

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Extração, clarificação e estabilização de betalaínas provenientes de talos  
de beterraba vermelha (*Beta vulgaris L.*)**

Cláudia Destro dos Santos

Porto Alegre

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Extração, clarificação e estabilização de betalínas provenientes de talos  
de beterraba vermelha (*Beta vulgaris L.*)**

Cláudia Destro dos Santos

Tese de doutorado apresentado como requisito para  
obtenção do título de Doutora em Engenharia.

Área de concentração: Fenômenos de Transporte e  
Operações unitárias

Orientadoras:

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Isabel Cristina Tessaro

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lígia Damasceno Ferreira Marczak

Professora Colaboradora:

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Aline Schilling Cassini

Porto Alegre

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a tese de doutorado *Extração, clarificação e estabilização de betalaínas provenientes de talos de beterraba vermelha (Beta vulgaris L.)* elaborado por Cláudia Destro dos Santos, como requisito para obtenção do título de Doutora em Engenharia.

Comissão Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniele Misturini Rossi

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Poliana Deyse Gurak

---

Prof. Dr. Rafael Aislan Amaral

*“Oh, my, my, how beautiful  
Oh, my beautiful mother  
She told me, son, in life you're gonna go far  
If you do it right, you'll love where you are  
Just know, wherever you go  
You can always come home  
Oh, my, my, how beautiful,  
Oh, my irrefutable father  
He told me, son, sometimes it may seem dark  
But the absence of the light is a necessary part  
Just know, you're never alone,  
You can always come back home”*

93 Million Miles - Jason Mraz

## Agradecimentos

A Deus, por ser perfeito e presente. Obrigada pela vida, por me ajudar a superar todos os obstáculos e aprender com cada um deles. Obrigada também pelas pessoas maravilhosas que colocaste em minha vida.

À minha família, a melhor que pode existir. Minha mãe Catarina, por ser um oceano de amor e por me esperar 9 meses duas vezes. Meu pai Cláudio, por sempre me fazer levantar, secar as lágrimas e seguir em frente. Meu irmão César, pela parceria incondicional. Meus amores, minha melhor parte!

Ao meu noivo Marcus, por toda compreensão e carinho. Obrigada pelo teu amor e por me fazer uma pessoa melhor. Obrigada por cuidar tão bem do Johnnie durante a minha ausência, que sei que não foi pequena.

Às minhas orientadoras Prof. Isabel e Prof. Ligia, por todo conhecimento e suporte. Por sempre tentarem extrair o melhor de mim, e principalmente, por me fazer entender que um doutor é mais do que uma pessoa que cumpriu os pré-requisitos de um doutorado. Também agradeço à Prof. Aline, que esteve comigo desde o mestrado. Obrigada por ver as coisas de uma forma tão positiva, nunca desistir de mim e ter sempre um sorriso reconfortante para oferecer.

Ao Professor Mohammed Farid e a Dr<sup>a</sup> Marliya Ismail, por me ajudarem a evoluir como profissional e como pessoa. Obrigada pelo conhecimento e por me receberem tão gentilmente. Ao engenheiro Rick Coetzer, por estar sempre pronto para ajudar.

Aos alunos de iniciação científica Bernardo, Andressa e Roberta, pelo pouco que pude ensinar e pelo muito que pude aprender com cada um de vocês.

Aos meus amigos, colegas e funcionários do Dequi. Ao Lasem e ao Latepa, por contribuírem com a minha formação e por todos os dias de convivência. É um privilégio fazer parte de duas equipes tão incríveis.

Ao Departamento de Engenharia Química e de Materiais da Universidade de Auckland. Aos colegas e amigos Biolab, especialmente Yubin, Bhumika, Joanna, Jawaad, Rui, Sanelle, Susanna, Kaveh, Refat, Laura, Peter e Peter B.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UFRGS, à Capes e ao CNPq, pelo apoio estrutural e financeiro.

## Resumo

Milhões de toneladas de resíduos são gerados pela agroindústria todos os anos, gerando problemas ambientais e econômicos; muitos destes resíduos, entretanto, são ricos em nutrientes e compostos funcionais, o que poderia torná-los subprodutos com valor agregado. A utilização de subprodutos possibilita enriquecimento dos alimentos processados, redução de descarte no meio ambiente e melhor aproveitamento dos recursos naturais. Os talos de beterraba são um exemplo de resíduo com potencial a ser explorado e, assim como os bulbos, são ricos em betalaína, composto responsável pela sua coloração vermelho-violeta. Esses pigmentos são aplicáveis na indústria alimentícia como corantes naturais, mas a sua estabilidade é um dos maiores desafios frente a sua utilização. Neste contexto, este trabalho tem como objetivo principal estudar a extração, a clarificação e a estabilização de betalaínas provenientes de talos de beterraba vermelha. Para tanto, foi inicialmente estudado a viabilidade da utilização dos talos de beterraba como fonte de betalaínas e, em sequência, a extração destes compostos via esmagamento. A utilização de diferentes processamentos com vistas à melhora da extração e o seu impacto na estabilidade das betalaínas presente no extrato foram investigados: o processamento por alta pressão (HPP do inglês *High Pressure Processing*) e o tratamento térmico com alta temperatura por curto tempo (HTST do inglês *High Temperature Short Time*). Por fim, foi realizado um estudo de clarificação do extrato por meio de processo de separação por membranas (PSM). A clarificação foi aplicada por microfiltração (MF) seguido por ultrafiltração (UF). Além disto, a MF também foi operada no modo diafiltração (DF). A redução da atividade da enzima peroxidase, as características físico-químicas, a cor e a taxa de degradação das betalaínas ao longo do armazenamento foram avaliados nos extratos antes e após a clarificação. Os resultados mostraram que os extratos obtidos via esmagamento possuíam em média 45% da quantidade de pigmentos presentes no extrato dos bulbos de beterraba. O processamento por HPP não foi considerado uma boa alternativa para melhorar a extração e também não contribuiu para o aumento na estabilidade dos pigmentos presentes nos extratos. O tratamento térmico HTST causou uma pequena degradação das betalaínas; porém, quando aplicado por 120 s a 85,7 °C nos extratos com alta concentração

inicial, promoveu uma redução na taxa de degradação das betalaínas da amostra tratada de 1,2 para 0,4 mg de betanina/100 ml de extrato por dia após uma semana de armazenamento. No estudo de clarificação por PSM, os experimentos de MF e UF apresentaram reduções no fluxo do permeado ao longo do processo, além de elevada tendência ao *fouling*, em ambas as membranas. A aplicação da MF batelada seguida por UF ocasionou uma redução de 99,5% da atividade de peroxidase. Quando a MF foi operada em modo DF, a alimentação do processo foi modificada de duas bateladas de 2 L cada para uma batelada de 3 L, aproveitando melhor os pigmentos da alimentação. Além disto, a clarificação contribuiu para a estabilidade das betalaínas, uma vez que a taxa de degradação reduziu de 0,32 e 0,41 mg de betanina/100 ml de extrato por dia para 0,2 mg de betanina/100 ml de extrato por dia no 10º dia de armazenamento. Os processos de MF, em modo batelada e DF, seguidos por UF promoveram redução na turbidez e no teor de sólidos solúveis, além de extratos clarificados com cor mais intensa, luminosa e avermelhada.

Palavras chave: talos de beterraba; betalaínas; clarificação; extração; estabilidade; HPP; HTST; PSM; microfiltração; ultrafiltração; diafiltração.

## Abstract

Every year a huge amount of waste is generated by agricultural industry, becoming a serious environmental and economic problem; many of these wastes, however, contain nutrients and functional compounds, which could make them by-products with added value. The use of by-products allows the enrichment of processed foods and the reduction of discard in the environment, ensuring a better use of natural resources. The beet stalks are an example of waste with potential to be explored and, as the root, are rich in betalains, whose provide their red-violet color. These pigments are applicable in the food industry as natural dyes. The stability of these pigments, however, is one of the biggest challenges of using it. In this context, this work aims to study the extraction and clarification of betalains from red beet stalks. Initially it was studied the feasibility of using beet stalks like a betalain source and, after that, the extraction of these compounds through crushing was carried out. The utilization of different processing to improve the extraction and the impact on the betalain stability present in the extract were studied: the high pressure processing (HPP) and the thermal treatment high temperature short time (HTST). Lastly, a study of clarification of the extract using the membrane separation processes (PSM) was carried out. Clarification was first applied by microfiltration (MF) followed by ultrafiltration (UF). In addition, MF was also operated in diafiltration mode (DF). The peroxidase activity reduction, physico-chemical characteristics, color and degradation rate of betalains over the storage were evaluated in the extracts before and after the clarification. The results show that the stalks extract by crushing had about 45% of the pigments content in the extract from root of beet. HPP was not considered a suitable alternative to improve the extraction and did not contribute to the increase in the stability of the pigments present in the extracts. The thermal treatment HTST caused a small degradation of betalains. However, when it was applied for 120 s at 85.7 °C, in the extracts with high initial concentration, it promoted a reduction in the betalain degradation rate of the treated sample from 1.2 to 0.4 mg of betanin/100 ml of extract per day after one week of storage. In the PSM clarification study, the MF and UF experiments, showed permeated flux reduction, indicating high fouling tendency on both MF and UF membranes. The application of MF followed by UF caused a reduction of



99.5% in peroxidase activity. When MF was operated in DF mode, the process feed was modified from two batches of 2 L each to a 3 L batch, making better use of feed pigments. In addition, the clarification experiments contributed to the betalain stability, as the betalain degradation rate reduced from 0.32 and 41 mg of betanin/100 ml of extract per day to 0.2 mg of betanin/100 ml of extract per day on the 10th day of storage. The MF processes, batch and DF mode, followed by UF promoted a reduction in the turbidity and soluble solids content and the clarified extracts had color more intense, bright and reddish.

Keywords: beet stalks; betalain; extraction; clarification; stability; HPP; HTST; PSM; microfiltration; ultrafiltration; diafiltration.

## Lista de Figuras

Figura 3.1 – Beterrabas vermelhas ( <i>Beta vulgaris</i> L.) inteiras (a) e suas partes formadoras: talos (b), bulbos (c) e folhas (c).....	8
Figura 3.2 – Estruturas químicas do ácido betalâmico (A), betaxantinas (B) e betacianinas (C), com algumas possíveis substituições para os radicais .....	11
Figura 3.3 - Crescimento mundial do uso da tecnologia de processamento por alta pressão na indústria alimentícia.....	22
Figura 3.4 - Representação simplificada das principais correntes envolvidas em um processo de separação por membranas .....	27
Figura 4.1 - Fluxograma do processo de extração e processamento por HPP do extrato de betalaínas provenientes de talos de beterraba vermelha.....	44
Figura 4.2 – Fotografia do equipamento de HPP utilizado nos testes realizados ao longo deste estudo.....	45
Figura 4.3 – Esquema simplificado da pressurização que ocorre no interior do equipamento de HPP.....	46
Figura 4.4 - Fluxograma do processo de extração e aplicação do tratamento térmico HTST em extrato de betalaínas provenientes de talos de beterraba vermelha.....	51
Figura 4.5 - Fluxograma do processo de extração e clarificação do extrato de betalaínas provenientes de talos de beterraba vermelha por MF, modo batelada ou DF, seguida por UF..	54
Figura 4.6 - Fotografia das membranas de MF e UF utilizadas neste estudo.....	55
Figura 4.7- Fotografia do sistema de membranas de bancada utilizado para a clarificação do extrato: módulos para membranas tubulares (1) e (2); bomba diafragma (3) e (4); manômetros (5, 6, 7 e 8); válvulas agulha (9, 10, 11 e 12); banho de resfriamento ultratermostático (13) e caixa térmica de ciclopentano (14).....	56
Figura 4.8 - Visão da disposição dos tanques de alimentação e de permeado dentro da caixa térmica.....	57
Figura 5.1 – Concentrações de betalaínas (mg de betanina/100 ml de extrato) em extratos obtidos por esmagamento em três conjuntos distintos de bulbos e de talos de beterraba .....	69
Figura 5.2 – Percentual mássico de betalaínas extraído dos talos de beterraba em cada etapa de extração: esmagamento, seguido de três extrações sólido líquido à temperatura ambiente (20 °C).....	70
Figura 5.3 – Variação do teor de betalaínas (mg de betanina/100 ml de extrato) nos talos de beterraba submetidos ao armazenamento sob refrigeração (4 °C) e ao abrigo da luz .....	72
Figura 5.4 – Variação do teor de betalaínas dos extratos obtidos de talos armazenados sob refrigeração (4 °C) e ao abrigo da luz, em relação ao teor inicial (imediatamente após a extração) durante cinco dias.....	73

Figura 5.5 – Perfil típico de pressão e temperatura durante o tratamento com HPP de extratos de talos de beterraba vermelha. Linha contínua (—) representa pressão e linha tracejada (---) representa temperatura.....	<b>74</b>
Figura 5.6 – Concentração de betalaínas (mg de betanina/100 ml de extrato) em duas amostras (A e B) tratadas por HPP durante 5, 10 e 15 min, nas pressões de 4000 e 6000 bar, a temperatura moderada (40 °C) no dia do tratamento (1º dia) e submetidas ao armazenamento à 4 °C e ao abrigo da luz (2º dia) .....	<b>75</b>
Figura 5.7 – Concentração de betalaínas (mg de betanina/100 ml de extrato) em amostras tratadas por HPP durante 5 min, nas pressões de 4000 e 6000 bar, a temperatura ambiente, no dia do tratamento (1º dia) e submetidas ao armazenamento (2º dia) .....	<b>78</b>
Figura 5.8 - Concentração de betalaínas (mg de betanina/100 ml de extrato) em amostras tratadas por HPP durante 5 e 15 min, na pressão de 6000 bar, a temperatura moderada (40 °C) no dia do tratamento (1º dia) e após o seu armazenamento (2º dia e 4º dia) .....	<b>80</b>
Figura 5.9 - Concentração de betalaínas do extrato de talos de beterraba vermelha quando submetidos ao tratamento com HPP durante curto e longo tempo de processamento, à temperatura moderada (40 °C) e sob pressão de 4000 bar e 6000 bar .....	<b>82</b>
Figura 5.10 – Concentração de betalaínas de extratos obtidos com diferentes tecnologias aplicadas ao bagaço do esmagamento dos talos de beterraba vermelha: 10 e 20 min de HPP, trituração com extração sólido-líquido, trituração com extração sólido-líquido seguida por HPP (10 e 20 min) e sem aplicação de tecnologia (controle).....	<b>84</b>
Figura 5.11 - Concentração de betalaínas de extrato de talos de beterraba vermelha, com baixa concentração inicial de betalaínas (12,0 ± 0,2 mg de betanina/100 ml de extrato), no 1º, 2º e 4º dia de armazenamento, para controle e após tratamento HPP a 6000 bar, para diferentes tempos de tratamento.....	<b>85</b>
Figura 5.12 - Concentração de betalaínas de extrato de talos de beterraba vermelha, com alta concentração inicial de betalaínas (17,3 ± 0,3 mg de betanina/100 ml de extrato), no 1º, 2º e 4º dia de armazenamento, para controle e após tratamento HPP a 6000 bar, para diferentes tempos de tratamento.....	<b>87</b>
Figura 5.13 - Perfil de temperaturas do aquecimento de extrato de talos de beterraba vermelha .....	<b>89</b>
Figura 5.14 - Concentração de betalaínas em extrato de talos de beterraba vermelha tratados com HTST, com baixa concentração inicial de betalaínas (12,2 ± 0,1 mg de betanina/100 ml de extrato), ao longo de uma semana de armazenamento.....	<b>91</b>
Figura 5.15 - Concentração de betalaínas em extrato de talos de beterraba vermelha tratados com HTST, com alta concentração inicial de betalaínas (17,3 ± 0,3 mg de betanina/100 ml de extrato), ao longo de uma semana de armazenamento.....	<b>92</b>
Figura 5.16 – Esquema simplificado da reação de hidrólise e regeneração de betanina. ....	<b>93</b>
Figura 5.17 – Fluxo permeado médio em função do tempo durante os ensaios de compactação para as membranas de MF utilizando pressão de 1 bar e de UF utilizando pressão de 2 bar. Os experimentos foram realizados na temperatura de 15 °C.....	<b>96</b>

Figura 5.18 – Fluxo de permeado em função da pressão transmembrana para intervalos de tempo de 30 min, para as membranas de MF e de UF. Condições de operação: 10 °C e 0,3 m <sup>3</sup> h <sup>-1</sup> .....	<b>97</b>
Figura 5.19 – Fluxo permeado em função do tempo de experimento (4 h) para o processo de MF para três soluções de alimentação diferentes: Sol I com 11 mg de betanina/100 ml de extrato (original), Sol II com 23 mg de betanina/100 ml de extrato (original) e Sol III com 11 mg de betanina/100 ml de extrato (diluído). Condições de operação: 0,5 bar, 10 °C e 0,3 m <sup>3</sup> h <sup>-1</sup> .....	<b>99</b>
Figura 5.20 – Fluxo permeado normalizado ao longo do tempo, durante os experimentos de MF batelada e MF/DF para o extrato dos talos de beterraba. Linhas tracejadas (---) indicam o tempo em que foram feitas DFs. Condições de operação: pressão de 0,5 bar, temperatura de 10 °C e vazão de alimentação de 0,3 m <sup>3</sup> h <sup>-1</sup> .....	<b>104</b>
Figura 5.21 – Concentração de betalaínas do permeado obtido na MF bateada e na MF/DF, ao longo do processo. Condições de operação: pressão de 0,5 bar, temperatura de 10 °C e vazão de alimentação de 0,3 m <sup>3</sup> h <sup>-1</sup> .....	<b>105</b>
Figura 5.22 - Fluxo permeado normalizado ao longo do tempo, durante os experimentos de MF para o extrato dos talos de beterraba. Condições de operação: pressão de 0,5 bar, temperatura de 10 °C e vazão de alimentação de 0,3 m <sup>3</sup> h <sup>-1</sup> .....	<b>107</b>
Figura 5.23 - Fluxo de permeado de água destilada em função da pressão antes e após os experimentos de MF do extrato.....	<b>108</b>
Figura 5.24 - Concentrações de betalaínas na corrente de retido normalizadas em relação à concentração inicial ao longo dos experimentos de MF.....	<b>109</b>
Figura 5.25 – Concentrações de betalaínas para a alimentação inicial e para o permeado obtido em cada experimento de MF.....	<b>111</b>
Figura 5.26 – Fluxo permeado normalizado ao longo do tempo, durante os experimentos de UF (permeado obtido na etapa de MF) para o extrato dos talos de beterraba. Condições de operação: pressão de 0,5 bar, temperatura de 10 °C e vazão de alimentação de 0,3 m <sup>3</sup> h <sup>-1</sup> .....	<b>112</b>
Figura 5.27 – Fluxo permeado de água destilada em função da pressão antes e após os experimentos de UF do permeado obtido na etapa de MF.....	<b>113</b>
Figura 5.28 – Concentrações de betalaínas na corrente de retido normalizadas em relação à concentração inicial ao longo dos experimentos de UF.....	<b>114</b>
Figura 5.29 – Concentrações de betalaínas normalizadas para a alimentação inicial e para o permeado obtido em cada experimento de UF.....	<b>115</b>
Figura 5.30- Fluxo permeado normalizado ao longo do tempo, durante os experimentos de MF/DF para o extrato dos talos de beterraba. Linhas tracejadas (---) indicam o tempo em que foram feitas DFs. Condições de operação: pressão de 0,5 bar, temperatura de 10 °C e vazão de alimentação de 0,3 m <sup>3</sup> h <sup>-1</sup> .....	<b>117</b>
Figura 5.31 - Fluxo de permeado de água destilada em função da pressão antes e após os experimentos de MF/DF do extrato Condições de operação: temperatura de 10 °C e vazão de alimentação de 0,3 m <sup>3</sup> h <sup>-1</sup> .....	<b>118</b>

Figura 5.32 – Fluxo permeado normalizado ao longo do tempo, durante os experimentos de UF (permeado obtido na etapa de MF/DF) para o extrato dos talos de beterraba. Condições de operação: pressão de 0,5 bar, temperatura de 10 °C e vazão de alimentação de 0,3 m <sup>3</sup> h <sup>-1</sup> ...	<b>121</b>
Figura 5.33 – Fluxo de permeado de água destilada em função da pressão antes e após os experimentos de UF do permeado obtido na etapa de MF/DF. Condições de operação: temperatura de 10 °C e vazão de alimentação de 0,3 m <sup>3</sup> h <sup>-1</sup> .....	<b>122</b>
Figura 5.34 – Percentual residual da atividade de peroxidase em cada extrato: Alim inicial MF 1 é a alimentação inicial da MF batelada utilizada no início do processo, Perm MF 1 é o permeado recolhido nas duas primeiras horas de MF batelada, Alim inicial MF 2 é a segunda alimentação da MF batelada, Perm MF 2 é o permeado recolhido após a MF batelada, Alim inicial UF é o permeado da MF batelada utilizado como alimentação da UF e Perm UF é o permeado obtido na UF, conhecido como extrato clarificado.....	<b>128</b>
Figura 5.35 – Percentual residual da atividade de peroxidase em cada extrato para os dois experimentos: Alim inicial MF/DF é a alimentação da MF/DF, Alim final MF/DF é a alimentação da MF/DF após processo, Alim inicial UF é o permeado da MF/DF utilizado como alimentação da UF, Alim final UF é a alimentação da UF após o processo e Permeado é o permeado obtido na UF .....	<b>129</b>
Figura 5.36 – Concentração de betalainas (mg de betanina/100 ml de extrato) para as soluções de alimentação iniciais e finais da MF/DF e UF e permeado final, no dia do tratamento (1º dia) e no 2º, 6º e 10º dia de armazenamento com temperatura e luz controladas .....	<b>133</b>
Figura 5.37 – Fluxograma de blocos para as correntes do processo de preparo da amostra..	<b>136</b>
Figura 5.38 – Fluxograma de blocos para as correntes de processo para a etapa de extração do sumo dos talos de beterraba vermelha.....	<b>137</b>
Figura 5.39 – Fluxograma de blocos para as correntes de processo para a etapa de clarificação do extrato de talos de beterraba vermelha .....	<b>138</b>
Figura 5.40 - Fluxograma de blocos para as correntes de processo para a etapa de clarificação (MF/DF, seguida por UF) do extrato de talos de beterraba vermelha.....	<b>140</b>

## Lista de Tabelas

Tabela 3.1 – Composição centesimal do bulbo da beterraba vermelha, em base úmida .....	<b>8</b>
Tabela 3.2 - Influência da temperatura no tempo de meia-vida (min) de betanina em suco de beterraba com pH 5,8.....	<b>13</b>
Tabela 3.3 – Tempo de meia vida de betanina submetida a 90 °C em diferentes pH e atmosferas .....	<b>15</b>
Tabela 5.1- Comparação da composição mássica da beterraba utilizando plantas menos desenvolvidas (a) e plantas mais desenvolvidas (b) .....	<b>67</b>
Tabela 5.2 – Atividade residual (%) da PPO em amostras tratadas por HPP durante 5, 10 e 15 min, nas pressões de 4000 e 6000 bar a temperatura moderada (40 °C).....	<b>76</b>
Tabela 5.3 - Atividade residual (%) da PPO em amostras tratadas por HPP durante 5 min, nas pressões de 4000 e 6000 bar a temperatura ambiente (25°C).....	<b>77</b>
Tabela 5.4 - Atividade residual (%) da PPO em amostras tratadas por HPP durante 5, e 15 min, na pressão de 6000 bar a temperatura moderada (40 °C) .....	<b>79</b>
Tabela 5.5 – Atividade residual (RA%) de POD em amostras tratadas com HPP, com baixa e alta concentração inicial de betalaínas .....	<b>88</b>
Tabela 5.6 - Atividade residual (RA%) de POD nas amostras tratadas por tratamento térmico HTST com baixa e alta concentração inicial de betalaínas.....	<b>94</b>
Tabela 5.7 – Concentrações de betalaínas da alimentação inicial, alimentação final, permeado e volumes de permeado obtidos na MF para três diferentes soluções de alimentação .....	<b>99</b>
Tabela 5.8 – Concentrações de betalaínas normalizadas em relação à concentração inicial para as alimentações iniciais, alimentações submetidas à MF batelada e as concentrações dos seus respectivos permeados .....	<b>102</b>
Tabela 5.9 - Valores da permeância hidráulica antes e depois dos experimentos de MF e seus respectivos coeficientes de determinação (R <sup>2</sup> ).....	<b>108</b>
Tabela 5.10 – Concentrações de betalaínas no permeado normalizadas em relação à concentração após 30 min de experimento ao longo dos experimentos de MF em modo batelada .....	<b>110</b>
Tabela 5.11 - Valores da permeância hidráulica antes e depois dos experimentos de UF e seus respectivos coeficientes de determinação (R <sup>2</sup> ) .....	<b>113</b>
Tabela 5.12 – Concentrações de betalaínas normalizadas em relação à concentração de betalaínas após 15 min de filtração para o permeado obtido no processo de UF .....	<b>115</b>
Tabela 5.13 - Valores da permeância hidráulica antes e após os experimentos de MF/DF e seus respectivos coeficientes de determinação (R <sup>2</sup> ) .....	<b>118</b>
Tabela 5.14 - Concentrações de betalaínas do permeado normalizadas em relação à concentração do permeado no início do processo MF/DF .....	<b>120</b>
Tabela 5.15 - Valores da permeância hidráulica antes e após os experimentos de UF, precedidos pela MF/DF, e seus coeficientes de determinação (R <sup>2</sup> ).....	<b>122</b>

Tabela 5.16 – Concentrações de betalaínas normalizadas em relação à concentração de betalaínas no permeado obtido no processo de UF após 15 min de filtração.....	<b>123</b>
Tabela 5.17 - Turbidez e sólidos solúveis de alimentações iniciais, alimentações finais e permeados dos processos de MF, modos batelada (bat.) e DF, e de UF .....	<b>124</b>
Tabela 5.18 – Parâmetros colorimétricos de alimentações iniciais e permeados dos processos de MF, em modo batelada e DF, e de UF, descritos em termos de saturação ( $C^*_{ab}$ ), tonalidade ( $h_{ab}$ ) e variação de luminosidade ( $\Delta L$ ).....	<b>126</b>
Tabela 5.19 – Taxa de degradação de betalaínas (mg de betanina/100 ml de extrato dia) dos extratos de talos de beterraba vermelha ao longo do processo de clarificação, no 2º, 6º e 10º dia de armazenamento controlado (refrigeração a 4 °C e ao abrigo da luz) .....	<b>134</b>

## Lista de siglas, abreviaturas e símbolos

$\approx$  – aproximado (aproximadamente)

$a^*$  – coordenada cromática verde-vermelho

$b^*$  – coordenada cromática azul-amarelo

BHA – 2-terc-butil-4-hidroxianisol e 3-terc-butil-4-hidroxianisol

$C_{ab}^*$  – Croma (saturação da cor)

CEASA – Central de Abastecimento do Rio Grande do Sul

CIE – *Commission International de l'Eclairage*

$D$  – tempo de redução decimal

DF – diafiltração

DO – destilação osmótica

DR – taxa de degradação

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

FCV – fator de concentração volumétrico

$h_{ab}$  ou hue – ângulo de tonalidade

HPP – processamento por alta pressão (do inglês *High Pressure Processing*)

HTST – alta temperatura por curto tempo (do inglês *High Temperature Short Time*)

IgAS – imunoglobulina A secretora

$L^*$  – parâmetro de cor (luminosidade)

LASEM – Laboratório de Separação por Membranas

LATEPA – Laboratório de Tecnologia e Processamento de Alimentos

MF – microfiltração

MMC – massa molar de corte

NF – nanofiltração

OI – osmose inversa

PME – pectina metil-esterase

POD – peroxidase

PPO – polifenoloxidase

PSM – processos de separação por membranas

PVDV – fluoreto de polivinilideno

$R^2$  – coeficiente de determinação

RA – atividade residual

$R_{obs}$  – retenção observada

SOL I – solução de alimentação nº 1

SOL II – solução de alimentação nº 2

SOL III – solução de alimentação nº 3



UAE – unidade de atividade enzimática

UF – ultrafiltração

UoA – Universidade de Auckland (do inglês *The University of Auckland*)

$\Delta L$  – variação da luminosidade

# Sumário

1.	Introdução.....	1
2.	Objetivos.....	4
2.1.	Objetivo geral.....	4
2.2.	Objetivos específicos.....	4
3.	Revisão Bibliográfica .....	5
3.1.	Aproveitamento de Resíduos Agroindustriais.....	5
3.2.	Beterraba.....	7
3.3.	Betalainas: pigmentos naturais presentes na beterraba .....	9
3.3.1.	Estabilidade das Betalainas .....	12
3.3.2.	Vias de degradação das betalainas .....	17
3.4.	Extração.....	18
3.5.	Processamento por Alta Pressão (HPP).....	20
3.6.	Tratamento Térmico com Alta Temperatura em Curto Tempo (HTST) .....	22
3.7.	Clarificação – Processos de separação por membranas (PSM).....	25
3.7.1.	Conceitos básicos .....	28
3.7.1.1.	Fluxo .....	28
3.7.1.2.	Fluxo permeado .....	28
3.7.1.3.	Fluxo limite .....	28
3.7.1.4.	Fluxo crítico .....	29
3.7.1.5.	Percentual de Retenção Observada .....	29
3.7.1.6.	Fator de Concentração Volumétrico .....	30
3.7.1.7.	Polarização por Concentração e Fouling.....	30
3.7.1.8.	Modos de operação comuns na indústria alimentícia .....	31
3.7.2.	Processos de Microfiltração (MF) e Ultrafiltração (UF) .....	33
4.	Materiais e métodos .....	36
4.1.	Matéria-prima .....	36
4.2.	Análises para a avaliação da qualidade dos extratos.....	36
4.2.1.	Determinação do teor de betalainas.....	36

4.2.2.	Taxa de degradação de betalaínas .....	37
4.2.3.	Análises físico-químicas dos extratos .....	37
4.2.4.	Análise de cor dos extratos .....	38
4.2.5.	Atividade enzimática .....	39
4.3.	Avaliação da aplicabilidade dos talos de beterraba vermelha como fonte de betalaínas.....	40
4.3.1.	Rendimento de talos na planta beterraba vermelha.....	40
4.3.2.	Avaliação do rendimento da extração do sumo dos bulbos e dos talos de beterraba.....	41
4.3.2.1.	Preparo das amostras para extração do sumo .....	41
4.3.2.2.	Esmagamento e separação do sumo dos bulbos e dos talos de beterraba.....	41
4.3.2.3.	Rendimento da extração do sumo dos talos de beterraba.....	42
4.3.3.	Avaliação da degradação das betalaínas presentes nos talos e nos extratos armazenados sob refrigeração.....	43
4.3.3.1.	Degradação das betalaínas presentes nos talos .....	43
4.3.3.2.	Degradação das betalaínas presentes nos extratos armazenados sob refrigeração.....	43
4.4.	Processamento por Alta Pressão: estudo de extração e estabilidade .....	43
4.4.1.	Preparo da amostra para o teste inicial e para os testes preliminares.....	46
4.4.2.	Teste inicial.....	46
4.4.3.	Testes preliminares .....	47
4.4.3.1.	Verificação do efeito do HPP na atividade de PPO sem utilização de calor.....	47
4.4.3.2.	Efeito da redução da atividade de PPO na estabilidade de amostras tratadas com HPP.....	47
4.4.3.3.	Tempo e pressão de processamento .....	48
4.4.3.4.	Extração do pigmento residual .....	48
4.4.4.	Efeitos do HPP na concentração e na estabilização de betalaínas de extratos de talos de beterraba vermelha.....	49
4.4.4.1.	Preparo da amostra.....	49

4.4.4.2.	Aplicação de HPP.....	50
4.5.	Tratamento Térmico aplicado em Alta Temperatura por Curto Tempo (HTST): estudo de estabilidade.....	50
4.5.1.	Preparo da amostra.....	50
4.5.2.	Determinação da Temperatura Efetiva do Tratamento ( $T_{eff}$ ).....	52
4.5.3.	Efeitos do tratamento térmico HTST na concentração e na estabilidade de betalaínas de extratos de talos de beterraba vermelha .....	53
4.6.	Clarificação e Estabilização: microfiltração e ultrafiltração .....	53
4.6.1.	Membranas .....	55
4.6.2.	Sistema de membranas.....	55
4.6.3.	Compactação das membranas .....	57
4.6.4.	Determinação do fouling através da permeância hidráulica .....	58
4.6.5.	Limpeza das membranas.....	58
4.6.6.	Limpeza da unidade de membranas .....	59
4.6.7.	Testes Preliminares de Clarificação.....	59
4.6.7.1.	Preparo das amostras para extração do sumo .....	59
4.6.7.2.	Determinação da pressão de operação .....	60
4.6.7.3.	Padronização da solução de alimentação .....	60
4.6.7.4.	Tempo de processo versus degradação de betalaínas.....	61
4.6.7.5.	Comparação do comportamento do fluxo permeado de MF batelada e MF/DF62 .....	
4.6.8.	Clarificação do extrato de beterraba vermelha utilizando MF em batelada seguida por UF.....	62
4.6.8.1.	Microfiltração do extrato dos talos de beterraba.....	63
4.6.8.2.	Ultrafiltração do extrato microfiltrado .....	63
4.6.9.	Clarificação do extrato de beterraba vermelha utilizando MF/DF seguida por UF.....	64
4.7.	Análise estatística.....	65
5.	Resultados e discussão .....	66

5.1.	Avaliação da aplicabilidade dos talos de beterraba vermelha como fonte de betalaínas.....	66
5.1.1.	Determinação do percentual mássico de bulbo, folhas e talos na planta beterraba vermelha.....	66
5.1.2.	Concentração de betalaínas nos extratos obtidos de talos e nos bulbos de beterraba vermelha .....	68
5.1.3	Avaliação do rendimento da extração do sumo dos talos de beterraba .....	69
5.1.4.	Avaliação da degradação das betalaínas presentes nos talos e nos extratos submetidos ao armazenamento sob refrigeração .....	71
5.2.	Processamento por Alta Pressão: estudo de extração e estabilidade .....	73
5.2.1.	Teste Inicial.....	74
5.2.2.	HPP - Testes Preliminares.....	77
5.2.2.1.	Verificação do efeito do HPP na atividade de PPO sem utilização de calor.....	77
5.2.2.2.	Efeito da redução da atividade de PPO na estabilidade de amostras tratadas com HPP.....	79
5.2.2.3.	Tempo e pressão de processamento .....	80
5.2.2.4.	Extração do pigmento residual .....	83
5.2.3.	Aplicação do HPP: efeitos na concentração e na estabilização de betalaínas de extratos de talos de beterraba vermelha.....	85
5.3.	Tratamento Térmico aplicado em Alta Temperatura por Curto Tempo (HTST): estudo de estabilidade .....	89
5.3.1.	Determinação da Temperatura Efetiva de Tratamento.....	89
5.3.2.	Efeitos do tratamento térmico HTST na concentração e na estabilidade de betalaínas de extratos de talos de beterraba vermelha .....	90
5.4.	Clarificação e Estabilização: microfiltração e ultrafiltração .....	95
5.4.1.	Testes preliminares .....	95
5.4.1.1.	Compactação das membranas .....	96
5.4.1.2.	Determinação da pressão de operação .....	97
5.4.1.3.	Padronização da solução de alimentação .....	98
5.4.1.4.	Tempo de processo versus degradação de betalaínas.....	101

5.4.1.5. Comparação do comportamento do fluxo permeado de MF batelada e MF/DF.....	103
5.4.2. Clarificação do extrato de beterraba vermelha utilizando MF em modo batelada seguida por ultrafiltração.....	106
5.4.2.1. Microfiltração do extrato em modo batelada.....	106
5.4.2.2. Ultrafiltração do extrato microfiltrado em modo batelada.....	111
5.4.3. Clarificação do extrato de beterraba vermelha utilizando MF/DF seguida por UF.....	116
5.4.3.1. Microfiltração do extrato em modo diafiltração.....	116
5.4.3.2. Ultrafiltração do extrato microfiltrado em modo diafiltração.....	121
5.4.4. Análises físico-químicas dos extratos de talos de beterraba vermelha.....	124
5.4.5. Análise de Cor.....	126
5.4.6. Atividade Enzimática – Peroxidase (POD).....	127
5.4.7. Estabilidade das betalaínas nos extratos – taxa de degradação.....	131
5.4.8. Balanços de massa para betalaínas ao longo do processo de clarificação.....	135
5.4.8.1. Preparo da amostra.....	136
5.4.8.2. Extração por esmagamento.....	136
5.4.8.3. Clarificação - MF em modo batelada e UF.....	138
5.4.8.4. Clarificação – MF em modo DF e UF.....	139
6. Conclusões.....	142
Referências Bibliográficas.....	145

# 1. Introdução

O desperdício de alimentos é visto nos dias de hoje como um problema que transcende o preparo em quantidades excessivas ou o armazenamento inadequado. O desperdício também contempla o que ocorre quando partes consideradas menos nobres dos alimentos são tratadas como resíduos, sem que a qualidade nutricional e/ou funcional dessas partes seja valorizada.

A utilização dos resíduos agroindustriais permite a redução de material descartado no meio ambiente, contribui para uma exploração de recursos naturais menos danosa ao planeta, favorece a redução do custo de produção por meio da substituição de fontes mais nobres, além de representar uma responsabilidade social.

Dentre os resíduos de alimentos, encontram-se os resíduos vegetais, os quais podem ser compostos de talos, cascas, sementes, folhas, bagaços ou qualquer outro derivado do vegetal que difere da parte principal utilizada como alimento. Contudo, estudos mostram que partes consideradas menos nobres podem ser subprodutos com potencial para utilização como fonte de nutrientes e compostos funcionais.

Os talos de beterraba são um exemplo de um resíduo ainda muito pouco explorado pela indústria alimentícia. Geralmente, os talos de beterraba são utilizados apenas como complemento da alimentação animal ou como fertilizante orgânico. Quando os talos de beterraba são utilizados como fonte de pigmentos naturais, eles deixam de ser um resíduo da agroindústria e passam a ser um subproduto com valor agregado.

Os pigmentos presentes nos bulbos e talos de beterraba são conhecidos como betalaínas, as quais são responsáveis pela sua intensa coloração vermelho-violeta. Um fator que dificulta a utilização destes pigmentos é a sua grande tendência à degradação a partir do momento em que são extraídos, em decorrência do rompimento do tecido vegetal. Desta forma, para a extração destes pigmentos deve-se levar em consideração fatores que contribuem para a sua estabilidade, visando reduzir, assim, sua degradação. A estabilidade das betalaínas está relacionada a fatores endógenos, como a presença de enzimas

e metais, além de fatores associados ao ambiente, tais como temperatura, oxigênio, luz, pH, entre outros.

Para melhorar a estabilidade desses pigmentos, o processamento precisa reduzir a presença de compostos relacionados aos fatores endógenos e minimizar a ocorrência dos fatores relacionados ao ambiente sem expressivas reduções no teor de betalaínas. Uma das tecnologias que está em crescimento é o processamento com alta pressão. Essa tecnologia, diferente de muitas tecnologias convencionais da indústria alimentícia, não requer a utilização de reagentes químicos, não produz alta quantidade de efluentes e está sendo aplicada com o intuito de manter os compostos funcionais presentes no alimento.

O tratamento térmico é um processamento frequente na indústria alimentícia. Contudo, o tratamento térmico com alta temperatura em um curto período de tempo, conhecido como tratamento térmico HTST (do inglês *High Temperature Short Time*), pode apresentar os benefícios solidificados pelo tratamento convencional, mas com algumas modificações que diminuem o impacto da tecnologia nos compostos de interesse. Este processamento pode ser uma alternativa para os extratos de talos de beterraba vermelha visando minimizar os fatores que afetam negativamente a estabilidade e reduzindo a degradação das betalaínas durante o tratamento térmico HTST.

Uma outra forma de aumentar a estabilidade das betalaínas é purificar o extrato onde ela se encontra. Visando a manutenção do teor de betalaínas, os processos de separação por membranas (PSM) são uma alternativa de clarificação àquela tradicional que utiliza agentes clarificantes e aplicação de calor.

Os PSM são utilizados no fracionamento de misturas, soluções e suspensões envolvendo espécies de tamanho e natureza química distintas. Esses processos contribuem para a produção de alimentos com alta qualidade e com mínimas alterações estruturais, nutricionais e de sabor.

Considerando a alternativa de utilização dos talos de beterraba vermelha como fonte de betalaínas para aplicação como corante natural, o projeto de doutorado contempla quatro estudos principais: a avaliação da utilização dos talos de beterraba vermelha como fonte de betalaínas; o emprego do



processamento por alta pressão para aumentar a extração de pigmentos e melhorar a estabilidade dos mesmos; a aplicação do tratamento térmico HTST como alternativa para aumentar a estabilidade dos extratos e realizar uma comparação com as outras tecnologias estudadas; e, por fim, a clarificação do extrato de talos de beterraba vermelha por meio de PSM, aplicando inicialmente microfiltração, operada nos modos batelada e diafiltração, seguida por ultrafiltração.

## **2. Objetivos**

Neste capítulo estão descritos os objetivos que foram propostos para o desenvolvimento deste estudo.

### **2.1. Objetivo geral**

O objetivo geral do presente trabalho é estudar a viabilidade técnica do aproveitamento das betalaínas contida nos talos de beterraba vermelha, por meio de processos de extração, clarificação e estabilização, visando sua utilização como corante natural.

### **2.2. Objetivos específicos**

Para que seja possível alcançar o objetivo geral, os seguintes objetivos específicos são propostos:

- avaliar a possibilidade de utilização dos talos de beterraba vermelha como fonte de betalaínas, através da quantificação deste composto no extrato obtido sem aplicação de calor ou solventes orgânicos;
- estudar os efeitos do processamento por alta pressão (HPP) no rendimento de extração e no aumento da estabilidade do extrato;
- estudar os efeitos do tratamento térmico aplicado em altas temperaturas por curto tempo (HTST) na estabilidade do extrato;
- estudar o processo de clarificação do extrato utilizando processos combinados de micro e ultrafiltração em um sistema com temperatura e exposição à luz controladas;
- comparar os resultados obtidos em cada processo a fim de sugerir uma estratégia para a extração das betalaínas dos extratos de talos de beterraba vermelha.

### 3. Revisão Bibliográfica

Neste capítulo são apresentados os fundamentos teóricos e uma revisão das informações presentes na literatura relacionada aos assuntos discutidos neste estudo. Estas informações permitem uma melhor compreensão dos objetos envolvidos e foram utilizadas como base para o desenvolvimento do trabalho. Os tópicos abordados neste capítulo contemplam a matéria-prima utilizada, a qual é proveniente de resíduos da indústria, e os processos envolvidos na extração, clarificação e estabilização de um extrato rico em betalaínas, bem como as particularidades desses pigmentos naturais.

#### 3.1. Aproveitamento de Resíduos Agroindustriais

O desperdício de alimentos, além de indicar um mal-uso de recursos, também implica em problemas ambientais e econômicos, tornando-se um desafio moral para a sociedade (Mirabella *et al.*, 2014). Apesar de tradicionalmente serem tratados como um problema, os subprodutos do processamento de alimentos estão cada vez mais sendo utilizados como fontes de produtos com valor agregado, tais como pigmentos naturais e compostos fenólicos (Vulić *et al.*, 2012).

Na literatura, encontram-se estudos que avaliaram a utilização de subprodutos da agroindústria como fonte de aditivos alimentares ou substitutos de matérias-primas mais nobres. A revisão apresentada por Ayala-Zavala *et al.* (2011) analisa as potenciais utilizações de subprodutos de frutas tropicais exóticas como antioxidantes, antimicrobianos, corantes, aromatizantes e agentes espessantes. Dorta *et al.* (2014) estudaram a utilização do resíduo do processamento da manga (cascas e caroços) como um ingrediente funcional na indústria alimentícia. Segundo os autores, este resíduo pode representar até 60% em massa da fruta.

A utilização integral dos alimentos (talos, cascas, sementes, entre outros) é uma alternativa para enriquecer a alimentação diária com nutrientes e compostos funcionais, possibilitando maior ingestão de fibras, vitaminas, sais minerais e, principalmente, compostos bioativos (Wootton-Beard e Ryan, 2011). O consumo de farinha de beterraba como forma de enriquecimento nutricional e

ingestão de compostos bioativos é uma das alternativas apresentadas na literatura. Oliveira *et al.* (2013) avaliaram a composição química, a concentração de minerais e o poder antioxidante da farinha de beterraba, bem como a aceitação dos consumidores de dois produtos com adição desta farinha. Os autores observaram que a farinha de beterraba apresentava em torno de seis vezes mais cálcio e magnésio que a farinha de trigo, além de apresentar uma quantidade representativa de potássio (2433 mg/100 g de farinha de beterraba). Em relação aos testes de aceitação, os produtos desenvolvidos (cookies e *frozen*), foram aceitos pelos consumidores e os mesmos indicaram, ainda, a intenção de consumo continuado destes produtos.

A substituição de compostos sintéticos presentes em alimentos processados por compostos naturais é, também, alvo frequente das pesquisas desenvolvidas no mundo; estudos envolvendo a substituição de corantes sintéticos por corantes naturais são um exemplo destas pesquisas. A partir da crescente rejeição aos corantes sintéticos, a produção de substitutos naturais provenientes de materiais que até então eram considerados resíduos da produção agroindustrial é uma alternativa emergente. Além da minimização da geração de resíduos, este reaproveitamento pode, em alguns casos, enriquecer o produto através do aumento de componentes funcionais (Vulić *et al.*, 2012; Shui e Leong, 2006).

Ao avaliar o reaproveitamento de resíduos agroindustriais como substitutos de corantes sintéticos, a abordagem de questões sobre a estabilidade dos corantes naturais e a aceitação do consumidor aos produtos com adição destes corantes são fundamentais. No estudo realizado por Kaimainen *et al.* (2015), corantes naturais obtidos do bulbo da beterraba vermelha foram avaliados quanto à estabilidade e à aceitação pelos consumidores e comparados a outros corantes à base de antocianinas. Os autores concluíram que o corante natural em pó, obtido por atomização, possui a estabilidade necessária para uma longa vida de prateleira e sua utilização como corante alimentício é satisfatória aos consumidores.

A produção de corantes naturais provenientes de resíduos requer o desenvolvimento de processos eficientes e capazes de manter os pigmentos com características adequadas para sua utilização em alimentos. Este

desenvolvimento está diretamente ligado às tecnologias que precisam ser empregadas e adaptadas ao processamento.

Dentre as tecnologias tradicionais para o aproveitamento de resíduos agroindustriais, podem-se citar, por exemplo, a extração com auxílio de solventes orgânicos e o tratamento térmico. Outras tecnologias consideradas emergentes, entretanto, estão cada vez mais sendo utilizadas na ciência e processamento de alimentos; algumas destas tecnologias são: a secagem por rádio frequência, a desidratação eletro osmótica, o tratamento com plasma de baixa temperatura, a aplicação de alta pressão hidrostática, a extração assistida por ultrassom, a ablação a laser, a aplicação de descarga elétrica de alta voltagem, a aplicação de campo elétrico pulsado, a aglomeração em leito fluidizado pulsado e a nanotecnologia (Galanakis, 2013). Além das tecnologias citadas, os PSM também vêm sendo, cada vez mais, aplicados ao processamento de alimentos, apresentando diversas vantagens quando comparados aos processos tradicionais.

A escolha da tecnologia mais adequada para o reaproveitamento de compostos presentes em diferentes resíduos, entretanto, exige um conhecimento profundo sobre a matéria-prima a ser utilizada.

### **3.2. Beterraba**

A beterraba (*Beta vulgaris L.*) é uma das principais hortaliças cultivadas no Brasil; ao longo da década de 2000 foi observado um crescimento na demanda brasileira para o consumo de beterrabas *in natura*, bem como do número de beterrabas utilizadas na fabricação de conservas industriais, alimentos infantis e corantes (aplicados em sopas desidratadas, iogurtes e molhos ketchups) (Tivelli *et al.*, 2011). Em 2006, cinco estados produtores totalizaram mais de 75% da quantidade de beterrabas produzida no país: Paraná (20,0%), São Paulo (17,0%), Minas Gerais (15,5%), Rio Grande do Sul (15,0%) e Bahia (8,0%) (Tivelli *et al.*, 2011). A Figura 3.1 apresenta uma fotografia de beterrabas inteiras e suas partes separadas: folhas, talos e bulbos.



Fonte: Autor

Figura 3.1 – Beterrabas vermelhas (*Beta vulgaris* L.) inteiras (a) e suas partes formadoras: talos (b), bulbos (c) e folhas (c)

A beterraba é um produto recorrente em trabalhos científicos por apresentar um alto nível de antioxidantes biologicamente acessíveis e conter outros compostos primordiais para a saúde humana, tais como potássio, magnésio, ácido fólico, ferro, zinco, cálcio, fósforo, sódio, niacina, biotina, vitamina B6 e fibras solúveis. A composição centesimal do bulbo da beterraba vermelha, em base úmida, está apresentada na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Composição centesimal do bulbo da beterraba vermelha, em base úmida

<b>Carboidratos (g)</b>	<b>Fibras brutas (g)</b>	<b>Proteínas (g)</b>	<b>Lipídios (g)</b>	<b>Cinzas (g)</b>	<b>Umidade (%)</b>
<b>11,1</b>	3,4	1,9	0,1	0,9	86,0

Fonte: adaptado de Taco (2011)

Georgiev *et al.* (2010) identificaram os compostos fenólicos ácido 4-hidroxibenzóico, ácido clorogênico, ácido caféico, hidrato de catequina e epicatequina em extratos de betalaínas retirados do bulbo de beterraba da variedade Detroit Dark Red.

No estudo desenvolvido por Vulić *et al.* (2012) foi analisada a composição fenólica de bagaços de bulbo de beterraba das variedades conhecidas como

Cardeal-F1, chata do Egito, Bicolor e Kestrel. Os autores verificaram a presença dos seguintes compostos fenólicos: ácido ferúlico, ácido vanílico, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido caféico e ácido protocatecuico. Nas quatro variedades analisadas por esses autores, o ácido ferúlico mostrou-se como o composto fenólico mais abundante, com concentrações variando de  $0,850 \pm 0,040$  mg/g de massa seca de bagaço de beterraba, na variedade chata do Egito, até  $1,200 \pm 0,052$  mg/g, na variedade Bicolor. Wootton-Beard e Ryan (2011) afirmam que o consumo de polifenóis acarreta em múltiplos benefícios à saúde e sugerem a ingestão de suco de beterraba como fonte de compostos fenólicos. Além disso, o vegetal completo pode ser considerado como uma fonte rica de compostos polifenólicos (Wootton-Beard e Ryan, 2011).

A parte aérea do vegetal, constituída de talos e folhas, possui uma maior quantidade de ferro, potássio, sódio, vitamina A e vitaminas do complexo B do que as raízes, reforçando a importância do aproveitamento dessas partes para a alimentação humana (Tivelli *et al.*, 2011).

Além de todos os benefícios proveniente da composição nutricional da beterraba vermelha, e da presença dos compostos fenólicos, os pigmentos naturais presentes nesta planta são, também, componentes funcionais, apresentando aplicação na indústria alimentícia. Os pigmentos naturais responsáveis pela coloração vermelho-violeta da beterraba são as betalaínas (Stintzing e Carle, 2007), cujas características serão apresentadas no item a seguir.

### **3.3. Betalaínas: pigmentos naturais presentes na beterraba**

A beterraba vermelha é a fonte mais comum de betalaínas; contudo, é frequentemente subutilizada uma vez que apenas seu bulbo, considerado a parte mais importante da planta, é empregado como alimento, assim como fonte de pigmentos e de enzimas (Stintzing e Carle, 2008a; Rudrappa *et al.*, 2005). Os talos e as folhas da planta não são amplamente usados, sendo, na maioria das vezes, descartados como resíduos. No estudo desenvolvido por Koubaier *et al.* (2014), entretanto, foi encontrado teor de fenólicos totais maior no extrato de talos do que no extrato proveniente de bulbos. Adicionalmente, os autores também observaram que o extrato de talos de beterraba vermelha apresentou

quantidades consideráveis de betalaínas, entre betacianinas e betaxantinas, e atividade antioxidante.

Os pigmentos de origem biológica são intensamente pesquisados devido ao seu potencial de aplicação e aos benefícios à saúde humana. As betalaínas são uma família de pigmentos presentes em plantas da ordem *Centrospermae* (Caryophyllales); sua classificação, conforme sua estrutura química, é de compostos *N-heterocíclicos*; são hidrossolúveis e encontrados como betacianinas (vermelho violeta) e betaxantinas (amarelo) (Escribano *et al.*, 1998). A fonte mais comum de betalaínas é a beterraba vermelha (*Beta Vulgaris* L) e a betalaína majoritária nesse vegetal é a betanina, um tipo de betacianina (Manchali *et al.*, 2012). Além da beterraba vermelha, betalaínas podem ser encontradas em outros vegetais como amaranto, acelga, pera de cactos e pitiaia (Stintzing e Carle, 2008a).

Stintzing e Carle (2007) reportam que, até o ano de 2007, foram identificadas, na natureza, cerca de 55 estruturas de betalaínas, incluindo betacianinas e betaxantinas. Os autores consideraram este número bastante modesto, quando comparado a outros pigmentos, como as antocianinas, as quais apresentavam em torno de 550 estruturas identificadas até aquele momento.

Apesar de apresentarem colorações semelhantes as plantas que possuem antocianinas, diferentemente destas, a coloração dos compostos ricos em betalaínas não é afetada pelo pH do meio (Stintzing e Carle, 2007). A estabilidade da coloração em um meio com pH no intervalo entre 3 e 7 torna particularmente adequada a aplicação de betalaínas para uma ampla faixa de alimentos ácidos e neutros (Stintzing e Carle, 2007). Dessa forma, as betalaínas podem ser uma alternativa para substituir as antocianinas como corante natural em uma vasta gama de produtos alimentícios (Stintzing e Carle, 2004). Segundo Gonçalves *et al.* (2012), o extrato de betalaínas retirado da beterraba vermelha é utilizado amplamente como corante natural em produtos lácteos, bebidas e doces.

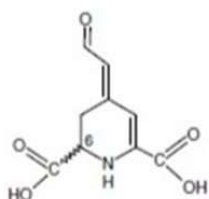
Segundo Stintzing e Carle (2008a), a betalaína presente em maior quantidade na beterraba vermelha é a betanina, seguida pela isobetanina e pela



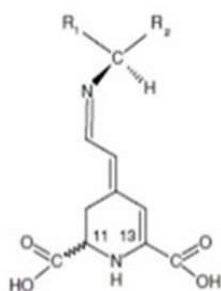
prebetanina. Os autores também afirmam que a beterraba vermelha possui, ainda, em menor quantidade, as betaxantinas Vulgaxantina I e Vulgaxantina II.

Na Figura 3.2 estão apresentadas as estruturas do ácido betalâmico, bem como a estrutura base das betaxantinas e betacianinas. Na mesma figura estão apresentados alguns exemplos de substituições para os radicais e os respectivos compostos formados com essas substituições.

(A) Ácido Betalâmico

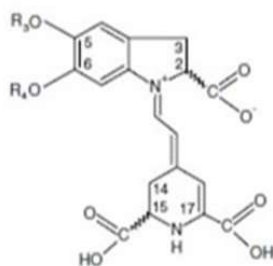


(B) Betaxantinas



Padrão de Substituição		Composto
R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	
H	Ácido Glutâmico	Vulgaxantina I
	Prolina	Indicaxantina

(C) Betacianinas



Padrão de Substituição		Composto
R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	
β-glicose	H	Betanina
6'-o-(malonil)-β-glicose	H	Phyllocactus
6'-o-(3''-hidroxi-3'' metilglutarilo)-β-glicose	H	Hylocerina
2'-o-(β-ácido glicurônico)-β-glicose	H	Amarantina
H	β-glicose	Gonfrenina I

Fonte: adaptado de Herbach *et al.* (2006).

Figura 3.2 – Estruturas químicas do ácido betalâmico (A), betaxantinas (B) e betacianinas (C), com algumas possíveis substituições para os radicais

A presença de betalaínas possibilita outras vantagens, além da coloração vermelha, podem atuar com propriedades de atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobiana, hepatoprotetoras e propriedades antitumorais (Gengatharan *et al.*, 2015; Georgiev *et al.*, 2010).

As betalaínas resultantes da concentração de sumos ou de pós do bulbo da beterraba vermelha, entretanto, podem apresentar um sabor indesejável e maus odores, que lembram o aroma de terra úmida (Georgiev *et al.*, 2010; Stintzing e Carle, 2007; Azeredo, 2009). O alto teor de nitrato e derivados de pirazina e geosmina, responsáveis por esses aspectos indesejáveis e pela

formação de nitrito e de nitrosaminas, torna necessária a redução dos mesmos por meio da desnitrificação microbiana (Stintzing e Carle, 2008a).

Devido a essa característica indesejável, o teor de geosmina, em alimentos à base de beterraba, foi alvo de alguns estudos (Lu *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2002; Tyler *et al.*, 1978). No estudo realizado por Tyler *et al.* (1979), foram avaliadas as características sensoriais da presença de geosmina em sucos de beterraba. Os autores observaram que o limiar para a percepção de geosmina no suco de beterraba é de 5,8 µg/g; sendo este limiar 35 vezes maior do que o da água destilada.

O tratamento térmico é também utilizado para reduzir parcialmente os efeitos da geosmina nas características sensoriais dos produtos à base de beterraba. Além disso, há uma patente que utiliza a ultrafiltração como forma de remoção da geosmina (Stintzing e Carle, 2008a), da companhia Henkel (Behr *et al.*, 1984). Não foi avaliada a presença de geosmina no presente trabalho. Porém, a clarificação do extrato de talos de beterraba vermelha foi realizada utilizando o processo de ultrafiltração, o que pode ter, também, contribuído para a remoção da geosmina presente no extrato.

### **3.3.1. Estabilidade das Betalaínas**

As betalaínas tornam-se propensas à degradação a partir do momento em que são extraídas, com o rompimento do tecido vegetal (Stintzing e Carle, 2008a). A degradação desses pigmentos durante a extração, portanto, já foi alvo de alguns estudos presentes na literatura, como os desenvolvidos por Cardoso-Ugarte *et al.* (2014) e Loginova *et al.* (2011), que estudaram a aplicação de extração de betalaínas da beterraba vermelha assistida por micro-ondas e por campo elétrico pulsado, respectivamente.

A estabilidade das betalaínas está relacionada com fatores endógenos, tais como a atividade de enzimas, como a polifenoloxidase, a peroxidase e a β-glicosidase, e complexação metal-pigmento, e com fatores relacionados às condições do processo de extração, tais como a temperatura, a presença de oxigênio e o pH (Azeredo, 2009; Stintzing e Carle, 2008a). Conhecer as condições de processamento do alimento e, principalmente, as possibilidades de modificação destes são questões essenciais para a manutenção do pigmento

natural, permitindo a menor degradação possível destes compostos ao longo do processamento.

O pH do meio em que as betalaínas estão presentes também influencia na estabilidade desses pigmentos. A literatura apresenta estudos indicando que as betalaínas estão mais estáveis em pH entre 3 e 7 (Herbach *et al.*, 2006; Stintzing e Carle, 2004). Logo, pHs extremamente ácidos (abaixo de 3) e pHs de neutros até alcalinos (acima de 7) podem induzir as betalaínas à degradação. Em outros estudos, a betanina mostrou-se mais estável em pH entre 5,5 e 5,8 (Huang e von Elbe, 1987; Saguy, 1979).

A temperatura pode ser considerada o fator que tem maior influência na estabilidade das betalaínas, uma vez que calor é empregado tanto no processamento quanto no armazenamento do alimento (Herbach *et al.*, 2006). Assim, o comportamento desses pigmentos naturais quando submetidos a tratamentos térmicos e ao armazenamento/manipulação a altas temperaturas são constantemente reportados na literatura. Ravichandran *et al.* (2013) estudaram a influência de alguns processos térmicos no teor de betalaínas e na atividade antioxidante em bulbos de beterraba vermelha. Os autores observaram que, quando pequenos pedaços de bulbo de beterraba vermelha foram submetidos ao tratamento térmico via imersão em água à 80 °C, 180 s, o teor de betacianinas diminuiu 51% em relação a sua concentração inicial.

Durante o processamento, estudos sugerem que ocorre degradação considerável do pigmento quando o processo é aplicado em temperaturas a partir de 50 °C. A Tabela 3.2 apresenta a influência da temperatura (tratamento térmico) na concentração de betalaínas de suco de beterraba a pH 5,8.

Tabela 3.2 - Influência da temperatura no tempo de meia-vida (min) de betanina em suco de beterraba com pH 5,8

	Temperatura (°C)			
	61,5	75,5	85,5	100,0
Tempo de meia-vida (min)	154,3	47,4	21,7	7,3

Fonte: adaptado de Saguy (1979).

Com auxílio da Tabela 3.2, observa-se um aumento da degradação térmica da betanina, através da diminuição do tempo de meia-vida, com o

aumento de temperatura. Quando os autores aumentaram a temperatura de 61,5 °C para 75,5 °C, o tempo de meia-vida da betanina reduziu aproximadamente 69%. Logo, é de suma importância a redução/adequação das condições de temperatura e tempo de processamento do tratamento térmico visando à diminuição de danos ao extrato e aos pigmentos.

Cejudo-Bastante *et al.* (2014) avaliaram a utilização de Ulluco (*Ullucus tuberosus*), vegetal amplamente cultivado na região andina da América do Sul, como fonte de betalaínas. Os autores verificaram a influência do pH (4, 5 e 6) e da temperatura (4, 20 e 80 °C) a fim de determinar as condições ideais de armazenamento e os tratamentos tecnológicos possíveis quando o extrato do vegetal era empregado como corante alimentício. Os autores observaram que o Ulluco pode ser utilizado como fonte de betalaínas visando à aplicação como corante natural, destacando, entretanto, a necessidade de mais estudos com este vegetal, principalmente com relação às características químicas das betalaínas provenientes do Ulluco.

As betalaínas também são suscetíveis à degradação quando expostas à luz; essa degradação ocorre pela absorção da luz que ocasiona uma excitação nos elétrons dos cromóforos das betalaínas, elevando estes elétrons para um maior nível energético e deixando a molécula mais reativa ou com sua energia de ativação reduzida (Herbach *et al.*, 2006; Jackman e Smith, 1996). Outro fator que influencia na degradação das betalaínas é o oxigênio, sendo que na sua ausência esses pigmentos naturais tornam-se mais estáveis (Manchali *et al.*, 2012; Damodaran *et al.*, 2008).

A interação de fatores ambientais pode acelerar a degradação das betalaínas: a oxidação pode ser acelerada na presença de luz, por exemplo (Gonçalves *et al.*, 2012; Kanner *et al.*, 2001). A Tabela 3.3 apresenta os valores de tempo de meia-vida da betanina (em min) em função da presença/ausência de oxigênio e do pH de uma solução aquosa aquecida a 90 °C com concentração inicial de 0,25mM ( $\approx 137,5$  mg/L), reportado por Huang e von Elbe (1987).

Tabela 3.3 – Tempo de meia vida de betanina submetida a 90 °C em diferentes pH e atmosferas

pH	Valores de tempo de meia-vida de betanina (min)	
	Nitrogênio	Oxigênio
3,0	56 ± 6	11,3 ± 0,7
4,0	115 ± 10	23,3 ± 1,5
5,0	106 ± 8	22,6 ± 0,8
6,0	41 ± 4	12,6 ± 0,8
7,0	4,8 ± 0,8	3,6 ± 0,3

Fonte: adaptado de Huang e von Elbe (1987).

Huang e von Elbe (1987) observaram que o tempo de meia vida da betanina submetida à atmosfera de oxigênio, juntamente com aquecimento, foi menor em todos os valores de pH avaliados. Além disto, os pHs 4,0 e 5,0 foram aqueles que apresentaram os maiores valores de tempo de meia-vida em ambas as atmosferas, sendo esta, portanto, a faixa de pH que apresentou a menor degradação do pigmento.

Antioxidantes podem ser adicionados aos alimentos quando esses possuem compostos altamente suscetíveis à degradação. A utilização de antioxidantes, como o ácido iso-ascórbico e o ácido ascórbico, pode auxiliar na estabilidade das betalaínas, principalmente na presença de quelantes como o EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e o ácido cítrico. Entretanto, a utilização de antioxidantes fenólicos que impedem a auto-oxidação da cadeia por radicais livres, como BHA (2-terc-butil-4-hidroxianisol e 3-terc-butil-4-hidroxianisol) e catequina não são adequados, uma vez que esse tipo de antioxidante não influencia na estabilidade da betanina (Damodaran *et al.*, 2008).

Além dos fatores ambientais, os fatores endógenos também exercem ampla influência na estabilidade das betalaínas. Os fatores internos que afetam a estabilidade das betalaínas são primordialmente a ação das enzimas, representadas na sua maioria pelas  $\beta$ -glicosidases, as polifenoloxidasas e as peroxidases (PODs). PODs são protoenzimas classificadas como oxiredutoras e estão presentes principalmente nos vacúolos das células vegetais (Yong, 2014;

Neelwarne e Rudrappa, 2012). As PODs presentes nas plantas são monoméricas, com massa molar em torno de 40 – 45 kDa, exibem pH ótimo entre 4,0 e 6,0 e são consideradas as enzimas mais termoestáveis presentes no tecido vegetal (Damodaran *et al.*, 2008).

Quando a POD está fora do “sistema da planta” pode catalisar a desidrogenação de uma gama de compostos fenólicos, aminas aromáticas e hidroquinonas. Apesar de nem todas as funções da peroxidase estarem completamente compreendidas, estudos apresentados na literatura sugerem que este tipo de enzima pode destruir pigmentos naturais, particularmente betalaínas provenientes de beterraba vermelha (Damodaran *et al.*, 2008).

A beterraba vermelha é rica em POD e betacianinas são mais suscetíveis à degradação por enzimas que betaxantinas. Portanto, o controle da atividade da POD contribui para a manutenção das betalaínas vermelhas no extrato. A atividade da POD é dependente principalmente da temperatura, pH, atividade de água e exposição à luz (Yong, 2014; Neelwarne e Rudrappa, 2012).

Liu *et al.* (2008) estudaram a inativação da POD de extrato de bulbo de beterraba (pH 5,83) com variação da temperatura e do pH. Os autores observaram atividade residual (RA) de POD de 78,3% após o tratamento térmico a 55 °C por 60 min. Comportamento similar foi encontrado no estudo desenvolvido por Rudrappa *et al.* (2005), onde foi investigada a estabilidade de extrato de beterraba vermelha em diferentes pHs (4, 6, 7 e 9) e temperaturas (50, 60 e 70 °C). Os autores observaram redução da atividade de POD menor que 40% nos extratos com pH 6, tratados nas temperaturas de 50 e 60 °C durante 40 min. Esses estudos mostraram que os tratamentos térmicos moderados utilizados não foram suficientes para inativar a POD quando aplicados em curtos períodos de tempo.

No estudo de Liu *et al.* (2008), os autores estimaram que o tempo de redução decimal (*D*) da inativação da POD foi de 555,56 min na temperatura de 55 °C. Ou seja, são necessários mais de 550 min de tratamento à 55 °C para que a atividade residual da POD seja apenas de 10%. Entretanto, Rudrappa *et al.* (2005) observaram um aumento na velocidade de inativação de POD quando o tratamento teve sua temperatura aumentada para 70 °C durante 10 min. Este resultado está de acordo com Yong (2014), que menciona que enzimas perdem

sua atividade em temperaturas superiores a 60 °C. Por outro lado, longos tempos de processamento causam uma extensiva degradação das betalaínas. Portanto, o uso de altas temperaturas em tempos curtos de processamento pode ser uma alternativa para reduzir a degradação excessiva de pigmentos durante o tratamento.

### **3.3.2. Vias de degradação das betalaínas**

Assim como descrito anteriormente, o processamento do alimento pode causar a degradação das betalaínas. A literatura apresenta algumas reações que ocorrem com esses pigmentos durante o processamento, causando a sua degradação. Dentre as reações que podem causar a degradação das betalaínas, a isomerização, a glicólise e a hidrólise podem ser citadas como as mais comuns.

As betacianinas são comumente acompanhadas de seus respectivos isômeros, porém a incidência desses compostos varia de acordo com a sua fonte. No caso da betanina, não há diferença na cor quando comparada a isobetanina (Herbach *et al.*, 2006), não ocasionando relevantes problemas quando os pigmentos são utilizados na forma de corantes. Além da fonte, o tipo de processamento também influencia na condição apresentada; tratamentos térmicos, por exemplo, podem reduzir a proporção betanina/isobetanina (von Elbe *et al.*, 1981).

Algumas condições de processamento extremas como meios fortemente ácidos, altas temperaturas ou ainda presença de enzimas como a  $\beta$ -glicosidase podem ocasionar a quebra da ligação da betanina com a glicose, resultando em um deslocamento batocrômico (Herbach *et al.*, 2004; Zakharova e Petrova, 2000; Jackman e Smith, 1996).

A literatura também apresenta uma outra reação que acarreta na degradação das betalaínas: a hidrólise. Neste tipo de reação, observada em tratamentos térmicos, ocorre a quebra da ligação aldimina das betalaínas. Na betanina, betalaína majoritária da beterraba vermelha, a quebra produz ácido betalâmico e ciclodopa-5-O-glicosídeo, diminuindo a sua potência de coloração e deslocando a cor em direção ao amarelo (Herbach *et al.*, 2006). Contudo, a hidrólise da betanina pode ser reversível. A regeneração da betanina ocorre com a condensação da base de Schiff, a qual pode ser favorecida por fatores como

o ajuste ao pH 6, o resfriamento imediato após o tratamento térmico e a abstenção de oxigênio (Damodaran *et al.*, 2008; Czapski, 1990; Huang e von Elbe, 1987; Saguy, 1979).

Em função do exposto anteriormente, o conhecimento dos fatores endógenos, do ambiente e os mecanismos envolvidos na estabilidade/degradação das betalaínas é vital para a obtenção de um corante natural aplicável em alimentos. Os processos de extração das betalaínas, etapa na qual este conhecimento é primordial, serão discutidos a seguir.

### **3.4. Extração**

A extração é uma etapa de grande importância para a obtenção de compostos funcionais, interferindo no isolamento, identificação e, por consequência, na utilização posterior dos mesmos (Radhakrishnan *et al.*, 2013; Cissé *et al.*, 2012; Bucić-Kojić *et al.*, 2007). Vários métodos de extração são aplicados em alimentos; a extração sólido-líquido, por exemplo, pode utilizar água como solvente (Cissé *et al.*, 2012) ou um solvente orgânico (Zaghdoudi *et al.*, 2015). Pode-se citar, ainda, como métodos de extração, a aplicação de tecnologias não térmicas (Briones-Labarca *et al.*, 2015), a aplicação de tecnologias que utilizam o campo elétrico (Loginova *et al.*, 2011) e a aplicação do esmagamento, onde o alimento é submetido ao processo sem estar disperso em um meio ou um solvente (Gonçalves *et al.*, 2012).

Como discutido anteriormente, as betalaínas são muito propensas à degradação, principalmente quando manipuladas em presença de luz, calor e oxigênio. Dentre todos os métodos de extração aplicáveis na indústria, o esmagamento é um dos poucos métodos que não utiliza solventes orgânicos e altas temperaturas. Gonçalves *et al.* (2012) utilizaram uma centrífuga de alimentos para aplicar o esmagamento em amostras de bulbos de beterraba vermelha. Estes autores observaram que a centrifugação permitiu a obtenção de uma amostra homogênea, que possibilitou uma avaliação adequada dos métodos de purificação, objetivo principal do estudo citado.

A extração sólido-líquido é um dos métodos mais aplicado na extração de pigmentos naturais, que consiste basicamente na imersão de um sólido em um meio líquido com o intuito de transferir compostos do sólido para o líquido.



Segundo Cissé e colaboradores (2012), a extração sólido-líquido é limitada pelo processo de difusão, o que torna o processo de transferência lento. Os autores reportam que na literatura existem muitos estudos que apresentam diversas formas de aumentar a taxa de transferência de massa em um processo de extração sólido-líquido, como a redução do tamanho das partículas, o aumento da difusividade mássica efetiva, a modificação do pH do meio e o aumento da temperatura de extração.

Quando a extração sólido-líquido é aplicada em um tecido vegetal com a finalidade de extrair compostos funcionais, o comportamento da extração precisa ser avaliado para cada situação. As variações da natureza do solvente utilizado, a presença de diferentes compostos antioxidantes e as características naturais do tecido vegetal influenciam no rendimento do extrato e na sua atividade antioxidante (Radhakrishnan *et al.*, 2013; Peschel *et al.*, 2006).

O etanol é um solvente comumente encontrado em metodologias de extração sólido-líquido. No estudo desenvolvido por Ravichandran *et al.* (2013), as betalaínas foram extraídas da beterraba vermelha liofilizada por meio deste tipo de metodologia, utilizando 1 g de beterraba liofilizada com 10 ml de solução aquosa de etanol 50%. Os autores aplicaram a extração sólido-líquido três vezes no mesmo sólido para aumentar a quantidade de betalaínas extraídas.

Estes métodos de extração, no entanto, não são sempre econômica e ambientalmente viáveis. Técnicas de extração estão sendo continuamente desenvolvidas visando reduzir o tempo de processo e o consumo de solventes orgânicos e aumentar a eficiência da extração; estes melhoramentos permitem reduzir o custo do processo e a poluição ambiental (Huang *et al.*, 2013). Além disso, a consciência dos consumidores sobre a saúde faz com que aumente a busca por alimentos com melhor qualidade, com maior segurança alimentar, com maior valor nutricional e com a sensação de alimento fresco, características que refletem diretamente em seu sabor (Huang *et al.*, 2017), incentivando o desenvolvimento de técnicas de extração mais amigáveis aos alimentos. A seguir serão apresentados de forma mais detalhada as técnicas de extração de interesse para este trabalho.

### 3.5. Processamento por Alta Pressão (HPP)

O Processamento por Alta Pressão (HPP do inglês *high pressure processing*) é uma tecnologia promissora que permite o desenvolvimento de novos produtos alimentares com qualidades sensoriais e nutricionais superiores, e que, além disso, colabora no aumento da vida útil do alimento (Barbosa-Cánovas *et al.*, 2005).

No HPP, o alimento é colocado em uma embalagem plástica que suporta altas pressões sem romper e é fechada a vácuo. O alimento embalado é disposto dentro de um vaso de pressão, sendo necessário que algum fluido permita a aplicação da pressão ao longo do alimento. Comumente os equipamentos de HPP que operam na indústria utilizam água como fluido de trabalho. Após o fechamento do equipamento, água é adicionada no recipiente em que está o alimento sendo então aplicada a pressão de trabalho que pode variar de 1.000 a 10.000 bar.

O processo de pressurização leva poucos minutos e causa um leve aquecimento no alimento. Após o tratamento, o vaso é imediatamente despressurizado e o alimento pode ser retirado do equipamento.

Para a aplicação dessa tecnologia no tratamento de algum alimento é necessário que sejam conhecidos os princípios básicos do HPP. Segundo Balasubramaniam *et al.* (2015), o processamento por alta pressão está baseado nos fundamentos apresentados a seguir.

- Princípio isostático – a aplicação da pressão age igualmente em todas as direções e pode ser estabelecida quando um fluido é utilizado para transmitir a pressão em todo o alimento. Considerando este princípio, quando a alta pressão é aplicada, seus efeitos são distribuídos de forma instantânea e homogênea ao longo de todo o alimento.
- Princípio de *Le Chatelier* – um fenômeno de mudança de fase, mudança na configuração molecular ou reação química, acompanhado por uma diminuição do volume e intensificado pela pressão.

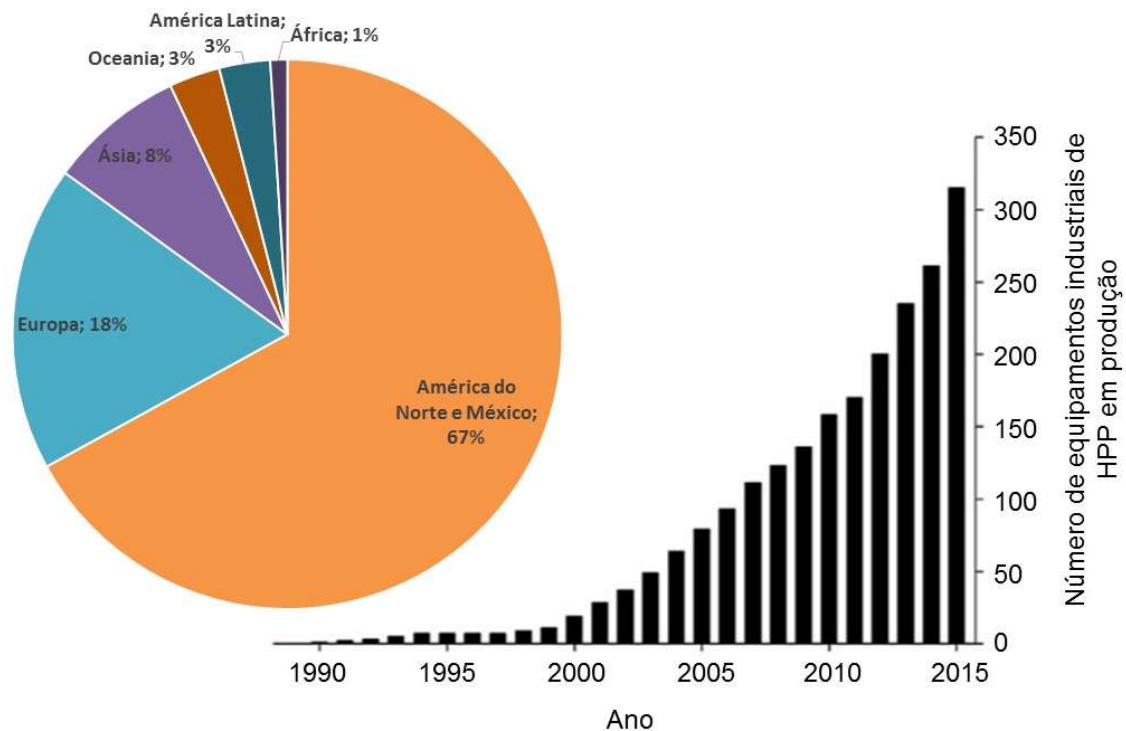
- Ordenação microscópica – a pressão e a temperatura exercem forças antagonistas nas reações químicas e na estrutura molecular, uma vez que, a temperatura constante, o aumento da pressão aumenta a ordenação das moléculas em uma determinada substância.
- Relação de Arrhenius – assim como no processamento térmico de alimentos, diversas taxas de reação também são influenciadas por efeitos térmicos ao longo do HPP.

A literatura mostra que esta tecnologia tem sido utilizada para inativar enzimas, como polifenoloxidase e peroxidase, além de micro-organismos indesejáveis (Briones-Labarca *et al.*, 2015; Sampedro *et al.*, 2009).

Devido ao princípio isostático, o HPP pode ser aplicado a diferentes tipos de alimentos - citando-se os trabalhos que utilizaram kiwi (Fang *et al.*, 2008), fatias de abacate (Woolf *et al.*, 2013) e fatias de beterraba (Paciulli *et al.*, 2016) - uma vez que a ausência de poros, a alta umidade, o estado físico do alimento (líquido ou sólido) não são considerados um limitante para a aplicação dessa tecnologia.

No processamento HPP a alta pressão atinge o alimento como um todo, isto é, a transferência de pressão é instantânea, diferentemente de um tratamento térmico convencional onde ocorre inicialmente o aquecimento da superfície do alimento e, ao longo do tratamento, o calor é transferido através do alimento. Além disto, o tratamento térmico convencional pode afetar negativamente as características sensoriais e nutricionais do alimento (Huang *et al.*, 2017).

Apesar das inúmeras vantagens da aplicação de HPP, a literatura apresenta uma quantidade relativamente inferior de pesquisas com essa tecnologia quando comparada aos processamentos convencionais. O alto investimento no equipamento pode ser uma dificuldade no aumento do número de estudos com essa tecnologia. Mesmo assim, foi observado um aumento expressivo na utilização da tecnologia pela indústria nos últimos anos, como pode ser observado na Figura 3.3.



Fonte: adaptado de Huang *et al.*, 2017.

Figura 3.3 - Crescimento mundial do uso da tecnologia de processamento por alta pressão na indústria alimentícia

Como pode ser observado na Figura 3.3, o crescimento de número de equipamentos foi bastante expressivo nos últimos anos. No ano 2000, menos de 50 máquinas estavam em operação industrial. Após 15 anos, esse número ultrapassa 300 equipamentos.

Porém, a distribuição mundial dos equipamentos é bastante desproporcional, uma vez que a América do Norte e o México concentram 67% dos equipamentos industriais de HPP.

### 3.6. Tratamento Térmico com Alta Temperatura em Curto Tempo (HTST)

A aplicação de tratamento térmico pode conduzir a mudanças positivas nos alimentos, como torná-los mais macios e com diferentes componentes aromáticos; mas, também, pode conduzir a mudanças negativas como a perda de vitaminas, minerais, compostos funcionais, cor e aparência de fresco (Güneşer, 2016; Huang *et al.*, 2013; Ohlsson e Bengtsson, 2002; Czapski, 1990)

A indústria alimentícia encontra-se em um momento em que precisa se adaptar às novas tendências alimentares, visto que os consumidores estão buscando cada vez mais alimentos prontos para o consumo, novos produtos sem aditivos em excesso, com qualidade sensorial e nutricional e sem perda dos componentes funcionais do alimento (Wootton-Beard e Ryan, 2011; Blasco *et al.*, 2004).

Uma alternativa para evitar ou minimizar estas alterações de qualidade indesejáveis durante o processamento térmico é o tratamento térmico aplicado com alta temperatura em um curto período de tempo (HTST do inglês *High Temperature Short Time*). A alta temperatura por um curto tempo permite a rápida inativação dos micro-organismos e enzimas que requerem processos como pasteurização ou esterilização, minimizando as alterações na qualidade do alimento. Entretanto, o controle da eficiência do processamento é crucial para que a qualidade do produto não seja comprometida pelo tratamento (Ohlsson e Bengtsson, 2002).

O tratamento térmico HTST é uma opção de processamento quando os compostos de interesse do alimento são termossensíveis. Contudo, por ainda se tratar de um tratamento térmico, é necessário o conhecimento da degradação desses compostos devido à exposição a altas temperaturas. A literatura apresenta estudos de alimentos com compostos termossensíveis tratados com HTST, como ácido ascórbico em cogumelos (Blasco *et al.*, 2004) e carotenoides em suco de cenoura (Zhang *et al.*, 2016). Apresenta, também, estudos sobre a inativação de micro-organismos como bactérias *Pediococcus* sp em cidra de maçã (Piyasena *et al.*, 2003) e enzimas como POD e PPO em néctar de damasco (Huang *et al.*, 2013). Na maioria dos estudos o tratamento térmico HTST foi eficiente na inativação/redução de atividade dos micro-organismos e enzimas em que foi testado, preservando de forma satisfatória os compostos termossensíveis dos alimentos.

Por ser um processamento térmico capaz de minimizar os efeitos na qualidade do alimento, o tratamento térmico HTST é, muitas vezes, comparado com tecnologias emergentes não-térmicas; uma das tecnologias emergentes estudadas neste trabalho, e que a literatura apresenta estudos de comparação, é o HPP.

No estudo desenvolvido por Huang *et al.* (2013) os autores comparam os efeitos dessas duas tecnologias, tratamento térmico HTST e HPP, na atividade das enzimas POD, PPO e pectina metil-esterase (PME), na concentração de compostos fenólicos, carotenoides e na cor de néctar de damasco. Os autores observaram que um dos tratamentos com melhores resultados utilizando o HPP, aplicado a 500 MPa por 20 min, permitiu o aumento da concentração dos carotenoides totais, aumento de  $\beta$ -caroteno e cor mais próxima do néctar de damasco controle. Em contrapartida, o tratamento HTST aplicado a 110 °C por 8,6 s possibilitou a inativação completa das enzimas, maior teor de fenólicos totais, de (-)-epicatequina, de ácido ferúlico e de ácido p-cumárico, além de ter apresentado amostras com cor mais luminosa e intensa. Logo, os autores concluíram que o tratamento HTST teve um impacto mais positivo na qualidade do néctar de damasco.

O tratamento térmico HTST, porém, apresenta algumas desvantagens, como quando aplicado em alimentos sólidos ou com alta viscosidade. Como é necessário um tempo para que o calor seja transferido para o interior do alimento, a superfície que está recebendo mais calor pode superaquecer, ocasionando perdas na qualidade do alimento. Essa desvantagem é ainda maior quando o alimento tratado está embalado, ou enlatado, em uma embalagem com grandes dimensões ou grande quantidade de alimento. Nestas situações, uma alternativa para alguns casos é processar o alimento antes de colocá-lo na embalagem final e, em seguida, embalá-lo assepticamente (Ohlsson e Bengtsson, 2002).

Apesar dessas limitações, o tratamento térmico HTST está sendo estudado para aplicações em uma ampla variedade de alimentos, incluindo o próprio leite humano. No estudo desenvolvido por Giribalbi *et al.* (2016), essa tecnologia foi aplicada com o objetivo de inativar as bactérias *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Chronobacter sakazakii*, mantendo o máximo dos componentes biológicos do leite humano. Após a aplicação do tratamento, os autores observaram que não ocorreu crescimento de bactérias e patógenos no leite, e apresentou valores de atividade da lipase estimulada pelo sal biliar e pelo teor de imunoglobulina A secretora (IgAS) superiores ao do leite pasteurizado. Os autores concluíram que a utilização da tecnologia HTST

resultou em um leite humano tratado com características que atende aos requisitos de segurança dos bancos de leite europeus, mantendo fatores de suma importância para a qualidade do alimento.

Considerando que o extrato de talos de beterraba possui compostos termossensíveis com viscosidade próxima à da água, o tratamento térmico HTST é uma alternativa para o processamento dos extratos ricos em betalaínas, uma vez que essa tecnologia permite a aplicação de calor em curtos períodos de exposição, resultando em uma menor modificação das características naturais do alimento, quando comparado aos tratamentos térmicos convencionais. Além disso, o uso de betalaínas como corante alimentício deve ser avaliado não somente durante o tratamento, mas também durante o período de armazenamento, após o tratamento.

A literatura apresenta poucos estudos sobre a estabilidade de betalaínas, sendo que os mais comuns tratam da aplicação do tratamento térmico convencional. No estudo desenvolvido por Mereddy *et al.* (2017) foi analisada a estabilidade das betalaínas presentes em suco de beterraba vermelha, cru e cozido, armazenado a temperatura ambiente e refrigerado (4 °C), na presença de luz (lâmpada fluorescente – 12 W) e na ausência de luz. Além disto, também foi avaliada a influência do pH (4,5, 5,5 e 6,5) sobre a estabilidade das betalaínas em suco de beterraba cozido. Os autores verificaram que o tratamento térmico contribuiu para o aumento da estabilidade do suco em todas as condições testadas.

Estudos que aplicam o tratamento térmico HTST em extratos de betalaínas provenientes de beterraba vermelha avaliando a estabilidade dos pigmentos durante o armazenamento, especialmente quando o extrato é oriundo dos talos, não foram encontrados na literatura até o presente momento.

### **3.7. Clarificação – Processos de separação por membranas (PSM)**

O processo de clarificação é empregado para remoção de partículas suspensas presentes em solução. Além disto, a clarificação pode retirar outros compostos que não são desejados ao produto final. Na indústria de sucos de frutas, por exemplo, o processo de clarificação pode ser aplicado para remover taninos, que interferem negativamente no sabor da bebida (Bagci, 2014).

A aplicação de agentes clarificantes, como gelatina e bentonita, por exemplo, permite a floculação das partículas suspensas, possibilitando a remoção das mesmas. A utilização do processo de ultrafiltração como clarificação no processamento de sucos de fruta permite a eliminação de agentes clarificantes e, por consequência, dos problemas associados ao uso desses agentes (Bagci, 2014).

Na literatura, são encontrados diversos estudos que avaliam a aplicação de processos de separação por membranas (PSM) para este fim, tais como os desenvolvidos para a clarificação de suco de romã (Bagci, 2014), de suco de maçã (He *et al.*, 2007) e de xarope de milho (Almandoz, *et al.*, 2010).

Quando se deseja obter um extrato rico em betalaínas passível de aplicação na produção de alimentos, é necessário remover as partículas suspensas e as macromoléculas presentes nestes extratos. Além disso, a remoção das enzimas que causam a degradação das betalaínas também é desejada a fim de aumentar a estabilidade dos extratos obtidos. Assim, os PSMs são considerados uma opção possível a ser estudada, uma vez que possibilitam a obtenção de um extrato clarificado, sem a necessidade de um tratamento posterior para inativação das enzimas.

Os processos de separação por membranas são aplicados para separar, concentrar e/ou purificar compostos e são considerados uma tecnologia recente, pois estão presentes há poucas décadas na indústria. Os processos que utilizam membranas sintéticas como barreiras seletivas começaram a aparecer a partir do início da década de 1970, aplicados juntamente com os processos de separação clássicos, como destilação, centrifugação e extração por solventes (Habert *et al.*, 2006).

A entrada das membranas no mercado ocorreu, primeiramente, com o uso de materiais poliméricos e estas ainda representam a grande maioria das membranas comerciais. Contudo, as membranas feitas de materiais inorgânicos começaram a disputar o mercado tendo como vantagens a facilidade de limpeza e a maior vida útil e, como desvantagem, o preço superior ao das poliméricas. O interesse por membranas inorgânicas vem aumentando uma vez que essas membranas são aplicáveis em uma vasta gama de processos, os quais podem

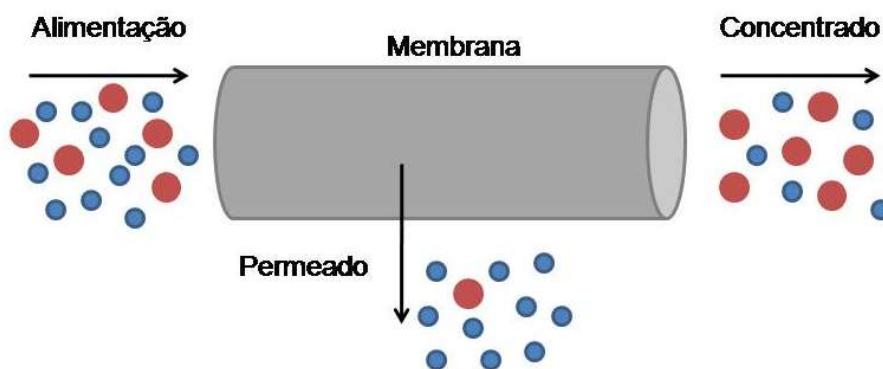


variar desde o tratamento de água e efluentes, até processamentos bioquímicos (Almandoz *et al.*, 2015).

A necessidade de novos estudos e o crescimento da aplicação dos PSM ocorre continuamente, pois, quando comparados às tecnologias convencionais, os PSM se apresentam mais eficientes em relação ao tamanho do equipamento e a sua capacidade de produção, além de reduzir o consumo de energia elétrica e a produção de resíduos, sendo considerados uma técnica sustentável e interessante de ser avaliada economicamente (Drioli e Fontananova, 2004).

Os PSM podem ser considerados adequados para o processamento industrial de substâncias termossensíveis uma vez podem ser operados a temperatura ambiente ou inferiores. Além disso, são uma alternativa quando deseja-se obter um produto final livre de solventes orgânicos ou, ainda, quando deseja-se utilizar, de forma mais adequada, as matérias-primas, proporcionando a recuperação e a utilização de sub-produtos da indústria, pois, na sua grande maioria, os PSM não necessitam da adição de produtos químicos (Chhaya *et al.*, 2012; Drioli e Fontananova, 2004).

Neste tipo de processo, a corrente que entra no sistema é chamada de alimentação, a corrente que passa através da membrana é conhecida como permeado e a corrente que não atravessa a membrana é o concentrado ou retido; este processo está, esquematicamente, apresentado na Figura 3.4.



Fonte: Autor

Figura 3.4 - Representação simplificada das principais correntes envolvidas em um processo de separação por membranas

Apenas a existência dessas correntes não permite a separação de determinado componente, sendo necessário o emprego de uma força motriz para auxiliar neste processo. Essa força motriz pode ser o gradiente de potencial elétrico e/ou químico, sendo que, este último, pode ser expresso em termos de diferença de concentração ou de pressão através da membrana.

A utilização do gradiente de pressão como força motriz é empregada em processos como a Microfiltração (MF), a Ultrafiltração (UF), a Nanofiltração (NF) e a Osmose Inversa (OI).

### **3.7.1. Conceitos básicos**

Alguns conceitos e nomenclaturas relativas aos PSM são apresentados a seguir.

#### **3.7.1.1. Fluxo**

O volume de solução, por unidade de área e por unidade de tempo, é conhecido como fluxo.

#### **3.7.1.2. Fluxo permeado**

O fluxo permeado é determinado pela aplicação da força motriz, pela resistência da membrana e pelas interações membrana-solução. O fluxo permeado está diretamente ligado às condições de operação e às características da solução de alimentação e da membrana. O fluxo do permeado é calculado a partir da Equação 3.1:

$$J_p = \frac{1}{A} \frac{dV}{dt} \quad \text{Eq (3.1)}$$

em que  $J_p$  é o fluxo permeado ( $\text{l m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ),  $A$  é a área de contato da membrana com a solução ( $\text{m}^2$ ),  $V$  é o volume de permeado (l) e  $t$  é o intervalo de tempo em que o volume de permeado foi recolhido (h).

#### **3.7.1.3. Fluxo limite**

Em pressões mais baixas, o aumento da pressão transmembrana (força motriz) resulta em um aumento no fluxo permeado; contudo, quanto maior o fluxo

permeado, maior a concentração de compostos retidos próximos à superfície da membrana. O fluxo limite é identificado quando o fluxo permeado permanece inalterado mesmo com o aumento da pressão transmembrana.

#### **3.7.1.4. Fluxo crítico**

Os PSM podem ser operados sob pressão ou fluxo constante. Em um PSM operado sob pressão constante, dependendo do valor deste parâmetro, o fluxo permeado pode se manter constante ou pode ir diminuindo ao longo do tempo, em função das incrustações formadas na superfície da membrana.

O maior valor de fluxo permeado em que não é observada redução do fluxo com o tempo é conhecido como fluxo crítico. Este valor é o último fluxo em que a linearidade entre fluxo *versus* tempo é mantida; a partir deste ponto, a relação não é mais linear. O sistema deve operar em uma pressão inferior a que ocasione o fluxo crítico para que, à medida que a permeação ocorra, ele ainda apresente um valor suficiente para considerar o processo viável.

Estudos de determinação do fluxo crítico podem ser encontrados na literatura. Kwon *et al.* (2000) determinaram o fluxo crítico durante a microfiltração tangencial de uma suspensão de partículas de látex de poliestireno, operada a fluxo constante. Para isto, os autores avaliaram o balanço de massa das partículas e o aumento da pressão transmembrana para que o fluxo permeado fosse mantido constante.

#### **3.7.1.5. Percentual de Retenção Observada**

A retenção observada ( $R_{obs}$ ) avalia a capacidade seletiva da membrana em relação a um determinado composto e pode ser obtida por meio da Eq 3.2:

$$R_{obs}(\%) = 100 \times \left(1 - \frac{C_P}{C_C}\right) \quad \text{Eq (3.2)}$$

onde  $C_P$  é a concentração do composto no permeado e  $C_C$  é a concentração do composto no concentrado (ambos em mg de betanina/100 ml de extrato).

Quando a  $R_{obs}$  é igual a 100%, não está ocorrendo permeação através da membrana, ou seja, tem-se a retenção completa do composto; quando a  $R_{obs}$  é

igual a 0%, a membrana não tem capacidade seletiva para este composto e toda alimentação permeia através da membrana.

### 3.7.1.6. Fator de Concentração Volumétrico

O Fator de Concentração Volumétrico (FCV) pode ser considerado fator limitante ao PSM e está diretamente associado ao fluxo permeado.

Durante a filtração através da membrana, a solução vai sendo concentrada e o fluxo permeado diminui. Este processo de concentração da alimentação ocorre devido à retenção dos compostos pela membrana, bem como pela redução do volume da alimentação. O FCV pode ser determinado por meio da Eq 3.3 e sua utilização é comumente aplicada em PSM operados em modo batelada:

$$FCV = \frac{V_0}{V_C} = \frac{V_0}{V_0 - V_P} \quad \text{Eq (3.3)}$$

em que  $V_0$  é o volume inicial da alimentação,  $V_C$  é o volume do concentrado e  $V_P$  é o volume do permeado (ambos em L).

### 3.7.1.7. Polarização por Concentração e *Fouling*

Durante os processos de separação por membranas, é comum ocorrer a redução do fluxo permeado ao longo do tempo. Essa pode ocorrer pelo acúmulo dos componentes presentes na alimentação nos poros da membrana (*fouling*), bem como devido à formação de uma camada polarizada na superfície da membrana (polarização por concentração) (Mondor *et al.*, 2000).

A polarização por concentração é um fenômeno de camada limite que ocorre devido ao aumento da concentração do composto próximo à superfície da membrana ao longo do processo. Esse aumento de concentração faz com que ocorra uma resistência adicional à transferência através da membrana, resultando na queda do fluxo permeado. Contudo, este é um fenômeno considerado reversível, que cessa quando cessa a alimentação (Habert *et al.*, 2006).

Este fenômeno é alvo de estudos em processos de diversas áreas, como nanofiltração de soluções de glicose (Almazán *et al.*, 2015), dessalinização de água (Amokrane *et al.*, 2015) e concentração de sacarose (Garcia-Castello *et al.*, 2009).

O *fouling* é outro problema bastante comum nos PSM e é constatado quando se observa uma redução contínua no fluxo permeado. O *fouling* pode ser resultado de uma combinação de diversos fenômenos, como o bloqueio de poros, a formação de camada gel, a adsorção e a deposição de soluto na superfície da membrana. Diferente da polarização por concentração, o *fouling* é considerado um fenômeno irreversível, ou seja, a diminuição do fluxo permeado causada pelo *fouling* permanece, mesmo cessando a alimentação.

Uma forma de quantificar o percentual de tendência ao *fouling* em um PSM é através da determinação da permeância hidráulica, antes e após a filtração da solução em estudo. A permeância hidráulica é o coeficiente angular de cada curva de fluxo permeado *versus* pressão transmembrana. Segundo Mänttari *et al.* (2006), o *fouling* pode ser calculado utilizando a seguinte equação (3.4):

$$Fouling (\%) = \left(1 - \frac{Lp_a}{Lp_b}\right) \times 100 \quad \text{Eq (3.4)}$$

onde  $Lp_b$  e  $Lp_a$  são, respectivamente, o coeficiente angular da curva da permeância hidráulica antes e após a filtração da solução em estudo.

Métodos físicos e químicos têm sido sugeridos com o intuito de diminuir o depósito de incrustações na superfície das membranas, dentre os quais se podem citar a limpeza química, modificações na alimentação ou na superfície da membrana e pulsos com ar ou água no sentido contrário ao fluxo (Almandoz *et al.*, 2010).

#### **3.7.1.8. Modos de operação comuns na indústria alimentícia**

##### ***Batelada***

O modo de operação mais usual na indústria alimentícia é o modo batelada, que consiste no tratamento de uma quantidade pré-determinada de

solução de alimentação. Neste modo o permeado é recolhido e a corrente de concentrado pode ou não retornar ao tanque de alimentação, dependendo da área de membrana e do fator de concentração desejado. Durante o processo ocorre uma diminuição do fluxo permeado não somente devido aos fenômenos de *fouling* e de polarização por concentração, mas também devido ao aumento da concentração da solução e, conseqüentemente, da sua viscosidade.

### **Diafiltração**

Diafiltração (DF) é uma forma de operar o processo de separação por membranas que dilui o concentrado com solvente ao longo do processo. A DF tem como objetivos a purificação da alimentação ou o aumento da recuperação de microssolutos na corrente de permeado. A diafiltração não é considerada um processo e sim uma modificação na operação do processo, que pode ser aplicada quando a separação de solutos com elevadas e baixas massas molares é prejudicada (Mulder, 1996). A adição de solvente na corrente do concentrado auxilia na separação, contribuindo para minimizar a redução do fluxo permeado.

O emprego da diafiltração no processo precisa ser bem estudado, pois vai influenciar substancialmente na qualidade dos produtos que serão obtidos com o processo no qual esse modo de operação foi empregado. No estudo realizado por Morin *et al.* (2006), foi comparada a microfiltração do soro do leite coalhado com e sem diafiltração. Os autores observaram que a aplicação da diafiltração permitiu o aumento do fluxo permeado, mas interferiu na seletividade, o que limitou o processo.

Em outras situações, a aplicação de diafiltração pode favorecer substancialmente o processo. Oliveira *et al.* (2016) estudaram a utilização de PSM para concentrar e purificar licopeno presente em suco de melancia. Os autores aplicaram a DF no processo de microfiltração e, com 300 min de operação, observaram um aumento significativo no fluxo permeado de  $70 \text{ kg h}^{-1}\text{m}^{-2}$  para  $93 \text{ kg h}^{-1}\text{m}^{-2}$ . Além disso, operando a MF no modo DF possibilitou uma redução de aproximadamente 8,5 vezes o teor de sólidos solúveis quando comparado ao suco de melancia inicial. Os sólidos solúveis do suco de melancia estudado são representados principalmente pelos açúcares glicose, frutose e sacarose, que reduziram respectivamente 71%, 40% e 54% quando tratados por MF no modo DF.

### 3.7.2. Processos de Microfiltração (MF) e Ultrafiltração (UF)

O processo de microfiltração (MF) utiliza membranas indicadas para a retenção de materiais que estão em suspensão ou em emulsão, com tamanho nominal de poros que varia de 0,1 e 10  $\mu\text{m}$  (100 e 10.000 nm) sendo que a pressão de operação destes processos dificilmente ultrapassa 3 bar.

Na literatura, encontram-se estudos que aplicam o processo de MF para diversas finalidades, tais como: recuperação de ácido láctico (Roque *et al.*, 2015), tratamento de águas residuais (Kumar *et al.*, 2015), recuperação de polifenóis presentes em efluentes de vinícolas (Giacobbo *et al.*, 2015), clarificação de suco de framboesa vermelha (Vladislavljević *et al.*, 2013), clarificação de xarope de milho (Almandoz *et al.*, 2010), entre outros.

O processo de MF também pode ser aplicado como um pré-tratamento, com o intuito de remover sólidos em suspensão, polissacarídeos, detritos celulares e outros materiais presentes na solução que usualmente não são removidos pela filtração convencional (Charcosset, 2006). No estudo desenvolvido por Poletto *et al.* (2015), a MF foi um dos pré-tratamentos testados para a ultrafiltração de pectinases. Os autores consideram que a MF foi eficiente como pré-tratamento, uma vez que não interferiu na recuperação do caldo enzimático e proporcionou um aumento no fluxo de mais de 50% no processo de ultrafiltração.

O processo de ultrafiltração (UF) é aplicado quando se pretende purificar e fracionar soluções que contêm macromoléculas. As membranas de UF possuem poros que variam de 1 a 100 nm, sendo mais fechados, portanto, quando comparados aos poros das membranas de MF. Normalmente, este tipo de processo opera com pressões de 2 a 10 bar e com o fluxo permeado entre 150 e 250  $\text{L m}^{-2}\text{h}^{-1}$ , quando não está ocorrendo polarização por concentração ou *fouling* na membrana. As membranas de UF são caracterizadas pela massa molar de corte (MMC).

Assim como para a MF, encontram-se na literatura diversos estudos que aplicam o processo de UF para diversas finalidades, tais como: separação de enzimas de extratos provenientes de resíduos da indústria alimentícia (Nor *et al.*, 2016), purificação de polissacarídeos bacterianos utilizados em vacinas (Hadidi

*et al.*, 2015), tratamento de água para potabilidade (Yu e Graham, 2015), pré-tratamento de dessalinização da água do mar (Woo *et al.*, 2015), clarificação de suco de romã (Bagci, 2014), clarificação de extrato de stevia (Chhaya *et al.*, 2012), entre outros.

A aplicação dos PSM na indústria alimentícia possibilita a produção de alimentos com alta qualidade, sabor natural e livre de aditivos alimentares. Um exemplo dessa aplicação, com estes resultados, é na produção de sucos de frutas industrializados (Almandoz *et al.*, 2010).

Na indústria de sucos de frutas, o principal problema encontrado nos processos de micro e ultrafiltração é o *fouling* formado na membrana, acarretando uma expressiva diminuição do fluxo permeado ao longo do tempo (Vladislavjević *et al.*, 2013; Mondor *et al.*, 2000); uma das opções para melhorar a clarificação de sucos por PSM é o emprego de pré-tratamentos. Bagci (2014) estudou a aplicação de gelatina, bentonita e polivinil polipirrolidona como pré-tratamentos no processo de UF do suco de romã. O autor observou que a utilização dos agentes clarificantes auxiliou no processo de clarificação. Contudo, quanto mais agentes clarificantes eram adicionados ao suco, mais alterações ocorriam nos atributos de qualidade do suco de romã (pH, acidez total, teor de fenólicos totais, antocianinas monoméricas totais, ácidos fenólicos individuais, ácidos orgânicos, atividade antioxidante e cor). O autor considerou o pré-tratamento que utilizou bentonita seguida por polivinil polipirrolidona como o mais adequado, pois, com este foi possível a obtenção de um suco melhor clarificado e mais estável.

Além das questões organolépticas, outra preocupação quando se processa um alimento é se os biocompostos presentes neste alimento estão sendo afetado pelo processo. Esta preocupação também deve ser avaliada quando um alimento é submetido aos PSM.

Patil e Raghavarao (2007) estudaram a concentração de antocianinas provenientes de rabanetes vermelhos através de ultrafiltração, osmose inversa (OI) e destilação osmótica (DO), aplicados, individualmente, e em combinações. Os autores avaliaram a permanência da cor e a estabilidade dos extratos concentrados e concluíram que, quando ocorre a clarificação por UF, a pré-



concentração por OI e a concentração final utilizando DO, os resultados são mais satisfatórios que quando aplicado apenas um único processo.

Além de serem usados para concentração de compostos, os PSM são uma alternativa para clarificação de extratos ricos em biocompostos, como o extrato de erva mate, estudado por Gerke *et al.* (2017). Neste estudo, os autores estudaram a aplicação de MF e MF seguida por UF visando a manutenção de biocompostos.

A literatura apresenta poucos estudos sobre a utilização de PSM em extratos de beterraba vermelha. Em um desses estudos, realizado por Mereddy *et al.* (2017), foi verificada a redução no teor de sal e nitrato de um extrato de beterraba vermelha, previamente microfiltrado, por meio de osmose reversa. Nesse estudo, os autores avaliaram a aplicação de membranas com massa molar de corte que variavam de 0,5 a 30 kDa na remoção de sais e outros sólidos dissolvidos, mantendo a maior quantidade de betalaínas possível no extrato previamente microfiltrado. Com resultados de remoção de mais de 96% dos sais e 47% de outros sólidos dissolvidos, os autores consideraram que o processo foi aplicado com sucesso no suco de beterraba.

Como descrito anteriormente, as betalaínas são muito suscetíveis à degradação durante o processamento. Então, é de suma importância que a adequação dos PSM no desenvolvimento deste trabalho considere os fatores que contribuem para a degradação desse pigmento natural.

## 4. Materiais e métodos

Neste capítulo estão descritos os materiais, os equipamentos, a metodologia experimental e os métodos analíticos utilizados no desenvolvimento deste trabalho. Este capítulo está dividido na apresentação das matérias-primas utilizadas, no estudo inicial que avalia a aplicação dos talos de beterraba vermelha como fonte de betalaínas, nos estudos que avaliam a aplicação das tecnologias HPP e HTST para o processamento dos extratos e, por fim, a clarificação dos extratos por PSM.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Tecnologia e Processamento de Alimentos (LATEPA) e no Laboratório de Separação por Membranas (LASEM), ambos localizados no Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Além disto, parte dos experimentos, referentes aos estudos que utilizaram HPP e tratamento térmico HTST, foram realizados no Departamento de Engenharia Química e de Materiais na Universidade de Auckland (*The University of Auckland*), localizado na cidade de Auckland, na Nova Zelândia.

### 4.1. Matéria-prima

As beterrabas vermelhas (*Beta vulgaris L.*) utilizadas nos estudos realizados na UFRGS foram adquiridas da Central de Abastecimento do Rio Grande do Sul (CEASA) em Porto Alegre, enquanto que as beterrabas vermelhas utilizadas na Universidade de Auckland (UoA) foram produzidas em Clevedon, região de Auckland, na Nova Zelândia.

### 4.2. Análises para a avaliação da qualidade dos extratos

#### 4.2.1. Determinação do teor de betalaínas

Como a betalaína majoritária na beterraba vermelha é a betanina, as análises para quantificar o teor do pigmento foram determinadas em função da concentração de betanina nos extratos obtidos (mg de betanina/100 ml de extrato). Para isto, foram realizadas quantificações por espectrofotometria através do método de Nilsson, descrito por Stintzing e Carle (2008b). Após a

análise espectrofotométrica, a concentração de betalaínas foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{Teor de betalaínas (mg|L)} = A \times DF \times MW \times 1000 / \epsilon \times L \text{ Eq ( 4.1)}$$

onde  $A$  é a absorção  $\lambda_{\text{máx}}$  (536 nm) corrigido pela absorção a 600 nm;  $DF$  é o fator de diluição;  $MW$  representa a massa molar ( $\text{g mol}^{-1}$ );  $\epsilon$  é absorvidade molar ( $\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ),  $L$  é igual ao comprimento de percurso (cm) (Stintzing e Carle, 2008b). Para facilitar a discussão dos resultados, optou-se por utilizar mg/100 ml ao invés de mg/l.

Nos experimentos realizados na UFRGS, foi utilizado o espectrofotômetro PG Instruments (T80 UV/VIS) e, nos experimentos realizados na UoA, foi utilizado o espectrofotômetro PerkinElmer (Agilent 8453).

#### **4.2.2. Taxa de degradação de betalaínas**

A degradação das betalaínas durante o período de armazenamento foi avaliada através da taxa de degradação (DR), a qual relaciona a variação da concentração de betalaínas ao longo dos dias de armazenamento. A DR (mg de betanina/100 ml de extrato por dia) é calculada utilizando a equação 4.2:

$$DR = \frac{dC}{dt} \quad \text{Eq. (4.2)}$$

onde  $C$  é a concentração de betalaínas no extrato (mg de betanina/100 ml de extrato) e  $t$  é o tempo de armazenamento (dias).

#### **4.2.3. Análises físico-químicas dos extratos**

##### **4.2.3.1. Turbidez**

As medidas de turbidez dos extratos foram realizadas com auxílio do turbidímetro Policontrol (modelo Ap2000) e turbidímetro Hanna instruments (modelo HI98703), os quais foram previamente calibrados.

##### **4.2.3.2. Sólidos Solúveis**

Os extratos utilizados no estudo foram obtidos por extrações seguidas de um pré-tratamento. Devido ao pré-tratamento e às características naturais dos

talos de beterraba vermelha, os teores de sólidos solúveis nos extratos foram baixos.

O teor de sólidos solúveis de cada extrato foi verificado utilizando um refratômetro analógico portátil (Carl Zeiss, modelo 32-G) que possuía uma escala de 0,2 °Brix. Considerando o baixo teor de sólidos solúveis dos extratos e a precisão do refratômetro, as análises de sólidos solúveis foram realizadas apenas para verificar se havia possibilidade de se observar alguma redução nos teores e não para evidenciar o tratamento, uma vez que a clarificação dos extratos está fundamentada em outros fatores como turbidez, atividade de POD e a estabilização das amostras.

#### **4.2.3.3. pH**

O pH das amostras foi verificado com o auxílio de um pHmetro (Digimed, modelo DM 20), o qual era previamente calibrado com soluções padrão nos pHs de 4,0 e 9,0.

#### **4.2.4. Análise de cor dos extratos**

A cor de cada extrato foi verificada com o auxílio de um colorímetro (Hunterlab, modelo Colorquest XE), o qual apresenta os parâmetros colorimétricos  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  da escala CIELAB determinados pela *Commission International de l'Eclairage* (CIE). As leituras foram realizadas com o iluminante  $D_{65}$  (luz solar) e com o ângulo do observador de 10° (modo RSIN).

Com os parâmetros colorimétricos obtidos, foram determinados o Cromo ( $C^*_{ab}$ ), o ângulo de tonalidade ou hue ( $h_{ab}$ ) e a variação da luminosidade ( $\Delta L$ ), por meio das Equações 4.3, 4.4, 4.5 e 4.6, respectivamente.

$$C_{ab}^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2} \quad \text{Eq ( 4.3)}$$

$$h_{ab} = \arctg\left(\frac{b^*}{a^*}\right), \text{ para } +a^* \text{ e } +b^* \quad \text{Eq ( 4.4)}$$

$$h_{ab} = 360 + \arctg\left(\frac{b^*}{a^*}\right), \text{ para } +a^* \text{ e } -b^* \quad \text{Eq ( 4.5)}$$

$$\Delta L = L^* - L_0^* \quad \text{Eq ( 4.6)}$$

#### 4.2.5. Atividade enzimática

##### 4.2.5.1. Polifenoloxidase (PPO)

A atividade da enzima polifenoloxidase nos extratos foi determinada colorimetricamente com o auxílio de um espectrofotômetro, segundo o método descrito por Walker (2001) com modificações.

Inicialmente, foram preparados os extratos enzimáticos para cada amostra, com a mistura de 0,4 ml de cada extrato obtido e 2,3 ml de tampão fosfato 0,05 M (pH 7,0). Em seguida, foram adicionados 0,3 ml de solução de catecol 0,6 M e a mistura foi imediatamente transferida para uma cubeta de vidro e procedida a leitura de absorbância no espectrofotômetro.

A modificação da coloração foi observada pela absorbância lida a cada 20 s, durante 3 min no comprimento de onda de 420 nm. Os resultados foram expressos pelo percentual da atividade residual (RA) de PPO; o qual é determinado através da Eq 4.7.

$$\text{RA(\%)} \text{ de PPO} = \frac{\text{atividade da PPO na amostra tratada}}{\text{atividade da PPO na amostra controle}} \quad \text{Eq (4.7)}$$

##### 4.2.5.2. Peroxidase (POD)

A atividade da enzima peroxidase em cada extrato foi determinada colorimetricamente com o auxílio de um espectrofotômetro, segundo o método descrito por Vetal e Rathod (2015) com modificações.

Inicialmente, foram preparados os extratos enzimáticos para cada amostra, com a mistura de 0,2 ml de cada extrato obtido e 0,8 ml de tampão fosfato 0,05 M (pH 7,0). Em um tubo *Falcon*, de 15 ml de capacidade, foram misturados 1,5 ml de tampão fosfato 0,1 M (pH 5), 0,2 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1% e 1 ml do

extrato enzimático. Em seguida, foram adicionados 0,5 ml de guaicol 1,5% e a mistura foi imediatamente transferida para uma cubeta de vidro e procedida a leitura de absorvância no espectrofotômetro.

A modificação da coloração foi observada pela absorvância lida a cada 20 s, durante 3 min no comprimento de onda de 460 nm. Os resultados foram expressos por unidade de atividade enzimática por minuto a cada grama de amostra (UAE.g.min<sup>-1</sup>) ou pelo percentual da atividade residual (RA) de POD, o qual é determinado pela Eq 4.8.

$$RA(\%) \text{ de POD} = \frac{\textit{atividade da POD na amostra tratada}}{\textit{atividade da POD na amostra controle}} \quad \text{Eq (4.8)}$$

### **4.3. Avaliação da aplicabilidade dos talos de beterraba vermelha como fonte de betalaínas**

Estudos sobre o emprego de talos de beterraba como fonte de betalaínas não foram encontrados na literatura. Desta forma, a primeira etapa deste trabalho consistiu em avaliar o rendimento de talos em relação às plantas de beterraba, o rendimento de extrato em relação aos talos e o teor de betalaínas presente nesse extrato. Além disso, avaliou-se a estabilidade desses pigmentos nos talos antes da extração e nos extratos obtidos.

#### **4.3.1. Rendimento de talos na planta beterraba vermelha**

A composição em massa da planta beterraba (bulbos, talos e folhas) pode variar durante o ano (safra e entressafra); isso se deve às adversidades climáticas que podem ocorrer (seca, enchentes, vendavais, entre outros) mesmo que a planta seja cultivada da mesma forma e no mesmo local. Em função disso, foram realizados dois conjuntos de experimentos distintos para verificar os percentuais de cada parte da planta em dois momentos diferentes do ano. Na primeira série de experimentos, as plantas estavam visualmente menos desenvolvidas e, na segunda série de experimentos, as plantas estavam visualmente bem desenvolvidas. Cada série de experimentos foi realizada em triplicata.

Para cada série de experimentos, inicialmente, foi adquirido um lote de beterrabas e este lote foi dividido em três partes de acordo com o número de

plantas. Cada lote consistia de aproximadamente 3 kg de beterrabas. As massas de cada parte foram verificadas e, com essas massas, foi determinado o percentual mássico de cada parte que compõe a planta.

#### **4.3.2. Avaliação do rendimento da extração do sumo dos bulbos e dos talos de beterraba**

O procedimento utilizado para avaliar o rendimento da extração consiste, basicamente, das seguintes etapas: (a) preparo das amostras, (b) extração por esmagamento seguido de (c) centrifugação e, por fim, (d) filtração a vácuo. Estas etapas estão descritas a seguir. Vale ressaltar que o procedimento descrito nesta seção também foi utilizado para extração do sumo utilizado nos experimentos de clarificação.

##### **4.3.2.1. Preparo das amostras para extração do sumo**

As plantas recebidas foram divididas em bulbos e talos com folhas. Os talos com folhas e os bulbos foram lavados em água corrente e depois imersos em solução de hipoclorito de sódio a 1 ppm por 15 min. Após a imersão, os bulbos e os talos com folhas foram enxaguados em água corrente e colocados para escorrer. Com os talos limpos e secos, as folhas foram retiradas com auxílio de uma faca doméstica e decidiu-se proceder à remoção das folhas somente após a higienização para minimizar a ruptura do tecido vegetal dos talos, e por consequência, a degradação das betalaínas.

##### **4.3.2.2. Esmagamento e separação do sumo dos bulbos e dos talos de beterraba**

A extração por esmagamento permite que o extrato obtido seja menos suscetível à degradação, quando comparado com técnicas que utilizam o aquecimento e/ou a adição de solventes orgânicos. Devido à alta suscetibilidade à degradação das betalaínas, optou-se por fazer o esmagamento dos bulbos e dos talos e a separação do sumo de acordo com a metodologia recomendada por Gonçalves *et al.* (2012).

O esmagamento foi realizado utilizando uma centrífuga de alimentos (Philips Walitta, modelo RI 1861) na potência máxima, a fim de maximizar a retirada do sumo.

Como o sumo bruto possui muitas partículas suspensas e pedaços de fibras, optou-se por separar a fração contendo a maior quantidade de betalaínas (sobrenadante) por centrifugação (centrífuga Cientec, modelo CT-5000R) a 6000 rpm por 12 min a 4 °C e filtrar a vácuo o sobrenadante em filtro de papel (Quanty, tamanho de poro nominal de 25 µm). Os extratos obtidos foram imediatamente armazenados em frascos protegidos da luz e sob refrigeração (4 °C) até a realização das análises.

#### **4.3.2.3. Rendimento da extração do sumo dos talos de beterraba**

Em um primeiro momento, foi adquirido um lote de beterrabas e os talos foram removidos cuidadosamente e misturados. Os talos foram divididos em três grupos com massas semelhantes. Cada grupo de talos foi submetido à primeira extração por esmagamento e o sumo foi recolhido (extrato).

Amostras do bagaço recolhido foram submetidas a uma segunda extração utilizando água destilada, na proporção de 100 g de bagaço para cada 1 L de água destilada, à temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C), por 10 min e com o auxílio de um misturador mecânico (Fisatom, modelo 715). Essa mistura foi peneirada e o extrato recolhido. O bagaço remanescente foi submetido a mais duas extrações, nas mesmas condições descritas para a segunda extração, para garantir que o máximo de betalaínas fosse retirado dos talos.

Ao final do experimento, cada grupo de bulbos e de talos havia sido submetido a uma extração por esmagamento e, na sequência, três extrações sólido-líquido. Para avaliar o teor de betalaínas (metodologia descrita no item 4.2), foram retiradas amostras dos extratos obtidos em cada etapa de extração.



### **4.2.3. Avaliação da degradação das betalaínas presentes nos talos e nos extratos armazenados sob refrigeração**

#### **4.3.3.1. Degradação das betalaínas presentes nos talos**

A avaliação da degradação das betalaínas presentes nos talos foi realizada verificando-se a concentração de betalaínas dos talos de beterraba retirados da planta e armazenados sob refrigeração ao longo de oito dias.

Primeiramente, foi adquirido um lote de beterraba e os talos foram removidos cuidadosamente e misturados. Os talos foram divididos em 24 grupos com massas semelhantes, armazenados em sacos de polietileno e mantidos sob refrigeração (4 °C). Em cada dia, durante os oito dias de armazenamento, foi realizada a extração do sumo por esmagamento em três grupos de talos distintos, então determinou-se o teor de betalaínas em cada extrato conforme metodologia descrita no item 4.2.

#### **4.3.3.2. Degradação das betalaínas presentes nos extratos armazenados sob refrigeração**

Além do estudo de degradação das betalaínas presentes nos talos armazenados, foi avaliada a degradação desses compostos nos extratos armazenados sob refrigeração (4°C).

Novamente partiu-se de um lote de beterrabas e os talos foram removidos cuidadosamente e misturados. Os talos foram divididos em 3 grupos com massas semelhantes e cada grupo foi submetida a uma única etapa de extração por esmagamento; os extratos obtidos foram armazenados em frascos *Falcon*, com capacidade de 50 ml sob refrigeração e ao abrigo da luz. Imediatamente após a extração, e diariamente durante cinco dias, verificou-se a concentração de betalaínas das amostras conforme metodologia previamente descrita.

### **4.4. Processamento por Alta Pressão: estudo de extração e estabilidade**

Os testes realizados utilizando a tecnologia de processamento por alta pressão (HPP) tiveram o intuito de estudar os efeitos desta tecnologia na extração e na estabilidade das betalaínas de talos de beterraba vermelha. Em um primeiro momento estão apresentados alguns testes preliminares que

auxiliaram no desenvolvimento dos experimentos, visto que a literatura ainda não apresenta muitos estudos que relacionam esta tecnologia à família desses pigmentos, especialmente quando os mesmos são provenientes dos talos. Os procedimentos experimentais utilizados na aplicação do HPP estão apresentados por um fluxograma na Figura 4.1

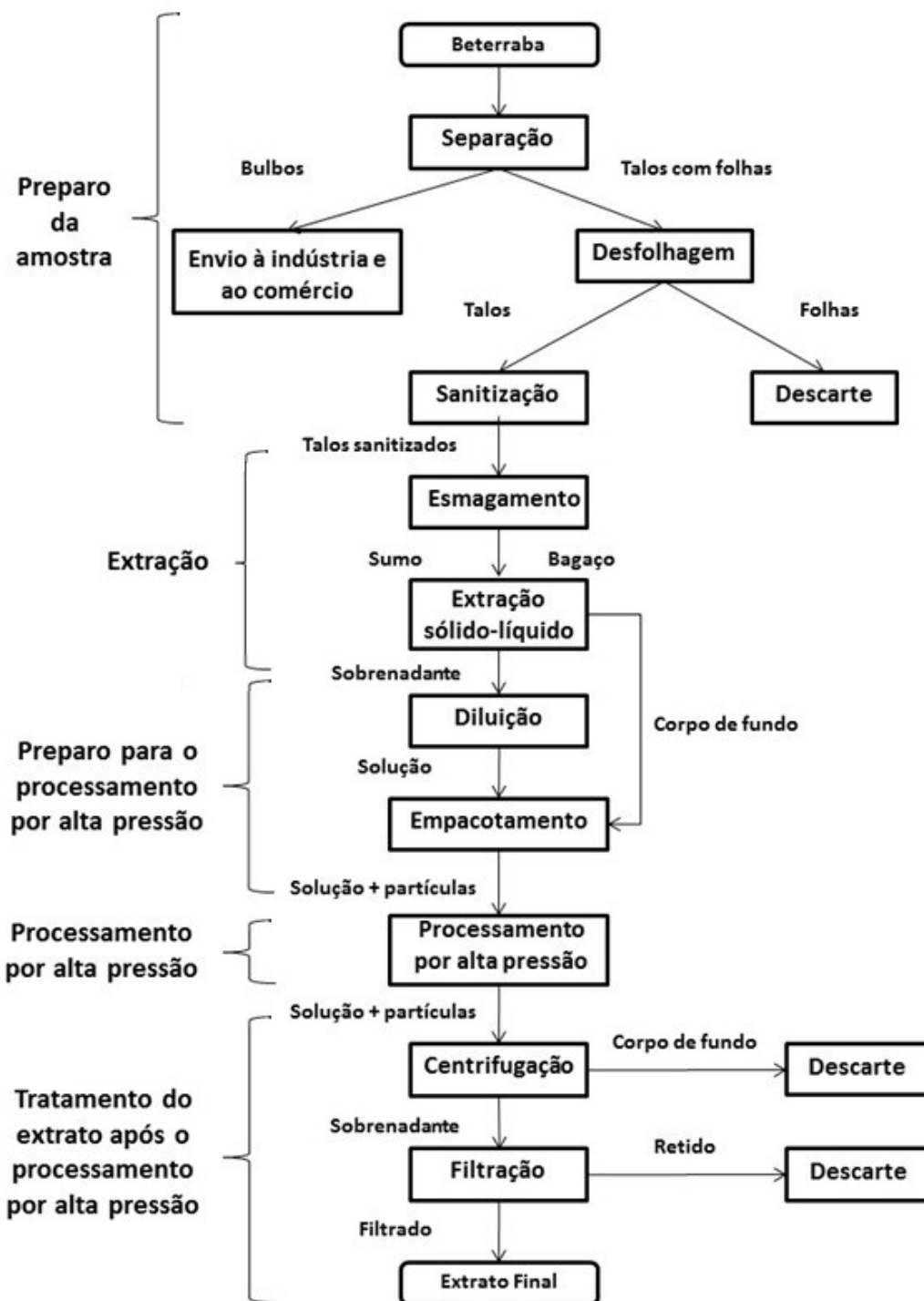


Figura 4.1 - Fluxograma do processo de extração e processamento por HPP do extrato de betalaínas provenientes de talos de beterraba vermelha

Os experimentos de HPP realizados utilizaram o Sistema de Processamento de Alimento por Alta Pressão em escala laboratorial Avure 2L-700 (Número de série 101130, EUA), em temperatura ambiente e temperatura moderada (em torno de 40 °C), nas pressões de 4000 bar e 6000 bar. Na Figura 4.2 está apresentada uma fotografia do equipamento de tratamento.



Fonte: Autor

Figura 4.2 – Fotografia do equipamento de HPP utilizado nos testes realizados ao longo deste estudo

O equipamento utiliza água destilada para transferir a pressão do meio para a câmara, onde é colocado o alimento, e registra a temperatura na câmara com auxílio de um termopar. Após o tratamento, a câmara é instantaneamente despressurizada. Um esquema simplificado da pressurização está apresentado na Figura 4.3. Após o tratamento, os extratos foram centrifugados, filtrados e armazenados em tubos cônicos tipo *Falcon* sob refrigeração e ao abrigo de luz

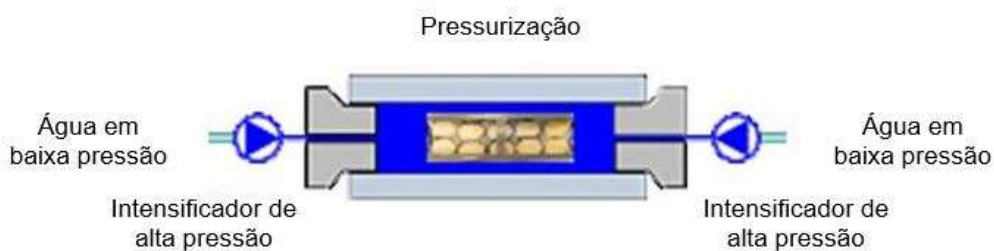


Figura 4.3 – Esquema simplificado da pressurização que ocorre no interior do equipamento de HPP

#### **4.4.1. Preparo da amostra para o teste inicial e para os testes preliminares**

O extrato de beterraba vermelha foi preparado por meio de uma extração sólido-líquido, realizada com auxílio de liquidificador doméstico (Breville, modelo BBL420). Juntamente com os talos de beterraba vermelha, foi utilizada água acidificada com ácido cítrico para que o pH do extrato estivesse em 5,8, considerado o pH de maior estabilidade para a betanina (Saguy, 1979). A proporção massa de talos:volume de água acidificada foi de 1:2.

Nos experimentos realizados no teste inicial (item 4.4.2), as amostras foram padronizadas pelo volume de 20 ml da mistura resultante no liquidificador. Esse volume foi mensurado com auxílio de uma proveta graduada e a amostra transferida para um envelope plástico, selado e então tratado conforme a descrição do teste.

A fim de melhorar a homogeneização das amostras para os testes preliminares (item 4.4.3), a mistura foi separada com auxílio de uma peneira e foram verificados o volume do líquido e a massa do sólido. Respeitando a proporção original, os envelopes plásticos foram preparados com o mesmo volume e massa.

#### **4.4.2. Teste inicial**

Este estudo foi realizado a fim de observar alguns efeitos do tratamento HPP nos extratos de beterraba vermelha uma vez que a literatura não apresenta

estudos desta tecnologia aplicada a este produto. Neste primeiro experimento foram testadas as pressões de 4000 e 6000 bar, durante 5 min e em temperatura moderada. O efeito do HPP nas amostras foi verificado por meio da análise de concentração de betalaínas (item 4.2) no dia do tratamento (1° dia) e com um dia de armazenamento (2° dia). Além disto, também foi verificada a atividade residual da enzima polifenoloxidase (item 4.2) nas amostras tratadas.

#### **4.4.3. Testes preliminares**

A seguir estão apresentados os testes realizados para determinar as condições mais adequadas do tratamento em alta pressão para os extratos de talos de beterraba vermelha.

##### **4.4.3.1. Verificação do efeito do HPP na atividade de PPO sem utilização de calor**

Neste estudo, foi avaliado se a redução da atividade de PPO (observada nos resultados do *Teste Inicial*) foi obtida em função da aplicação de HPP ou da combinação de calor e alta pressão. Para isto, foram realizados experimentos com HPP nas pressões de 4000 e 6000 bar, durante 5 min, em temperatura ambiente.

O efeito do HPP nas amostras foi verificado por meio da atividade residual da enzima polifenoloxidase (item 4.2) e da análise de concentração de betalaínas (item 4.2) no dia do tratamento (1° dia) e com três dias de armazenamento (4° dia).

Foi verificado, também, se a modificação no preparo da amostra proporcionou melhora na homogeneização das mesmas.

##### **4.4.3.2. Efeito da redução da atividade de PPO na estabilidade de amostras tratadas com HPP**

O teste realizado nesta parte do estudo verificou se a redução na atividade da enzima PPO contribuiu para o aumento da estabilidade das betalaínas, quando os extratos são tratados por HPP e armazenados sob condições controladas de temperatura e luz.

Neste experimento, foi aplicado HPP na pressão de 6000 bar, durante 5 e 15 min, em temperatura moderada; foram utilizadas, como formas de avaliação, a verificação da redução da atividade de PPO (item 4.2) e a concentração de betalaínas (item 4.2) no 1º, 2º e 4º dia.

#### **4.4.3.3. Tempo e pressão de processamento**

Inicialmente, este estudo avaliou a concentração de betalaínas nos extratos submetidos ao tratamento por alta pressão com diferentes durações. Tratamento por HPP foi aplicado nos extratos durante 10, 20, 30, 40 e 50 min, sob temperatura moderada (aproximadamente 40 °C) e pressão de 4000 bar. O efeito do tratamento nas amostras foi avaliado por meio da comparação da concentração de betalaínas (item 4.2) nas amostras tratadas com a amostra controle.

Além do tempo de tratamento, também foi avaliado o impacto de diferentes pressões na concentração de betalaínas dos extratos. Para isto, foi aplicado HPP na pressão de 6000 bar, durante 20, 30 e 40 min, em temperatura moderada.

#### **4.4.3.4. Extração do pigmento residual**

Ao longo dos experimentos, foi verificado que a concentração do extrato produzido com diferentes lotes de beterraba estava reduzindo consideravelmente, o que pode ocorrer naturalmente, devido a sazonalidade dos alimentos ao longo do ano, como já abordado no item 4.3. Para aumentar a concentração de betalaínas nos extratos, foi testada a extração por esmagamento, com auxílio de uma centrífuga de alimentos (ao invés do liquidificador) (Breville, modelo BJE200C). Contudo, o esmagamento produzia uma quantidade considerável de bagaço. Como a parte sólida era visualmente pigmentada, foi testada a aplicação de HPP no auxílio da extração do pigmento presente neste resíduo.

Para o teste HPP, foram colocados em envelopes plásticos 5 g de bagaço e 10 ml de água destilada. Os envelopes foram tratados em alta pressão por 10 e 20 min, na temperatura de 40 °C e 6000 bar. Também foi realizado o mesmo teste utilizando um liquidificador doméstico (Breville, modelo BBL420), com o

intuito de verificar se seria necessário a aplicação de uma tecnologia deste porte para o auxílio da extração ou se uma tecnologia simplificada seria suficiente.

O teste com o liquidificador doméstico foi realizado na mesma proporção bagaço/água que o teste com HPP. Amostras resultantes da extração sólido-líquido também foram submetidas ao tratamento de alta pressão a fim de verificar se a combinação dos processos de extração sólido-líquido (liquidificador) e de alta pressão (HPP) iria impactar na extração de pigmentos no bagaço dos talos de beterraba vermelha. O efeito dos tratamentos nas amostras foi avaliado por meio da comparação da concentração de betalaínas (item 4.2) nas amostras tratadas com a amostra controle e entre os tratamentos.

#### **4.4.4. Efeitos do HPP na concentração e na estabilização de betalaínas de extratos de talos de beterraba vermelha**

Os experimentos desta parte do estudo foram realizados com base nos resultados obtidos nos testes preliminares, os quais estão apresentados no item 5.2.2.

##### **4.4.4.1. Preparo da amostra**

O extrato de beterraba vermelha foi obtido com o esmagamento, utilizando uma centrífuga de alimentos (Breville, modelo BJE200C) na potência máxima, a fim de maximizar a retirada do sumo. Em seguida, foi realizada a extração sólido-líquido com sumo e bagaço obtidos no esmagamento, juntamente com água acidificada (mesmo volume do sumo obtido), com o auxílio de um liquidificador doméstico (Breville, modelo BBL420). Após 2 min de trituração com extração sólido-líquido, a mistura foi separada com o auxílio de uma peneira doméstica. O bagaço residual foi descartado e o líquido (extrato) foi utilizado nos testes.

Devido à variação natural da concentração de betalaínas presentes nos talos de beterraba vermelha, e ao fato deste fator ser de suma importância na estabilidade dos pigmentos, esta parte do estudo foi realizada com duas faixas de concentração de pigmentos: o extrato menos concentrado (em torno de 12 mg de betanina/100 ml de extrato) e o mais concentrado (em torno de 17 mg de betanina/100 ml de extrato).

#### **4.4.4.2. Aplicação de HPP**

As amostras que foram tratadas por alta pressão foram transferidas para envelopes plásticos e seladas, no volume de 20 ml de amostra em cada envelope. As amostras com baixa concentração inicial de betalaínas apresentaram concentração de  $12,0 \pm 0,2$  mg de betanina/100 ml de extrato e as de alta apresentaram  $17,3 \pm 0,3$  mg de betanina/100 ml de extrato. Os experimentos foram realizados a temperatura ambiente, na pressão de 6000 bar, durante 10, 20 e 30 min.

A concentração de betalaínas foi observada no dia do tratamento (1º dia) e, novamente, no 2º e 4º dia. A atividade de POD foi analisada no 2º dia. A concentração de betalaínas, a taxa de degradação das betalaínas e a atividade da POD foram realizados conforme descritos no item 4.2.

#### **4.5. Tratamento Térmico aplicado em Alta Temperatura por Curto Tempo (HTST): estudo de estabilidade**

Neste item, estão descritas os materiais, os equipamentos e as metodologias utilizadas no preparo dos extratos de talos de beterraba vermelha, a determinação da temperatura efetiva do tratamento e como o tratamento térmico HTST foi aplicado nos extratos. Os procedimentos experimentais utilizados na aplicação do tratamento térmico HTST estão apresentados por um fluxograma na Figura 4.4.

##### **4.5.1. Preparo da amostra**

Os talos de beterraba vermelha foram esmagados com o auxílio de centrífuga de alimentos (Breville, modelo BJE200C). Este processo inicial foi realizado para diminuir o tamanho das partículas e reduzir a quantidade de água necessária na extração sólido-líquido feita no liquidificador doméstico (Breville, modelo BBL420). Após o esmagamento, foram verificados o volume de sumo (líquido) e a massa do bagaço (sólido).



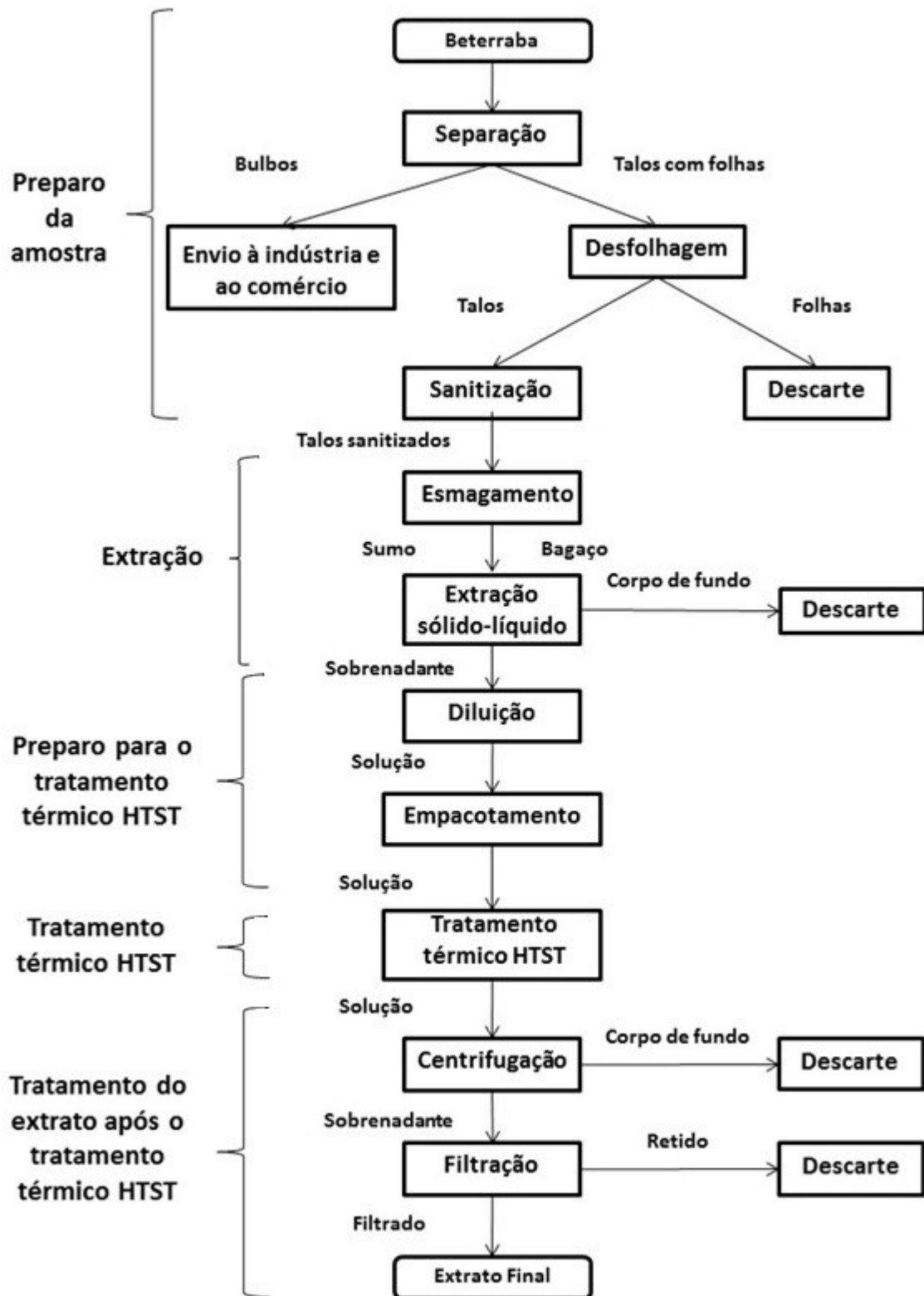


Figura 4.4 - Fluxograma do processo de extração e aplicação do tratamento térmico HTST em extrato de betalaínas provenientes de talos de beterraba vermelha

Foram adicionados ao liquidificador o sumo, água levemente acidificada com ácido cítrico (no mesmo volume que o sumo) e o bagaço. O liquidificador foi ligado por 2 min. Em seguida, a mistura foi separada com o auxílio de uma peneira doméstica, o bagaço residual foi descartado e o líquido (extrato) foi utilizado nos testes.

Os extratos foram diluídos e separados em amostras de 20 ml seladas em *pouches*. Assim como nos testes de HPP, foram testadas amostras com duas concentrações iniciais de betalaínas. As amostras com baixa concentração inicial de betalaínas continham concentração de  $12,2 \pm 0,1$  mg de betanina/100 ml de extrato e, as de alta, continham  $17,3 \pm 0,3$  mg de betanina/100 ml de extrato.

#### **4.5.2. Determinação da Temperatura Efetiva do Tratamento ( $T_{eff}$ )**

Em tratamentos térmicos de alimentos, é comum os autores referenciar a temperatura média, final ou do banho/equipamento. Entretanto, isto pode não representar a temperatura precisa a que o alimento foi submetido durante o tempo em que foi tratado. Esta falta de precisão dificulta a avaliação da magnitude da influência da aplicação do calor no alimento, uma vez que a cinética de degradação de um composto pode ser afetada por fatores não-térmicos durante o tratamento térmico. Considerando que o tratamento térmico HTST é, em grande parte, ou até totalmente, aplicado durante a fase de aquecimento do alimento, foi necessário o cálculo da temperatura efetiva do tratamento, sugerido por Farid e Alkhafaji (2012).

No estudo, os autores apresentam um método de determinação da  $T_{eff}$ . Neste método, é necessário que sejam mensuradas as temperaturas do alimento ao longo do aquecimento e, com tais informações, é possível construir um perfil de aquecimento.

O perfil de aquecimento foi determinado colocando um *pouch*, contendo uma pequena abertura, a qual permitia apenas a introdução de um termopar, dentro de um banho previamente aquecido a  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A temperatura do extrato foi observada, durante 2 min, a cada 10 segundos. Este teste foi realizado em triplicata.

Utilizando as informações do perfil de temperatura e a equação simplificada (Eq 4.9), retirada do estudo de Farid e Alkhafaji (2012), foram determinadas as temperaturas efetivas de tratamento em cada intervalo estudado.

$$T_{eff} = \frac{\frac{E}{R}}{\ln\left(\frac{\sum_0^n e^{-E/RT}}{n-1}\right)} \quad \text{Eq ( 4.9)}$$

onde  $E$  é a energia de ativação da betanina ( $82061,3 \text{ J mol}^{-1}$  (Saguy, 1979)),  $R$  é a constante universal dos gases ( $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ),  $T$  é a temperatura absoluta no ponto (K) e  $n$  é o número de pontos observado.

#### **4.5.3. Efeitos do tratamento térmico HTST na concentração e na estabilidade de betalaínas de extratos de talos de beterraba vermelha**

Os *pouches* contendo os extratos foram colocados em um banho previamente aquecido a  $120 \text{ }^\circ\text{C}$ , durante 80, 100 e 120 s. Imediatamente após o tratamento, os *pouches* foram resfriados em banho de água fria e gelo por 3 min. As amostras resfriadas foram centrifugadas, filtradas e armazenadas em tubos cônicos tipo *Falcon* sob refrigeração e abrigo de luz.

A concentração de betalaínas foi observada no dia do tratamento ( $1^\circ$  dia), e novamente no  $2^\circ$ ,  $4^\circ$  e  $8^\circ$  dia. A atividade de POD foi analisada no  $2^\circ$  dia. A concentração de betalaínas, a taxa de degradação das betalaínas e a atividade da POD foram determinados conforme o item 4.2.

#### **4.6. Clarificação e Estabilização: microfiltração e ultrafiltração**

Nesta seção estão apresentadas as membranas que foram utilizadas nos processos de micro e ultrafiltração, o equipamento de bancada construído para a realização dos experimentos, bem como a metodologia empregada no processo de clarificação do extrato. Os procedimentos experimentais utilizados na aplicação dos PSM estão apresentados por um fluxograma na Figura 4.5

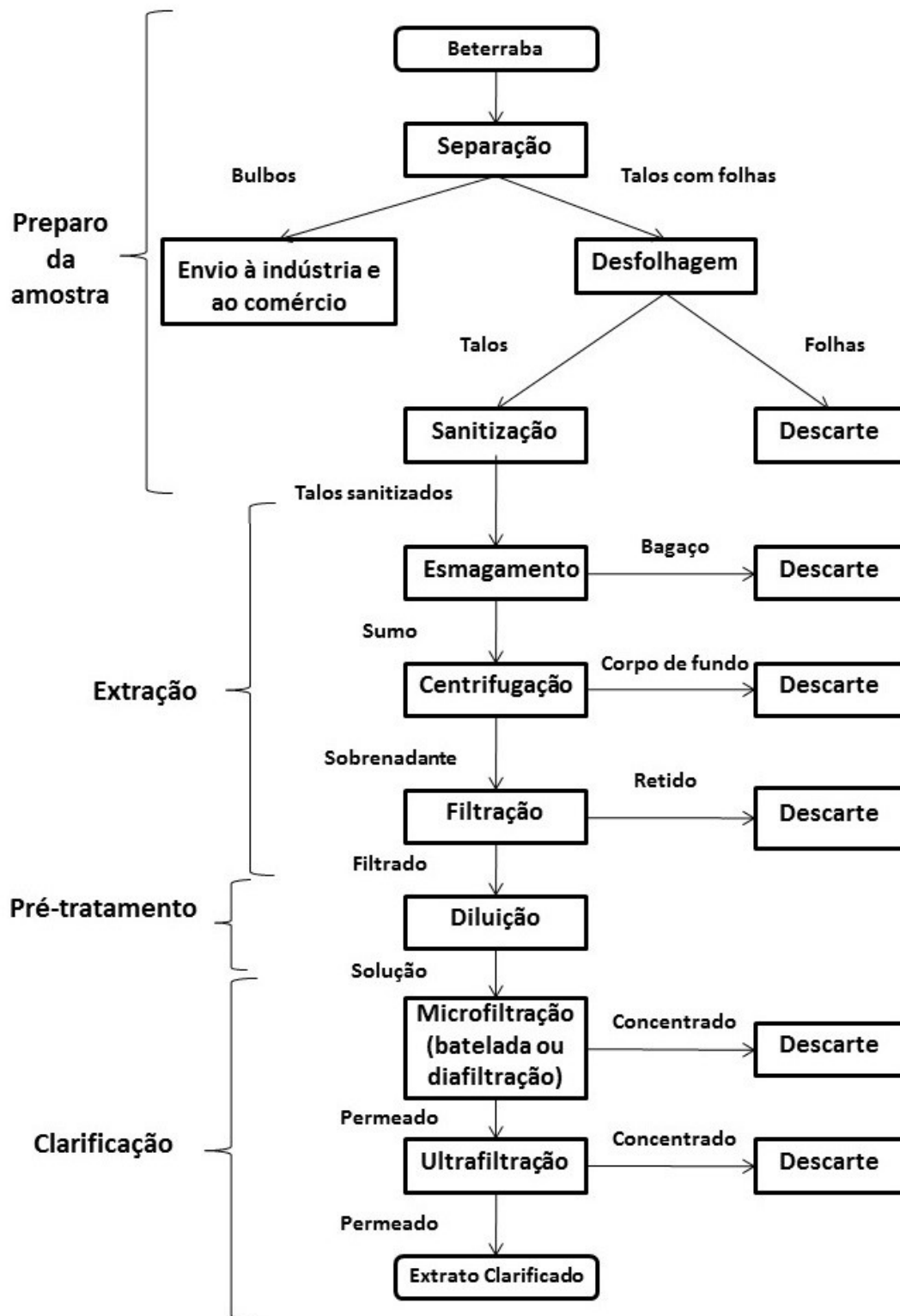


Figura 4.5 - Fluxograma do processo de extração e clarificação do extrato de betalínas provenientes de talos de beterraba vermelha por MF, modo batelada ou DF, seguida por UF

#### 4.6.1. Membranas

As membranas utilizadas neste trabalho são membranas cerâmicas, à base de zircônio e titânio ( $ZrO_2/TiO_2$ ), sendo a membrana de MF com tamanho de poro nominal de  $0,05\ \mu\text{m}$  e a membrana de UF com massa molar de corte (MMC) de 20 kDa. Ambas as membranas são tubulares e possuem 250 mm de comprimento, 6 mm de diâmetro interno e 10 mm de diâmetro externo, perfazendo uma área de permeação de  $0,0047\ \text{m}^2$ .

As membranas foram adquiridas da Andritz Separation, Indústria e Comércio de Equipamentos de Filtração Ltda e uma fotografia das membranas está apresentada na Figura 4.6.

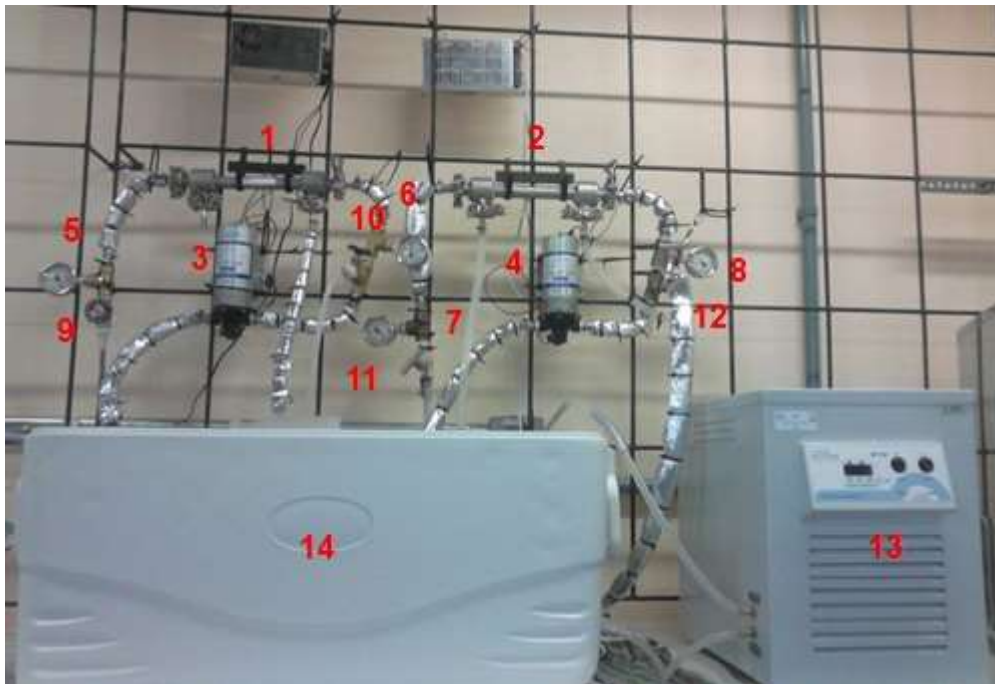


Fonte: Autor

Figura 4.6 - Fotografia das membranas de MF e UF utilizadas neste estudo

#### 4.6.2. Sistema de membranas

A Figura 4.7 apresenta uma fotografia do sistema de membranas de bancadas utilizado para a clarificação do extrato.



Fonte: Autor

Figura 4.7- Fotografia do sistema de membranas de bancada utilizado para a clarificação do extrato: módulos para membranas tubulares (1) e (2); bomba diafragma (3) e (4); manômetros (5, 6, 7 e 8); válvulas agulha (9, 10, 11 e 12); banho de resfriamento ultratermostático (13) e caixa térmica de ciclopentano (14)

Este sistema de membranas é constituído pelos seguintes equipamentos e acessórios:

- dois módulos para membranas tubulares de aço inoxidável (Andritz S. I. C. E. F. Ltda) (1 e 2);
- duas bombas diafragmas (Shurflo, modelo 8030-813-239) (3 e 4);
- quatro manômetros (Manotec, com escala até 5 bar), dispostos antes e depois de cada módulo (5, 6, 7 e 8);
- quatro válvulas agulha de latão dispostas na saída do concentrado e na linha de recirculação (9, 10, 11 e 12);
- tubulações de silicone atóxico;
- manta com subcobertura de alumínio (espessura de 5 mm) para isolamento térmico e bloqueio de luz;

- banho de resfriamento ultratermostático (Labor, modelo SP-152/10) (13);
- caixa térmica de ciclopentano (Coleman, modelo Marine 100QT, volume 94,6 L) onde foram dispostos os tanques de alimentação e de permeado (14).

A Figura 4.8 apresenta uma imagem dos acessórios que estavam dentro da caixa térmica e a sua disposição. Os acessórios são:

- serpentina de aço inoxidável;
- tanque de alimentação de plástico com capacidade para 3,6 L;
- frasco de vidro para coleta do permeado com capacidade de 1 L;
- estantes para suportar os frascos.



Fonte: Autor

Figura 4.8 - Visão da disposição dos tanques de alimentação e de permeado dentro da caixa térmica

#### 4.6.3. Compactação das membranas

A compactação das membranas foi realizada através da circulação de água destilada na planta em pressão superior à pressão de operação. O fluxo permeado foi verificado a cada 10 min; quando a diferença nos valores das três

últimas medidas de fluxo era menor do que 1% foi considerado que a membrana estava compactada.

Para a compactação da membrana de MF foi utilizada a pressão de 1,0 bar e para a membrana de UF foi utilizada a pressão de 2,0 bar.

#### **4.6.4. Determinação do *fouling* através da permeância hidráulica**

A permeância hidráulica, antes e após a filtração do extrato através das membranas, foi verificada através da medida do fluxo permeado em quatro pressões diferentes. As medidas de fluxo foram realizadas variando-se a pressão no sentido decrescente, com o intuito de minimizar o efeito de compactação da membrana durante os experimentos. Para a membrana de MF foram utilizadas as pressões de 1,0; 0,75; 0,5 e 0,25 bar e para a membrana de UF foram utilizadas as pressões de 2,0; 1,5; 1,0 e 0,5 bar.

Em ambos os casos, o experimento foi iniciado com a circulação de água destilada na maior pressão durante 10 min. Após este tempo, o fluxo permeado foi medido em duplicata e a pressão foi reduzida. Este procedimento foi repetido com todas as quatro pressões observadas. Com os dados obtidos, a tendência ao *fouling* foi determinada com auxílio da Eq 3.4.

#### **4.6.5. Limpeza das membranas**

As membranas cerâmicas foram submetidas a limpezas antes e após cada experimento, pois ocorreu o escurecimento das membranas e percebeu-se um mau cheiro devido à degradação da matéria orgânica. O processo de limpeza consistiu de várias etapas: limpezas químicas, imersão em banho de ultrassom e imersão em solução de hipoclorito de sódio.

A limpeza química foi adaptada do trabalho de Cassini (2008) e consiste de uma etapa alcalina e uma etapa ácida intercaladas por enxagues com água destilada. A limpeza química foi realizada na pressão de 0,01 bar e com a vazão de alimentação de  $0,3 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ . O procedimento foi iniciado com água destilada à temperatura ambiente, que foi lentamente aquecida até atingir  $40 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Após 15 min de circulação, a solução de alimentação foi trocada pela solução de hidróxido de sódio  $5 \text{ g L}^{-1}$  previamente aquecida a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , que circulou no sistema



por 30 min. Em seguida, foi realizado o enxágue com água destilada por 15 min e, novamente, a solução de alimentação foi trocada pela solução de ácido cítrico ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ) previamente aquecida a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , que circulou no sistema por 30 min. Finalmente, foi realizado o enxágue com água destilada.

Após a limpeza química, o módulo foi desmontado e a membrana cerâmica foi cuidadosamente retirada e colocada em um banho com ultrassom (Unique, modelo 1600A) aquecido a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  durante uma hora.

A limpeza foi finalizada com a imersão da membrana em uma solução contendo hipoclorito de sódio (1%) durante 1 h. Por fim, a membrana foi enxaguada com água destilada.

#### **4.6.6. Limpeza da unidade de membranas**

Nos intervalos de utilização da unidade de membranas, foram realizadas limpezas com o intuito de remover qualquer resíduo de extrato do interior das mangueiras, bombas e módulos, além de inibir o desenvolvimento de micro-organismos.

A limpeza foi feita com a circulação de uma solução de hipoclorito de sódio a 0,1 ppm durante 45 min. Essa circulação foi feita com a solução em temperatura ambiente e a planta operando sem pressão, para evitar que alguma possível sujidade fosse pressionada para o interior da membrana. Após a circulação da solução, a unidade foi enxaguada repetidas vezes com água destilada.

#### **4.6.7. Testes Preliminares de Clarificação**

Nesta seção estão apresentados os testes preliminares realizados para estabelecer as melhores condições para os experimentos de MF e UF.

##### **4.6.7.1. Preparo das amostras para extração do sumo**

Os talos sanitizados foram submetidos à extração por esmagamento utilizando uma centrífuga de alimentos (Philips Walitta, modelo RI 1861) na potência máxima. O sumo foi centrifugado (centrífuga Cientec, modelo CT-5000R) a 6000 rpm por 12 min a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  e o sobrenadante foi filtrado à vácuo em filtro de papel (Quanty, tamanho de poro nominal de  $25 \mu\text{m}$ ). Os extratos obtidos

foram imediatamente armazenados em frascos protegidos da luz e sob refrigeração (4 °C). A diluição dos extratos só foi aplicada minutos antes da clarificação.

#### **4.6.7.2. Determinação da pressão de operação**

A determinação da pressão de operação foi realizada a partir da análise do comportamento do fluxo permeado ao longo da filtração do extrato em diferentes pressões. Para a realização desses experimentos, foram utilizados extratos com concentração inicial de 10 mg de betanina/100 ml de extrato.

Inicialmente, realizou-se um condicionamento do sistema utilizando um pequeno volume de extrato que foi circulado e removido para garantir a retirada total de água remanescente nas tubulações. Em seguida, iniciaram-se os experimentos para verificação da pressão de operação. Para a membrana de MF foram utilizadas pressões de 0,25 até 1 bar e, para a membrana de UF, testaram-se pressões de 0,5 até 1,25 bar, com intervalos de 0,25 bar entre os pontos de observação para ambas as membranas. O extrato circulava nesta pressão durante 30 min e o fluxo permeado foi medido a cada 5 min. Se o fluxo permeado estivesse constante após os 30 min, a pressão seria aumentada para o próximo ponto de observação e assim por diante. A pressão crítica de operação consiste no maior valor de pressão abaixo da qual não ocorre *fouling* ou que a ocorrência do mesmo se torna desprezível, ou seja, que o fluxo permeado se mantém constante ao longo do tempo

#### **4.6.7.3. Padronização da solução de alimentação**

Como já mencionado neste trabalho, os alimentos apresentam diferentes composições, mesmo que cultivados em situações semelhantes. Logo, foram realizados três experimentos com diferentes concentrações iniciais de alimentação para observar a influência da concentração inicial no processo de MF. As soluções testadas foram:

- solução I (SOL I): concentração de 11 mg de betanina/100 ml de extrato obtida naturalmente com o esmagamento (sem diluição);

- solução II (SOL II): concentração de 23 mg de betanina/100 ml de extrato obtida naturalmente com o esmagamento (sem diluição);
- solução III (SOL III): concentração de 11 mg de betanina/100 ml de extrato obtida por meio da diluição de um extrato com concentração de 20 mg de betanina/100ml de extrato.

Os experimentos iniciaram com a circulação da alimentação por 20 min. no modo de reciclo total, isto é, com as correntes de retido e de permeado retornando para o tanque de alimentação; após este tempo, o permeado começou a ser recolhido. Os experimentos foram realizados na pressão transmembrana de 0,5 bar, vazão de alimentação de  $0,3 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ , temperatura de  $10 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  e tempo de duração de 4 h. O volume inicial de alimentação foi de 2 L, com a troca da solução de alimentação após 2 h de filtração.

A cada 30 min foram coletadas amostras das correntes de permeado e da solução de alimentação, medindo-se, também, o fluxo permeado. Para cada amostra foi determinado o teor de betalaínas e os volumes finais dos permeados foram verificados com auxílio de uma proveta. Antes e após cada experimento foram realizadas limpezas, conforme descrito no item 4.6.5.

#### **4.6.7.4. Tempo de processo *versus* degradação de betalaínas**

Considerando que a alimentação do processo de UF foi o permeado do processo de MF, realizou-se um experimento de MF para verificar a degradação das betalaínas com o tempo de experimento e se o volume de permeado obtido seria suficiente para realizar o experimento de UF.

Os experimentos de MF foram realizados na pressão transmembrana de 0,5 bar, vazão de alimentação de  $0,3 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ , temperatura de  $10 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  e tempo de duração e troca de alimentação conforme descrito a seguir:

- tempo de experimento de 6 h, com troca de alimentação a cada 3 h, com volumes iguais a 2 L;
- tempo de experimento de 6 h, com troca de alimentação a cada 2 h com volumes iguais a 2 L;

- tempo de experimento de 4 h, com troca de alimentação a cada 2 h, com volumes iguais a 2 L.

A cada 30 min, foram verificados o fluxo permeado e coletadas amostras do permeado. Também foram coletadas amostras de cada solução de alimentação, antes e após a MF. Para cada amostra, foi determinado o teor de betalaínas e os volumes finais dos permeados foram verificados com auxílio de uma proveta. Antes e após cada experimento foram realizadas limpezas, conforme descrito no item 4.6.5.

#### **4.6.7.5. Comparação do comportamento do fluxo permeado de MF batelada e MF/DF**

Dois experimentos de MF foram realizados: um em modo batelada e um em modo DF. As microfiltrações foram realizadas durante 4h, sendo que foi feita uma troca da solução de alimentação na MF em modo batelada. Na MF/DF não houve troca da solução de alimentação e a primeira adição de água destilada (100 ml) à solução de alimentação foi com 2 h de processo. Após essa adição inicial, a cada 100 ml permeado recolhidos, 100 ml de água destilada foram adicionados à solução de alimentação. Amostras do permeado foram recolhidas a cada 20 min e os valores do fluxo permeado e da concentração de betalaínas foram comparados ao longo do processo.

Com o intuito de reduzir as variações na concentração do extrato a ser clarificado, neste teste, os extratos foram preparados de um mesmo lote de beterrabas e congelados. O extrato congelado foi descongelado no dia do processo e imediatamente submetido ao processo.

#### **4.6.8. Clarificação do extrato de beterraba vermelha utilizando MF em batelada seguida por UF**

Neste item está apresentada a metodologia utilizada para os experimentos de microfiltração e de ultrafiltração dos extratos, utilizando as condições de operação mais adequadas que foram determinadas pelos testes preliminares. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

#### **4.6.8.1. Microfiltração do extrato dos talos de beterraba**

Antes de iniciar o processo de MF em batelada, o extrato utilizado como alimentação foi diluído até a concentração de 10 mg de betanina/100 ml de extrato para fins de padronização. Para cada experimento de MF foram utilizados 4 L de extrato, divididos em dois frascos (2 L cada).

Os experimentos iniciaram com a circulação da alimentação por 20 min no modo de reciclo total e, após este tempo, o permeado começou a ser recolhido em um frasco Duran âmbar. Os experimentos foram realizados na pressão transmembrana de 0,5 bar, vazão de alimentação de  $0,3 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ , temperatura de  $10 \pm 2^\circ\text{C}$  e tempo de duração de 4 h. O processo ocorreu no modo batelada alimentada, com volume inicial de alimentação de 2 L, com a troca da solução de alimentação após 2 h de filtração e o processo de MF prosseguiu por mais duas horas, totalizando 4 h de experimento. Essa troca da solução foi adotada em função de resultados preliminares, nos quais uma grande diminuição do fluxo permeado foi percebida em função do aumento da concentração da solução de alimentação.

A cada 30 min, foram coletadas amostras das correntes de permeado e de concentrado e medido o fluxo permeado (em duplicata). Para cada amostra foi determinado o teor de betalainas e a atividade residual da POD (item 4.2).

Durante todo o processo de MF, os tanques de alimentação e do permeado ficaram imersos em banho a  $10^\circ\text{C}$ . Apesar do aquecimento proveniente do atrito com as tubulações e do calor dissipado pela bomba, a temperatura da solução de alimentação foi monitorada e não ultrapassou a temperatura de  $12^\circ\text{C}$ .

#### **4.6.8.2. Ultrafiltração do extrato microfiltrado**

O permeado obtido da MF foi utilizado como alimentação para o processo de UF, nestes experimentos, não foram realizadas diluições.

Assim como nos experimentos de MF, os experimentos iniciaram com a circulação da alimentação por 20 min no modo de reciclo total e, após este tempo, o permeado começou a ser recolhido em um frasco Duran âmbar. Os experimentos foram realizados na pressão transmembrana de 1,0 bar, vazão de

alimentação de  $0,3 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ , temperatura de  $10 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  e tempo de duração de 45 min.

A cada 15 min, foram coletadas amostras das correntes de permeado e concentrado e medido o fluxo permeado (em duplicata). Para cada amostra foi determinado o teor de betalaínas e a atividade residual da POD (item 4.2).

#### **4.6.9. Clarificação do extrato de beterraba vermelha utilizando MF/DF seguida por UF**

Com o intuito de reduzir a quantidade de resíduo gerado pela clarificação do extrato de beterraba vermelha por meio de MF batelada seguida por UF, estudou-se a aplicação de MF em modo DF; neste caso, o permeado proveniente deste processo também foi, em seguida, submetido à UF.

As condições de operação da MF/DF seguem as mesmas do processo de MF batelada:

- pressão de operação = 0,5 bar;
- temperatura do banho =  $10 \text{ }^\circ\text{C}$ ;
- vazão da corrente de alimentação =  $0,3 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ ,
- tempo de MF = 4h;
- concentração de betalaínas na alimentação inicial = 10 mg de betanina/100 ml de extrato.

A modificação foi realizada quanto ao volume de alimentação, o qual, na MF batelada, foi de 2 L e, na MF/DF foi de 3 L. Além disto, não foi realizada a troca de alimentação após duas horas de processo. Estas modificações permitiram que o processo utilizasse  $\frac{3}{4}$  dos talos de beterraba quando comparado ao processo de MF em batelada.

Como a concentração de pigmentos é um fator que influencia na estabilidade das betalaínas, conforme descrito anteriormente, e, uma vez que a adição de uma grande quantidade de água na alimentação iria reduzir a concentração de permeado, manteve-se os parâmetros da MF/DF para estes experimentos, ou seja, a adição de água destilada iniciou com 2 h de processo e foi repetida a cada 100 ml de permeado recolhido. O permeado obtido nesta etapa também foi submetido ao processo de UF, como descrito no item 4.6.8.2.

A aplicação de MF em modo DF foi avaliada por meio das análises para a determinação da qualidade dos extratos (item 4.2), assim como os extratos submetidos ao processo de clarificação anterior. Adicionalmente, também foi avaliada a estabilidade das betalínas das amostras (Alimentação MF inicial, Alimentação MF final, Alimentação UF inicial, Alimentação UF final e permeado) comparando a qualidade das mesmas no dia do tratamento (1º dia) e sob armazenamento controlado (2º, 6º e 10º dia).

#### **4.7. Análise estatística**

Os dados experimentais foram avaliados pelo teste de análise de variância (ANOVA) e o teste de diferenças entre as médias, teste Tukey, com o nível de significância de 95%. O software utilizado foi Statistica® 7.0 para Windows (Statistica 7.0, Stat Soft).

## **5. Resultados e discussão**

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos para todos os estudos, bem como a discussão dos mesmos. Inicialmente, estão apresentados os resultados do estudo da aplicabilidade dos talos de beterraba vermelha como fonte de betalaínas, uma vez que esta parte da beterraba não é alvo de muitos estudos e de aplicações industriais.

Em seguida, apresenta-se o estudo que avaliou a aplicação do HPP nos extratos de talos, enfatizando o efeito do tratamento na extração e na estabilidade dos pigmentos. Na sequência, estão apresentados os resultados do estudo do efeito do tratamento térmico HTST na estabilidade das betalaínas.

Por fim, está apresentado o estudo da aplicação dos PSM na clarificação do extrato de talos de beterraba vermelha. Este estudo inicia com os testes preliminares, seguido pela clarificação do extrato por MF em batelada e UF. Na sequência, está apresentada uma modificação do procedimento anterior por meio da aplicação da MF em modo DF, também seguido por UF. E, por fim, está apresentado um balanço de massa do processo com o objetivo de avaliar o rendimento de cada etapa e a necessidade de melhorias no processo.

### **5.1. Avaliação da aplicabilidade dos talos de beterraba vermelha como fonte de betalaínas**

Nesta etapa foram realizados experimentos para determinar o percentual mássico que os talos representam em uma beterraba, o teor de betalaínas nos extratos obtidos dos talos em comparação aos extratos obtidos dos bulbos e o rendimento da extração, tanto em relação ao volume quanto em relação ao teor de betalaínas presentes nos talos.

#### **5.1.1. Determinação do percentual mássico de bulbo, folhas e talos na planta beterraba vermelha**

A massa de talos em relação à massa da planta de beterraba é um dado importante uma vez que poucos estudos presentes na literatura abordam informações sobre os talos. Para tanto, foram realizados experimentos para quantificar o percentual mássico dos talos, e demais parte, em uma planta inteira



de beterraba. Observou-se que o tamanho e o desenvolvimento das plantas ao longo de um ano são bastante variáveis; desta forma, realizou-se a comparação de massas em dois momentos distintos: (a) plantas visualmente menos desenvolvidas (após um período de seca) e (b) plantas visualmente mais desenvolvidas (no período de safra). Os resultados obtidos, para os percentuais de massa para as diferentes partes da planta (bulbo, folhas e talos) nos dois grupos, estão apresentados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1- Comparação da composição mássica da beterraba utilizando plantas menos desenvolvidas (a) e plantas mais desenvolvidas (b)

<b>Amostra</b>	<b>Talos (%)</b>	<b>Folhas (%)</b>	<b>Bulbo (%)</b>
(a)	26,6 ± 0,1 <sup>bc</sup>	20,2 ± 1,3 <sup>cd</sup>	53,3 ± 1,3 <sup>a</sup>
(b)	33,3 ± 3,7 <sup>b</sup>	12,2 ± 2,5 <sup>d</sup>	54,5 ± 6,1 <sup>a</sup>

Os resultados seguidos por diferentes letras na mesma linha indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste Tukey.

Na Tabela 5.1 está apresentada a análise estatística dos resultados obtidos. Apesar do desenvolvimento das beterrabas dos dois grupos ter ocorrido de forma diferente, não houve diferença significativa em relação ao percentual mássico para cada parte da planta avaliada.

A amostra de beterraba que apresentou menor percentual mássico de talos (26,5%) fez parte do grupo (a) e a amostra com o maior percentual mássico de talos (37%) estava no grupo (b).

A partir da análise da Tabela 5.1 ainda pode-se perceber que, quando as plantas eram menos desenvolvidas, não foi possível observar diferença significativa entre as composições mássicas de talos e folhas. Durante a limpeza das beterrabas, na etapa de preparação das amostras, era possível observar que os talos das plantas menos desenvolvidas eram mais finos e curtos, quando comparados aos talos das plantas mais desenvolvidas.

Considerando que no Brasil foram produzidas 177.154 toneladas de beterraba em 2006 (IBGE, 2009) e que as plantas têm uma composição média de 30% de talos, pode-se estimar que foram descartadas em torno de 53.146 ton de talos de beterraba somente nesse ano. Com base nestes dados, a produção de talos de beterraba pode ser considerada relevante para justificar a

necessidade de estudos para o seu aproveitamento de modo a minimizar problemas de natureza socioeconômica e ambientais.

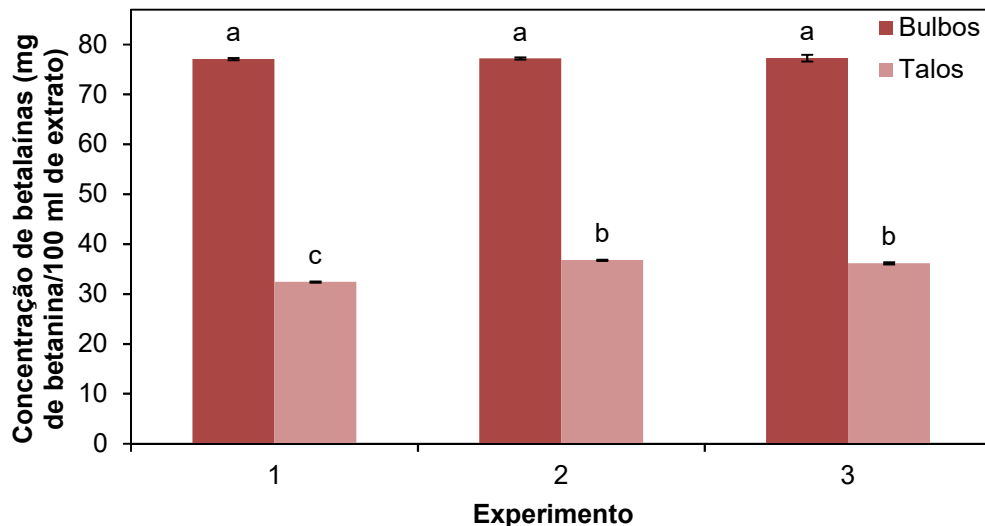
### **5.1.2. Concentração de betalaínas nos extratos obtidos de talos e nos bulbos de beterraba vermelha**

Com o objetivo de avaliar se a quantidade de betalaínas presentes no extrato obtido dos talos de beterraba por esmagamento é comparável àquela obtida com o esmagamento dos relativos bulbos, foram realizados experimentos para determinar a quantidade de betalaínas encontrada nos diferentes extratos obtidos de três conjuntos distintos de talos e de bulbos de beterraba. Na Figura 5.1 estão apresentados os resultados obtidos neste experimento.

É possível observar que não houve diferença significativa entre as concentrações de betalaínas nos extratos dos bulbos, cujo valor ficou em torno de 77 mg de betanina para cada 100 ml de extrato de bulbos. Segundo Stintzing e Carle (2008a) o bulbo da beterraba vermelha apresenta teores entre 40 e 200 mg de betanina para cada 100 g.

No entanto, para os extratos obtidos dos talos houve diferença significativa entre as concentrações de betalaínas obtidas para o primeiro experimento em relação aos outros dois, sendo que, para esses, não houve diferença. A faixa de concentrações observada nos extratos dos talos ficou entre 32,3 e 36,8 mg/100 ml de extrato. Considerando que os extratos foram obtidos de diferentes plantas e que os alimentos são matrizes muito complexas, a variação de concentração dos pigmentos pode ser considerada pequena.

Considerando os resultados obtidos percebe-se que a concentração de betalaínas nos extratos provenientes dos talos apresentam uma concentração em torno de 55% menor quando comparada à concentração dos extratos provenientes dos bulbos. Segundo Azeredo (2009), os corantes comerciais de beterraba vermelha possuem concentração de betanina de 0,3 a 1% (m/m). Com base nessa informação, nos dados de produção de beterraba no país e nos resultados obtidos, os talos de beterrabas podem ser considerados como uma fonte para a extração de betalaínas.



Os resultados seguidos por diferentes letras indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste Tukey.

Figura 5.1 – Concentrações de betalaínas (mg de betanina/100 ml de extrato) em extratos obtidos por esmagamento em três conjuntos distintos de bulbos e de talos de beterraba

### 5.1.3 Avaliação do rendimento da extração do sumo dos talos de beterraba

A fim de avaliar o rendimento da extração de betalaínas dos talos de beterraba por esmagamento foram realizadas quatro extrações em série: a primeira por esmagamento, seguida de três extrações sólido-líquido do bagaço, utilizando água destilada na temperatura ambiente (em torno de 20 °C). Este procedimento foi adotado pois, após o esmagamento, observou-se que o bagaço ainda apresentava coloração característica indicando presença de betalaínas.

A técnica de extração sólido-líquido foi selecionada com base em estudos apresentados na literatura, nos quais este processo foi empregado para a extração de betalaínas presente na beterraba vermelha. No estudo desenvolvido por Nayak *et al.* (2006), a extração de betalaínas de fatias de bulbos de beterraba foi realizada utilizando radiação gama e, para o experimento controle, os autores empregaram o processo de extração sólido-líquido, utilizando como solvente uma solução aquosa de ácido cítrico 1%, na razão 1:25 (m:m).

Como uma das motivações principais deste trabalho foi manter as características naturais do extrato, optou-se pela utilização de água destilada como solvente para a realização da extração sólido-líquido.

Na Figura 5.2 estão apresentados os resultados do percentual mássico de betalaínas que foi removido em cada etapa de extração em relação ao total extraído no processo.

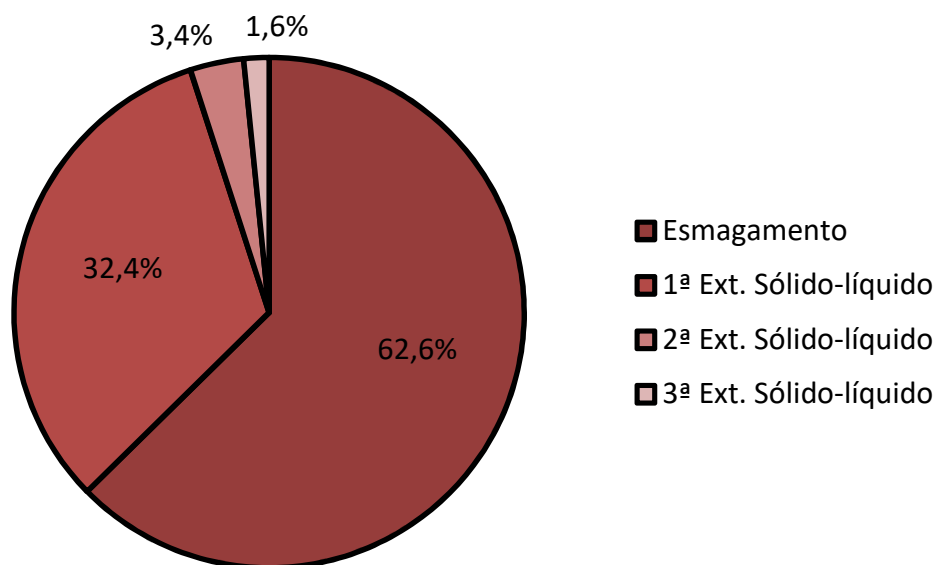


Figura 5.2 – Percentual mássico de betalaínas extraído dos talos de beterraba em cada etapa de extração: esmagamento, seguido de três extrações sólido líquido à temperatura ambiente (20 °C)

Conforme pode ser observado na Figura 5.2, na etapa de esmagamento foi extraída a maior quantidade de betalaínas (em torno de 62,6% das betalaínas presentes nos talos de beterraba) e, na primeira etapa de extração sólido-líquido, extraiu-se cerca de 32% da massa de betalaínas presentes nos talos. Porém, nos extratos obtidos por esmagamento, as concentrações de betalaínas ficaram em torno de 30 mg/100 ml de extrato, enquanto que a concentração da 1ª extração sólido-líquido não chegou a 2 mg de betanina/100 ml de extrato (o teste foi realizado em triplicata).

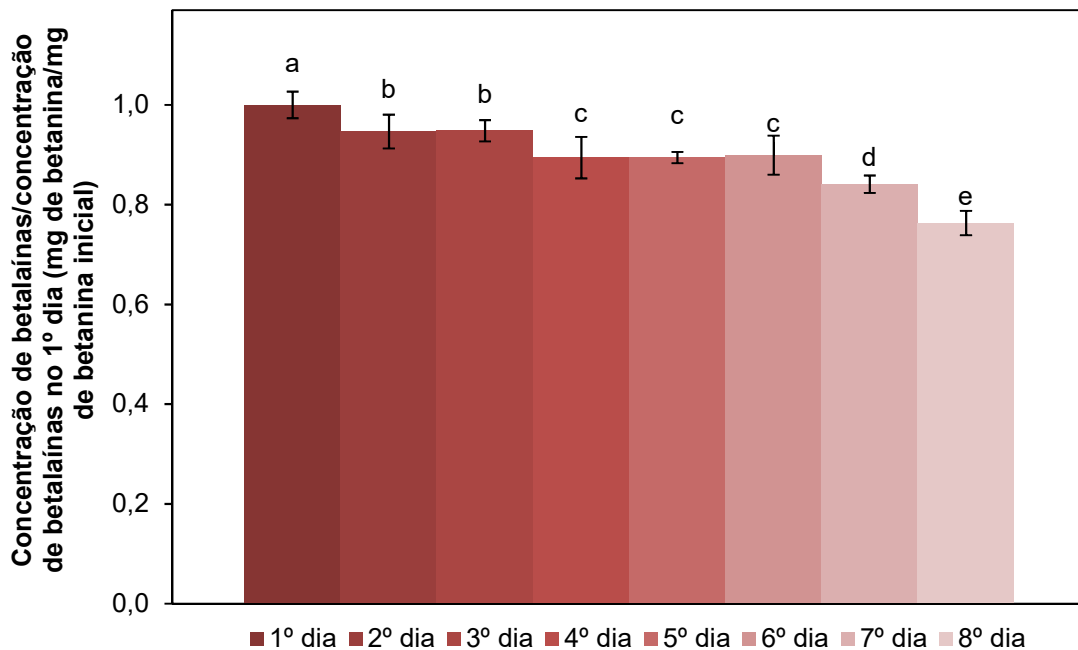
A concentração obtida na 1ª extração sólido-líquido do bagaço de talos foi menor que aquela obtida por Nayak *et al.* (2006). Uma explicação para este resultado é que, além da quantidade de betalaínas ser menor nos talos do que

nos bulbos, os autores realizaram a extração diretamente em fatias de bulbos, utilizando água acidificada como solvente e durante duas horas. No presente trabalho, a extração foi realizada no bagaço dos talos somente com água destilada, durante 15 min.

Ao longo do desenvolvimento deste estudo, foi estudada a possibilidade de utilizar o extrato da primeira extração sólido-líquido para diluir os extratos com o objetivo de padronizar a alimentação do processo de clarificação. Entretanto, extratos com concentrações muito baixas (menor que 2 mg de betanina/100 ml de extrato), mesmo armazenado sob refrigeração e protegido da luz, sofriam oxidação no período de 15 h em que precisava ser armazenado. A concentração de betalaínas diminuía para 0,8 -1 mg/100 ml de extrato e era possível observar visivelmente tons alaranjados no extrato. Logo, a partir dos resultados obtidos nestes experimentos, o esmagamento foi adotado como única etapa de extração de betalaínas dos talos de beterraba.

#### **5.1.4. Avaliação da degradação das betalaínas presentes nos talos e nos extratos submetidos ao armazenamento sob refrigeração**

Durante os experimentos de determinação do teor de betalaínas nos extratos observou-se que ocorria a rápida degradação das mesmas. Decidiu-se, portanto, avaliar a degradação destes compostos ainda nos talos, bem como nos extratos obtidos por esmagamento. Nestes experimentos, tanto os talos como os extratos foram armazenados sob refrigeração (4 °C) e ao abrigo de luz e, além disto, o teor de betalaínas foi avaliado diariamente durante oito dias (talos) e cinco dias (extratos). Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 5.3.

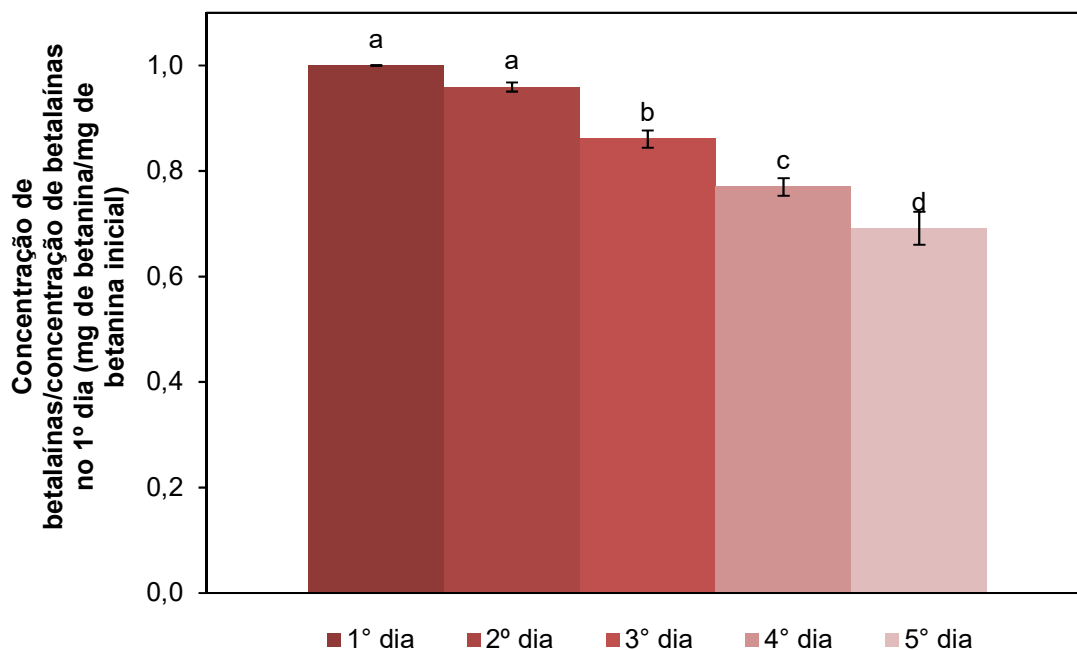


Os resultados seguidos por diferentes letras indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste Tukey.

Figura 5.3 – Variação do teor de betalaínas (mg de betanina/100 ml de extrato) nos talos de beterraba submetidos ao armazenamento sob refrigeração (4 °C) e ao abrigo da luz

Pela análise dos resultados apresentados na Figura 5.3, observa-se que há diferença significativa na concentração de betalaínas para os extratos de talos armazenados sob refrigeração. A concentração de betalaínas manteve-se sem diferença significativa entre o segundo e o terceiro dia de armazenamento. Foi observado uma redução na concentração dos pigmentos no quarto dia, mantendo-se sem diferença significativa até o sexto dia de armazenamento. A degradação aumentou significativamente para o sétimo e oitavo dias. Em oito dias de armazenamento, foi degradado em torno de 24% das betalaínas presentes nos talos.

Em seguida, foi avaliada a degradação das betalaínas nos extratos obtidos a partir do esmagamento dos talos de beterraba. Os resultados estão apresentados na Figura 5.4.



Os resultados seguidos por diferentes letras indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste Tukey.

Figura 5.4 – Variação do teor de betalaínas dos extratos obtidos de talos armazenados sob refrigeração (4 °C) e ao abrigo da luz, em relação ao teor inicial (imediatamente após a extração) durante cinco dias

Observa-se na Figura 5.4 que a degradação dos extratos foi comprovada estatisticamente apenas a partir do 3º dia de armazenamento. Considerando o comportamento da degradação das betalaínas, torna-se necessário basear a escolha da forma de armazenamento, talos ou extrato, de acordo com o tempo que este produto precisará ser armazenado. Se o produto precisa ser armazenado por apenas um dia, não há degradação significativa das betalaínas no extrato; contudo, quando há necessidade de armazenar por uma semana, ocorre menor degradação das betalaínas nos talos. Desta forma, é importante avaliar o tempo necessário para o processamento para definir a melhor forma de armazenamento.

## 5.2. Processamento por Alta Pressão: estudo de extração e estabilidade

Nesta seção estão apresentados os resultados obtidos nos testes preliminares e finais da aplicação da tecnologia de HPP em extratos de talos de beterraba vermelha.

Na Figura 5.5 está apresentado um perfil típico de pressão e de temperatura em função do tempo para o tratamento com HPP, neste caso, aplicado em amostras de extratos de talos de beterraba vermelha e a temperatura ambiente ( $\approx 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Para todos os tratamentos, o tempo de pressurização foi inferior a 3 min e a despressurização foi mais rápida do que a pressurização. A temperatura aumentou com a pressurização, mas manteve-se próxima a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante a maior parte do tratamento.

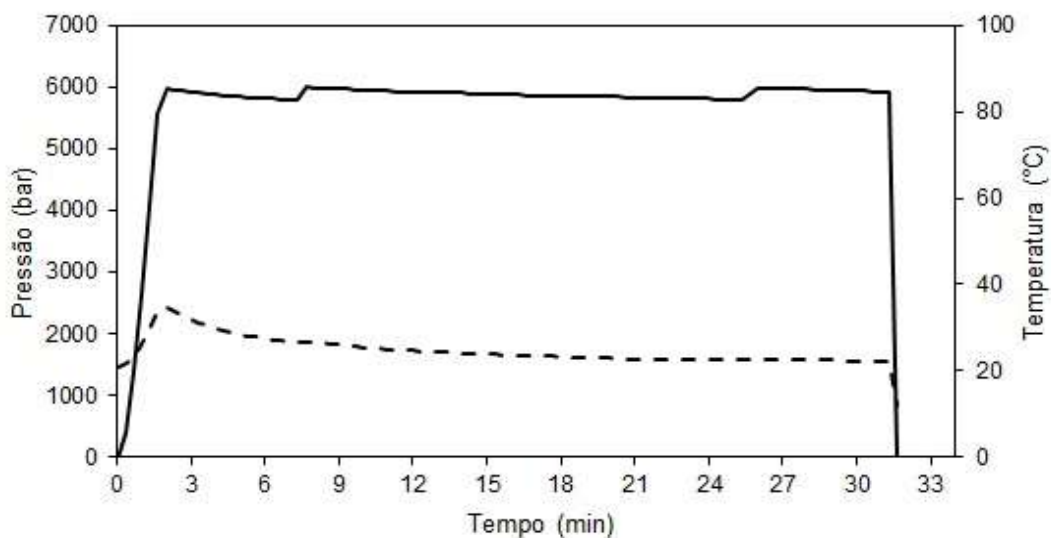
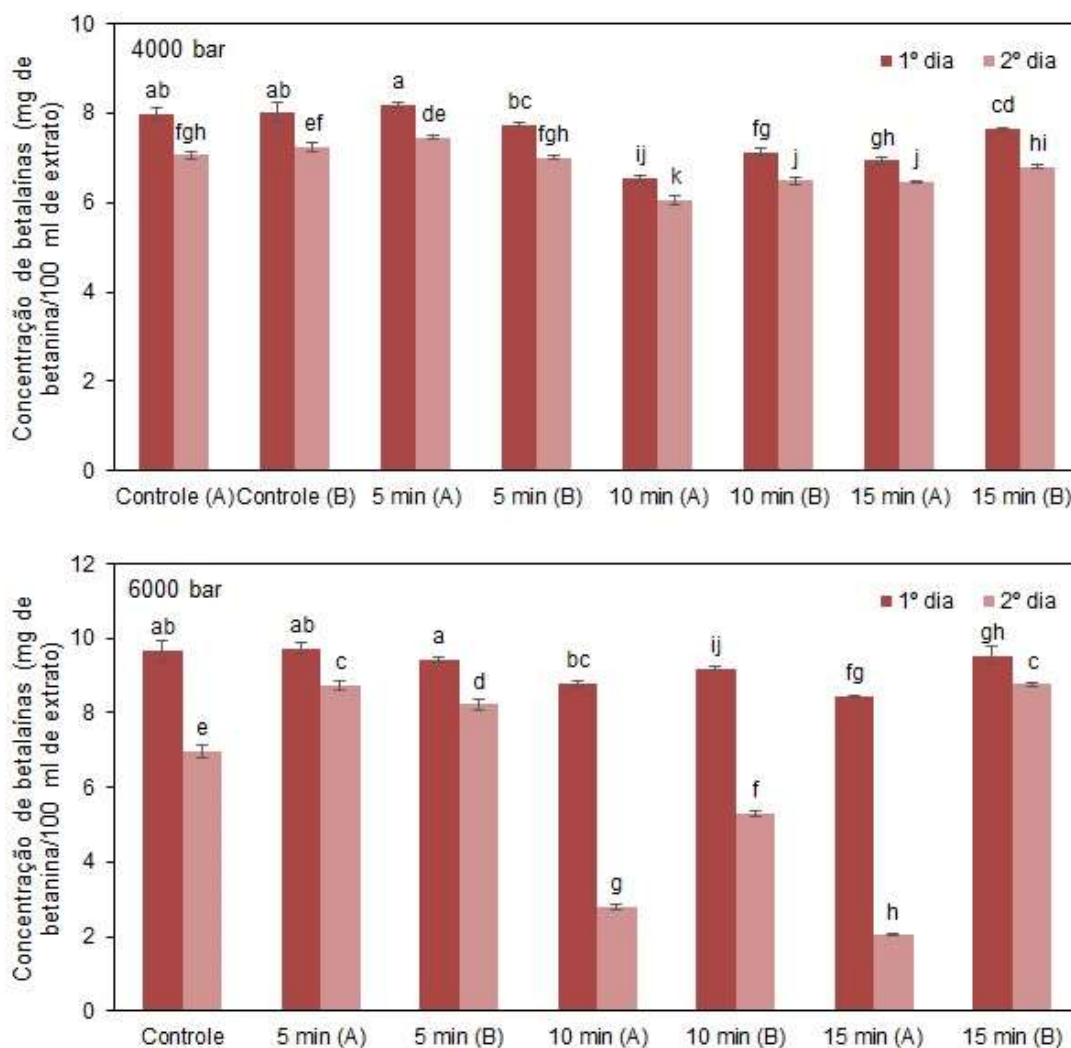


Figura 5.5 – Perfil típico de pressão e temperatura durante o tratamento com HPP de extratos de talos de beterraba vermelha. Linha contínua (—) representa pressão e linha tracejada (----) representa temperatura

### 5.2.1. Teste Inicial

O comportamento da concentração de betalaínas dos extratos de talos de beterraba vermelha no dia do tratamento (1<sup>o</sup> dia) e no 2<sup>o</sup> dia (mantida em armazenamento controlado) está apresentado na Figura 5.6 juntamente com as amostras controle de cada dia. Os extratos foram tratados por HPP a temperatura moderada ( $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), durante 5, 10 e 15 min, nas pressões de 4000 e 6000 bar.





Os resultados seguidos por diferentes letras indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste Tukey.

Figura 5.6 – Concentração de betalaínas (mg de betanina/100 ml de extrato) em duas amostras (A e B) tratadas por HPP durante 5, 10 e 15 min, nas pressões de 4000 e 6000 bar, a temperatura moderada (40 °C) no dia do tratamento (1º dia) e submetidas ao armazenamento à 4 °C e ao abrigo da luz (2º dia)

Pela análise dos resultados apresentados na Figura 5.6 observa-se que diferentes amostras (A e B), submetidas ao mesmo tratamento, apresentaram comportamento diferente com relação à concentração de pigmento, especialmente após um dia de armazenamento e em ambas as pressões testadas. Essa discrepância do comportamento entre as amostras submetidas ao mesmo tratamento pode ter sido devida a uma preparação inadequada das mesmas. Uma vez que a forma em que o volume de amostra foi mensurado não

possibilitou que as composições das amostras fossem semelhantes, isto é, apenas a amostragem por volume não assegura que a mesma quantidade de líquido (sumo) e sólido (bagaço) estejam na mesma proporção em todas as amostras.

A redução da atividade de PPO nas amostras submetidas ao tratamento pode ser observada na Tabela 5.2, a qual nomeia as amostras pelo tempo de tratamento.

Tabela 5.2 – Atividade residual (%) da PPO em amostras tratadas por HPP durante 5, 10 e 15 min, nas pressões de 4000 e 6000 bar a temperatura moderada (40 °C)

Amostra	Atividade Residual de PPO (%RA)	
	4000 bar	6000 bar
5 min (A)	11,6	11,6
5 min (B)	13,7	11,2
10 min (A)	13,8	11,6
10 min (B)	12,4	12,4
15 min (A)	13,3	34,5
15 min (B)	11,2	9,2

Apesar da falta de homogeneização das amostras, observa-se na Tabela 5.2 que o tratamento empregado possibilitou a redução na atividade de PPO em valores relevantes, resultando em atividades residuais variando de 34,5% (amostra 15 min A na pressão de 6000 bar) a 9,2% (amostra 15 min B na pressão de 6000 bar). O processamento com mais curta duração, 5 min, já foi suficiente para reduzir a atividade da enzima nas duas pressões testadas, apresentando reduções que variam de 86,3 a 88,8%.

Apesar da expressiva redução na atividade de PPO, os resultados obtidos nesta etapa não possibilitam afirmar que a redução da atividade é ocasionada pela alta pressão, uma vez que nos testes desta etapa ocorreu um efeito combinado de alta pressão com temperatura moderada (em torno de 40 °C). Considerando isto, foi realizada a verificação da aplicação de alta pressão a temperatura ambiente (25 °C).

## 5.2.2. HPP - Testes Preliminares

Os resultados descritos nos subitens seguintes foram obtidos nos testes preliminares que foram utilizados para determinar as melhores condições de aplicação da tecnologia aos extratos.

### 5.2.2.1. Verificação do efeito do HPP na atividade de PPO sem utilização de calor

Na Tabela 5.3 estão apresentados os resultados da atividade residual de PPO nas amostras tratadas durante 5 min, nas pressões de 4000 e 6000 bar em temperatura ambiente (25 °C).

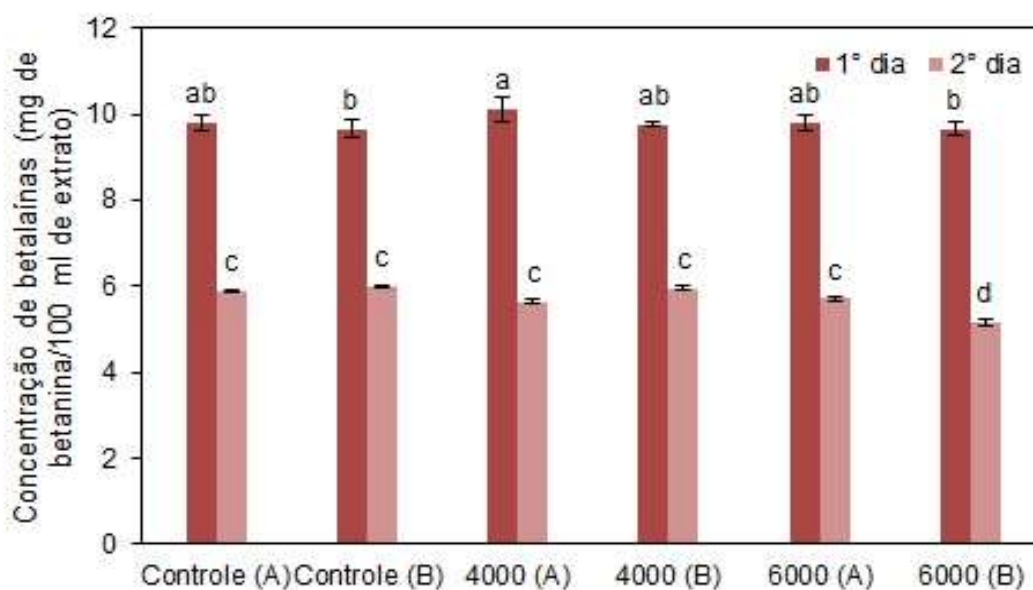
Tabela 5.3 - Atividade residual (%) da PPO em amostras tratadas por HPP durante 5 min, nas pressões de 4000 e 6000 bar a temperatura ambiente (25°C)

Amostra	Atividade Residual de PPO (%RA)
4000 bar (A)	87,2
4000 bar (B)	89,2
6000 bar (A)	90,7
6000 bar (B)	91,3

Como pode ser observado na Tabela 5.3, o processamento HPP proporcionou uma redução de aproximadamente 10% na atividade da PPO em extratos de talos de beterraba vermelha. Comparando os resultados apresentados nas Tabelas 5.2 e 5.3 observa-se que o uso do processamento HPP em temperatura moderada contribuiu mais para a redução da atividade da PPO do que quando aplicado em temperatura ambiente. Quando os experimentos foram realizados a temperatura moderada e na pressão de 4000 bar durante 5 min (Tabela 5.2), as atividades residuais de PPO foram de 11,6% e 13,7%, enquanto que para HPP, à temperatura ambiente (Tabela 5.3) as atividades residuais foram de 87,2% e 89,2%. O mesmo comportamento foi observado para o tratamento HPP na pressão de 6000 bar: em temperatura moderada (Tabela 5.2) as atividades residuais foram de 11,6% e 11,2% e em temperatura ambiente (Tabela 5.3) as atividades residuais de PPO foram de 90,7% e 91,3%.

Esses resultados demonstram que a enzima PPO é mais sensível ao processamento que combina tratamento térmico e alta pressão do que apenas à alta pressão, mesmo quando aplicado a curtos tratamentos, confirmando a sua termosensibilidade descrita na literatura (Yong, 2014; Latorre *et al.*, 2012).

As concentrações de betalaínas das amostras controle e tratadas a temperatura ambiente, durante 5 min, nas pressões de 4000 e 6000 bar, no 1º e 2º dia, estão apresentadas na Figura 5.7.



Os resultados seguidos por diferentes letras indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste Tukey.

Figura 5.7 – Concentração de betalaínas (mg de betanina/100 ml de extrato) em amostras tratadas por HPP durante 5 min, nas pressões de 4000 e 6000 bar, a temperatura ambiente, no dia do tratamento (1º dia) e submetidas ao armazenamento (2º dia)

Como pode ser observado na Figura 5.7, as amostras submetidas ao mesmo tratamento (ou controle) não apresentam diferença significativa na concentração de betalaínas. Logo, a modificação do preparo da amostra, apresentada em detalhes no item 4.4.1, permitiu melhor homogeneização do que a metodologia utilizada anteriormente. Este preparo foi padronizado para os testes posteriores e os resultados seguintes estão apresentados por meio das médias das amostras.

Além disso, pela análise dos resultados apresentados na Figura 5.7, observou-se que ocorreu uma redução na concentração de pigmentos em todas as amostras após o armazenamento (2º dia), indicando que as condições de processamento aplicadas não possibilitaram um aumento na estabilidade.

#### **5.2.2.2. Efeito da redução da atividade de PPO na estabilidade de amostras tratadas com HPP**

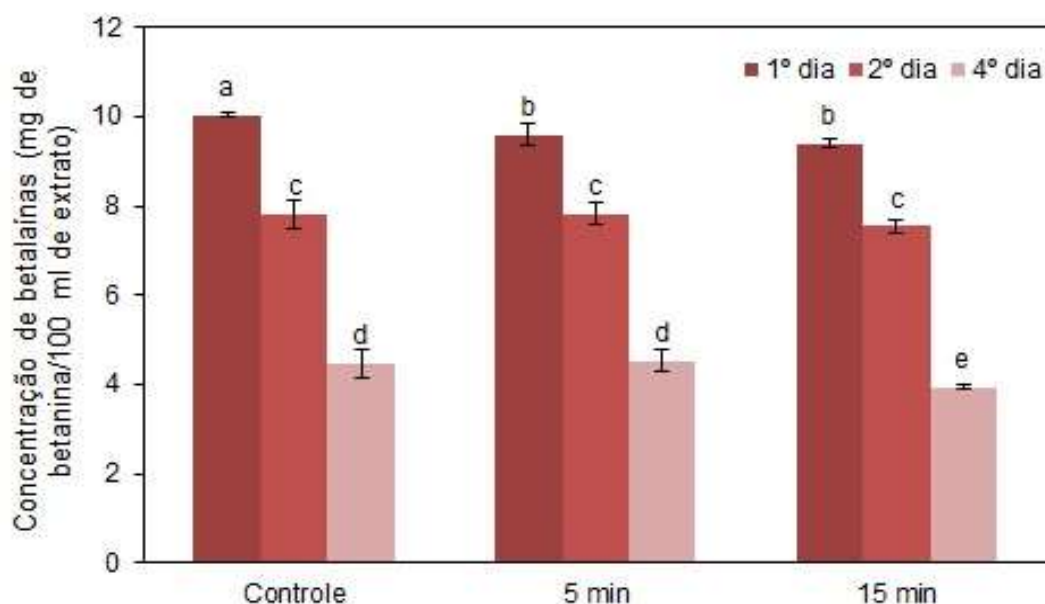
Com a presença de PPO nos extratos de beterraba vermelha e os resultados dos testes anteriores, os quais permitiram uma ampla redução na atividade desta enzima nos extratos quando combinado o HPP com temperaturas moderadas, foi estudado se esta redução na atividade da PPO possibilitava um aumento na estabilidade dos pigmentos.

Na Tabela 5.4 estão apresentadas as atividades residuais de PPO das amostras tratadas HPP com temperatura moderada, onde pode ser observada a redução da atividade enzimática das amostras tratadas com HPP combinado com temperatura moderada.

Tabela 5.4 - Atividade residual (%) da PPO em amostras tratadas por HPP durante 5, e 15 min, na pressão de 6000 bar a temperatura moderada (40 °C)

<b>Amostra</b>	<b>Atividade Residual de PPO (%RA)</b>
5 min	19,7
15 min	15,9

Na Figura 5.8 estão apresentadas as concentrações de betalaínas nos extratos tratados com HPP e nas amostras controle no dia do tratamento (1º dia) e nos dias de armazenamento (2º e 4º dia).



Os resultados seguidos por diferentes letras indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste Tukey.

Figura 5.8 - Concentração de betalaínas (mg de betanina/100 ml de extrato) em amostras tratadas por HPP durante 5 e 15 min, na pressão de 6000 bar, a temperatura moderada (40 °C) no dia do tratamento (1º dia) e após o seu armazenamento (2º dia e 4º dia)

Conforme dados apresentados na Figura 5.8, observa-se que o tratamento por HPP combinado com temperatura moderada ocasionou redução na concentração de pigmento no dia de tratamento (1º dia). Além disto, foi observada uma redução da concentração de betalaínas em todas as amostras já no 2º dia, sem diferença significativa entre o controle e as amostras tratadas. No 4º dia, a concentração da amostra tratada por 5 min e a amostra controle não apresentaram diferença significativa. A amostra tratada por 15 min, no entanto, apresentou concentração significativamente menor que as demais amostras. Logo, a redução em mais de 80% da atividade da PPO não foi suficiente para aumentar a estabilidade das betalaínas nas condições estudadas.

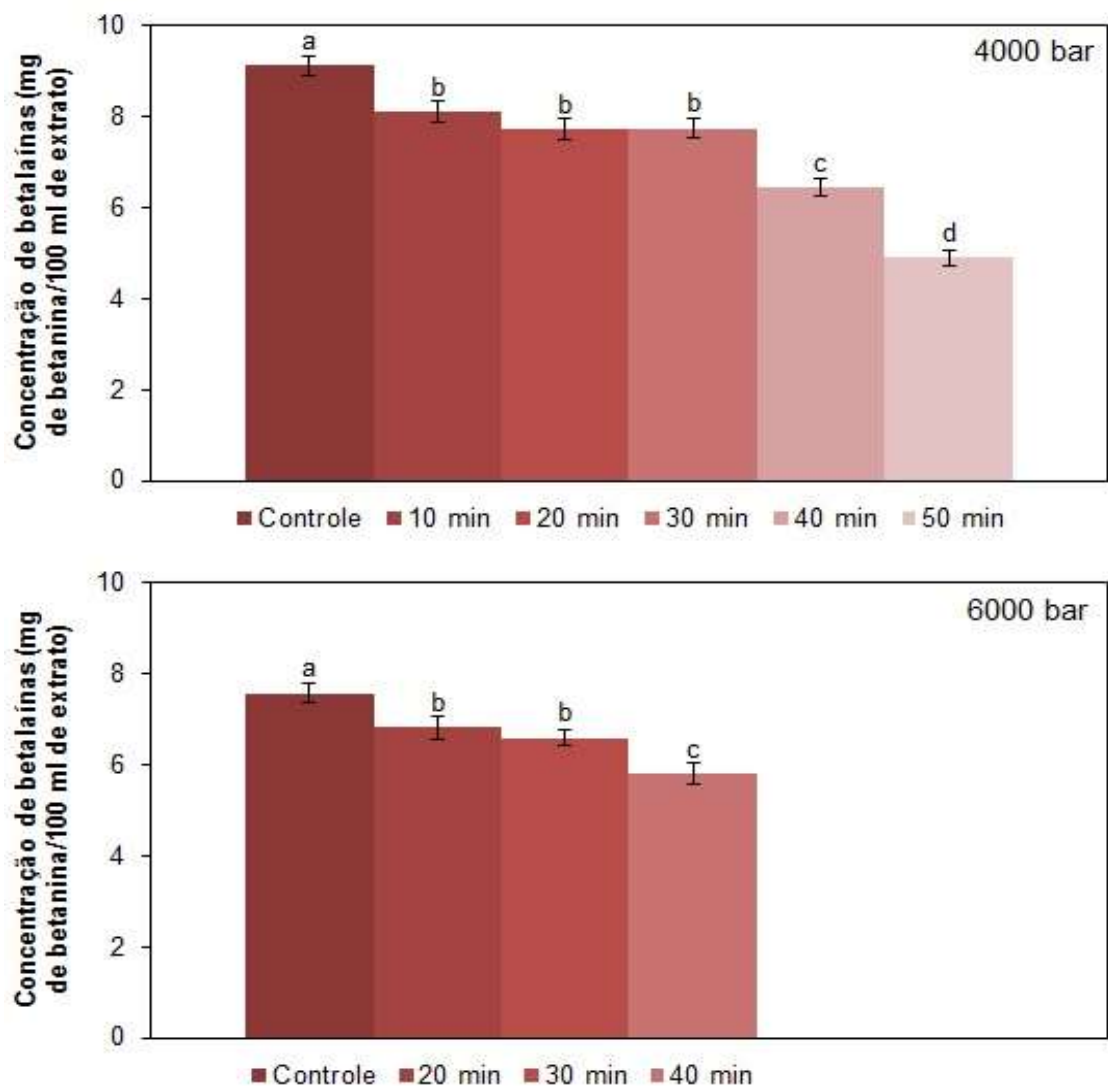
### 5.2.2.3. Tempo e pressão de processamento

Esta etapa dos testes preliminares foi realizada para melhor avaliar as condições de processamento por alta pressão com relação ao tempo e à pressão de tratamento. As amostras tratadas com HPP a 4000 bar foram tratadas durante

10, 20, 30, 40 e 50 min; as amostras tratadas a 6000 bar, por sua vez, foram tratadas durante 20, 30 e 40 min. Em todos os tratamentos, a temperatura foi moderada ( $\approx 40$  °C). Os resultados que relacionam a concentração de betalaínas dos extratos com diferentes durações de tratamento em cada uma das duas pressões testadas estão apresentados na Figura 5.9.

Observa-se na Figura 5.9 que as amostras tratadas por HPP apresentaram concentrações de betalaínas mais baixas do que a amostra controle (não tratada). Além disto, observou-se que as amostras tratadas durante um tempo mais curto ( $t \leq 30$  min) apresentaram concentrações mais elevadas de betalaínas do que as amostras tratadas durante 40 e 50 min. Isso pode ter ocorrido devido à ação da pressão nos vacúolos celulares, onde se encontram as betalaínas. Como a estabilidade desses pigmentos é afetada a partir do rompimento vegetal, o processamento expôs possivelmente os pigmentos, ocasionando o início da degradação. A redução da concentração de betalaínas em fatias de beterraba vermelha tratadas por HPP, em processamentos mais longos, também foi observada no estudo realizado por Paciulli *et al.* (2016).

Os tempos de processamento de 40 e 50 min foram considerados muito longos devido à redução da concentração de betalaínas de 30,2% e 46,9%, respectivamente, no tratamento a 4000 bar, e 23,2%, no tratamento aplicado por 40 min a 6000 bar. Além disso, o aumento da pressão não causou uma queda na concentração de betalaínas do extrato de talo de beterraba vermelha, uma vez que a redução da concentração de betalaínas da amostra tratada a 4000 bar durante 30 min foi de 16,2% e, na amostra tratada a 6000 bar, foi de 12,8%.



Os resultados seguidos por diferentes letras indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste Tukey.

Figura 5.9 - Concentração de betalínas do extrato de talos de beterraba vermelha quando submetidos ao tratamento com HPP durante curto e longo tempo de processamento, à temperatura moderada (40 °C) e sob pressão de 4000 bar e 6000 bar

Ao longo dos testes preliminares, foi observado que a concentração de betalínas dos extratos de talos de beterraba vermelha tratados por HPP é um balanço entre a concentração inicial e a degradação causada pela preparação e pela aplicação do tratamento. Portanto, considerando os resultados obtidos, foram selecionadas as condições de processamento: pressão de operação de 6000 bar e tempos de tratamento inferiores a 30 min.



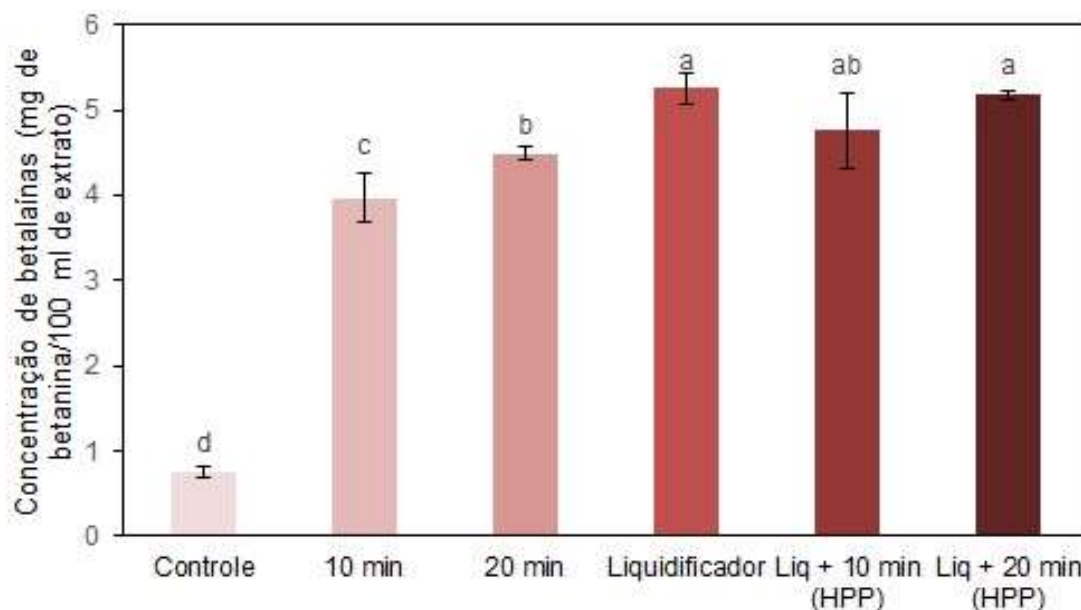
#### 5.2.2.4. Extração do pigmento residual

Devido à variação natural da concentração de pigmentos nos talos de beterraba, a busca por melhores condições de extração das betalaínas, que minimizem as modificações nas características naturais do extrato, foi realizada no presente estudo. A melhor forma encontrada foi o esmagamento, assim como mostram os resultados apresentados no item 5.1. Contudo, a geração de um resíduo pigmentado abre uma nova alternativa de extração.

A aplicação de HPP nesse resíduo (10 e 20 min, temperatura ambiente e pressão de 6000 bar) foi avaliada e comparada com a trituração com extração sólido-líquido, feita em um liquidificador doméstico, e com a combinação das duas tecnologias (trituração com extração sólido-líquido seguida por HPP). Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 5.10.

Como pode ser observado na Figura 5.10, apenas o contato da água com o bagaço não foi eficiente na extração do pigmento residual, uma vez que o extrato obtido apresentou concentração de  $0,8 \pm 0,1$  mg de betanina/100 ml de extrato. Entretanto, a aplicação de HPP e de trituração com extração sólido-líquido permitiram a extração de uma quantidade relevante de pigmento do extrato.

No estudo realizado por Jun *et al.* (2011), o processamento por alta pressão foi utilizado para extrair ingredientes bioativos de folhas de chá verde. Os autores aplicaram 400 MPa durante 15 min em uma mistura de 15 g folhas frescas de chá verde (*Thea sinensis* L.) em pó com 300 ml de uma solução água:etanol na proporção 1:1. Foi observado que o processamento com alta pressão ocasionou ruptura do tecido das folhas, da parede celular, membrana e das organelas, favorecendo a transferência de massa entre as folhas e o solvente.



Os resultados seguidos por diferentes letras indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste Tukey.

Figura 5.10 – Concentração de betalaínas de extratos obtidos com diferentes tecnologias aplicadas ao bagaço do esmagamento dos talos de beterraba vermelha: 10 e 20 min de HPP, trituração com extração sólido-líquido, trituração com extração sólido-líquido seguida por HPP (10 e 20 min) e sem aplicação de tecnologia (controle)

No presente trabalho, a aplicação de HPP durante 10 e 20 min permitiu a extração de  $4,0 \pm 0,3$  e  $4,5 \pm 0,1$  mg de betanina/100 ml de extrato, respectivamente, e a trituração com extração sólido-líquido resultou em um extrato com concentração de  $5,2 \pm 0,2$  mg de betanina/100 ml de extrato.

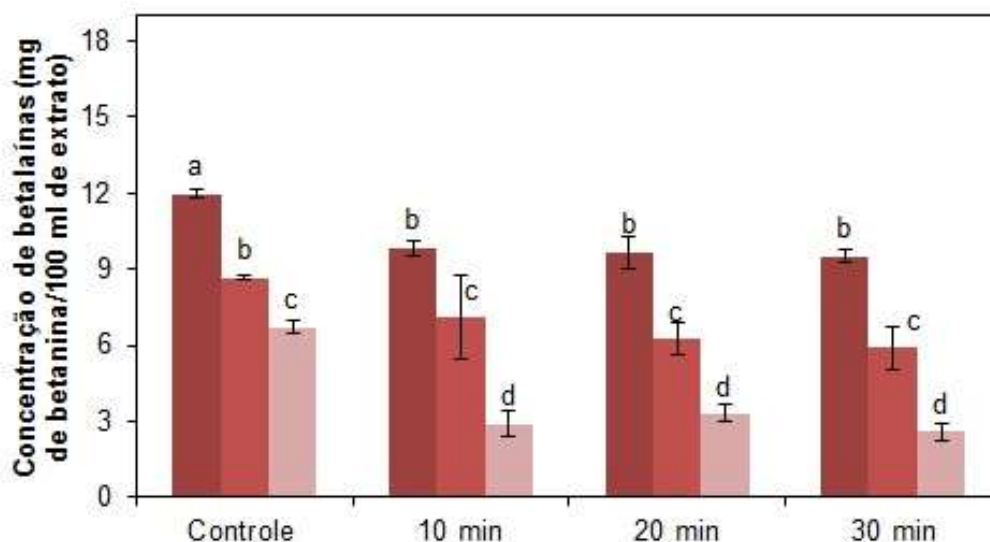
Entretanto, a combinação de trituração com extração sólido-líquido e aplicação de HPP não apresentou aumento na extração de betalaínas do resíduo de talos de beterraba vermelha uma vez que não houve diferença significativa entre o extrato obtido apenas pela trituração com extração sólido-líquido do bagaço com água e os extratos que, posteriormente à trituração com extração sólido-líquido, foram submetidos ao HPP durante 10 e 20 min.

Considerando os resultados desta etapa, a aplicação de HPP para o aumento da extração de betalaínas do resíduo do esmagamento se apresentou economicamente desnecessária. A extração por trituração com extração sólido-líquido, realizada com o liquidificador doméstico, apresentou resultados

satisfatórios, não justificando assim o emprego de uma tecnologia emergente, a qual necessita de um alto investimento inicial. Logo, a extração do pigmento residual foi realizada, para as próximas etapas, por trituração com extração sólido-líquido.

### 5.2.3. Aplicação do HPP: efeitos na concentração e na estabilização de betalaínas de extratos de talos de beterraba vermelha

Na Figura 5.11 estão apresentadas as concentrações de betalaínas nas amostras tratadas por HPP (6000 bar) durante 10, 20 e 30 min, com baixa concentração inicial de betalaínas ( $12,0 \pm 0,2$  mg de betanina/100 ml de extrato), e na amostra controle, no 1º, 2º e 4º dia de armazenamento.



Os resultados seguidos por diferentes letras indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste Tukey.

Figura 5.11 - Concentração de betalaínas de extrato de talos de beterraba vermelha, com baixa concentração inicial de betalaínas ( $12,0 \pm 0,2$  mg de betanina/100 ml de extrato), no 1º, 2º e 4º dia de armazenamento, para controle e após tratamento HPP a 6000 bar, para diferentes tempos de tratamento

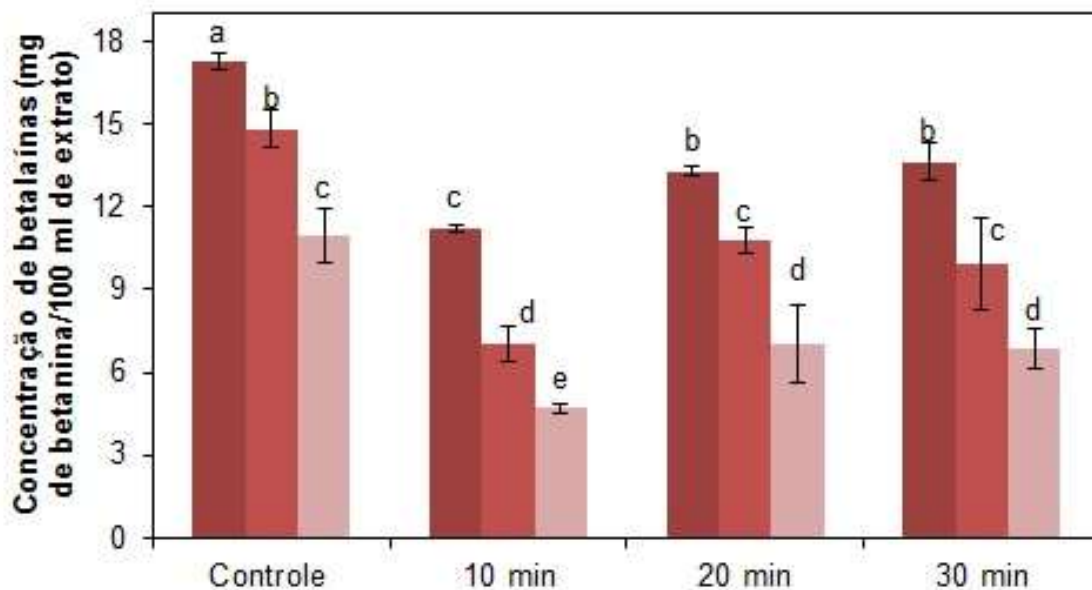
O efeito do tratamento HPP a 6000 bar na estabilidade das betalaínas com o tempo de armazenamento pode ser observado a partir dos resultados de concentração. Esses resultados confirmam a degradação das betalaínas durante o tratamento com HPP, quando comparada ao controle. Como mencionado

anteriormente, a diminuição da concentração de betalaínas no primeiro dia pode ser devida à oxidação e à exposição à luz durante a preparação das amostras. A partir do 2º dia essa degradação está relacionada com o tempo de armazenamento. As taxas de degradação das betalaínas (DR), calculadas com auxílio da Eq 4.2, para as amostras controle e as tratadas por 10, 20 e 30 min, foram: 1,8, 2,3, 2,1 e 2,3 mg de betanina/100 ml de extrato por dia, respectivamente. Isto demonstra que o tratamento com HPP não aumentou a extração nem auxiliou na manutenção da estabilidade das betalaínas durante o período de armazenamento considerado.

Paciulli *et al.* (2016) estudaram o impacto do processamento térmico e do HPP na qualidade das fatias de beterraba. Os autores observaram melhora na extração de betalaínas das fatias quando a HPP foi aplicada até 7 min, e consideraram que o aumento do teor de betalaínas foi devido ao rompimento celular no alimento. As amostras tratadas durante 15 e 30 min tiveram concentrações de betalaínas superior à da amostra controle, mas inferior às concentrações das amostras tratadas durante 3 e 7 min.

A extração por HPP pode ter sido maior nas fatias de beterrabas (Paciulli *et al.*, 2016) do que nos extratos de talos de beterraba vermelha, porque o tratamento com HPP pode ter sido mais eficaz em células vegetais abertas. No presente estudo, a maior percentagem de betalaínas extraída foi obtida durante o esmagamento seguido por extração sólido-líquido. Além disto, a adição de água durante a extração diminuiu a concentração de pigmento, aumentando também a atividade de água.

Na Figura 5.12 estão apresentadas as concentrações de betalaínas nas amostras tratadas por HPP (6000 bar) durante 10, 20 e 30 min, com alta concentração inicial de betalaínas, e na amostra controle no 1, 2 e 4º dia de armazenamento. As DRs da amostra controle e das amostras tratadas por 10, 20 e 30 min foram, respectivamente: 2,1, 2,2, 2,1 e 2,3 mg de betanina/100 ml de extrato por dia. Estes resultados confirmam que o HPP não foi eficaz na melhoria da estabilidade de extrato de talos de beterraba vermelha mesmo em concentrações iniciais de pigmentos mais elevadas ( $17,3 \pm 0,3$  mg de betanina/100 ml de extrato).



Os resultados seguidos por diferentes letras indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste Tukey.

Figura 5.12 - Concentração de betalínas de extrato de talos de beterraba vermelha, com alta concentração inicial de betalínas ( $17,3 \pm 0,3$  mg de betanina/100 ml de extrato), no 1º, 2º e 4º dia de armazenamento, para controle e após tratamento HPP a 6000 bar, para diferentes tempos de tratamento

Na Tabela 5.5 está apresentada a atividade residual da POD nas amostras que foram tratadas com HPP. A partir desses resultados observa-se que não foi possível inativar a POD utilizando o tratamento HPP nas condições testadas, pelo contrário, o tratamento com HPP aumentou a sua atividade. Estes resultados concordam com os resultados obtidos no estudo realizado por Anese *et al.* (1995), que trata da ativação de POD em cenouras, utilizando o HPP. Os resultados deste estudo mostraram um aumento na atividade desta enzima quando as amostras foram submetidas ao tratamento com alta pressão, particularmente quando o tratamento foi aplicado no pH 6, com diferentes pressões (4000, 5000 e 6000 bar). Os autores também relataram que a inativação de POD apenas iniciou quando foram aplicadas pressões muito altas, em torno de 9000 bar.

Tabela 5.5 – Atividade residual (RA%) de POD em amostras tratadas com HPP, com baixa e alta concentração inicial de betalaínas

Concentração Inicial de Betalaínas	RA (%) de POD		
	10 min	20 min	30 min
Baixa (12,0 ± 0,2 mg de betanina/100 ml de extrato)	130,0	134,9	117,0
Alta (17,3 ± 0,3 mg de betanina/100 ml de extrato)	175,1	184,3	170,0

Similarmente, Huang *et al.* (2013) estudaram a ativação de POD por HPP no néctar de damasco. Os resultados mostraram que, nas duas maiores pressões testadas, 400 MPa (4000 bar) e 500 MPa (5000 bar), o HPP causou ativação, ou seja, ocorreu um aumento da atividade de POD em todos os tempos de tratamento testados, 5, 10, 15 e 20 min. O maior valor de RA observado pelos autores foi de 146,8% a 500 MPa/5 min. Os autores sugeriram que o aumento na atividade de POD pode ser devido a alguns fatores tais como: mudanças nos constituintes do extrato, liberação de enzimas que estavam nas membranas ou ativação de enzimas que estavam inativas ou latentes.

No processamento de alimentos, uma tecnologia pode ser eficaz para melhorar a qualidade do produto e a sua vida útil, sem ser eficiente na inativação de enzimas. Esta situação foi observada no estudo de Woolf *et al.* (2013), que avaliaram o impacto do HPP na qualidade de fatias de abacate através da análise da cor, taxa de respiração, produção de etileno e atividades PPO e POD. Os resultados mostraram que o tratamento com HPP teve um efeito na inativação da respiração celular e na produção de etileno, sem a necessidade de aplicação de calor. Contudo, o processo foi ineficaz na inativação de enzimas. Woolf *et al.* (2013) concluíram que, apesar da HPP ter apresentado efeitos moderados em relação à atividade enzimática, o tratamento contribuiu para o aumento da vida útil de fatias de abacate.

No presente estudo, para as condições testadas, não houve redução na DRs das betalaínas para qualquer amostra após o tratamento com HPP, indicando que o uso desta tecnologia não representa uma alternativa adequada para o aumento da estabilidade das betalaínas.

### 5.3. Tratamento Térmico aplicado em Alta Temperatura por Curto Tempo (HTST): estudo de estabilidade

Nesta seção estão apresentados os resultados da aplicação do tratamento térmico HTST em extratos de talos de beterraba vermelha avaliando o efeito da tecnologia na concentração de pigmentos e na contribuição da estabilidade dos mesmos, quando submetidos ao armazenamento controlado.

Conforme salientado, devido ao curto intervalo de tempo que o alimento é tratado na aplicação desta tecnologia, foi determinada a temperatura efetiva de tratamento nos tempos de tratamento aplicados.

#### 5.3.1. Determinação da Temperatura Efetiva de Tratamento

Na Figura 5.13 está apresentado o perfil de temperaturas durante o aquecimento de extratos de beterraba vermelha utilizando um banho pré-aquecido a 120 °C.

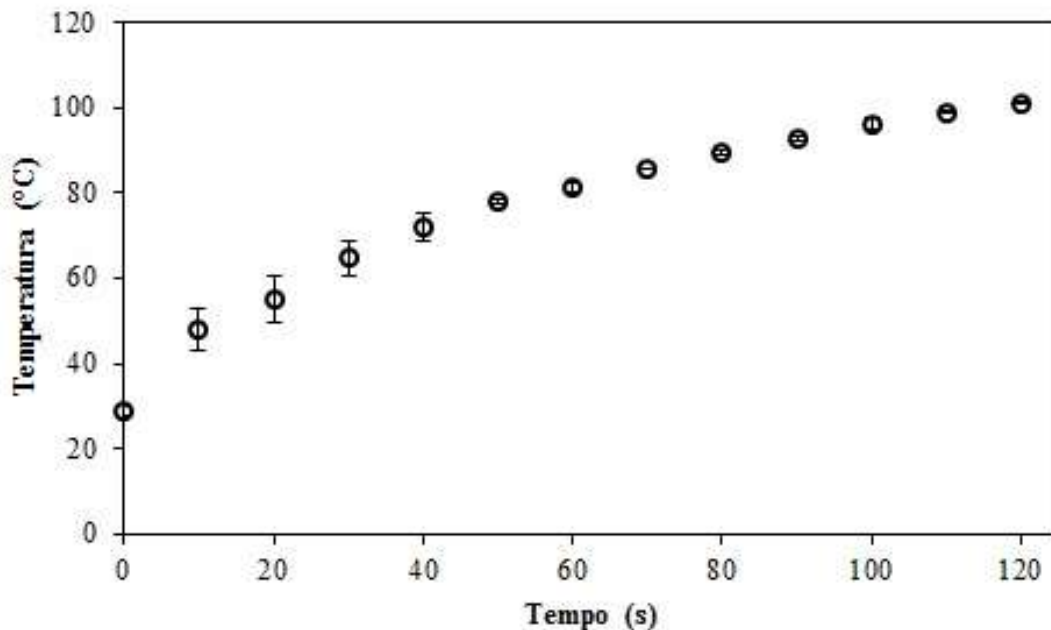


Figura 5.13 - Perfil de temperaturas do aquecimento de extrato de talos de beterraba vermelha

Como pode ser visto nesta figura, o aquecimento das amostras não ocorreu instantaneamente e a temperatura foi aproximadamente 20 °C inferior à temperatura do banho ao final do tratamento. Logo, o uso da temperatura do

banho de óleo, temperatura média ou final da amostra não retrata adequadamente a temperatura em que o tratamento ocorreu. A fim de empregar a temperatura real em que as amostras foram tratadas, foi de grande importância a utilização da temperatura efetiva de tratamento. Este cálculo da temperatura efetiva do tratamento (Eq 4.9) foi também utilizada por Shibeshi e Farid (2010), no estudo de termo-esterilização de sopa de abóbora.

Utilizando os dados apresentados na Figura 5.14 e na Eq 4.9, foi determinado que as  $T_{eff}$  para o tratamento térmico HTST a 80 s, 100 s e 120 s foram de 75,7 °C, 81,1 °C e 85,7 °C, respectivamente.

### **5.3.2. Efeitos do tratamento térmico HTST na concentração e na estabilidade de betalaínas de extratos de talos de beterraba vermelha**

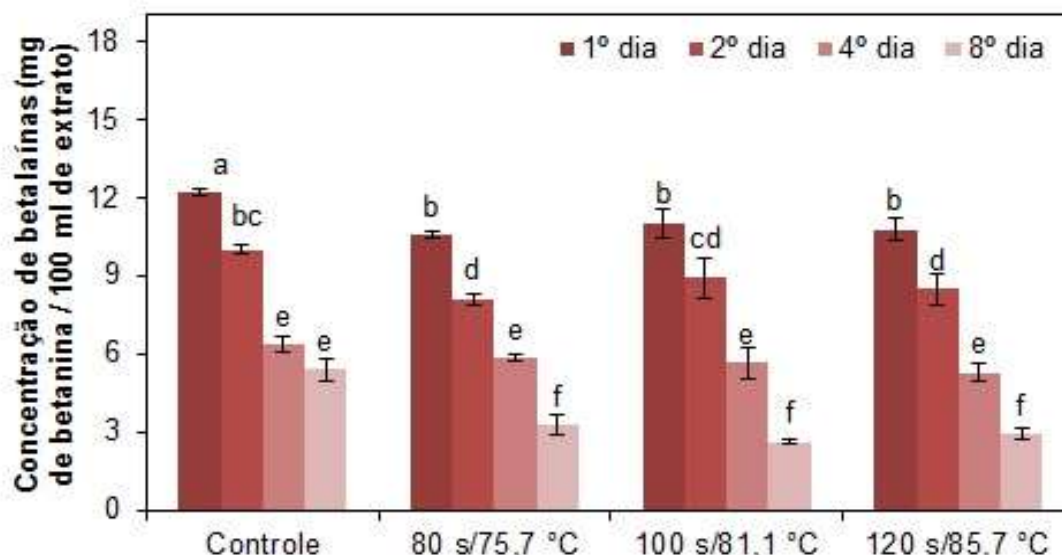
Estudos prévios apresentados na literatura demonstram o impacto do processamento térmico nas betalaínas da beterraba vermelha e o uso desses pigmentos como corante alimentar (Güneşer, 2016; Paciulli *et al.*, 2016). Güneşer (2016) investigou a estabilidade das betalaínas utilizadas em leite de vaca e observou um aumento na degradação das betalaínas com o aumento da temperatura. O autor também apontou a necessidade de mais estudos para investigar a mudança de cor durante o processamento e/ou armazenamento em alimentos pigmentados com betalaínas.

Na Figura 5.14 estão apresentadas as concentrações de betalaínas em amostras com baixa concentração inicial sem tratamento (controle) e termicamente tratadas com HTST por 80 s (75,7 °C), 100 s (81,1 °C) e 120 s (85,7 °C), no dia do tratamento (1º dia) e durante uma semana de armazenamento (2º, 4º e 8º dia).

Os resultados apresentados na Figura 5.14 mostram que as betalaínas foram degradadas pelo tratamento térmico HTST em todos os tempos de tratamentos testados. O controle (amostra não tratada por tratamento térmico HTST) apresentou uma concentração de betalaínas superior à das amostras tratadas durante todos os dias de armazenamento. Após uma semana de armazenamento (8º dia), a DR da betalaínas da amostra controle foi de 1,0 mg de betanina/100 ml de extrato por dia e das amostras tratadas a 80 s, 100 s e



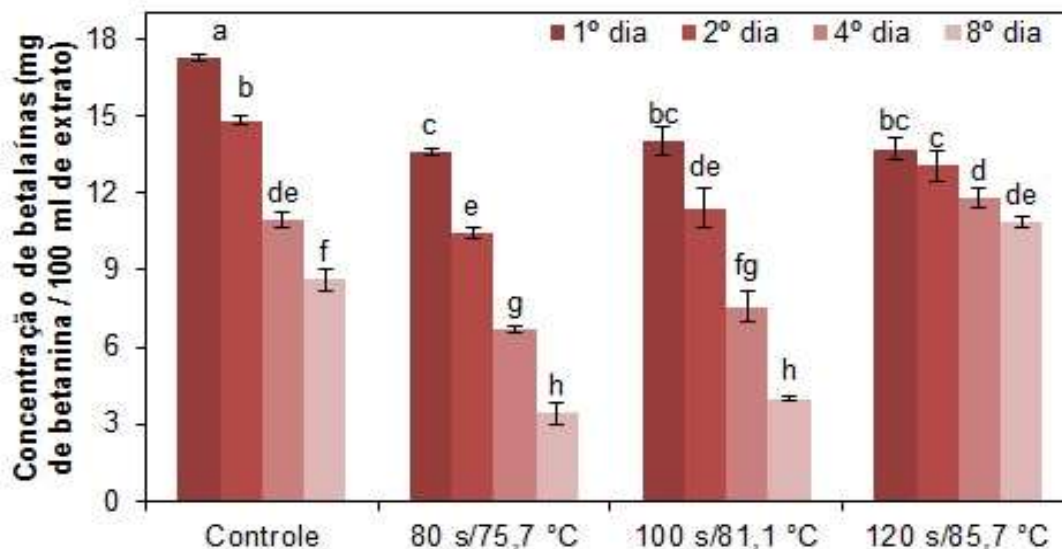
120 s foram 1,0, 1,2 e 1,1 mg de betanina/100 ml de extrato por dia, respectivamente. Isto mostra que, nas condições estudadas, o tratamento HTST não foi eficaz para o aumento da estabilidade das betalaínas presentes nos extratos de talos de beterraba vermelha com baixa concentração inicial.



Os resultados seguidos por diferentes letras indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste Tukey.

Figura 5.14 - Concentração de betalaínas em extrato de talos de beterraba vermelha tratados com HTST, com baixa concentração inicial de betalaínas ( $12,2 \pm 0,1$  mg de betanina/100 ml de extrato), ao longo de uma semana de armazenamento

Adicionalmente, amostras com alta concentração de betalaínas ( $17,3 \pm 0,3$  mg de betanina/100 ml de extrato) também foram testadas. As concentrações de betalaínas das amostras sem tratamento (controle) e termicamente tratadas com HTST por 80 s ( $75,7$  °C), 100 s ( $81,1$  °C) e 120 s ( $85,7$  °C), no dia do tratamento (1º dia) e durante uma semana em armazenamento (2º, 4º e 8º dia) estão apresentadas na Figura 5.15.



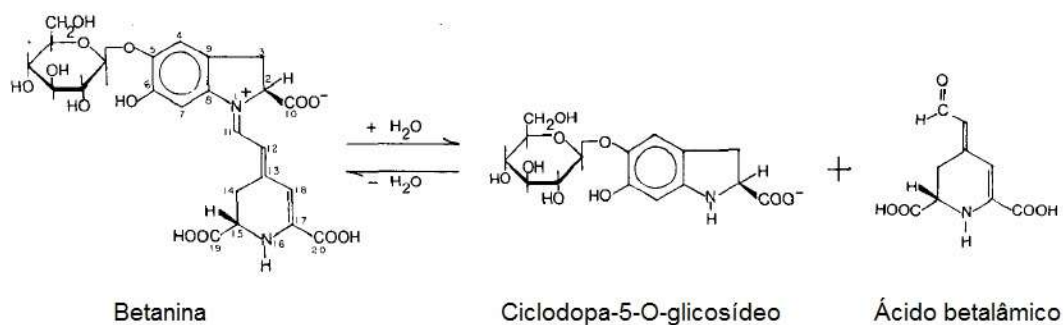
Os resultados seguidos por diferentes letras indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste Tukey.

Figura 5.15 - Concentração de betalaínas em extrato de talos de beterraba vermelha tratados com HTST, com alta concentração inicial de betalaínas ( $17,3 \pm 0,3$  mg de betanina/100 ml de extrato), ao longo de uma semana de armazenamento

Em extratos com alta concentração inicial de betalaínas (Figura 5.15), a preparação e manipulação das amostras causaram degradação dos pigmentos em todos os tratamentos estudados, semelhante ao que ocorreu com as amostras com baixa concentração inicial de betalaínas. Novamente, a amostra controle apresentou concentração de betalaínas superior à das amostras tratadas no 1º dia. No entanto, apesar da degradação do pigmento causada pelo tratamento HTST, a amostra tratada durante 120 s e 85,7 °C mostrou uma estabilidade melhorada. A concentração de betalaínas da amostra tratada (120 s) não mostrou diferença significativa em relação ao controle, após 4 dias de armazenamento.

A alta concentração de betalaínas da amostra tratada (120 s) no segundo dia de armazenamento pode estar relacionada a um evento conhecido como regeneração de betalaínas. Este fenômeno ocorre quando as betalaínas são tratadas termicamente. Huang e von Elbe (1985) explicam que, após o aquecimento, a betanina em solução é hidrolisada em ácido betalâmico e

ciclodopa-5-O-glicosídeo (Damodaran *et al.*, 2008). No entanto, esta reação pode ser reversível, provocando a regeneração da betanina. A regeneração ocorre com uma condensação de base de Schiff entre a amina nucleofílica do ciclodopa-5-O-glicosídeo e o grupo aldeído do ácido betalâmico (Damodaran *et al.*, 2008) e está apresentada, em um esquema simplificado, na Figura 5.16.



Fonte: adaptado de Huang e von Elbe (1985).

Figura 5.16 – Esquema simplificado da reação de hidrólise e regeneração de betanina

Huang e von Elbe (1985) observaram que as amostras tratadas com alta temperatura apresentaram maior percentagem de regeneração de betanina, principalmente quando foram imediata e rapidamente resfriadas após o tratamento térmico. Eles também mencionaram que a energia de ativação ( $E_a$ ) da reação de degeneração da betanina é relativamente alta (17,3 kCal), enquanto a regeneração tem um baixo valor  $E_a$  de 0,64 kCal. Isto explica ainda a baixa dependência da temperatura da reação de regeneração que auxiliou na retenção de betanina quando a mistura reacional foi resfriada rapidamente.

A regeneração de betalaínas em suco de beterraba tratado termicamente também foi observado no estudo realizado por Mereddy *et al.* (2017). Os autores observaram esse evento nas amostras tratadas termicamente, mas a regeneração ocorreu em maior quantidade quando o suco tratado foi mantido sob refrigeração após o tratamento, aumentando a regeneração de pigmentos de 3% (resfriamento até 25 °C) para 10% (resfriamento até 4 °C), estando de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho. Além disto, Mereddy *et al.* (2017) observaram que o suco tratado termicamente apresentou maior estabilidade que o suco cru ao longo de todo o armazenamento, confirmando a

contribuição do tratamento térmico na estabilidade das betalaínas presentes na beterraba vermelha.

Como resultado, a combinação de tempo e temperatura de tratamento (120 s/85,7 °C), juntamente com o resfriamento rápido do extrato, provavelmente permitiu a regeneração de uma quantidade maior de betanina, em comparação com as outras condições de tratamento. Este aumento na estabilidade foi observado a partir do segundo dia e também foi confirmado pelos valores da DR das betalaínas. Após uma semana de armazenamento (8 dias), a DR da amostra controle foi de 1,2 mg de betanina/100 ml de extrato por dia, enquanto a DR da amostra tratada (120 s) foi de 0,4 mg de betanina/100 ml de extrato por dia. Além disso, a concentração de betalaínas do controle no 4º dia não apresentou diferença significativa com a concentração da amostra tratada (120 s) no 8º dia. Diferentemente, as amostras tratadas por 80 e 100 segundos foram mais instáveis do que o controle, uma vez que as DR foram de 1,5 e 1,4 mg de betanina/100 ml de extrato por dia, respectivamente.

Adicionalmente, o tratamento térmico de HTST foi eficaz na redução da atividade de POD de todas as amostras tratadas (baixa e alta concentração de betalaínas), conforme resultados apresentados na Tabela 5.6.

Tabela 5.6 - Atividade residual (RA%) de POD nas amostras tratadas por tratamento térmico HTST com baixa e alta concentração inicial de betalaínas

Concentração Inicial de Betalaínas	RA (%) de POD		
	80 s/75,7 °C	100 s/81,1 °C	120 s/85,7 °C
Baixa (12,2 ± 0,1 mg de betanina/100 ml de extrato)	20,1	1,2	0,7
Alta (17,3 ± 0,3 mg de betanina/100 ml de extrato)	5,9	1,4	0,9

A POD é um dos elementos responsáveis pela degradação das betalaínas, mas a estabilidade destes pigmentos depende de muitos outros fatores, tais como pH, temperatura, outras enzimas, teor de água, entre outros (Manchali *et al.*, 2013, Dambach *et al.*, 2008; Herbach *et al.*, 2006).

Os resultados para a amostra com baixa concentração inicial de betalaínas mostram que a atividade de POD foi reduzida em mais de 99% quando tratada por 120 s, mas ainda insuficiente para manter o extrato estável. Contudo, nas amostras com concentração elevada de betalaínas, a redução

significativa da atividade de POD pode ter evitado a degradação do pigmento pela enzima, o que contribui para a estabilidade do extrato.

Devido ao baixo número de estudos sobre os talos de beterraba vermelha, a literatura não apresenta qualquer discussão relacionada ao comportamento dos compostos presentes no extrato quando submetidos a diferentes tratamentos. No entanto, a diferença na estabilidade pode ser porque, em concentrações elevadas, as soluções têm menos mobilidade dos componentes do alimento do que em soluções de baixa concentração, desfavorecendo a solubilidade do oxigênio/oxidação e, conseqüentemente, aumentando a estabilidade das betalaínas (Stintzing e Carle, 2008a).

#### **5.4. Clarificação e Estabilização: microfiltração e ultrafiltração**

Nesta seção estão apresentados os resultados do estudo da aplicação dos PSM para a clarificação do extrato de talos de beterraba vermelha. Inicialmente estão apresentados os testes preliminares, que possibilitaram delinear as condições em que a MF e a UF foram aplicadas. Em seguida estão apresentados os resultados da MF, em modo batelada, seguida pela UF. Posteriormente, os resultados da aplicação da MF em modo DF também estão apresentados. Em seguida, estão apresentados os resultados das análises físico-químicas, de cor e atividade de POD, além da verificação da estabilidade das betalaínas, com o intuito de verificar os efeitos da clarificação nos extratos. Por fim, um balanço de massa para as etapas do processo, considerando a massa de beterrabas inicial, as perdas e o extrato clarificado. Este balanço final permite avaliar o efeito do modo DF na MF, bem como identificar a abrangência e as limitações do processamento.

##### **5.4.1. Testes preliminares**

Neste item estão apresentados os resultados obtidos para os experimentos preliminares de MF e UF do extrato obtido dos talos de beterraba por esmagamento, para determinação do tempo de compactação da membrana e da pressão crítica de operação. Também estão apresentados os procedimentos de padronização da solução de alimentação e de avaliação da degradação das betalaínas com o tempo de experimento.

#### 5.4.1.1. Compactação das membranas

Com o intuito de distinguir os efeitos que causam diminuição do fluxo permeado durante os experimentos de MF e UF é necessário realizar a compactação das membranas, a qual deve ser realizada com água destilada em pressões superiores à pressão de operação. Neste estudo utilizou-se a pressão de 1 bar para a membrana de MF e de 2 bar para a membrana de UF, as quais foram escolhidas com base em ensaios preliminares. Na Figura 5.17 está apresentado o comportamento do fluxo permeado de água destilada para cada membrana durante os experimentos de compactação.

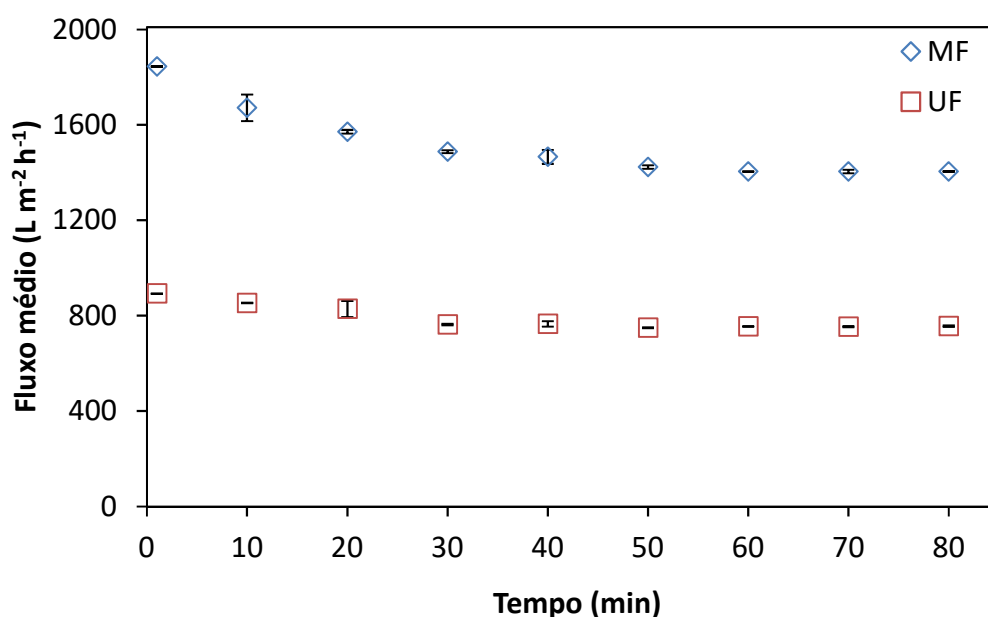


Figura 5.17 – Fluxo permeado médio em função do tempo durante os ensaios de compactação para as membranas de MF utilizando pressão de 1 bar e de UF utilizando pressão de 2 bar. Os experimentos foram realizados na temperatura de 15 °C.

Com estes resultados, foi observado que o fluxo permeado permanece aproximadamente constante após 50 min de compactação para ambas as membranas. Para garantir a compactação das membranas (e assim minimizar o efeito deste fator nos resultados) e considerando o resultado deste experimento, estabeleceu-se que 60 min é um tempo suficiente para compactação das membranas antes dos experimentos.

#### 5.4.1.2. Determinação da pressão de operação

Para a determinação da pressão crítica de operação foi utilizado um extrato com concentração de 10,5 mg de betanina/100 ml de extrato para a membrana de MF. O permeado obtido no processo de MF foi utilizado como alimentação para o processo de UF e apresentava uma concentração de 7 mg/100 ml de extrato. As pressões de operação para as membranas de MF e UF foram determinadas com a avaliação da estabilidade do fluxo permeado. Para a membrana de MF utilizaram-se as pressões de 0,25, 0,5, 0,75 e 1 bar e, para a membrana de UF, as pressões de 0,5, 0,75, 1,0 e 1,25 bar. Os resultados obtidos nestes experimentos estão apresentados na Figura 5.18.

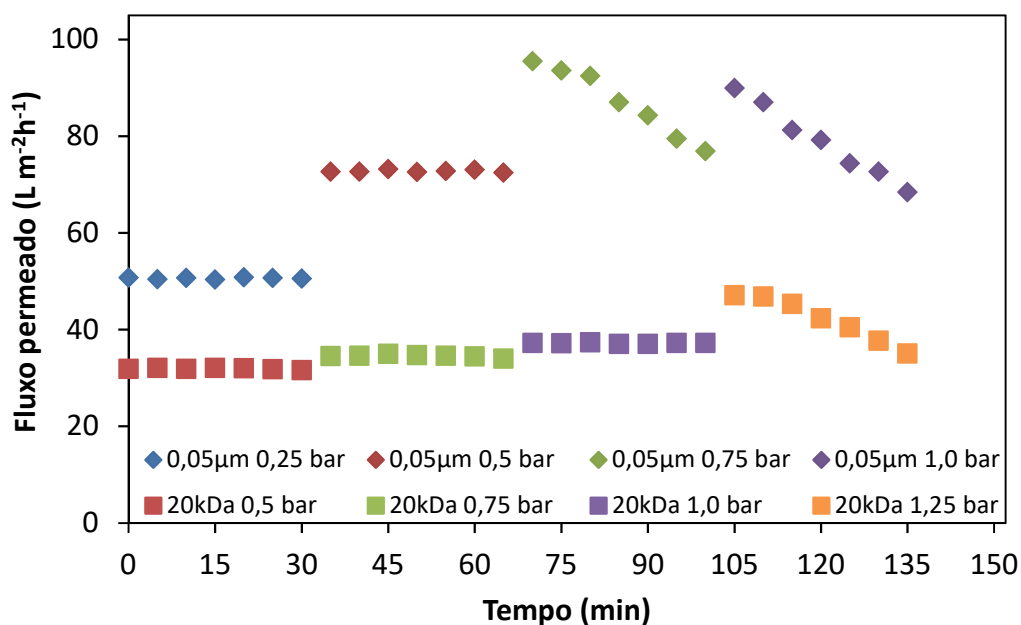


Figura 5.18 – Fluxo de permeado em função da pressão transmembrana para intervalos de tempo de 30 min, para as membranas de MF e de UF. Condições de operação: 10 °C e 0,3 m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup>

No processo de MF, foi observada queda no fluxo permeado a partir da pressão de operação de 0,75 bar. No processo de UF, por sua vez, a redução no fluxo permeado ocorreu quando o sistema operava na pressão de 1,25 bar. Para as pressões de 0,25 e 0,5 bar o fluxo permeado permaneceu constante durante os 30 min de experimento para o processo de MF e, para o processo de UF, isto ocorreu para as pressões de 0,5, 0,75 e 1,0 bar.

Com base nos resultados destes experimentos, as pressões de operação estabelecidas para os processos de MF e de UF foram 0,5 bar e 1,0 bar, respectivamente. Quando o sistema operou nestas condições, o fluxo permeado se manteve constante e foi maior quando comparado a pressões mais baixas.

A concentração da alimentação tem influência direta no comportamento do fluxo permeado e no valor da pressão crítica de operação, desta forma, se a concentração inicial for diferente da utilizada nesta etapa será necessário refazer este experimento para encontrar as novas pressões críticas de operação.

#### **5.4.1.3. Padronização da solução de alimentação**

Visando minimizar as variações na etapa de clarificação utilizando o processo de MF seguido da UF, foram realizados experimentos com extratos em diferentes concentrações de betalaínas como solução de alimentação do processo de MF: solução 1 (Sol I), com 11 mg de betanina/100 ml de extrato (cuja concentração foi obtida naturalmente, sem diluição), solução 2 (Sol II), com 23 mg de betanina/100 ml de extrato (cuja concentração foi obtida naturalmente, sem diluição) e solução 3 (Sol III), com 11 mg de betanina/100 ml de extrato (cuja concentração foi obtida por meio de diluição com água destilada). Lembrando que o processo ocorreu no modo batelada alimentada, com volume inicial de alimentação de 2 L e com a troca da alimentação depois de 2 h de filtração e o processo de MF prosseguiu por mais duas horas, totalizando 4 L de solução de alimentação utilizada e 4 h de experimento.

Na Figura 5.19 está apresentado o comportamento do fluxo permeado ao longo do processo de MF para estas três soluções de alimentação testadas; na Tabela 5.7 estão apresentadas as concentrações iniciais e finais dos extratos utilizados, bem como a concentração e o volume do permeado obtido no processo, que foi utilizado, posteriormente, como alimentação na etapa de UF.



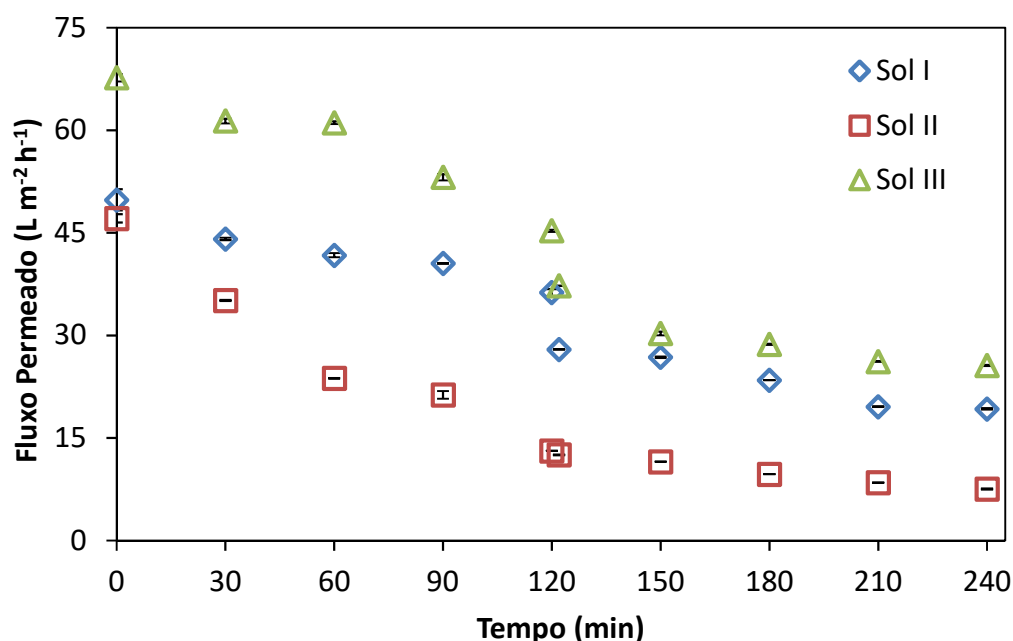


Figura 5.19 – Fluxo permeado em função do tempo de experimento (4 h) para o processo de MF para três soluções de alimentação diferentes: Sol I com 11 mg de betanina/100 ml de extrato (original), Sol II com 23 mg de betanina/100 ml de extrato (original) e Sol III com 11 mg de betanina/100 ml de extrato (diluído).

Condições de operação: 0,5 bar, 10 °C e 0,3 m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup>

Tabela 5.7 – Concentrações de betalaínas da alimentação inicial, alimentação final, permeado e volumes de permeado obtidos na MF para três diferentes soluções de alimentação

Amostra	Concentração alimentação inicial (mg de bet/ 100 ml de ext.)	Concentração alimentação final (mg de bet/ 100 ml de ext.)	Concentração do permeado (mg de bet/100 ml de ext.)	Volume de permeado (ml)
Sol I 11 mg bet/100 ml ext. - natural	10,9 ± 0,1 <sup>d</sup>	10,8 ± 0,1 <sup>d</sup>	6,5 ± 0,1 <sup>f</sup>	550
Sol II 23 mg bet/100 ml ext. - natural	22,9 ± 0,7 <sup>a</sup>	21,8 ± 0,1 <sup>b</sup>	18,5 ± 0,01 <sup>c</sup>	300
Sol III 11 mg bet/100 ml ext. - diluído	11,0 ± 0,3 <sup>d</sup>	11,0 ± 0,1 <sup>d</sup>	8,3 ± 0,1 <sup>e</sup>	700

Os resultados seguidos por diferentes letras indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste Tukey.

A análise dos resultados apresentados na Figura 5.19, mostra que os experimentos realizados com a Sol III (11 mg de betanina/100ml de extrato com diluição) apresentaram os maiores valores de fluxo permeado durante todo o

processo de MF, seguido pela Sol I (11mg de betanina/100 ml de extrato original); os experimentos realizados com a Sol II (23 mg de betanina/100 ml de extrato, original) apresentaram os menores valores de fluxo permeado. Estes resultados estão de acordo com o esperado, uma vez que, quanto mais concentrada uma solução, maiores são os efeitos dos fenômenos de polarização por concentração e *fouling* na membrana.

Quando a Sol III foi utilizada como alimentação, foram obtidos os maiores valores de fluxo permeado durante todo o tempo de experimento. Esta diferença do fluxo ocorreu, pois, o extrato original não contém apenas betalaínas em sua composição, mas, também, outros componentes naturais. Quando ocorre a diluição do extrato, a concentração de todos os componentes diminui e as características da alimentação como a massa específica e a viscosidade são modificadas.

Com auxílio da Tabela 5.7, foi observado que não houve diferença significativa entre a concentração inicial e final para os experimentos realizados com a solução Sol I. Contudo, ocorreu degradação das betalaínas durante o processo realizado com a solução Sol II. Considerando apenas a concentração de betalaínas, este fato não era esperado, uma vez que foi realizada uma troca de alimentação depois de 2 h de MF, o processo ocorreu em temperatura de 10 °C, protegido da luz e sabendo que soluções mais diluídas sofrem maior degradação do que soluções mais concentradas. Uma possível explicação para este resultado é que durante o PSM, a solução de alimentação é concentrada (devido à retirada do permeado), principalmente nos componentes que são retidos, aumentando, portanto, a quantidade de enzimas na alimentação e, por consequência, a degradação do pigmento. Além disso, durante o processo de filtração a solução de alimentação sofre a ação de forças cisalhantes que podem causar degradação das betalaínas. Apesar de estatisticamente significativa, a degradação das betalaínas que ocorreu na alimentação Sol II foi baixa (em torno de 5%).

No estudo sobre recuperação de polifenóis de efluentes de vinícolas desenvolvido por Giacobbo *et al.* (2015), foi observado que a recuperação de polifenóis por MF foi maior para correntes de alimentação mais diluídas. Os

autores relacionam o aumento da recuperação de polifenóis no permeado com o aumento da solubilidade dos polifenóis no efluente utilizado como alimentação.

Resultados semelhantes foram obtidos neste trabalho, relacionando a concentração de betalaínas e o volume permeado, as amostras Sol I, Sol II e Sol III permearam, respectivamente 35,8, 55,5 e 58,1 mg de betalaínas. A primeira amostra (Sol I) permeou uma quantidade menor de pigmentos devido a combinação de uma baixa concentração de betalaínas na solução de alimentação e um baixo volume permeado. As amostras Sol II e Sol III recuperaram quantidades próximas de pigmento. Entretanto, a Sol II teve maior rendimento em função da diluição da solução de alimentação, o que minimiza os fenômenos de camada limite e, desta forma, permite que as betalaínas permeiem mais facilmente através da membrana.

Tendo em vista os resultados obtidos, foi estabelecido que a concentração de alimentação para a etapa de MF no processo de clarificação do extrato deve estar entre 10 – 11 mg de betanina/100 ml de extrato, sendo esta, também, a menor concentração encontrada para todos os extratos originais analisados, que variou entre 10 e 36 mg de betanina/100 ml de extrato.

Quando é realizada a diluição do extrato além de ocorrer um aumento da quantidade de betalaínas recuperada, se observa, também, um melhor aproveitamento dos talos para se obter o mesmo volume de alimentação. Por exemplo, para se obter 4 L de extrato com concentração de 23 mg de betanina/100 ml extrato foram necessários 7400 g de talos de beterraba, com rendimento de 55,5 mg de betanina no permeado (300 ml). Se este extrato fosse diluído, seriam necessários 1,92 L de extrato original e 3550 g de talos seriam suficientes, proporcionando uma redução de 52% em massa de talos e, como consequência, um melhor aproveitamento de talos.

#### **5.4.1.4. Tempo de processo *versus* degradação de betalaínas**

Experimentos de MF foram realizados para avaliar a degradação das betalaínas presentes nas correntes de alimentação e de permeado. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.8.

Nesta etapa, foram realizados 2 experimentos com duração de 6 h, sendo que, no primeiro, houve troca de alimentação a cada 3 h, com volumes iguais de

2 L e, no segundo, procedeu-se à troca de alimentação a cada 2 h, com volumes iguais de 2 L. No terceiro experimento, com duração de 4 h, fez-se a troca de alimentação a cada 2 h, com volumes iguais de 2 L.

Tabela 5.8 – Concentrações de betalaínas normalizadas em relação à concentração inicial para as alimentações iniciais, alimentações submetidas à MF batelada e as concentrações dos seus respectivos permeados

Amostra	Concentração de betalaínas/concentração inicial de betalaínas (mg de betanina/mg inicial de betanina)		
	6h - 2 alim. de 3 h	6h - 3 alim. de 2 h	4h - 2 alim. de 2 h
Alim. Inicial 1	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01
Alim. Final 1	0,98 ± 0,1	1,00 ± 0,05	0,95 ± 0,01
Alim. Inicial 2	0,99 ± 0,02	0,97 ± 0,04	1,00 ± 0,01
Alim. Final 2	0,98 ± 0,05	0,98 ± 0,01	0,97 ± 0,02
Alim. Inicial 3		1,00 ± 0,02	
Alim. Final 3		0,99 ± 0,01	
Permeado após 30 min	1,00 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,00 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,00 ± 0,04 <sup>a</sup>
Permeado Final	0,91 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,89 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,93 ± 0,01 <sup>b</sup>

Os resultados seguidos por diferentes letras indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste Tukey.

Pela análise dos resultados apresentados na Tabela 5.8, observa-se que não houve diferença significativa entre a concentração inicial e final de betalaínas para todas as alimentações durante o processo de MF, isto é, nas condições em que os experimentos foram realizados, foi possível minimizar a degradação das betalaínas presente no extrato dos talos de beterraba. Entretanto, houve degradação das betalaínas no permeado final quando este foi comparado a uma amostra retirada depois de 30 min, para três combinações de processamento testadas. No entanto, não houve diferença significativa entre as degradações de betalaínas para as diferentes combinações de processamento.

Entretanto, no que se refere ao volume de permeado recolhido as diferenças são mais expressivas. Para a primeira combinação, obteve-se um volume de permeado de 700 ml; para a segunda combinação 770 ml, e, no experimento que utilizou apenas 2 alimentações, trocando a cada 2 horas, foram permeados 650 ml. Ressalta-se que a fim de selecionar a melhor combinação, outros fatores devem ser considerados, como por exemplo, a quantidade de talos utilizados e o volume necessário de permeado para a etapa de UF.

Desta forma, como o volume obtido na combinação 3 é suficiente para o experimento de UF, o tempo de experimento é menor e são utilizados menos talos de beterraba, esta foi a combinação escolhida para a realização dos experimentos de clarificação do extrato obtido a partir do esmagamento dos talos de beterraba.

#### **5.4.1.5. Comparação do comportamento do fluxo permeado de MF batelada e MF/DF**

A aplicação de MF operando em modo DF foi considerada uma alternativa para melhorar o aproveitamento do extrato de talos de beterraba vermelha, uma vez que foi observada a necessidade da troca da alimentação durante a MF batelada. Contudo, foi necessário encontrar uma condição que contrabalançasse o provável aumento do fluxo permeado, a diminuição da concentração de betalaínas do permeado e o aumento do volume permeado.

Como, neste trabalho, a MF é um processo que precede a UF, a utilização de apenas 2 L de alimentação reduziria muito a quantidade de extrato permeado. Com um volume baixo de permeado, não seria possível a aplicação da UF. Logo, foi aumentado o volume da solução de alimentação inicial de 2 L para 3 L. Esse aumento permite reduzir a concentração de compostos com alta massa molar, mantendo o volume de extrato inferior ao utilizado na alimentação do processo de MF modo batelada (4 L).

A fim de avaliar a influência dessa modificação no tratamento do extrato, foi comparado o comportamento do fluxo permeado na MF batelada, com duas alimentações de 2 L (totalizando 4 L e com a troca de alimentação com 120 min) com o fluxo no processo de MF/DF. Na Figura 5.20 estão apresentados os fluxos permeados do extrato de talos de beterraba vermelha durante o processo de MF nos modos batelada e DF.

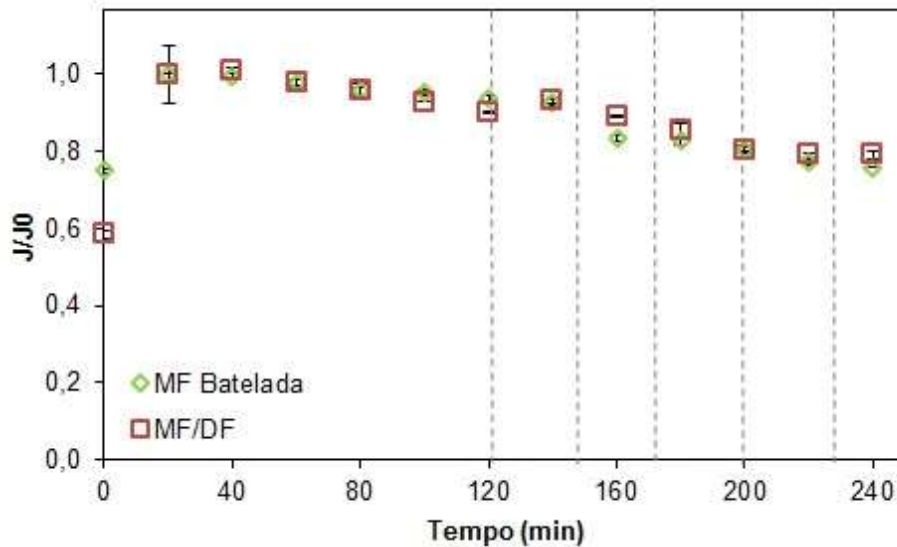


Figura 5.20 – Fluxo permeado normalizado ao longo do tempo, durante os experimentos de MF batelada e MF/DF para o extrato dos talos de beterraba. Linhas tracejadas (----) indicam o tempo em que foram feitas DFs. Condições de operação: pressão de 0,5 bar, temperatura de 10 °C e vazão de alimentação de 0,3 m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup>

De acordo com os resultados apresentados na Figura 5.20, observa-se que o fluxo permeado, em ambos os processos (MF batelada e MF/DF), apresentou comportamento semelhante. Vale ressaltar que no processo MF/DF foi utilizado um volume menor de extrato, desta forma é possível inferir que no modo DF não houve uma redução brusca no fluxo permeado.

O comportamento do fluxo permeado no processo de MF/DF foi considerado uma modificação positiva no processo. Contudo, é importante considerar o efeito de diluição da corrente de permeado que pode resultar em uma baixa concentração de betalaínas. Na Figura 5.21 estão apresentadas as concentrações de betalaínas obtidas para a corrente de permeado ao longo dos processos de MF batelada e MF/DF.

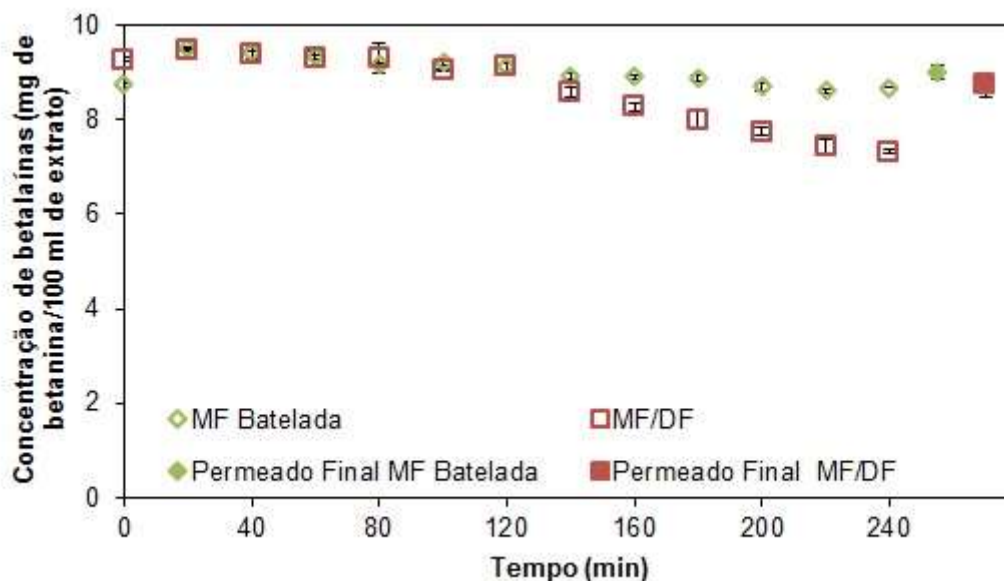


Figura 5.21 – Concentração de betalaínas do permeado obtido na MF bateada e na MF/DF, ao longo do processo. Condições de operação: pressão de 0,5 bar, temperatura de 10 °C e vazão de alimentação de 0,3 m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup>

A análise dos dados apresentados na Figura 5.21 demonstra que os permeados obtidos nos dois processos (MF batelada e MF/DF) apresentaram concentrações próximas a partir dos 20 min de operação, este comportamento se manteve até a operação atingir 140 min. Após este período, foi observado uma redução na concentração de betalaínas do permeado do processo de MF/DF. Essa redução ocorreu devido ao efeito de diluição da corrente de alimentação.

Entretanto, os permeados finais obtidos para os dois processos não apresentaram uma diferença relevante entre as suas concentrações de betalaínas. O processo MF batelada foi aplicado com uma alimentação de  $11,0 \pm 0,1$  mg de betanina/100 ml de extrato e proporcionou um permeado final com concentração de  $9,0 \pm 0,1$  mg de betanina/100 ml de extrato. No processo de MF/DF, por sua vez, foi aplicado com uma alimentação com concentração de  $10,7 \pm 0,1$  mg de betanina/100 ml de extrato e proporcionou um permeado final com concentração de  $8,7 \pm 0,2$  mg de betanina/100 ml de extrato. A redução na concentração da solução de alimentação com o modo DF não reduziu a

concentração do permeado final uma vez que o maior volume de permeado é recolhido na primeira metade do processo.

#### **5.4.2. Clarificação do extrato de beterraba vermelha utilizando MF em modo batelada seguida por ultrafiltração**

A partir dos resultados obtidos nos testes preliminares, as condições de operação para a clarificação do extrato utilizando processos combinados de MF e de UF estão descritas a seguir.

a) Microfiltração em modo batelada – concentração da alimentação entre  $10 \pm 1$  mg de betanina/100 ml de extrato; configuração de escoamento tangencial com vazão de alimentação de  $0,3 \text{ m}^3\text{h}^{-1}$ ; temperatura de operação de  $10 \text{ }^\circ\text{C}$ , pressão de operação de 0,5 bar; modo de operação batelada alimentada, experimento com duração de 4 h; com troca de alimentação a cada 2 h e volumes iguais de 2 L e aproximadamente 650 ml de permeado recolhido.

b) Ultrafiltração – solução de alimentação é o permeado obtido na etapa de MF com concentração entre  $6 \pm 1$  mg de betanina/100 ml de extrato, configuração de escoamento tangencial com vazão de alimentação de  $0,3 \text{ m}^3\text{h}^{-1}$ ; temperatura de operação de  $10 \text{ }^\circ\text{C}$ ; pressão de operação de 1 bar; modo de operação batelada; experimento com duração de 45 min e aproximadamente 200 ml de permeado recolhido.

Os resultados do comportamento do fluxo permeado, da degradação das betalainas ao longo do processo e da tendência ao *fouling* em cada membrana estão apresentados nesta seção.

##### **5.4.2.1. Microfiltração do extrato em modo batelada**

Inicialmente, foi avaliado o comportamento do fluxo permeado ao longo das 4 horas de MF em modo batelada; foram realizados dois experimentos e os resultados encontram-se apresentados na Figura 5.22. Para melhor comparação entre os dois experimentos, os fluxos foram normalizados.



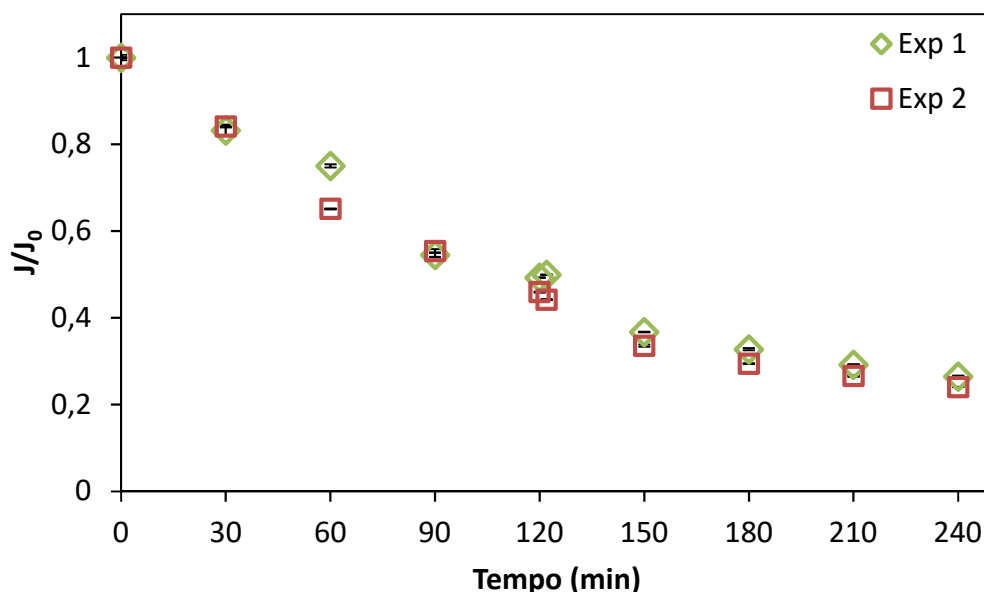


Figura 5.22 - Fluxo permeado normalizado ao longo do tempo, durante os experimentos de MF para o extrato dos talos de beterraba. Condições de operação: pressão de 0,5 bar, temperatura de 10 °C e vazão de alimentação de 0,3 m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup>

Conforme dados apresentados na Figura 5.22, observa-se que o comportamento do fluxo permeado para os dois experimentos foi semelhante, mesmo que cada experimento tenha sido realizado com um lote diferente de beterrabas, podendo ocorrer alterações na composição da alimentação. Medidas como a padronização da alimentação e a eficiência do procedimento de limpeza também são fatores que podem influenciar neste resultado.

Contudo, observa-se que houve uma grande redução do fluxo permeado, que, no final do experimento, era cerca de 25% do seu valor inicial. Este resultado indica que, mesmo operando abaixo da pressão crítica e utilizando um baixo fator de concentração volumétrico (FCV≈1,2), as baixas temperaturas e velocidades de escoamento são parâmetros que podem estar influenciando o decaimento do fluxo.

A tendência ao *fouling*, que representa as interações entre a solução de alimentação e a membrana e que depende das características da solução da alimentação e da membrana e das condições de operação, foi avaliada a partir de medidas de fluxo de água destilada em função da pressão antes e após cada

experimento de MF. Os resultados estão apresentados na Figura 5.23 e na Tabela 5.9.

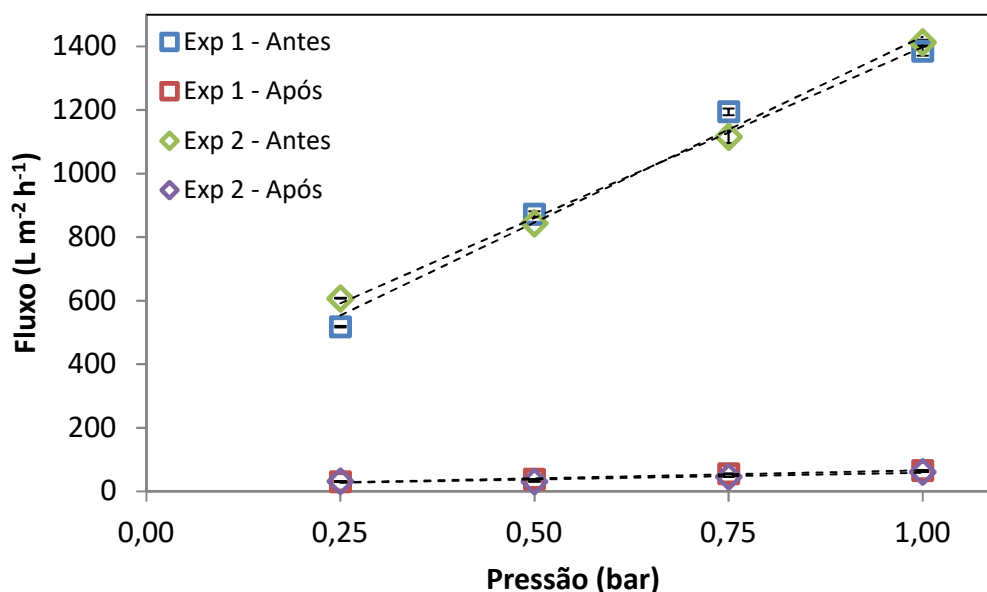


Figura 5.23 - Fluxo de permeado de água destilada em função da pressão antes e após os experimentos de MF do extrato.

Tabela 5.9 - Valores da permeância hidráulica antes e depois dos experimentos de MF e seus respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ )

Exp.	Permeância hidráulica antes (L m <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> bar <sup>-1</sup> )	Coefficiente de determinação ( $R^2$ )	Permeância hidráulica após (L m <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> bar <sup>-1</sup> )	Coefficiente de determinação ( $R^2$ )
1	1168,8	0,983	50,1	0,980
2	1074,8	0,997	41,9	0,879

A análise dos dados apresentados na Figura 5.23 e na Tabela 5.9 mostra que houve uma diminuição acentuada da permeância hidráulica, indicando uma elevada tendência ao *fouling* para este processo. Utilizando os coeficientes angulares dos ajustes lineares e por meio da Eq. 3.4, obteve-se uma tendência ao *fouling* de 95,7% para o Exp 1 e de 96,1% para o Exp 2.

Apesar do percentual do *fouling* ter sido bastante elevado, também pode ser observado, com o auxílio dos dados apresentados na Figura 5.21 que a limpeza da membrana foi eficiente, uma vez que foi possível recuperar o fluxo permeado inicial da membrana.

Durante os experimentos de MF, as concentrações de betalaínas nas correntes de concentrado e de permeado foram verificadas. As concentrações de betalaínas da corrente de retido foram normalizadas em função da concentração inicial de betalaínas ao longo do tempo durante a MF e estão apresentadas na Figura 5.24. Observa-se que a concentração se manteve praticamente constante e próxima da concentração inicial, indicando que as condições de operação são adequadas para este parâmetro.

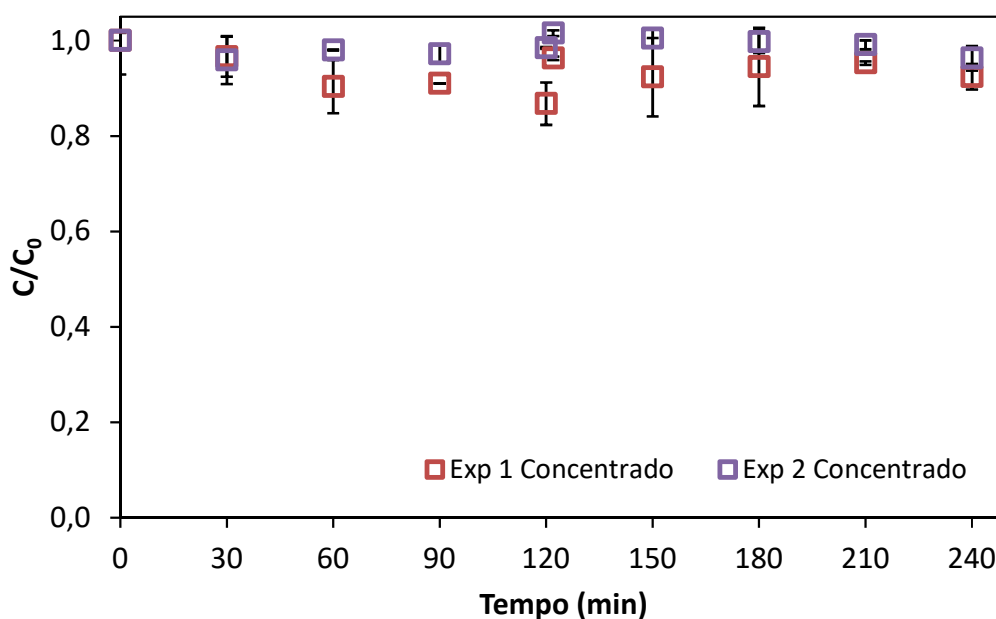


Figura 5.24 - Concentrações de betalaínas na corrente de retido normalizadas em relação à concentração inicial ao longo dos experimentos de MF

Na Tabela 5.10 estão apresentadas as concentrações de betalaínas no permeado ao longo do processo de MF. Para melhor comparação dos resultados obtidos em cada experimento, as concentrações foram normalizadas utilizando como concentração inicial a concentração do permeado determinada após 30 min de experimento.

Como pode ser observado a partir dos dados apresentados na Tabela 5.10, houve diminuição significativa do teor de betalaínas na corrente de permeado durante os experimentos de MF. A concentração de betalaínas no permeado do Exp. 1 diminuiu a partir de 150 min de processo, enquanto que no Exp 2, essa diminuição somente foi significativa com 240 min de MF. Uma possível explicação para este resultado pode ser a diferença de composição das

soluções de alimentação, uma vez que foram obtidas de lotes diferentes. Além disso, verificou-se uma concentração maior de enzimas na alimentação 1.

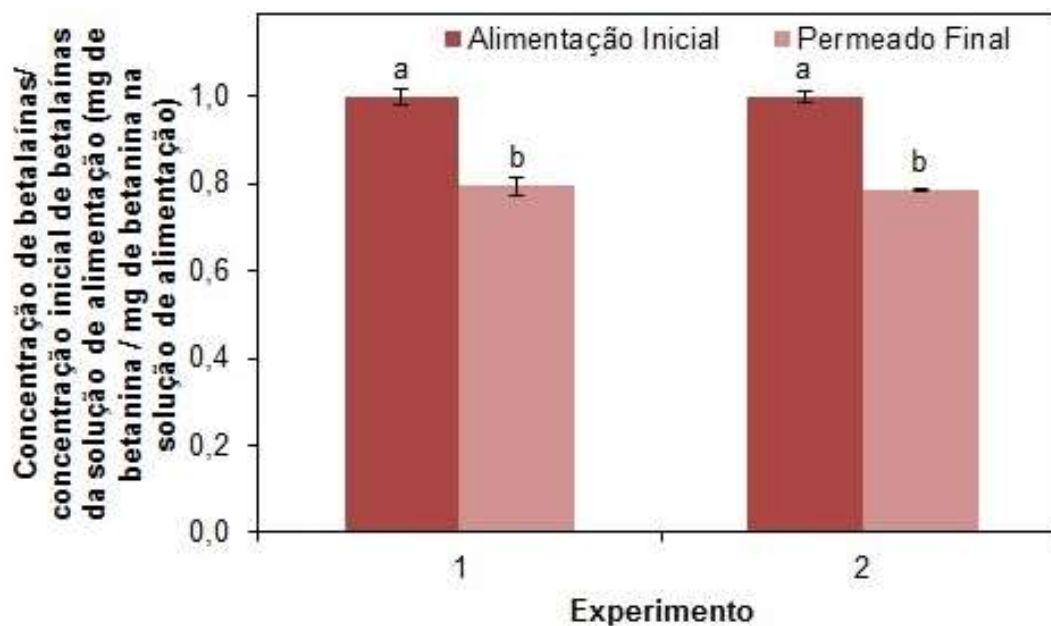
Tabela 5.10 – Concentrações de betalaínas no permeado normalizadas em relação à concentração após 30 min de experimento ao longo dos experimentos de MF em modo batelada

Tempo (min)	Concentração de betalaínas/concentração de betalaínas em 30 min de MF (mg de betanina/ mg de betanina em 30 min de MF)	
	Exp 1	Exp 2
30	1,00 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,00 ± 0,04 <sup>a</sup>
60	0,98 ± 0,02 <sup>ab</sup>	0,97 ± 0,01 <sup>ab</sup>
90	0,98 ± 0,02 <sup>ab</sup>	0,94 ± 0,02 <sup>abcd</sup>
120	0,96 ± 0,01 <sup>abc</sup>	0,91 ± 0,02 <sup>abcde</sup>
122	0,93 ± 0,03 <sup>abcd</sup>	0,96 ± 0,02 <sup>abc</sup>
150	0,87 ± 0,01 <sup>cde</sup>	0,93 ± 0,06 <sup>abcd</sup>
180	0,81 ± 0,01 <sup>e</sup>	0,93 ± 0,05 <sup>abcd</sup>
210	0,85 ± 0,01 <sup>de</sup>	0,90 ± 0,02 <sup>abcde</sup>
240	0,84 ± 0,01 <sup>de</sup>	0,89 ± 0,01 <sup>bcde</sup>

Os resultados seguidos por diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste Tukey.

A retenção observada média para as betalaínas pode ser calculada a partir da relação de concentrações das correntes de retido e de permeado. A  $R_{obs}$  média para o Exp 1 foi de 15% e para o Exp 2 de 19%.

Para melhor avaliar o processo de microfiltração como um todo, foram comparadas concentrações de betalaínas das alimentações iniciais de cada experimento com as concentrações do permeado recolhido. Os resultados estão apresentados na Figura 5.25.



Os resultados seguidos por diferentes letras indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste Tukey.

Figura 5.25 – Concentrações de betalaínas para a alimentação inicial e para o permeado obtido em cada experimento de MF

Como pode ser observado na Figura 5.25, para os dois experimentos foram obtidas concentrações de betalaínas para o permeado sem diferenças significativas entre si, indicando que os experimentos tiveram boa reprodutibilidade. As concentrações médias da alimentação e do permeado para o Exp 1 foram respectivamente iguais a  $10,2 \pm 0,2$  e  $8,1 \pm 0,2$  mg de betanina/100 ml de extrato e para o Exp 2 iguais a  $10,6 \pm 0,1$  e  $8,3 \pm 0,1$  mg de betanina/100 ml de extrato.

Os permeados obtidos em cada experimento de MF batelada foram armazenados sob refrigeração durante aproximadamente 15 h e então foram utilizados como solução de alimentação para a realização dos experimentos de UF.

#### 5.4.2.2. Ultrafiltração do extrato microfiltrado em modo batelada

Inicialmente, foi avaliado o comportamento do fluxo permeado ao longo de 45 min de UF, na pressão de 1,0 bar, temperatura de 10 °C e com vazão de

0,3 m<sup>3</sup>h<sup>-1</sup> e estes resultados estão apresentados na Figura 5.26. Observa-se que o comportamento do fluxo permeado nos dois experimentos também foi semelhante, contudo houve uma grande redução do fluxo permeado após 45 min de experimento; com uma redução de ≈ 60% do seu valor inicial.

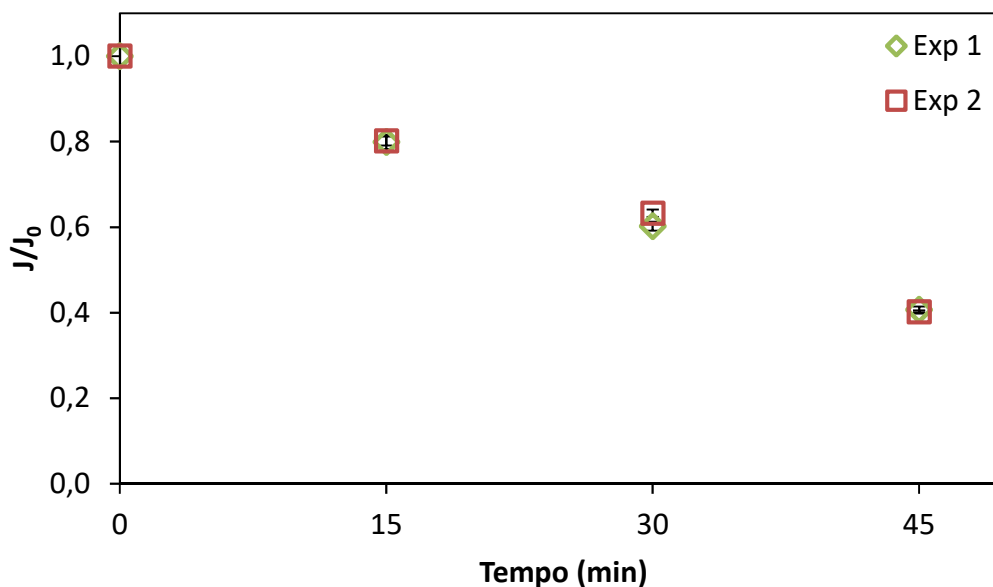


Figura 5.26 – Fluxo permeado normalizado ao longo do tempo, durante os experimentos de UF (permeado obtido na etapa de MF) para o extrato dos talos de beterraba. Condições de operação: pressão de 0,5 bar, temperatura de 10 °C e vazão de alimentação de 0,3 m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup>

No estudo sobre a UF do suco de romã, desenvolvido por Bagci (2014), foi observada uma redução de 90% no fluxo permeado; nesse estudo foi utilizada uma membrana de UF de Fluoreto de Polivinilideno (PVDF) com a massa molar de corte de 30 kDa. O processo foi realizado durante 180 min, com pressão de operação de 3 bar e taxa de alimentação de 700 Lh<sup>-1</sup>.

Assim como na MF, também foi observada a ocorrência dos fenômenos de *fouling* e polarização por concentração na membrana de UF. Para analisar a tendência ao *fouling* foram realizadas medidas de fluxo de água destilada em função da pressão antes e após cada experimento de UF. Os resultados estão apresentados na Figura 5.27.

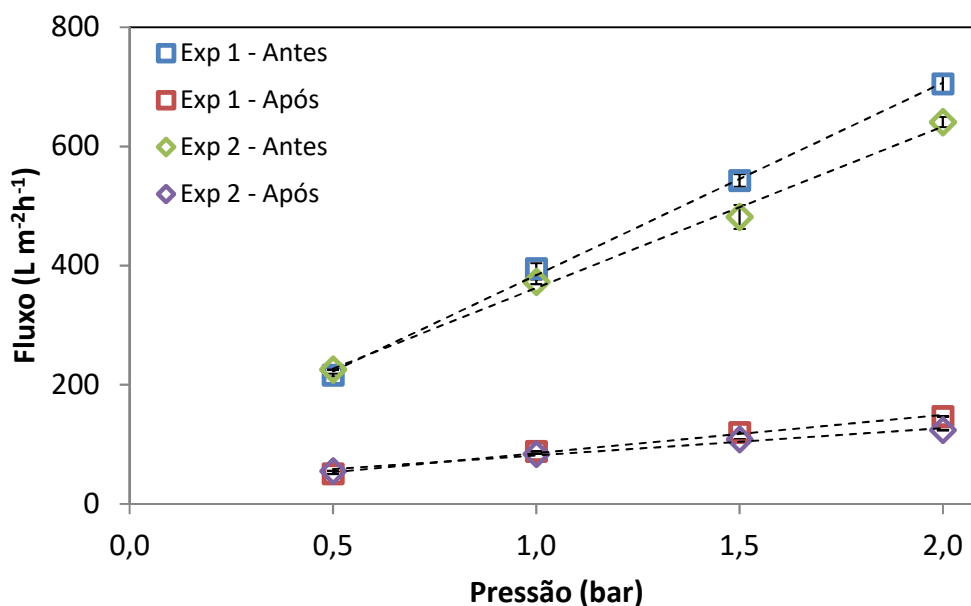


Figura 5.27 – Fluxo permeado de água destilada em função da pressão antes e após os experimentos de UF do permeado obtido na etapa de MF

Tabela 5.11 - Valores da permeância hidráulica antes e depois dos experimentos de UF e seus respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ )

Exp.	Permeância hidráulica antes (L m <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> bar <sup>-1</sup> )	Coefficiente de determinação ( $R^2$ )	Permeância hidráulica após (L m <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> bar <sup>-1</sup> )	Coefficiente de determinação ( $R^2$ )
1	322,9	0,999	64,2	0,994
2	271,0	0,995	45,9	0,984

Novamente observa-se uma elevada tendência ao *fouling*. Utilizando os coeficientes angulares dos ajustes lineares e por meio da Eq 3.4, foram obtidos 80,1% de tendência ao *fouling* para o Exp 1 e 83,1%, para o Exp 2. Os percentuais de *fouling* também foram altos na UF, porém menores do que obtidos na MF. Isso se deve às diferentes características das membranas e também à filtração prévia desta solução pela membrana de MF.

Durante a UF, a concentração de betalaínas no concentrado e no permeado foram verificadas. As concentrações do concentrado (normalizadas) ao longo da UF estão apresentadas na Figura 5.28.

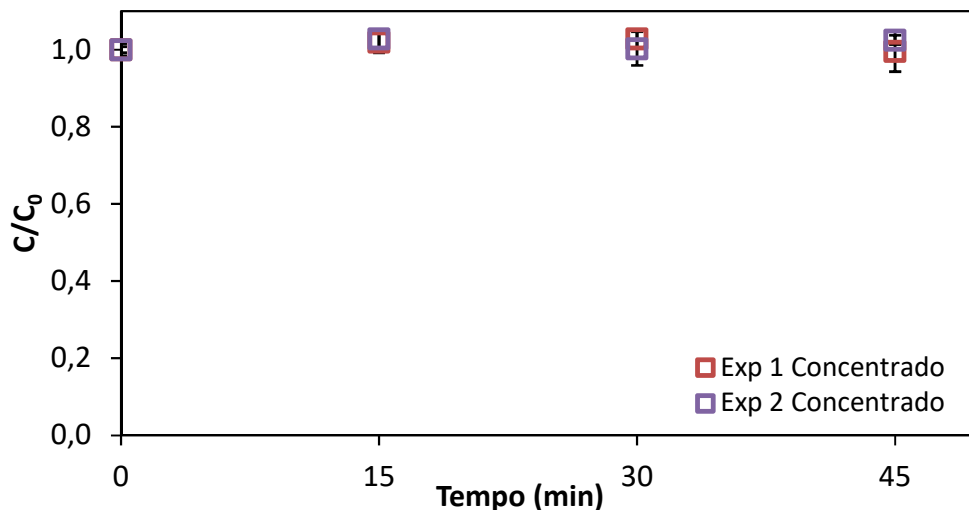


Figura 5.28 – Concentrações de betalaínas na corrente de retido normalizadas em relação à concentração inicial ao longo dos experimentos de UF

Assim como na MF em modo batelada, não houve diferença significativa entre as concentrações de betalaínas no retido ao longo do processo de UF.

Na Tabela 5.12 estão apresentadas as concentrações de betalaínas do permeado obtido ao longo do processo de UF. Para melhor comparar os experimentos, as concentrações foram normalizadas utilizando como concentração inicial a concentração do permeado após 15 min de experimento. Como pode ser observado a partir dos dados apresentados na Tabela 5.12 somente houve diminuição significativa do teor de betalaínas na corrente de permeado durante o Exp 2 de UF.

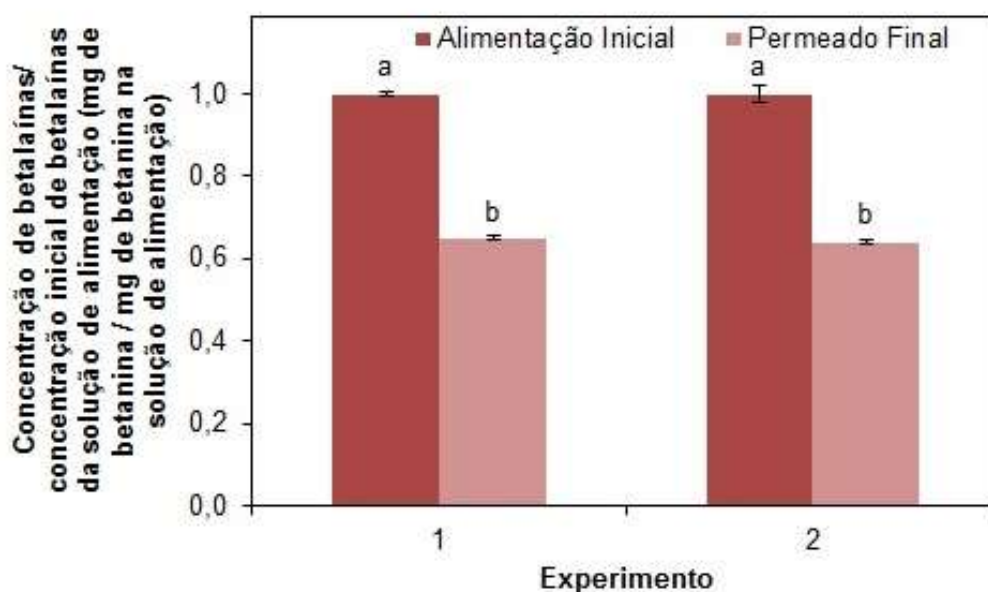


Tabela 5.12 – Concentrações de betalaínas normalizadas em relação à concentração de betalaínas após 15 min de filtração para o permeado obtido no processo de UF

Tempo (min)	Concentração de betalaínas/concentração de betalaínas em 15 min de UF (mg de betanina/ mg de betanina em 15 min de UF)	
	Exp 1	Exp 2
15	1,00 ± 0,01 <sup>ab</sup>	1,00 ± 0,02 <sup>ab</sup>
30	1,00 ± 0,01 <sup>ab</sup>	1,00 ± 0,01 <sup>a</sup>
45	1,01 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,95 ± 0,01 <sup>b</sup>

Os resultados seguidos por diferentes letras indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste Tukey.

Na Figura 5.29 estão apresentadas as concentrações de betalaínas normalizadas para a alimentação inicial e para o permeado obtido durante o processo de UF, para os dois experimentos realizados.



Os resultados seguidos por diferentes letras indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste Tukey.

Figura 5.29 – Concentrações de betalaínas normalizadas para a alimentação inicial e para o permeado obtido em cada experimento de UF

Pela análise dos resultados apresentados na Figura 5.29 observa-se que, assim como na MF, os experimentos tiveram boa reprodutibilidade, pois não há diferença significativa entre as concentrações normalizadas para os permeados. As concentrações das alimentações e dos permeados foram respectivamente:  $6,2 \pm 0,02$  e  $4,0 \pm 0,03$  mg de betanina/100 ml de extrato (Exp 1) e  $6,4 \pm 0,12$  e

4,1 ± 0,04 mg de betanina/100 ml de extrato (Exp 2). A  $R_{obs}$  média para o Exp 1 foi de 34% e para o Exp 2 de 36%.

Quando comparadas as concentrações de betalaínas dos permeados com aquelas das alimentações, observa-se que houve uma redução de aproximadamente 35% no teor de betalaínas, indicando uma perda significativa deste composto na solução de alimentação. Desta forma, percebe-se a necessidade de melhorias no processo para minimizar estas perdas.

#### **5.4.3. Clarificação do extrato de beterraba vermelha utilizando MF/DF seguida por UF**

Nesta seção estão apresentados os resultados obtidos com a aplicação de MF em modo DF do extrato de talos de beterraba vermelha, iniciando com os resultados da clarificação do extrato com a aplicação de MF/DF seguida de UF.

O experimento de clarificação do extrato de talos de beterraba vermelha por MF/DF, seguido por UF foi realizado em duplicata e os resultados estão apresentados com o número 1 para o primeiro experimento e o número 2 para o segundo experimento: MF/DF UF 1 e MF/DF UF 2.

Nesta etapa, optou-se por não apresentar apenas a média com desvio-padrão uma vez que os experimentos foram realizados com amostras de lotes diferentes e também porque a membrana apresentou incrustações irreversíveis e desgaste ao longo de todo o trabalho realizado.

##### **5.4.3.1. Microfiltração do extrato em modo diafiltração**

Inicialmente, foi avaliado o fluxo permeado durante o processo de MF/DF. O processo foi aplicado durante 4 h, na pressão de 0,5 bar e na temperatura de  $10 \pm 2$  °C. A primeira adição de água foi com 2 h de MF e foi realizada novamente a cada 100 ml de permeado recolhido. As concentrações de betalaínas das soluções de alimentação foram de  $9,0 \pm 0,1$  mg de betanina/100 ml de extrato para MF/DF1 e de  $8,8 \pm 0,03$  mg de betanina/100 ml de extrato para MF/DF 2.

Os resultados do comportamento do fluxo permeado normalizado para os dois experimentos estão apresentados na Figura 5.30.

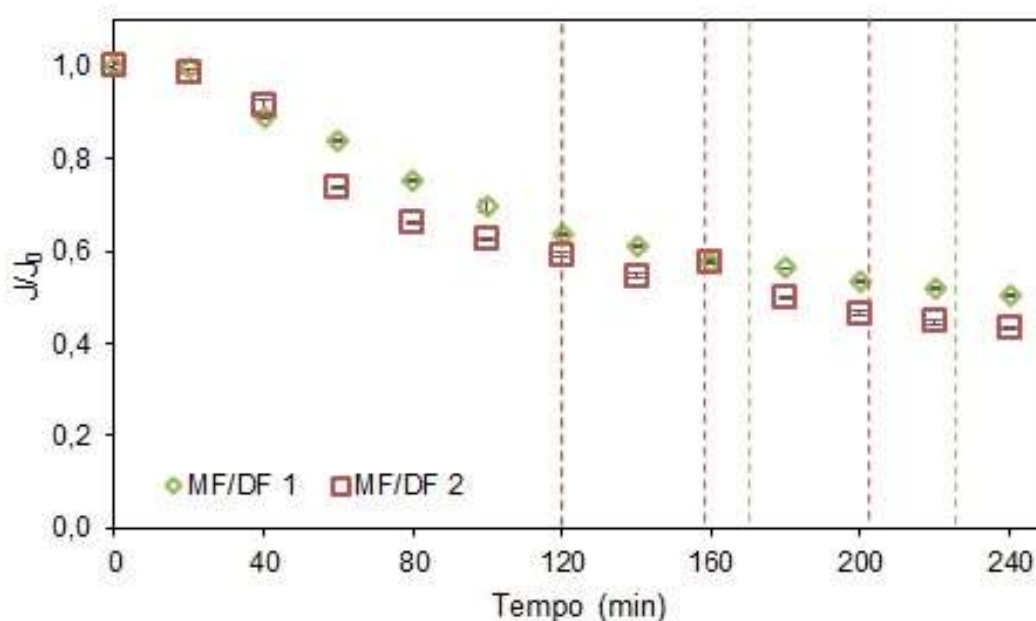


Figura 5.30- Fluxo permeado normalizado ao longo do tempo, durante os experimentos de MF/DF para o extrato dos talos de beterraba. Linhas tracejadas (----) indicam o tempo em que foram feitas DFs. Condições de operação: pressão de 0,5 bar, temperatura de 10 °C e vazão de alimentação de 0,3 m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup>

Foi observado que o fluxo permeado foi semelhante apenas nos 40 min iniciais do processo de MF. Após este tempo, o experimento MF/DF 2 apresentou fluxo permeado levemente menor que o MF/DF 1. Entretanto, o comportamento dos dois processos foi semelhante e, em ambos os casos, a aplicação de DF contribuiu para o aumento no fluxo permeado. Sendo assim, foi possível obter o volume de permeado necessário para realizar o processo de UF sem que fosse necessária a troca da alimentação na etapa de MF.

A diafiltração também foi importante no estudo realizado por Mereddy *et al.* (2017), em que concentraram betalaínas e removeram sais de um suco de beterraba previamente microfiltrado. Com a aplicação de 3 etapas de DF (a cada 15 L de permeado recolhido, 15 L de água foram adicionado à solução de alimentação), os autores conseguiram remover 96% dos sais e 47% dos sólidos

solúveis, mantendo 98% das betalaínas. Além disto, após as 3 diafiltrações, 95% dos nitratos também foram removidos.

De qualquer forma, foi observada uma redução no fluxo permeado ao longo do processo no presente trabalho, a qual está diretamente ligada ao fenômeno *fouling* que causa dificuldades na recuperação das características de fluxo e retenção da membrana. Esses fatores podem ser melhor entendidos pela análise dos resultados de fluxo permeado antes e após os experimentos, que estão apresentados na Figura 5.31 e na Tabela 5.13. Esses resultados estão diretamente relacionados com a tendência ao *fouling* das membranas utilizadas nos experimentos.

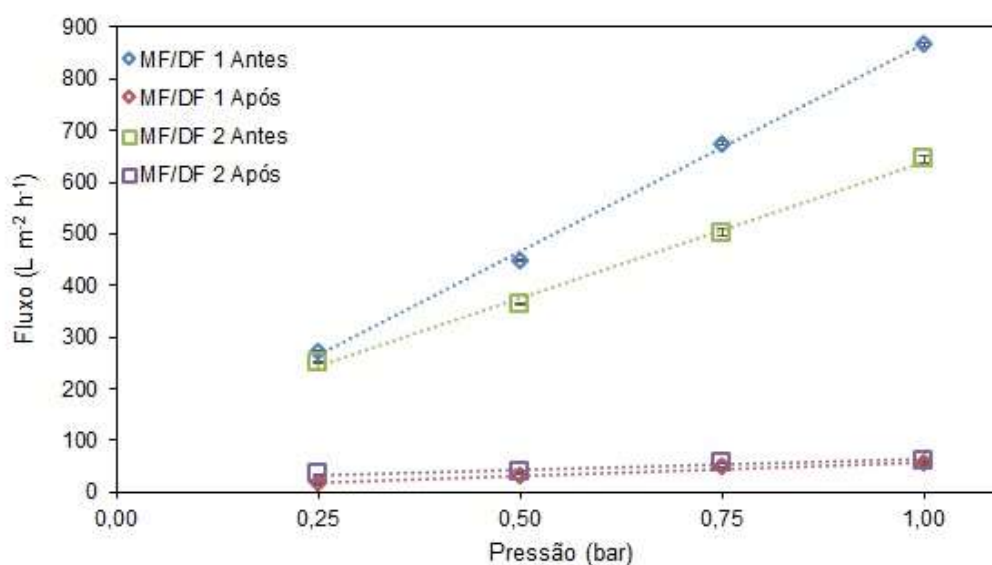


Figura 5.31 - Fluxo de permeado de água destilada em função da pressão antes e após os experimentos de MF/DF do extrato. Condições de operação: temperatura de 10 °C e vazão de alimentação de 0,3 m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup>

Tabela 5.13 - Valores da permeância hidráulica antes e após os experimentos de MF/DF e seus respectivos coeficientes de determinação (R<sup>2</sup>)

Exp.	Permeância hidráulica antes (L m <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> bar <sup>-1</sup> )	Coef. de determinação (R <sup>2</sup> )	Permeância hidráulica após (L m <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> bar <sup>-1</sup> )	Coef. de determinação (R <sup>2</sup> )
MF/DF 1	803,1	0,998	52,9	0,981
MF/DF 2	525,6	0,997	39,1	0,957

A partir desses resultados, observa-se que para os dois experimentos, houve elevada tendência ao *fouling* e que os percentuais foram superiores a 90%; no MF/DF1 foi de 93,4% e no MF/DF2 foi de 92,6%. Portanto, em relação

a este quesito (*fouling*) o comportamento da membrana foi similar e o teste apresentou boa reprodutibilidade.

Entretanto, em relação à seletividade observou-se um aumento na retenção para o segundo experimento. A  $R_{obs}$  média de betalaínas para a MF/DF1 foi de 8% e para a MF/DF2 foi de 25%. A diferença entre as retenções pode estar relacionada com a recuperação das características da membrana após a limpeza. Vale ressaltar que até esta etapa do estudo foi mantido o mesmo protocolo de limpeza dos testes de MF em modo batelada. Na Figura 5.31 é possível observar que após a limpeza não foi possível recuperar o fluxo inicial da membrana obtido antes do experimento MF/DF 1 e a permeância hidráulica foi reduzida de 53 para 39 L m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> bar<sup>-1</sup>. Desta forma, a membrana permaneceu com algum tipo de incrustação, o que pode comprometer a seletividade da mesma.

A manutenção das características da membrana é um fator importante quando se deseja reprodutibilidade. Com o intuito de recuperar a permeância hidráulica da membrana, outras condições de limpeza química e mecânica foram testadas. Foram aplicados outros ácidos, concentrações diferentes, aumento no tempo de limpeza química, aumento e redução de temperatura, aumento no tempo de ultrassom e aumento do tempo e da concentração da aplicação da solução de hipoclorito de sódio.

No entanto, todas as tentativas de limpeza não resultaram em um aumento na permeância hidráulica da membrana, caracterizando, neste ponto, um *fouling* irreversível. Apesar da diminuição da permeância hidráulica observa-se que os fluxos permeados da MF dos extratos foram muito similares, sendo possível obter o volume necessário para alimentar o processo de UF realizado na sequência.

Além do fluxo permeado, também foi observada a concentração de betalaínas presentes no permeado ao longo da MF/DF para os dois experimentos. As concentrações de betalaínas do permeado foram normalizadas em relação à concentração de betalaínas do permeado no início do processo MF/DF. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5.14.

Tabela 5.14 - Concentrações de betalaínas do permeado normalizadas em relação à concentração do permeado no início do processo MF/DF

Tempo (min)	Concentração de betalaínas/concentração de betalaínas no início de MF/DF (mg de betanina/mg de betanina em 0 min de MF/DF)	
	MF/DF 1	MF/DF 2
0	1,00 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,00 ± 0,01 <sup>a</sup>
20	1,00 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,99 ± 0,01 <sup>ab</sup>
40	0,98 ± 0,02 <sup>ab</sup>	0,95 ± 0,01 <sup>bc</sup>
60	0,96 ± 0,01 <sup>bc</sup>	0,93 ± 0,01 <sup>cd</sup>
80	0,94 ± 0,01 <sup>cd</sup>	0,84 ± 0,01 <sup>fg</sup>
100	0,94 ± 0,01 <sup>cd</sup>	0,82 ± 0,01 <sup>gh</sup>
120	0,90 ± 0,01 <sup>de</sup>	0,82 ± 0,01 <sup>ghi</sup>
140	0,88 ± 0,02 <sup>ef</sup>	0,78 ± 0,01 <sup>hijk</sup>
160	0,82 ± 0,01 <sup>gh</sup>	0,76 ± 0,01 <sup>jkl</sup>
180	0,79 ± 0,01 <sup>hij</sup>	0,73 ± 0,01 <sup>lm</sup>
200	0,80 ± 0,01 <sup>ghi</sup>	0,75 ± 0,01 <sup>klm</sup>
220	0,78 ± 0,01 <sup>ijk</sup>	0,71 ± 0,01 <sup>mn</sup>
240	0,73 ± 0,01 <sup>lm</sup>	0,68 ± 0,01 <sup>n</sup>

Os resultados seguidos por diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste Tukey.

Como pode ser observado, a partir dos dados apresentados na Tabela 5.14, houve diminuição significativa do teor de betalaínas na corrente de permeado ao longo dos experimentos de MF/DF. A concentração de betalaínas no permeado do MF/DF 1 apresentou diferença significativa a partir de 1 h de MF, enquanto no MF/DF 2, essa diminuição foi significativa com 40 min de MF. Conforme mencionado anteriormente, cada experimento foi realizado com extratos obtidos de diferentes lotes de beterrabas, a permeância hidráulica inicial para os dois experimentos foi diferente. Além disso, um fator muito importante que influencia a concentração de betalaínas no permeado é a retenção, que foi maior durante o experimento MF/DF 2 diminuindo, desta forma a passagem de betalaínas para a corrente de permeado.

A concentração de betalaínas no permeado do experimento MF/DF2 foi menor do que a do MF/DF1 após 80 min de MF. Novamente, além das diferenças intrínsecas nas características do extrato, a recuperação apenas parcial da

permeância hidráulica da membrana de MF pode ter afetado a seletividade da mesma.

Vale ressaltar que uma redução na concentração de pigmentos no permeado já era esperada após 2 h de processo, devido ao modo DF, que promove uma diluição da alimentação e, conseqüentemente, do permeado.

#### 5.4.3.2. Ultrafiltração do extrato microfiltrado em modo diafiltração

Assim como nos testes anteriores, a UF foi aplicada após a MF, utilizando o permeado desta como solução de alimentação. O fluxo permeado foi avaliado ao longo de 45 min de UF, na pressão de 1,0 bar, temperatura de 10 °C e com vazão de 0,3 m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup>. Os resultados de fluxo permeado ao longo dos experimentos de UF estão apresentados na Figura 5.32.

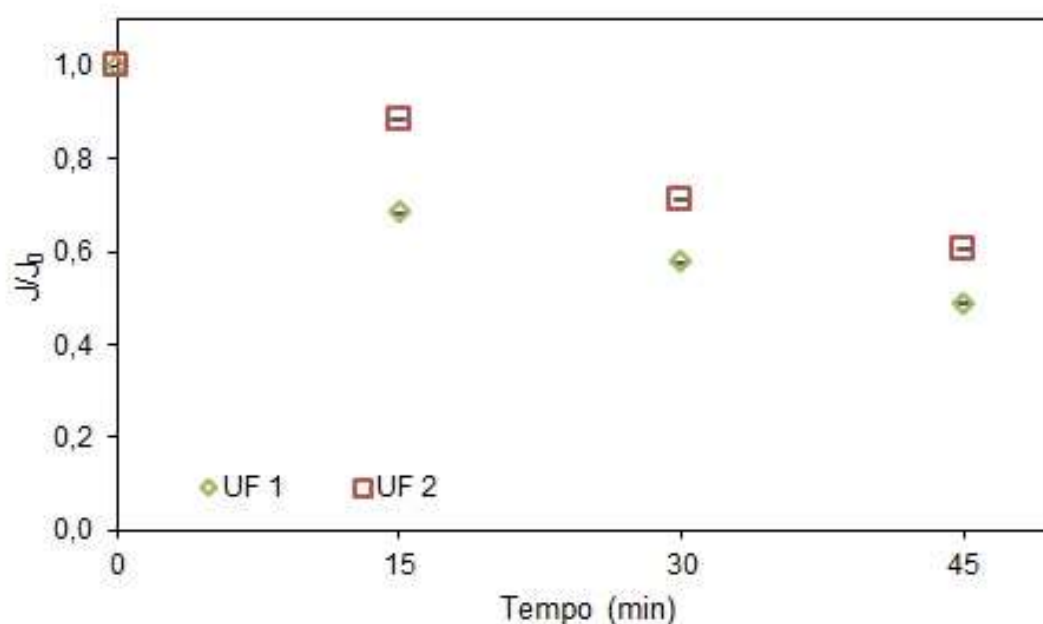


Figura 5.32 – Fluxo permeado normalizado ao longo do tempo, durante os experimentos de UF (permeado obtido na etapa de MF/DF) para o extrato dos talos de beterraba. Condições de operação: pressão de 0,5 bar, temperatura de 10 °C e vazão de alimentação de 0,3 m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup>

Com auxílio da Figura 5.32 pode ser observado que houve redução do fluxo permeado ao longo do tempo, para os dois experimentos. Ao final dos

experimentos, 45 min de processo, a redução do fluxo permeado foi de 51,1% para a UF 1 e 39,3% para a UF 2.

A UF 2 apresentou menor redução do fluxo ao longo do processo. Isto pode ter ocorrido devido às diferenças nas características da solução de alimentação: por exemplo, em relação à concentração de betalaínas, para o experimento UF 2 esta foi de  $5,5 \pm 0,05$  mg de betanina/100 ml de extrato, enquanto que para o experimento UF 1 foi de  $6,2 \pm 0,03$  mg de betanina/100 ml de extrato. A Figura 5.33 apresenta o comportamento do fluxo permeado de água destilada em diferentes pressões, antes e após a UF, auxiliando na determinação da tendência ao *fouling*, juntamente com os valores de permeância hidráulica apresentados na Tabela 5.15.

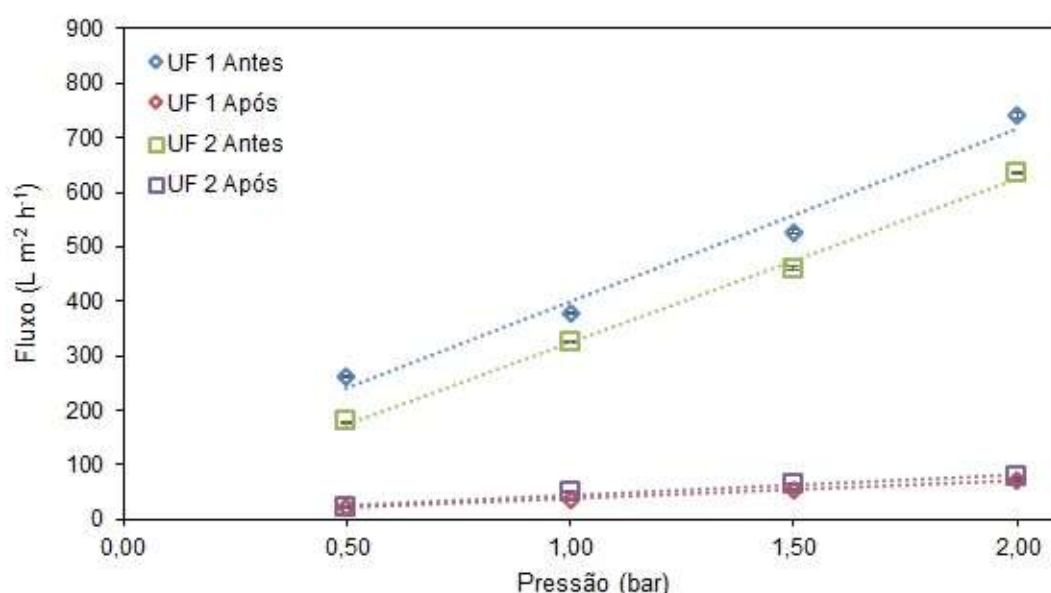


Figura 5.33 – Fluxo de permeado de água destilada em função da pressão antes e após os experimentos de UF do permeado obtido na etapa de MF/DF.

Condições de operação: temperatura de 10 °C e vazão de alimentação de  $0,3 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$

Tabela 5.15 - Valores da permeância hidráulica antes e após os experimentos de UF, precedidos pela MF/DF, e seus coeficientes de determinação ( $R^2$ )

Exp.	Permeância hidráulica antes (L m <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> bar <sup>-1</sup> )	Coef. de determinação ( $R^2$ )	Permeância hidráulica após (L m <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> bar <sup>-1</sup> )	Coef. de determinação ( $R^2$ )
UF 1	317,7	0,981	33,0	0,994
UF 2	300,2	0,997	36,0	0,966



Assim como nos testes de MF, nos experimentos de UF também foi observada uma elevada tendência ao *fouling*. Utilizando os coeficientes angulares dos ajustes lineares e por meio da Eq. 3.4, foram obtidos 89,6% de tendência ao *fouling* para o UF 1 e 88,0%, para o UF 2. Apesar destes serem inferiores aos verificados para a MF, os percentuais de *fouling* foram superiores aos observados nos testes em que a MF foi operada em modo batelada, que foram de 80,1% para o Exp 1 e 83,1% para o Exp 2. Este aumento na tendência ao *fouling* pode estar relacionado a vários fatores como: nas características naturais da matéria-prima e nas características intrínsecas das membranas que sofrem modificações ao longo do seu uso.

Novamente o protocolo de limpeza empregado não possibilitou a recuperação da membrana, uma vez que o fluxo permeado inicial ( $t = 0$  min) foi de  $80,7 \pm 0,3 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  para a UF 1 e  $53,4 \pm 0,4 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  para a UF 2.

Além do comportamento do fluxo permeado, as concentrações de betalaínas no permeado, ao longo da UF, foram observadas. Para uma melhor comparação entre os dois experimentos, as concentrações foram normalizadas utilizando como concentração inicial a concentração do permeado após 15 min de experimento, e os resultados estão apresentados na Tabela 5.16.

Tabela 5.16 – Concentrações de betalaínas normalizadas em relação à concentração de betalaínas no permeado obtido no processo de UF após 15 min de filtração

Tempo (min)	Concentração de betalaínas/concentração de betalaínas em 15 min de UF (mg de betanina/ mg de betanina em 15 min de UF)	
	UF 1	UF 2
15	$1,00 \pm 0,05^a$	$1,00 \pm 0,01^a$
30	$0,99 \pm 0,03^a$	$1,01 \pm 0,02^a$
45	$0,99 \pm 0,01^a$	$0,98 \pm 0,01^a$

Os resultados seguidos por diferentes letras indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste Tukey.

Como pode ser observado analisando os dados na Tabela 5.16, não houve diferença significativa nos valores de concentração de betalaínas do permeado ao longo da UF, após os primeiros 15 min de processo. Os permeados finais obtidos na UF 1 e UF 2 apresentaram concentrações de betalaínas de 4,9

$\pm 0,1$  e  $4,6 \pm 0,01$  mg de betanina/100 ml de extrato, respectivamente. A  $R_{obs}$  média para a UF1 foi de 21% e para a UF2 foi de 15%, valores que estão diretamente relacionados com as características dos permeados provenientes da MF e com as características da membrana antes e após a limpeza.

#### 5.4.4. Análises físico-químicas dos extratos de talos de beterraba vermelha

Foram realizadas análises de turbidez e sólidos solúveis com o intuito de melhor avaliar a qualidade dos extratos de talos de beterraba ao longo do processo de clarificação. Os resultados obtidos para as soluções de alimentação inicial, alimentação final e de permeados dos processos de MF, em modo batelada e DF, e dos processos de UF estão apresentados na Tabela 5.17.

Tabela 5.17 - Turbidez e sólidos solúveis de alimentações iniciais, alimentações finais e permeados dos processos de MF, modos batelada (bat.) e DF, e de UF

Amostra	Turbidez (NTU)				Sólidos solúveis (°Brix)			
	MF bat. UF		MF/DF UF		MF bat. UF		MF/DF UF	
	Exp 1	Exp 2	Exp 1	Exp 2	Exp 1	Exp 2	Exp 1	Exp 2
<b>MF</b>								
Alim.1 Inicial	4408	4960	1043	1481	1,0	1,2	1,8	2,2
Alim.1 Final	4988	5524	1083	1504	1,0	1,2	2,0	2,4
Perm.1	21	54,3			1,0	1,0		
Alim.2 Inicial	4336	4772			1,0	1,2		
Alim.2 Final	4496	6696			1,0	1,2		
Perm. Final	20,7	31,9			1,0	1,0		
<b>UF</b>								
Alim. Inicial	47,6	49,5	71,5	228,8	1,0	1,0	1,2	1,6
Alim. Final	78,1	96,7	98,4	397,3	1,0	1,0	1,4	1,8
Perm. Final	0,7	0,6	13,4	37,3	0,2	0,4	1,0	1,4

Um dos objetivos da aplicação de MF é a remoção de materiais finamente divididos que estão em suspensão na solução e não são retidos por processo de filtração convencional. A turbidez foi avaliada para verificar a diminuição destes materiais nos extratos de talos de beterrabas, uma vez que quanto menor a turbidez, mais clarificado será o extrato.

Foi observado (Tabela 5.17) que houve aumento da turbidez nas soluções de alimentação para todos os experimentos realizados, indicando a eficiência das membranas para remoção dos materiais em suspensão. Além disso, quando

se compara a alimentação inicial com o seu respectivo permeado, percebe-se que houve redução da turbidez para todos os experimentos.

Após a etapa de MF em modo batelada, foi observado que, quando comparados os valores de turbidez da alimentação inicial e do permeado final, houve uma redução de 99,5% no Exp 1 e 99,4% no Exp 2; já na etapa de UF, esta redução aumentou para 99,98%, em ambos os experimentos. O processo MF/DF proporcionou uma redução de 93,1% da turbidez no experimento 1 e de 84,5% no experimento 2. Na UF, as reduções foram de 81,3% para UF 1 e 83,7% na UF 2. Considerando todo o processo de clarificação, a redução para a amostra 1 foi de 98,7% e de 97,5% para a amostra 2. A redução de turbidez, em ambos modos de operação para MF, foi considerada bastante satisfatória, uma vez que este parâmetro demonstra parcialmente a eficiência da clarificação do extrato de talos de beterraba vermelha por PSM.

Resultado semelhante foi obtido na microfiltração de suco de beterraba vermelha apresentada no estudo de Mereddy *et al.* (2017). Neste estudo, os autores utilizaram uma membrana com tamanho de poro nominal de 0,1 $\mu$ m e obtiveram uma redução de 99% na turbidez do suco de beterraba. Outro fator importante estudado por Mereddy *et al.* (2017) foi a redução no teor de sais e nitratos no suco de beterraba tratado por PSM.

Esse resultado está de acordo com outros encontrados na literatura. No estudo de clarificação do extrato de palma forrageira, realizado por Vergara *et al.* (2014), os autores observaram que, após a UF, a turbidez foi reduzida de 2453  $\pm$  64,2 NTU para zero, confirmando a excelente clarificação da amostra. Além disso, também foi observada uma redução significativa do teor de sólidos solúveis do extrato ultrafiltrado.

Os resultados da determinação do teor de sólidos solúveis também estão apresentados na Tabela 5.17. Em todos os experimentos foi observado o mesmo comportamento dos sólidos solúveis ao longo do processo de clarificação de MF seguida por UF. O teor de sólidos solúveis apresentou uma leve diminuição nesse parâmetro ao longo do processo de clarificação. A redução no teor de sólidos solúveis é um resultado esperado, uma vez que uma característica da UF é a separação de componentes de alta massa molar.

### 5.4.5. Análise de Cor

As análises de cor dos extratos permitem constatar se os processos de preparação de amostra, extração e clarificação dos extratos utilizados neste trabalho foram adequados. Conforme apresentado, as etapas de preparo e extração foram realizadas de forma cuidadosa e em condições suaves para preservar as características naturais dos extratos. O processo de clarificação, que consiste de duas etapas combinadas de processos de MF seguido pela UF, pode ser considerado uma etapa crítica para a preservação da cor, uma vez que o extrato é submetido a forças de cisalhamento e de pressão. Os resultados relativos aos parâmetros colorimétricos das soluções de alimentação e permeados dos processos de MF, modo batelada e DF, e de UF, descritos em termos de saturação ( $C^*_{ab}$ ), tonalidade ( $h_{ab}$ ) e variação de luminosidade ( $\Delta L$ ) estão apresentados na Tabela 5.18.

Tabela 5.18 – Parâmetros colorimétricos de alimentações iniciais e permeados dos processos de MF, em modo batelada e DF, e de UF, descritos em termos de saturação ( $C^*_{ab}$ ), tonalidade ( $h_{ab}$ ) e variação de luminosidade ( $\Delta L$ )

Amostra	$C^*_{ab}$				$h_{ab}$				$\Delta L$			
	MF bat. UF		MF/DF UF		MF bat. UF		MF/DF UF		MF bat. UF		MF/DF UF	
	Exp 1	Exp 2	Exp 1	Exp 2	Exp 1	Exp 2	Exp 1	Exp 2	Exp 1	Exp 2	Exp 1	Exp 2
<b>MF</b>												
Alim. 1 Inicial	2,3	2,4	2,3	2,6	359,4	359,3	359,4	359,5				
Perm. 1	5,0	4,7			0	360						
Alim. 2 Inicial	2,3	2,4			359,4	359,3						
Perm. Final	4,8	4,9			0	360						
<b>UF</b>												
Alim. Inicial	4,6	3,8	2,5	1,8	360	359,9	359,8	359,7				
Perm. Final	10,3	10,0	4,7	4,9	0,2	0,1	0,05	0,03	1,52	1,18	1,09	1,53

Conforme dados apresentados na Tabela 5.18, observa-se que houve aumento do parâmetro  $C^*_{ab}$  para todos os permeados obtidos nas diferentes etapas do processo. Logo, é possível afirmar que os permeados obtidos nos processos de MF e de UF apresentaram cor mais intensa do que aquela que apresentavam no início do processo. Além disto, comparando-se o parâmetro

$C_{ab}^*$  para o permeado da MF no modo batelada que foi utilizado com alimentação para a etapa de UF, observa-se que houve redução deste parâmetro que mede a intensidade de luz, indicando que, durante o armazenamento por 15 h, mesmo que sob refrigeração e protegido da luz, ocorre degradação da solução.

Por meio da análise dos valores de  $h_{ab}$ , apresentados também na Tabela 5.18 pode ser observado um leve deslocamento da tonalidade dos extratos em direção ao vermelho para os extratos permeados. Diferentemente do  $C_{ab}^*$ , não foi observada diferença de tonalidade devido ao armazenamento para o permeado final da etapa de MF (batelada) no primeiro experimento e uma diferença de apenas  $0,1^\circ$  no segundo experimento.

Além disso, é possível observar um aumento na luminosidade dos extratos de permeado obtidos em ambos modos de operação. Isso se deve à retenção de partículas em suspensão e solutos dissolvidos de maior massa molar, confirmado pelos resultados de turbidez; o permeado é, portanto, mais brilhante que o extrato bruto. Um aumento na luminosidade também foi observado no estudo sobre a clarificação de suco de romã, desenvolvido por Bagci (2014), em que a UF do suco resultou em uma  $\Delta L$  de 2,3.

De modo geral, a cor dos extratos finais, isto é, os permeados obtidos na etapa de UF, apresentou-se mais intensa, luminosa e avermelhada quando comparada com a dos extratos iniciais (alimentação inicial da etapa de MF).

#### **5.4.6. Atividade Enzimática – Peroxidase (POD)**

Como já descrito anteriormente, um dos principais fatores de degradação das betalainas é a atividade das enzimas presentes, tal como a POD. Na Figura 5.34 estão apresentadas a atividade residual desta enzima nos extratos obtidos dos talos de beterraba, que foram utilizados como alimentação para os dois experimentos de MF em modo batelada e nos permeados obtidos desse processamento. Também estão apresentadas a atividade residual da POD para as soluções de alimentação utilizada nos dois experimentos de UF, que consistem dos permeados obtidos na MF armazenados por 15 h sob refrigeração ( $4^\circ\text{C}$ ), e para os permeados obtidos nesse processo.

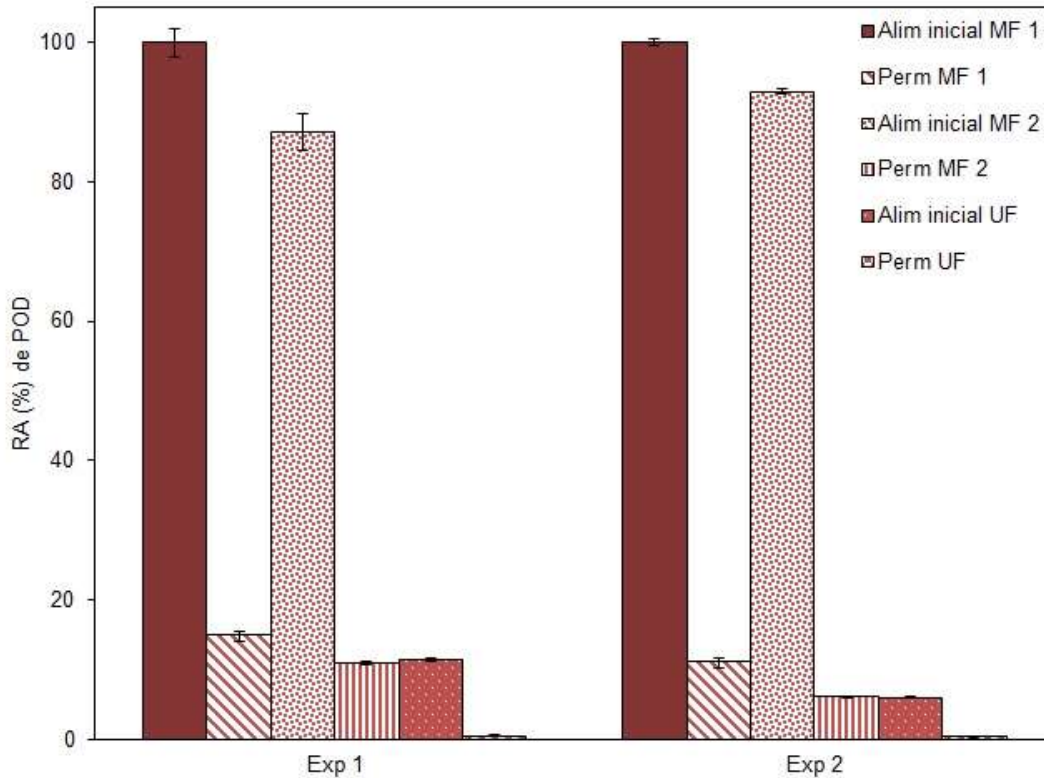


Figura 5.34 – Percentual residual da atividade de peroxidase em cada extrato: Alim inicial MF 1 é a alimentação inicial da MF batelada utilizada no início do processo, Perm MF 1 é o permeado recolhido nas duas primeiras horas de MF batelada, Alim inicial MF 2 é a segunda alimentação da MF batelada, Perm MF 2 é o permeado recolhido após a MF batelada, Alim inicial UF é o permeado da MF batelada utilizado como alimentação da UF e Perm UF é o permeado obtido na UF, conhecido como extrato clarificado

A partir dos resultados apresentados na Figura 5.34, observa-se que, na etapa de MF, tanto para o Exp 1 quanto para o Exp 2 houve uma redução de aproximadamente 90% e 94%, respectivamente, na atividade enzimática quando comparadas as correntes de alimentação (Alim inicial MF 1) com as de permeado (Perm MF 2).

Com a aplicação da UF a atividade enzimática da corrente de permeado foi ainda menor. Após o processo combinado de MF seguida pela UF, a redução da atividade enzimática foi de 99,5% para os dois experimentos. Estes resultados mostram que tanto a membrana de MF (tamanho de poro nominal de 0,05  $\mu\text{m}$ ), como a membrana de UF (massa molar de corte de 20 kDa) apresentaram uma elevada retenção para esta enzima. A massa molar da

peroxidase presente nos tecidos vegetais está entre 40 – 45 kDa (Damodaran *et al.*, 2008).

Assim como na clarificação por MF em modo batelada seguida por UF, também foi observada a redução da atividade da POD nos extratos clarificados por MF em modo DF seguida por UF. As atividades residuais de POD nas alimentações iniciais e finais da MF/DF e UF, juntamente com o permeado final, estão apresentadas na Figura 5.35.

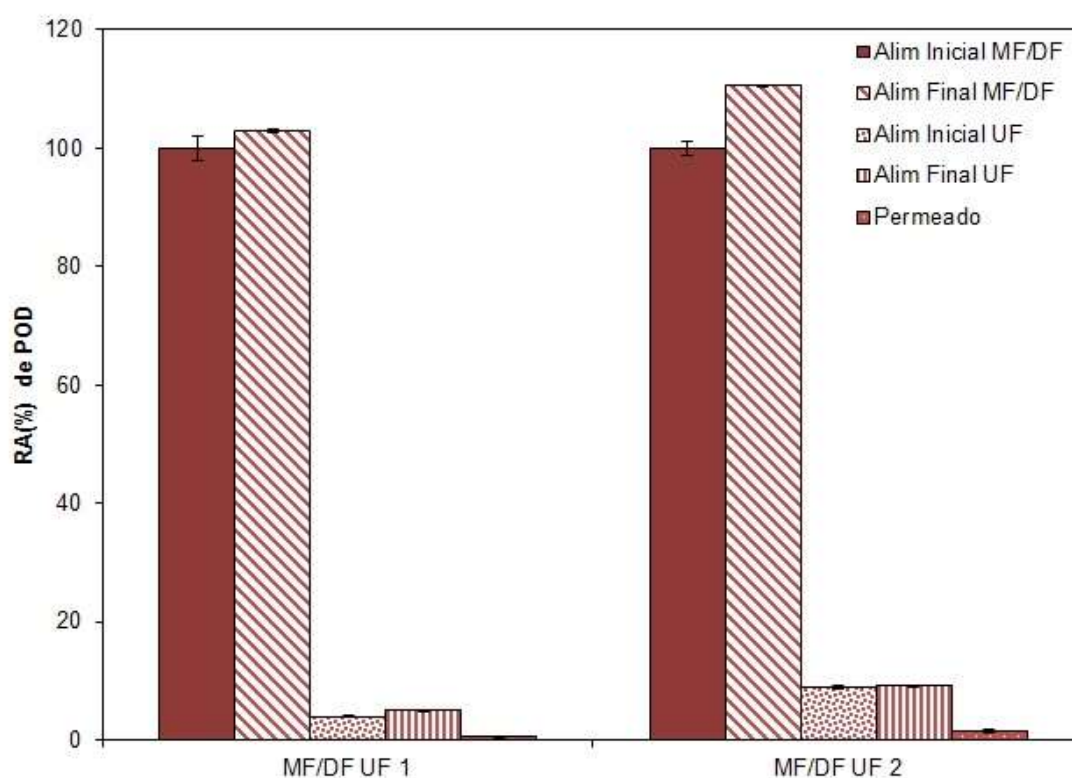


Figura 5.35 – Percentual residual da atividade de peroxidase em cada extrato para os dois experimentos: Alim inicial MF/DF é a alimentação da MF/DF, Alim final MF/DF é a alimentação da MF/DF após processo, Alim inicial UF é o permeado da MF/DF utilizado como alimentação da UF, Alim final UF é a alimentação da UF após o processo e Permeado é o permeado obtido na UF

Observando os resultados apresentados na Figura 5.35, percebe-se que o processo de MF/DF proporcionou uma expressiva redução na atividade da POD, em torno de 96,0% na MF/DF 1 e 91,1% na MF/DF 2, comparando o extrato inicial (Alim. MF/DF Inicial) e seu respectivo permeado (Alim. UF Inicial).

Apesar da pequena diferença no percentual entre os experimentos 1 e 2, isto não comprometeu o processo de clarificação do extrato, uma vez que o processo de MF precedeu a UF.

Com a aplicação da UF, a redução da atividade de POD foi de 99,4% no primeiro experimento e 98,5% no segundo experimento. Ou seja, no experimento MF/DF UF 1, a atividade do extrato inicial (Alim. MF/DF Inicial) foi de  $1552 \pm 32$  UAE g min<sup>-1</sup> e o extrato obtido após a clarificação (Permeado Final) foi de  $8,5 \pm 1,8$  UAE g min<sup>-1</sup>. No experimento MF/DF UF 2, a atividade do extrato antes da clarificação foi de  $1679 \pm 19$  UAE g min<sup>-1</sup> e após o tratamento foi de  $25,1 \pm 4,2$  UAE g min<sup>-1</sup>. Novamente a clarificação por MF/DF seguida de UF proporcionou redução expressiva da atividade da enzima POD nos extratos de talos de beterraba vermelha.

A redução da atividade da POD obtida com a clarificação, em ambos modos de operação da MF, foi considerada um resultado importante, pois a remoção da POD do extrato de talos de beterraba vermelha impede/minimiza a degradação oxidativa das betalaínas e dos outros compostos fenólicos presentes no extrato. Quando as betalaínas são degradadas, a coloração do extrato perde a tonalidade vermelha, a qual é o fator primordial para a utilização deste extrato como um corante alimentício natural. Além disto, o escurecimento enzimático causado pela POD, antes e durante o processamento, causa modificações organolépticas, principalmente com a formação de polímeros marrons, prejudicando a aceitação do produto pelo consumidor (Latorre *et al.*, 2012; Tomás-Barberán e Espín, 2001).

Resultado semelhante foi obtido no estudo da ultrafiltração de suco de mirtilo realizado por Kechinski (2011). Neste estudo, o autor avaliou a redução da atividade de peroxidase em sucos de mirtilo através do processo de UF. Os experimentos realizados no estudo citado apresentaram redução acima de 97% da atividade da peroxidase em todas as condições avaliadas. No trabalho de Kechinski (2011) foram utilizadas membranas com diferentes massas molares de corte (10, 30 e 50 kDa), diferentes temperaturas de operação (30, 40 e 50 °C) e diferentes teores de sólidos solúveis totais (8, 10 e 12 °Brix).

A UF também demonstrou ser uma tecnologia com excelentes resultados para separação de enzimas de extratos provenientes da indústria alimentícia. No



trabalho de Nor *et al.* (2016) foi estudada a separação da enzima bromelaína (MMC≈30 kDa) de um extrato de cascas, coroas e partes centrais de abacaxi por meio de UF, utilizando uma membrana tubular cerâmica com massa molar de corte de 75 kDa. Os autores obtiveram a separação de 96,8% das enzimas, sendo este valor considerado bastante satisfatório.

No presente trabalho, foi observado que a utilização da tecnologia de separação por membranas permitiu uma redução quase que completa da atividade da POD. Entretanto, em algumas situações, verificou-se que a redução da atividade enzimática não assegurou a manutenção da estabilidade dos pigmentos presentes no extrato, principalmente em extratos com baixa concentração de pigmentos. Considerando isto, a verificação da concentração de pigmentos no extrato ao longo do armazenamento controlado é uma forma de avaliar o efeito da clarificação utilizando MF seguida de UF na estabilidade dos extratos de talos de beterraba vermelha.

#### **5.4.7. Estabilidade das betalaínas nos extratos – taxa de degradação**

Todos os estudos realizados neste trabalho visaram o aproveitamento de um pigmento natural, priorizando que ele fosse obtido da forma mais natural possível, isto é, condições brandas de temperatura e sem a adição de produtos químicos. Contudo, é importante avaliar como esse processamento afeta a estabilidade do pigmento, a fim de comprovar a sua aplicabilidade.

Nesta etapa do estudo de clarificação do extrato de talos de beterraba vermelha foram realizados alguns testes para verificar a estabilidade das betalaínas e como o processo utilizado influencia esse parâmetro. Devido aos bons resultados obtidos com a aplicação do modo DF na MF, os testes de estabilidade foram aplicados para a clarificação feita em MF/DF seguida por UF.

A indústria alimentícia precisa utilizar tecnologias de processamento capazes de reduzir a incorporação de aditivos, mantendo os sabores naturais e a qualidade dos alimentos, e essa necessidade auxilia no desenvolvimento de tecnologias emergentes (Huang *et al.*, 2017). Os processos de separação por membranas representam uma tecnologia que pode auxiliar na redução de

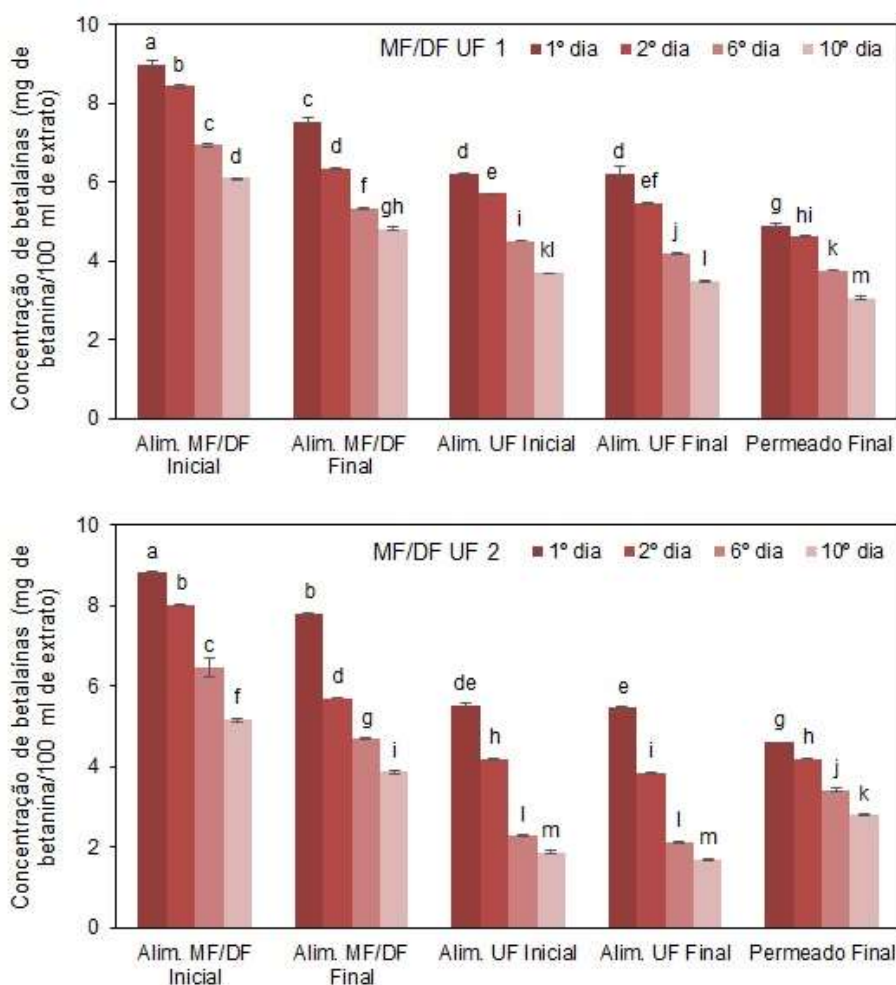
impurezas de um produto e, desta forma, melhorar as suas características finais. Entretanto, quando o produto desejado está presente em uma matriz complexa, a clarificação de um extrato, por exemplo, realizada de forma física, pode remover também outros compostos que agem como “protetores” do produto em questão.

A fim de verificar a influência do processo sobre a estabilidade das betalaínas, foram realizados testes para avaliar a concentração de betalaínas no tempo de armazenamento, para as soluções de alimentação iniciais e finais e do permeado final, obtidos nos experimentos MF/DF UF 1 e MF/DF UF 2. Os resultados obtidos para as concentrações de betalaínas dos extratos no dia de tratamento (1º dia) e ao longo do armazenamento controlado, sob refrigeração e ao abrigo de luz (2º, 6º e 10º dias) estão apresentadas na Figura 5.36 e as taxas de degradação do pigmento estão apresentadas na Tabela 5.19.

Pela análise dos resultados apresentados na Figura 5.36, observa-se que houve degradação das betalaínas ao longo do armazenamento, para todos os extratos analisados. Porém a taxa de degradação das betalaínas (Tabela 5.19) foi diferente, dependendo da parte do processo que o extrato era proveniente.

No 2º dia de armazenamento foi observado que as soluções de alimentação finais apresentaram taxa de degradação maior do que as suas respectivas soluções iniciais. Esse aumento na taxa de degradação pode ter ocorrido devido a inúmeros fatores, tais como a oxigenação que ocorre na alimentação/concentrado ao longo do processo de MF/DF, a concentração de enzimas e de compostos de alta massa molar que foram retidos pela membrana e/ou à adição de água destilada durante a DF, uma vez que a concentração do pigmento também influencia na sua estabilidade. Para os demais dias de armazenamento também foi observado um aumento na taxa de degradação. Porém, não ocorreu apenas na MF/DF 1 no 10º dia de armazenamento, no qual o extrato sem clarificação (Alim. MF/DF Inicial 1) apresentou taxa de degradação maior que sua respectiva alimentação final (Alim. MF/DF Final 1). Essa pequena diferença na taxa de degradação pode ser devida à presença de algum componente que se encontra naturalmente em maior ou menor concentração nos vegetais que foram utilizados na preparação do extrato. A variação natural

dos alimentos não permite que os experimentos sejam realizados com condições exatamente iguais. Além disto, a estimaco da taxa de degradao das betalaínas no extrato no considera os desvios das anlises. Como a diferena das taxas foi de apenas 0,02 mg de betanina/100 ml de extrato por dia, no  possvel afirmar que houve uma real reduo na taxa de degradao do pigmento da amostra inicial para a sua respectiva amostra final.



Os resultados seguidos por diferentes letras indicam diferena significativa ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste Tukey.

Figura 5.36 – Concentrao de betalaínas (mg de betanina/100 ml de extrato) para as soluoes de alimentao iniciais e finais da MF/DF e UF e permeado final, no dia do tratamento (1º dia) e no 2º, 6º e 10º dia de armazenamento com temperatura e luz controladas

Tabela 5.19 – Taxa de degradação de betalaínas (mg de betanina/100 ml de extrato dia) dos extratos de talos de beterraba vermelha ao longo do processo de clarificação, no 2º, 6º e 10º dia de armazenamento controlado (refrigeração a 4 °C e ao abrigo da luz)

Amostra	Taxa de degradação de betalaínas (mg de betanina/ 100 ml de extrato dia)					
	MF/DF UF 1			MF/DF UF 2		
	2º dia	6º dia	10º dia	2º dia	6º dia	10º dia
Alim. MF/DF Inicial	0,56	0,41	0,32	0,80	0,47	0,41
Alim. MF/DF Final	1,21	0,44	0,30	2,09	0,62	0,44
Alim. UF Inicial	0,49	0,34	0,28	1,35	0,65	0,41
Alim. UF Final	0,73	0,41	0,30	1,61	0,67	0,42
Permeado Final	0,30	0,23	0,20	0,42	0,24	0,20

Também pode ser observado, através dos dados apresentados na Figura 5.36 e na Tabela 5.19, que a taxa de degradação das betalaínas é maior no início do armazenamento do que após alguns dias. Em todas as amostras testadas, a taxa de degradação no 10º dia foi inferior à do 6º dia, que, por sua vez, foi inferior à do 2º dia de armazenamento. Essa redução indica que a maior degradação ocorreu no início do armazenamento, independente se a amostra foi clarificada ou não.

Também foi observado que no experimento MF/DF UF 2, o processo de MF/DF 2 gerou um permeado menos clarificado que o no experimento MF/DF 1. Uma vez que foram observadas maiores taxas de degradação das betalaínas e atividades residuais de PPO. Além da diferença dos extratos iniciais, a recuperação apenas parcial da membrana de microfiltração pode ter reduzido a seletividade da mesma, diminuindo a eficiência desse processo.

Contudo, o processo de MF/DF foi utilizado como um pré-tratamento da UF, a qual compensou e possibilitou uma clarificação eficiente do extrato. Uma das comprovações adicionais do resultado positivo da clarificação do extrato de talos de beterraba vermelha por MF/DF seguida por UF foi a taxa de degradação das betalaínas do extrato clarificado (permeado final) inferior a todos os outros extratos (Tabela 5.21). Apesar da redução na concentração de pigmento, da oxigenação proveniente do bombeamento dos extratos e do manuseio

necessário para o processamento, a taxa de degradação do permeado final ainda foi menor do que o extrato não clarificado e dos extratos obtidos ao longo de todo o processamento.

Finalmente, com base nos resultados obtidos pode-se afirmar que a clarificação dos extratos de talos de beterraba vermelha através de MF/DF seguida por UF possibilitou a obtenção de um extrato com menor turbidez, menor teor de sólidos solúveis, coloração mais intensa, luminosa e avermelhada, residual da atividade de POD menor do que 2% e taxa de degradação das betalaínas reduzida.

#### **5.4.8. Balanços de massa para betalaínas ao longo do processo de clarificação**

Neste item estão apresentados os balanços de massa envolvidos nas etapas de preparo de amostra, extração e clarificação, com o objetivo de fornecer uma ideia global do rendimento do processo e verificar onde estão localizadas as maiores perdas e, desta forma propor modificações no processo como sugestões para trabalhos futuros. Para o desenvolvimento dos balanços, foram consideradas as condições médias de concentração e de permeação encontradas durante o processamento dos talos de beterrabas vermelhas. Estas condições estão descritas a seguir:

- a composição da planta (beterraba) seguia a proporção das plantas mais desenvolvidas;
- a concentração inicial do extrato igual a de 20 mg de betanina/100 ml de extrato;
- o volume de permeado na etapa de MF batelada foi de 700 ml e para a etapa de UF de 200 ml;
- a massa inicial de 12 kg de beterraba foi escolhida para que fosse possível calcular os balanços para uma batelada de MF e UF.

As correntes do processo estão identificadas por letras maiúsculas para facilitar a identificação de cada etapa no fluxograma.

#### 5.4.8.1. Preparo da amostra

A Figura 5.37 apresenta a parte do fluxograma do processo para o preparo da amostra, iniciando com as plantas inteiras até a obtenção de talos sanitizados.

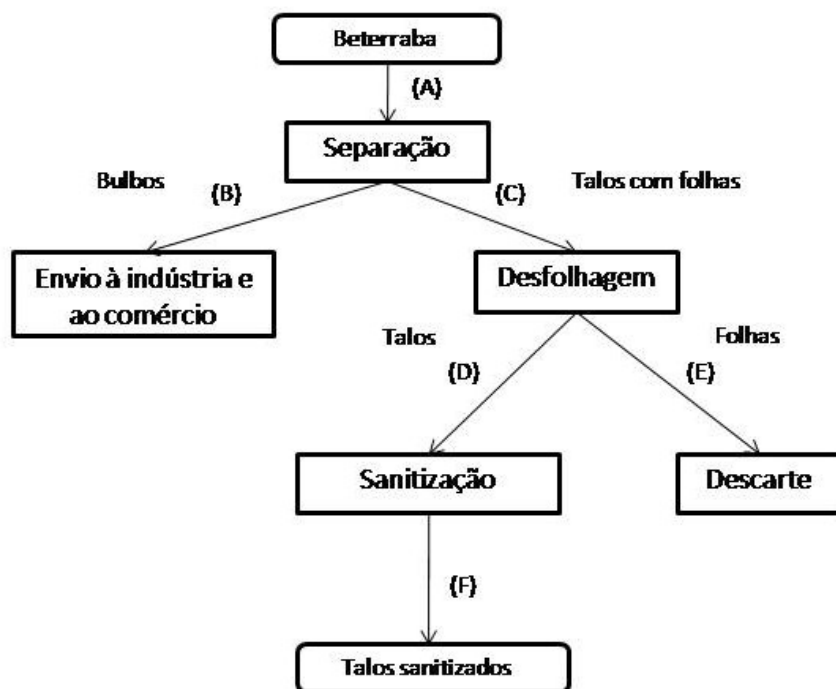


Figura 5.37 – Fluxograma de blocos para as correntes do processo de preparo da amostra

As plantas foram separadas (A) em bulbos e talos com folhas. Os bulbos representam 54,5% da massa das plantas e os talos com folhas representam 45,5%, ou seja, 6,54 e 5,46 kg, respectivamente. Os bulbos foram enviados à indústria e ao comércio (B) e os talos com folhas foram desfolhados (C). Os 4 kg de talos (33,3%) obtidos foram sanitizados (D) e os 1,46 kg de folhas (12,2%) foram descartados (E). Após a sanitização (F), a massa de talos permaneceu a mesma, portanto foram obtidos 4 kg de talos limpos. Os talos sanitizados foram armazenados adequadamente até a extração.

#### 5.4.8.2. Extração por esmagamento

A Figura 5.38 apresenta a parte do fluxograma do processo referente à extração, iniciando com talos sanitizados até a obtenção do extrato que será utilizado como alimentação para o processo de clarificação.

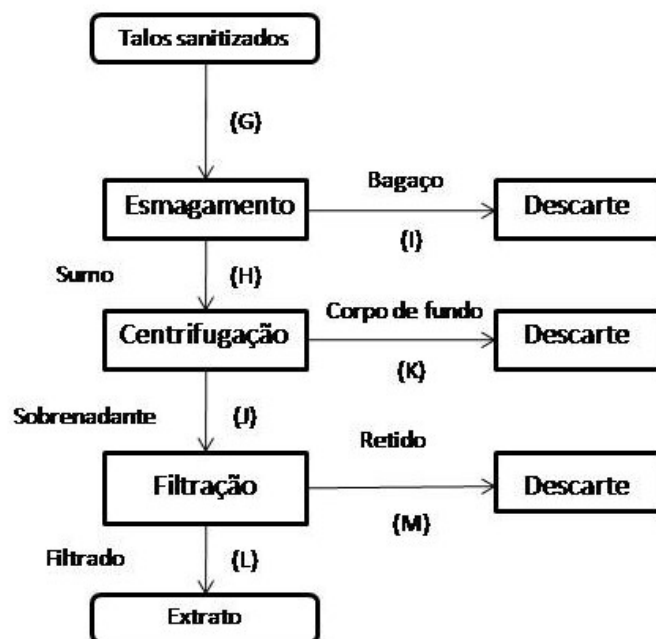


Figura 5.38 – Fluxograma de blocos para as correntes de processo para a etapa de extração do sumo dos talos de beterraba vermelha

A massa inicial de talos foi de 4 kg, nesta massa estima-se que a quantidade de betalaínas é de 640 mg. Estes talos foram submetidos à extração por esmagamento (G). Após o esmagamento, foram obtidos 2,2 L de extrato bruto (sumo) e 1,79 kg de bagaço, o qual foi descartado (I). O sumo foi centrifugado (J) e obteve-se 2,02 L de sobrenadante, o que representa em torno de 92% do volume do extrato bruto. Os 8% restantes do volume eram compostos pelo material decantado, que foi descartado (K). O sobrenadante foi filtrado a vácuo (J), resultando em filtrado com 99% do volume e o retido com o 1% restante. O retido foi descartado (M) e o filtrado ( $\approx 2$  L) foi considerado o extrato final desta etapa (L). O extrato foi armazenado sob refrigeração e protegido da luz por aproximadamente 15 h, para então ser clarificado.

Considerando que o esmagamento extraiu 62,6% das betalaínas presentes nos talos e que, com este processo, foram obtidos 2 L de extrato com concentração de 20 mg de betanina/100 ml de extrato, foram perdidas em torno de 240 mg de betalaínas no descarte (I). Para este cálculo, foi desconsiderada a degradação das betalaínas sofrida na centrifugação e filtração, uma vez que não é possível verificar a concentração do extrato bruto, por limitações do método de quantificação.

### 5.4.8.3. Clarificação - MF em modo batelada e UF

A Figura 5.39 apresenta a parte do fluxograma do processo referente a clarificação do extrato através dos PSM, iniciando com o extrato, até a obtenção do extrato clarificado (permeado da UF).

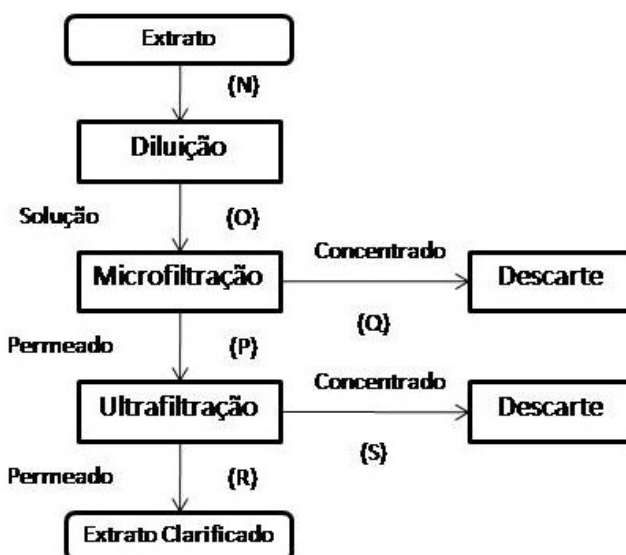


Figura 5.39 – Fluxograma de blocos para as correntes de processo para a etapa de clarificação do extrato de talos de beterraba vermelha

O extrato obtido foi diluído (N) com água destilada até a concentração de 10 mg de betanina/100 ml de extrato. O volume inicial do extrato era de 2 L e o volume da solução resultante foi de 4 L, contendo 400 mg de betalaínas. A solução foi utilizada como alimentação no processo de microfiltração em modo batelada (O). Com a MF foi possível obter 700 ml de permeado com concentração de 8 mg de betanina/100 ml de extrato. Ou seja, foram retirados em torno de 56 mg de betalaínas da alimentação. O volume final do concentrado foi de 3,3 L e não houve redução significativa da concentração. Como o concentrado foi descartado (Q), houve a perda, no descarte, de aproximadamente 330 mg de betalaínas. A diferença da concentração pode ser explicada, provavelmente, pela degradação da solução, a qual representa em torno de 14 mg de betalaínas durante o processo de MF batelada.

O permeado recolhido da MF batelada foi utilizado como alimentação para a UF (P). No processo de UF, foram recolhidos em torno de 200 ml de extrato



clarificado (permeado) com concentração de 4 mg de betanina/100 ml de extrato, resultando na recuperação de apenas 8mg de betalaínas. O volume do concentrado da UF era de 500 ml com concentração de 8 mg de betanina /100 ml de extrato. Este concentrado foi descartado (S), ocasionando a perda de mais 40 mg de betalaínas. Através da diferença de concentrações, estima-se que foram degradadas em torno de 4 mg de betalaínas durante o processo de UF.

As maiores perdas de betalaínas no processo ocorreram no descarte do bagaço proveniente da etapa de esmagamento e no descarte do concentrado proveniente do processo de MF batelada. Uma alternativa para reduzir o descarte do concentrado da MF batelada com tantos pigmentos seria a aplicação de etapas de diafiltração.

#### **5.4.8.4. Clarificação – MF em modo DF e UF**

A modificação do processo de clarificação do extrato de beterraba vermelha utilizando MF no modo DF seguido de UF teve como objetivo reduzir as perdas de pigmento com o descarte da alimentação da MF batelada na primeira etapa. Para isto, algumas considerações iniciais do balanço foram modificadas, de acordo com os testes realizados:

- alimentação inicial de MF de 3 L, sem troca de alimentação durante o processo;
- volume de permeado na etapa de MF foi de 600 ml e para a etapa de UF de 160 ml;
- massa inicial de 9 kg de beterraba foi escolhida para que fosse possível avaliar os balanços de massa para uma batelada de MF e UF.

Na Figura 5.40 está apresentada a parte do fluxograma do processo referente a clarificação do extrato através dos PSM, iniciando com o extrato, até a obtenção do extrato clarificado (permeado da UF).

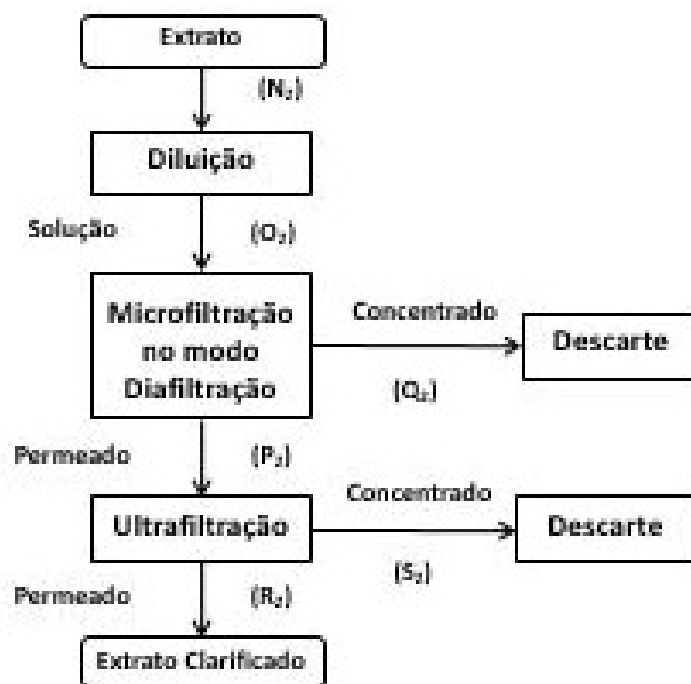


Figura 5.40 - Fluxograma de blocos para as correntes de processo para a etapa de clarificação (MF/DF, seguida por UF) do extrato de talos de beterraba vermelha

O extrato obtido foi diluído (N<sub>2</sub>) com água destilada até a concentração de 10 mg de betanina/100 ml de extrato com volume de 3 L, contendo 300 mg de betalaínas. A solução foi utilizada como alimentação no processo de microfiltração (O<sub>2</sub>). Ao longo do processo foi adicionado, por três vezes, 100 ml de água destilada. Com a MF/DF foi possível obter 600 ml de permeado com concentração de 7 mg de betanina/100 ml de extrato. Ou seja, foram retirados em torno de 42 mg de betalaínas da alimentação. O volume final do concentrado foi de 2,7 L. Como o concentrado foi descartado (Q<sub>2</sub>), houve a perda, no descarte, de aproximadamente 258 mg de betalaínas.

O permeado recolhido da MF/DF foi utilizado como alimentação para a UF (P<sub>2</sub>). Devido ao residual de água dentro do sistema de membranas, a concentração de betalaínas da alimentação de UF foi de 6 mg de betanina/100 ml de extrato e o volume utilizado foi de 500 ml, o que representa 30 mg de betalaínas. No processo de UF, foram recolhidos em torno de 160 ml de extrato clarificado (permeado) (R<sub>2</sub>) com concentração de 5 mg de betanina/100 ml de extrato, resultando na recuperação de apenas 8 mg de

betalaínas. O volume do concentrado da UF era de 340 ml com concentração de 6 mg de betanina /100 ml de extrato. Este concentrado foi descartado (S<sub>2</sub>), ocasionando a perda de mais 20,4 mg de betalaínas. Através da diferença de concentrações, estima-se que foram degradadas em torno de 1,6 mg de betalaínas durante o processo de UF.

A operação do processo no modo diafiltração possibilitou uma redução na perda de betalaínas ao longo do processo de filtração. Com a aplicação da MF batelada, foi perdido no descarte do concentrado da alimentação da MF (S) em torno de 330 mg de betalaínas em uma batelada. Com a modificação da operação, utilizando MF/DF, esta perda foi de 258 mg de betalaínas por batelada. O modo DF melhorou o processo de clarificação, porém o descarte das alimentações finais, MF e UF, além do bagaço do esmagamento, ainda resultando em uma perda relevante desses pigmentos.

## 6. Conclusões

Os talos de beterraba vermelha representam em torno de 30% em massa da composição da planta beterraba. Devido à alta produção deste vegetal, a quantidade de talos subutilizados justifica a necessidade de estudos para melhores aplicações deste resíduo. Os talos de beterraba vermelha possuem quantidades relevantes de betalaínas, sendo, portanto, uma boa alternativa para obtenção de corante natural.

O esmagamento foi considerado um método de extração adequado para a obtenção de extratos ricos em betalaínas; mostrou-se um método rápido de processamento, sem adição de calor ou solventes orgânicos. Contudo, o extrato obtido por meio de esmagamento possuía em torno de 62,6% das betalaínas presentes nos talos.

O HPP é uma tecnologia emergente com inúmeras vantagens, mas que não possibilitou melhora relevante na extração das betalaínas, fornecendo resultados próximos aos alcançados com a aplicação de uma extração sólido-líquido com auxílio de um liquidificador doméstico.

Além disto, a aplicação de HPP nos extratos de talos de beterraba indicou que a atividade de enzimas pode aumentar ou diminuir. A enzima PPO foi bastante afetada pelo tratamento que combina alta pressão e temperatura. Contudo, a redução em mais de 80% da atividade da PPO não foi suficiente para aumentar a estabilidade das betalaínas nas condições estudadas.

A resposta a esse tratamento não foi a mesma para a outra enzima testada, a peroxidase, uma vez que não foi possível inativar a POD utilizando o tratamento HPP nas condições testadas. Pelo contrário, o tratamento com HPP aumentou a sua atividade. O processamento não contribuiu com o aumento da estabilidade das betalaínas, sendo, portanto, desinteressante a sua aplicação.

Os testes realizados no estudo sobre o tratamento térmico HTST mostraram que o aquecimento das amostras não ocorreu instantaneamente e a utilização da temperatura efetiva de tratamento permitiu que a temperatura real em que o extrato foi tratado fosse melhor determinada.

O tratamento térmico HTST causou uma pequena degradação nas betalaínas, mas proporcionou um aumento na estabilidade das betalaínas do extrato com alta concentração inicial, tratado por 120 s a 85,7 °C, reduzindo a sua taxa de degradação de 1,2 mg de betanina/100 ml de extrato por dia para 0,4 mg de betanina/100 ml de extrato por dia, após 8 dias de armazenamento controlado.

Apesar dos resultados positivos do tratamento térmico de HTST para melhorar a estabilidade das betalaínas em extratos de talos de beterraba vermelha com alta concentração inicial, estudos adicionais sobre a estabilidade de extratos com baixa concentração de betalaínas devem ser realizados, uma vez que a variação do teor de pigmento é uma característica natural do vegetal

O processo combinado de MF/DF e de UF mostrou-se uma alternativa promissora para a clarificação dos extratos ricos em betalaínas provenientes de talos de beterraba vermelha, resultando em um permeado final com coloração mais intensa e luminosa. Porém, durante as etapas de MF e UF, foi observada redução no fluxo permeado e a ocorrência dos fenômenos de *fouling* e polarização por concentração.

Com a aplicação do processo de clarificação por meio de MF seguida de UF não foi possível manter os teores de pigmento elevados, uma vez que se observou em todos os experimentos que a concentração de betalaínas dos permeados possui diferença significativa da concentração de betalaínas da alimentação, indicando perdas durante o processo. Por outro lado, o processo mostrou-se eficiente na diminuição da atividade enzimática e na redução da turbidez e sólidos solúveis, cujos resultados foram confirmados pela análise colorimétrica.

Os resultados obtidos nos estudos realizados mostram, de maneira geral, que os talos de beterraba vermelha podem ser considerados uma fonte promissora de betalaínas visando à aplicação como corante natural.

Considerando o exposto, algumas sugestões para trabalhos futuros estão listadas a seguir:

- estudar produtos ou processos que possam vir a aproveitar os resíduos do esmagamento, como em biofilmes, excipiente/base para alimentação animal nutricionalmente enriquecida, entre outros;
- estudar a aplicação do HPP para a ativação de POD com o intuito de produzir extratos ricos em enzimas;
- estudar os motivos da alta instabilidade e, conseqüentemente, produtos/processamentos para estabilizar as betalaínas em diferentes concentrações de pigmentos;
- estudar formas de minimizar as perdas de pigmentos durante o processo de clarificação ou utilizar o descarte da alimentação como fonte de enzimas;
- estudar a aplicação do tratamento térmico HTST como um pré-tratamento ao PSM;
- estudar a microencapsulação das betalaínas provenientes de talos de beterraba vermelha como forma de estabilização dos pigmentos;
- testar a aplicação das betalaínas como corante natural em alimentos e/ou cosméticos, observando a coloração obtida no processamento e a degradação da cor ao longo do armazenamento.

## Referências Bibliográficas

Almandoz, C., Pagliero, C., Ochoa, A., Marchese, J. **Corn syrup clarification by microfiltration with ceramic membranes.** Journal of Membrane Science, v. 363, p. 87–95, 2010.

Almandoz, M.C., Pagliero, C.L., Ochoa, N.A., Marchese, J. **Composite ceramic membranes from natural alumino silicates for microfiltration applications.** Ceramics International, v.41, p. 5621–5633, 2015.

Almazán, J.E., Romero-Dondiz, E.M., Rajal, V.B., Castro-Vidaurre, E.F. **Nanofiltration of glucose: Analysis of parameters and membrane characterization.** Chemical Engineering Research and Design, v.94, p. 485–493, 2015.

Amokrane, M., Sadaoui, D., Koutsou, C.P., Karabelas, A.J., Dudeck, M. **A study of flow field and concentration polarization evolution in membrane channels with two-dimensional spacers during water desalination.** Journal of Membrane Science, v. 477, p. 139–150, 2015.

Anese, M., Nicoli, M.C., Dall'Aglio, G., Lerici, C.R. **Effect of high pressure treatments on peroxidase and polyphenoloxidase activities.** Journal of Food Biochemistry, v. 18, p. 285-293, 1995.

Ayala-Zavala, J.F., Vega-Veja, V., Rosas-Domínguez, C., Palafox-Carlos, H., Villa-Rodríguez, J.A., Siddiqui, M.W., Dávila-Aviña, J.E., González-Aguilar, G.A. **Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives.** Food Research International, n. 44, p. 1866–1874, 2011.

Azeredo, H.M.C. **Betalains: properties, sources, applications, and stability – a review.** International Journal of Food Science and Technology, v. 44, p. 2365–2376, 2009.

Bagci, P.O. **Effective clarification of pomegranate juice: A comparative study of pretreatment methods and their influence on ultrafiltration flux.** Journal of Food Engineering, v. 141, p. 58–64, 2014.

Balasubramaniam, V.M., Martínez-Monteagudo, S.I., Gupta, R. **Principles and application of high pressure-based technologies in the food industry.** Annual Review of Food Science and Technology, n. 6, p. 435-462, 2015.

Barbosa-Cánovas, G.V., Góngora-Nieto, M.M., Rodríguez, J.J., Swanson, B.G. **Nonthermal Processing of Foods and Emerging Technologies.** Em (Ed) G.V. Barbosa-Cánovas, Food Engineering. Encyclopedia of Life Support Sciences, p. 575-593, Paris: EOLSS Publishers/UNESCO, 2005.

Behr, N., Göbel, G., Pfeiffer, H., Patentanmeldung der Fa. Henkel KGaA, Düsseldorf. **Herstellung eines Rote-Beete-Saftkonzentrats mit besserer Geschmacksneutralität und Haltbarkeit.** Ind. Obst Gem. Verwert., n. 59, p. 238, 1984.

Blasco, R., Esteve, M.J., Frígola, A., Rodrigo, M. **Ascorbic acid degradation kinetics in mushrooms in a high-temperature short-time process controlled by a thermoresistometer.** LWT - Food Science and Technology, v. 37, p. 171–175, 2004.

Briones-Labarca, V., Plaza-Morales, M., Giovagnoli-Vicuña, C., Jamett, F. **High hydrostatic pressure and ultrasound extractions of antioxidant compounds, sulforaphane and fatty acids from Chilean papaya (*Vasconcellea pubescens*) seeds: Effects of extraction conditions and methods.** LWT - Food Science and Technology, n. 60, p. 525-534, 2015.

Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Bilić, M., Velic, D. **Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds.** Journal of Food Engineering, v. 81, p. 236-242, 2007.

Cardoso-Ugarte, G.A., Sosa-Morales, M.E., Ballard, T., Liceaga, A., San Martín-González, M.F. **Microwave-assisted extraction of betalains from red beet (*Beta vulgaris*).** LWT - Food Science and Technology, v. 59, p. 276-282, 2014.

Cassini, A.S. **Estudo de Processos Alternativos no Pré-tratamento de Efluentes Provenientes da Produção de Isolados Protéicos.** Tese de Doutorado, Porto Alegre: UFRGS, 179 p., 2008.

Cejudo-Bastante, M.J., Hurtado, N., Mosquera, N., Heredia, F.J. **Potential use of new Colombian sources of betalains. Color stability of ulluco (*Ullucus tuberosus*) extracts under different pH and thermal conditions.** Food Research International, v. 64, p. 465-471, 2014.

Charcosset, C. **Membrane processes in biotechnology: An overview.** Biotechnology Advances, v. 24, p 482-492, 2006.

Chhaya, Sharma, C., Mondal, S., Majumdar, G.C., De, S. **Clarification of Stevia extract by ultrafiltration: Selection criteria of the membrane and effects of operating conditions.** Food and Bioproducts Processing, v. 90, p. 525-532, 2012.

Cissé, M., Bohuon, P., Sambe F., Kane, C., Sakho, M., Dornier, M. **Aqueous extraction of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa*: Experimental kinetics and modeling.** Journal of Food Engineering, v. 109, p. 16-21, 2012.

Czapski, J. **Heat stability of betacyanins in red beet juice and in betanin solutions.** Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung, n. 191, p. 275-278, 1990.

Damodaran, S., Parkin K.L., Fennema, O.R. **Fennema's food chemistry.** (4<sup>a</sup> Ed.) CRC Press: Boca Raton, 2008.

Dorta, E.; González, M.; Lobo, M. G.; Sánchez-Moreno, C.; Ancos, B. **Screening of phenolic compounds in by-product extracts from mangoes (*Mangifera indica* L.) by HPLC-ESI-QTOF-MS and multivariate analysis for use as a food ingredient.** Food Research International, n. 57, p. 51 - 60, 2014.

Drioli, E.; Fontananova, E. **Membrane Technology and Sustainable Growth.** Chemical Engineering Research and Design, v. 82, n. 12, parte A, p. 1557 - 1562, 2004.

Escribano, J., Pedreño, M. A., García-Carmona, F., Muñoz, R. **Characterization of the Antiradical Activity of Betalains From *Beta vulgaris* L. Roots.** Phytochemical Analysis, v. 9, p. 124-127, 1998.



- Fang, L., Jiang, B., Zhang, T. **Effect of combined high pressure and thermal treatment on kiwifruit peroxidase.** Food Chemistry, n. 109, p. 802–807, 2008.
- Farid, M., Alkhafaji, S. **Determination of an Effective Treatment Temperature of Chemical and Biological Reactions.** Food Bioprocess Technology, v. 5, p. 147–154, 2012.
- Galanakis, C.M. **Emerging technologies for the production of nutraceuticals from agricultural by-products: A viewpoint of opportunities and challenges.** Food and Bioprocess Technology, n. 91, p. 575 – 579, 2013.
- Garcia-Castello, E.M., McCutcheon, J.R., Elimelech, M. **Performance evaluation of sucrose concentration using forward osmosis.** Journal of Membrane Science, v. 338, p. 61–66, 2009.
- Gengatharan, A., Dykes, G.A., Choo, W.S. **Betalains: Natural plant pigments with potential application in functional foods.** LWT - Food Science and Technology, v. 64, p. 645–649, 2015.
- Georgiev, V.G., Weber J., Kneschke, E.M., Denev, P.N., Bley, T., Pavlov, A. I. **Antioxidant activity and phenolic content of betalain extracts from intact plants and hairy root cultures of the red beetroot *Beta Vulgaris* CV. Detroit Dark Red.** Plant Foods for Human Nutrition, v. 65, p. 105–111, 2010.
- Gerke, I.B.B., Hamerski, F., Scheer, A.P., Silva, V.R. **Clarification of crude extract of yerba mate (*Ilexparaguariensis*) by membrane processes: Analysis of fouling and loss of bioactive compounds.** Food and bioprocess processing, n. 102, p. 204-212, 2017.
- Giacobbo, A., Prado, J.M., Meneguzzi, A., Bernardes, A.M., Pinho, M.N. **Microfiltration for the recovery of polyphenols from winery effluents.** Separation and Purification Technology, v. 143, p. 12-18, 2015.
- Giribaldi, M., Coscia, A., Peila, C., Antoniazzi, S., Lamberti, C., Ortoffi, M., Moro, G.E., Bertinoc, E., Civera, T., Cavallarin, L. **Pasteurization of human milk by a benchtop High-Temperature Short-Time device.** Innovative Food Science and Emerging Technologies, n. 36, p. 228–233, 2016.
- Gonçalves, L.C.P., Trassi, M.A.S., Lopes, N.B., Dörr, F.A., Santos, M.T., Baader, W.J., Oliveira Jr., V.X., Bastos, E.L. **A comparative study of the purification of betanin.** Food Chemistry, v. 131, p. 231–238, 2012.
- Güneşer, O. **Pigment and color stability of beetroot betalains in cow milk during thermal treatment.** Food Chemistry, n. 196, p. 220–227, 2016.
- Habert, A.C., Borges, C.P., Nobrega, R. **Processos de separação por membranas.** Rio de Janeiro, RJ: E-papers, 180 p., 2006.
- Hadidi, M., Buckley, J.J., Zydney, A.L. **Ultrafiltration behavior of bacterial polysaccharides used in vaccines.** Journal of Membrane Science, v. 490, p. 294–300, 2015.
- He, Y., Ji, Z., Li, S. **Effective clarification of apple juice using membrane filtration without enzyme and pasteurization pretreatment.** Separation and Purification Technology, v. 57, p. 366–373, 2007.

- Herbach, K.M., Stintzing, F.C., Carle, R. **Betalain Stability and Degradation - Structural and Chromatic Aspects.** Journal of Food Science, v. 71, n. 4, p. R41–R50, 2006.
- Herbach, K.M., Stintzing, F.C., Carle, R. **Impact of Thermal Treatment on Color and Pigment Pattern of Red Beet (*Beta vulgaris* L.) Preparations.** Journal of Food Science, v. 69, n. 6, p. C491-C498, 2004
- Huang, A.S., von Elbe, J.H. **Effect of pH on the Degradation and Regeneration of Betanine.** Journal of Food Science, v. 52, n. 6, p. 1689-1693, 1987.
- Huang, A.S., von Elbe, J.H. **Kinetics of the degradation and Regeneration of Betanine.** Journal of Food Science, n. 50, p. 1115-1120, 1985.
- Huang, H.W., Hsu, C.P., Yang, B.B., Wang, C.Y. **Advances in the extraction of natural ingredients by high pressure extraction technology.** Trends in Food Science & Technology, n. 33, p. 54–62, 2013.
- Huang, H.W., Wu, S.J., Lu, J.K., Shyu, Y.T., Wang, C.Y. **Current status and future trends of high-pressure processing in food industry.** Food Control, n. 72, p. 1-8, 2017.
- Huang, W., Bi, X., Zhang, X., Liao, X., Hu, X., Wu, J. **Comparative study of enzymes, phenolics, carotenoids and color of apricot nectars treated by high hydrostatic pressure and high temperature short time.** Innovative Food Science and Emerging Technologies, n. 18, p. 74–82, 2013.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário 2006: Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação.** Rio de Janeiro, 777 p., 2009.
- Jackman, R. L.; Smith, J. L. **Anthocyanins and betalains.** Em G. F. Hendry e J. D. Houghton (Ed.), Natural food colourants, p. 244–309, London: Blackie Academic & Professional, 1996.
- Jun, X., Deji, S., Ye, L., Rui, Z. **Micromechanism of ultrahigh pressure extraction of active ingredients from green tea leaves.** Food Control, n. 22, p. 1473-1476, 2011.
- Kaimainen, M., Laaksonen, O., Järvenpää, E., Sandell, M., Huopalahti, R. **Consumer acceptance and stability of spray dried betanin in model Juices.** Food Chemistry, n. 187, p. 398–406, 2015.
- Kanner, J., Harel, S., Granit, R. **Betalains - A New Class of Dietary Cationized Antioxidants.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 49, p. 5178-5185, 2001.
- Kechinski, C.P. **Estudo de diferentes formas de processamento do mirtilo visando à preservação dos compostos antociânicos.** Tese de Doutorado, Porto Alegre: UFRGS, 277 p., 2011.
- Koubaier, H.B.H, Snoussi, A., Essaidi, I., Chaabouni, M.M., Thonart, P., Bouzouita, N. **Betalain and Phenolic Compositions, Antioxidant Activity of Tunisian Red Beet (*Beta vulgaris* L. conditiva) Roots and Stems Extracts.** International Journal of Food Properties, n. 17, p. 1934–1945, 2014.
- Kumar, R.V., Ghoshal, A.K., Pugazhenthii, G. **Elaboration of novel tubular ceramic membrane from inexpensive raw materials by extrusion method**

**and its performance in microfiltration of synthetic oily waste water treatment.** Journal of Membrane Science, v. 490, p. 92–102, 2015.

Kwon, D.Y., Vigneswaran, S., Fane, A.G., Aim, R.B. **Experimental determination of critical flux in cross-flow microfiltration.** Separation and Purification Technology, v. 19, p. 169–181, 2000.

Latorre, M.E., Bonelli, P.R., Rojas, A.M., Gerschenson, L. N. **Microwave inactivation of red beet (*Beta vulgaris* L. var. *conditiva*) peroxidase and polyphenoloxidase and the effect of radiation on vegetable tissue quality.** Journal of Food Engineering, v. 109, p. 676–684, 2012.

Liu, X., Gao, Y., Peng, X., Yang, B., Xu, H., Zhao, J. **Inactivation of peroxidase and polyphenol oxidase in red beet (*Beta vulgaris* L.) extract with high pressure carbon dioxide.** Innovative Food Science and Emerging Technologies, v. 9, p. 24–31, 2008.

Loginova, K.V., Lebovka, N.I., Vorobiev, E. **Pulsed electric field assisted aqueous extraction of colorants from red beet.** Journal of Food Engineering, v. 106, p. 127–133, 2011.

Lu, G., Edwards, C.G., Fellman, J.K., Mattinson, D.S., Navazio, J. **Biosynthetic Origin of Geosmin in Red Beets (*Beta vulgaris* L.).** Journal of Agricultural and Food Chemistry, n. 51, p. 1026-1029, 2003.

Lu, G., Edwards, C.G., Fellman, J.K., Mattinson, D.S., Navazio, J. **Quantitative determination of geosmin in red beets (*Beta Vulgaris* L.) using headspace solid-phase microextraction.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, n. 51, p. 1021-1025, 2002.

Manchali, S., Murthy, K. N. C., Nagaraju, S., Neelwarne, B. **Stability of Betalain Pigments of Red Beet.** Em B. Neelwarne (Ed.), Red Beet Biotechnology: Food and Pharmaceutical Applications, p. 55-74. Springer Science + Business Media: New York, 2013.

Mänttäre, M., Viitikko, M., Nyström, M. **Nanofiltration of biologically treated effluents from the pulp and paper industry,** Journal of Membrane Science, v. 272, p. 152–160, 2006.

Mereddy, R., Chan, A., Fanning, K., Nirmal, N., Sultanbawa, Y. **Betalain rich functional extract with reduced salts and nitrate content from red beetroot (*Beta vulgaris* L.) using membrane separation technology.** Food Chemistry, n. 215, p. 311–317, 2017.

Mirabella, N., Castellani, V., Sala, S. **Current options for the valorization of food manufacturing waste: a Review.** Journal of Cleaner Production, n. 65, p. 28–41, 2014.

Mondor, M., Girard, B., Moresoli, C. **Modeling flux behavior for membrane filtration of apple juice.** Food Research International, v. 33, p. 539-548, 2000.

Morin, P., Pouliot, Y., Jiménez-Flores, R. **A comparative study of the fractionation of regular buttermilk and whey buttermilk by microfiltration.** Journal of Food Engineering, v. 77, p. 521-528, 2006.

Mulder, M. **Basic Principles of Membrane Technology,** 2ed. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, p. 312-354, 1996.

Nayak, C.A., Chethana, S., Rastogi, N.K., Raghavarao, K.S.M.S. **Enhanced mass transfer during solid-liquid extraction of gamma-irradiated red beetroot.** Radiation Physics and Chemistry, v. 75, p 173–178, 2006.

Neelwarne, B., Rudrappa, T. **Peroxidases and Other Enzymes from Red Beet Hairy Roots.** EM B. Neelwarne (Ed.), Red Beet Biotechnology: Food and Pharmaceutical Applications, p. 283-334. Springer Science + Business Media: New York, 2013.

Nor, M.Z.M., Ramchandran, L., Dukec, M., Vasiljevic, T. **Separation of bromelain from crude pineapple waste mixture by a two-stage ceramic ultrafiltration process.** Food and Bioproducts processing, n. 98, p. 142-150, 2016.

Ohlsson, T., Bengtsson, N. **Minimal processing of foods with thermal methods.** Em Ohlsson, T., Bengtsson, N. (Ed), Minimal Processing Technologies in the Food Industry, p. 4-33, Cambridge: Woodhead publishing, 2002.

Oliveira, C.S., Gomes, F.S., Constant, L.S., Silva, L.F.M., Godoy, R.L.O., Tonon, R.V., Cabral, L.M.C. **Integrated membrane separation processes aiming to concentrate and purify lycopene from watermelon juice.** Innovative Food Science and Emerging Technologies, v. 38, p. 149–154, 2016.

Oliveira, L.P., Cesconetto, G., Schweitzer, B., Foppa, T. **Avaliação e composição nutricional da farinha de beterraba e sua utilização no preparo de sobremesas.** Jornada Interdisciplinar da Saúde. Anais de Congresso. Caçador, SC: Uniarp n.1, p. 13–19, 2013.

Paciulli, M., Medina-Meza, I.G., Chiavaro, E., Barbosa-Cánovas, G.V. **Impact of thermal and high pressure processing on quality parameters of beetroot (*Beta vulgaris* L.).** LWT - Food Science and Technology, v. 68, p. 98-104, 2016.

Patil, G., Raghavarao, K.S.M.S. **Integrated membrane process for the concentration of anthocyanin.** Journal of Food Engineering, v. 78, p. 1233–1239, 2007.

Peschel, W., Sánchez-Rabaneda, F., Diekmann, W., Plescher, A., Gartzía, I., Jiménez, D., Lamuela-Raventós, R., Buxaderas, S., Codina, C. **An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes.** Food Chemistry, n. 97, p. 137–150, 2006.

Piyasena, P., McKellar, R.C., Bartlett F.M. **Thermal inactivation of *Pediococcus* sp. in simulated apple cider during high-temperature short-time pasteurization.** International Journal of Food Microbiology, v. 82, p. 25– 31, 2003.

Poletto, P., Renosto, D.R., Baldasso, C., Zeni, M., Silveira, M.M. **Activated charcoal and microfiltration as pretreatment before ultrafiltration of pectinases produced by *Aspergillus niger* in solid-state cultivation.** Separation and Purification Technology, v. 151, p. 102–107, 2015.

Radhakrishnan, K., Sivarajan, M., Babuskin, S., Archana, G., Babu, P.A.S., Sukumar, M. **Kinetic modeling of spice extraction from *S. aromaticum* and *C. cássia*.** Journal of Food Engineering, v. 117, p. 326–332, 2013.

Ravichandran, K., Saw, N.M.M.T., Mohdaly, A.A.A., Gabr, A.M.M., Kastell, A., Riedel, H., Cai, Z., Knorr, D., Smetanska, I. **Impact of processing of red beet on betalain content and antioxidant activity.** Food Research International, n. 50, p. 670-675, 2103.

Roque, L., Escudero, I., Benito, J.M. **Lactic acid recovery by microfiltration using niosomes as extraction agents.** Separation and Purification Technology, v. 151, p. 1–13, 2015.

Rudrappa, T., Neelwarne, B., Kumar, V., Lakshmanan, V., Venkataramareddy, S.R., Aswanthararayana, R.G. **Peroxidase production from hairy root cultures of red beet (*Beta vulgaris*).** Electronic Journal of Biotechnology, v. 8, n. 2, p. 185–196, 2005.

Saguy, I. **Thermostability of Red Beet Pigments (Betanine and Vulgaxanthin-I): Influence of pH and Temperature.** Journal of Food Science, n. 44, p. 1554-1555, 1979.

Sampedro, F., Geveke, D.J., Fan, X., Zhang, H.Q. **Effect of PEF, HPP and thermal treatment on PME inactivation and volatile compounds concentration of an orange juice–milk based beverage.** Innovative Food Science and Emerging Technologies, n. 10, p. 463–469, 2009.

Shibeshi, K., Farid, M.M. **Pressure-assisted thermal sterilization of soup.** High Pressure Research, v. 30, N. 4, p. 530–537, 2010.

Shui, G., Leong, L.P. **Residue from star fruit as valuable source for functional food ingredients and antioxidant nutraceuticals.** Food Chemistry, v. 97, p. 277–284, 2006.

Stintzing, F.C., Carle, R. **Analysis of Betalains.** Em C. Socaciu (Ed.), Food colorantes: Chemical and Functional Properties, p. 507-520, CRC Press: Boca Raton, 2008b.

Stintzing, F.C., Carle, R. **Betalains – emerging prospects for food scientists.** Trends in Food Science & Technology, n. 18, p. 514 - 525, 2007.

Stintzing, F.C., Carle, R. **Betalains in Food: Occurrence, Stability, and Postharvest Modifications.** Em C. Socaciu (Ed.), Food colorantes: Chemical and Functional Properties, p. 277-299, CRC Press: Boca Raton, 2008a.

Stintzing, F.C., Carle, R. **Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition.** Trends in Food Science & Technology, n. 15, p. 19–38, 2004.

Stintzing, F.C., Trichterborn, J., Carle, R. **Characterisation of anthocyanin–betalain mixtures for food colouring by chromatic and HPLC-DAD-MS analyses.** Food Chemistry, n. 94, p. 296–309, 2006.

TACO. **Tabela brasileira de composição de alimentos.** 4ªed. Campinas: NEPA-UNICAMP, 2011.

Tivelli, S.W., Factor, T.L., Teramoto, J.R.S., Fabri, E.G., Moraes, A.R.A. de, Trani, P.E., May, A. **Beterraba: do plantio à comercialização.** Série Tecnologia APTA. Boletim Técnico IAC, 210. Campinas: Instituto Agrônômico, 2011.

- Tomás-Barberán, F.A., Espín, J.C. **Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables.** Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 81, p. 853 - 876, 2001.
- Tyler, L.D., Acree, T.E., Becker, R.F., Nelson, R.R., Butts, R.M. **Effect of maturity, cultivar, field history, and the operations of peeling and coring on the geosmin content of *Beta Vulgaris*.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, n. 26, p. 1466-1469, 1978.
- Tyler, L.D., Acree, T.E., Smith, N.L. **Sensory evaluation of geosmin in juice made from cooked beets.** Journal of Food Science, n. 44, p. 79-81, 1979.
- Vergara, C., Saavedra, J., Sáenz, C., García, P., Robert, P. **Microencapsulation of pulp and ultrafiltered cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) extracts and betanin stability during storage.** Food Chemistry, n. 157, p. 246-251, 2014.
- Vetal, M.D., Rathod, V.K. **Three phase partitioning a novel technique for purification of peroxidase from orange peels (*Citrus sinenses*).** Food and Bioproducts Processing, v. 94, p. 284–289, 2015.
- Vladislavljević, G.T., Vukosavljević, P., Veljović, M.S. **Clarification of red raspberry juice using microfiltration with gas backwashing: A viable strategy to maximize permeate flux and minimize a loss of anthocyanins.** Food and Bioproducts Processing, v. 91, p. 473 – 480, 2013.
- von Elbe, J.H., Schwartz, S.J., Hildenbrand, B.E. **Loss and Regeneration of Betacyanin Pigments During Processing of Red Beets.** Journal of Food Science, v. 46, n. 6, p. 1713–1715, 1981.
- Vulić, J., Čanadanović-Brunet, J., Četković, G., Tumbas, V., Djilas, S., Četojević-Simin, D., Čanadanović, V. **Antioxidant and cell growth activities of beet root pomace extracts.** Journal of Functional Foods, v. 4, p. 670-678, 2012.
- Walker, J.R.L. **Expression and measurement of enzyme activity.** Current protocols in food analytical chemistry, John Wiley & Sons, Inc, p. C4.1.1–C4.1.15, 2001.
- Woo, Y.C. Lee, J.J., Tijing, L.D., Shon, H.K., Yao, M., Kim, H. **Characteristics of membrane fouling by consecutive chemical cleaning in pressurized ultrafiltration as pre-treatment of seawater desalination.** Desalination, v. 369, p. 51–61, 2015.
- Wolf, A.B., Wibisono, R., Farr, J., Hallett, I., Richter, L., Oey, I., Wohlers, M., Zhou, J., Fletcher, G.C., Requejo-Jackman, C. **Effect of high pressure processing on avocado slices.** Innovative Food Science and Emerging Technologies, n. 18, p. 65–73, 2013.
- Wootton-Beard, P.C., Ryan, L. **A beetroot juice shot is a significant and convenient source of bioaccessible antioxidants.** Journal of functional foods, v. 3, p. 329–334, 2011.
- Yong, G. **Enzymatic Engineering.** Science Press, Oxford, U.K. Alpha Science International Ltd.: Beijing, 2014.
- Yu, W., Graham, N.J.D. **Performance of an integrated granular media – Ultrafiltration membrane process for drinking water treatment.** Journal of Membrane Science, v. 492, p. 164 – 172, 2015.

Zaghdoudi, K., Pontvianne, S., Framboisier, X., Achard, M., Kudaibergenova, R., Ayadi-Trabelsi, M., Kalthoum-cherif, J., Vanderesse, R., Frochot, C., Guiavarc'h, Y. **Accelerated solvent extraction of carotenoids from: Tunisian Kaki (*Diospyros kaki L.*), peach (*Prunus persica L.*) and apricot (*Prunus armeniaca L.*)**. Food Chemistry, v. 184, p. 131 – 139, 2015.

Zakharova, N.S., Petrova, T.A.  **$\beta$ -Glucosidases from Leaves and Roots of the Common Beet, *Beta vulgaris***. Applied Biochemistry and Microbiology, v. 36, n. 4, p. 394-397, 2000.

Zhang, Y., Liu, X.C., Wang, Y., Zhao, F., Sun, Z., Liao, X. **Quality comparison of carrot juices processed by high-pressure processing and high-temperature short-time processing**. Innovative Food Science and Emerging Technologies, v. 33, p. 135–144, 2016.