que as membranas de osmose reversa. As primeiras retêm as moléculas dissolvidas e íons polivalentes, mas deixam permear os íon monovalentes. Dessa forma, enquanto os processos de osmose reversa operam na faixa de 35 a 100 bar, a nanofiltração opera na faixa de 10 a 30 bar,

proporcionando menor custo (MAROULIS; SARAVACOS, 2003).

A membrana ideal para os processos de separação deve apresentar as seguintes características (PILIPOVIK; RIVEROL, 2005, SILVA, 1995):

- alto fluxo de solvente;
- alta rejeição aos sais monovalentes e metanol/ etanol ;
- resistente ao cloro e outros oxidantes, importante para limpeza do equipamento;
- resistente à ataque biológico;
- resistente aos materiais suspensos e colóides;
- baixo Custo;
- fácil de formar filmes e cavidades;
- tolerante a altas pressões;
- química, física e termicamente estável;
- resistente a altas temperaturas (esterilização).

Uma unidade de separação por nanofiltração é normalmente constituída de um cartucho de membrana, uma bomba de alimentação e tubulações distintas para o retentado e o permeado, além de manômetros e termômetros. A recirculação do produto concentrado é necessária quando se precisa manter alta vazão de alimentação a fim de aumentar a eficiência da separação. A Figura 3.9 esquematiza um processo de separação com mebranas.

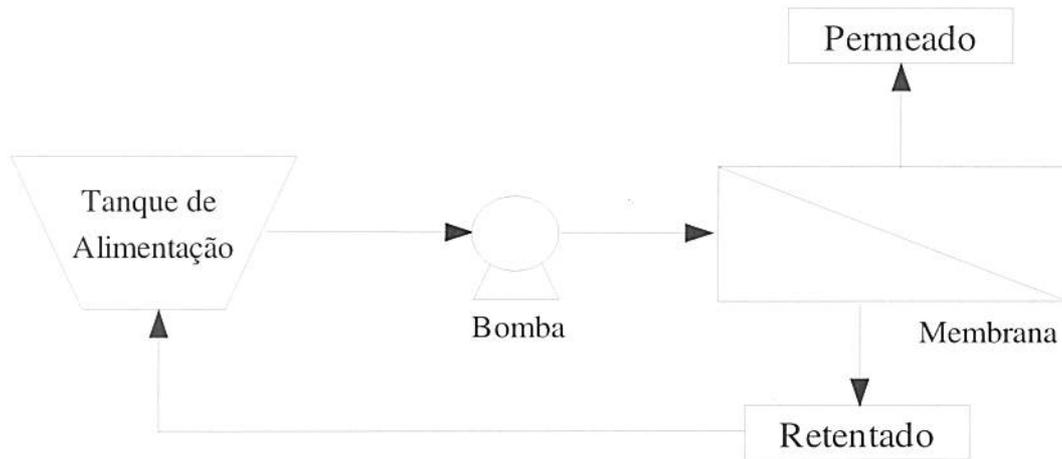


Figura 3.9- Esquema de um processo de separação por membranas.

Pode ocorrer redução no fluxo de permeado devido a compactação da membrana, polarização da concentração ou pelo “*fouling*” (ocasionado pelo acúmulo de componentes da alimentação na superfície ou nos poros da membrana). Este fenômeno pode ser reduzido pela seleção da membrana adequada, configuração do processo e fluxo de alimentação. As proteínas e as gorduras são as principais causadoras de *fouling* em membranas.

### 3.4.3. Principais parâmetros de processo

O fluxo de permeado nos processos de separação por membrana são principalmente afetados pela pressão, concentração da alimentação, temperatura e velocidade tangencial. Além disso, um aumento na concentração de sólidos na solução retida causa um aumento na sua viscosidade e densidade, provocando uma diminuição na difusividade do soluto. Dessa forma, o fluxo de permeado tende a diminuir conforme aumenta-se a concentração do retido. Alguns parâmetros são usados para quantificar e comparar a eficiência do processo :

**Fluxo de Permeado (J)** – Representa o volume de produto permeado que atravessa a área da membrana em um determinado tempo:

$$J = \frac{V_p}{t \cdot A_p} \quad (3.1)$$

onde:  $V_p$  = massa do permeado  
 $t$  = tempo  
 $A_p$  = área da membrana

**Pressão transmembrana ( $P_m$ )** – Definida pela diferença entre a pressão exercida na linha do retentado e na linha de permeado. Ao se trabalhar com unidades laboratoriais que simulam o escoamento transversal, a pressão de saída geralmente a pressão atmosférica, enquanto ao se trabalhar com cartuchos de membranas, deve-se considerar a média da pressão dentro do módulo. É considerada, na prática, como a média das pressões de entrada e de saída do retentado na membrana (Cheryan, 1998).

$$P_m = \frac{P_e + P_s}{2} \quad (3.2)$$

onde:  $P_e$  = pressão de entrada  
 $P_s$  = pressão de saída

**Índice de Retenção** – Este índice fornece a capacidade da membrana em reter um determinado componente, sob condições de operação pré-estabelecidas. É definido pela equação 3.3:

$$R = 1 - \frac{C_p}{C_r} \quad (3.3)$$

onde  $C_p$  = concentração do componente no permeado  
 $C_r$  = concentração do componente no retentado

**Fator de Concentração** – Determina a relação entre as massas do produto retido e da alimentação, determinando a extensão do processo de nanofiltração:

$$F = \frac{m_a}{m_r} \quad (3.4)$$

onde:  $m_a$  = massa da alimentação  
 $m_r$  = massa do retido

## 4. Material e Métodos

### 4.1. Própolis

Foi utilizada própolis verde bruta da região sudeste do país, proveniente de colméias de abelhas da espécie *Apis mellifera* do interior do estado de São Paulo. As características da própolis utilizada, dadas pelo produtor, estão indicadas no Apêndice I.

Alencar (2002) estudou a origem botânica de própolis de diversas regiões e constatou que a própolis do estado de São Paulo é possivelmente proveniente da espécie vegetal *B. Dracunculifolia* e é a que possui maior valor para o mercado externo devido a constatação da presença dos compostos fenólicos ácido cumárico, ácido ferrúlico, kanferol, apigenina e kanferide, sendo que esse último composto normalmente apresenta concentrações muito superiores às própolis das outras regiões do país. Além disso, a própolis dessa região apresenta maior atividade antioxidante correlacionada aos flavonóides que já foram identificados no extrato.

Toda a própolis utilizada neste trabalho foi adquirida dos Apiários *Baldoni*, situados na região de Campinas, com a precaução de que toda a própolis a ser consumida no trabalho fosse de um mesmo lote, ou seja, produzida na mesma região e época do ano, para que houvesse diminuição da variabilidade quanto ao clima e flora utilizada na sua produção. Foi então acondicionada sob refrigeração a 4°C e posteriormente triturada e homogeneizada para extração.

## **4.2. Preparo dos extratos**

A solução etanólica de própolis foi preparada pela mistura da própolis bruta triturada em liquidificador convencional, seguida de homogeneização manual e pesada utilizando-se balança semi-analítica (Marte AM 5500), com álcool etílico 80%. A solução foi feita utilizando-se 20% de própolis bruta para 80% de álcool etílico. A mistura poderia ser mantida em temperatura ambiente, sofrendo agitações manuais e periódicas por três dias. Entretanto, para uma melhor extração, recomenda-se que a própolis seja extraída por um período entre uma e duas semanas. Neste trabalho esta etapa teve a duração de sete dias.

Após esse período, o material foi centrifugado em equipamento Beckman -allegre 25-R a 8800g por 10 minutos a 20°C. O sobrenadante foi separado e mantido sob refrigeração a 4°C por 3 horas. A seguir, a solução foi filtrada em papel de filtro qualitativo para a remoção de ceras. Finalmente, o líquido foi armazenado sob temperatura ambiente, ao abrigo da luz.

O preparo da solução aquosa seguiu o mesmo procedimento empregado para a solução alcoólica, utilizando-se água deionizada. O fluxograma representado na Figura 4.1 indica as principais etapas do processo de preparo e caracterização dos extratos de própolis.

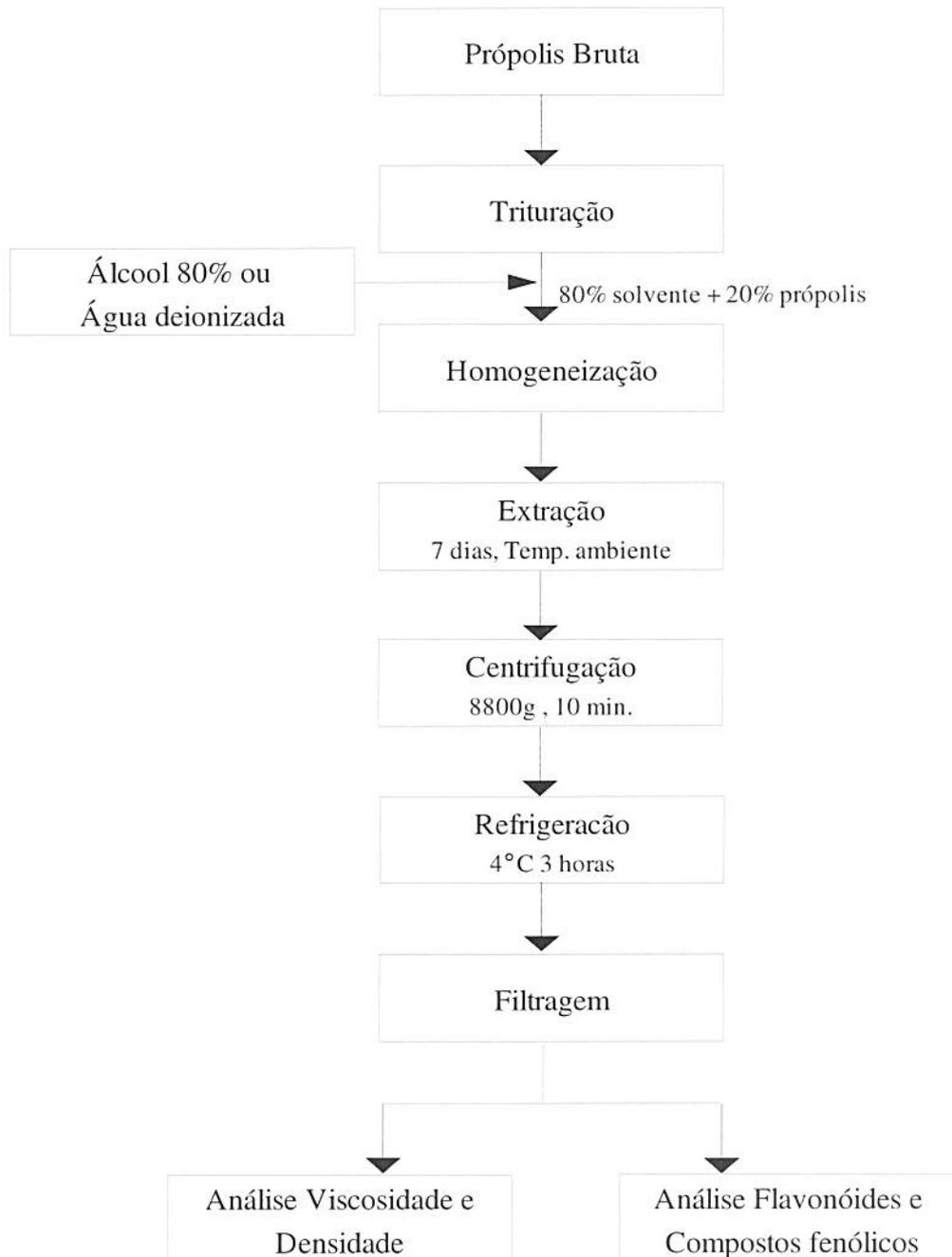


Figura 4.1- Fluxograma de processamento e análise dos extratos de própolis

### 4.3. Caracterização físico-química dos extratos obtidos

#### 4.3.1. Determinação da viscosidade e densidade das soluções

Para verificar a influência da concentração no aumento da viscosidade, foi feita uma concentração por evaporação do solvente dos extratos aquoso e alcoólico da própolis. O solvente foi evaporado em chapa aquecida a 110°C durante o tempo necessário para atingir a concentração desejada. Foram preparadas e analisadas amostras em triplicata com soluções que foram submetidas à evaporação de 10, 20 e 40% de solvente.

Foi utilizado viscosímetro de tubo do tipo Canon-Fenske, ilustrado na Figura 4.2, por se tratar do instrumento mais adequado para medir a viscosidade de fluidos newtonianos que operam sob gravidade, já que permite a obtenção da viscosidade de fluidos de forma rápida e prática.

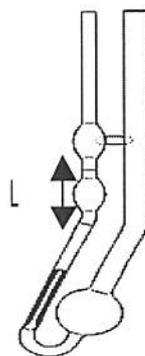


Figura 4.2- Viscosímetro Canon-Fenske.

Para o cálculo da viscosidade utiliza-se a seguinte equação:

$$\frac{\mu}{\rho} = K \cdot t \quad (4.1)$$

onde,  $\mu$  = viscosidade do fluido (Pa.s)  
 $\rho$  = densidade do fluido ( $\text{kg/m}^3$ )  
K = constante do viscosímetro ( $\text{m}^2/\text{s}^2$ )  
t = tempo de escoamento (s)

O determinação da densidade das soluções foi feita utilizando-se picnômetro de 10 mL, previamente calibrado com água destilada a 25°C. Foram medidas as massas dos picnômetros vazios e posteriormente, com água destilada. A densidade da água a 25°C foi considerada  $997,08 \text{ kg/m}^3$  (PERRY; CHILTON, 1973) e o volume foi calculado pela relação  $V=m/\rho$ , onde m representa a massa de água destilada no picnômetro e  $\rho$  sua densidade. Com os dados do volume do picnômetro, foi medida a massa do picnômetro tendo-se seu volume completado com as soluções em estudo e então, foi feito o cálculo da densidade.

A confirmação da viscosidade de cada uma das soluções foi feita pela comparação entre a medida feita com o viscosímetro e aquela feita a 25°C com o reômetro de tensão controlada Carri-Med SL2 500 (TA Instruments, USA), utilizando-se geometria inoxidável cone-placa de 6 cm de diâmetro.

#### **4.3.2. Determinação de flavonóides totais**

A determinação baseia-se na formação de um complexo flavonóide-alumínio, estável, que promove um desvio do espectro de absorção dos flavonóides (efeito batocrômico). Assim é possível a determinação da quantidade de flavonóides sem a interferência de outras substâncias fenólicas, especialmente os ácidos fenólicos (MARCUCCI; WOISKY; SALATINO, 1998; PARK et al., 1998; FUNARI; FERRO, 2006; WOISKY, 1996). A quantificação é feita considerando como base uma curva padrão

de quercetina hidratada, usada como substância de referência, já que ela é um dos flavonóides comumente encontrados em plantas. A Figura 4.3 mostra a reação de formação do complexo flavonóide-alumínio.

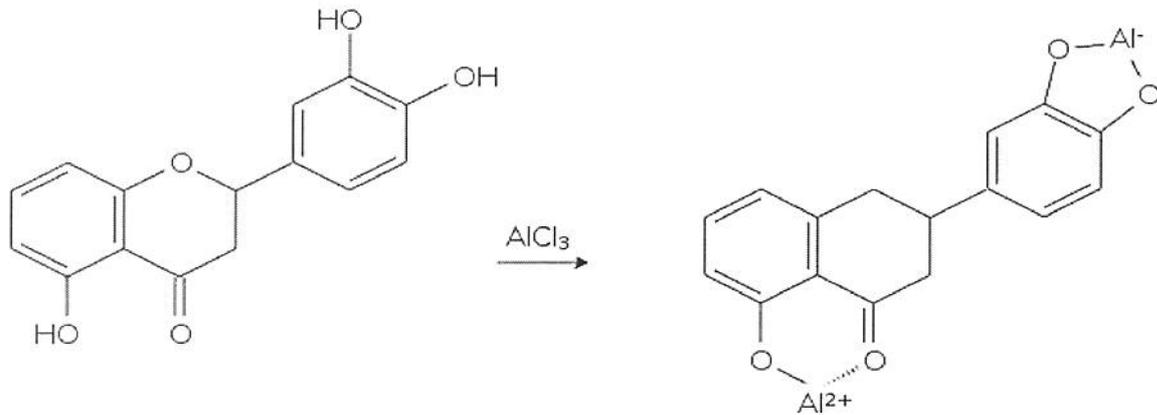


Figura 4.3- Formação do complexo flavonóide-alumínio

(Adaptado de MARCUCCI; WOISKY; SALATINO, 1998)

A metodologia utilizada foi descrita no Boletim Informativo da Associação Japonesa de Saúde e Nutrição (1994) e por Park et al. (1995), ambos citados por Moura (2000). Em tubos de ensaio contendo 0,5 mL do extrato de própolis previamente diluído na proporção de 1:10 foram adicionados uma solução de 0,1 mL de nitrato de alumínio 10%, 0,1 mL de acetato de potássio 1mol/L e 4,3 mL de álcool etílico 80%. As amostras foram homogeneizadas e após 40 minutos foi feita a leitura espectrofotométrica a 415 nm. Para o tubo controle foi utilizado 0,1 mL de água destilada no lugar do nitrato de prata. Para o branco foi utilizada uma solução aquosa de cloreto de alumínio.

A curva padrão foi preparada utilizando-se solução de quercetina em concentrações de 5 a 110  $\mu\text{g/mL}$ , e está ilustrada no Apêndice II. Os valores de flavonóides totais foram expressos como equivalentes de quercetina (mg/g).

Apesar do método colorimétrico para a determinação de flavonóides totais,

através do nitrato de alumínio, ser rápido e prático, não é um método extremamente preciso, já que o efeito batocrômico (desvio para maiores comprimentos de onda e intensificação da absorção) da absorção causado pelo complexo com alumínio não é uniforme para todos os flavonóides. Isto porque, a formação de quelatos entre o alumínio e os flavonóides ocorre de forma diferente, dependendo do flavonóide (Marcucci et al., 1998, Oldoni, 2007, Koo, 1996). Desta forma, dependendo da composição de flavonóides, os resultados podem ser sub ou super estimados.

Para a confirmação dos dados espectrofotométricos obtidos, foi feita uma quantificação de flavonóides totais, usando o método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), conforme descrito no item 4.3.4.

#### **4.3.3. Determinação de substâncias fenólicas totais**

A determinação de polifenóis no extrato de própolis foi feita pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (KUMAZAWA; HAMASAK; NAKAYAMA, 2004), 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, com absorção máxima em 760 nm.

Em tubos de ensaio foram misturados 0,5 mL da solução de própolis diluída em 1:10 com 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu e 0,5 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 10%. As amostras foram homogeneizadas e mantidas em temperatura ambiente, sob o abrigo da luz por 1 hora para posterior leitura espectrofotométrica a 760 nm. Para elaboração da curva padrão, utilizou-se solução de ácido gálico dissolvido em água destilada na concentração de 5 a 200 µg/mL. A curva padrão obtida está ilustrada no Apêndice 2 e os valores de compostos fenólicos totais foram expressos como equivalentes de ácido gálico (mg/g).

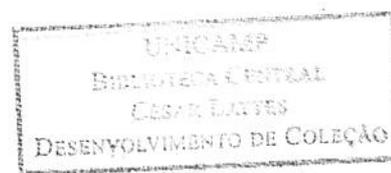
#### 4.3.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

As análises por HPLC foram feitas de acordo com o método descrito por Alencar (2002) e Park et al. (1998). Pequenos volumes dos extratos a serem analisados foram injetados em um cromatógrafo líquido acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos a 260 nm e uma coluna de fase reversa C18 (250 x 4,6 mm) com tamanho de partícula de 5µm. A fase móvel utilizada foi água/ácido acético (19:1, v/v) (solvente A) e metanol (solvente B), com vazão constante de 1 mL/min. O gradiente iniciou com 30% do solvente B, passou a 60% em 45 minutos, 75% em 85 minutos, 90% em 95 minutos, voltando a 30% em 105 minutos. A coluna foi mantida a uma temperatura constante de 30°C e os cromatogramas foram processados utilizando-se software computacional Chromatography Workstation (Shimatzu Corporation, Japão).

#### 4.3.5. Determinação da influência do pH na composição dos extratos

Enquanto é feita a extração das soluções dos extratos de própolis ocorre uma variação do pH da solução, decorrente da extração das substâncias fenólicas. Para conhecer a faixa normal de pH da extração da própolis, verificou-se diariamente a variação do pH das soluções, utilizando-se pHmetro digital. Durante os sete dias de extração, o pH oscilou entre 4,0 e 5,0.

Conhecendo-se o pH normal das soluções, foram feitas novas amostras de extratos de própolis, com diferentes pHs, para verificar a influência da alteração do pH do meio na extração dos compostos da própolis. Para isso, foram preparadas amostras em pHs 2,0; 3,0; 6,0 e 8,0 através da adição de HCl 1 molar ou NaOH 1 molar para modificar o pH



das soluções, que também foi corrigido diariamente para garantir a manutenção do pH do meio.

O extrato de própolis foi preparado conforme o item 4.2 adicionando-se nas embalagens de extração o ácido ou a base em quantidades necessárias para se atingir o pH desejado. O pH foi medido utilizando-se pHmetro digital. O mesmo procedimento foi adotado durante os sete dias de extração para corrigir o pH do meio. Após os sete dias de extração, as amostras foram centrifugadas e filtradas em papel filtro e foram analisados os teores de flavonóides e de fenólicos totais dos extratos alcoólico e aquoso de própolis em diferentes pHs de acordo com os itens 4.3.2 e 4.3.3 para verificar a influência do pH na extração dos compostos da própolis.

#### **4.4. Processo de Concentração**

##### **4.4.1. Ensaio Preliminares**

Foram realizados ensaios preliminares no Laboratório de Processos de Separação com Membranas do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, da Universidade Federal de Santa Catarina. Estes ensaios tiveram a finalidade de validar o processo de nanofiltração em extratos de própolis e fazer a escolha da membrana que possibilitasse a maior retenção de flavonóides e compostos fenólicos. Para tanto, utilizou-se uma unidade de membrana de pequeno porte, como esquematizada na Figura 4.4, que faz a simulação de escoamento transversal. A unidade utilizada encontra-se ilustrada no apêndice III.

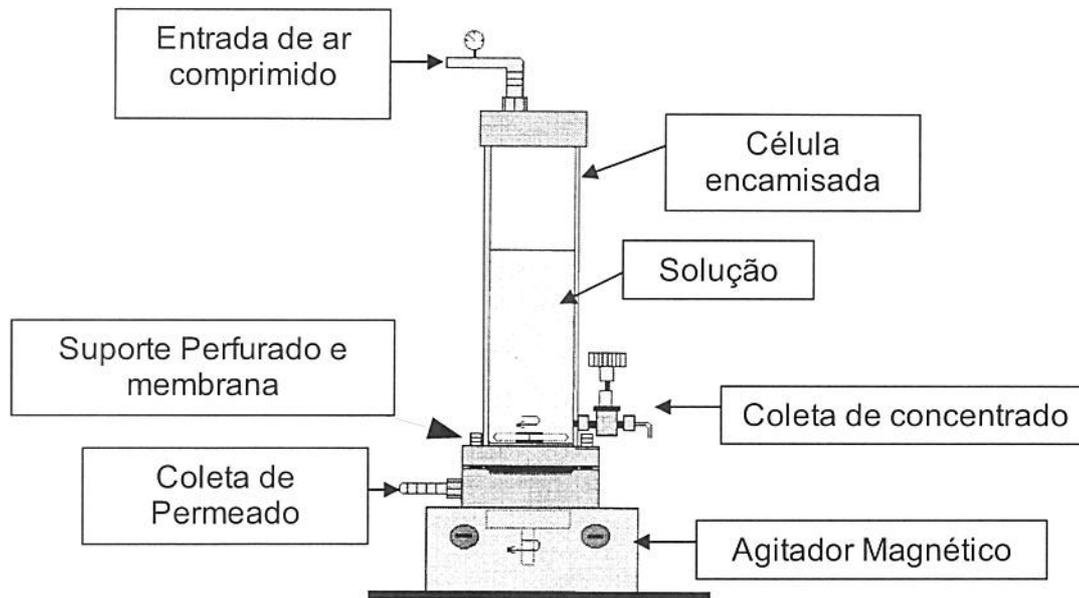


Figura 4.4- Esquema da unidade usada nos ensaios preliminares

(adaptado de Petrus, 1997)

Inicialmente, a solução (extrato de própolis) foi transferida para a célula de filtração e aquecida a 40°C. Foi admitido N<sub>2</sub> pressurizado na parte superior do sistema para fornecer a pressão necessária (força motriz) para o processo. A membrana de formato circular foi colocada sobre um suporte perfurado na parte inferior do equipamento. Neste sistema, foi utilizada a pressão de 4,0 bar. Para proteger a membrana do agitador magnético, que simula a convecção do escoamento transversal, existe um segundo suporte perfurado.

Foram testadas quatro membranas: ultrafiltração (UF), nanofiltração (modelos NF e NF90) e osmose reversa (RO), cujas especificações estão listadas na Tabela 4.1, de modo a verificar a validade do processo de nanofiltração. O tamanho de

disco usado foi de 10,2 cm<sup>2</sup> e as membranas utilizadas variavam entre si pelo tamanho médio de poro e material de fabricação. Foram coletadas pequenas amostras do produto permeado após a filtração pelas distintas membranas, pelo tempo necessário para a coleta de cerca de 2 mL de permeado. A membrana que fornecesse um permeado (filtrado) com menor concentração de solutos de interesse (maior retenção de compostos fenólicos), analisados conforme itens 4.3.2 e 4.3.3, seria escolhida para a realização dos testes subsequentes.

Tabela 4.1- Dados das membranas usadas nos ensaios preliminares.

Membrana	Fabricante	Retenção (%)	Sais <sup>a</sup>	Material
NF	Filmtec/Dow	99,0	MgSO <sub>4</sub>	Polipiperazina amida
NF-90	Filmtec/Dow	97,7	MgSO <sub>4</sub>	Poliamida
OR	Filmtec/Dow	99,5	NaCl	Poliamida
UF	LABSEM	96,0	BSA	Polifluoreto de Vinilideno

<sup>a</sup>Sais usados para o cálculo de retenção da membrana

#### 4.4.2. Membrana

O tipo de membrana utilizada no processo de concentração foi escolhido em função dos resultados obtidos nos ensaios preliminares de separação. Foi utilizada membrana de nanofiltração, fabricada pela Osmonics com diâmetro médio de corte entre 150 e 300g/mol e área filtrante de 0,6m<sup>2</sup>. O tipo de configuração de membrana utilizada para os ensaios de concentração tangencial foi o de espiral que apresenta uma excelente relação entre área filtrante/volume da membrana, , baixo consumo de energia, grande número de membranas disponíveis comercialmente e fácil manipulação.

Um desenho esquemático de uma membrana tipo espiral é mostrado na Figura 4.5.

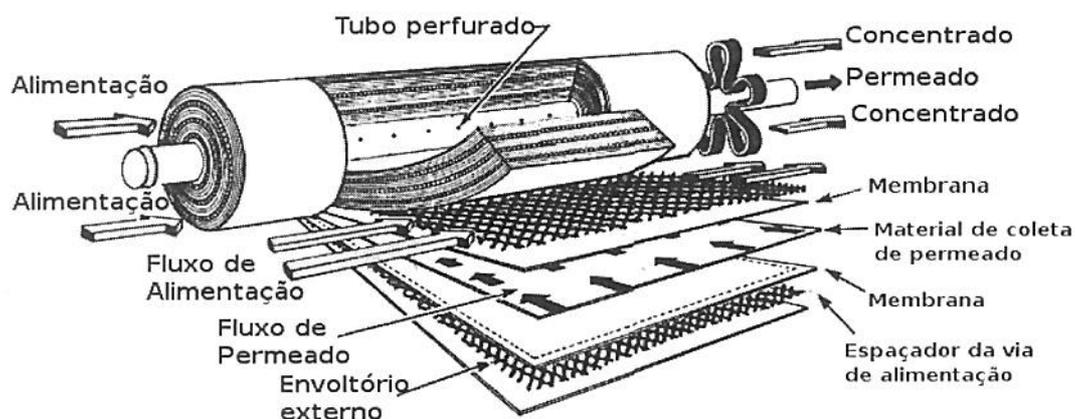


Figura 4.5- Esquema de módulo de membrana na configuração espiral.

(Adaptado de Cheryan, 1998)

Após cada etapa do processamento, foi feita a limpeza da membrana com hidróxido de sódio a 0,25% a fim de eliminar os materiais da superfície da membrana e no interior de seus poros e restabelecer o fluxo de permeado inicial. A solução de limpeza foi utilizada no sistema em circuito fechado, após uma pré-lavagem com água filtrada, por cerca de 10 minutos e posteriormente procedeu-se a um enxágüe do equipamento com água destilada.

#### 4.4.3. Etapas do Processamento

Após a seleção da membrana de nanofiltração, todos os experimentos foram realizados em unidade de filtração tangencial de acordo com o esquema representado pela Figura 4.6, sob diferentes condições operacionais, conforme será descrito posteriormente. O equipamento utilizado está ilustrado no Apêndice III.

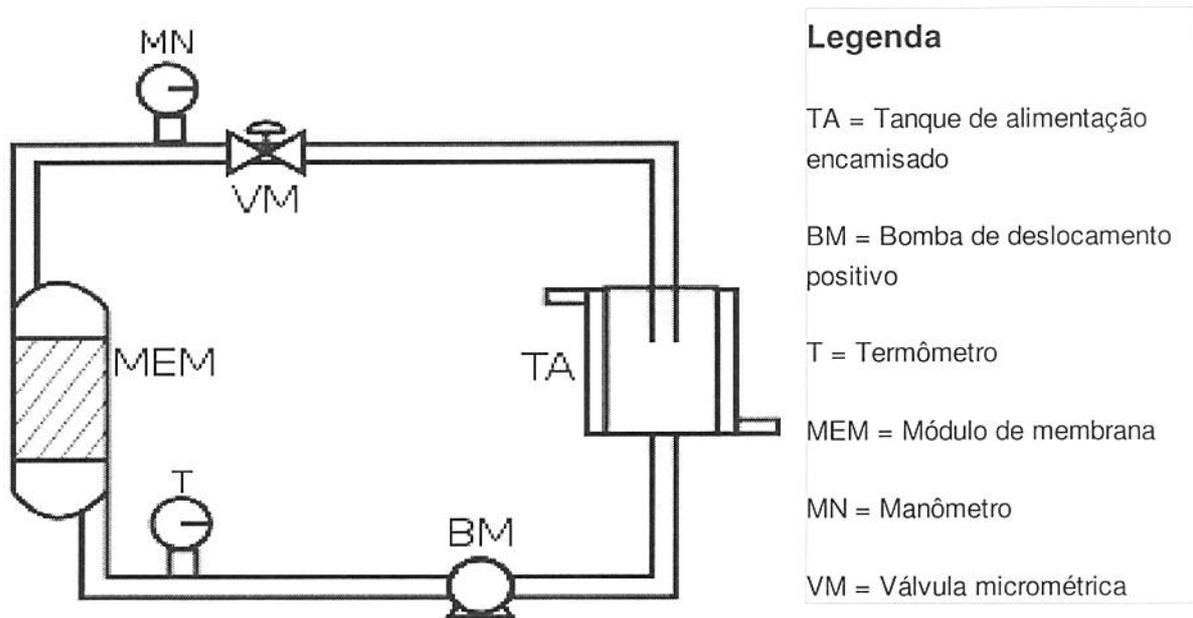


Figura 4.6- Esquema de unidade de filtração tangencial

#### 4.4.4. Cálculo do fluxo de permeado

O fluxo de permeado é uma importante medida em qualquer processo de filtração já que fluxos muito baixos, nas condições escolhidas de processo, são inviáveis comercialmente. Para o processamento das soluções aquosa e alcoólica de própolis, trabalhou-se com temperatura de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  e pressão de  $5,8 \pm 0,2$  bar. A pressão utilizada não é característica do processo de nanofiltração, mas foi suficiente para ocorrer a filtração, propiciando economia de energia durante o processo. As soluções de própolis foram colocadas no tanque encamisado e colocadas sob processamento em sistema fechado (tanto o produto permeado quanto o retentado retornavam para o tanque de alimentação). A solução aquosa foi processada durante 60 minutos e amostras do permeado foram coletadas em intervalos regulares de 10 minutos, seu volume medido e posteriormente analisado segundo teor de flavonóides e compostos fenólicos, para verificar a influência do tempo de

processamento no teor de compostos retidos. Para a solução alcoólica, o processamento foi feito por 30 minutos e as amostras foram coletadas a intervalos regulares de 5 minutos. Foi utilizado o volume médio de 5 litros de extrato de própolis para cada ensaio de filtração.

Posteriormente, para a obtenção do produto concentrado final, as soluções foram processadas em sistema aberto (retirada do permeado durante todo o processamento e recirculação da solução concentrada) até que se atingisse um volume mínimo de extrato concentrado no sistema. Durante esta etapa, foi medido o volume acumulado de permeado com o tempo e calculado o fator de concentração da solução.

#### **4.4.5. Efeito da pressão sobre o fluxo de permeado**

Foi analisado o efeito da pressão transmembrana no fluxo de permeado através da passagem de solução aquosa de própolis em sistema fechado no equipamento, à temperatura constante  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ . Foram coletadas amostras de permeado a cada variação de pressão de 1,0 bar até 5,0 bar. Após este processamento, foi feita limpeza da membrana e, na seqüência, o mesmo processamento, mas utilizando-se água destilada em substituição à solução de própolis. A variação nos fluxos de permeado obtidos entre a solução de própolis e a de água destilada, fornecia a taxa de colmatagem da membrana.

#### **4.4.6. Efeito da temperatura no fluxo de permeado**

Sabe-se que o aumento de temperatura reduz a viscosidade e aumenta a difusividade de solventes através de um meio filtrante, aumentando a produtividade do sistema. Mas é preciso verificar se um aumento no fluxo permeado não resulta em perda de seletividade do meio filtrante.

A solução de própolis aquosa foi disposta no tanque de alimentação encamisado da unidade filtração tangencial e processada em temperatura de 20 a 45°C. A pressão foi mantida em 5,8 bar e para cada temperatura foram coletadas amostras do permeado após 5 minutos da estabilização da temperatura para avaliação da quantidade de flavonóides e compostos fenólicos que foram perdidos no processo.

#### **4.4.7. Avaliação da histerese**

Para verificar a ocorrência de histerese no processo de filtração tangencial, a solução aquosa de própolis foi mantida em temperatura constante e a pressão foi aumentada gradualmente de 1,0 até 7,0 bar, em seguida a pressão foi reduzida até retornar à pressão de 1,0 bar. . Para cada valor de pressão, foram colhidas amostras do permeado e calculado o seu fluxo. Este experimento foi realizado em duas diferentes temperaturas: 30 e 40°C. Foram feitos gráficos de fluxo versus pressão para os resultados obtidos e comparadas as curvas obtidas no sentido de aumento e diminuição da pressão.

#### **4.5. Avaliação das soluções obtidas pós concentração**

Após o processo de concentração foram obtidos dois produtos: permeado e retentado ou concentrado que foram analisados segundo suas características físicas e químicas. O produto permeado caracteriza-se por ser pobre em compostos de interesse e rico em solvente, enquanto o produto concentrado é rico em compostos fenólicos e flavonóides e possui quantidade bem inferior de solvente quando comparado à solução inicial.

#### **4.5.1. Determinação da viscosidade e densidade das soluções**

As soluções obtidas no processo de concentração foram caracterizadas segundo sua viscosidade, utilizando-se viscosímetro tipo Canon-Fenske e picnômetro pré-calibrado de 10 mL, seguindo o mesmo procedimento descrito no item 4.3.1. Os resultados obtidos foram comparados com os dados das soluções iniciais.

#### **4.5.2. Análise de flavonóides e compostos fenólicos**

No permeado e concentrado, obtidos dos processos com membranas, foram realizadas as análises de flavonóides e compostos fenólicos, como descrito nos itens 4.3.2 e 4.3.3, respectivamente. Para a comprovação dos resultados obtidos, as amostras também foram submetidas à análise por HPLC, de acordo com o item 4.3.4.

### **4.6. Análise dos resultados**

Os resultados obtidos no processo de separação por membranas, e os parâmetros do processo, foram analisados estatisticamente utilizando o teste de Duncan a 5% de significância, utilizando-se o software Statistica 5.5 (StatSoft Inc., Tulsa, EUA).

## **5. Resultados e Discussão**

### ***5.1. Caracterização das soluções iniciais***

#### **5.1.1. Determinação da viscosidade das soluções**

Determinou-se a viscosidade das soluções (extratos) a diferentes concentrações, conforme item 4.3. A variação da viscosidade é importante para se saber os seu efeito sobre o fluxo permeado durante a concentração com membranas. O fluxo permeado é um dos parâmetros mais importantes num processo com membranas. Para isso, foi feita uma caracterização das soluções inicial e concentrada através da evaporação de 10%, 20% ou 40% de solvente. As concentrações foram feitas utilizando-se evaporação do solvente utilizando-se chapa aquecida a 110° C. A densidade foi medida através de picnômetro de 10 mL. As medidas foram feitas em triplicata, a 30°C e os resultados das médias das densidades e viscosidades das soluções são mostradas na tabela abaixo:

Tabela 5.1- Dados de densidade e viscosidade para soluções a diferentes concentrações.

		Densidade (g/mL)	Viscosidade (Kgl/(m.s))
Solução Aquosa	Inicial	1,0030 ± 0,0002	(9,12 ± 0,06)E-4
	Concentrada 10%	1,0060 ± 0,0004	(10,30 ± 0,05)E-4
	Concentrada 20%	1,0070 ± 0,0004	(10,70 ± 0,04)E-4
	Concentrada 40%	1,0090 ± 0,0006	(10,80 ± 0,09)E-4
Solução Alcoólica	Inicial	0,8820 ± 0,0008	(2,27 ± 0,01)E-3
	Concentrada 10%	0,8870 ± 0,0012	(2,41 ± 0,04)E-3
	Concentrada 20%	0,8980 ± 0,0010	(2,70 ± 0,04)E-3
	Concentrada 40%	0,9160 ± 0,0014	(2,86 ± 0,01)E-3

Como esperado, os resultados obtidos demonstraram um aumento de viscosidade em função da concentração, porém, acredita-se que esse aumento não seja expressivo o suficiente para representar redução importante no fluxo permeado durante o processamento com membranas. Tendo-se aumentado a concentração em 40%, a viscosidade foi aumentada em cerca de 12% para a solução aquosa e de 26% no caso da solução alcoólica. Como ambas as soluções apresentam valores de viscosidade relativamente baixos, o processo não será afetado negativamente pelo aumento de viscosidade.

### 5.1.2. Influência do pH na extração de flavonóides

Como descrito no item 4.3.5, foi feita uma determinação do pH das soluções de própolis durante os sete dias de extração. Foi constatado que o pH do extrato permanece na faixa entre 4 e 5. Dessa forma, foram escolhidos 4 pontos de pH, dois mais ácidos e dois mais básicos para verificar a influência do pH na eficiência da extração. Os valores escolhidos foram de 2,0; 3,0; 6,0 e 8,0. Após os sete dias de extração, com a amostra centrifugada, procedeu-se a análise dos flavonóides e compostos fenólicos das soluções. Os

dados foram analisados estatisticamente através de Teste de Tukey e as amostras que apresentaram diferença estatística entre si estão representadas com letras diferentes. As Tabelas 5.2 e 5.3 mostram os resultados obtidos para as soluções aquosa e alcoólica, respectivamente:

Tabela 5.2- Variação na composição do extrato aquoso em diferentes pHs.

	<b>Teor flavonóides (mg/g)<sup>a</sup></b>	<b>% variação</b>	<b>Teor fenólicos (mg/g)<sup>b</sup></b>	<b>% variação</b>
Sol. inicial	23,67 ± 2,14 (d)	-	36,57 ± 0,35 (a,b)	-
pH 2,0	12,08 ± 0,54 (a)	-48,96	36,96 ± 0,04 (a)	1,07
pH 3,0	11,41 ± 1,56 (a)	-51,8	35,48 ± 0,44 (b)	-2,98
pH 6,0	33,21 ± 2,62 (b)	40,3	40,37 ± 0,27 (c)	10,39
pH 8,0	61,42 ± 1,51 (c)	159,48	45,41 ± 0,40 (d)	24,17

Valores representam média ± desvio padrão (n=3)

Médias seguidas de letras diferentes indicam que são relevantes a 5% de significância

<sup>a</sup> equivalentes de quercetina

<sup>b</sup> equivalentes de ácido gálico

Tabela 5.3- Variação na composição do extrato alcoólica em diferentes pHs.

	<b>Teor flavonóides (mg/g)<sup>a</sup></b>	<b>% variação</b>	<b>Teor fenólicos (mg/g)<sup>b</sup></b>	<b>% variação</b>
Sol. inicial	69,35 ± 0,38 (a)	-	98,74 ± 0,96 (b)	-
pH 2,0	68,40 ± 1,89 (a,b)	-1,27	79,44 ± 1,9 (a)	-19,55
pH 3,0	68,29 ± 0,61 (a,b)	-1,41	100,59 ± 2,27 (b)	1,87
pH 6,0	66,68 ± 0,95 (a,b)	-3,56	52,88 ± 0,21 (c)	-46,45
pH 8,0	64,91 ± 1,11 (b)	-5,92	49,80 ± 3,03 (c)	-49,56

Valores representam média ± desvio padrão (n=3)

Médias seguidas de letras diferentes indicam que são relevantes a 5% de significância

<sup>a</sup> equivalentes de quercetina

<sup>b</sup> equivalentes de ácido gálico

Analisando os dados obtidos para solução aquosa, no caso do teor de flavonóides, percebe-se que todas as amostras apresentaram diferença estatística em relação à solução inicial, utilizando nível de significância de 95%. No entanto, apenas as amostras com pH mais básico (pHs 6,0 e 8,0) apresentaram aumento de concentração. Esse fato se

repete para os compostos fenólicos nas amostras de pHs 6,0 e 8,0, que também tiveram variação estatística em relação à solução inicial.

No caso da solução alcoólica, só a amostra com pH 8,0 apresentou variação em relação à solução inicial, e esta diferença foi resultado de um decréscimo na concentração de flavonóides. Para o caso dos compostos fenólicos, a única amostra que não apresentou resultados negativos em relação à concentração foi a de pH 3,0 sendo que a diferença em relação ao extrato inicial não é estatisticamente significativa.

Com estes dados, percebe-se que as amostras com pHs 6,0 e 8,0 (mais básico em relação ao extrato inicial) apresentam diferença significativa em relação ao teor de flavonóides e compostos fenólicos em solução aquosa. Para uma melhor conclusão foi feita análise por HPLC nas amostras que apresentaram diferença significativa para valores acima da amostra padrão, para saber quais foram os constituintes extraídos da própolis em pHs mais altos.

Os resultados espectrofotométricos para solução alcoólica não foram positivos já que as variações na concentração dos compostos de interesse foram negativas em relação à solução inicial. Dessa forma, não foram realizadas análises de HPLC para diferentes pHs desta solução.

As figuras 5.1, 5.2 e 5.3 mostram os cromatogramas obtidos para o extrato aquoso inicial, alterado para pH 6,0 e pH 8,0, respectivamente. A comparação das figuras em relação à quantidade e tamanho dos picos, permite avaliar o efeito do pH no extrato aquoso de própolis. A unidade expressada nos gráficos no eixo das ordenadas pela unidade "mAU" expressa o sinal dado pela amostra durante a análise, assim, não corresponde à concentração das substâncias. A concentração dos compostos indicados pelos picos das figuras estão expressos na tabela 5.4.

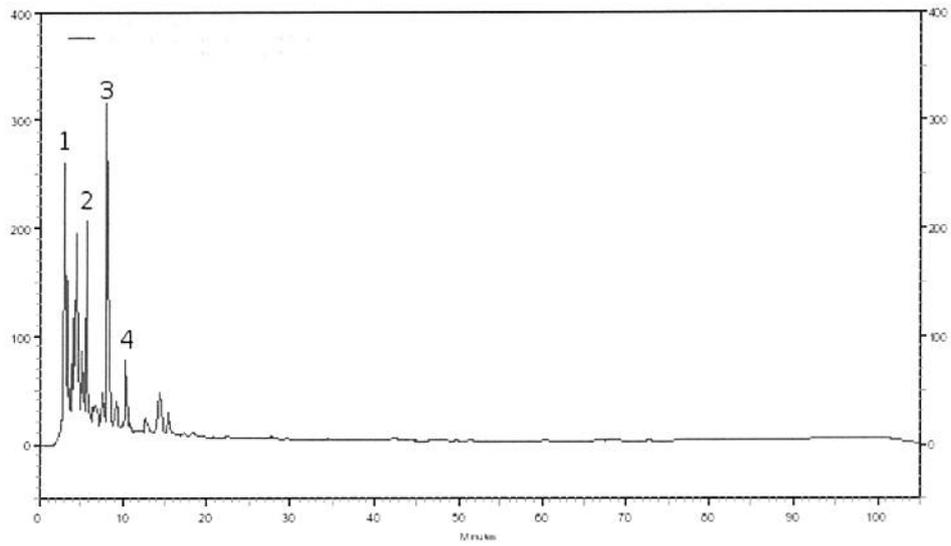


Figura 5.1- Cromatograma obtido por HPLC de extrato aquoso inicial de própolis

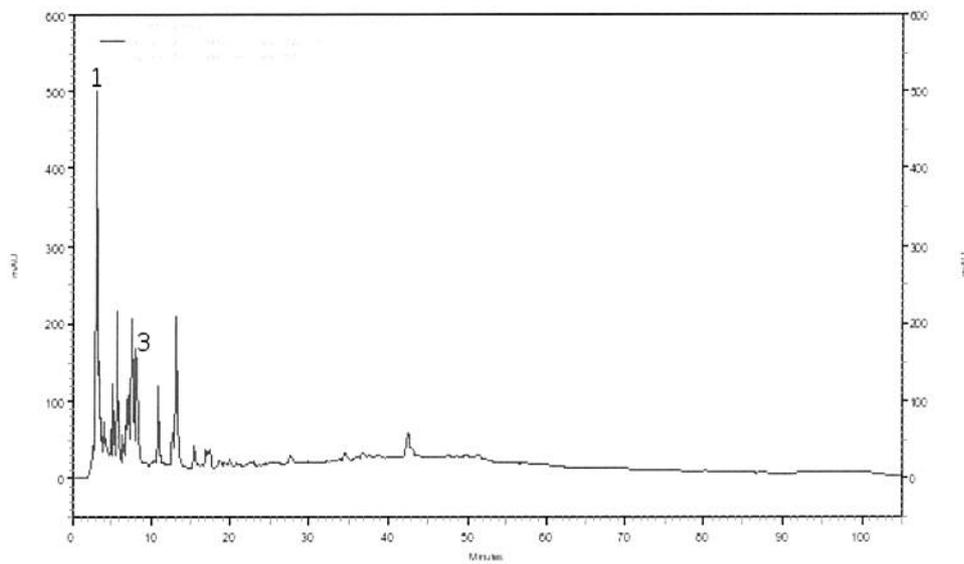


Figura 5.2- Cromatograma obtido por HPLC do extrato aquoso a pH 6,0

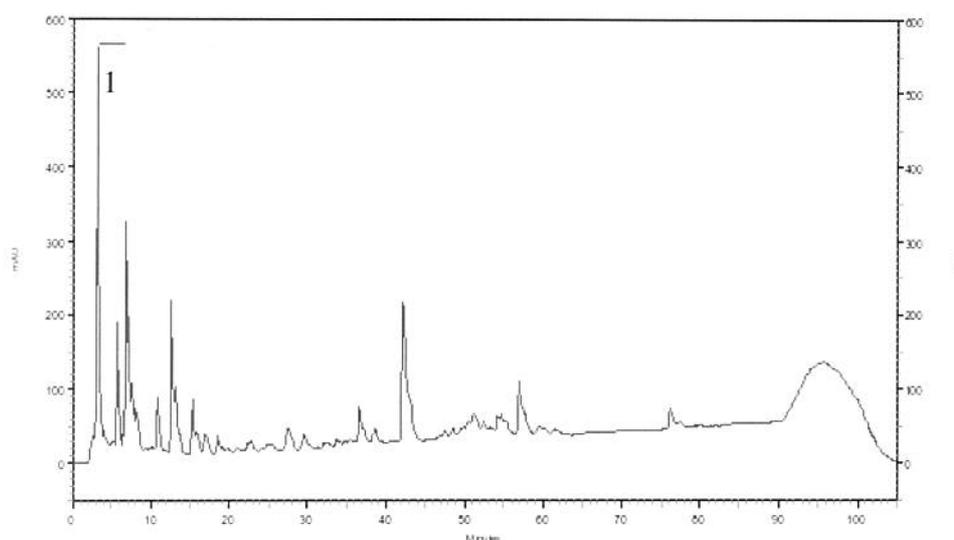


Figura 5.3- Cromatograma obtido por HPLC do extrato aquoso a pH 8,0

Pela análise dos cromatogramas pode-se verificar que a alteração do pH das soluções para um pH mais básico propiciou um aumento na concentração dos compostos polares extraídos, além de um aumento na extração de compostos apolares em relação ao extrato aquoso sem alteração de pH. O extrato aquoso, devido as características do solvente, tende a extrair apenas os compostos polares que apresentam baixo tempo de retenção (até 20 minutos) no cromatograma, como pode ser visualizado na Figura 5.1. A Tabela 5.4 relaciona alguns compostos encontrados na solução e sua concentração:

Tabela 5.4- Compostos identificados nos extratos aquosos de própolis e suas concentrações.

Número Pico	Composto	Concentração (mg/mL)	
		Extrato inicial	pH 6,0
2	Ácido Caféico	1,04	-
3	Ácido Cumárico	1,49	1,28
4	Ácido Ferrúlico	0,92	-

A solução mantida em pH 6,0 apresentou um aumento de cerca de 48% do composto representado pelo pico 1, que não foi identificado. Essa variação na concentração foi medida pela diferença no tamanho dos picos, que representam o sinal gerado pelo composto. Além disso, a análise evidencia uma tendência a extração de compostos apolares, que são os compostos que apresentam tempo de retenção acima de 20 minutos no teste de cromatografia, apresentando um pequeno pico em torno de 40 minutos de corrida. A solução mantida em pH 8,0 apresentou um aumento de extração de aproximadamente 54% do mesmo composto e houve uma grande extração de vários compostos apolares, representados pelos picos com tempo de retenção maior.

Os picos representados pelos números 2 e 4 na figura 5.1 representam os ácidos caféico e ferrúlico, respectivamente. Estes compostos foram identificados na solução inicial, mas não foram detectados nas soluções com diferentes pHs. O pico número 3 foi identificado como sendo ácido cumárico e foi encontrado na solução inicial e na solução com pH 6,0, porém, em menor concentração.

Dessa forma, o uso de solução aquosa em pHs diferenciados, apesar de aparentemente extrair menor quantidade de compostos polares que o extrato inicial, extrai outros tipos de compostos, principalmente os apolares que estão presentes em grande quantidade na solução alcoólica, o que pode validar o produto como uma alternativa frente ao consumo da solução etanólica de própolis.

## **5.2. Ensaio preliminares**

Como foi utilizada baixa pressão, próxima a 4,0 bar, nos ensaios preliminares, devido à limitação da célula de filtração, não foi possível permear o extrato alcoólico, já

que para a nanofiltração (membrana NF-90) e a osmose inversa geralmente são necessárias maiores pressões transmembrana para que a separação ocorra. Os produtos permeados da concentração por membrana dos extratos de própolis foram analisados em relação ao teor de flavonóides totais e substâncias fenólicas totais, de acordo com os itens 4.3.2 e 4.3.3. Os resultados obtidos estão expressos na tabela abaixo :

Tabela 5.5- Teores de flavonóides e compostos fenólicos no permeado.

	Teor flavonóides (mg/g) <sup>a</sup>	% retenção	Teor fenólicos (mg/g) <sup>b</sup>	% retenção
Extrato alcóolico	71,98±0,17	-	131,22±1,51	-
Extrato aquoso	67,81±1,27	-	96,17±0,79	-
NF aquoso	2,02±0,17	97,03	35,46±0,17	63,12
NF90 aquoso	2,02±0,08	97,02	35,06±0,18	63,54
NF alcoólico	9,64±1,11	86,6	67,48±0,36	48,58
RO aquoso	1,81±0,33	97,33	35,91±0,19	62,66
UF aquoso	65,13±1,26	4,11	42,59±0,37	55,72
UF alcoólico	65,76±3,64	8,63	129,96±1,3	0,97

Valores representam média ± desvio padrão (n=3)

<sup>a</sup> equivalentes de quercetina

<sup>b</sup> equivalentes de ácido gálico

Através da análise dos dados obtidos, verificou-se que as membranas que apresentaram maiores retenções de flavonóides e substâncias fenólicas foram as membranas de nanofiltração. Portanto, a utilização dessas membranas no processo é mais interessante e recomendada para o uso com extratos de própolis, já que possibilitou uma boa retenção de flavonóides e substâncias fenólicas e necessita de um menor gasto de energia em comparação com o processo de osmose reversa, que também apresentou boa retenção, mas que normalmente necessita de pressões mais altas de operação.

Para avaliar o método de extração da própolis utilizado em laboratório e para

comparação dos resultados obtidos, foi feita a análise de flavonóides e compostos fenólicos de três marcas de extratos de própolis comercialmente disponíveis. As três marcas foram adquiridas de forma aleatória em farmácias da região de Campinas. As marcas testadas foram: Abelhão, produzida pela LaborApis – Minas Gerais - com composição de 50% de própolis e 50% de álcool de cereais; Makrovit, produzida por W. Wenzel Produtos Apícolas – São Paulo – com composição mínima de própolis de 12%; e Uniflora, produzida por empresa de mesmo nome – São Paulo - e composição de 25% própolis. Os resultados das análises são apresentados na tabela 5.6, onde os dados referentes a solução etanólica e solução aquosa representam os teores obtidos para as amostras preparadas em laboratório:

Tabela 5.6- Comparação entre os teores de flavonóides e compostos fenólicos para extratos de própolis comerciais e aqueles obtidos no presente trabalho

	Teor flavonóides (mg/g) <sup>a</sup>	Teor fenólicos (mg/g) <sup>b</sup>
Abelhão	49,00 ± 0,73	104,87 ± 0,77
Makrovit	12,48 ± 1,50	97,49 ± 0,10
Uniflora	57,93 ± 2,3	113,72 ± 0,37
Extrato alcoólico	69,35 ± 0,38	98,74 ± 0,96
Extrato aquoso	23,67 ± 2,14	36,56 ± 0,35

Valores representam média ± desvio padrão (n=3)

<sup>a</sup> equivalentes de quercetina

<sup>b</sup> equivalentes de ácido gálico

A análise dos dados revela uma grande variação importante nos valores de flavonóides e compostos fenólicos. Essa variação pode ser decorrência da diferença de região de coleta e época do ano em que foi feita a colheita da própolis. Além disso, alguns fabricantes podem estar usando quantidades insuficientes de própolis para o preparo do extrato. Ressalte-se que apenas essa análise não é suficiente para apontar as causas destas variações.

Percebe-se que o extrato alcoólico preparado em laboratório apresentou teores parecidos com a maioria das marcas comerciais, enquanto o extrato aquoso apresentou teores inferiores. Como não foi encontrado extrato aquoso comercial, a comparação foi feita com o extrato alcoólico comercial. Esse resultado já era esperado visto que a literatura aponta que o extrato alcoólico, preparado em laboratório, extrai quantidades muito menores dos compostos de interesse em relação aos extratos alcoólicos em diferentes concentrações (PARK et al., 1998).

Kumazawa; Hamasak e Nakayama (2004) estudaram a própolis de diversos países e para o Brasil, o total de flavonóides foi de aproximadamente 51,9 mg/g e para os polifenóis cerca de 120 mg/g. Funari e Ferro (2006) estudaram a própolis do estado de São Paulo e encontraram um teor de flavonóides de 26,41 mg/g e de compostos fenólicos de 73,93 mg/g. Comparando-se os dados da literatura com os dados obtidos experimentalmente, percebe-se que todos os dados variam muito entre si, mas situam-se dentro da mesma ampla faixa de resultados. Todas as amostras ficaram dentro dos limites estabelecidos pelo Ministério da Agricultura quanto ao teor de flavonóides (mínimo de 0,5%) e a amostra de solução aquosa não se enquadrou na especificação quanto aos compostos fenólicos (mínimo de 5%).

### **5.3. Parâmetros do Processo**

#### **5.3.1. Fluxo de permeado**

O fluxo médio de permeado da nanofiltração em unidade de escoamento tangencial, foi medido de acordo com o item 4.4.4 e apresentou os valores de 24,43L/h.m<sup>2</sup>

para a solução aquosa e 12,11 L/h.m<sup>2</sup> para a solução alcoólica. O teste foi feito em duplicata e o comportamento médio do fluxo durante o processamento está apresentado na Figura 5.4, através das curvas de fluxo obtidas com os diferentes extratos. A grande diferença obtida no valor de fluxo entre os extratos pode ser decorrência da grande diferença de viscosidade entre as soluções iniciais e de diferentes graus de colmatagem e formação de película na membrana para cada solução, já que apresentam solventes de naturezas distintas.

Durante o processamento em sistema aberto, foi possível concentrar a solução aquosa para 25% do seu volume inicial e a solução alcoólica em 33%. As variações ocorridas na taxa de concentração são decorrentes dos diferentes tipos de interação das soluções com a membrana e da aderência da solução no equipamento, que foi acentuada na solução alcoólica devido às suas características de adesividade. Não foi possível obter maior concentração, devido à quantidade que preenche o “volume morto” do equipamento (tubulações e a quantidade mínima de solução no tanque de alimentação). Assim, quando se atinge o volume mínimo de capacidade do equipamento, não é possível continuar a se recircular o retentado, impedindo maior concentração da solução.

O fluxo da solução alcoólica foi medido por menor tempo, devido aos problemas de se trabalhar com álcool concentrado em altas pressões, o que eleva as suas características inflamáveis, gerando riscos já que o equipamento não é destinado a esse tipo de processo. Além disso, o fluxo da solução alcoólica apresentou uma tendência de estabilização por volta dos 12 L/h.m<sup>2</sup>.

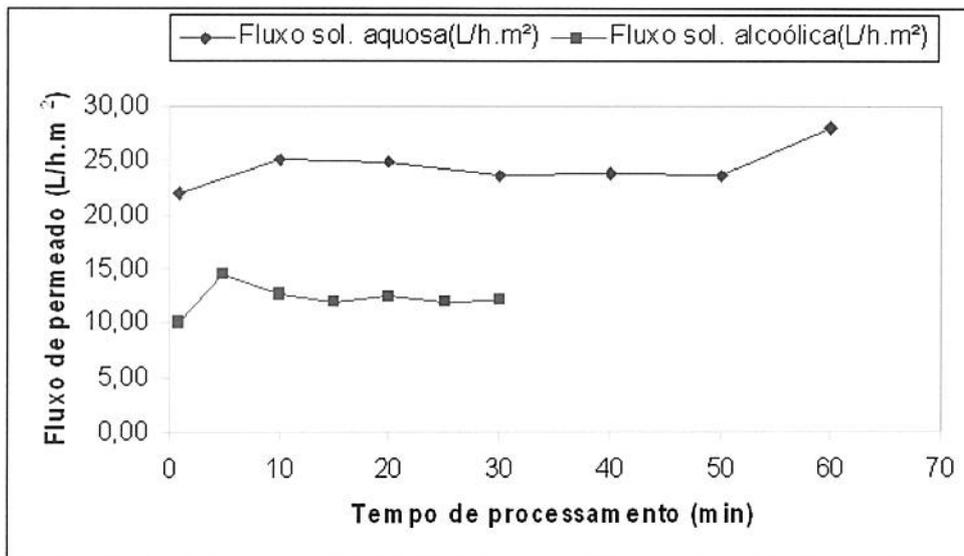


Figura 5.4- Fluxo de permeado em função do tempo de processamento para as diferentes soluções

Tsui e Cheryan (2007) estudaram a purificação do extrato de milho alcoólico para produção de xantofila, utilizando nanofiltração. Obtiveram fluxo de aproximadamente 10,0 L/h.m<sup>2</sup>, ao trabalhar com pressão de 27 bar, a 50°C. Hossain (2003) estudou o processo de concentração de antocianina (pertencente à família dos flavonóides) de resíduos de cassis em solução aquosa por ultrafiltração em diferentes tipos de membranas e obteve valores de fluxo de permeado de no máximo 17,3 L/h.m<sup>2</sup> a 1,4 bar e 18°C. Banvolgyi et al. (2006) estudaram o processo de concentração de vinho tinto (rico em polifenóis, álcool e açúcares) por nanofiltração em diferentes temperaturas de processamento e pressão de 20 bar e obtiveram valores de fluxo de permeado de 10,0, 15,0 e 20,0 L/h.m<sup>2</sup> para 30, 40 e 50°C respectivamente. O processo de concentração do vinho tinto pode ser considerado como o mais próximo da solução alcoólica de própolis, já que ambos possuem compostos em solução em comum e utilizam o álcool como solvente.

Para os extratos de própolis foram utilizadas pressões relativamente baixas (em

torno de 6,0 bar) quando comparada a outros processos estudados na literatura, propiciando valores de fluxo de permeado semelhante a outros processos, evidenciando sua viabilidade, já que se gasta menor energia para gerar menor pressão de processamento, e o fluxo é alto quando comparado a outros processos.

Apesar do fluxo da solução alcoólica ter apresentado valores que viabilizam o processo de concentração com membranas, a higienização da membrana pós-processamento se mostrou mais trabalhosa e cara, já que os compostos adesivos que são extraídos pelo álcool se aderem a membrana e só são retirados através da circulação de etanol pela membrana. Essa etapa aumenta o tempo de processamento e dificulta a aplicação industrial.

### **5.3.2. Efeito da pressão no fluxo de permeado**

O efeito da pressão foi medido utilizando-se a metodologia descrita no item 4.4.5. A temperatura foi mantida em  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  e a pressão foi alterada de 1 até 5 bar para se avaliar a influência da pressão no fluxo e a variação da taxa de colmatagem com a pressão. Os resultados estão expressos na Figura 5.5, onde os dados mostram o valor do fluxo de permeado obtido com solução aquosa de própolis e com água destilada.

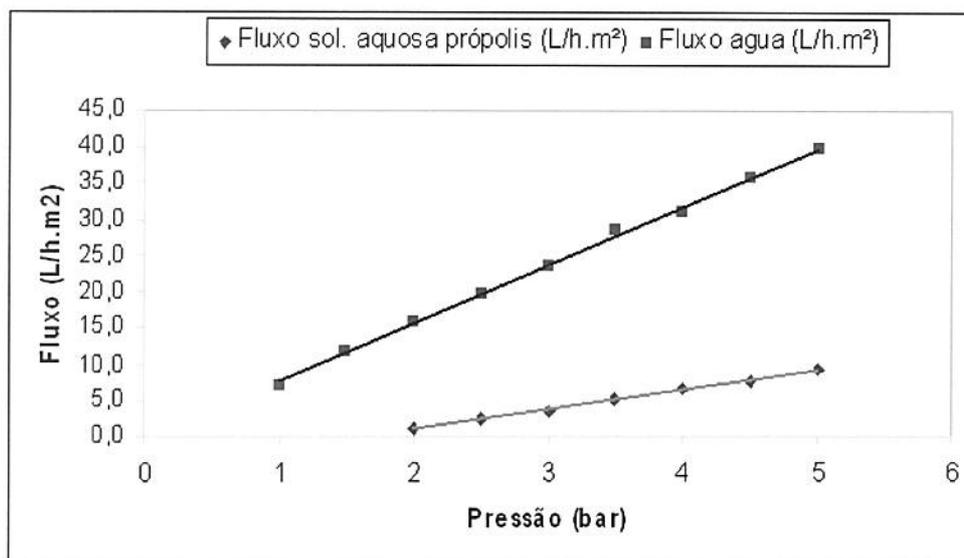


Figura 5.5- Fluxo do permeado em função da pressão de processamento.

Desconsiderando-se os efeitos de compactação da membrana, formação da camada gel e a colmatagem, a variação de pressão seria diretamente proporcional ao fluxo de permeado. Normalmente, pressões maiores provocam um efeito de compactação sobre a membrana e a camada gel, gerando um aumento no entupimento (PETRUS, 1997). Esse aumento foi evidenciado nos testes, já que a taxa de colmatagem, medida pela diferença entre o fluxo da solução analisada e o fluxo de água destilada, sob as mesmas condições de temperatura e pressão, foi crescente com o aumento de pressão, sendo de 32% a 5 bar de pressão. Além disso, o aumento no fluxo de permeado foi proporcional ao aumento de pressão, demonstrando que a solução aquosa apresenta baixos efeitos de compactação e de formação de camada gel. No entanto, como o aumento no fluxo foi proporcional ao aumento da pressão, pode-se considerar que a taxa de colmatagem e formação de camada de gel no sistema são muito baixas e que o aumento de pressão não alterou a eficiência do processo.

Miranda (2005) ao estudar a concentração do suco de melancia utilizando tecnologia de membranas, observou que o efeito de *fouling* é menor com a redução da pressão utilizada, mas não foi influenciado pela temperatura. Assim, mesmo para soluções com composições muito diferentes, o efeito de *fouling* geralmente diminui com a diminuição da pressão. Entretanto, a redução do fluxo provocada pela diminuição da pressão pode tornar o processo economicamente inviável.

### **5.3.3. Efeito da temperatura no fluxo de permeado**

Foi feita uma variação de temperatura de 20°C a 45°C, de forma a estudar o seu efeito na variação do fluxo de permeado, enquanto a pressão foi mantida em 5,8 bar, conforme descrito no item 4.4.6. O uso de temperaturas mais altas não foi estudado para não ocorrer degradação de componentes químicos presentes na solução. Normalmente, o aumento de temperatura reduz a viscosidade da solução e aumenta a sua difusividade através da membrana e da camada gel que pode ter sido formada. Foram feitas duas repetições do processamento para comprovar os efeitos. Os dados obtidos para cada repetição podem ser visualizados na Figura 5.6.

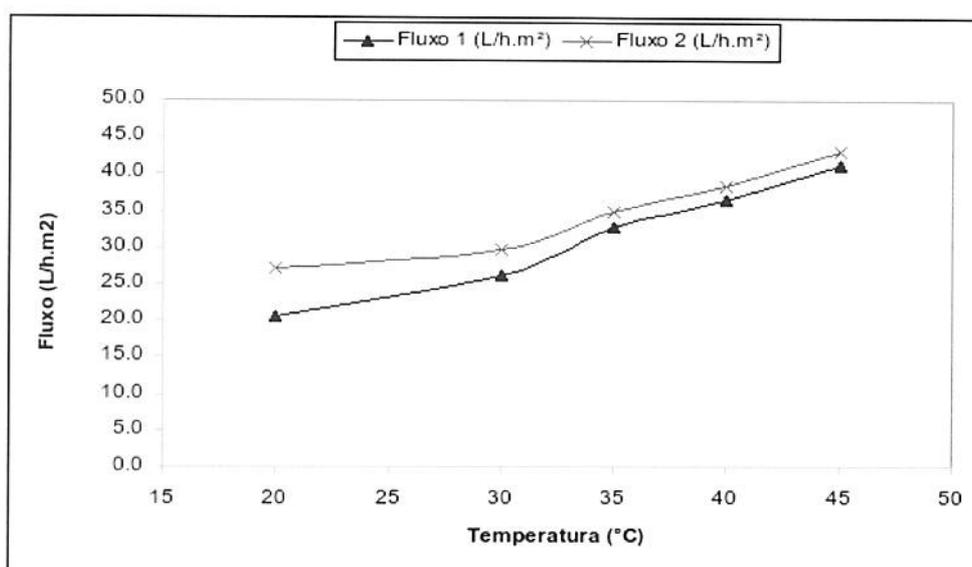


Figura 5.6- Fluxo do permeado em função da temperatura de processamento.

Houve um aumento no fluxo, diretamente relacionado com o aumento de temperatura, nas duas repetições do experimento. O aumento de 25°C da solução possibilitou um fluxo cerca de 100% superior, ou seja, em processos industriais onde é necessário menor tempo de processamento, um aumento de temperatura da solução é aconselhável. No entanto, deve-se considerar que o uso de solução de alimentação a quente aumenta o consumo de energia do processo.

No processo de concentração de vinho tinto (BANVOLGYI et al., 2006) por nanofiltração, o aumento de 20°C na temperatura provocou um aumento no fluxo de permeado de 100%, confirmando que o aumento de temperatura é diretamente proporcional ao aumento do fluxo de permeado.

### 5.3.4. Efeito do tempo de processamento no teor de flavonóides e compostos fenólicos

O teor de flavonóides no permeado foi acompanhado ao longo do processo de concentração em sistema fechado. Foram retiradas amostras do produto permeado, no processamento do extrato aquoso, a cada 10 minutos num total de 60 minutos de processamento, e amostras do produto permeado, no processamento do extrato alcoólico, a cada 5 minutos de um processo total de 30 minutos. Para cada amostra, foram analisados o teor de flavonóides e compostos fenólicos e os resultados estão expressos nas tabelas 5.7 e 5.8:

Tabela 5.7- Influência do tempo de processamento no teor de flavonóides e compostos fenólicos para solução aquosa.

Tempo (min)	Equiv. Quercetina (mg/g)	Equiv. Ác. Galico (mg/g)
1	0,07 ± 0,02	8,41 ± 0,53
10	0,08 ± 0,02	7,47 ± 1,31
20	0,06 ± 0,03	7,02 ± 0,78
30	0,09 ± 0,02	6,72 ± 1,31
40	0,05 ± 0,02	7,22 ± 0,67
50	0,04 ± 0,03	5,02 ± 1,17
60	0,07 ± 0,03	31,49 ± 0,37

Valores representam média ± desvio padrão (n=3)

<sup>a</sup> equivalentes de quercetina

<sup>b</sup> equivalentes de ácido gálico

Tabela 5.8- Influência do tempo de processamento no teor de flavonóides e compostos fenólicos para solução alcoólica.

Tempo (min)	Equiv. Quercetina (mg/g)	Equiv. Ác. Galico (mg/g)
1	5,54 ± 0,19	73,44 ± 1,20
5	19,26 ± 2,76	75,18 ± 0,91
10	11,61 ± 0,84	74,94 ± 0,36
15	4,33 ± 0,69	74,55 ± 0,36
20	21,63 ± 1,78	72,04 ± 1,93
25	6,24 ± 0,57	76,02 ± 1,97
30	7,02 ± 0,96	79,30 ± 0,96

Valores representam média ± desvio padrão (n=3)

<sup>a</sup> equivalentes de quercetina

<sup>b</sup> equivalentes de ácido gálico

O teor de flavonóides presente no permeado da solução aquosa foi praticamente nulo durante todo o processo, como mostrado na tabela 5.7. O teor de compostos fenólicos no permeado foi praticamente constante durante todo o processo e ficou em torno de 7,5 mg/g. No entanto, a última amostra analisada, a 60 minutos de processamento, apresentou uma concentração bem superior, 31,5 mg/g. Esse aumento na concentração de fenólicos no permeado após grande período de processamento, pode ser decorrência de erros durante a amostragem ou de falha na separação após longo período de processo, já que poderia estar passando para a linha de permeado solução não filtrada.

Para o caso da solução alcoólica, o teor de flavonóides no permeado variou bastante durante o processamento, de 5 a 20 mg/g, resultando em perdas de 6 a 30% do teor inicial de flavonóides na solução. Essa variação pode ser decorrência da formação de camada gel e entupimento e maior taxa de *fouling* já que a solução alcoólica apresenta maior concentrações de compostos adesivos que podem interferir na seletividade da membrana. Além disso, pequenas variações na temperatura do sistema podem influenciar no comportamento da membrana frente à solução alcoólica, já que se trata de um sistema

mais sensível às variações de temperatura devido ao solvente e solutos presentes em solução.

Houve uma grande perda de compostos fenólicos para o permeado da solução alcoólica, aproximadamente 76% da quantidade inicial. Essa perda foi constante durante o tempo de operação do sistema. A interação do álcool com a membrana pode provocar um aumento do tamanho dos poros da membrana (entumescimento), possibilitando a permeação de compostos de baixa massa molar. Provavelmente esta deva ser a causa mais provável da perda de retenção da membrana.

De modo geral, o processo de concentração foi muito mais eficaz para a solução aquosa, já que houve perdas muito pequenas de compostos de interesse para o permeado.

### **5.3.5. Efeito da velocidade tangencial no fluxo de permeado**

A turbulência junto à superfície filtrante, seja em filtração perpendicular ou tangencial, controla de maneira importante a formação da zona de polarização e a espessura da camada de gel. Esse efeito de turbulência é mais pronunciado na filtração tangencial, em que a solução escoia a alta velocidade junto à membrana, assim, a velocidade de circulação da solução durante a concentração é de fundamental importância para o fluxo de permeado. No intervalo estudado, em que se variou a frequência da bomba de 45 a 85 Hz, o fluxo de permeado foi proporcional à velocidade tangencial, utilizando-se pressão de 5,8 bar e temperatura de 20°C. Os resultados estão expressos na Figura 5.7.

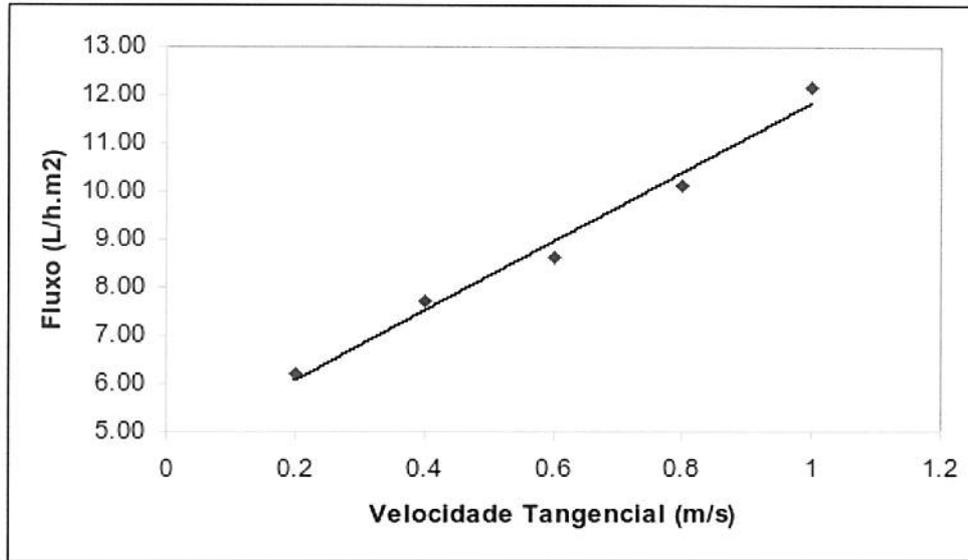


Figura 5.7- Fluxo do permeado em função da velocidade tangencial

Petrus (1997) estudou o efeito da velocidade tangencial no fluxo de permeado do processo de clarificação de suco de maçã por ultrafiltração e constatou um aumento proporcional do fluxo de permeado com o aumento da velocidade tangencial. Neta; Habert e Borges (2005) estudaram o processo de microfiltração de cerveja e verificaram que o fluxo de permeado recuperado aumentava com o aumento da velocidade tangencial, e correlacionaram esse efeito a uma redução nos efeitos da polarização da concentração que ocorre na membrana decorrente do aumento da velocidade com que o fluido passa pela membrana.

### 5.3.6. Histerese

As membranas orgânicas possuem uma tendência à compactação quando submetidas a altas pressões. No entanto, essa compactação é total ou parcialmente reversível na maioria das membranas, ou seja, assim que a pressão exercida sobre a

membrana é finalizada, ela retorna à sua forma original, por possuir uma natureza elástica (PETRUS, 1997). Esse efeito sobre a membrana foi avaliado com a utilização de solução aquosa de própolis sob temperaturas de 30 e 40°C, sendo que o aumento de pressão foi constante de 1,0 até 7,0 bar, seguido de uma diminuição de pressão constante até 2,5 bar, já que na descompressão o fluxo de permeado foi muito baixo em pressões menores que 2,5 bar e os dados foram desconsiderados. Os resultados desse experimento estão demonstrados nas Figuras 5.8 e 5.9:

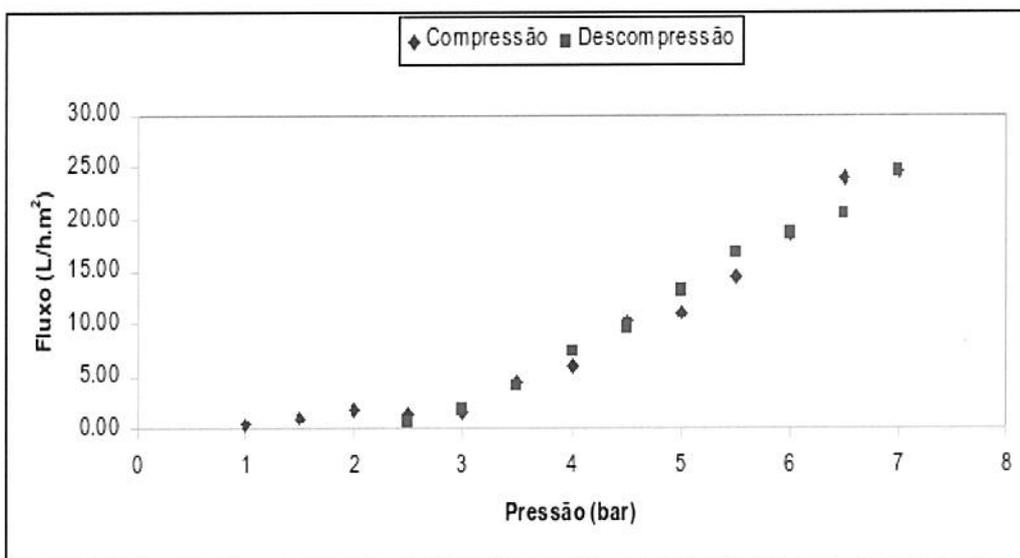


Figura 5.8- Histerese na membrana com solução a 30°C

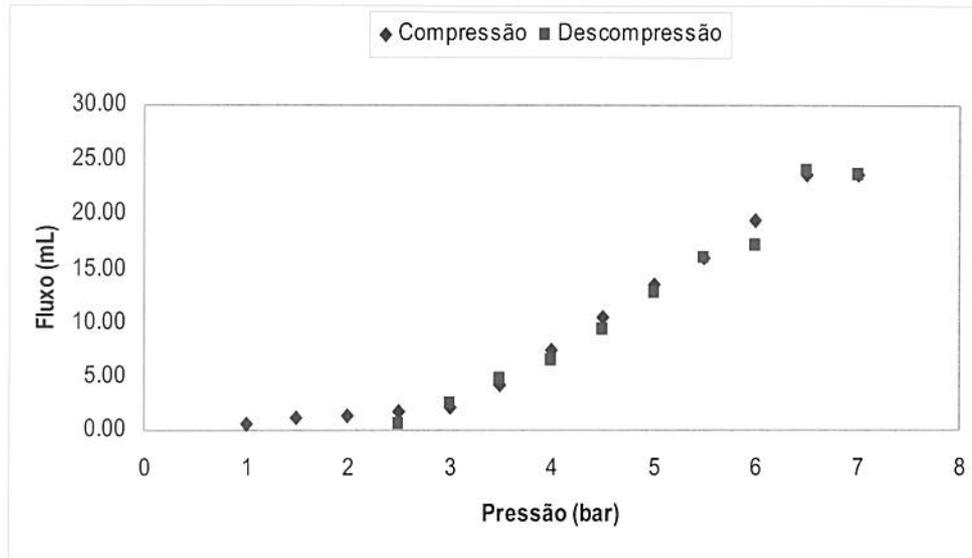


Figura 5.9- Histerese na membrana com solução a 40°C

Observa-se pelos resultados dos experimentos que houve pouca variação no fluxo do permeado ao se comparar o caminho do aumento da pressão e o caminho do alívio de pressão. Isso significa que a membrana se comportou de maneira elástica e a sua compactação foi totalmente reversível. Além disso, não houve variação significativa no grau de compactação da membrana com o aumento de temperatura, podendo-se concluir que o aumento de temperatura, no intervalo utilizado, não acarretou em uma variação na histerese.

No processo de ultrafiltração do suco de maçã, o fenômeno da histerese foi mais pronunciado, ocorrendo maior variação entre o fluxo de permeado entre a compactação e a descompactação da membrana. Além disso, o mesmo comportamento foi observado em diferentes temperaturas, ou seja, o aumento de temperatura não acarretou em maior compactação da membrana (PETRUS, 1997).

## 5.4. Caracterização das soluções pós-concentração

### 5.4.1. Viscosidade e Densidade

Os produtos resultantes do processo de nanofiltração, permeado e retentado, foram analisados de acordo com o teor de compostos fenólicos e flavonóides, viscosidade, densidade e HPLC e comparados com as soluções iniciais. Os dados de viscosidade e densidade, medidos em triplicata e calculados de acordo com o item 4.3.1, estão expressos na Tabela 5.9:

Tabela 5.9- Densidade e viscosidade das soluções obtidas por nanofiltração.

	<b>Solução</b>	<b>Densidade (g/mL)</b>	<b>Viscosidade (Kg/(m.s))</b>
Extrato Alcoólico	Inicial	0,902 ± 0,001	(3,15 ± 0,01)E-3
	Concentrado	0,951 ± 0,001	(5,06 ± 0,04)E-3
	Permeado	0,886 ± 0,001	(2,48 ± 0,01)E-3
Extrato Aquoso	Inicial	1,004 ± 0,005	(1,080 ± 0,003)E-3
	Concentrado	1,030 ± 0,001	(1,430 ± 0,004)E-3
	Permeado	0,998 ± 0,001	(1,040 ± 0,001)E-3

Valores representam média ± desvio padrão (n=3)

O aumento de viscosidade e de densidade das soluções concentradas já era previsto, de acordo com os ensaios de viscosidade executados preliminarmente (item 5.1.1), e evidencia o efeito do processo de concentração, já que a diminuição da quantidade de solvente em solução ocasiona um aumento na densidade e viscosidade da solução, devido ao aumento na concentração de compostos de maior massa molar. Os resultados obtidos também demonstram que o aumento da viscosidade da solução alcoólica foi da ordem de

58% e na solução aquosa o aumento foi de 32%, valores que não desfavorecem o uso de membranas no processo de concentração de soluções de própolis, pois apesar do aumento da viscosidade, ainda são valores relativamente baixos, e as soluções se comportam como fluidos newtonianos.

Os dados de viscosidade da solução aquosa foram verificados também utilizando reômetro de tensão controlada com geometria cone-placa. Para o extrato inicial, concentrado e permeado, foram obtidos os seguintes valores em Kg/m.s, dados pela Tabela 5.10.

Tabela 5.10- Comparação da viscosidade da solução aquosa

Solução	Viscosidade <sup>1</sup> (Kg/(m.s))	Viscosidade <sup>2</sup> (Kg/(m.s))
Inicial	(1,080 ± 0,003)E-3	(1,65 ± 0,37)E-2
Concentrado	(1,430 ± 0,004)E-3	(1,71 ± 0,16)E-2
Permeado	(1,040 ± 0,001)E-3	(1,28 ± 0,42)E-2

Valores representam média ± desvio padrão (n=3)

<sup>1</sup>= Canon-Fenske

<sup>2</sup>=Reômetro tensão controlada

Os valores dados pelo viscosímetro diferem dos valores encontrados pelo Canon-Fenske, mas expressam a mesma ordem de grandeza. Assim, para análises de comportamento das soluções, o viscosímetro se mostra um meio rápido e eficiente.

Além disso, também analisou-se, através do reômetro, o comportamento dos fluidos e verificou-se que a solução aquosa mais concentrada ainda apresentou um comportamento newtoniano, comprovado pela reta obtida no gráfico de deformação versus cisalhamento.

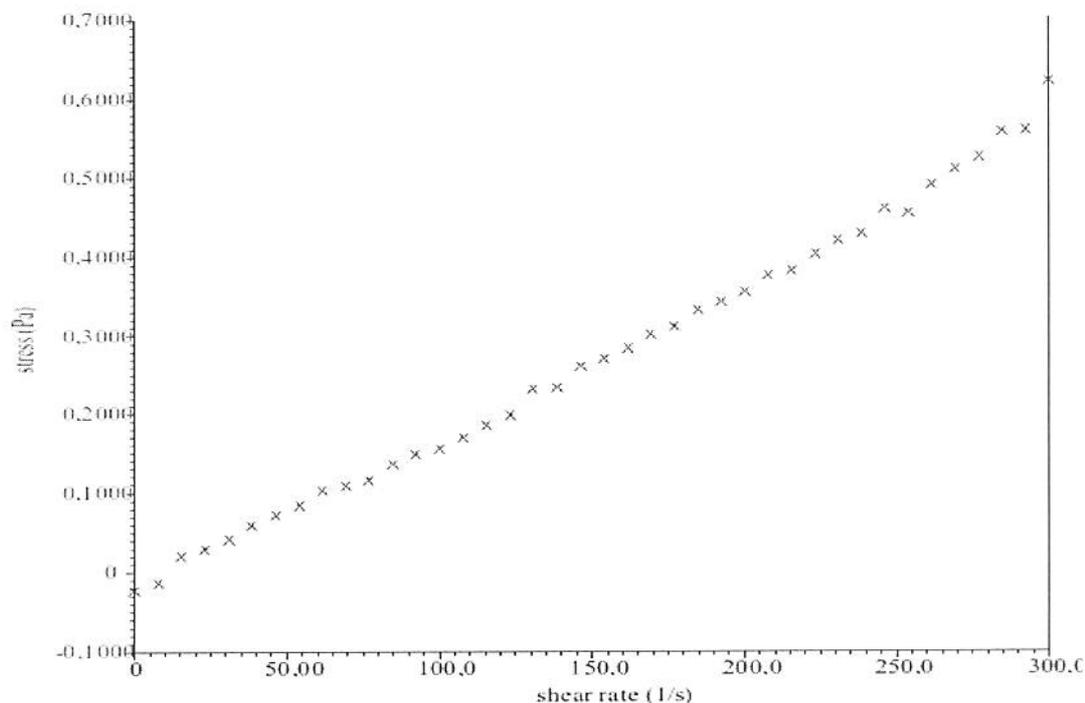


Figura 5.10- Deformação versus cisalhamento para solução aquosa concentrada.

#### 5.4.2. Teor de flavonóides e compostos fenólicos

As soluções obtidas após o processo de nanofiltração foram submetidas à análise espectrofotométrica, conforme descrito nos itens 4.3.2 e 4.3.3. A solução aquosa concentrada apresentou um fator de concentração de 3,88 enquanto para a solução alcoólica concentrada este valor foi de 4,37. Os resultados indicam que houve poucas perdas de compostos fenólicos e flavonóides para o permeado do processo com solução aquosa. Para o caso da solução alcoólica, as perdas para o permeado foram mais acentuadas, principalmente de compostos fenólicos, que apresentam baixa massa molar, conforme pode ser verificado na Tabela 5.11.

Tabela 5.11- Teor de flavonóides e fenólicos após concentração por membrana.

	<b>Solução</b>	<b>Teor flavonóides (mg/g)<sup>a</sup></b>	<b>Teor fenólicos (mg/g)<sup>b</sup></b>
Extrato Alcoólico	Inicial	69,35 ± 0,38	98,74 ± 0,96
	Concentrado	71,93 ± 0,21	105,08 ± 1,5
	Permeado	6,95 ± 2,49	75,07 ± 2,1
Extrato Aquoso	Inicial	23,67 ± 2,14	36,57 ± 0,35
	Concentrado	96,76 ± 2,35	104,74 ± 1,41
	Permeado	0,003 ± 0,003	7,51 ± 1,61

Valores representam média ± desvio padrão (n=3)

<sup>a</sup> equivalentes de quercetina

<sup>b</sup> equivalentes de ácido gálico

Analisando-se os dados obtidos para a solução aquosa concentrada, percebe-se que, diferentemente da solução inicial, o teor de compostos fenólicos se enquadra nas determinações do Ministério da Agricultura, possibilitando a sua comercialização, já que o teor de compostos fenólicos passou de 3,65% (m/m), conforme os valores indicados na Tabela 5.6, para 10,47%. Houve uma retenção de cerca de 99% dos flavonóides na solução aquosa e de quase 80% de compostos fenólicos, resultando numa solução concentrada com quatro vezes mais flavonóides e três vezes mais compostos fenólicos que a solução inicial. A Figura 5.11 mostra a variação entre o extrato inicial, o permeado e o retentado do processo de concentração do extrato aquoso da própolis:

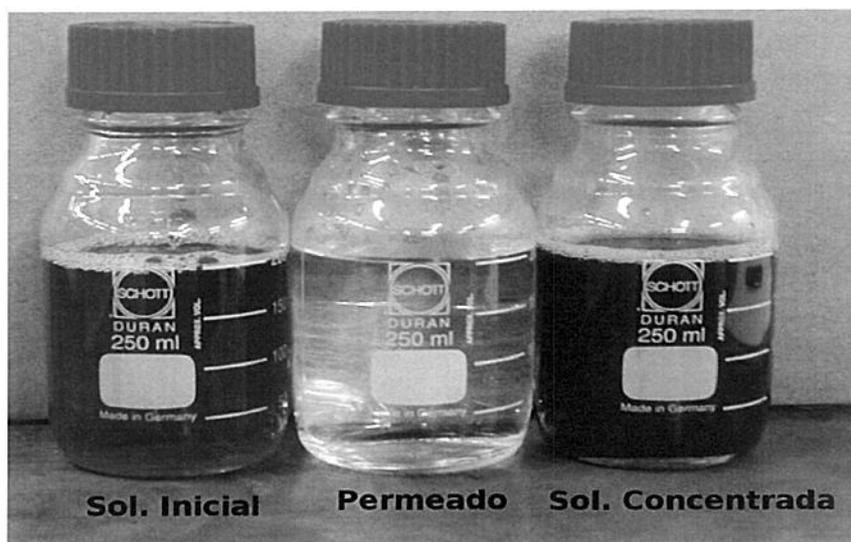


Figura 5.11- Solução aquosa nas diferentes etapas do processamento.

Os resultados obtidos para teor de flavonóides e compostos fenólicos pelos métodos espectrofotométricos foram comprovados por análises de HPLC, conforme descrito no item 4.3.4. Foram injetados 20  $\mu\text{L}$  de solução no equipamento, sendo que para as soluções aquosas inicial e concentrada foram diluídas na ordem de 300  $\mu\text{L}$  em 1,5 mL de água destilada e a amostra de permeado foi injetada sem diluição. As substâncias foram identificadas comparando-se com padrões da literatura. Os cromatogramas obtidos para a solução aquosa de própolis inicial, produto retentado e produto permeado, estão representados nas figuras 5.12 a 5.14, respectivamente:

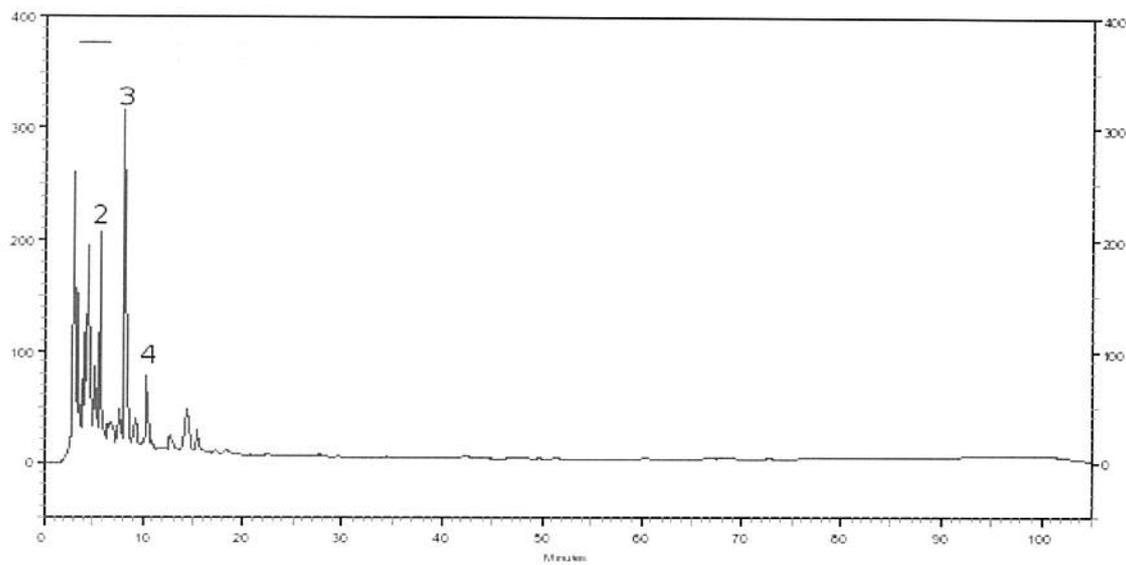


Figura 5.12- Cromatograma da solução aquosa inicial

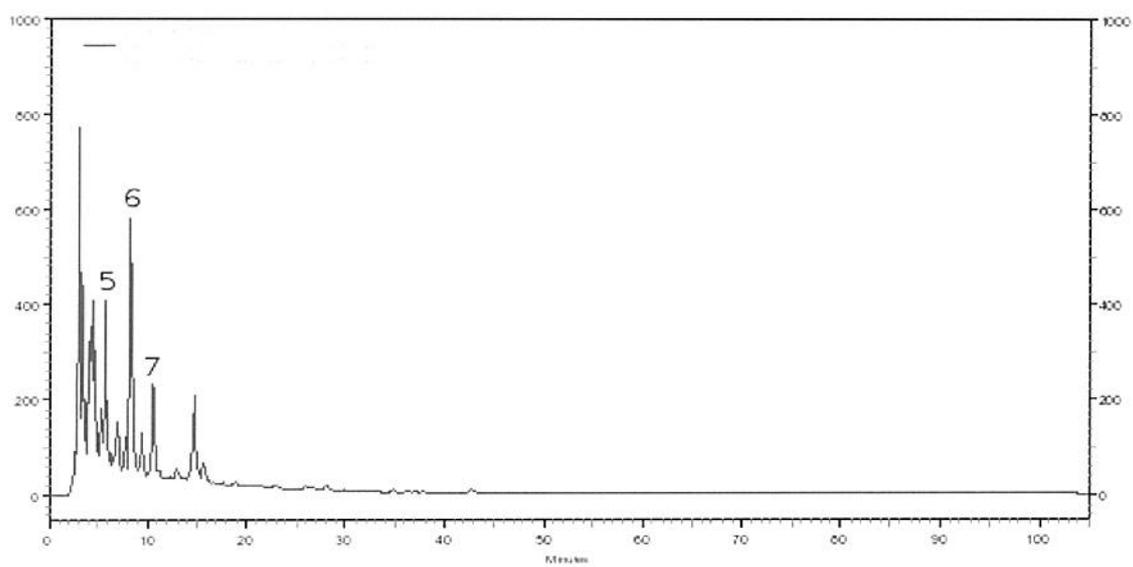


Figura 5.13- Cromatograma da solução aquosa concentrada

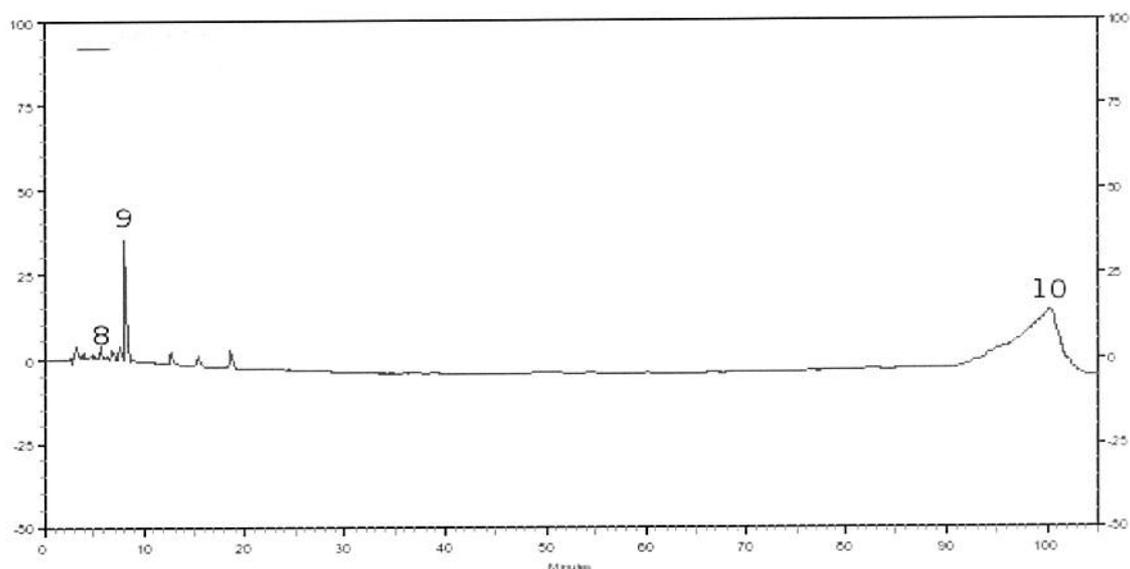


Figura 5.14- Cromatograma do permeado da solução aquosa

Analisando os cromatogramas, pode-se identificar alguns dos picos obtidos com padrões de cromatografia da literatura. Os compostos identificados, suas concentrações e os picos aos quais se referem, estão expressos na Tabela 5.12.

Tabela 5.12- Concentração de alguns compostos identificados por HPLC nas soluções aquosas.

Solução	Composto	Número pico	Concentração (mg/mL)
Inicial	Ácido Caféico	2	1,04
	Ácido Cumárico	3	1,50
	Ácido Ferrúlico	4	0,92
Concentrado	Ácido Caféico	5	2,31
	Ácido Cumárico	6	0,88
	Ácido Ferrúlico	7	1,56
Permeado	Ácido Caféico	8	0,25
	Ácido Cumárico	9	0,41

Todas as soluções aquosas apresentam picos situados na região que representa tempo de retenção de até 20 minutos. Isso ocorre pela tendência que a água tem em extrair compostos polares. O último pico, representado pelo número 9, identificado na solução de permeado provavelmente não representa um composto isolado e sim um interferente no sistema, já que o mesmo composto não esteve presente nos outros cromatogramas.

O ácido ferrúlico não foi identificado no permeado, podendo-se concluir que não houve perdas deste composto para o produto permeado. Os outros picos presentes nos cromatogramas representam outros compostos, mas que não foram identificados dentre os padrões da literatura. A baixa quantidade de compostos presentes na solução do permeado (baixa quantidade de picos) e a baixa concentração dos compostos ali presentes, evidenciam a eficácia do processo de concentração.

Park et al. (1998) analisaram a solução aquosa de própolis preparada em laboratório por cromatografia líquida de alta eficiência e obtiveram resultados muito semelhantes ao cromatograma representado na Figura 5.12, com a presença de picos obtidos em tempos de retenção pequenos, representando substâncias polares, onde foram identificados os compostos quercetina e pinocembrina. As substâncias foram detectadas em pequenas concentrações e aumentaram conforme o solvente foi alterado para uma solução composta de água e álcool em diferentes concentrações. Quanto maior a quantidade de álcool no solvente, maior a concentração dos compostos extraídos.

Para a análise das soluções alcoólicas inicial e concentrada, foram injetados 10  $\mu\text{L}$  de solução no equipamento, diluídas na ordem de 300  $\mu\text{L}$  em 1,5 mL de água destilada e foi injetado 5  $\mu\text{L}$  da amostra de permeado, sem diluição. Os cromatogramas obtidos para a solução alcoólica inicial, concentrada e permeada estão representados nas Figuras 5.15 a 5.17.

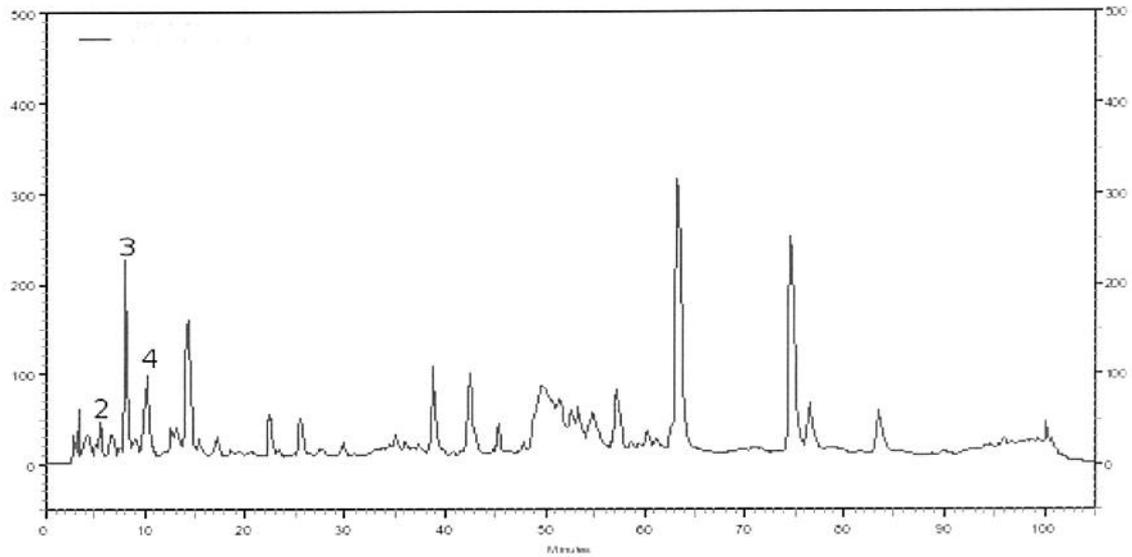


Figura 5.15- Cromatograma da solução alcoólica inicial

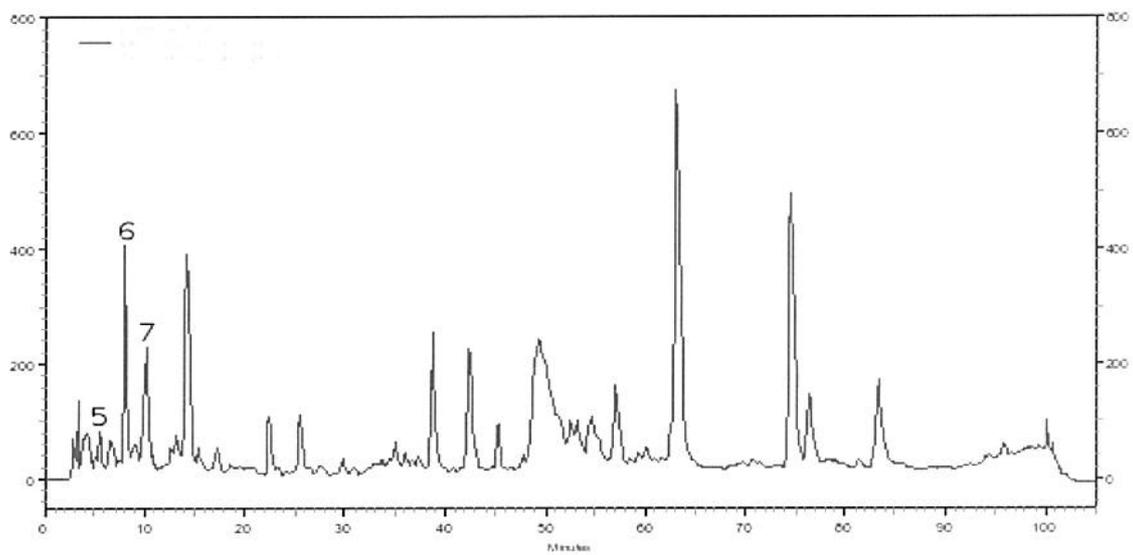


Figura 5.16- Cromatograma da solução alcoólica concentrada

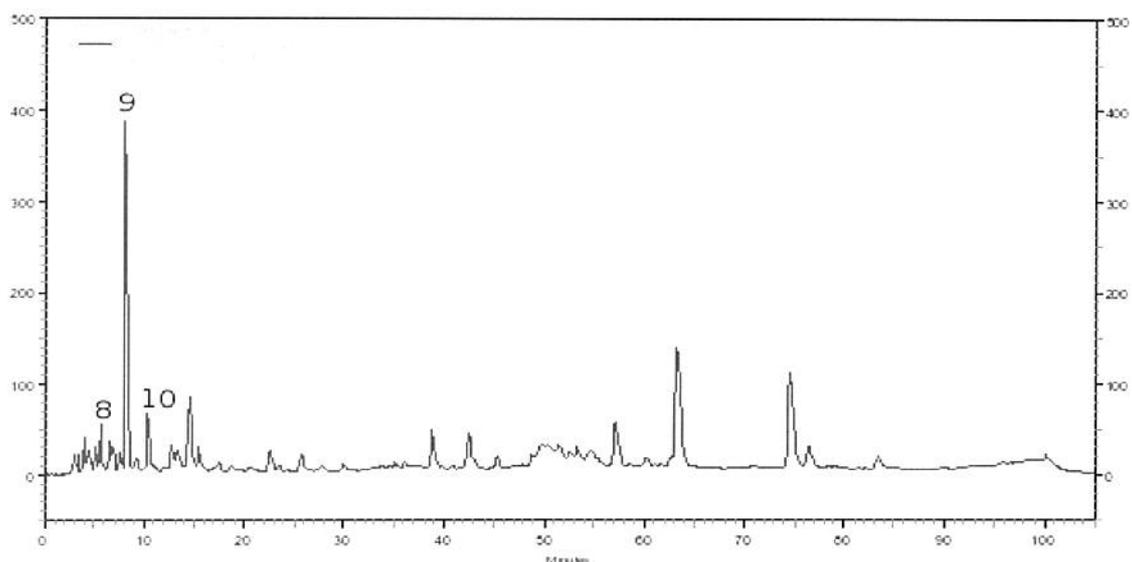


Figura 5.17- Cromatograma do permeado da solução alcoólica

A análise dos cromatogramas permitiu identificar alguns compostos através de comparação com padrões de cromatografia da literatura. Os compostos identificados e suas concentrações estão indicados na Tabela 5.13:

Tabela 5.13- Concentração de alguns compostos identificados por HPLC nas soluções alcoólicas.

Solução	Composto	Número pico	Concentração (mg/mL)
Inicial	Ácido Caféico	2	1,10
	Ácido Cumárico	3	2,89
	Ácido Ferrúlico	4	3,04
Concentrado	Ácido Caféico	5	1,65
	Ácido Cumárico	6	4,59
	Ácido Ferrúlico	7	6,01
Permeado	Ácido Caféico	8	0,41
	Ácido Cumárico	9	1,34
	Ácido Ferrúlico	10	0,70

Para o caso das soluções alcoólicas, ocorrem picos durante todo o tempo de análise. Os compostos que apresentaram tempo de retenção acima de 20 minutos são compostos apolares que são mais facilmente extraídos pelo álcool. Observa-se o composto que apresentou maior perda para o permeado (maior pico no cromatograma representado pela Figura 26) foi o ácido cumárico. Este ácido pertence à família dos ácidos fenólicos e possui baixa massa molar. Os resultados obtidos por análise espectrofotométrica já haviam apontado grande perda de compostos fenólicos, sendo um indicativo do que ocorreu com o ácido cumárico, dentre outros, que foram evidenciados pelo HPLC.

Alencar (2002) analisou o extrato da própolis de várias regiões do país. O cromatograma obtido para o extrato alcoólico da própolis proveniente do estado de São Paulo foi muito semelhante aos resultados representados na Figura 5.15. Entretanto, este autor identificou além do ácido cumárico e do ácido ferúlico, os compostos pinobanksina, kanferol, apigenina, isosakuranetina e kanferide. Neste trabalho também foi feita uma comparação do cromatograma obtido para o extrato de própolis com o cromatograma obtido do extrato metanólico de alecrim do campo, e os resultados foram muito semelhantes. Esse resultado evidencia a origem vegetal da própolis.

A partir dos dados das Tabelas 5.12 e 5.13, calculou-se os índices de retenção, conforme equação 3.3, para os compostos identificados nas soluções, e os resultados estão expressos na tabela a seguir:

Tabela 5.14- Índice de retenção dos compostos avaliados.

<b>Composto</b>	<b>Solução aquosa</b>	<b>Solução alcoólica</b>
Ácido Caféico	0,89	0,75
Ácido Cumárico	0,53	0,71
Ácido Ferrúlico	1,00	0,88

Os dados do índice de retenção evidenciam que a solução aquosa apresentou menor perda de compostos para o permeado em relação à solução alcoólica. O ácido cumárico apresenta-se como uma exceção, já que apenas 53% do composto não foram perdidos para o permeado. Mesmo com as perdas de compostos, os índices obtidos são altos e validam o processo de nanofiltração dos extratos de própolis.

Banvolgyi et al. (2006) durante o estudo do processo de concentração do vinho tinto por nanofiltração, obtiveram retenção de 88% dos ácidos totais, 50% dos ácidos sulfúricos livres e 93% dos extratos totais, que indicam alguns dos compostos por eles estudados. Tsui; Cheryan (2007) durante o processo de purificação de xantofila por nanofiltração, conseguiram retenção de 90% para sólidos totais, 88% para proteínas e 98% para xantofila, principal composto do estudo.

## 6. Conclusões

1. O processo de nanofiltração se apresentou como a melhor alternativa dentre as disponíveis na tecnologia de membranas para a concentração dos extratos de própolis, já que apresentou boa retenção de flavonóides e compostos fenólicos e necessita de menor quantidade de energia em comparação com o processo de osmose reversa.

2. A alteração do pH do meio de extração da própolis mostrou resultados positivos para o caso da solução aquosa, em meio básico. A extração mantida em pH 8,0 apresentou teor de flavonóides quase 160% superior em relação ao extrato inicial e conseguiu extrair compostos apolares que, normalmente, não são extraídos pela água pura.

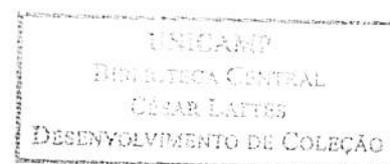
3. Através da evaporação do solvente dos extratos aquoso e alcoólico da própolis, pode-se verificar que as variações de densidade e viscosidade foram pequenas, e os fluidos ainda se comportaram como fluidos newtonianos. Dessa forma, a alteração na viscosidade com a concentração exercerá pouca influência durante o tratamento com membranas.

4. A concentração por nanofiltração feita com o extrato aquoso da própolis mostrou-se eficaz, já que houve poucas perdas de compostos fenólicos e flavonóides para o permeado do processo. Além disso, o fluxo foi alto e com pouco decaimento ao longo do tempo de processamento, evidenciando a viabilidade do processo.

5. A solução alcoólica não apresentou resultados a mesma retenção de

compostos que a solução aquosa, já que houve maior perda de flavonóides e compostos fenólicos para o permeado, além de se tratar de um solvente que envolve mais riscos de manipulação. O processo também é mais oneroso neste caso devido ao alto custo envolvido para limpeza da membrana.

6. A análise dos cromatogramas demonstrou que houve uma grande concentração dos compostos identificados, mesmo no caso da solução alcoólica. Esta resposta comprova os dados obtidos pelas análises espectrofotométricas e valida o processo de nanofiltração dos extratos de própolis, especialmente em meio aquoso.





## **7. Sugestões para trabalhos futuros**

1. Analisar as atividades antimicrobiana e antioxidante dos extratos aquosos preparados em diferentes pHs para verificar a viabilidade do uso desta solução para estes fins e também analisar estas atividades nos produtos concentrados por nanofiltração.

2. Verificar, através de modelagem matemática a influência dos parâmetros de processo no fluxo de permeado e retenção de compostos de interesse.

3. Ajustar a curva obtida para o fluxo de permeado a modelos de processos de concentração.

4. Avaliar a eficiência do processo de concentração com membranas utilizando-se extratos aquosos de própolis em diferentes pHs.

5. Testar o uso de emulsificantes em diferentes concentrações para realização da extração da própolis em meio aquoso e analisar a influência da alteração do pH do meio na extração de flavonóides e compostos fenólicos.



## 8. Bibliografia

ADELMANN, J. **Própolis: Variabilidade Composicional, Correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/antioxidante.** Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 185 p. 2005.

ALENCAR, S.M. **Estudo Fitoquímico da Origem Botânica da Própolis e Avaliação da Composição Química de Mel de *Apis mellifera* Africanizada de Diferentes Regiões do Brasil.** Tese de Doutorado - Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas: Universidade Estadual de Campinas. 120p. 2002.

AMJAD, Z. **Reverse Osmosis – Membrane Technology, Water Chemistry, and Industrial Applications.** Chapman & Hall, New York, 1993.

BAKER, R. W. **Membrane Technology and Applications.** John Wiley & Sons, 2004.

BANKOVA, V.; DYULGEROV, A.; POPOV, S.; EVSTATIEVA, L.; KULEVA, L.; PUREB, O. & ZAMJANSAN, Z. Propolis produced in Bulgaria and Mongolia: phenolic compounds and plant origin. **Apidologie** **23**: 79-85, 1992.

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

Bee history. Disponível em <<http://gears.tucson.ars.ag.gov/beebook/sec1/sec1.html>>  
Acesso em 07/10/2006,

BITTER, J. G. A., **Transport Mechanisms in Membrane Separation Processes. Reverse Osmosis – Membrane Technology, Water Chemistry, and Industrial Applications.** Plenum Press, New York, 1991.

BONVEHÍ, J. S.; COLL, F. V.; JORDÀ, R. E. The Composition, Active Components and Bacteriostatic Activity of Propolis in Dietetics. **Journal of American Oil Chemical Society**, v. 71, n.5, p. 529-532, 1993.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Instrução normativa nº3 – ANEXO VI – Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil.** Brasília, 19 jan. 2001.

BRUSCHI, M. L.; FRANCO, S. L.; GREMIÃO, P. D. Application of an HPLC method for analysis of propolis extract. **Journal of liquid chromatography & related technologies**, v. 26, n. 14, p. 2399-2409, 2003.

BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of the bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, p. 347-363, 1998.

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

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

FUNARI, C. S., FERRO, V. O. Análise de Própolis. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 171-178, 2006.

GARDZIELLA, A.; PILATO, L. A.; KNOP, A. **Phenolic Resins: Chemistry, Applications, Standardization, Safety, and Ecology**. Springer, New York, 2000.

GEANKOPOLIS, C. J. **Transport processes and Separation Processes Principles**. Pearson Education Inc, New Jersey, 2003.

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.

GÓMEZ-CARAVACA, A.M.; GÓMEZ-ROMERO, M.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; SEGURA-CARRATERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Advances in the analysis of the phenolic compounds in products derived from bees. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 1220-1234, 2006.

GROTEWOLD, E., **The Science of Flavonoids**. Springer, New York, 2006.

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

JUN, X. Comparison of antioxidant activity of ethanolic extracts of propolis obtained by different extractions methods. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, v.84, p. 447-451, 2006.

KIMOTO, T.; KOYA, S.; HINO, K.; YAMAMOTO, Y.; NOMURA, Y.; MICALLEF, M.J.; HANAYA, T.; ARAI, S.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M. Renal carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice, and protection from it by Brazilian propolis and Artepilin C. **Pathology International**, v. 50, p. 679-689, 2000.

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**, v. 75, 2004.

KOO, H. **Estudo dos Flavonóides da Própolis de *Apis mellifera* africanizada provenientes de diversas regiões do Brasil**. Dissertação de mestrado - Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas: Universidade Estadual de Campinas. 67 p. 1996.

KRELL, R. **Value-added products from beekeeping**. FAO agricultural services bulletin no. 124, 1996. Disponível em <<http://www.fao.org/docrep/w0076e/w0076e00.HTM>> Acesso em 29/11/2007.

KUMAZAWA, S.; HAMASAK, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of various geographic origins. **Food Chemistry**, v. 84, p. 329 – 339, 2004.

LONGHINI, R.; SHEILA, M.; RAKSA, S.; OLIVEIRA, A.C.P.; SVIDZINSKI, T.I.E.; FRANCO, S.L. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p. 388-395, 2007.

MANNAPPERUMA, J. D. Design and Performance Evaluation of Membrane Systems. In:VALENTAS, J. K.; ROTSTEIN, E.; SINGH, R. P. (Ed.) **Handbook of Food Engineering Practice**. CRC Press, 1997.

MARAIS, J.P.J.; DEAVOURS, B.; DIXON, R.A.; FERREIRA, D. The Stereochemistry of flavonoids. In:GROTEWOLD, E., **The Science of Flavonoids**. Springer, New York, 2006.

MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, v. 19, p. 529-535, 1996.

MARCUCCI, M. C.; WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Uso de Cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. **Mensagem Doce**, v. 46, 1998.

MAROULIS, Z.B.; SARAVACOS, G.D. **Food Process Design**. Marcel Dekker, Inc., New York, 2003. Cap. 10.

MIRANDA, K. F. **Estudo da concentração de licopeno por ultrafiltração a partir de suco de melancia (*Citrullus vulgaris* Schard)**. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas: Universidade Estadual de Campinas. 149 p. 2005.

MORAES, C. S. **Estudo comparativo de diferentes extrações de própolis dos grupos 12 e 13 e suas atividades biológicas**. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas: Universidade Estadual de Campinas. 118p.

MOURA, F. F. **Contribuição das Propriedades Físico-Químicas e Biológicas da Própolis Produzida por *Apis mellifera* na Região Nordeste do Brasil**. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas: Universidade Estadual de Campinas. 69p. 2000.

NETA, L.S.F.; HABERT, A.C.; BORGES, A.P. Cerveja microfiltrada: processo e qualidade. **Brazilian Journal of Food Technology**, 5°SIPAL, 2005.

OLDONI, T. L. C. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera***. Dissertação de Mestrado - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba: Universidade de São Paulo. 104 p. 2007.

OLIVEIRA, D. R. **Pré-tratamento do processo de osmose inversa utilizando microfiltração e investigação de técnicas de limpeza e recuperação de membranas.** Dissertação de Mestrado - Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro. 127 p. 2007.

ORSOLIC, N.; BASIC, I. Water-soluble derivative of propolis and its polyphenolic compounds enhance tumocidal activity of macrophages. **Journal of Ethno-Pharmacology**, v. 102, p. 37-45, 2005.

OSADA, Y.; NAKAGAWA, T. **Membrane Science and Technology.** Marcel dekker, Inc., New York, 1992.

PANCIERA, A. L.; PEREIRA, D. S.; MORENO, I. A. M.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M. Estudo da influência de agentes emulsificantes na extração aquosa de compostos fenólicos da própolis. **Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo**, 2004.

PARK, Y. P.; IKEGAKI, M.; ABREU, J. A. D. S.; ALCICI, N. M. F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18. n.3. 1998.

PARK, Y. P.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M. Classificação das própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. **Mensagem Doce**, v. 58, p. 2-7, 2000.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.50, p. 2502-2506, 2002.

PEREIRA, A. D. S.; SEIXAS, F. R. M. S.; NETO, F. R. D. A. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 25, p. 321-326, 2002.

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

PILIPOVIK, M. V.; RIVEROL, C. Assessing dealcoholization systems based on reverse osmosis. **Journal of food engineering**, v. 69, p.437-441, 2005.

Portal da Cidadania, 2002. Disponível em <<http://www.radiobras.gov.br/ct/materia.phtml?materia=86597>> Acesso em 07/10/2006

Produção de Mel – Embrapa, 2002. Disponível em  
<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/importancia.htm>>  
Acesso em 07/10/2006.

Própolis: Correlação Química e Biológica, 2002. Disponível em  
<[http://www.chemkeys.com/bra/md/tee\\_7/pcqeb\\_2/pcqeb\\_2.htm](http://www.chemkeys.com/bra/md/tee_7/pcqeb_2/pcqeb_2.htm)> Acesso em 07/10/2006

RAUTENBACH, R. ALBRECHT, R. **Membrane Processes**. John Wiley & Sons Ltd, New York, 1989.

RIJN C.J.M, **Nano and Micro Engineered Membrane Technology**, Elsevier, Amsterdam, 2005

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

SEBRAE. **Informações de Mercado sobre mel e derivados da colméia**. Relatório completo. Brasília, 243p. 2006

SCHÄFER, A.I.; FANE, A.G; WAITE, T.D. **Nanofiltration – Principles and Applications**. Elsevier, Great Britain, 2006.

SILVA, F. T. **Concentração de Suco de laranja (*Citrus sinensis*) por osmose inversa.** Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas: Universidade Estadual de Campinas. 110p. 1995.

SILVA, J. F. M.; SOUZA, M. C.; MATTA, S. R.; ANDRADE, M. R.; VIDAL, F. V. N. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. **Food Chemistry**, v.99, p. 431-435, 2006.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n.1, p. 71-81, 2002.

STOBIECKI, M.; KACHLICKI, P. Isolation and Identification of Flavonoids In: GROTEWOLD, E. **The Science of Flavonoids**. Springer, New York, 2006.

SUZUKI, I. A Própolis de Solução Aquosa. **Mensagem Doce**, v. 58, 2000.

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

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.

WOISKY, R. G. **Métodos de Controle Químico de Amostras de Própolis**. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. São Paulo: Universidade Estadual de São Paulo. 74p. 1996.

XI, J.; SHOUQIN, Z. Antioxidant activity of ethanolic extracts of propolis by high hydrostatic pressure extration. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 42, p. 1350-1356, 2007.



---

## APÊNDICE I

Especificações da própolis bruta



### Descrição

Própolis bruta fabricada 15/06/07, com validade até 15/06/09, embalada em embalagens plásticas individuais de 1Kg e embalagem secundária de papelão contendo 10Kg.

### Propriedades Organolépticas

	<b>Resultado</b>	<b>Especificado</b>
Cor	Conforme	Cores escuras variadas
Granulometria	Conforme	Heterogênea > 7,0 mm
Consistência	Conforme	Maleável a rígida (temperatura ambiente)

### Análises Físico-Químicas

	<b>Resultado</b>	<b>Especificado</b>
Umidade	5,03% (m/m)	Máximo 8% (m/m)
Cera	23,12% (m/m)	Máximo 25% (m/m)
Flavonóides	4,28% (m/m)	Mínimo 0,5% (m/m)
Solúveis em etanol	44,37% (m/m)	Mínimo 35% (m/m)



---

## APÊNDICE II

Curvas padrão de quercetina e ácido gálico



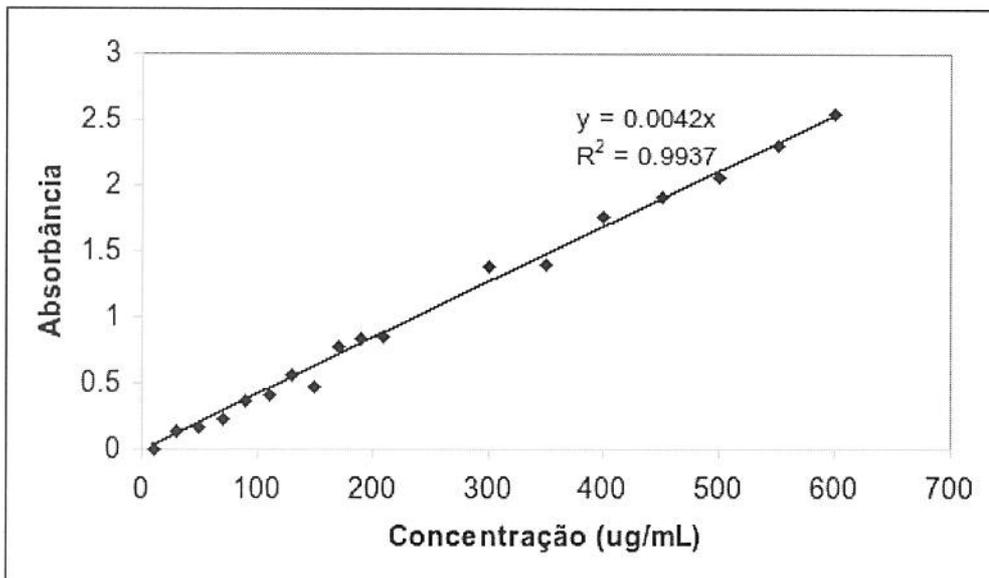


Figura AII.1- Curva padrão de quercetina hidratada

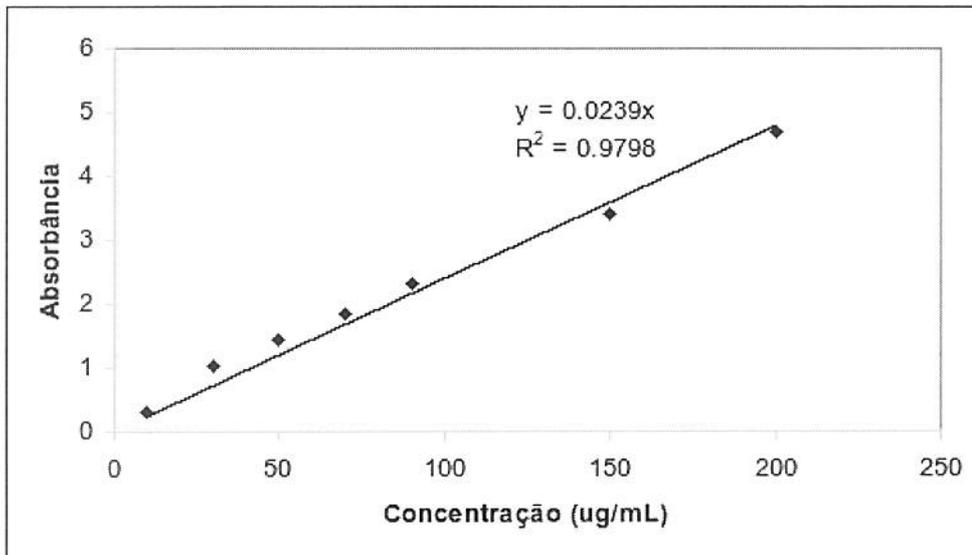


Figura AII.2- Curva padrão de ácido gálico



---

## APÊNDICE III

Fotos dos equipamentos utilizados nos ensaios de concentração por membranas



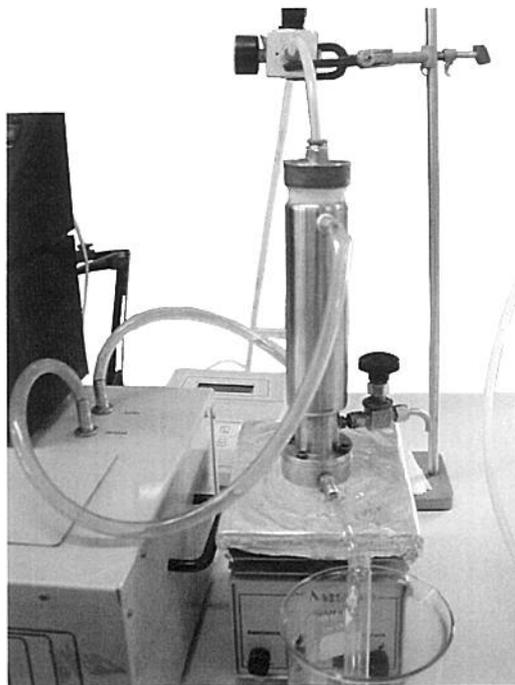


Figura AIII.1- Unidade de membrana utilizada nos ensaios preliminares

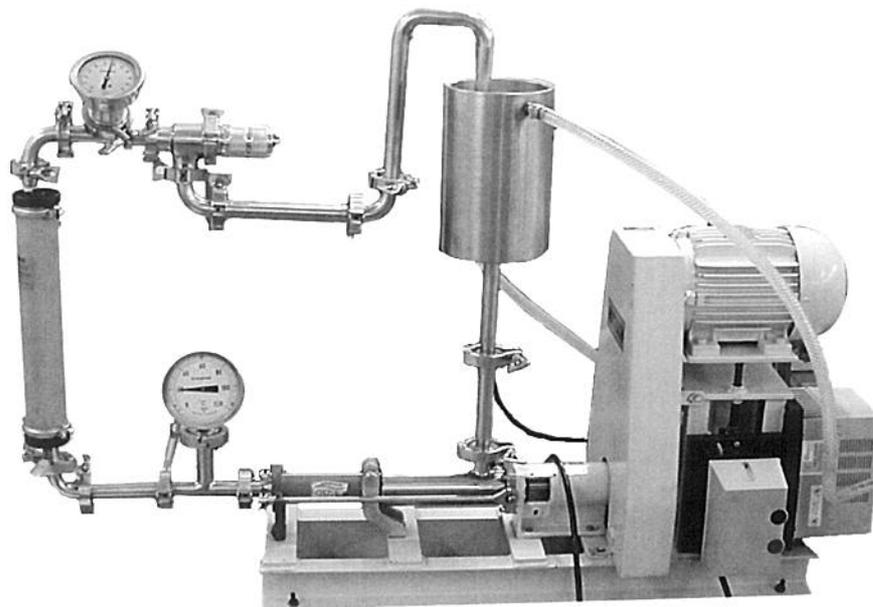


Figura AIII.2- Unidade de membrana utilizada no processo de concentração

