

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

**Estudo de diferentes formas de processamento do
mirtilo visando à preservação dos compostos
antociânicos**

TESE DE DOUTORADO

Carolina Pereira Kechinski

Porto Alegre

2011

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

**Estudo de diferentes formas de processamento do
mirtilo visando à preservação dos compostos
antociânicos**

Carolina Pereira Kechinski

Tese de doutorado apresentada como requisito parcial
para o título de Doutor em Engenharia.

Área de concentração: Fenômenos de Transporte e
Operações Unitárias.

Orientadoras:

Prof.^ª Dr.^ª Ligia Damasceno Ferreira Marczak

Prof.^ª Dr.^ª Isabel Cristina Tessaro

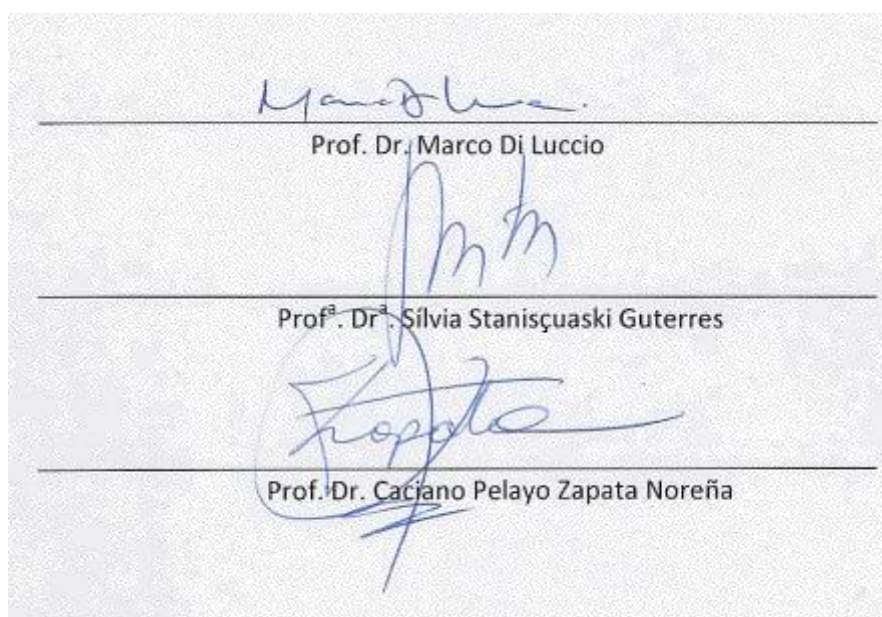
Porto Alegre

2011

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 Defesa da Tese intitulada “Estudo de diferentes formas de processamento do mirtilo visando à preservação dos compostos antociânicos” elaborada por Carolina Pereira Kechinski, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Engenharia.

Comissão Examinadora:



Prof. Dr. Marco Di Luccio

Prof.^a Dr.^a Silvia Stanisquaski Guterres

Prof. Dr. Cacijano Pelayo Zapata Noreña

Não basta dar os passos que nos devem levar um dia ao objetivo, cada passo deve ser ele próprio um objetivo em si mesmo, ao mesmo tempo que nos leva para diante.

(Johann Goethe)

Agradecimentos

A Deus, pelo dom da vida, sabedoria e por sempre iluminar meu caminho.

Ao meu esposo Rogério e ao meu amado filho João Vítor, que são a razão da minha energia, persistência e luta.

À minha mãe Miracy pelo apoio incondicional nos momentos mais difíceis.

Aos meus irmãos Ricardo, Mirvânia, Telmo, Cláudio e Renata, pessoas que representaram, para mim, a união nos momentos importantes.

Ao meu pai que, *in memoriam*, sempre foi um exemplo de coragem, amor, determinação, retidão e perseverança.

Às minhas orientadoras, Ligia e Isabel, que exerceram mais do que uma orientação a um trabalho científico, pois foram amigas com quem interagi tantos anos e com quem participei de lutas que me trouxeram cada vez mais experiência e amadurecimento e, sem dúvida, ambas são professoras no sentido mais amplo da palavra.

Ao Prof. Nilo que mostrou-me o lado fascinante da reologia e abrigou-me em seu laboratório, propiciando um ambiente de trabalho favorável e foi, sem dúvida, um facilitador de minha jornada.

Aos membros da banca que colaboraram com a revisão técnica desse trabalho e se disponibilizaram a participar dos nossos encontros mesmo em seus merecidos períodos de férias.

À equipe dos laboratórios da UFRGS, como a Tatiana, Eduardo e Marco (DEQUI) e o Roberval (ICTA), pessoas incansáveis em ajudar e, sem as quais, não seria possível realizar a grande parte dos meus trabalhos.

Aos bolsistas Pâmela, Raquel, Débora, Daiane, Bruna, Ana, Guilherme e Fernanda pela ajuda nos experimentos e socorro nos apuros do laboratório, por sua responsabilidade, dedicação e ajuda incansáveis. Amigos, vocês vão longe!

Ao Grupo FENOP pelo apoio nos momentos difíceis, pela troca de experiências e polos grandes momentos de confraternização.

Às amigas Florencia e Roberta pelo constante apoio incondicional, orientações e compreensão não apenas no âmbito técnico como emocional.

Às empresas Italbraz® e Niceberry®, por intermédio da sua Engenheira Agrônoma Laudete Maria Sartoretto, agradeço pela atenção, ensinamentos e fornecimento dos frutos.

Meus agradecimentos especiais a esta Universidade, seus Professores e Funcionários, pois são responsáveis pela minha formação.

Ao CNPQ pelo apoio, financiando uma bolsa para esta pesquisa.

A todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

Os meus mais sinceros agradecimentos.

MUITO OBRIGADA!

Sumário

1	Introdução	1
2	O Mirtilo ou <i>Blueberry</i>	5
2.1	Aspectos Gerais	5
2.1.1	Classificação	6
2.1.2	Tipos de Planta	6
2.1.3	Cultivares	8
2.2	Características Físico-químicas e Nutricionais do Mirtilo	12
2.3	Aspectos Produtivos e Econômicos do Mirtilo	15
2.4	Considerações Finais	19
3	Estudo da Estabilidade das Antocianinas em Suco de Mirtilo frente ao Tratamento Térmico	20
3.1	Fundamentos Teóricos e Revisão Bibliográfica	21
3.1.1	Estrutura química das antocianinas	22
3.1.2	Fatores que afetam a estabilidade das antocianinas	24
3.1.3	Métodos de análise qualitativa e quantitativa de antocianinas	26
3.1.4	Cinética de Degradação de Nutrientes	27
3.2	Materiais e Métodos	31
3.2.1	Materiais	31
3.2.2	Estudos de degradação térmica	31
3.2.3	Determinação do teor de antocianinas monoméricas	32
3.2.4	Estudos Cinéticos de Degradação	34
3.2.5	Cálculo das funções termodinâmicas	35

3.3 Resultados e Discussão.....	35
3.4 Conclusões.....	39
4 Obtenção do Suco de Mirtilo por Diferentes Técnicas.....	40
4.1 Fundamentos Teóricos e Revisão Bibliográfica.....	41
4.1.1 Definições de suco e legislação.....	42
4.1.2 Operações unitárias envolvidas no processamento de sucos.....	43
4.1.3 Alternativas tecnológicas para o processamento de sucos.....	46
4.1.4 Alterações de qualidade do suco de mirtilo durante o processamento.....	50
4.2 Materiais e Métodos.....	51
4.2.1 Materiais.....	51
4.2.2 Metodologia para o Processamento do Suco.....	52
4.2.3 Análises físico-químicas e reológicas.....	54
4.2.4 Planejamento dos Experimentos e Análise estatística.....	55
4.3 Resultados e discussão.....	56
4.3.1 Comparação entre os sucos de mirtilo extraídos por diferentes métodos.....	56
4.3.2 Seleção do tipo de enzima para extração do suco.....	59
4.3.3 Determinação da melhor condição de extração enzimática.....	60
4.4 Conclusões.....	65
5 Inativação da Polifenoloxidase do Suco de Mirtilo Mediante Tratamento Térmico.....	66
5.1 Fundamentos Teóricos e Revisão Bibliográfica.....	67
5.1.1 Ação das Enzimas nos Derivados de Frutas.....	67
5.1.2 Características Gerais da Polifenoloxidase (PPO).....	68
5.1.3 Efeitos da atividade da PPO em alimentos.....	69
5.1.4 Efeito de substâncias químicas na atividade de polifenoloxidase: inibidores e ativadores.....	70
5.2 Materiais e Métodos.....	72
5.2.1 Preparação do extrato enzimático.....	72
5.2.2 Determinação da Atividade da PPO solúvel.....	72
5.2.3 Tratamento Térmico.....	73

5.2.4 Desenho Experimental e Análise Estatística	73
5.3 Resultados e Discussão.....	75
5.4 Conclusões.....	78
6 Estudo sobre a Redução da Atividade da Peroxidase do Suco de Mirtilo por Ultrafiltração	79
6.1 Fundamentos Teóricos e Revisão Bibliográfica.....	80
6.1.1 Definição e Classificação dos Processos de Separação com Membranas (PSM)	80
6.1.2 Processos que Utilizam o Gradiente de Pressão como Força Motriz.....	81
6.1.3 Membranas: definição, características, morfologia, material e configuração	83
6.1.3 Parâmetros Característicos de Processo	85
6.1.4 Fenômenos que limitam o fluxo de permeado	89
6.1.5 Ultrafiltração.....	91
6.1.6 Peroxidase	94
6.2 Materiais e Métodos	97
6.2.1 Suco de Mirtilo Despectinizado	97
6.2.2 Membranas.....	97
6.2.3 Sistema de Ultrafiltração	98
6.2.4 Compactação e Permeabilidade Hidráulica das Membranas	99
6.2.5 Caracterização das Membranas por Medidas de Retenção e Microscopia Eletrônica de Varredura	100
6.2.6 Experimentos de ultrafiltração com suco de mirtilo.....	100
6.2.7 Limpeza do Sistema, Recuperação da Membrana e análise da Tendência ao “Fouling”	101
6.2.8 Planejamento dos Experimentos e Análise Estatística.....	102
6.2.9 Determinação do Fluxo Médio	103
6.2.10 Determinação da Atividade da Peroxidase	103
6.2.11 Quantificação das Antocianidinas	103
6.3 Resultados e Discussão.....	104
6.3.1 Compactação das Membranas	104
6.3.2 Permeabilidade Hidráulica	106
6.3.3 Caracterização das Membranas por Medidas de Retenção.....	107

6.3.4 Ultrafiltração do Suco de Mirtilo Clarificado	110
6.4 Conclusões	127
7 Extração de Antocianinas do Bagaço de Mirtilo	129
7.1 Fundamentos Teóricos e Revisão Bibliográfica	130
7.1.1 Antocianinas como Corantes Naturais e suas Alterações Físico-Químicas.....	130
7.1.2 Extração de antocianinas do bagaço de frutas.....	131
7.2 Materiais e Métodos	133
7.2.1 O bagaço de mirtilo	133
7.2.2 Extração das antocianinas do bagaço de mirtilo.....	133
7.2.3 Planejamento Fatorial da Extração e Análise Estatística.....	134
7.2.4 Quantificação das Antocianinas Monoméricas Totais	134
7.2.5 Quantificação das Antocianidinas	135
7.3 Resultados e Discussão.....	135
7.3.1 Efeito da Concentração de Etanol e do pH na Extração de Antocininas Monoméricas Totais	135
7.3.2 Efeito da Concentração de Etanol e do pH na Extração de Antocianidinas.....	138
7.4 Conclusões.....	142
8 Validação da Metodologia Analítica por Cromatografia Líquida para a Separação e Quantificação de Antocianinas Extraídas do Bagaço de Mirtilo.....	143
8.1 Fundamentos Teóricos e Revisão Bibliográfica	144
8.1.1 Conceitos básicos para o processo de validação.....	145
8.1.2 Aspectos de Legislação	146
8.1.3 Processo de Validação	147
8.1.4 Parâmetros analíticos para a validação de métodos	148
8.1.5 Alternativas para a extração, separação e quantificação de compostos antociânicos	154
8.1.6 Estudos envolvendo cromatografia líquida para análise de antocianinas em frutas e derivados	157
8.2 Materiais e Métodos	159
8.2.1 Materiais.....	159

8.2.2	Identificação e Quantificação das Antocianidinas	159
8.2.3	Parâmetros Analíticos de Validação	161
8.3	Resultados e Discussão	163
8.3.1	Validação da Metodologia Analítica	163
8.3.2	Caracterização do extrato etanólico obtido a partir do bagaço de mirtilo	172
8.4	Conclusões	174
9	Micropartículas Ricas em Antocianinas Extraídas do Bagaço de Mirtilo por Liofilização	176
9.1	Fundamentos Teóricos e Revisão Bibliográfica	177
9.1.1	Microencapsulação de Alimentos	177
9.1.2	Agentes Microencapsulantes	178
9.1.3	Principais Métodos de Encapsulação	180
9.1.4	Caracterização das Micropartículas	182
9.1.4.1	Avaliação morfológica	182
9.1.4.2	Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	183
9.1.4.3	Distribuição de tamanho de partícula	184
9.1.4.4	Fotoestabilidade	184
9.1.4.5	Testes de Dissolução em Água	185
9.1.4.6	Avaliação da Cor	185
9.2	Materiais e Métodos	187
9.2.1	Preparo das Micropartículas e Planejamento Fatorial	187
9.2.3	Caracterização das Micropartículas	188
9.2.4	Análise Estatística	191
9.3	Resultados e Discussão	192
9.3.1	Avaliação Morfológica	192
9.3.2	Distribuição de Tamanho de Partícula	194
9.3.3	Dissolução em água	197
9.3.4	Análise de Cor	199
9.3.5	Teor de Antocianinas	203
9.3.6	Fotoestabilidade	208

9.4 Conclusões.....	212
10 Reologia do Purê de Mirtilo.....	213
10.1 Fundamentos Teóricos e Revisão Bibliográfica.....	215
10.1.1 Fundamentos de Reologia de Alimentos.....	215
10.1.2 Reometria de Alimentos.....	219
10.1.3 Modelos Reológicos em estado estacionário.....	221
10.1.4 Estudos reológicos em derivados de frutas.....	223
10.2 Materiais e Métodos.....	224
10.2.1 Materiais.....	224
10.2.2 Testes Reológicos.....	225
10.2.3 Desenho experimental e análise estatística.....	225
10.2.4 Modelos Reológicos.....	226
10.3 Resultados e Discussão.....	227
10.3.1 Descrição geral do comportamento reológico apresentado pelas formulações de purê de mirtilo.....	228
10.3.2 Efeito da composição sobre o comportamento pseudoplástico de purês de mirtilo.....	229
10.3.3 Dependência com o tempo das Amostras.....	234
10.4 Conclusões.....	236
11 Considerações Finais.....	238
12 Sugestões para Trabalhos Futuros.....	243
Referências Bibliográficas.....	244
Anexo A.4.....	278
Anexo A.5.....	279
Anexo A.6.....	280
Anexo A.7.....	283
Anexo A.9.....	285
Anexo A.10.....	289
Anexo B.10.....	291

Lista de Figuras

Figura 2.1 Dados de valores e volumes de importação e exportação de mirtilos no período de 2003 a 2008.	18
Figura 3.1 Estrutura química da molécula de antocianina.....	23
Figura 3.2 Formas estruturais de antocianinas em diferentes valores de pH.....	23
Figura 3.3 Características espectrais de antocianinas de rabanete purificadas (derivados acilados de pelargonidina-3-soforosídeo-5-glicosídeo) em soluções tampão de pH 1,0 e pH 4,5	25
Figura 3.4 Espectro de absorvância entre os comprimentos de 500 a 540 nm para o suco de mirtilo com 8,9 °Brix.....	32
Figura 3.5 Degradação de antocianinas em em suco de mirtilo (8,9 ° Brix) durante o aquecimento a 40, 50, 60, 70 e 80 °C.....	36
Figura 3.6 Ajuste da Equação de Arrhenius para a avaliação da dependência da temperatura durante a degradação de antocianinas em suco de mirtilo.	38
Figura 4.1 Fluxograma simplificado das etapas do processamento de diversos tipos de sucos de fruta variando a forma de conservação.	44
Figura 4.2 Fluxograma de processamento do suco de mirtilo para 4 (quatro) métodos de extração: tratamento enzimático, desintegração, arraste a vapor e centrifugação.	52
Figura 4.3 Imagem da Prensa Hidráulica utilizada para a extração do suco de mirtilo.....	53
Figura 4.4 Imagem do viscosímetro capilar utilizado nos testes de viscosidade do suco de mirtilo.....	55

Figura 4.5 Curvas de contorno em função da temperatura e da concentração da enzima NZ103 para: (a) viscosidade, (b) teor de antocianinas e (c) índice de refração.....	64
Figura 5.1 Reação entre o catecol e o oxigênio formando o-quinona, catalisada pela polifenoloxidase (PPO).	73
Figura 5.2 Absorbância da amostra subtraída da absorbância do branco em função do tempo para os diferentes tratamentos térmicos.....	75
Figura 5.3 Curva de contorno da atividade de PPO em polpa de mirtilo.	78
Figura 6.1 Características de separação (força motriz e tamanhos de poros) dos processos de separação por membranas que utilizam a pressão como força motriz.	82
Figura 6.2 Representação esquemática da seção transversal dos diferentes tipos de morfologia de membranas sintéticas.....	83
Figura 6.3 Tipos de configuração dos módulos de membranas; a) Tubular; b) Fibra oca; c) Placa e quadro; e d) Espiral.....	85
Figura 6.4 Configuração do escoamento nos PSM: transversal (deadend) e tangencial (cross-flow).....	88
Figura 6.5 Desenho esquemático do processo de separação por UF evidenciando as substâncias que são retidas e permeadas durante o processo.	91
Figura 6.6 Fluxograma simplificado do sistema de ultrafiltração.	98
Figura 6.7 Fotografia do sistema de ultrafiltração utilizado.	99
Figura 6.8 Fluxo de permeado em função do tempo para os experimentos de compactação das membrana de 10 e 30 kDa (eixo principal) e da membrana de 50 kDa (eixo secundário) durante 3 momentos de compactação em dias consecutivos.	105
Figura 6.9 Fluxo permeado de água em função da pressão para a membrana de 30 kDa.....	106
Figura 6.10 Retenção observada em função do fluxo permeado para soluções de PEG 6, 10, 20 e 35 kDa para a membrana de 30 kDa.	108
Figura 6.11 Fluxo de permeado em função da retenção observada do soluto quando permeadas soluções de PEG 6, 10, 20 e 35 kDa para a membrana de 50 kDa.	109
Figura 6.12 Fluxo de permeado em função da pressão para o suco de mirtilo a 12°Brix para a membrana de 10 kDa.	111

Figura 6.13 Fluxo de permeado em função do tempo para os experimentos com a membrana de 10kDa para o suco de mirtilo.	112
Figura 6.14 Fluxo de permeado em função do tempo para a ultrafiltração do suco de mirtilo com a membrana de 30 kDa.	113
Figura 6.15 Fluxo de permeado em função do tempo para os experimentos de ultrafiltração do suco de mirtilo com a membrana de 50 kDa.....	114
Figura 6.16 Grafico de Pareto para análise de efeito das variáveis estudadas na retenção do conteúdo de antocianinas totais monoméricas em diferentes pontos do planejamento experimental.....	116
Figura 6.17 Fluxo de permeado com água destilada em função da pressão em três momentos: antes da passagem do suco (a 8°Brix) pelo sistema, depois da passagem do suco e depois da limpeza.	117
Figura 6.18 Fotomicrografias para a membrana de 30 kDa.	118
Figura 6.19 Grafico de Pareto para análise de efeito das variáveis estudadas na retenção do conteúdo de antocianinas totais monoméricas em diferentes pontos do planejamento experimental.....	122
Figura 6.20 Gráfico de Pareto para análise de efeito das variáveis estudadas na retenção de delphinidina durante a ultrafiltração do suco de mirtilo: MMC, °Brix e temperatura.	124
Figura 6.21 Grafico de Pareto para análise de efeito das variáveis estudadas na retenção de malvidina durante a ultrafiltração do suco de mirtilo: MMC, °Brix e temperatura.	125
Figura 6.22 Gráfico de Pareto para análise de efeito das variáveis estudadas na inativação da peroxidase durante a ultrafiltração do suco de mirtilo.	127
Figura 7.1 Curva de contorno para o teor de antocianina total monomérica (mg/100g) em função do pH e concentração de etanol.....	138
Figura 7.2 Curvas de contorno em função da concentração de etanol e do pH para: (a) delphinidina, (b) cianidina e (c) malvidina.	141
Figura 8.1 Perfil cromatográfico obtido por CLAE das antocianidinas presentes no extrato etanólico proveniente do bagaço de mirtilo.	164
Figura 9.1 Ilustração da característica morfológica das partículas de polifenólicos produzidos por liofilização.....	181
Figura 9.2 Micrografias de micropartículas de (a) extrato de betalainas de opuntia com maltodextrina (Saénz et al., 2009); (b) extrato dos frutos de pupunha com	

maltodextrina (Osorio et al., 2010); e (c) extrato de cenoura preta com maltodextrina (Ersus e Yurdagel, 2007).	183
Figura 9.3 Micrografias de micropartículas de suco de durio (<i>Durio zibethinus</i> Murr) com maltodextrina secos por: (a) atomização e (b) liofilização. Fonte: (Man et al., 1999).	183
Figura 9.4 Coordenadas do sistema CIE Lab de cor.	186
Figura 9.5 Espaço cromático para o ângulo Hue.....	187
Figura 9.6 Micrografias das micropartículas de extrato etanólico rico em antocianinas obtidas do bagaço de mirtilo com diferentes formulações.....	194
Figura 9.7 Distribuição do tamanho das partículas para os pós produzidos pelas diferentes formulações.....	195
Figura 9.8 Curva de contorno para o tamanho médio de partículas (μm) dos microparticulados em função da formulação.....	196
Figura 9.9 Gráfico de Pareto para análise de efeito do índice de polidispersão dos microencapsulados em função da formulação.	197
Figura 9.10 Curva de contorno para a dissolução dos microparticulados em função da formulação.....	199
Figura 9.11 Curva de contorno para a luminosidade (L^*) dos microparticulados em função da formulação.	201
Figura 9.12 Curva de contorno para o croma dos microparticulados em função da formulação.	202
Figura 9.13 Curva de contorno para o ângulo de cor ($^{\circ}\text{Hue}$), em módulo, dos microparticulados em função da formulação.....	203
Figura 9.14 Gráfico de Pareto para análise de efeito das variáveis de estudo sobre o teor de antocianinas totais monoméricas dos microparticulados em função da formulação.	205
Figura 9.15 Gráfico de Pareto para análise de efeito da formulação no teor de delphinidina.....	206
Figura 9.16 Curva de contorno para o teor de cianidina (mg/100g) dos microparticulados em função da formulação.....	207
Figura 9.17 Curva de contorno para o teor de malvidina dos microparticulados em função da formulação.	208

Figura 9.18 Gráficos obtidos para a fotoestabilidade dos parâmetros de cor (luminosidade, croma e ângulo de cor) dos microparticulados de acordo com as diferentes formulações.....	209
Figura 9.19 Fotoestabilidade do conteúdo de antocianinas totais monoméricas dos microparticulados de acordo com as diferentes formulações.	210
Figura 9.20 Classificação do comportamento reológico dos fluidos.	217
Figura 9.21 Curvas de escoamento típicas de fluidos independentes do tempo.	218
Figura 9.22 Curvas de escoamento para vários tipos de fluidos dependentes do tempo.....	219
Figura 9.23 Curvas de taxa de deformação ascendente e descendente para purê de mirtilo (Formulação 19).....	228
Figura 9.24 Curvas de taxa de deformação descendente (em escala logarítmica) para purê de mirtilo formulado com 2,5 % de Goma Xantana e 15 % de frutose avaliados nas temperaturas de 27, 40, 50, 60, 70, 80 e 93 °C.....	229
Figura 9.25 Comportamento reológico de purê de mirtilo para diferentes percentuais de Goma Xantana: (a) 2 %; (b) 3 % e (c) 2,5 %.....	230
Figura 9.26 Valores experimentais e preditos pelos modelos de Casson e Sisko para o Tratamento 15 (ponto central).	232
Figura 9.27 Curva de Contorno para o limite de escoamento de Casson (k_{0C}) para amostras com 15% de frutose.....	233
Figura 9.28 Curva de Contorno para a viscosidade plástica de Casson (K_C) para amostras com 15% de frutose.....	234
Figura 9.29 Curva de contorno para a dependência com o tempo do purê de mirtilo em função da formulação para temperatura de 40°C.	236

Lista de Tabelas

Tabela 2.1 Aspectos relativos às diferentes cultivares do mirtilo.....	10
Tabela 2.2 Composição nutricional do mirtilo em 100 g de fruto.....	13
Tabela 3.1 Valores de k , $t_{1/2}$ e do coeficiente de correlação obtidos para diferentes temperaturas no estudo da degradação de antocianinas do suco de mirtilo.	37
Tabela 3.2 Valores de Q_{10} obtidos para diferentes temperaturas no estudo da degradação de antocianinas do suco de mirtilo.	38
Tabela 4.1 Valores utilizados no delineamento fatorial em função dos níveis para as variáveis de estudo (concentração da enzima NZ103 e da temperatura de extração) na extração de suco de mirtilo pelo método de um único estágio enzimático.	56
Tabela 4.2 Resultados para rendimento, teor de antocianinas monoméricas e índice de refração do suco de mirtilo extraído por desintegração, centrifugação, arraste a vapor e extração enzimática.....	57
Tabela 4.3 Comparação entre os resultados obtidos para o teor de antocianinas monoméricas, acidez total titulável, índice de refração e ratio para o suco de mirtilo extraído por desintegração, centrifugação, arraste a vapor e extração enzimática.	58
Tabela 4.4 Resultados de índice de refração, rendimento, cor, teor de antocianinas monoméricas e viscosidade de sucos extraídos de 40 °C com diferentes enzimas na concentração de 1%.	60
Tabela 4.5 Resultados para índice de refração, teor de antocianinas monoméricas e viscosidade de suco de mirtilo elaborado por extração enzimática com NZ103 variando a concentração da enzima e a temperatura de extração.....	61

Tabela 4.6 Valores para as constantes a_0 , a_1 , a_{12} , a_2 , a_{22} e a_{12} da Equação 4.2 para viscosidade, antocianina e índice de refração e os valores de $F_{\text{calculado}}$ e coeficientes de determinação (R^2) correspondentes.....	62
Tabela 5.1 Tempo e temperatura de inativação da PPO em diferentes fontes.	72
Tabela 5.2 Valores utilizados no delineamento fatorial em função dos níveis para as variáveis de estudo (tempo e temperatura) empregadas no tratamento térmico da polpa de mirtilo.	74
Tabela 5.3 Atividade da PPO (U/mL) para as diferentes combinações de tempo e temperatura do planejamento fatorial.	76
Tabela 6.1 Planejamento fatorial das variáveis de estudo (massa molar de corte, teor de sólidos solúveis e temperatura) empregado para ultrafiltração de suco de mirtilo durante 3 h a pressão de entrada de 3,5 bar.	102
Tabela 6.2 Valores de permeabilidade hidráulica para as membranas de 10, 30 e 50 kDa a temperaturas de 30, 40 e 50°C para pressões entre 2 e 5 bar e vazão de alimentação 40 L.h ⁻¹	107
Tabela 6.3 Retenção observada para os diferentes tamanhos de PEG em função da pressão para a membrana de 30 kDa.	108
Tabela 6.4 Retenção observada para os diferentes tamanhos de PEG em função da pressão para a membrana de 50 kDa.	109
Tabela 6.5 Resultados obtidos para o fluxo de permeado médio durante a ultrafiltração do suco de mirtilo para os diferentes experimentos do planejamento experimental: MMC das membranas, teor de sólidos inicial e temperatura.	115
Tabela 6.6 Valores de permeabilidade hidráulica (WP) antes e após a permeação do suco de mirtilo e determinação da tendência ao fouling para os diferentes pontos do planejamento experimental.....	119
Tabela 6.7 Resultados obtidos para a retenção de antocianinas totais monoméricas após 3 h de ultrafiltração do suco de mirtilo para os diferentes pontos do planejamento experimental.....	121
Tabela 6.8 Resultados obtidos para a retenção de antocianidinas (delfinidina e malvidina) para os diferentes pontos do planejamento experimental após 3 h de ultrafiltração suco de mirtilo.	123
Tabela 6.9 Resultados obtidos para a atividade da peroxidase para os fluxos de permeado e concentrado após 3 h de ultrafiltração do suco de mirtilo para todos os experimentos do planejamento experimental.....	126

Tabela 7.1 Valores utilizados no delineamento fatorial em função dos níveis para as variáveis de estudo (concentração de etanol e pH) empregadas para a extração de antocianinas do bagaço de mirtilo.	134
Tabela 7.2 Teores de antocianinas monoméricas totais para as diferentes amostras obtidas dos experimentos definidos no planejamento experimental.	136
Tabela 7.3 Resultados de concentração (em ppm) para as agliconas delfinidina, cianidina e malvidina extraídas do bagaço de mirtilo.	139
Tabela 7.4 Valores para as constantes a_0 , a_1 , a_{11} , a_2 , a_{22} e a_{12} da Equação 7.2 para delfinidina (Df), cianidina (Cy) e malvidina (Ml), coeficientes de determinação (R^2) e $F_{\text{calculado}}$ correspondentes.	140
Tabela 8.1 Parâmetros para validação de métodos analíticos do INMETRO e da ANVISA.	147
Tabela 8.2 Lista de referências relacionadas à separação dos pigmentos antociânicos em frutas e derivados.	158
Tabela 8.3 Área dos picos, expressos em mV, em relação às diferentes concentrações para cada aglicona com os seus respectivos desvios padrões.	167
Tabela 8.4 Análise estatística da falta de ajuste e regressão linear para as diferentes antocianidinas.	168
Tabela 8.5 Estimação dos parâmetros a e b da Equação 8.5 com os seus respectivos desvios padrão e coeficientes de correlação (R^2) para as diferentes antocianidinas.	169
Tabela 8.6 Estimação dos parâmetros DP_a e IC da Equação 8.6 e valores de limites de detecção e quantificação do método analítico para as diferentes antocianidinas.	170
Tabela 8.7 Valores de desvio padrão relativo à avaliação da precisão intermediária e da repetibilidade do método analítico para as diferentes antocianidinas.	171
Tabela 8.8 Valores de desvio padrão relativo (DPR) das áreas (mV) e de recuperação (%) para as diferentes agliconas a fim de avaliar a exatidão do método analítico.	172
Tabela 8.9 Caracterização e quantificação das antocianidinas do extrato etanólico obtido a partir do bagaço de mirtilo.	173
Tabela 9.1 Aplicações da microencapsulação por liofilização indústria de alimentos.	181

Tabela 9.2 Planejamento das formulações para os experimentos de microencapsulação.	188
Tabela 9.3 Resultados obtidos para o tamanho médio de partícula e para o índice de polidispersão para as diferentes formulações do planejamento experimental.....	195
Tabela 9.4 Resultados obtidos para a dissolução em água das partículas para as diferentes formulações do planejamento experimental.	198
Tabela 9.5 Resultados obtidos para os parâmetros de cor das partículas produzidas por diferentes formulações do planejamento experimental.	200
Tabela 9.6 Resultados obtidos para o conteúdo de antocianinas totais monoméricas das partículas produzidas por diferentes formulações do planejamento experimental.	204
Tabela 9.7 Conteúdo de antocianidinas das partículas produzidas por diferentes formulações do planejamento experimental.....	206
Tabela 9.8 Resultados para o valor do coeficiente cinético de degradação das antocianinas a luz ultravioleta (k), do tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) e do coeficiente de correlação da curva de ajuste (R^2) das partículas para as diferentes formulações do planejamento experimental.....	211
Tabela 9.9 Exemplos de relações para determinar a viscosidade em arranjos experimentais padrões.	221
Tabela 9.10 Modelos mais comumente utilizados de acordo com o tipo de alimento.	222
Tabela 9.11 Valores utilizados no delineamento fatorial em função dos níveis para as variáveis de estudo empregado para o purê de mirtilo.....	226
Tabela 9.12 Valores médios dos parâmetros estatísticos para os diferentes modelos.	231
Tabela 9.13 Valores de dependência com o tempo para as amostras de purê de mirtilo.....	235
Tabela A.7.1 Análise da Variância (ANOVA) dos resultados experimentais da extração de antocianinas do bagaço de mirtilo para as variáveis independentes pH e concentração de etanol.	283
Tabela A.7.2 Resultados da Análise de Variância (ANOVA) para as diferentes agliconas obtidas durante a extração de antocianidinas do bagaço de mirtilo.	284
Tabela A.10.1 Análise de Variância para o limite de escoamento de Casson (k_{0C}).	289
Tabela A.10.2 Análise de Variância para a viscosidade plástica de Casson (K_C).	289

Tabela A.10.3 Análise de Variância para a dependência com o tempo.	290
Tabela B.10.1 Resultados da estimação para os parâmetros dos modelos de Bingham, Ostwald-de-Walle e Casson.	291
Tabela B.10.2 Resultados da estimação para os parâmetros do modelo de Mizrahi-Berk.	291
Tabela B.10.3 Resultados da estimação para os parâmetros do modelo de Herschel-Bulkley.	292
Tabela B.10.4 Resultados da estimação para os parâmetros do modelo de Sisko. .	292

Lista de Símbolos

Capítulo 3

ε	Coeficiente de Extinção Molar	$\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$
C_0	Concentração inicial ($t=0$)	g.L^{-1}
C_t	Concentração após certo tempo (t)	g.L^{-1}
E_a	Energia de Ativação	J.mol^{-1}
FD	Fator de Diluição	Adimensional
h	Constante de Plank	$6,626 \times 10^{-34} \text{ J.s}^{-1}.\text{K}^{-1}$
k	Constante cinética de primeira ordem	min^{-1}
k_0	Fator de frequência	min^{-1}
k_B	Constante de Boltzmann	$1,381 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$
L	Caminho ótico da cubeta	cm
M	Massa Molar	g.mol^{-1}
MA	Antocianinas Monoméricas	mg cianidina 3- glicosídeo/100mL de suco
n	Número de mols	Mol
Q_{10}	Coeficiente de Temperatura	Adimensional
R	Constante universal dos gases	$8,314 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$
t	Tempo	min
T	Temperatura Absoluta	K
$t_{1/2}$	Tempo de meia-vida	min

V_{Suco}	Volume de suco	mL
V_T	Volume de tampão fosfato	mL
ΔG	Energia livre de Gibbs	J.mol ⁻¹
ΔH	Entalpia	J.mol ⁻¹
ΔS	Entropia	J. mol ⁻¹ .K ⁻¹
θ	$\theta=(k_B \cdot T/h)$	Adimensional

Capítulo 4

M_{suco}	Massa de suco	g
M_{fruto}	Massa de fruto	g

Capítulo 6

J_p	Fluxo de Permeado	L·m ⁻² ·s ⁻¹
V	Volume de Permeado Coletado	L
A	Área Permeável do Módulo da Membrana	m ²
t	tempo para coletar o permeado	s
L_p	constante de proporcionalidade conhecida como permeabilidade da membrana	L·m ⁻² ·h ⁻¹ ·bar ⁻¹
$\partial P / \partial x$	Gradiente de pressão através da membrana	bar·m ⁻¹
R_{obs}	Resistência percentual observada	
C_p	Concentração do Permeado	g·L ⁻¹
C_b	Concentração da Alimentação (bulk) do fluido recirculante	g·L ⁻¹
WPa	Permeabilidade à água destilada antes da permeação com suco	L·m ⁻² ·h ⁻¹ ·bar ⁻¹
WPd	Permeabilidade à água destilada depois da permeação com suco	L·m ⁻² ·h ⁻¹ ·bar ⁻¹
J_{med}	Fluxo médio	L·m ⁻² ·s ⁻¹

Capítulo 10

Ω	Velocidade angular	rad.s^{-1}
α	Ângulo formado entre o cone e o prato	Rad
Ω_e	Velocidade angular no cilindro externo	rad.s^{-1}
Ω_i	Velocidade angular no cilindro interno	rad.s^{-1}
K_C	Índice de consistência de Casson	$\text{Pa}^{0,5} \cdot \text{s}^{0,5}$
K_{HB}	Índice de consistência de Herschel-Bulkley	$\text{Pa} \cdot \text{s}^{n_{HB}}$
K_{MB}	Índice de consistência de Mizrahi-Berk	$\text{Pa}^{0,5} \cdot \text{s}^{n_{MB}}$
K_{OW}	Índice de consistência de Oswald-de Waele	$\text{Pa} \cdot \text{s}^n$
K_S	Índice de consistência de Sisko	$\text{Pa} \cdot \text{s}^{n_S-1}$
k_{0C}	Tensão de cisalhamento inicial de Casson	$\text{Pa}^{0,5}$
k_{0MB}	Tensão de cisalhamento inicial de Mizrahi-Berk	$\text{Pa}^{0,5}$
n_{HB}	Índice de comportamento do fluido de Herschel-Bulkley	adimensional
n_{MB}	Índice de comportamento do fluido de Mizrahi-Berk	adimensional
n_{OW}	Índice de comportamento do fluido de Oswald-de Waele	adimensional
n_S	Índice de comportamento do fluido de Sisko	adimensional
$\dot{\gamma}$	Taxa de deformação	s^{-1}
η_∞	Viscosidade para taxa de deformação infinita	$\text{Pa} \cdot \text{s}$
η_a	Viscosidade aparente ($\eta_a = \tau / \dot{\gamma}$)	$\text{Pa} \cdot \text{s}$
τ_0	Tensão de cisalhamento inicial	Pa
μ	Viscosidade de fluidos Newtonianos	$\text{Pa} \cdot \text{s}$
B	Distância entre os pratos	m
M	Torque necessário para manter a velocidade angular	N.m
R	Raio do prato	m
R_0	Raio do cilindro interno	m
R_1	Raio do cilindro externo	m

Resumo

O mirtilo (blueberry, do inglês) é uma espécie frutífera nativa do Hemisfério Norte que é rica em pigmentos antociânicos - substâncias de alto poder antioxidante e preventivas de doenças degenerativas. O objetivo principal deste trabalho foi estudar a influência de diferentes formas de processamento do mirtilo a fim de preservar o seu conteúdo de antocianinas. Para tanto se estudou primeiramente a estabilidade das antocianinas frente ao tratamento térmico e determinou-se a sua cinética de degradação em sucos de mirtilo. Os resultados mostraram que a degradação de antocianinas de mirtilo seguiu uma cinética de reação de primeira ordem e que a variação nas constantes de taxa de degradação em função da temperatura obedeceu à relação de Arrhenius. Os valores de $t_{1/2}$ variaram de 180,5 a 5,1 h em temperaturas variando de 40 a 80 °C e a energia de ativação (E_a) calculada foi de 80,42 kJ.mol⁻¹. Um segundo estudo foi conduzido a fim de avaliar diferentes alternativas tecnológicas para a extração do suco de mirtilo frente à recuperação de compostos antociânicos. Foram testados quatro métodos de extração: centrifugação, desintegração, arraste a vapor e extração enzimática. O suco extraído com o auxílio de enzimas apresentou a maior recuperação de compostos antociânicos (superior a 30%) o que motivou tratamentos com diferentes preparados enzimáticos comerciais. A enzima NZ103 (Novozymes®) foi a que apresentou melhor desempenho e a condição ótima de seu emprego foi otimizada: temperatura de extração em 50 °C e concentração da enzima NZ103, diluída em 100 vezes, de 2%. Foi investigada a atividade da enzima polifenoloxidase (PPO) em polpas de mirtilo frente ao tratamento térmico. Observou-se que com temperaturas mais amenas de tratamento térmico (próximas a 40 °C) a enzima possuía os maiores valores de atividade; em contrapartida, ao se elevar a temperatura para valores superiores a 80 °C atividade da enzima apresentou-se praticamente nula. A otimização do binômio tempo e temperatura para a polpa do mirtilo resultou em um tratamento térmico a 80 °C durante 219 segundos implicando nas melhores condições para reduzir a atividade da enzima. Outra enzima responsável pela degradação das antocianinas do suco durante o processamento, reconhecida como sendo uma das

mais estáveis ao calor e utilizada como um indicador para os tratamentos térmicos é a peroxidase (POD). A redução da atividade de POD foi investigada utilizando membranas de ultrafiltração de 10, 30 e 50 kDa. A retenção das antocianinas foi inferior com a membrana de 50 kDa, com uma média de retenção de 16% e foi observado que, em geral, quanto maior a massa molar de corte da membrana e a temperatura, menor a retenção. A atividade POD nos tratamentos a 50°C foi reduzida independentemente da membrana utilizada; porém para os tratamentos a 30 e 40°C, essa atividade foi reduzida em 97,5 e 96,2% para as membranas de 10 e 30 kDa, respectivamente. Outro estudo foi conduzido com o propósito de minimizar as perdas e a geração de resíduos: a recuperação das antocianinas contidas no bagaço (que contém cerca de 70% das antocianinas do fruto) gerado na produção do suco. O bagaço foi submetido à extração de antocianinas com solventes orgânicos com vistas ao seu aproveitamento pela indústria de alimentos. Para tanto foram determinadas as condições ótimas de pH e razão etanol/água para a extração de antocianinas a partir do bagaço de mirtilo empregando a metodologia de superfície de resposta. Os resultados mostraram que a melhor condição para a extração de antocianinas monoméricas do bagaço de mirtilo foi para pH de 2,75 e 60% de etanol com 521 mg de cianidina-3-glicosídeo/100 g de bagaço. Para a extração das antocianidinas observou-se que uma concentração de 60% de etanol e o pH de 3,40 otimizam a extração. As agliconas peonidina e malvidina necessitaram de uma maior concentração de solvente e pH para a sua extração em relação as demais. No entanto, a aplicação desse extrato etanólico diretamente em alimentos é limitada pela presença de solvente orgânico e pela instabilidade das antocianinas ao calor, variações de pH e à luz. Visando minimizar estes efeitos, foi conduzido um estudo propondo a microencapsulação das antocianinas extraídas do bagaço de mirtilo via liofilização. Para tanto foram testados três diferentes agentes encapsulantes: maltodextrina (MD), carboximetilcelulose (CMC) e hidroximetilpropilcelulose (HPMC). A morfologia das micropartículas produzidas, visualizadas por microscopia eletrônica de varredura, apresentaram estruturas irregulares e semelhantes, o que é típico dos pós preparados por liofilização. Os microparticulados apresentaram boa velocidade de dissolução em água e fotoestabilidade das antocianinas, apresentado um tempo de meia vida superior a 38 dias. Um último estudo de aplicação da polpa de mirtilo para a produção de diferentes formulações de purê a partir do uso de hidrocolóides e açúcares incentivou os estudos que possibilitaram o conhecimento reológico destas formulações que serão úteis para o dimensionamento de equipamentos e desenvolvimento de produtos.

Abstract

Blueberry is a native fruit of the Northern Hemisphere which is rich in anthocyanin pigments - substances of high antioxidant capacity and preventive of degenerative diseases. The main objective of this study was to evaluate the influence of different methods of blueberry processing in order to maintain the anthocyanins content. To achieve this objective several studies were carried out, firstly the stability of anthocyanins and their degradation kinetics in blueberry juice were investigated. The results showed that the degradation of the anthocyanins from blueberries follows a first order kinetic reaction and its dependence on temperature follows the Arrhenius relationship. Values of $t_{1/2}$ ranging from 180.5 to 5.1 h at temperatures ranging from 40 to 80 °C were obtained, and the activation energy (E_a) was 80.42 kJ.mol⁻¹. A second study was conducted to evaluate different technological alternatives for the extraction of blueberry juice. Four methods were tested: centrifugation, disintegration, steam distillation, and enzymatic extraction. The juice extracted with enzymes showed the highest anthocyanin recovery (above 30%), which motivated tests with different commercial enzyme preparations. Among the enzymes tested, the enzyme NZ103 (Novozymes®) showed the best performance and the excellent conditions of its use were optimized: extraction temperature of 50 °C and enzyme NZ103 concentration of 2%. Another study was carried out to evaluate the activity of polyphenoloxidase (PPO) in the blueberry pulp during thermal treatment. It was observed that at lower temperatures (close to 40 °C) the enzyme has the highest activity values, however, by raising the temperature to above 80 °C enzyme activity was practically null. The optimization of time and temperature for the blueberry pulp led to thermal treatment of 80 °C during 219 seconds, resulting in the best condition to reduce enzyme activity. Another enzyme responsible for anthocyanin degradation during juice processing, one of the most heat stable enzymes and widely used as an indicator of thermal treatments, is the peroxidase (POD). The reduction of POD activity was investigated using ultrafiltration membranes with molecular weight cut off (MWC) of 10, 30 and 50 kDa. The anthocyanins retention was lower with the 50 kDa membrane, with an

average of 16% retention and was observed that, in general, the lower the MWC and temperature, the greater was the retention. The POD activity in the treatments at 50°C was reduced regardless of the membrane used; but for the treatments at 30 and 40°C, this activity was reduced by 97.5 and 96.2% for the 10 and 30 kDa membrane, respectively. Another study was conducted in order to minimize losses and waste generation: the pomace (which contains about 70% of the anthocyanins of the fruit), generated in the production of juice underwent the extraction of anthocyanins with organic solvents to be used by the food industry. The optimum conditions of pH and the ethanol/water ratio for extraction of anthocyanins from the blueberry pomace were determined using the response surface methodology. Results showed that the best condition for the extraction of monomeric anthocyanins present in the blueberry pomace was at pH 2.75 and 60% ethanol, with 521 mg of cyanidin-3-glucoside/100 g of pomace. For the extraction of anthocyanidins, it was observed that a concentration of 60% ethanol and pH of 3.40 was the best condition to optimize extraction. The extraction of aglycones peonidin and malvidin was better a higher concentration of solvent and higher pH values. However, application of ethanol extract directly in food is limited by the presence of organic solvent and the anthocyanins lower stability towards heat and light. In order to minimize these effects, there was another study proposing the microencapsulation of anthocyanins extracted from blueberry pomace by freeze-drying. Therefore, we tested three different coating agents: maltodextrin (MD) carboxymethylcellulose (CMC) and hydroxypropylmethylcellulose (HPMC). The microparticles morphology, visualized by scanning electron microscopy, showed irregular structures, which is typical of the powders prepared by freeze-drying. The microcapsules showed good solubility and anthocyanins stability toward light, presented a half-life exceeding 38 days. Finally, a study related with an application of blueberry pulp was developed, to produce different formulations of purees from the use of hydrocolloids and sugars. The influence of temperature, xanthan gum and fructose addition on rheological behavior in steady state of blueberry puree was evaluated. The xanthan gum appears as a determinant variable for the viscosity of the puree. In the range of additive concentrations studied, the obtained statistical models could be used for the development of formulations with specified viscosity, constituting a useful tool for modeling and design of unit operations related to blueberry puree production.

Capítulo 1

Introdução

A fruticultura brasileira tem-se apresentado como uma das atividades mais importantes do setor de alimentos, contribuindo para o desenvolvimento econômico, para a ampliação do mercado interno de frutos frescos e para a industrialização, atingindo vários segmentos como doces, bebidas (sucos e refrigerantes), purês e polpas. A conservação de frutos na forma de sucos, polpas, passas, purês e outros produtos, foram desenvolvidos para aumentar a oferta dos mesmos e para utilização dos excedentes de produção. Além disso, o processamento de frutos, quando fundamentado nas demandas do mercado, pode ser uma boa ferramenta para o aproveitamento das suas potencialidades, pois permite transformar produtos perecíveis em produtos armazenáveis.

O mirtilo (do inglês, *blueberry*) é uma cultura que, até pouco tempo atrás, era desconhecida por muitos produtores, consumidores e até mesmo da maioria dos técnicos agropecuários brasileiros; atualmente, vem tornando-se cada vez mais popular. Sua riqueza em pigmentos antocianicos, substâncias de alto poder antioxidante e preventivas de doenças degenerativas, seu sabor único e sua cor inconfundível, são fatores que atraem diretamente o consumidor. No caso do produtor, o interesse paira nas grandes potencialidades econômicas e na elevada rentabilidade que a fruta pode proporcionar.

Face ao exposto, o objetivo principal deste trabalho foi estudar a influência de diferentes formas de processamento do mirtilo a fim de manter as suas propriedades

nutracêuticas, em especial, o seu conteúdo de antocianinas. Para tanto este trabalho está estruturado em 11 capítulos. O Capítulo 2 mostra uma fundamentação teórica sobre o fruto (mirtilo) tais como aspectos gerais, características físico-químicas e nutricionais, fatores pós-colheita e dados de mercado, que servirão como base para os demais capítulos. O Capítulo 3 apresenta fundamentos sobre a estabilidade das antocianinas frente ao tratamento térmico e a metodologia utilizada para a determinação da sua cinética de degradação em sucos de mirtilo. O Capítulo 4 explora o processo de extração do suco, aspectos legais e alternativas tecnológicas de produção, além de comparar e otimizar as metodologias de extração do suco. O Capítulo 5 aborda o escurecimento enzimático do suco, otimizando a inativação da enzima via tratamento térmico. O Capítulo 6 aborda o uso de ultrafiltração para a remoção da peroxidase como indicativo de eficiência do processo e, ao mesmo tempo, aumentar a retenção de compostos antociânicos. Além do objetivo principal, o trabalho teve vários desdobramentos, no sentido de minimizar as perdas e a geração de resíduos: os frutos menores, que não são vendidos *in natura* ou em forma de passas, são destinados para a produção de sucos e polpas (Capítulo 4); o bagaço gerado na produção do suco foi aproveitado através da extração das antocianinas para a produção de corantes naturais, primeiramente por extração com solventes orgânicos (Capítulos 7) e por posterior microencapsulação (Capítulo 9); e a produção de diferentes formulações de purê a partir do uso de hidrocolóides e do suco de mirtilo incentivou os estudos que possibilitaram o conhecimento reológico destas formulações que serão úteis para o dimensionamento de equipamentos e para o desenvolvimento de produtos (Capítulo 10). Por fim são apresentadas, no Capítulo 11, as conclusões gerais do trabalho e sugestões para trabalhos futuros.

Capítulo 2

O Mirtilo ou *Blueberry*

Este capítulo trata dos principais aspectos relacionados ao mirtilo ou *blueberry*. Inicialmente são abordados o histórico e as características botânicas do fruto. A seguir são apresentados seus principais caracteres organolépticos, bem como sua composição química e propriedades nutraceuticas. Em seguida é abordada a fisiologia pós-colheita destes frutos, e os aspectos relativos ao seu armazenamento, que justificam sua aplicabilidade para o processamento industrial, bem como as perspectivas mercadológicas.

2.1 Aspectos Gerais

O mirtilo é uma espécie frutífera originária de algumas regiões da Europa e América do Norte, onde é muito apreciado por seu sabor exótico e por suas propriedades medicinais. É considerado como “fonte de longevidade”, devido especialmente ao alto teor de antocianinas contidas nos pigmentos de cor azul-púrpura. Pode ser comercializado *in natura*, em sucos ou processado como polpa para iogurtes, doces, sorvetes e geleias ou apenas ser congelado e comercializado nesta forma. Devido às suas propriedades nutricionais e, principalmente, às oportunidades de negócio que a fruta apresenta, tem despertado a atenção de técnicos agropecuários e produtores de frutas no Brasil.

No Hemisfério Norte há registros de que mirtilos selvagens são consumidos há décadas, mas desde o século XX essa cultura tem sido explorada e melhorada

geneticamente. Atualmente existe mais de 100 cultivares registradas e várias pesquisas em andamento. Em virtude de limitações de sazonalidade, e da grande demanda Norte Americana pelo mirtilo, outros países como o Brasil, Argentina e Chile vem produzindo esse fruto nas últimas duas décadas, com o objetivo de suprir essa entressafra.

No Brasil, o cultivo do mirtilo foi introduzido em 1983, pela Embrapa Clima Temperado (Pelotas, RS), a partir de plantas provenientes da Universidade da Flórida, com o objetivo de avaliar a adaptação da espécie ao clima e solo brasileiros. A espécie trazida a *Vaccinium ashei* Reade, proveniente da árvore tipo *rabbiteye* (olho-de-coelho, devido à cor vermelha dos frutos imaturos), de menor exigência de clima frio. Esta coleção de cultivares foi a principal base para a difusão da cultura no Brasil, pois permitiu obter informações essenciais para a definição do manejo da espécie em nossas condições climáticas e de solo. O plantio comercial iniciou em 1990 na cidade de Vacaria (RS) e o quadro produtivo atual, no país, está estimado em cerca de 60 toneladas, concentradas nas cidades de Vacaria (RS), Caxias do Sul (RS), Itá (SC), Barbacena (MG) e Campos do Jordão (SP), totalizando uma área de aproximadamente 35 ha (Pagot, 2006). No Rio Grande do Sul, a região de Vacaria é a pioneira no cultivo e a grande referência na produção.

A seguir serão apresentados os dados referentes à classificação botânica das espécies, aos tipos de planta e cultivares, cujo entendimento é fundamental para a compreensão da escolha dos frutos utilizados nesse estudo.

2.1.1 Classificação

O mirtilo é membro da família *Ericaceae*, subfamília *Vaccinoideae*, gênero *Vaccinium* e subgênero *Cyanococcus*. Os gêneros são muito diversos, contendo de 150 a 450 espécies, a maioria são arbustos de tamanhos e formas variados encontrados em locais de elevada altitude podendo também ser cultivados em regiões boreais e de clima temperado.

2.1.2 Tipos de Planta

Há muitas espécies de mirtilo, sendo que as principais espécies com expressão comercial são divididas em três grupos, de acordo com o genótipo, hábito de

crescimento, tipo de fruto produzido e outras características. Rieger (2006) classificou o mirtilo em três grupos comercialmente importantes: "*highbush*"; "*lowbush*" e "*rabbiteye*", que são detalhados a seguir.

- *Highbush* (*V. corymbosum* L. - arbusto alto) é uma das espécies de mirtilo mais cultivadas. São plantas de dois ou mais metros de altura, encontradas na costa leste da América do Norte (da Nova Escócia ao sul de Quebec e oeste de *Wisconsin*), estendendo-se até o extremo norte da Flórida e sudeste do Alabama. A necessidade de frio hibernal (abaixo de 7,2 °C) das plantas deste grupo está geralmente entre 200 a 850 horas (Pagot, 2006). Esta variedade foi desenvolvida principalmente a partir de duas espécies: *V. corymbosum* e *V. australe*, embora várias outras espécies tenham sido utilizadas em programas de seleção e melhoramento. As populações do sul são formadas principalmente por *V. australe*, enquanto nas populações do norte, predomina *V. corymbosum*. Esta última espécie, entretanto, pode misturar-se com outras como *V. lamarckii* e *V. britonii*, no seu limite mais ao norte, e *V. arkansanum*, *V. simulatum*, *V. australe* e *V. marianum* próximo aos seus limites ao sul. Nos Estados Unidos, o estado do Michigan é o maior produtor desta espécie, utilizando mais de 20 cultivares, entre elas: *Jersey*, *Bluecrop*, *Elliot* e *Rubel*. No Brasil, a Italbraz em Vacaria (RS) cultiva preferencialmente espécies do grupo *highbush* (Pagot, 2006).

- *Rabbiteye* (*Vaccinium ashei* - olho de coelho) tem plantas que podem atingir até 10 metros de altura e estende-se do norte da Flórida até sul de Alabama e Geórgia. Esta espécie é considerada pelos geneticistas como a que oferece as maiores possibilidades para o melhoramento, porque é tolerante a uma variação maior de pH do solo e a altas temperaturas, além disso apresenta certa resistência à seca e baixa necessidade em frio (Eck *et al.*, 1990) período entre 350 a 800 horas (Rieger, 2006). De acordo com o mesmo autor, nos Estados Unidos a produção dessa espécie é da ordem de 8 mil hectares e, destes, 6 mil estão concentrados no estado da Geórgia. As cultivares mais utilizadas no cruzamento genético são: *Tifblue*, *Woodard*, *Climax*, *Delite* e *Brightblue*. No Brasil, a maior plantação dessa espécie tem sido feita pela *Niceberry*® em Itá (SC) e produzem frutos pequenos e médios (Pagot, 2006).

- *Lowbush* (arbusto de pequeno porte) tem plantas com menos de meio metro de altura, que mais necessitam de frio, tempos superiores a mil horas de frio por ano. Produzem frutos muito macios, de tamanho pequeno e baixa acidez (Pagot, 2006). A

maioria delas pertence à espécie *V. angustifolium*, embora esteja neste grupo, o mirtilo do Canadá (*V. myrtilloides* e *V. boreale*), e outras espécies de menor importância como *V. lamarckii* e *V. britonii*. Em 1937, havia cerca de 70 mil híbridos e 15 cultivares lançadas. Esta espécie, domesticada inteiramente no século XIX, desenvolveu um mercado mundial originando programas de melhoramento na Holanda, Alemanha, Canadá, Irlanda, Itália, Finlândia, Iugoslávia, Inglaterra, Dinamarca e Escócia (Galletta e Himelrick, 1990).

2.1.3 Cultivares

Dentro de cada grupo existe um grande número de cultivares que estão sempre sendo aprimoradas geneticamente. As cultivares mais utilizadas pela Embrapa no Brasil com a finalidade de pesquisas de melhoramento genético são as do grupo *rabbiteye*, porém as cultivares de outros grupos também aparecem em alguns cruzamentos genéticos (Raseira e Antunes, 2004; Pagot, 2006).

Cultivares do Grupo Rabbiteye

- *Bluebelle* é a cultivar originária de Tifton, Geórgia, de cruzamento realizado em 1946, entre *Callaway* e *Ethel*; é autofértil e os frutos são firmes e têm um sabor doce e ácido, predominando a acidez e presença moderada de pruína (cera epicuticular) na superfície. A película é bem escura.

- *Bluegem* é a cultivar originária de Gainesville, Flórida. Necessita de polinização cruzada sendo que a cv. *Woodard* é uma das polinizadoras recomendadas.

- *Briteblue* é a cultivar que tem origem em Tifton, Geórgia, tendo sido desenvolvida pela Coastal Plain Experimental Station and Crops Research e pela Divisão de Agricultura dos Estados Unidos. Os frutos possuem uma película azul-clara, sabor regular e boa firmeza.

- *Clímax* esta cultivar é também originária de Tifton, Geórgia, desenvolvida pela Coastal Plain Experimental Station e o pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos; é proveniente de um cruzamento entre as cvs. *Callaway* e *Ethel*. Os frutos

possuem película de coloração azul-escuro e polpa saborosa, sendo que a película apresenta-se coberta por bastante pruína, dando o aspecto bem azulado à mesma.

- *Delite* tem origem na mesma Estação Experimental da cv. *Clímax*, oriunda do cruzamento de duas seleções: T14 e T15. Na descrição de registro da cultivar consta que os frutos são de tamanho grande. A película apresentou menos pruína do que os frutos da cv. *Clímax*, sendo bem escura. Segundo o registro desta cultivar, o sabor é excelente e a maturação inicia poucos dias após a cv. *Briteblue*.

- *Powderblue* é a cultivar que apresenta frutos com sabor doce-ácido equilibrado e é uma das cultivares com maior quantidade de pruína na película. Esta cultivar originou-se em Beltsville, Maryland, de um cruzamento entre as cvs. *Tifblue* e *Menditoo*, realizado por G.M. Darrow, Agricultural Research Service. É considerada resistente a doenças, sendo as plantas produtivas e vigorosas. Foi a cultivar de maior produtividade na coleção da Embrapa, safra 2002/2003 (6,1 g/planta).

- *Woodard* é a cultivar também originária de Tifton, Geórgia, e oriunda do cruzamento entre as cvs. *Ethel* e *Callaway*. Os frutos têm boa aparência sendo a película azul-clara. São considerados macios e, portanto, inadequados para transporte a longas distâncias. A maturação é pouco mais tardia que a cv. *Clímax*.

Além das cultivares mencionadas, Pagot (2006) destaca ainda a cv. *Aliceblue*, originária da Flórida que mostrou boa adaptação às condições de clima e solo de Pelotas. Essa planta necessita de polinização cruzada e apresenta frutos de sabor equilibrado entre acidez e açúcar com peso médio de 1,8 g.

Para melhor comparação entre as cultivares, a Tabela 2.1 foi elaborada. Nela pode-se observar a diferença entre o tamanho, peso e teor de açúcares dos frutos. De acordo com essa tabela as cultivares que fornecem frutos com melhores qualidades comerciais (maior tamanho e doçura) são: *Bluebelle*, *Delite* e *Powderblue*.

Tabela 2.1 Aspectos relativos às diferentes cultivares do mirtilo.

Cultivar	Diâmetro (cm)	Teor de sólidos solúveis (°Brix)	Peso médio (g)
<i>Bluebelle</i>	1,0 - 1,7	11,5	1,2
<i>Bluegem</i>	1,0 - 1,6	10,5 - 12,8	1,3
<i>Briteblue</i>	1,3	9,2 - 11,3	-
<i>Clímax</i>	1,0 - 1,7	10 - 12,4	1,8
<i>Delite</i>	1,2 - 1,8	10,8 - 12,5	1,2
<i>Powderblue</i>	1,3 - 1,7	11 - 11,7	1,5
<i>Woodard</i>	1,1 - 1,5	12 - 13,9	1,1

Fonte: Elaborado pelo autor com dados de Raseira e Antunes, 2004.

Nas condições do solo Gaúcho, a floração dessas cultivares ocorre ao final de agosto ou início de setembro (Raseira e Antunes, 2004). A colheita vai da segunda quinzena de dezembro ao final da segunda quinzena de janeiro. A frutificação se dá em ramos de um ano de idade e a colheita deve ser feita semanalmente ou preferentemente, duas vezes por semana; entretanto, dependendo da cultivar, podem ser necessárias cinco a seis colheitas, que devem ser efetuadas quando a epiderme do fruto está escura (azulada). Segundo Stiles e Abdalla (2009), frutos de boa qualidade podem ser conservados *in natura*, por até quatro semanas, a 0 °C, com alguma perda de qualidade.

Rodrigues *et al.* (2007) avaliaram a influência da cultivar de mirtilo nas características físicas, químicas e sensoriais de seis cultivares: *Woodard*, *Powderblue*, *Briteblue*, *Bluegem*, *Bluebelle* e *Delite*. Nos seus estudos, o maior teor de antocianinas encontrado foi nas frutas da cv. *Powderblue*.

Cultivares do Grupo Highbush

- *O'neal* é a cultivar com requerimento de frio (abaixo de 7,2 °C) entre 200 e 600 horas. Alguns autores definem que a exigência em frio para essa cultivar seja entre 400 e 600 horas, inclusive registram um potencial máximo de produtividade em acúmulos de frio próximos a 600 horas (Pagot, 2006). Tem o comportamento autofértil, mas produz frutos maiores quando plantada associada a outras cultivares. A fruta é grande, de coloração azul clara, com excelente qualidade. Planta vigorosa de hábito de crescimento ereto, que atinge até 1,8 metros de altura. Predomina nos cultivos da Argentina e no Uruguai. No Chile é a mais cultivada dentre o grupo *highbush*. Tem uma produção bastante precoce. O início da colheita nas condições da Argentina e do Uruguai é em outubro, o que proporciona excelentes preços para exportação. No Brasil, o cultivo é recente. Necessita de controle antecipada, devido à precocidade de sua primeira floração, que ocorre entre julho e agosto (Pagot, 2006).

- *Geogia Gem* tem as mesmas exigências de frio que a cv. *O'neil*. Essa planta é muito produtiva, com crescimento rápido e se forma antes das outras variedades, além disso, produzem frutas com tamanho médio e excelente sabor (Pagot, 2006).

- *Misty* é a cultivar que possui requerimento de frio entre 150 e 200 horas. Produzem frutas grandes, de tonalidade azul clara, firmes e de excelente sabor. Por apresentar uma produção precoce pode ter uma segunda colheita no outono (Pagot, 2006).

- *Bluecrop* é a cultivar com exigência de frio superior a 600 horas. Apresenta frutas com coloração azul clara e de tamanho grande. É uma das cultivares mais produzidas no Chile, com colheita entre dezembro e março (Pagot, 2006).

- *Duke e Brigita* é a cultivar que apresenta uma exigência de frio superior a 700 horas e frutos semelhantes ao da cv. *Bluecrop*, sendo também muito cultivado no Chile (Pagot, 2006).

- *Elliot* é a cultivar mais exigente ao frio entre as cultivadas no Brasil. Apresenta produção tardia, sendo colhida entre janeiro e abril (Pagot, 2006).

Cabe salientar que neste estudo foram utilizados frutos dos grupos *rabbitteye* e *highbush*. Os frutos adquiridos da Italbraz[®] (Vacaria/RS) são híbridos de cultivares do grupo *highbush* (*Vaccinium corimbosium*) e o da Niceberry[®] (Itá/SC) são híbridos entre as cultivares do grupo *rabbitteye* (*Vaccinium achei*), principalmente entre as cvs. *clímax* e *bluegem*. Ao longo dos nossos estudos observou-se que os frutos do grupo *highbush* eram maiores e com maiores teores de sólidos solúveis, por isso foram utilizados na maioria dos experimentos.

2.2 Características Físico-químicas e Nutricionais do Mirtilo

A qualidade de frutos e hortaliças é caracterizada com base em atributos como aparência, sabor, textura e valor nutritivo (Chitarra e Chitarra, 2005). Esta caracterização físico-química e nutricional é importante para o controle e melhoria da qualidade dos frutos para a comercialização no mercado interno e externo, bem como para o desenvolvimento de técnicas de armazenamento e de manejo pós-colheita adequadas.

Na Tabela 2.2 está apresentada a composição nutricional do mirtilo, a qual pode variar, em função da cultivar, práticas culturais, da fertilidade do solo, da época do ano, do grau de maturação e de outros fatores. De acordo com essa tabela pode-se observar que o mirtilo apresenta um alto teor de umidade, superior a 80%. O conteúdo de água nos tecidos depende, entre outros fatores, da disponibilidade hídrica do solo no momento da colheita (Sousa *et al.*, 2007). A perda de água nos frutos conduz à redução de volume e perda de massa, porém o elevado teor de umidade torna-os, geralmente, mais suscetíveis à deterioração, aumentando a possibilidade de contaminação microbológica.

Tabela 2.2 Composição nutricional do mirtilo em 100 g de fruto.

Nutrientes em 100g de fruto	
Umidade	83-87 g
Valor energético	51-62 kcal
Proteínas	0,4-0,7 g
Lípidos	0,5 g
Glicose	5-7 g
Frutose	5-7 g
Sacarose	nd
Fibra	1-1,5 g
Cinzas	0,19-0,25 g
Sais minerais	
Cálcio	11,4-12,2 mg
Ferro	0,6 mg
Magnésio	5,8-8,4 mg
Fósforo	14-47 mg
Potássio	48-112 mg
Sódio	3,4-4,3 mg
Zinco	0,1 mg
Cobre	0,1 mg
Manganês	0,4-1,2 mg
Vitaminas e outros componentes	
Vitamina C	22-62 mg
Taninos	270-550 mg
Pectinas	300-600 mg
Antocianinas	300-725 mg

Fonte: Sousa *et al.* (2007)

O mirtilo apresenta um baixo valor calórico, teor de lipídeos e proteínas. Os componentes de maior quantidade são: os sólidos solúveis, que representam cerca de 80% da matéria seca e são constituídos basicamente dos açúcares glicose e frutose, e as fibras e cinzas constituídas de sólidos insolúveis como casca, sementes e minerais.

Os frutos produzidos em zonas de verões quentes e secos têm uma concentração mais elevada de açúcares, são mais aromáticos e de coloração mais intensa, do que os que crescem em regiões mais amenas e úmidas (Rieger, 2006). O mirtilo contém ácidos orgânicos em teores elevados, sendo os mais comuns o quínico, o málico e o cítrico. O ácido quínico representa 40% dos ácidos orgânicos presentes no mirtilo (Sousa *et al.*, 2007), o ácido málico apresenta valores entre 0,06 a 0,14 g/100 g de fruto (Rodrigues *et al.*, 1992) e o ácido cítrico 0,4 a 0,5 g/100 g de fruto (Raseira e

Antunes, 2004). O ácido quínico é uma matéria-prima que tem sido bastante utilizada para a síntese de novos fármacos, incluindo o medicamento Tamiflu® para o tratamento de cepas de influenza A e B (Zutter *et al.*, 2008). Bushway *et al.* (1983) consideram o mirtilo um alimento rico em manganês, apresentando valores entre 0,4 a 1,2 mg/100 g no fruto maduro. Além disso, o mirtilo fornece potássio, ferro, vitaminas A e C e fibra alimentar. Meia xícara de chá de mirtilos fornece em média 45 kcal (Sousa *et al.*, 2007).

Por serem ricos em antocianinas, os frutos vermelhos são muito apreciados pelos seus sabores exóticos, valores comerciais e suas alegações terapêuticas, sendo considerados como a “fonte de longevidade”, a qual pode ser associada, segundo Raseira e Antunes (2004), ao alto teor de antocianinas. Apresentam em sua composição uma variedade de vitaminas (A, B, C, K, ácido fólico), minerais (potássio, magnésio, cálcio, fósforo, ferro, manganês), açúcares, pectina e taninos (Sousa *et al.*, 2007).

Dietas suplementadas com antociânicos são capazes de aumentar a plasticidade hipocampal, podendo prevenir problemas relacionados a doenças neurodegenerativas que incluem o Mal de Alzheimer, Mal de Parkinson e esclerose lateral (Ramirez *et al.*, 2005). Acredita-se ainda que sua ingestão frequente desses compostos possa atuar como adjuvante em patologias relacionadas a doenças oriundas do desequilíbrio da produção endógena de radicais livres como doenças cardiovasculares, distúrbios neurológicos e, até, o envelhecimento (Degápari e Waszczyński, 2005; Angelo e Jorge, 2007).

Conhecido popularmente como fruta da longevidade, o mirtilo é um dos cultivos que mais cresce em consumo no mundo, pelas suas características benéficas à saúde. A alta capacidade antioxidante encontrada nesta fruta atua na neutralização dos radicais livres, moléculas instáveis que estão ligadas ao aparecimento de um grande número de doenças crônicas não transmissíveis, como as doenças cardiovasculares e o câncer (Castrejón *et al.*, 2008). Vários estudos têm sido conduzidos em diversos países evidenciando que o consumo de mirtilo pode prevenir: a ocorrência de doenças neurodegenerativas e o declínio cognitivo durante o envelhecimento; doenças relacionadas à visão, como catarata e glaucoma, melhorando a capacidade de leitura e o foco da visão; perda óssea, pelo aumento da

densidade mineral óssea; e determina mudanças favoráveis nos biomarcadores do metabolismo ósseo (Kalt e Dufour, 1997; Konczak e Zhang, 2004; Stintzing e Carle, 2004; Castaneda-Ovando *et al.*, 2009). Está envolvido na redução da ingestão alimentar, acoplado com a diminuição no ganho de massa corporal e da oxidação da lipoproteína de baixa densidade humana (LDL); proporciona relaxamento das artérias, regulando a pressão do sangue e auxiliando na redução de doenças cardiovasculares; e, pode, também, auxiliar no controle do diabetes mellitus; apresenta alta capacidade antioxidante; inibe tumores cancerígenos (em ratos) devido à presença, principalmente, do ácido gálico e das antocianinas (Kamei *et al.*, 1995; Koide *et al.*, 1996; Koide *et al.*, 1997; Katsube *et al.*, 2002).

2.3 Aspectos Produtivos e Econômicos do Mirtilo

Por possuir naturalmente compostos funcionais e envolver consumidores de diversos segmentos econômicos, o mirtilo atinge valores interessantes no mercado externo, representando uma boa alternativa para a cadeia produtiva. Os Estados Unidos apresenta os maiores índices de consumo do fruto e, apesar de ser o maior produtor, o país não é autossuficiente e, exceto nos meses de maio, junho e julho (período de safra), depende diretamente do abastecimento canadense, chileno, neozelandês, argentino e brasileiro. O crescente interesse dos consumidores norte-americanos, europeus e asiáticos tem pressionado os tradicionais produtores mundiais e os novos empreendedores a aumentar a oferta do fruto em regiões ainda com pouca tradição na sua comercialização, como o Chile, a Argentina e, mais recentemente, o Brasil.

De acordo com os dados estatísticos publicados pela FAO (2009) os Estados Unidos aparece como o país com maior representatividade na produção de mirtilo, com aproximadamente 165 mil toneladas (59% da produção mundial em 2007), seguido do Canadá (28%) e recentemente da Alemanha, cabendo ao restante do mundo pouco mais de 10% de participação no volume produzido em 2007. Ainda, no ano de 1967, a produção nos Estados Unidos era de 1700 toneladas passando para 165 mil toneladas em 2007 indicando um aumento na produção de 100 vezes nos últimos 40 anos.

A produção de mirtilo no mundo por área plantada, em hectares (FAO, 2009) nos últimos oito anos aumentou mais de 30%, passando de 51 mil hectares em 2000 para 67,7 mil hectares em 2007. Ao comparar os dados de quantidade plantada com os de área plantada, pode-se observar que o Canadá apresenta uma área plantada de mirtilo maior que os Estados Unidos apesar de não ser o maior produtor em toneladas. Isso se deve ao fato da variedade cultivada nessa região, predominante a *lowbush*, apresentar um menor rendimento em toneladas/hectare (Rieger, 2006).

Quanto aos países da América do Sul, cabe destacar a participação do Chile, que produz cerca de 8 mil toneladas por ano, sendo o representante deste grupo que mais produz e mais exporta para o mercado norte-americano, concentrando seu abastecimento entre os meses de janeiro e abril. Outro país que merece destaque é a Argentina, que ingressou no mercado externo de mirtilo há pouco tempo, mas já apresenta números relevantes no abastecimento mundial da fruta. A primeira exportação argentina ocorreu em 1994 para o Reino Unido, mas somente em 1997 o país começou sua incursão pelo mercado norte-americano. Produzindo hoje cerca de 380 toneladas por ano, 74% dessa produção são destinadas ao abastecimento dos Estados Unidos entre os meses de outubro e dezembro (Pagot, 2006).

Não existem estatísticas oficiais sobre produção e área cultivada dessas espécies no Brasil, mas dados de pesquisadores e extensionistas apontam crescimento da área cultivada, principalmente nas Regiões Sul e Sudeste. No Rio Grande do Sul, o mirtilo é produzido por 45 produtores rurais, ocupando uma área de 65 hectares com produção de 150 toneladas (Silva, 2007).

A cultura do mirtilo tem atraído a curiosidade de muitos produtores; em escala comercial os plantios no Rio Grande do Sul se concentram no município de Vacaria, com uma área de 13,2 ha, sendo que uma área de 12 hectares, pertence à Empresa Italbraz que é pioneira no cultivo, exportando grande parte de sua produção (Raseira e Antunes, 2004).

Com base nos dados da Secretaria de Exportação do Ministério do Desenvolvimento (Secex, 2009), foram elaborados os gráficos apresentados na Figura 2.1 que mostram os valores e volumes de importação e exportação de mirtilos no período de 2003 a 2008. De acordo com os dados para importação observa-se que o

Brasil tem aumentado a importação desses frutos nos últimos anos atingindo cerca de 3 toneladas por ano. Porém, o volume de exportação é ainda maior que o de importação, atingindo no ano de 2008 um volume de aproximadamente 10 toneladas entre azeitonas e mirtilos, que representam uma receita de US\$ 100.000,00 (FOB) aos produtores do Brasil. Trata-se de um número ainda pouco significativo, face ao potencial natural que o país oferece para a produção comercial. Assim, o cultivo do mirtilo deve ser visto com uma visão mais estratégica, pois os produtores podem focar sua logística para exportação a fim de suprir a demanda pelo fruto durante a entressafra Norte Americana. Por não haver entre os brasileiros o hábito de consumo *in natura* desse fruto, o mercado interno é ainda pequeno, mas em crescimento, principalmente pelo apelo nutracêutico dos produtos, podendo também ser explorado (Silva, 2007).

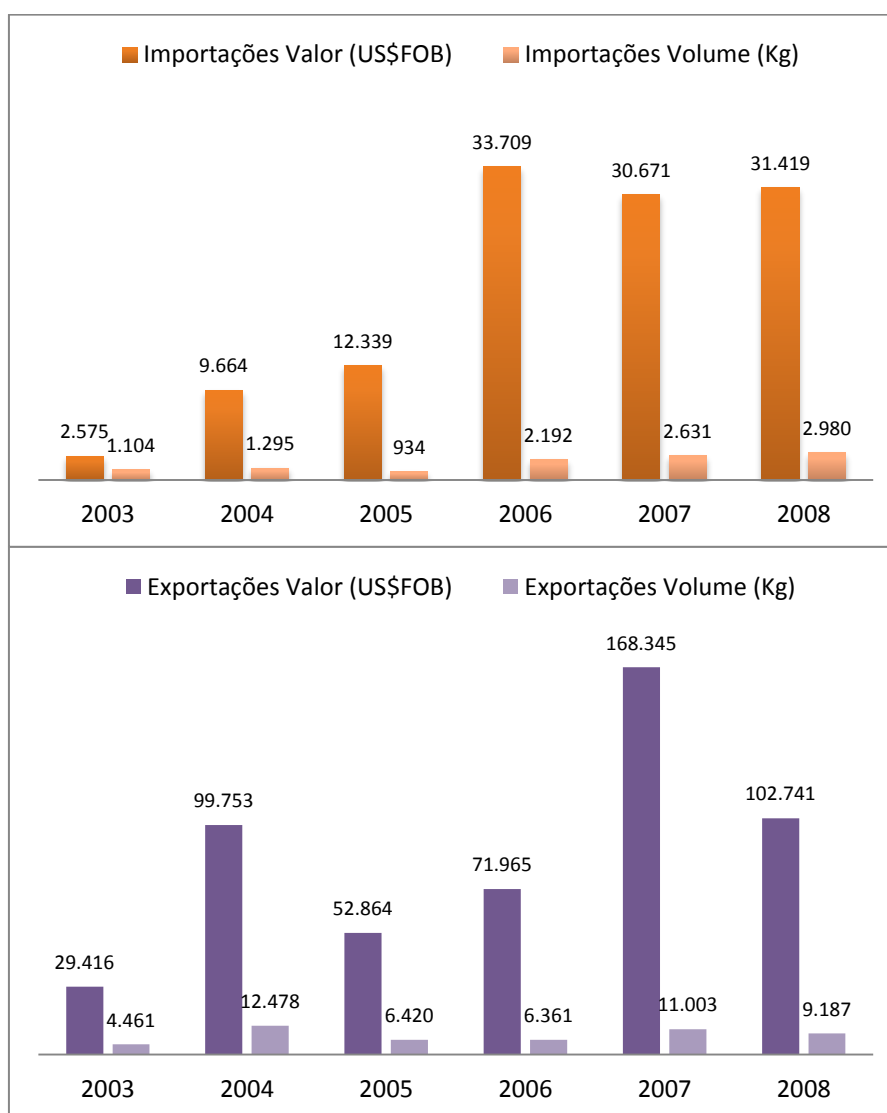


Figura 2.1 Dados de valores e volumes de importação e exportação de mirtilos no período de 2003 a 2008. **Fonte:** Gráfico elaborado pelo autor com base nos dados da SECEX, 2009.

No varejo local, o mirtilo produzido no Brasil é comercializado em embalagens de 120 a 150 g, por cerca de R\$ 10,00. No entanto, em junho de 2007, as cumbucas de 125 g estavam sendo comercializadas, em média, por R\$ 15,90 para o mirtilo importado (Silva, 2007). De acordo com o mesmo autor, o fato de ter poucos importadores para o mirtilo está relacionado com o alto preço do produto que é em média R\$ 90,00/kg comercializado no atacado. As vendas também são baixas, concentrando-se nos empórios de luxo, cuja clientela concentra-se nas classes com grande poder aquisitivo, devido às propriedades nutracêuticas ou para uso na preparação de pratos diferenciados.

2.4 Considerações Finais

Quando comparado com outras pequenas frutas vermelhas, como morango, framboesa e amora-preta, o mirtilo é classificado como a fruta com maiores teores de antioxidantes, tendo um conteúdo elevado de compostos antociânicos. O fato de esses compostos estarem relacionados com uma série de benefícios a saúde, o conhecimento das características dos frutos e o controle da manutenção de compostos fenólicos, em especial das antocianinas, durante o processamento é de fundamental importância. O potencial funcional de derivados de mirtilo, juntamente com o desenvolvimento regional fomentam pesquisas como esta.

Capítulo 3

Estudo da Estabilidade das Antocianinas em Suco de Mirtilo frente ao Tratamento Térmico

Há uma tendência de buscar ingredientes funcionais no desenvolvimento de produtos alimentícios. Muitas pesquisas têm demonstrado que as frutas e os vegetais contêm componentes com atividade antioxidante que estão relacionados com uma série de benefícios à saúde. Em particular, as frutas são normalmente fonte de vitamina C, vitamina E, carotenoides e polifenóis - uma ampla classe de componentes, incluindo os ácidos fenólicos, catequinas, flavonóis e antocianinas (Cao *et al.*, 1996; Wang e Jiao, 2000; Sellappan *et al.*, 2002). Dentre as frutas vermelhas, o mirtilo apresenta maior capacidade antioxidante, que está diretamente ligada ao seu alto teor de antocianinas (Kalt *et al.*, 1999).

Diversos fatores influenciam a estabilidade das antocianinas, incluindo pH, luz, presença de oxigênio, enzimas, ácido ascórbico, açúcares, dióxido de enxofre ou sulfito, íons metálicos e copigmentos (Francis e Markakis, 1989). O tratamento térmico é um dos métodos mais utilizados para preservar e prolongar a vida útil dos alimentos e é também um dos fatores mais importantes que afeta a estabilidade das antocianinas (Skrede *et al.*, 2000). A degradação térmica das antocianinas vem sendo estudada por outros autores em diversas plantas vegetais como em repolho roxo (Dyrby *et al.*, 2001), framboesas (Ochoa *et al.*, 1999), romã (Martí *et al.*, 2002), uvas (Morais *et al.*, 2002) e amoras (Wang e Xu, 2007). A cinética de degradação das antocianinas também pode ser avaliada a partir de uma perspectiva termodinâmica

baseadas em funções de ativação, como energia livre de Gibbs (ΔG), entalpia (ΔH), entropia (ΔS) e energia de ativação (E_a) (Al-Zubaidy e Khalil, 2007). Estas funções podem ser estimadas para as reações que ocorrem nos alimentos e podem fornecer informações valiosas sobre a cinética de degradação térmica.

O conhecimento dos parâmetros cinéticos é essencial para prever as mudanças de qualidade que ocorrem no alimento durante o processamento térmico, o objetivo do estudo mostrado neste capítulo foi estimar parâmetros cinéticos da degradação de antocianinas do suco de mirtilo durante o tratamento térmico. Para tanto, diferentes temperaturas foram usadas para prever a cinética de degradação e, para a temperatura de 25°C, as funções termodinâmicas foram estimadas.

3.1 Fundamentos Teóricos e Revisão Bibliográfica

Antocianinas (do grego anthos = flor e kianos = azul) são pigmentos encontrados principalmente nas frutas vermelhas. São solúveis em meio aquoso, o que as torna interessantes para seu uso como corante natural (Pazmiño-Durán *et al.*, 2001). Sua coloração forte usualmente mascara a dos carotenoides e das clorofilas sendo sintetizadas com o decorrer da maturação, predominando no epicarpo dos frutos (Chitarra e Chitarra, 2005). Estes pigmentos são responsáveis pelas cores laranja, rosa, vermelho, violeta e azul das flores e frutos de algumas plantas. Em especial, os frutos de mirtilo contêm grandes quantidades de antocianinas, principalmente nas formas glicosilada, de flavonois (como a quercetina, kaempferol e miricetina), de catequinas (como (+) catequina, (-) epicatequina e suas formas oligoméricas) e de ácidos benzoico e cinâmico (Hakkinen *et al.*, 1999; Kalt *et al.*, 1999; Sellappan *et al.*, 2002). Outra propriedade notável das antocianinas é a atividade antioxidante, que desempenha um papel vital na prevenção de doenças neuronais e cardiovasculares, câncer e diabetes, entre outras (Kalt e Dufour, 1997; Prior *et al.*, 1998; Kalt *et al.*, 2000; Konczak e Zhang, 2004; Sabbe *et al.*, 2009). Há vários relatos sobre o efeito do emprego das antocianinas em tratamentos contra o câncer (Lule e Xia, 2005; Nichenametla *et al.*, 2006), na nutrição humana (Stintzing e Carle, 2004) e na atividade biológica (Kong *et al.*, 2003).

3.1.1 Estrutura química das antocianinas

As antocianinas fazem parte do grupo dos flavonóides, compostos fenólicos caracterizados pelo núcleo básico flavílio (cátion 2-fenilbenzopirílio) que consiste de dois anéis aromáticos unidos por uma unidade de três carbonos e condensados por um oxigênio. Na Figura 3.1 está apresentada a estrutura química da molécula de antocianina que é constituída por dois ou três grupos funcionais: uma aglicona (antocianidina), um grupo de açúcares e, frequentemente, um grupo de ácidos orgânicos (Francis e Markakis, 1989).

Aproximadamente 22 agliconas são conhecidas, das quais 18 ocorrem naturalmente e apenas seis (pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina) são importantes em alimentos (Francis, 2000). Antocianidinas livres são raramente encontradas em plantas, ocorrendo comumente glicosiladas com açúcares que estabilizam a molécula (Francis, 2000). A glicosilação pode ocorrer em várias posições, sendo observada com maior frequência na posição 3. O segundo açúcar quando presente na molécula encontra-se na posição 5, porém podem ocorrer glicosilações nas posições 7, 3, 4 e 5 (Malacrida e Motta, 2005). Glicose, ramnose, xilose, galactose, arabinose, rutinose, soforose, sambubiose, gentiobiose e frutose são os açúcares mais comumente ligados às antocianidinas, ocorrendo como monoglicosídeos, diglicosídeos e triglicosídeos glicosilados diretamente na aglicona (Francis e Markakis, 1989). Muitas vezes, os açúcares das antocianinas são acilados pelos ácidos cinâmicos (p-cumárico, ferúlico e caféico) ou pelos ácidos alifáticos (p-hidroxibenzóico, sinápico, malônico, acético, succínico, oxálico e málico) (Francis e Markakis, 1989). Os substituintes acila encontram-se usualmente ligados à hidroxila do açúcar na posição 3 e com menor frequência nas posições 4 e 6. A metoxilação mais comum ocorre nas posições 3 e 5 e menos comum em na 5 e na 7. É importante salientar que antocianinas naturais nunca apresentam as hidroxilas das posições 5, 7 e 4 substituídas ao mesmo tempo. Um dos grupos hidroxila deve permanecer livre numa dessas posições para a formação da estrutura quinoidal, responsável pela cor (Bridle e Timberlake, 1997).

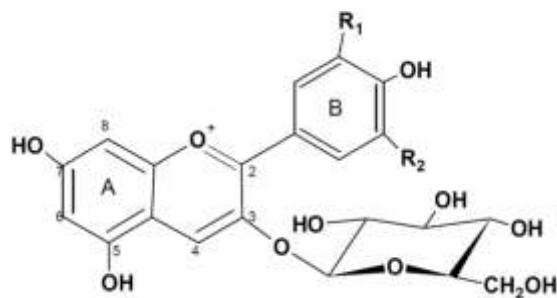


Figura 3.1 Estrutura química da molécula de antocianina. Agliconas (estrutura do anel B): Pelargonidina ($R_1 = R_2 = H$); Cianidina ($R_1 = OH$ e $R_2 = H$); Delfinidina ($R_1 = R_2 = OH$); Peonidina ($R_1 = OCH_3$ e $R_2 = H$); Petunidina ($R_1 = OCH_3$ e $R_2 = OH$) e Malvidina ($R_1 = R_2 = OCH_3$). **Fonte:** Malacrida e Motta (2005).

Na Figura 3.2 as formas estruturais predominantes das antocianinas em pH 1,0, 4,5 e 7,0 estão apresentadas. Nesta figura observa-se que a forma oxônio (que vai do laranja ao roxo) predomina em pH 1,0 e a forma hemiacetal (incolor) em pH 4,5. O método do pH diferencial baseia-se nesta reação, e permite uma medição precisa e rápida das antocianinas monoméricas totais, mesmo na presença de pigmentos polimerizados degradados e de outros compostos interferentes.

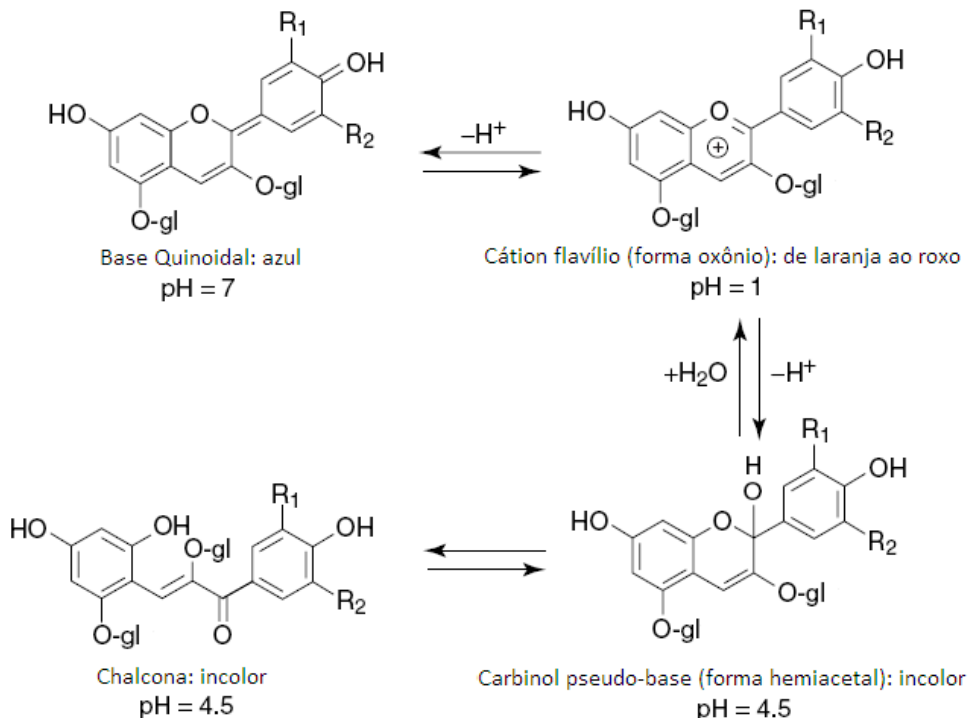


Figura 3.2 Formas estruturais de antocianinas em diferentes valores de pH. **Fonte:** adaptado de Francis e Markakis, (1989), Giusti e Wrolstad (2001) e Malacrida e Motta (2005).

No mirtilo, a cor está estreitamente relacionada com o teor de antocianinas do fruto e este, por sua vez, com o pH e o ratio (relação sólidos solúveis e acidez total) (Sellappan *et al.*, 2002).

O teor de antocianinas está inversamente relacionado com o tamanho da baga, uma vez que os pigmentos estão concentrados na epiderme (Harris *et al.*, 2007).

Em relação ao mirtilo cultivado na região sul do Brasil, não há na literatura material disponível sobre a completa caracterização das antocianinas. Porém, Lohachoompol e colaboradores (2008) identificaram e quantificaram as antocianinas presentes em diferentes cultivares de mirtilo australianos. Os frutos eram provenientes da variedade *Crunchie, Star e Sharpe (highbush, V. corymbosum)* e *Climax, Powderblue e Brightwell (rabbiteye, V. ashei)*. O perfil cromatográfico de antocianinas encontrado pelos autores foi semelhante em todas as cultivares, o que se espera acontecer também com as variedades cultivadas no Brasil. Lohachoompol *et al.* (2008) estudaram ainda as cultivares *Climax (rabbiteye, V. ashei)* e *Star (highbush, V. corymbosum)* e observaram que as proporções de cada composto foram cultivar-dependente. Os frutos do grupo *Highbush* apresentaram antocianinas mais polares e teor de antocianinas totais maiores do que as do grupo *Rabbiteye*. As agliconas delfinidina, petunidina e malvidina foram as principais contribuintes para o teor de antocianinas totais (Lohachoompol *et al.*, 2008).

3.1.2 Fatores que afetam a estabilidade das antocianinas

De acordo com Giusti e Wrolstad (2001), as antocianinas são muito instáveis e suscetíveis à degradação. Sua estabilidade é afetada principalmente pelos seguintes fatores: estrutura química, pH, temperatura, luz, presença de oxigênio, presença de enzimas e interações entre os componentes dos alimentos, tais como ácido ascórbico, íons metálicos, açúcares e copigmentos (Castaneda-Ovando *et al.*, 2009).

A presença de ácido cafeico na molécula, por exemplo, aumenta a estabilidade de antocianinas. Dangles *et al.* (1993) sugeriram a existência da interação entre o cromóforo de pelargonidina e grupos cafeoil de antocianinas extraídas de pétalas de *Pharbits nil* (cultivares vermelho-púrpura). Estes autores verificaram que a cafeilação da aglicona pelargonidina diminui a constante termodinâmica de hidratação,

retardando o deslocamento do equilíbrio da forma cátion flavílio (vermelho) para hemiacetal (incolor).

As antocianinas sofrem transformações estruturais reversíveis com uma mudança de pH manifestada por diferentes espectros de absorbância como mostrado na Figura 3.3. Neste gráfico pode-se observar que em comprimentos de onda entre 500 e 530 nm a amostra apresenta um pico de absorbância quando em tampão a pH 1 diferentemente da amostra submetida a pH 4,5.

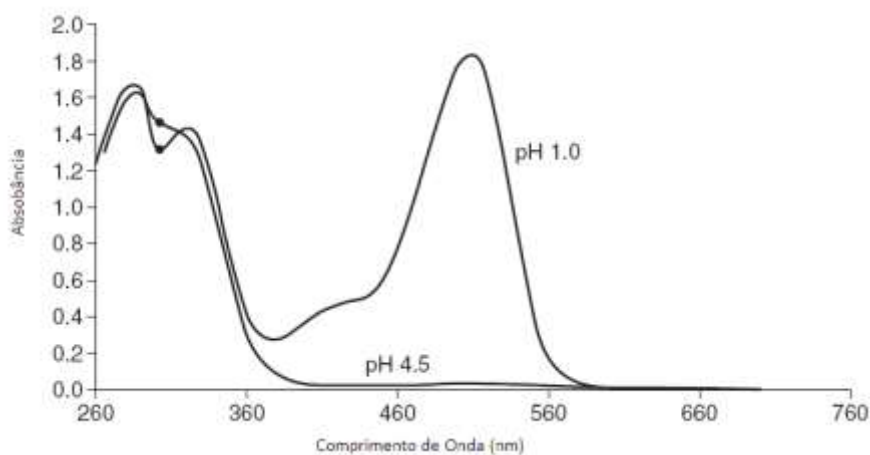


Figura 3.3 Características espectrais de antocianinas de rabanete purificadas (derivados acilados de pelargonidina-3-soforosídeo-5-glicosídeo) em soluções tampão de pH 1,0 e pH 4,5. **Fonte:** Giusti e Wrolstad (2001).

O aquecimento, durante o processamento ou estocagem dos alimentos, consegue destruir rapidamente as antocianinas. Muitos estudos demonstraram uma relação logarítmica entre a destruição das antocianinas e o aumento aritmético da temperatura. Processos utilizando baixo tempo em alta temperatura têm sido recomendados para melhor retenção dos pigmentos.

Skrede *et al.* (2000) em seus estudos com suco de mirtilo, mostraram perdas relativamente baixas de antocianinas durante a pasteurização do suco, porém durante a concentração, encontraram perdas superiores a 20% de procianidinas.

Ochoa *et al.* (1999) estudaram o armazenamento de polpa de framboesa e verificaram que as antocianinas foram degradadas e praticamente desapareceram após 50 dias de armazenamento a 37 °C. Os mesmos autores, ao compararem estas polpas com as armazenadas a 4 °C observaram que a temperatura mais baixa de armazenamento propicia uma cor mais estável e melhor aspecto visual. Ainda, Wang e

Xu (2007) mostraram que o suco de mirtilo a 65 °Brix apresenta mais degradação de antocianinas durante a armazenagem quando comparado com o suco a 8,9 °Brix.

As antocianinas são geralmente instáveis quando expostas à luz ultravioleta e visível, ou outras fontes de radiação ionizante (Malacrida e Motta, 2005). Os tempos de meia-vida das antocianinas em 2 sistemas (luz natural e escuro) indicaram que haveria uma perda de 50% da cor original após 2.800 h para as folhas da *Acalipha hispida* ao abrigo da luz, o que garantiria um considerável *shelf life* (vida de prateleira) do produto, porém quando sob efeito da luz continuamente durante as 24 h de cada dia esse valor é bem mais baixo, 721 h (Bailoni *et al.*, 1998).

O oxigênio pode causar degradação das antocianinas por mecanismos de oxidação direta ou indireta, quando constituintes oxidados do meio reagem com as antocianinas. O peróxido de hidrogênio (H₂O₂), formado pela oxidação do ácido ascórbico na presença de oxigênio e íons cobre, causa descoloração das antocianinas. Tal fato leva a crer que a degradação das antocianinas nessas condições seja mediada pelo H₂O₂ (Malacrida e Motta, 2005). Uma alternativa para explicar sua degradação é a ocorrência da reação de condensação entre o ácido ascórbico e a antocianina, formando produtos instáveis que se degradam em compostos incolores (Wrolstad *et al.*, 2005). Provenzi *et al.* (2006) mostraram que as antocianinas de uvas são sensíveis à luz e à presença de oxigênio, porém, para reduzir este efeito, os autores propuseram a encapsulação destes compostos com β- e γ-ciclodextrinas.

3.1.3 Métodos de análise qualitativa e quantitativa de antocianinas

Existem basicamente duas metodologias de quantificação das antocianinas: o método cromatográfico (CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) e o espectrofotométrico. De acordo com Giusti e Wrolstad (2001) o método espectrofotométrico é uma alternativa rápida, fácil e de boa reprodutibilidade à cromatografia. A metodologia proposta por estes autores determina o total de antocianinas monoméricas pelo princípio da diferença de pH.

Lee *et al.* (2008) estudaram a correlação entre os dois métodos comumente usados por pesquisadores e pela indústria de alimentos para a quantificação das antocianinas: o método diferencial de pH e CLAE. Neste estudo, eles avaliaram sete

amostras de suco, com composições diferentes de antocianinas, incluindo suco de mirtilo por ambas as metodologias. Seus resultados demonstraram a alta correlação entre o método do pH diferencial e CLAE na quantificação das antocianinas. Os mesmos autores sugerem que os laboratórios com recursos escassos, onde não há disponibilidade de um cromatógrafo, utilizem o método do pH diferencial, por ser um método simples e econômico para determinação quantitativa de antocianinas totais.

3.1.4 Cinética de Degradação de Nutrientes

Nos últimos anos tem existido uma maior preocupação, por parte dos consumidores, em relação à qualidade nutricional dos alimentos. No entanto, o processamento de alimentos geralmente envolve o uso de tratamentos térmicos, como o branqueamento, pasteurização e concentração, para principalmente inativar enzimas que promovem o escurecimento enzimático, reduzir a contaminação microbiana a níveis aceitáveis e diminuir a atividade de água (Evangelista, 2001). Para minimizar a perda de compostos nutricionais e funcionais durante estes tratamentos e, ao mesmo tempo, fornecer as propriedades sensoriais desejáveis, é importante o conhecimento da cinética de degradação destes nutrientes.

Dentre os nutrientes, a vitamina C (ácido ascórbico - AA) é a mais estudada em termos de termoestabilidade (Al-Zubaidy e Khalil, 2007). Tal fenômeno tem sido investigado por vários pesquisadores em: citros (Rassis e Saguy, 1995; Burdurlu *et al.*, 2006), limão (Al-Zubaidy e Khalil, 2007), laranja (Polydera *et al.*, 2003), ameixas (Gabas *et al.*, 2003), pêssigo (Torales *et al.*, 2008) e acerola (Yamashita *et al.*, 2003).

O mecanismo da degradação térmica das antocianinas ainda não foi completamente elucidado. Porém, visto a importância funcional das antocianinas, a sua degradação ao longo do processamento deve ser minimizada (Sadilova *et al.*, 2006).

A degradação térmica de antocianinas presentes em diversos frutos tem sido estudada por vários autores: ginja (Cemeroglu *et al.*, 2006), framboesa (Ochoa *et al.*, 1999), romã (Martí *et al.*, 2002), uva (Morais *et al.*, 2002), morango (García-Viguera e Zafrilla, 1999), amora (Wang e Xu, 2007; Cisse *et al.*, 2009; Jiménez *et al.*, 2010), laranja e quiabo-roxo (Cisse *et al.*, 2009) e maçã (Kirca, Özkan *et al.*, 2006), estes

trabalhos trazem informações sobre parâmetros cinéticos (energia de ativação, E_a , e a constante da velocidade de reação, k) para uma ampla variedade de produtos ricos em antocianinas.

Malacrida e Motta (2005) citam que em valores de pH entre 2,0 e 4,0, o aquecimento das antocianinas provoca primeiramente a hidrólise da ligação glicosídica com posterior formação da chalcona. Além disso, existem evidências de que a hidrólise glicosídica das antocianinas seja a principal causa da perda de cor, uma vez que a velocidade da liberação do açúcar é proporcional à velocidade da perda da cor vermelha.

Maeda *et al.* (2007) avaliaram a estabilidade do ácido ascórbico e das antocianinas presentes no néctar de camu-camu, armazenados sob diferentes condições de luminosidade (presença e ausência de luz) e temperatura (ambiente e refrigerado) por 120 dias. Em seus estudos, o ácido ascórbico presente nos néctares armazenados sob refrigeração apresentou boa estabilidade, com perda de apenas 12 a 14%. Quanto às antocianinas, a temperatura ambiente contribuiu negativamente, ocasionando uma degradação mais acelerada.

Kirca *et al.* (2006) estudaram a estabilidade de antocianinas da cenoura adicionadas em sucos (maçã, laranja, uva, toranja, tangerina e limão) e néctares (damasco, pêsego e abacaxi), durante aquecimento a 70-90 °C e estocagem a 4-37 °C. Os resultados demonstraram grande efeito da temperatura de estocagem na estabilidade das antocianinas em todos os sucos e néctares, ocorrendo degradação muito mais rápida durante estocagem a 37 °C. As antocianinas apresentaram menor estabilidade durante aquecimento e estocagem no suco de laranja.

Wang e Xu (2007) estudaram a estabilidade térmica (60 a 90 °C) e de armazenamento (5 a 37 °C) de antocianinas em suco (8,9 °Brix) e concentrado (65 °Brix) de amora preta. Os resultados indicaram que a degradação térmica de antocianinas seguiu cinética de reação de primeira ordem dependente da temperatura pela equação de Arrhenius. Durante o armazenamento, as antocianinas presentes no suco de amora concentrado degradaram mais rapidamente do que as do suco a 8,90 °Brix.

Cemeroglu *et al.* (2006) estudaram os efeitos da temperatura (50 e 80 °C) e do teor de sólidos solúveis (15, 45 e 71 °Brix) na degradação de antocianinas em concentrado de ginjas (ou cereja ácida). Os autores modelaram a cinética de degradação como uma reação de primeira ordem, com taxas de $33,97 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ (15 °Brix), $59,19 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ (45 °Brix) e $97,14 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ (71 °Brix) a 80 °C. A dependência da temperatura da reação foi descrita pela relação de Arrhenius e a energia de ativação média para um teor de sólidos solúveis de 15 a 71 °Brix foi de $17,45 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

Morais *et al.* (2002) determinaram a taxa de decomposição de antocianinas monoméricas de extratos de casca de uva frente à luz, ao tempo de armazenamento e à temperatura. A análise de regressão confirmou que a taxa de decomposição total de antocianinas monoméricas, peonidina-3-glucosídeo e malvidina-3-glucosídeo foi dependente do tempo e da temperatura de armazenamento, sendo o efeito do tempo de armazenamento o mais importante. A presença ou ausência de luz exerceu um impacto pouco significativo sobre a taxa de decomposição.

Yue e Xu (2008) estudaram a estabilidade térmica de 10 antocianinas encontradas em extrato de mirtilo em altas temperaturas (80, 100 e 125°C) e para diferentes tempos. A degradação das antocianinas seguiu uma cinética de reação de primeira ordem. Embora as taxas de degradação de antocianinas (k) não tenham sido significativamente diferentes entre si, na mesma temperatura de aquecimento, aumentaram drasticamente quando a temperatura de aquecimento foi aumentada para 125°C. Nesta temperatura, todos os tempos de meia-vida foram inferiores a 8 min. A dependência da constante de reação seguiu a equação de Arrhenius. Ainda, os autores observaram que as antocianinas não foram estáveis a temperatura de aquecimento superior a 100°C.

Ochoa *et al.* (1999) avaliaram a influência do processamento (concentração de 10 a 37 °Brix e pasteurização) e armazenamento (temperaturas de 4, 20 e 37 °C) em polpas de framboesa (2 diferentes variedades) sobre o teor de antocianinas e ácido ascórbico. Tanto as antocianinas quanto o teor de ácido ascórbico seguiram uma cinética de reação de primeira ordem.

Cisse *et al.* (2009) avaliaram a estabilidade das antocianinas a temperaturas variando de 30 a 90 °C para sete produtos: suco de laranja, dois tipos de suco de amora (alto e baixo conteúdo de sólidos insolúveis em suspensão - SIS), e quatro

extratos de quiabo-roxo. O suco de amora-preta foi o que apresentou maior teor de antocianinas com $1,2 \text{ g.L}^{-1}$ seguido pelo quiabo-roxo e suco de laranja, respectivamente. A taxa de degradação das antocianinas foi calculada por três modelos: Arrhenius, Eyring e Ball. A constante cinética de degradação de antocianinas em suco de laranja apresentou a maior taxa, seguida pela amora e o quiabo-roxo. Os valores das energias de ativação foram 66 e 37 kJ.mol^{-1} para a laranja e amora, respectivamente, e na faixa de 47 a 61 kJ.mol^{-1} para os extratos de quiabo. Harbourne *et al.* (2008) avaliaram o efeito da temperatura sobre a degradação de antocianinas do suco de groselha para um intervalo de temperatura de 4 a 140 °C. A degradação térmica de antocianinas seguiu uma cinética de pseudo primeira-ordem. A dependência da temperatura na taxa de degradação das antocianinas foi modelada por uma extensão da equação de Arrhenius, que apresentou um aumento linear na energia de ativação com a temperatura.

Jiménez *et al.* (2010) avaliaram a degradação das antocianinas monoméricas e o escurecimento não-enzimático (NEB) em suco de amora aquecido em duas faixas de temperaturas (100 - 140 e 140 - 180 °C). Para ambas as faixas de temperatura a cinética de reação foi de primeira ordem. A energia de ativação para o NEB (106 kJ.mol^{-1}) foi ligeiramente superior ao valor das antocianinas na faixa de temperatura 100 - 140 °C (92 kJ.mol^{-1}), mas foi mais do que o dobro do valor (44 kJ mol^{-1}) para a maior faixa de temperatura (140 - 180 °C). Assim, a degradação das antocianinas foi mais rápida do que o aparecimento de produtos NEB.

De um modo geral, as antocianinas apresentam baixa estabilidade em produtos industrializados, o que limita seu uso como corante natural em alimentos ou como constituinte de formulações farmacêuticas. Entre os principais fatores relacionados com a instabilidade das antocianinas durante o processamento de sucos podem ser citados aqueles associados à composição inicial da fruta, tal como o tipo de antocianina e a presença de certas enzimas. Fatores externos característicos do tipo de processamento como temperatura, luz e presença de oxigênio também interferem na estabilidade das antocianinas. Assim, o conhecimento da cinética de degradação das antocianinas é de vital importância para empresas processadoras de derivados de mirtilo, principalmente se o interesse estiver voltado para a produção de alimentos ricos em compostos antociânicos.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Materiais

Os mirtilos (*Vaccinium achei* Reade), um híbrido das cultivares *Climax* e *Bluegen*, foram obtidos da *NiceBerry*[®] (Itá, SC, Brasil) e armazenados a -18 °C até a extração do suco. Cerca de 2 kg de mirtilos congelados foram descongelados por 12 h a 4 °C e triturados com o auxílio de um mixer (Ultramixer, Britânia, Brasil) durante 5 minutos. O suco foi produzido utilizando uma panela extratora (Suqueira 5 kg, Ricefer, Garibaldi/RS, Brasil), que produz suco pelo arraste a vapor; o tempo de processo foi de duas horas. O suco obtido foi imediatamente resfriado a 25 °C e armazenado a temperatura de 4 °C até o momento dos experimentos de degradação.

O teor de sólidos solúveis totais (SST) do suco foi determinado pela medição do índice de refração em um refratômetro de bancada (Carl Zeiss GmbH, Vienna, Áustria) a 25 °C. Para todos os tratamentos foi utilizado o suco proveniente da mesma batelada com as seguintes características: teor de SST de $8,90 \pm 0,02$ °Brix e total de antocianinas monoméricas de $32,75 \pm 3,10$ mg de cianidina-3-glicosídeo/100 mL de suco. A metodologia de análise de antocianinas monoméricas está descrita na seção 3.2.3.

3.2.2 Estudos de degradação térmica

A degradação térmica de antocianinas em suco de mirtilo foi estudada nas temperaturas de 40, 50, 60, 70 e 80°C. Alíquotas de 10 mL de suco de mirtilo foram colocadas em tubos com tampa de rosca (tipo Falcon) que foram acondicionados em um banho termostático (Quimis, Q226M, Diadema/SP, Brasil, precisão de ± 1 °C) a uma temperatura específica. Em intervalos de tempo diferentes, três amostras foram retiradas do banho e resfriadas a 4°C rapidamente, de acordo com a metodologia de estudos cinéticos de degradação de antocianinas proposta por Wang e Xu (2007), para suco de amora. A concentração de antocianinas monoméricas foi determinada imediatamente após a coleta de cada amostra. A degradação das antocianinas foi conduzida até que o nível de retenção de 50% das mesmas fosse atingido e pelo

menos seis amostras foram analisadas a fim de garantir uma boa representação dos dados. O teor de antocianinas inicial (C_0) foi medido para cada temperatura e os resultados foram expressos pela razão C/C_0 .

3.2.3 Determinação do teor de antocianinas monoméricas

As antocianinas foram determinadas pelo método de pH diferencial proposto por Giusti e Wrolsted (2001). A forma oxônio predomina em pH 1,0 (0,025 M tampão de cloreto de potássio), e a forma hemiacetal predomina em pH 4,5 (0,400 M tampão acetato de sódio).

Para determinar o comprimento de onda que representa a absorção máxima no suco de mirtillo, foi realizada uma varredura entre os comprimentos de 500 a 540 nm em espectrofotômetro UV1600 (Pro-análise, Brasil), o espectro obtido está apresentado na Figura 3.4. A amostra utilizada para esta varredura foi diluída em tampão cloreto de potássio na proporção de 0,5 mL de suco para 3,5 mL de tampão. O branco utilizado para zerar o espectrofotômetro foi água destilada. Na curva apresentada nesta figura observa-se que o pico de maior absorção se deu a 520 nm e este foi o comprimento de onda adotado para análise de antocianinas monoméricas.

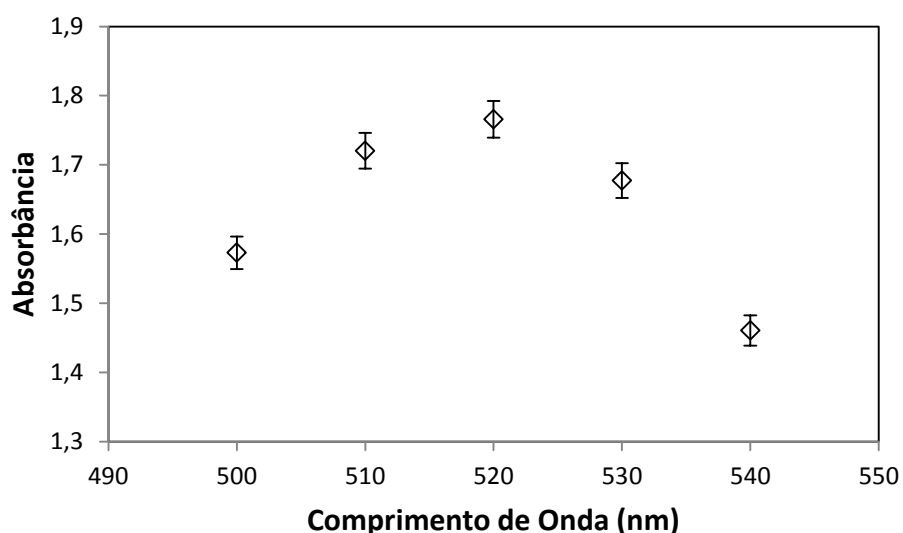


Figura 3.4 Espectro de absorbância entre os comprimentos de 500 a 540 nm para o suco de mirtillo com 8,9 °Brix.

As amostras foram diluídas em tampão de cloreto de potássio até que a relação entre a absorbância da amostra a 520 nm e a concentração estivesse dentro do intervalo que apresenta comportamento linear. Para atingir uma faixa de absorbância entre 0,8 e 1,2, a diluição encontrada foi de 0,3 mL de suco para 3,7 mL de tampão cloreto de potássio. O Fator de Diluição (FD) foi calculado de acordo com a Equação 3.1.

$$FD = \frac{V_T}{V_{Suco}} + 1 \quad (3.1)$$

onde: V_T é o volume do tampão (mL) e V_{Suco} é o volume do suco (mL). Para efetuar as diluições o FD encontrado foi de 13,3 e o mesmo foi utilizado em todas as análises dos estudos de degradação térmica, como também, para diluir a amostra com tampão acetato de sódio.

Para as análises, as amostras de suco foram diluídas ($FD = 13,3$) em tampão cloreto de potássio ($pH=1,0$) e acetato de sódio ($pH=4,5$) e a leitura foi realizada após 15 minutos de incubação, três repetições por amostra, em dois comprimentos de onda: 520 e 700 nm. A leitura a 700 nm foi realizada para eliminar os interferentes da reação. A absorbância foi então calculada de acordo com a Equação 3.2.

$$A = (A_{520} - A_{700})_{pH\ 1.0} - (A_{520} - A_{700})_{pH\ 4.5} \quad (3.2)$$

A concentração de antocianinas monoméricas (MA) final é expressa em mg de cianidina-3 glucosídeo/100 mL de suco de acordo com a Equação 3.3. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

$$MA = \frac{A \times M \times FD \times 100}{\epsilon \times L} \quad (3.3)$$

onde: A é a absorbância calculada pela Equação 3.2; M é a massa molar da cianidina-3 glucosídeo ($449,2\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$); FD é o fator de diluição (13,3); ϵ é o coeficiente de extinção molar ($26.900\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) e L é o caminho óptico da cubeta (1 cm) (Giusti e Wrolstad, 2001).

3.2.4 Estudos Cinéticos de Degradação

De acordo com Wang e Xu (2007), no estudo com suco de amora, a degradação térmica das antocianinas se dá por uma reação de primeira ordem, este tipo de cinética pode ser expressa pelas Equações 3.4 e 3.5.

$$C_t = C_0 e^{-kt} \quad (3.4)$$

$$t_{1/2} = -\frac{\ln 0,5}{k} \quad (3.5)$$

onde: C_t é o teor de antocianina após um tempo de aquecimento t (min) a uma dada temperatura (°C); C_0 é o teor de antocianinas inicial; k é a constante cinética de reação de primeira ordem e $t_{1/2}$ é o tempo de meia-vida.

A constante cinética de degradação, k , é dependente da temperatura e pode ser expressa pela equação de Arrhenius como mostra a Equação 3.6.

$$k = k_0 e^{-\frac{E_a}{R \times T}} \quad (3.6)$$

onde: k_0 é o fator de frequência (por minuto); E_a é a energia de ativação (J.mol⁻¹); R é a constante universal dos gases (8,314 J.mol⁻¹.K⁻¹) e T é a temperatura absoluta (K).

De acordo com Kirca *et al.* (2006) o coeficiente Q_{10} (coeficiente de temperatura) é outra maneira de caracterizar o efeito da temperatura sobre a velocidade de uma reação que representa a mudança na degradação quando a temperatura aumenta de 10°C, e pode ser calculado pela Equação 3.7.

$$Q_{10} = \left(\frac{k_{T_2}}{k_{T_1}} \right)^{\left(\frac{10}{T_2 - T_1} \right)} \quad (3.7)$$

Onde k_{T_2} e k_{T_1} são as constantes de degradação a T_2 e a T_1 , respectivamente.

3.2.5 Cálculo das funções termodinâmicas

As funções termodinâmicas de ativação para a degradação de antocianinas seguem uma reação de primeira ordem (Labuza, 1980; Al-Zubaidy e Khalil, 2007) e podem ser calculadas pelas Equações de 3.8 a 3.11 apresentadas a seguir.

$$\vartheta = \left(\frac{k_B \cdot T}{h} \right) \quad (3.8)$$

$$k = \vartheta \times e^{-\left(\frac{\Delta G}{R \times T}\right)} \quad (3.9)$$

$$\Delta H = E_a - n \times R \times T \quad (n = 1) \quad (3.10)$$

$$\Delta G = \Delta H - T \times \Delta S \quad (3.11)$$

onde: ϑ é uma constante; k_B é a constante de Boltzmann ($1,381 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$), h é a constante de Plank $6,626 \times 10^{-34} \text{ J.s}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$, T é a temperatura absoluta, R é constante universal dos gases ($8,314 \text{ J.mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$) e E_a é a energia de ativação (kJ.mol^{-1}).

3.3 Resultados e Discussão

Na Figura 3.5 estão apresentados os resultados de retenção de antocianinas ($\ln(C/C_0)$) em função do tempo para diferentes temperaturas que representam a degradação de antocianinas do suco de mirtillo durante o aquecimento. A análise destes resultados mostra que os dados apresentaram uma boa linearidade indicando uma cinética de reação de primeira ordem em relação à temperatura. Também pode ser observado que a degradação de antocianinas é mais rápida com o aumento da temperatura.

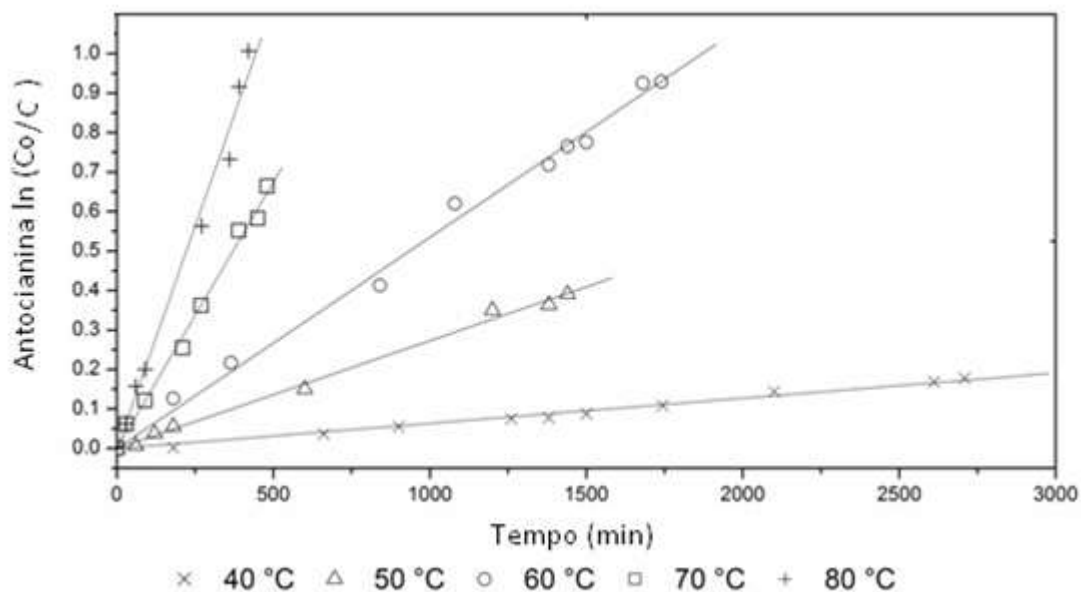


Figura 3.5 Degradação de antocianinas em em suco de mirtilo (8,9 ° Brix) durante o aquecimento a 40, 50, 60, 70 e 80 °C expressa em termos de retenção $-\ln(C/C_0)$ versus tempo. O erro padrão de cada ponto é de cerca de 5,0% e cada ponto representa a média de três repetições.

Os parâmetros cinéticos de degradação das antocianinas durante o aquecimento são mostrados na Tabela 3.1, onde os valores da constante cinética de primeira ordem, k , e $t_{1/2}$ foram estimados para cada temperatura utilizada neste trabalho. O coeficiente de correlação obtido, superior a 0,9877, mostra que os ajustes dos dados foi muito bom. Observa-se ainda que quando a temperatura aumenta, o valor de k também aumenta, corroborando com a idéia de que quanto maior a temperatura, maior a degradação das antocianinas. Os valores de $t_{1/2}$ variaram 180,5 a 5,1 h na faixa de temperatura estudada. Wang e Xu (2007) relataram que os valores de $t_{1/2}$ para a degradação de antocianinas em suco de amora-preta foram 16,7, 8,8, 4,7 e 2,9 h em 60, 70, 80 e 90 °C, respectivamente. O alto valor de 180,5 h para $t_{1/2}$ é devido à lentidão do processo de degradação das antocianinas a 40 °C. Quando se compara o $t_{1/2}$ de antocianinas da amora-preta com os obtidos para as antocianinas de mirtilo, é possível verificar que, em altas temperaturas (70 e 80 °C), os resultados são muito semelhantes, mas a 60 °C uma pequena diferença pode ser notada (25,3 h para o mirtilo e 16,7 h para amora), mostrando que as antocianinas de mirtilo foram menos suscetíveis à degradação térmica. Portanto, parece que as diferentes sensibilidades de antocianinas do suco de fruta frente a um tratamento térmico podem ser causadas

tanto pelas diferentes formas de antocianinas quanto pelas interações entre os componentes dos frutos.

Tabela 3.1 Valores de k , $t_{1/2}$ e do coeficiente de correlação obtidos para diferentes temperaturas no estudo da degradação de antocianinas do suco de mirtilo.

Temperatura (°C)	$k^a \times 10^3$ (min ⁻¹)	$t_{1/2}^b$ (h)	R^2
40	0,064 ± 0,003	180,50 ± 8,38	0,9927
50	0,273 ± 0,004	42,30 ± 0,57	0,9928
60	0,457 ± 0,029	25,30 ± 1,22	0,9943
70	1,350 ± 0,241	8,60 ± 1,54	0,9939
80	2,254 ± 0,003	5,11 ± 0,01	0,9877

^a constante cinética

^b tempo de meia-vida

Na Tabela 3.2 estão apresentados os valores do coeficiente de temperatura (Q_{10}) para as temperaturas avaliadas neste trabalho. O maior valor é obtido dentro do intervalo de 40 a 50 °C, indicando que nesse intervalo a cinética de degradação foi fortemente afetada pela temperatura, comportamento semelhante pode ser observado dentro da faixa de 60 a 70 °C, mas em menor escala. Nas faixas de 50 a 60 °C e 60 a 70 °C, os valores de Q_{10} foram iguais e inferiores a outros intervalos, indicando que dentro destas duas faixas a cinética de degradação é pouco afetada pela mudança de temperatura. Segundo a Al-Zubaidy e Khalil (2007), o valor relativamente baixo de Q_{10} sugere que as associações moleculares poderiam diminuir a degradação das antocianinas. Estes autores também mencionaram que esse efeito pode ser confirmado através da determinação da energia de ativação e pelas funções termodinâmicas deste processo de degradação.

Tabela 3.2 Valores de Q_{10} obtidos para diferentes temperaturas no estudo da degradação de antocianinas do suco de mirtilo.

T (°C)	Q_{10}
40-50	4,27 ± 0,21
50-60	1,67 ± 0,04
60-70	2,95 ± 0,06
70-80	1,67 ± 0,11

A energia de ativação (E_a) foi determinada através da estimação dos parâmetros da Equação 3.6, ou seja, a inclinação da reta obtida plotando $-\ln k$ versus $1/T$. Na Figura 3.6 estão apresentados os dados obtidos e a E_a calculada foi de 80,42 kJ.mol⁻¹. Al-Zubaidy e Khalil (2007) encontraram um valor de E_a para o ácido ascórbico em suco de limão (9 °Brix) em torno de 60 kJ.mol⁻¹. Isso indica que as antocianinas de suco de mirtilo são menos suscetíveis a elevação da temperatura, na faixa de 40 a 80°C, do que o ácido ascórbico de suco de limão.

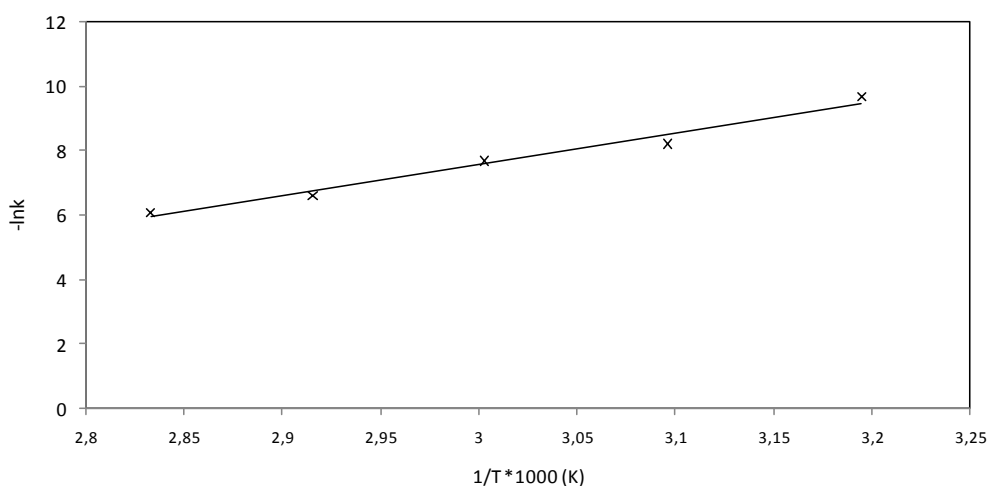


Figura 3.6 Ajuste da Equação de Arrhenius para a avaliação da dependência da temperatura durante a degradação de antocianinas em suco de mirtilo.

Os valores obtidos para a constante cinética (k) e a energia de ativação (E_a) foram utilizados nas Equações de 3.8 a 3.12 para calcular as funções termodinâmicas de ativação. Os resultados foram 91,3 kJ.mol⁻¹, 77,8 kJ.mol⁻¹ e -43,07 J.mol⁻¹.k⁻¹ para ΔG , ΔH e ΔS , respectivamente.

Resultados similares foram observados para a degradação do ácido ascórbico em suco de limão (Al-Zubaidy e Khalil, 2007); para ΔG , ΔH e ΔS , os autores encontraram valores de $81,6 \text{ kJ.mol}^{-1}$, $55,2 \text{ kJ.mol}^{-1}$ e $-21,2 \text{ J.mol}^{-1}$, respectivamente. Valores semelhantes de ΔG indicam que fatores semelhantes afetam a degradação de ácido ascórbico e antocianinas em suco de limão e mirtilo (mecanismo de degradação similar). Este valor representa a diferença entre os produtos e os reagentes e, portanto, deve ter um sinal positivo. O sinal positivo de ΔH representa um estado endotérmico entre o complexo ativado e os reagentes que leva a um aumento na degradação com o aumento da temperatura. O valor relativamente baixo de ΔS mostra a baixa significância desta função, enquanto o seu sinal negativo indica que um aumento é necessário para formar um complexo ativado (Al-Zubaidy e Khalil, 2007).

3.4 Conclusões

Nesta etapa do trabalho foi avaliada a degradação térmica de antocianinas em suco de mirtilo. Os resultados mostram que a degradação de antocianinas de mirtilo segue uma cinética de reação de primeira ordem e que a variação dos parâmetros cinéticos de degradação em função da temperatura obedece à relação de Arrhenius. O maior grau de estabilidade das antocianinas foi obtido usando temperaturas entre 40 e 50°C e um curto tempo de aquecimento (menor que 5 h) durante o processamento do suco de mirtilo. Estudos sobre a estabilização de antocianinas durante o processamento do mirtilo em suco ou corante são necessários para viabilizar o seu uso como corante ou outro ingrediente pela indústria alimentícia.

Capítulo 4

Obtenção do Suco de Mirtilo por Diferentes Técnicas

Um dos mais importantes derivados do mirtilo é o suco, e a avaliação da degradação dos compostos antioxidantes durante o seu processamento é importante para que o consumidor tenha disponível no mercado produtos diferenciados com elevados níveis de compostos bioativos (Skrede *et al.*, 2000). Os métodos mais usuais de extração são: desintegração seguida de prensagem, centrifugação e extração por arraste a vapor. Os dois primeiros processos apresentam um rendimento muito baixo e elevadas perdas de antocianinas. O processamento por arraste a vapor, largamente utilizado pela indústria, contribui para aumentar o rendimento e a extração de compostos fenólicos no suco; no entanto, o uso de altas temperaturas durante o processo (como durante o branqueamento e a pasteurização) pode causar perdas de compostos fenólicos que é, em grande parte, devido à degradação das antocianinas (Malacrida e Motta, 2005; Kechinski *et al.*, 2010).

Uma alternativa para contornar esse problema é a utilização de enzimas pectinolíticas durante o processo de extração. Estas enzimas são capazes de degradar a pectina facilitando a extração dos compostos fenólicos, sem perturbar o grupo éster que é responsável pelo aroma específico do suco; além disso, estas enzimas não levam à formação de compostos tóxicos (Taragano e Pilosof, 1999).

No caso da produção de sucos, as enzimas pectinolíticas são utilizadas logo após a trituração das bagas a fim de facilitar a extração do suco. Com essas enzimas, a

rede da parede celular é rompida e o rendimento do suco é aumentado. Além disso, o tratamento enzimático é conhecido por potencializar a extração dos compostos fenólicos da parede celular. Comercialmente, existem vários preparados enzimáticos para o processamento de frutas, sendo que a maioria destes produtos contém pectinases, celulases e hemicelulases em várias proporções (Spagna *et al.*, 1994). Além destas enzimas, alguns preparados apresentam em sua formulação enzimas de ação exógena que afetam a química dos glicosídeos fenólicos extraídos (Buchert *et al.*, 2005). Vários estudos reportam o uso de preparados enzimáticos para a fabricação de sucos como o de oxicoço (Wightman e Wrolstad, 1996), maçã (Alvarez *et al.*, 1998; Oliveira *et al.*, 2006), pera (Tanriöven e Eksi, 2005), sapoti (Sin *et al.*, 2006), banana (Lee *et al.*, 2006a; b), carambola (Liew Abdullah *et al.*, 2007), cereja e romã (Özkan, 2002), groselha preta (Landbo e Meyer, 2004), sabugueiro (Landbo *et al.*, 2007) e uva (Sreenath e Santhanam, 1992).

Na literatura vários estudos abordam as alterações que ocorrem nas antocianinas de suco de mirtilo para processos específicos de extração (Skrede *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002; Rossi *et al.*, 2003), porém não há uma comparação clara entre as alternativas de processo e aditivos e a relação com a qualidade do produto obtido. Como o intuito de auxiliar a indústria no processamento desse novo fruto cultivado no Brasil, o mirtilo, esse trabalho teve como objetivo abordar as alternativas tecnológicas para a extração do suco de mirtilo e comparar a recuperação de compostos antociânicos dos mesmos.

Para tanto, serão apresentados primeiramente os fundamentos teóricos e a revisão bibliográfica dos processos de extração de sucos seguido da metodologia, resultados e discussão dos processos de extração avaliados neste estudo. O Capítulo 4 destaca preferencialmente a parte da extração do suco. A etapa de inativação enzimática é vista, mais detalhadamente, no Capítulo 5.

4.1 Fundamentos Teóricos e Revisão Bibliográfica

Nesta seção são apresentados aspectos importantes relacionados ao processamento de sucos tais como: definições de suco legislação, operações unitárias envolvidas no processamento, alternativas tecnológicas e aspectos de qualidade durante o processamento do suco.

4.1.1 Definições de suco e legislação

De acordo com o Ministério da Agricultura, “suco” é o produto mais concentrado, integral, com 100% de fruta. Caso haja a necessidade da adição de açúcar, essa não deve ultrapassar 10% da composição e no rótulo no produto deve conter a frase: “Suco de fruta adoçado”. Ao suco não podem ser adicionados corantes e conservantes. Com exceção aos sucos de frutas tropicais, nos quais a polpa de fruta pode ser diluída em água potável numa proporção mínima de 35% de polpa, dependendo do sabor (Brasil, 2009).

A Legislação Brasileira não determina os padrões de Identidade e Qualidade específicos para o suco de mirtilo, apenas apresenta aspectos gerais para sucos de frutas (Brasil, 2009) e sucos tropicais (Brasil, 2003a). O Ministério da Agricultura publicou o Decreto Nº 6871, de 04 de junho de 2009 regulamentando a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre padronização, classificação, registro, inspeção, produção e fiscalização de bebidas (Brasil, 1994). Esse mesmo decreto revoga os Decretos 2314 (1997), 3510 (2000), 4851 (2003) e 5305 (2004) (Brasil, 2009).

Na Lei 8.918 é apresentada a classificação das bebidas de frutas produzidas no Brasil, segundo esta legislação, existem cinco tipos de bebidas de frutas: suco, polpa de fruta, suco tropical, néctar e refresco.

Suco ou sumo de fruta é a bebida não fermentada, não concentrada e não diluída, destinada ao consumo, obtida da fruta madura e sã, ou parte do vegetal de origem, por processamento tecnológico adequado, submetida a tratamento que assegure a sua apresentação e conservação até o momento do consumo.

Polpa de fruta é o produto não fermentado, não concentrado, não diluído, obtido de frutos polposos, através de processo tecnológico adequado, com um teor mínimo de sólidos totais, proveniente da parte comestível do fruto.

Suco tropical é o produto obtido pela dissolução, em água potável, da polpa de fruta polposa de origem tropical, não fermentado, de cor, aroma e sabor característicos da fruta, através de processo tecnológico adequado, submetido a tratamento que assegure a sua apresentação e conservação até o momento do consumo.

Néctar é a bebida não fermentada, obtida da diluição em água potável da parte comestível do vegetal e açúcares ou de extratos vegetais e açúcares, podendo ser adicionado de ácidos e destinada ao consumo direto.

Refresco ou bebida de fruta ou de vegetal é a bebida não gaseificada, não fermentada, obtida pela diluição, em água potável, do suco de fruta, polpa ou extrato vegetal de sua origem, com ou sem açúcar.

Para o produto ser classificado como suco, não pode ter sido diluído com água. O suco parcialmente desidratado é denominado de suco concentrado. O suco pode ser adicionado de açúcar, numa proporção que não exceda 10 % em percentual mássico (Brasil, 2009).

O órgão regulamentador dos Estados Unidos, *Food and Agriculture Organization*, FAO, apresenta, além das mesmas classificações acima, restrições em relação ao teor de sólidos solúveis totais para o suco de mirtilo. Para os sucos obtidos diretamente dos frutos, o teor de sólidos solúveis deve ser no mínimo de 8,5 °Brix, os sucos reconstituídos de sucos de mirtilo concentrados devem ter no mínimo 10 °Brix e os sucos concentrado devem ter teores de sólidos solúveis totais superiores a 50% (FAO, 2001).

4.1.2 Operações unitárias envolvidas no processamento de sucos

As principais operações unitárias do processamento de suco de frutas, de acordo com Rosenthal *et al.* (2003) envolvem: operações preliminares de seleção e lavagem dos frutos, extração, inativação enzimática, refino, desaeração, conservação, envase e armazenamento. Um fluxograma simplificado destas etapas está apresentado na Figura 4.1 que estão detalhadas no texto a seguir.

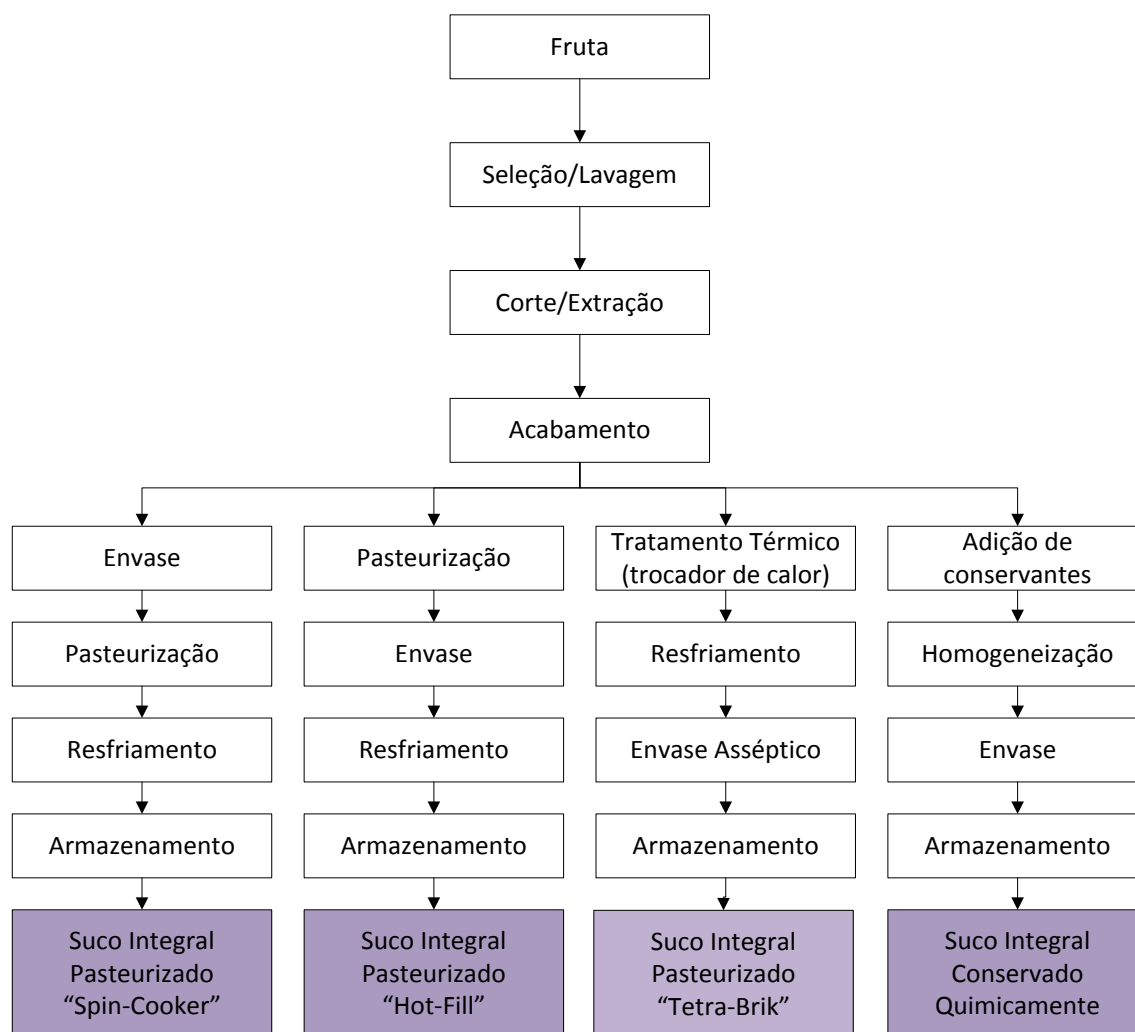


Figura 4.1 Fluxograma simplificado das etapas do processamento de diversos tipos de sucos de fruta variando a forma de conservação. **Fonte:** Adaptado de Camargo *et al.* (1986), Rosenthal *et al.* (2003) e Vendruscolo e Vendruscolo (2005).

Na etapa de extração, o suco é separado das cascas, fibras, sementes e outras partes não comestíveis em despoldadeiras ou em extratores do tipo prensa. Este processo pode estar associado a tratamentos térmicos e/ou enzimáticos da polpa, visando o aumento do rendimento de extração de suco.

Após o despoldamento, o produto é submetido a um tratamento térmico para inibir ou minimizar as transformações enzimáticas e reduzir a carga microbiana que deterioram o produto, esse tratamento é denominado branqueamento. Para frutas sensíveis, usa-se a extração a frio. Nesse caso, é necessária a realização da etapa de inativação enzimática (75 a 80 °C durante 15 a 30 s), imediatamente após a extração. Para frutas resistentes, pode-se usar a extração a quente (temperatura acima de 65 °C), o que pode aumentar o rendimento em 5 a 10% na extração do suco.

A operação de refino tem por objetivo a remoção do excesso de polpa de algumas frutas, como a manga e o abacaxi, a qual é composta de material fibroso e sólido (pectina e celulose) que pode prejudicar a qualidade do produto, esta etapa também é denominada de clarificação. Nessa operação podem-se utilizar centrífugas, membranas, ou mesmo despulpadeiras com peneiras de malha bem fina.

Outra etapa importante é a eliminação do ar, que é incorporado ao produto durante as fases de extração e refino e provoca alterações de cor, aroma e sabor. Esta operação pode ser efetuada num desaerador do tipo centrífugo ou do tipo instantâneo. O desaerador é colocado em linha com o pasteurizador, para que o suco só atinja a temperatura de pasteurização após a eliminação do oxigênio.

Para a conservação pode-se utilizar das seguintes alternativas tecnológicas: pasteurização antes ou após envase, adição de conservantes químicos e acondicionamento asséptico.

A pasteurização mais usada é aquela em que o envase ocorre imediatamente após o tratamento térmico, também denominada de enchimento a quente ou *Hot-Fill*. Neste processo, o suco, devidamente pasteurizado, é enviado imediatamente para o sistema de enchimento. Então, é embalado à temperatura de pasteurização (ou aproximada). Também pode ocorrer a pasteurização na embalagem, neste caso o suco, já na embalagem, é mergulhado em tanques de imersão, em cozedores rotativos ou em túneis de pasteurização a uma temperatura de 115 a 125 °C por 15 a 20 minutos.

Na conservação dos sucos pela adição de produtos químicos, os conservantes são adicionados após o resfriamento do suco pasteurizado até a temperatura ambiente. Os conservantes mais comuns são o ácido sórbico, o ácido benzóico ou seus derivados de sais de sódio e potássio. O teor máximo desses compostos, legalmente permitido para produtos de consumo direto, é de 0,1% em massa. O uso de conservantes permite que o suco de fruta seja mantido em perfeitas condições por, aproximadamente, seis meses.

O acondicionamento asséptico, embora não seja propriamente um processo novo, pode ser considerado como uma tecnologia avançada para produção de uma ampla série de produtos manufaturados. O processo asséptico engloba, basicamente,

uma combinação de princípios de esterilização à alta temperatura durante um breve período de tempo, com métodos de acondicionamento asséptico. O processo difere dos tradicionais, porque o produto é rapidamente esterilizado e resfriado, antes de ser embalado sob condições de assepsia. Esse processo é feito, normalmente, bombeando-se o produto sucessivamente por trocadores de calor (aquecimento à alta temperatura; retenção sob calor e resfriamento) do tipo tubular ou de superfície raspada (para o caso de polpas).

O produto, devidamente esterilizado, escoar para as unidades de acondicionamento, onde é colocado em embalagens previamente esterilizadas, sem nenhum contato com o ar atmosférico ou qualquer fonte de contaminação. Antes do início das operações de enlatamento ou entamboramento, os trocadores de calor, tubulações, bombas sanitárias e todos os demais equipamentos são esterilizados por meio de passagem de água quente sob pressão, em temperatura variando de 149 a 163 °C. Já as unidades de acondicionamento e de fechamento são esterilizadas por meio de vapor superaquecido a temperaturas não inferiores a 200 a 204 °C. Essas unidades devem ser mantidas estéreis durante a operação de embalagem de produto. O processo asséptico dá origem a um produto final de excelente qualidade, em relação às características básicas de cor, sabor, aroma, quando comparado aos métodos tradicionais.

As embalagens mais utilizadas para o acondicionamento de sucos de fruta são garrafas de vidro, garrafas de polietileno tereftalato (PET) e embalagens cartonadas. O rótulo deve conter as seguintes informações sobre o produto: a fruta de origem, tipo de suco, data da fabricação, prazo de validade, nome e endereço do fabricante, CNPJ e inscrição estadual.

Após a pasteurização, o suco deve ser armazenado sob refrigeração; quando são adicionados conservantes ou acidulantes ao suco ou se ele foi esterilizado assepticamente, o produto pode ficar a temperatura ambiente.

4.1.3 Alternativas tecnológicas para o processamento de sucos

O mirtilo é muitas vezes transformado em suco e suco concentrado, a fim de difundir o seu consumo e contornar o problema da sazonalidade. Devido aos seus efeitos benéficos, como visto nos Capítulos 2 e 3, uma atenção especial deve ser dada

às mudanças que sofrem as antocianinas ao longo do processamento. As antocianinas, bem como outros compostos fenólicos, são facilmente oxidadas e, portanto, suscetíveis a reações de degradação durante as várias etapas de processamento. Skrede *et al.* (2000) mostraram perdas substanciais de antocianinas e compostos fenólicos durante o processamento do suco de mirtilo. Os mesmos autores identificaram que a maior degradação ocorreu durante a desintegração dos frutos em virtude da presença da polifenoloxidase nativa (PPO). Kader (1992) destacou que o efeito da PPO é principalmente no escurecimento enzimático, devido à degradação oxidativa das antocianinas. No entanto, a inativação térmica da PPO pode ser empregada impedido a degradação da antocianina. A aplicação de calor e a adição de dióxido de enxofre também foram eficazes em aumentar a recuperação de antocianinas, mas não de outros polifenóis presentes nos sucos (Lee *et al.*, 2002).

Miguel *et al.* (2004) avaliaram o efeito de dois métodos de extração de suco de romã sobre a sua qualidade e estabilidade. O primeiro método consistiu na separação de sementes de frutas e centrifugação. O segundo método consistiu em apertar as metades da fruta com um espremedor elétrico de laranja. Durante um período de 72 horas de armazenamento a temperatura de 4 °C, os sucos foram avaliados quanto à presença de açúcares, ácidos orgânicos e antocianinas. Não houve diferença significativa no teor de açúcares, ácidos orgânicos e antocianinas presentes nos sucos obtidos pelos dois métodos de extração, com exceção de uma diminuição drástica do nível de cianidina 3,5-diglucosídeo no suco obtido por centrifugação de sementes.

Outro método muito usado na extração de sucos é a extração com água quente por maximizar o rendimento de suco, a extração de cor e o sabor (Lee *et al.*, 2006a). Neste método os frutos são cortados e postos em contato com a água quente ou fervente. O calor quebra a polpa o suficiente para a extração do suco e do sabor. Este método também poderia simultaneamente inativar enzimas no suco (Chitarra e Chitarra, 2005). Lee *et al.*(2006a) usaram este método para a produção de suco de banana e o extrato obtido foi turvo, viscoso e de cor cinzenta, necessitando assim de um tratamento posterior, tal como o tratamento enzimático, para produzir um suco de maior aceitabilidade comercial.

Mota (2006) estudou a qualidade do suco de uva elaborado em um extrator caseiro que utiliza como princípio o arraste a vapor. A extração por 2 h apresentou

rendimento de 84% e as antocianinas foram os compostos que sofreram alteração mais significativa na elaboração do suco, com redução média de 42%.

Os sucos de fruta contêm colóides que são principalmente polissacarídeos (pectinas, celulose, hemicelulose, lignina e amido), açúcares, proteínas, taninos e metais (Vaillant *et al.*, 2001; Uenojo e Pastore, 2007). As pectinas estão associadas a vários problemas encontrados no processamento de sucos de frutas como: turbidez (Liew Abdullah *et al.*, 2007), formação de géis durante o aquecimento e formação de *fouling* durante os processos de separação por membranas (Sulaiman *et al.*, 1998). Sousa *et al.* (2007) ao analisarem mirtilo de vários grupos, encontraram teores de pectina variando de 0,3 a 0,6% em massa. Em virtude disto, vários estudos têm relatado a despectinização dos sucos usando o tratamento enzimático, basicamente com pectinases (Mutlu *et al.*, 1999; Buchert *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2006; Liew Abdullah *et al.*, 2007; Uenojo e Pastore, 2007). As pectinases hidrolisam a pectina resultando em um complexo pectina-proteína que tende a flocular (Liew Abdullah *et al.*, 2007). A redução de pectinas resulta em sucos menos viscosos, o que é vantajoso, pois facilita os processos de filtração subsequentes (Gava *et al.*, 2008).

Liew Abdullah *et al.* (2007) avaliaram os efeitos das condições de tratamento enzimático (tempo de incubação, temperatura de incubação e concentração da enzima) sobre as características físicas (tais como turbidez, viscosidade e cor). O suco de carambola foi tratado com enzima pectinase nas seguintes condições: tempo de incubação (2 e 10 min), temperatura de incubação (30 e 50 °C) e concentração de enzima (0,01 e 0,10 v/v%). Os resultados indicaram que a concentração da enzima foi o fator que mais afetou as características do suco de carambola. A condição do tratamento enzimático recomendado no estudo foi de 0,10% a concentração da enzima a 30 °C por 20 min.

Existem vários estudos sobre a otimização do pré-tratamento enzimático para clarificação de sucos de frutas: banana (Lee *et al.*, 2006a), limão doce (Rai *et al.*, 2004), sapoti (Sin *et al.*, 2006), carambola (Liew Abdullah *et al.*, 2007), cassis (Buchert *et al.*, 2005) e mirtilo (Buchert *et al.*, 2005). O tratamento enzimático para a hidrólise de substâncias pécticas é influenciado por diversos fatores, tais como: tempo de incubação, temperatura de incubação e concentração de enzima (Lee *et al.*, 2006a; Sin *et al.*, 2006).

As enzimas pectinolíticas são atualmente utilizadas no processamento industrial das bagas de uva a fim de facilitar a extração do suco (Malacrida e Motta, 2005). Com base em seu modo de ação e substrato preferencial, estas enzimas podem ser classificadas em três grupos distintos: esterases, hidrolases e liases. As esterases reagem por hidrólise da pectina em ácido pético e metanol (pectina metil esterase - PME) ou etanol (pectina acetil esterase - PAE). As hidrolases são do grupo das depolimerases e reagem por hidrólise do ácido pético em oligogalacturonatos (endo polgalacturonase – PG) ou em monogalacturonatos (exo PG). As liases também são do grupo das depolimerases e reagem por transeliminação, tanto do ácido pético em oligogalacturonatos não saturados (endo pectatoliase – PL) como com o ácido pético em digalactouronatos não saturados (exo PL); e as pectinas em metiloligogalactouronatos não saturados (endo pectinaliase - PL) (Yadav *et al.*, 2009).

Com as enzimas pectinolíticas, a rede da parede celular é rompida e, conseqüentemente, melhora o rendimento de suco (Landbo e Meyer, 2004). Além disso, o tratamento enzimático é conhecido por aumentar a extração de compostos fenólicos da matriz da parede celular.

Comercialmente existem vários tipos de misturas de enzimas para o processamento de sucos, muitos destes preparados contêm pectinases de ação endógena, celulases e hemicelulases em proporções variáveis. A partir do efeito destas enzimas sobre a parede celular, açúcares neutros como D-arabinose, D-galactose, L-ramnose e D-xilose, que estão ligados nas substâncias pécticas, são liberados e se tornam solúveis (Oliveira *et al.*, 2006). Além destas enzimas, enzimas de ação exógena também estão presentes nestes preparados, que potencializam a extração de compostos fenólicos glicosilados, como as antocianinas (Wrolstad *et al.*, 2005).

Buchert *et al.* (2005) conseguiram aumentar o rendimento de extração de antocianinas do suco de mirtilo (*V. myrtillus*) e groselhas (*Ribes nigrum*) utilizando preparados enzimáticos comerciais (Econase CE, Pectinex Ultra SP-L, Pectinex Smash, Pectinex BE 3-L e Biopectinase CCM, todas da Novozymes). A melhora foi mais pronunciada com as groselhas, devido às suas paredes celulares serem mais espessas. O uso destas enzimas elevou o teor total de antocianinas de 13 para 41% no suco de mirtilo e de 18 para 29% nos sucos de groselha. No entanto, estas enzimas podem,

efetivamente, hidrolisar certos glicosídeos e, portanto, afetar o perfil das antocianinas extraídas.

4.1.4 Alterações de qualidade do suco de mirtilo durante o processamento

Durante o processamento do mirtilo em suco ou suco concentrado ocorrem várias reações e a compreensão das alterações que as antocianinas sofrem com o tratamento é importante no que diz respeito ao seu papel funcional, na qualidade e estabilidade da cor (Skrede *et al.*, 2000). Antocianinas, assim como outros polifenóis são facilmente oxidadas devido as suas propriedades antioxidantes e, portanto, suscetíveis a reações de degradação durante várias operações unitárias de processamento. Devido ao seu valor funcional como micronutrientes, é fundamental que essas mudanças durante o processamento sejam medidas e avaliadas.

Kader (1992) relatou que a polifenoloxidase (PPO) nativa nos frutos de mirtilo, disponibilizada e ativada na desitegração dos frutos no início do processamento, acelera a destruição das antocianinas.

Skrede *et al.* (2000) conseguiram recuperar 32% das antocianinas presentes no fruto de mirtilo para o suco durante o processamento. Os mesmos autores observaram que as perdas mais acentuadas de antocianinas e polifenóis ocorreram durante a moagem e despectinização e associaram esse fato a presença da polifenoloxidase nativa. Durante a concentração do suco as perdas variaram de 1,5% (antocianinas) a 20% (procianidinas). Neste mesmo estudo mostraram que durante o processamento do suco de mirtilo ocorrem mudanças no perfil das antocianinas sendo que a forma mais estável encontrada foi a da malvidina associada a glicosídeos e a menos estável foi a delphinidina associada a glicosídeos.

Kader *et al.* (1997) destacaram o papel da PPO e do ácido clorogênico, o principal derivado hidroxicinâmicos encontrado no mirtilo, no escurecimento enzimático, devido à degradação oxidativa das antocianinas. No entanto, o branqueamento promove a inativação térmica da PPO impedido que a mesma promova a descoloração da antocianina (Fellows, 2006). Lee *et al.* (2002) mostraram em seus estudos que tanto o calor quanto o dióxido de enxofre são capazes de aumentar a recuperação de antocianinas presentes no suco de mirtilo, mas não de outros polifenóis.

Como pôde ser visto, os sucos de frutas podem ser elaborados por diversas técnicas de extração. Essas técnicas apresentam rendimentos diferentes que impactam diretamente no custo do produto. Além disso, resultam em sucos com distintos conteúdos de compostos fenólicos, afetando a funcionalidade do produto obtido. Assim, para que seja possível a otimização do processo produtivo, a fim de se obter produtos de melhor qualidade com um menor consumo de energia e menor adição de produtos químicos, há a necessidade do conhecimento dessas alternativas tecnológicas de extração do suco.

4.2 Materiais e Métodos

Com o objetivo de determinar a melhor alternativa tecnológica para a extração do suco de mirtilo foram testados quatro métodos de extração: centrifugação, desintegração, arraste a vapor e extração enzimática. Esses métodos foram comparados basicamente em relação à recuperação de compostos antociânicos e ao rendimento. Dentro do processo de extração enzimática, foram testadas um total de 4 (quatro) enzimas. Posteriormente, fez-se a otimização do melhor entre os quatro tratamentos.

4.2.1 Materiais

Os mirtilos (*V. corymbosum*) foram obtidos da Italbraz Company® (Vacaria, RS/Brasil) congelados em sacos de 1 kg na forma de IQF (*individual quick-frozen*) e armazenados a -18 °C até o uso. Estes frutos apresentaram um teor de sólidos solúveis totais de 15,15 ($\pm 0,60$) °Brix e de antocianinas monoméricas de 109,26 ($\pm 9,86$) mg de cianidina 3-glucosídeo/100 g de fruta. As enzimas, Novozyme® 33095 (NZ95), Novozyme® 33103 (NZ103), Novoferm® 61 (NF61) e Pectinex SMASH XXL® (PXXL), são preparados comerciais e foram obtidas da Novozymes S/A® (Bagsvaerd, Dinamarca). Essas enzimas são ativas em uma temperatura entre 15-55 °C e para uma faixa de pH de 2,8 - 4,5. As alíquotas da enzima foram diluídas 100 vezes com água destilada (como recomendado pelo fabricante). Todos os reagentes utilizados possuíam grau de pureza para análise.

4.2.2 Metodologia para o Processamento do Suco

Os mirtilos foram processados a suco de acordo com o fluxograma mostrado na Figura 4.2. A fim de identificar o melhor método para potencializar a extração de antocianinas quatro diferentes métodos de extração foram utilizados: centrifugação, desintegração, arraste a vapor e extração enzimática. Para todos os processos de extração de suco, os frutos foram descongelados sob refrigeração (5 °C) durante 24 h.

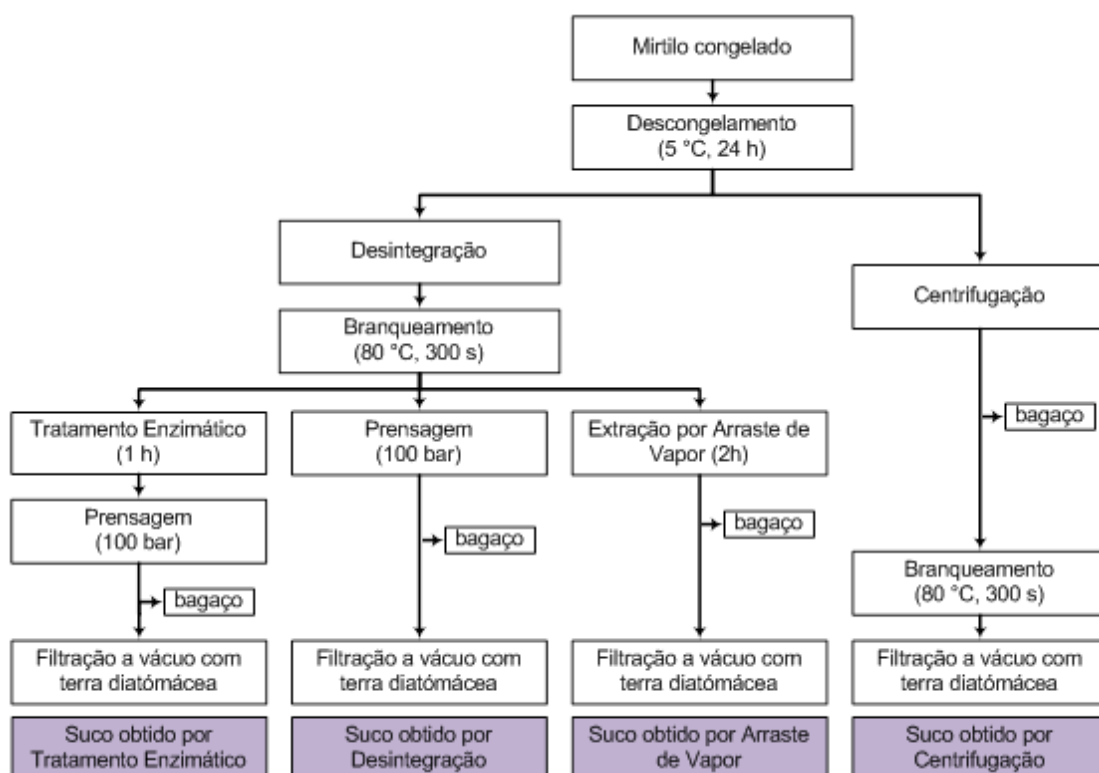


Figura 4.2 Fluxograma de processamento do suco de mirtilo para 4 (quatro) métodos de extração: tratamento enzimático, desintegração, arraste a vapor e centrifugação.

No processo de extração enzimática do suco, os frutos descongelados foram desintegrados em um liquidificador comercial (Ultra mixer, Britânia, Brasil). As bagas trituradas foram submetidas a um processo de branqueamento a 80 °C por cinco minutos. A polpa foi então resfriada rapidamente a 50 °C e adicionada da enzima na proporção descrita no planejamento fatorial. Durante a extração enzimática a polpa ficou sob agitação (Agitador com impelidor de 2 pás planas, Tecnal, TE039, Piracicaba/SP, Brasil) em banho termostático (Quimis, Q226M, Diadema/SP, Brasil) a

temperatura de 50 °C durante 1 hora. A Figura 4.3 mostra o tipo de prensa hidráulica (Capacidade 2 kg, Bellinox, Carlos Barbosa/RS, Brasil) utilizada; neste equipamento o extrato foi pressionado por três vezes com uma pressão máxima de 100 bar. O bagaço foi congelado para análises posteriores. O suco foi filtrado a vácuo (bomba Primatec, Modelo 131, Itu/SP, Brasil) com o auxílio de terra diatomácea na proporção de 1 g de terra para 10 g de suco e armazenado sob refrigeração até o momento das análises. Esse suco foi denominado de suco obtido por Extração Enzimática.



Figura 4.3 Imagem da Prensa Hidráulica utilizada para a extração do suco de mirtilo.
Fonte: Bellinox, Carlos Barbosa/RS.

Para o suco obtido por desintegração, os frutos foram macerados em um liquidificador doméstico. As bagas trituradas foram submetidas a um processo de branqueamento como descrito anteriormente. A polpa foi prensada em prensa hidráulica por três vezes com uma pressão máxima de 100 bar e filtrada a vácuo. O bagaço foi seco e armazenado para análises posteriores e o suco foi mantido sob refrigeração até o momento das análises e denominado de suco obtido por Desintegração.

No processo de arraste a vapor, o suco foi produzido usando uma panela extratora de suco. Em um primeiro momento, os frutos foram descongelados (5 °C) e desintegrados em um liquidificador doméstico. As bagas trituradas foram submetidas a um processo de branqueamento a 80 °C por 5 minutos. A polpa foi transferida para a panela extratora (Suqueira 5 kg, Ricefer, Garibaldi / RS, Brasil), que produz suco através do arraste a vapor, durante 2 horas. O suco foi filtrado a vácuo como descrito anteriormente. O suco foi armazenado sob refrigeração até o momento das análises e denominado de suco obtido por Arraste a Vapor.

Para o suco denominado suco obtido por Centrifugação, os frutos descongelados foram diretamente colocados em uma centrífuga para sucos (CF-01 Super Centrífuga Premium Juicer, Mondial, China). O suco foi submetido a um processo de branqueamento a 80 °C por 5 minutos e filtrado a vácuo.

4.2.3 Análises físico-químicas e reológicas

Todas as análises foram realizadas em triplicata. A acidez total titulável (ATT) foi determinada diluindo 10 g de suco em 75 mL de água destilada. A mistura foi titulada com NaOH 0,1 M a pH 8,1, monitorada por um medidor de pH (Tecnal, TEC-3MP, Piracicaba/SP, Brasil), e os resultados foram calculados e expressos em mg de ácido málico/100 g de suco (AOAC 942.15, 2002). Os teores de sólidos solúveis totais (SST) ou índice de refração (RI) do suco foram medidos usando um refratômetro digital (Carl Zeiss, Vienna, Áustria). Os resultados foram expressos em °Brix.

O teor de antocianinas foi determinado pelo método de pH diferencial proposto por Giusti e Wrolsted (2001) como descrito no Capítulo 3. As amostras foram diluídas em tampão de cloreto de potássio até que a absorbância da amostra a 520 nm estivesse dentro de um intervalo linear no espectrofotômetro UV1600 (Pro-análise, Brasil). Este fator de diluição também foi usado para diluir a amostra com tampão acetato de sódio. A leitura de comprimento de onda foi realizada após 15 minutos de incubação, quatro vezes por amostra, diluídas em soluções tampão em diferentes comprimentos de onda de 520 e 700 nm.

Para determinar o rendimento percentual do suco, calculou-se a razão entre a massa de suco em gramas (M_{suco}) e a massa de frutos em gramas (M_{fruto}) como mostra a Equação 4.1.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{M_{\text{suco}}}{M_{\text{fruto}}} \times 100 \quad (4.1)$$

O “ratio” (índice de maturação) foi calculado dividindo-se o valor nominal de sólidos solúveis totais (SST) pelo valor da acidez total titulável (ATT).

Os testes de viscosidade foram realizados com um viscosímetro capilar (CT52 Schott, Alemanha) a 40 °C, conectado a um aparelho automático de medição da viscosidade (tempo) (Schott, AV350, Alemanha). A Figura 4.4 mostra o aparato

utilizado no teste. Um vaso capilar n° 100 foi usado com a constante correspondente (K) com valor de $0,01471 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-2}$.



Figura 4.4 Imagem do viscosímetro capilar utilizado nos testes de viscosidade do suco de mirtilo. **Fonte:** Schott Instruments® < <http://www.schottinstruments.com>>.

A análise da cor do suco de mirtilo foi adaptada de uma técnica descrita por Wrolstad (1976), que consiste em diluir um grama de suco de mirtilo em 50 mL de tampão McIlvaine, pH 3,2; a leitura de absorbância (espectrofotômetro UV1600, Pro-análise, Brasil) foi realizada nos comprimentos de onda de 520 e 430 nm e os resultados foram multiplicados por 50. A relação da cor foi calculada pelo quociente de cor a 520 e 430 nm, respectivamente.

4.2.4 Planejamento dos Experimentos e Análise estatística

Inicialmente, quatro diferentes métodos de extração foram comparados (centrifugação, desintegração, arraste a vapor e extração enzimática) a fim de determinar qual apresenta o melhor desempenho com base no rendimento em suco, índice de refração, relação de cor, teor de antocianinas monoméricas e viscosidade.

O método de extração enzimática apresentou os melhores resultados e, em virtude disso, a etapa seguinte foi escolher entre as quatro enzimas disponíveis qual seria a melhor para a extração enzimática.

A enzima NZ103 mostrou-se como a melhor destas quatro enzimas e, portanto foi a utilizada para a determinação da concentração e da temperatura ideal de extração de acordo com um planejamento fatorial 2^2 com ponto central mostrado na Tabela 4.1. O índice de refração, teor de antocianinas monoméricas e viscosidade

foram medidos como variáveis dependentes. O delineamento completo consiste de quatro combinações, com mais três repetições no ponto central. As três repetições executadas no ponto central foram realizadas para permitir uma estimativa do erro puro.

Tabela 4.1 Valores utilizados no delineamento fatorial em função dos níveis para as variáveis de estudo (concentração da enzima NZ103 e da temperatura de extração) na extração de suco de mirtilo pelo método de um único estágio enzimático.

Nível	Concentração da Enzima NZ103 (%)	Temperatura (°C)
	X_1	X_2
-1,41	0,25	26
-1	0,50	30
0	1,24	40
1	1,98	50
1,41	2,23	54

Os resultados dos testes foram analisados com o programa Statistica para Windows (versão 7.0, Statsoft®, Tulsa, USA) através de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey a nível de 5% de significância, para comparação das médias.

4.3 Resultados e discussão

Os resultados serão apresentados em três seções de acordo com a execução dos experimentos: escolha do melhor método de extração, uso de dois tratamentos enzimáticos consecutivos, escolha da melhor enzima para um único tratamento enzimático e otimização da concentração da melhor enzima.

4.3.1 Comparação entre os sucos de mirtilo extraídos por diferentes métodos

Os resultados de rendimento, teor de antocianinas monoméricas e índice de refração (°Brix) de suco de mirtilo extraído por diferentes métodos são mostrados na Tabela 4.2. A partir destes dados, é possível observar que os processos que resultam em valores de rendimentos mais elevados e mais baixos são na extração por arraste a vapor (109,99%) e por desintegração (81,12%), respectivamente. O valor do rendimento gerado na extração por arraste a vapor (superior a 100%) pode ser

justificado pela incorporação de água ao suco e ao bagaço, não necessariamente na mesma proporção, durante o processo de extração, diluindo o suco e resultando em um teor de sólidos solúveis mais baixo (74,07%).

Tabela 4.2 Resultados para rendimento, teor de antocianinas monoméricas e índice de refração do suco de mirtilo extraído por desintegração, centrifugação, arraste a vapor e extração enzimática.

	Desintegração	Centrifugação	Arraste a Vapor	Extração Enzimática
<i>Rendimento (g)</i>				
Frutos	865,50	716,20	762,34	640,37
Suco	702,10	629,20	838,52	539,70
Bagaço	163,49	87,00	205,12	100,67
Recuperação (%)	81,12	87,85	109,99	84,28
<i>Antocianina (g)</i>				
Frutos	0,945	0,783	0,832	0,765
Suco	0,051	0,052	0,100	0,236
Bagaço	0,895	0,432	0,175	0,482
Recuperação (%)	5,40	6,64	12,02	30,85
<i>Índice de Refração (°Brix)</i>				
Frutos	10,28	8,51	9,06	8,25
Suco	9,22	7,87	6,71	7,83
Recuperação (%)	89,66	92,44	74,07	94,88

Antocianinas monoméricas expressas em gramas de cianidina 3-glicosídeo.

Como o principal objetivo deste estudo foi identificar o método de extração que permite a obtenção de suco com recuperações mais elevadas de antocianina, o suco que apresentou melhor desempenho foi o processado pelo método da extração enzimática que resultou em uma recuperação de 30,85 % de antocianina do fruto. Como se pode observar esse valor é bastante superior ao obtido pelos demais métodos.

Na Tabela 4.3 estão apresentados os resultados obtidos para o teor de antocianinas monoméricas, acidez total titulável, índice de refração e ratio para o suco de mirtilo extraído pelos quatro métodos de extração. Conforme pode ser observado o teor de antocianinas do suco extraído pelo método enzimático apresentou um valor de

42,35 mg/100 g, significativamente superior ao do suco obtido pelos demais métodos. Katsube *et al.* (2004) recomendaram o consumo de mais de 200 mg de antocianina por dia a fim de impedir a oxidação do LDL (lipoproteína de baixa densidade) e, com isso, reduzir a arteriosclerose.

Além disto, as antocianinas têm sido associadas ao aumento da sinalização neuronal nos centros cerebrais, mediando a função da memória. Krikorian *et al.* (2010) investigaram os efeitos do consumo diário de suco de mirtilo em proporção de 6,14 mg de cianidina 3-glicosídeo por kg corporal de idosos com problemas de memória. Ao final de 12 semanas, esses idosos apresentaram melhoras na aprendizagem, na evocação de lista de palavras, redução dos sintomas depressivos e menores níveis de glicose. Deste ponto de vista, um idoso de 70 kg deveria consumir diariamente cerca de 1 litro de suco de mirtilo produzido por extração enzimática ou 4 litros de suco processados por arraste a vapor.

Tabela 4.3 Comparação entre os resultados obtidos para o teor de antocianinas monoméricas, acidez total titulável, índice de refração e ratio para o suco de mirtilo extraído por desintegração, centrifugação, arraste a vapor e extração enzimática.

Propriedade	Desintegração	Centrifugação	Arraste a Vapor	Extração Enzimática
Antocianinas monoméricas (mg/100g)	6,03 ± 0,09 ^a	7,03 ± 0,07 ^b	10,57 ± 0,33 ^c	42,35 ± 3,68 ^d
Acidez Total Titulável (meq/100g)	0,58 ± 0,01 ^b	0,58 ± 0,01 ^b	0,32 ± 0,01 ^a	0,32 ± 0,01 ^a
Índice de Refração (°Brix)	13,13 ± 0,09 ^b	12,50 ± 0,17 ^b	8,00 ± 0,06 ^a	14,50 ± 0,17 ^c
Ratio (°Brix/TTA)	22,45	21,46	24,66	45,82

*Letras minúsculas iguais na mesma linha representam que não há diferença significativa (Tukey HSD, p<0,05).

Apesar da legislação brasileira não apresentar ainda padrões internos de qualidade específicos para o suco de mirtilo, nos Estados Unidos o “Codex Alimentarius Commission” recomenda que os sucos de mirtilo apresentem índices de refração superiores a 8 °Brix (FAO, 2001). Observa-se que os sucos obtidos pelo método de arraste a vapor apresentam um valor de índice de refração muito próximo ao limite da

legislação americana. O suco obtido pelos demais métodos de extração apresentaram valores de sólidos solúveis totais superiores a 12 °Brix.

Mota (2006) relatou que sucos com valores de ratio inferiores a 10 precisam de adição de açúcar ou associados a sucos mais doces para serem consumidos. O ratio (relação SST/ATT) encontrado foi superior a 20 para todos os métodos de extração, indicando que os sucos obtidos neste estudo apresentam doçura satisfatória e não precisam de adição de açúcar.

4.3.2 Seleção do tipo de enzima para extração do suco

Na Tabela 4.4 estão apresentados os resultados obtidos para as diferentes enzimas utilizadas para o tratamento enzimático em um único estágio utilizando 1% de cada enzima. Quanto aos aspectos de cor, os valores do comprimento de onda de 430 nm estão relacionados com a quantidade de polifenoloxidase (PPO) presentes no suco que estão relacionadas com o escurecimento enzimático e, no segundo o comprimento de onda (520 nm) encontra-se o comprimento de absorção máxima das antocianinas. Para resultados de cor a 430 nm, os valores mais baixos (5,81) foram obtidos com NZ95, enquanto para os resultados de cor a 520 nm, valores elevados (11,64) foram obtidos com NF61. De acordo com Wightman e Wrolstad (1996) a melhor estabilidade do suco é conseguida em valores mais elevados da relação de cor. No presente estudo isto ocorreu com a enzima NZ95, porém este valor não foi estatisticamente diferente do obtido para a NZ103. O máximo teor de antocianinas (41,67 mg/100 g) foi obtido com o uso da enzima NZ103, estatisticamente superior ao da NZ95.

Tabela 4.4 Resultados de índice de refração, rendimento, cor, teor de antocianinas monoméricas e viscosidade de sucos extraídos de 40 °C com diferentes enzimas na concentração de 1%.

Enzima	NZ95	NZ103	PXXL	NF61
Índice de refração do suco (°Brix)	15,2 ^b ± 0,2	15,5 ^b ± 0,1	14,5 ^a ± 0,2	15,7 ^b ± 0,3
Rendimento (%)	66,29 ^a	63,46 ^a	63,39 ^a	63,27 ^a
Cor (520 nm)	10,56 ^a ± 0,2	11,33 ^b ± 0,08	11,29 ^b ± 0,06	11,64 ^b ± 0,15
Cor (430 nm)	5,81 ^a ± 0,01	6,33 ^b ± 0,10	6,58 ^c ± 0,06	7,29 ^d ± 0,13
Relação de Cor	1,817 ^b	1,789 ^b	1,715 ^b	1,597 ^a
Antocianina Monomérica (mg/100g)	35,78 ^a ± 0,57	41,67 ^b ± 0,87	40,11 ^b ± 0,70	40,46 ^b ± 0,79
Viscosidade (mm ² /s)	1,17 ^a ± 0,02	1,18 ^a ± 0,02	1,31 ^c ± 0,02	1,23 ^b ± 0,01

*Letras minúsculas iguais na mesma linha representam que não há diferença significativa (Tukey HSD, p<0,05).

Considerando o erro experimental de até 15% para a análise de rendimento, mostrado na seção anterior, apesar da enzima NZ95 apresentar maior rendimento este valor não difere das demais enzimas. Para os resultados de viscosidade, a redução máxima foi obtida utilizando NZ95 (1,168) e NZ103 (1,182).

Devido ao melhor desempenho global, com baixa viscosidade e alta relação de cor e considerando o alto teor de antocianinas totais obtidos com seu uso, NZ103 pode ser considerada como a melhor enzima e, por esta razão, foi escolhida para os próximos estudos.

4.3.3 Determinação da melhor condição de extração enzimática

Na Tabela 4.5 estão apresentados os resultados para o índice de refração, teor de antocianinas monoméricas e viscosidade com o objetivo de escolher as melhores condições para a extração enzimática do suco de mirtilo utilizando a enzima NZ103. Os menores valores de viscosidade obtidos (1,166 e 1,156 mm²/s) foram nos tratamentos que utilizavam as maiores concentrações da enzima (1,98 e 2,23%, respectivamente). Gummadi e Panda (2003) e Aehle (2007) destacaram a importância do uso de enzimas pectinolíticas nas indústrias de sucos de frutas para reduzir a viscosidade e melhorar e aumentar a eficiência de filtração e clarificação. Ainda, Lee *et al.* (2002) em seus estudos indicaram que concentrações de enzimas pectinolíticas na ordem de 1 % são

suficientes para a redução da viscosidade e para obter uma maior recuperação de antocianinas.

Quanto ao conteúdo de antocianinas e viscosidade, os maiores valores foram obtidos com a menor concentração da enzima e a temperatura mais elevada. Também é possível afirmar, com base nos dados da Tabela 4.5, que o índice de refração aumenta com o aumento da temperatura.

Tabela 4.5 Resultados para índice de refração, teor de antocianinas monoméricas e viscosidade de suco de mirtilo elaborado por extração enzimática com NZ103 variando a concentração da enzima e a temperatura de extração.

Concentração da Enzima (%)	Temperatura (°C)	Viscosidade Cinemática (mm ² /s)	Antocianina Monomérica (mg/100g)	Índice de refração do suco (°Brix)
1,98	30	1,166 ± 0,001	38,04 ± 0,50	13,40 ± 0,10
0,50	30	1,354 ± 0,002	29,32 ± 0,64	14,80 ± 0,10
1,98	50	1,195 ± 0,002	59,79 ± 0,57	16,60 ± 0,53
0,50	50	1,338 ± 0,013	47,29 ± 0,73	14,47 ± 0,40
0,25	40	1,453 ± 0,008	45,56 ± 0,80	16,93 ± 0,12
2,23	40	1,156 ± 0,001	54,21 ± 0,87	16,50 ± 0,10
1,24	26	1,298 ± 0,007	30,35 ± 0,17	13,63 ± 0,15
1,24	54	1,285 ± 0,012	56,08 ± 0,75	14,10 ± 0,10
1,24	40	1,201 ± 0,006	46,24 ± 0,54	16,47 ± 0,15
1,24	40	1,181 ± 0,001	46,10 ± 0,22	16,63 ± 0,23
1,24	40	1,189 ± 0,001	53,39 ± 0,57	17,00 ± 0,10

Para avaliar o nível de significância das variáveis independentes, uma ANOVA (Análise de Variância) foi aplicada aos dados experimentais e estes valores são apresentados na Tabela A.4.1. Para a viscosidade, os resultados mostram que tanto a concentração da enzima (x_1 e x_1^2) quanto a temperatura (x_2^2) e a interação entre elas ($x_1 \cdot x_2$) exercem influência significativa ($p < 0,05$). Para o teor de antocianinas monoméricas, as variáveis que exerceram influência significativa ($p < 0,05$) foram a concentração da enzima (x_1) e a temperatura (x_2 e x_2^2). Já para o índice de refração (°Brix) apenas a temperatura (x_2 e x_2^2) e a interação concentração/temperatura ($x_2 \cdot x_2$) exercem influência significativa ($p < 0,05$).

Com base nos resultados obtidos, uma equação geral (Equação 4.2) foi proposta para representar essas três variáveis como uma função da concentração de enzima (x_1) e da temperatura (x_2).

$$Visc, ACY, Brix = a_0 + a_1x_1 + a_{11}x_1^2 + a_2x_2 + a_{22}x_2^2 + a_{12}x_1x_2 \quad (4.2)$$

onde a_s são constantes. Os modelos foram validados pois, nos três casos, o $F_{calculado}$ foi maior que o $F_{tabelado}$ (4,51).

Na Tabela 4.6 estão apresentados os valores significativos para as constantes a_0 , a_1 , a_{12} , a_2 , a_{22} e a_{12} da Equação 4.2 para cada variável e os coeficientes de correlação correspondentes. Com base nestes coeficientes observa-se um bom ajuste para viscosidade, teor de antocianinas e índice de refração com valores de R^2 de 0,9398, 0,9337 e 0,9150, respectivamente.

Tabela 4.6 Valores para as constantes a_0 , a_1 , a_{12} , a_2 , a_{22} e a_{12} da Equação 4.2 para viscosidade, antocianina e índice de refração e os valores de $F_{calculado}$ e coeficientes de determinação (R^2) correspondentes.

Parâmetro	Viscosidade Cinemática (mPa.s)	Teor de Antocianinas Monoméricas (%)	Índice de Refração (° Brix)
a_0	1,192 ± 0,003	48,53 ± 0,53	16,61 ± 0,06
a_1	NS	4,33 ± 0,45	NS
a_{11}	- 0,096 ± 0,002	NS	NS
a_2	0,051 ± 0,002	9,57 ± 0,44	0,44 ± 0,05
a_{22}	0,040 ± 0,002	- 3,47 ± 0,51	- 1,53 ± 0,06
a_{12}	0,012 ± 0,002	NS	0,88 ± 0,08
$F_{calculado}$	84,29	80,93	58,10
R^2	0,9398	0,9337	0,9107

NS indica que esse parâmetro foi ignorado pois foi considerado não significativo pela ANOVA ($p < 0,05$).

A região ótima de extração pode ser identificada pela análise da curva de contorno para viscosidade, antocianinas e índice de refração, em função da temperatura e da concentração da enzima NZ103 (%), obtidas a partir destes modelos (Figura 4.5). Na Figura 4.5 (a) verifica-se que a viscosidade diminui com o aumento da concentração da enzima. No entanto, ao analisar a Figura 4.5 (b), é possível concluir que a região ótima de extração para maximizar o teor de compostos antocianínicos corresponde a maiores concentrações de enzima e temperatura de 50 °C. Na Figura 4.5 (c) está mostrada a influência da temperatura e da concentração de enzima sobre

o índice e refração, indicando que a temperaturas entre 37 e 47 °C o teor de açúcares é maximizado. Novamente, é importante reforçar a ideia de que para minimizar a degradação de antocianinas, deve-se escolher a faixa mais baixa de temperaturas que, ao mesmo tempo, represente uma inativação enzimática satisfatória (Skrede *et al.*, 2000; Kechinski *et al.*, 2010).

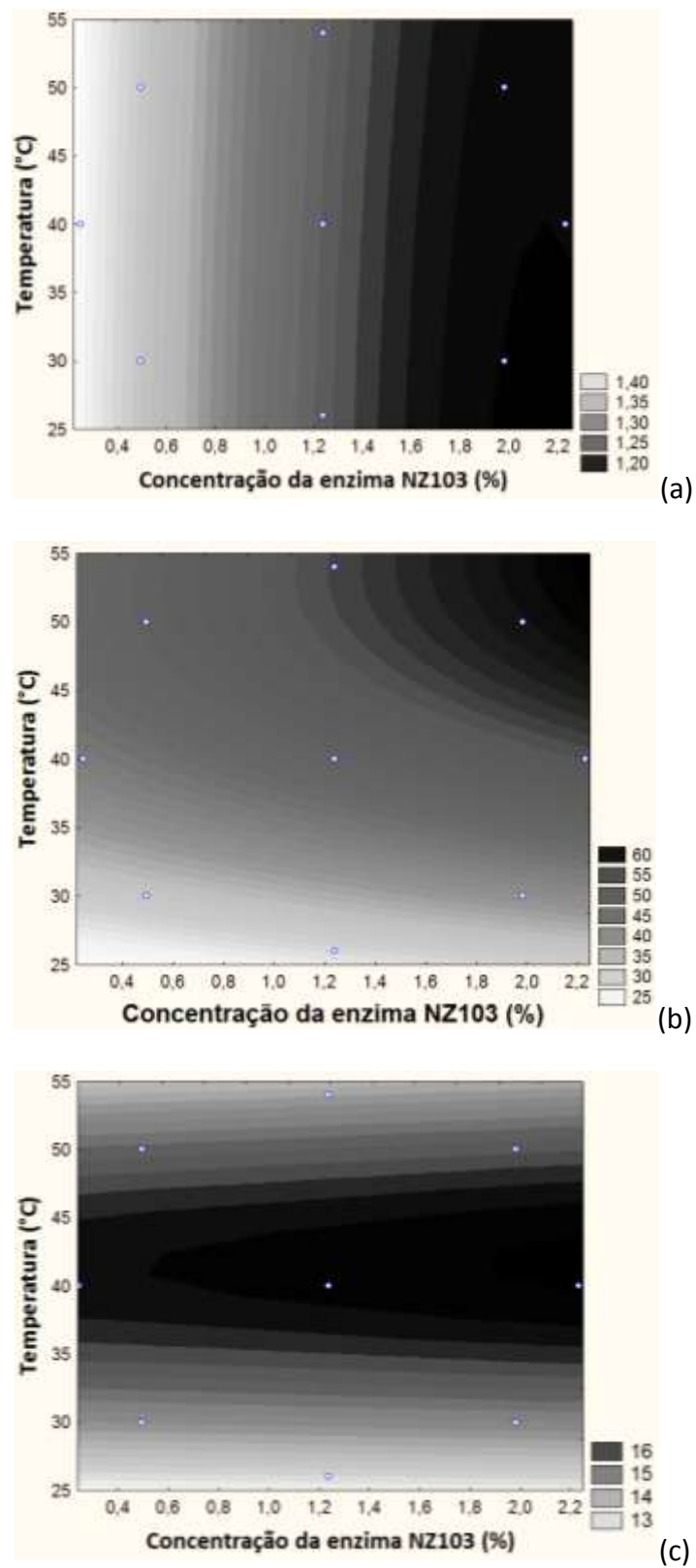


Figura 4.5 Curvas de contorno em função da temperatura e da concentração da enzima NZ103 para: (a) viscosidade, (b) teor de antocianinas e (c) índice de refração.

4.4 Conclusões

O presente estudo mostrou uma comparação entre diferentes métodos de extração de suco de mirtilo. A extração por arraste a vapor resulta em valores de rendimento aparentemente mais elevados em virtude da incorporação de vapor de água ao suco durante o processo de extração, no entanto, ocorre uma diluição do suco resultando em um teor de sólidos solúveis totais mais baixo. O método de extração enzimática resultou em níveis mais elevados de recuperação de antocianinas em comparação com o método de extração por arraste a vapor.

Para a viscosidade todas as enzimas testadas apresentaram resultados semelhantes, porém para a extração de antocianinas a melhor enzima foi a NZ103. O maior teor de antocianinas e a maior redução da viscosidade foram obtidos quando a extração foi realizada a temperatura de 50 °C e com concentrações de enzima NZ103 próximas a 2%.

A escolha do melhor método de extração é importante na elaboração de sucos funcionais a fim de garantir um produto com maior teor de compostos nutracêuticos, neste caso específico as antocianinas.

Capítulo 5

Inativação da Polifenoloxidase do Suco de Mirtilo Mediante Tratamento Térmico

A otimização do processo térmico (ou branqueamento) em alimentos que contenham enzimas endógenas termorresistentes se torna difícil pelo fato destas enzimas apresentarem uma dependência com a temperatura da mesma forma que os nutrientes e fatores de qualidade (cor e textura) (Lund, 1975). O uso de altas temperaturas no processamento de sucos é capaz de inativar essas enzimas que causam o escurecimento enzimático do suco, porém pode degradar muitos compostos funcionais termosensíveis, como vitaminas, aminoácidos, compostos fenólicos, proteínas entre outros. Segundo o mesmo autor, no processo térmico, baseado na inativação enzimática, a enzima mais termorresistente, que pode alterar a qualidade do produto durante o armazenamento, é usada como parâmetro no estabelecimento do processo. Entre estes alimentos encontram-se as frutas que, em geral, contêm enzimas termorresistentes como a polifenoloxidase, peroxidase e pectinesterase (Ramaswamamy *et al.*, 1989). Além disso, sabe-se que a resistência térmica de microrganismos capazes de se desenvolver em sucos é menor que a de enzimas presentes como a peroxidase e a polifenoloxidase, desta forma, determinar as condições em que ocorre inativação enzimática implica obter um produto seguro do ponto de vista microbiológico (Labib *et al.*, 1995).

A polifenoloxidase (PPO) faz parte de um grande grupo de enzimas conhecidas como oxiredutases e são responsáveis pelo escurecimento em frutas, vegetais e seus produtos processados e, por isso, o controle das atividades destas enzimas é de grande importância durante a transformação dessas matérias-primas para a obtenção de produtos processados (Clemente e Pastore, 1998).

A aparência é a característica mais importante de qualidade de um alimento para o consumidor e o controle do escurecimento enzimático durante o armazenamento e processamento de frutos é de fundamental importância para a sua preservação; assim, é de grande interesse para indústria de alimentos o estudo de métodos para inativação destas enzimas. Como o mirtilo cultivado recentemente no Brasil apresenta características distintas daqueles cultivados em outras regiões, e na literatura, os dados encontrados concentram-se nos frutos cultivados no hemisfério norte, estudos relacionados ao processamento do mirtilo brasileiro são importantes. Em virtude disso, o objetivo desta etapa foi utilizar a metodologia de superfície de resposta para avaliar a atividade da PPO em polpas de mirtilo e estudar o comportamento de sua atividade enzimática frente ao tratamento térmico utilizando temperaturas na faixa de 32 a 88°C e tempos entre 88 e 512 segundos.

5.1 Fundamentos Teóricos e Revisão Bibliográfica

Nesta seção são apresentados alguns aspectos importantes relacionados à atividade das enzimas, em especial a PPO, em derivados de frutas, tais como: características gerais, efeitos da PPO em alimentos e efeitos de substâncias químicas na inibição e ativação dessa enzima.

5.1.1 Ação das Enzimas nos Derivados de Frutas

Em alimentos congelados, a taxa das reações catalisadas por enzimas é frequentemente o principal limitante para se estender o shelf-life do produto, devido às alterações sensoriais resultantes de sua atividade, seja em sabor, textura ou cor. Várias enzimas presentes em frutas e vegetais foram relatadas como causadoras de alterações durante a estocagem de alimentos congelados. Alguns exemplos são lipase, álcool desidrogenase, peroxidase, fosfolipase D, polifenoloxidase, superóxido

dismutase, mirosinase, lipoxigenase, protease, xantina-oxidase (Churchill e Scott, 1986).

A polifenoloxidase catalisa a oxidação de compostos fenólicos na presença de oxigênio formando compostos escuros. A peroxidase é uma enzima oxidativa que pode provocar alterações de cor, gosto e aroma em frutas e vegetais. A pectinametilesterase promove a desmetoxilação da pectina, liberando álcool metílico e formando ácido pectínico e ácido péctico, alterando a textura de frutas e vegetais.

A velocidade das reações enzimáticas em derivados de frutas, normalmente refrigerados ou congelados, por sua vez, é influenciada pela temperatura e pelas alterações físico-químicas. As reações catalisadas por enzimas são consideradas limitadas pela capacidade de difusão das moléculas no meio, já que a ocorrência destas reações requer que o substrato entre em contato com a enzima e se reorienta de forma a se enquadrar no seu sítio ativo. Os produtos da reação também devem se difundir e se afastar da enzima, de forma que a reação prossiga (Manzocco *et al.*, 1998).

5.1.2 Características Gerais da Polifenoloxidase (PPO)

A polifenoloxidase (monofenol, dihidroxi-L-fenilalanina oxigênio oxidoreductase EC 1.14.18.1) é uma enzima que contém íon cobre no sítio ativo, e está presente em fungos e bactérias, na maioria das plantas e em todos os mamíferos (Martinez e Whitaker, 1995). Apresenta a propriedade de catalisar duas reações, ambas com utilização de oxigênio molecular: a hidroxilação de monofenóis a o-difenóis, pela ação da cresolase e a oxidação de o-difenóis a o-quinonas, pela atuação da catecolase (Martinez e Whitaker, 1995; Kavrayan e Aydemir, 2001).

Para a reação de cresolase, substratos comuns são o-cresol, tirosina, p-cresol e ácido p-cumárico. Para a reação de catecolase, os exemplos de substratos são catecol, 4-metil catecol, catequina e epicatequina, ácido clorogênico, dopamina, ácido caféico, ácido gálico, ácido 3-(3,4 dihidroxifenil) propiônico (DHPPA) e L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) (Ayaz *et al.*, 2008).

Em vegetais, foi relatada a existência de polifenoloxidase tanto na forma solúvel quanto na forma ionicamente ligada (Martinez e Whitaker, 1995). Em plantas,

a polifenoloxidase localiza-se principalmente nos plastídeos e cloroplastos das células intactas (Rapeanu *et al.*, 2006). A atividade da enzima é maior em frutos verdes, diminuindo ao longo do período de maturação da fruta (Serradell *et al.*, 2000). Acredita-se que este fato seja causado pela solubilização e proteólise da enzima nos plastídeos durante o amadurecimento e estocagem, razão pela qual a fração solúvel aumenta na medida em que os frutos amadurecem (Concellón *et al.*, 2004).

As quinonas formadas pela polifenoloxidase em plantas constituem o primeiro sinal de resposta fisiológica quando ocorrem danos aos tecidos ou ataque de patógenos, e possuem propriedades antimicrobianas efetivas (Serradell *et al.*, 2000).

5.1.3 Efeitos da atividade da PPO em alimentos

A polifenoloxidase é responsável pelo escurecimento enzimático indesejável durante a manipulação, estocagem e processamento de tecidos danificados de frutas e vegetais, e até mesmo de alguns produtos de origem animal (Kavrayan e Aydemir, 2001). As o-quinonas formadas pela ação da enzima são instáveis (Concellón *et al.*, 2004) e rapidamente polimerizam dando origem a pigmentos escuros (melaninas) (Serradell *et al.*, 2000). A tonalidade de cor dos compostos formados pode variar dependendo dos compostos fenólicos presentes num dado tecido, resultando em pigmentos marrons, avermelhados ou negros (Dincer *et al.*, 2002). O escurecimento afeta a aceitação do alimento pelo consumidor e é uma das principais causas de rejeição de frutas e vegetais por problemas de qualidade (Serradell *et al.*, 2000). Em tecidos vivos, o substrato e a enzima encontram-se separados dentro das células. Qualquer tratamento que danifique a estrutura celular colocará a enzima em contato com seu substrato, permitindo que a reação ocorra. Isto inclui danos mecânicos e fisiológicos. Alguns vegetais íntegros sofrem danos pelo frio, com rompimento das paredes celulares no interior do vegetal, quando estocados para preservação em temperaturas inferiores a 10 °C, mas acima da temperatura de congelamento (Concellón *et al.*, 2004).

Além da formação de compostos escuros, as o-quinonas formadas também reagem com aminoácidos, peptídeos e proteínas, causando alterações estruturais e funcionais, e como consequência a diminuição do valor nutritivo dos alimentos

(Escribano *et al.*, 1997). Em frutas vermelhas, como mirtilo, morango, framboesa e amora, a atividade de polifenoloxidase também pode ser responsável pela degradação das antocianinas, causando perda da cor vermelha (Serradell *et al.*, 2000).

5.1.4 Efeito de substâncias químicas na atividade de polifenoloxidase: inibidores e ativadores

Devido à importância do escurecimento enzimático no processamento de frutas e vegetais, diversos métodos de inibição da atividade da polifenoloxidase têm sido descritos na literatura. Em alguns casos, é empregada a inativação térmica da enzima. No entanto, para outras aplicações, o emprego de tratamentos térmicos intensos pode produzir alterações de cor, textura, e formação de *off – flavors* (Martinez e Whitaker, 1995).

O ajuste de pH com ácido cítrico, málico e/ou fumárico, para valores abaixo de 4 também é empregado para inibir o escurecimento em sucos e frutas em pedaços. Como a ação da enzima é dependente do oxigênio molecular, a utilização de embalagens não permeáveis ao oxigênio, com atmosfera de CO₂ ou N₂ também é prática comum na prevenção do escurecimento (Martinez e Whitaker, 1995). De acordo com os mesmos autores, a PPO pode ser removida dos sucos de frutas por β-ciclodextrinas e polivinilpirrolidona ou polietilenoglicóis insolúveis. Esses tratamentos, no entanto, são caros e nem sempre estão disponíveis.

O método mais empregado de inibição da polifenoloxidase consiste na utilização de agentes redutores. O metabissulfito de sódio promove tanto a inativação da PPO como também atua na redução de benzoquinonas a o-dihidroxiifenóis (Martinez e Whitaker, 1995). A ação inibitória do ácido ascórbico sobre a polifenoloxidase também foi relatada em cogumelos (Kavrayan e Aydemir, 2001) e kiwi (Park e Luh, 1985). O aminoácido L-cisteína atua na inibição da polifenoloxidase de duas formas: primeiramente, estendendo a fase lag da PPO, e em seguida, combina-se com as quinonas impedindo a formação de melanina (Martinez e Whitaker, 1995). Outros agentes inibidores relatados são cianeto de potássio e ditioneitol, capazes de se ligar ao cobre presente no sítio ativo da enzima, além de mercaptoetanol, azida de sódio, ácido benzóico e glutatona (Kavrayan e Aydemir, 2001; Dincer *et al.*,

2002). No entanto, muitas destas substâncias são tóxicas para os seres humanos e, portanto, não são aplicáveis como ingredientes alimentícios.

Por outro lado, a adição de açúcares (como sacarose e glicose) promove um efeito estabilizante sobre a enzima, dificultando a sua inativação térmica. Este efeito também foi relatado para sais como sulfato de amônio e cloreto de sódio (Kavrayan e Aydemir, 2001). Detergentes, como o dodecilsulfato de sódio, se ligam ao sítio ativo da enzima, causando uma mudança conformacional que a torna mais ativa (Park e Luh, 1985) (Concellón *et al.*, 2004). Na Tabela 5.1 estão apresentadas as características de inativação da polifenoloxidase de várias frutas (temperatura e tempo) com a respectiva referência. Nela pode-se observar que os valores obtidos nesse trabalho estão de dentro da faixa de tempo e temperatura desses estudos. Pode-se destacar dessa tabela os trabalhos com amora preta (*Rubus spp*) com temperatura de 90 °C durante 30 segundos (Guimarães, 2006) e morango (*Fragaria ananassa*) com temperatura de 65 °C durante 1800 segundos (Serradell *et al.*, 2000). Outros autores trabalharam com a otimização apenas do tempo considerando a temperatura de ebulição, como Santos (2001) e Fujita *et al.* (1995) que trabalharam, respectivamente, com açaí (*Euterpe oleracea*) e pinha (*Annona squamosa L.*) e encontraram tempos de 120 e 600 segundos, respectivamente.

Tabela 5.1 Tempo e temperatura de inativação da PPO em diferentes fontes.

Fonte	Temperatura (°C)	Tempo (s)	Referência
Abacaxi (<i>Ananas comosus</i> L.)	90	60	(Brito, 2001)
Melão (<i>Cucumis melo</i> L.)	80	300	(Lamikanra e Watson, 2000a)
Açaí (<i>Eutherpe oleracea</i>)	100	120	(Santos, 2001)
Kiwi (<i>Actinidia chinensis</i>)	75	60	(Park e Luh, 1985)
Morango (<i>Fragaria ananassa</i>)	65	1800	(Serradell <i>et al.</i> , 2000)
Nêspera (<i>Mespilus germanica</i>)	80	1800	(Dincer <i>et al.</i> , 2002)
Pinha (<i>Annona squamosa</i> L.)	100	600	(Fujita <i>et al.</i> , 1995)
Amora Preta (<i>Rubus spp</i>)	90	30	(Guimarães, 2006)

5.2 Materiais e Métodos

5.2.1 Preparação do extrato enzimático

Amostras de 200 g de mirtilo congelado foram trituradas com mixer, alternando com resfriamento em banhos de gelo para não elevar a temperatura da amostra. Em seguida, a polpa foi centrifugada (centrífuga modelo CT5000R, Cientec Instrumentos Cientificos S.A., Santiago/Chile) a 10.000 rpm durante 15 minutos. O precipitado foi descartado e o sobrenadante (extrato enzimático) armazenado a 4 °C até o momento da análise.

5.2.2 Determinação da Atividade da PPO solúvel

A atividade da PPO foi determinada como descrito por Oktay *et al.* (1995) e Lima (1999), modificado por Guimarães (2006). Esse método se baseia na reação que acontece entre o reagente catecol e o oxigênio, catalisada pela enzima polifenoloxidase (PPO) formando o-quinona, conforme mostrado na Figura 5.1.

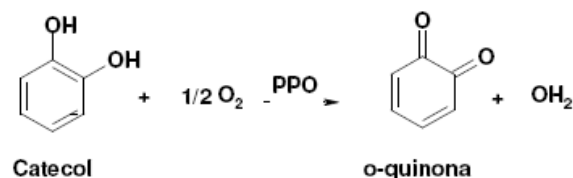


Figura 5.1 Reação entre o catecol e o oxigênio formando o-quinona, catalisada pela polifenoloxidase (PPO). **Fonte:** Pérez-Gilabert e Carmona (2000).

A mistura de 3,8 mL de solução de catecol 0,01 M em tampão fosfato 0,05 M, pH 6,0 foi incubada a 25 °C durante 10 minutos. Em seguida foram adicionados 0,2 mL de extrato enzimático. Após 15 segundos de reação, o aumento da absorbância a 420 nm, foi monitorada até 5 minutos de reação a 25 °C contra o branco em espectrofotômetro (Pró-análise modelo UV-1600) previamente zerado com água destilada. O branco foi preparado pela mistura de 3,8 mL de catecol 0,01 M em 0,2 mL de tampão fosfato 0,05 molar pH 6,0. Uma unidade de atividade de PPO foi definida como o aumento de 0,001 na absorbância por minuto por mL da amostra.

5.2.3 Tratamento Térmico

Os extratos enzimáticos concentrados foram submetidos a tratamento térmico nas temperaturas de 32, 40, 60, 80 e 88 °C, por períodos variando entre 88 a 512 segundos e, posteriormente, determinou-se a atividade da PPO solúvel.

5.2.4 Desenho Experimental e Análise Estatística

O desenho experimental seguiu um fatorial 2² com delineamento composto central rotacional (DCCR). As variáveis independentes para o tratamento térmico foram: tempo, X₁ (88 a 512 segundos) e temperatura, X₂ (32 a 88 °C).

Na **Erro! Fonte de referência não encontrada.** estão apresentados os níveis com os respectivos valores utilizados para o binômio tempo e temperatura do tratamento térmico da polpa de mirtilo. Observa-se que cada variável independente possui 5 níveis codificados (x_i , $i=1, 2$) com os seguintes valores: -1,41, -1, 0, +1 e +1,41, totalizando 11 experimentos incluindo 3 repetições do ponto central (codificado por 0) sendo que

os experimentos foram realizados de modo aleatório para minimizar o erro experimental (Rodrigues e lemma, 2005). A variável dependente foi a atividade da PPO e todas as análises foram feitas em triplicata.

Tabela 5.2 Valores utilizados no delineamento fatorial em função dos níveis para as variáveis de estudo (tempo e temperatura) empregadas no tratamento térmico da polpa de mirtillo.

Nível	Tempo (s)	Temperatura (°C)
-1,41	88	32
-1	150	40
0	300	60
1	450	80
1,41	512	88

Os resultados dos experimentos do planejamento fatorial foram analisados pela Metodologia da Superfície de Resposta (MSR) por meio de um modelo quadrático, apenas com os parâmetros significativos, mostrado na Equação 5.1 utilizando o programa Statistica para Windows (versão 7.0, Statsoft®, Tulsa, USA).

$$APPO = a_0 + a_1 \times x_1 + a_{11} \times x_1^2 + a_2 \times x_2 + a_{22} \times x_2^2 + a_{12} \times x_1 \times x_2 \quad (5.1)$$

Nessa equação *APPO* é a atividade da polifenoloxidase (PPO) em U/mL, a_{ij} são os parâmetros a serem estimados (pela técnica dos mínimos quadrados) e x_i são os valores codificados para as variáveis de estudo. O modelo foi avaliado com base nos seguintes parâmetros: coeficiente de determinação (R^2) que define o percentual de variação na resposta que é explicada pelo modelo e pelo valor de F da regressão. Para o cálculo do F da regressão, compararam-se os valores gerados pela análise de variância (ANOVA) do modelo, apenas com os parâmetros significativos, com valores tabelados a fim de definir se o modelo foi significativo, a um nível de significância de 5%.

A otimização do tempo de tratamento térmico foi feita através do uso dos mínimos quadrados no software Matlab (Matlab 5.3®, MathWorks Inc., Natick, USA).

5.3 Resultados e Discussão

Os resultados obtidos da reação entre a PPO e pirocatecol estão apresentados na Figura 5.2 onde se pode observar no eixo das ordenadas a média da leitura das absorbâncias, subtraídas do branco, graficadas *versus* o tempo de reação (5 minutos), nas abscissas, para os diferentes tratamentos térmicos. Conforme pode ser verificado, com temperaturas mais amenas de tratamento (entre 32 e 40 °C) a linha absorbância *versus* tempo apresenta uma inclinação positiva indicando maior atividade enzimática; em contrapartida, ao se elevar a temperatura (entre 80 e 88 °C) a inclinação da curva passa a ser praticamente nula, indicando que não há mais atividade da enzima. Este mesmo comportamento é observado quando tempos longos são utilizados, como no tratamento a 60 °C durante 512 s. Troiani *et al.* (2003), ao estudarem a inativação da PPO em uvas da cultivar *Rubi*, *Borbon* e *Benitaka* submetidas a tratamentos térmicos (60, 65, 70 e 75 °C durante períodos de tempo variando de 1 a 10 minutos), observaram uma diminuição contínua da atividade de PPO com o aumento do binômio tempo e temperatura do tratamento térmico.

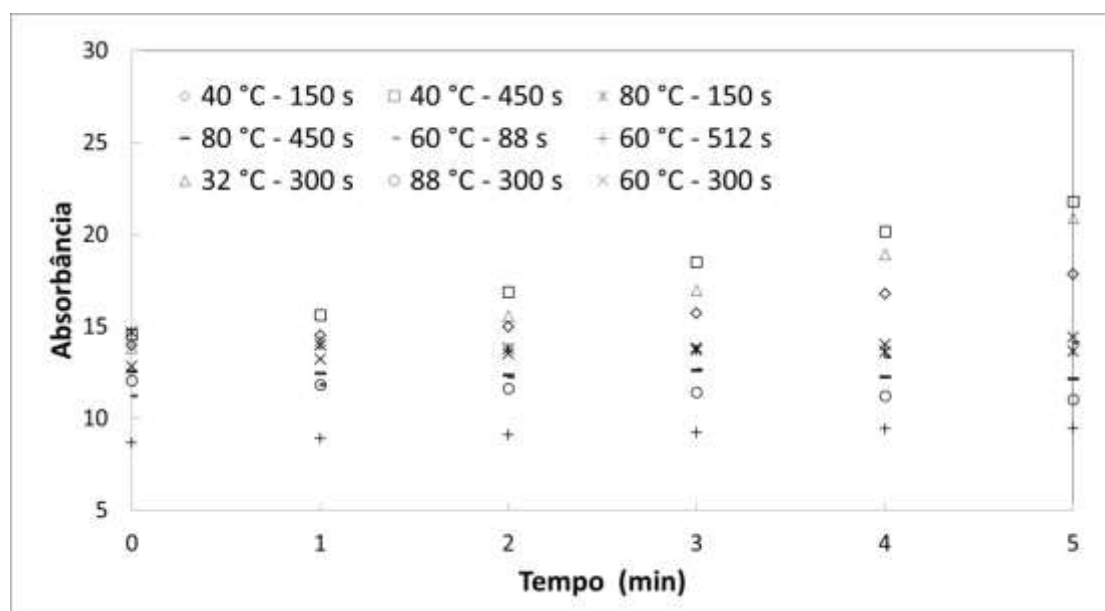


Figura 5.2 Absorbância da amostra subtraída da absorbância do branco em função do tempo para os diferentes tratamentos térmicos. Os valores de absorbância foram subtraídos do valor encontrado para a absorbância do branco.

Com base nos dados experimentais apresentados na Figura 5.2, foi possível determinar a atividade da PPO (U/mL) calculada a partir do coeficiente angular das retas dividido por 0,2 mL o que representa o aumento de 0,001 na absorbância, por minuto, por mL da amostra. Os resultados de atividade da PPO estão apresentados na Tabela 5.3 com os respectivos coeficientes de correlação das retas. Nesta tabela observa-se que os tratamentos realizados a temperaturas superiores a 80 °C apresentaram valores zerados de atividade de PPO, indicando inativação da enzima. Kechinski *et al.* (2010) demonstraram em seus estudos que as antocianinas presentes no mirtillo se degradam a altas temperaturas, por isso o uso de temperaturas moderadas ou um curto tempo a altas temperaturas é recomendável no processamento do suco de mirtillo. Ainda, é possível observar nessa mesma tabela que se consegue uma redução considerável na atividade desta enzima operando a temperaturas de 60 °C durante 300 s.

Tabela 5.3 Atividade da PPO (U/mL) para as diferentes combinações de tempo e temperatura do planejamento fatorial.

Tratamento	Tempo (s)	Temperatura (°C)	Atividade da PPO (U/mL)	Coefficiente de Correlação
	$X_1 (x_1)$	$X_2 (x_2)$	Y_1	R^2
1	150 (-1)	40 (-1)	3,829	0,9699
2	450 (+1)	40 (-1)	7,371	0,9929
3	150 (-1)	80 (+1)	0,000*	0,8164
4	450 (+1)	80 (+1)	0,000*	0,9704
5	88 (-1,41)	60 (0)	2,768	0,9864
6	512 (+1,41)	60 (0)	3,818	0,9669
7	300 (0)	32 (-1,41)	7,232	0,9882
8	300 (0)	88 (+1,41)	0,000*	0,8645
9	300 (0)	60 (0)	1,114	0,9812
10	300 (0)	60 (0)	1,529	0,9928
11	300 (0)	60 (0)	1,325	0,8906

* atividade da enzima não significativa.

Nota: o coeficiente de correlação R^2 é referente ao ajuste linear dos dados da Figura 5.2 possibilitando o cálculo da atividade da PPO.

Os resultados da ANOVA para o planejamento fatorial estão mostrados no Anexo A.5.1 e o modelo estatístico para a inativação da PPO, dentro da faixa estudada, está apresentado na Equação 5.2 ($R^2 = 0,9776$).

APPO =

$$1,32(\pm 0,12) + 0,63(\pm 0,07) \times x_1 + 0,82(\pm 0,09) \times x_1^2 - 2,69(\pm 0,07) \times x_2 + 0,99(\pm 0,09) \times x_2^2 - 0,89(\pm 0,10) \times x_1 \times x_2 \quad (5.2)$$

onde: APPO é a atividade da PPO (U/mL) e x_1 e x_2 são as variáveis codificadas de tempo e temperatura, respectivamente.

O modelo foi validado, com coeficiente de determinação de 0,9776, e o valor de $F_{\text{calculado}}$ foi 2,1 vezes maior que o valor que o de F_{tabelado} permitindo a construção das curvas de contorno da atividade de PPO (U/mL) em polpa de mirtilo em função da temperatura e do tempo que podem ser observadas na Figura 5.3. A análise desta figura mostra a região ótima para inativação da atividade da PPO: tempo entre 200 e 500 segundos e temperaturas superiores a 72 °C.

Utilizando a Equação 5.2, fez-se uma otimização utilizando a função *Isqnonlin* no Matlab®, pelo método dos mínimos quadrados, e chegou-se ao binômio tempo/temperatura de 80°C durante 3,65 min (219 segundos).

Valores semelhantes a estes foram encontrados por outros autores em diferentes frutas, podendo-se destacar Santos (2001) e Fujita *et al.* (1995) que trabalharam, respectivamente, com açaí (*Euterpe oleracea*) e pinha (*Annona squamosa L.*) e encontraram tempos de 120 e 600 segundos, respectivamente a temperatura de 100 °C.

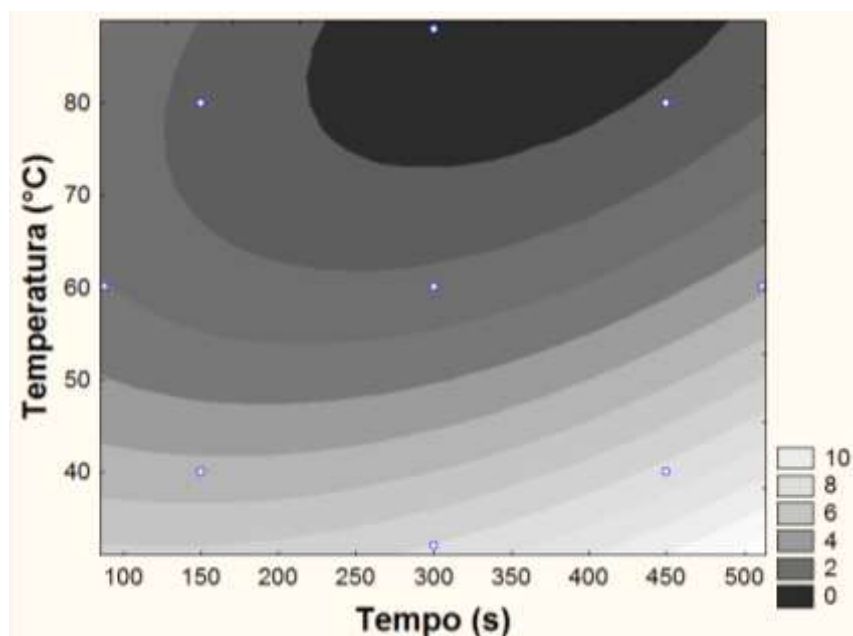


Figura 5.3 Curva de contorno da atividade de PPO em polpa de mirtilo.

5.4 Conclusões

Nesta etapa do trabalho foi investigada a relação do tempo e da temperatura na atividade da polifenoloxidação (PPO) presentes em polpas de mirtilo durante o tratamento térmico. Os resultados mostraram que estas duas variáveis têm influência na atividade da PPO, dentro da faixa estudada.

Observou-se que com temperaturas mais amenas de tratamento (próximas a 40 °C) a enzima possui os maiores valores de atividade; em contrapartida, ao se elevar a temperatura para valores superiores a 80 °C atividade da enzima é diminuída.

A otimização do binômio tempo e temperatura para a polpa do mirtilo chegou ao tratamento térmico de 80 °C durante 219 segundos implicando nas melhores condições para reduzir a deterioração das características sensoriais da fruta, aumentando assim a sua vida útil e reduzindo a perda de compostos fenólicos.

Capítulo 6

Estudo sobre a Redução da Atividade da Peroxidase do Suco de Mirtilo por Ultrafiltração

A estabilidade das antocianinas é influenciada por vários fatores discutidos mais detalhadamente no Capítulo 3, entre estes fatores as enzimas do grupo das oxiredutases desempenham um papel importante na degradação das antocianinas presentes em frutas e legumes. Além de degradar os compostos antociânicos, essas enzimas promovem o escurecimento de sucos na presença de oxigênio. No Capítulo 5 é apresentado um estudo de otimização do tratamento térmico para a inativação de uma enzima do grupo das oxiredutases, a polifenoloxidase (PPO). Outra enzima do grupo das oxiredutases de grande importância é a peroxidase (POD) que é reconhecida como sendo uma das mais estáveis ao calor. Essa enzima é amplamente utilizada como um indicador para os tratamentos térmicos, de forma que quando inativada, as demais enzimas, como a PPO.

Em virtude de que as antocianinas são degradadas pelo calor principalmente a temperaturas superiores a 50°C, o presente Capítulo apresenta o estudo de aplicação de um método alternativo ao tratamento térmico para a inativação da peroxidase presente no suco de mirtilo: a ultrafiltração.

A seguir serão apresentados os fundamentos teóricos e a revisão bibliográfica relativa aos processos de separação com membranas, com ênfase no processo de

ultrafiltração e nos estudos relacionados com a aplicação deste processo na clarificação de sucos. Os materiais e a metodologia adotada, os resultados obtidos neste estudo estão apresentados na sequência.

6.1 Fundamentos Teóricos e Revisão Bibliográfica

Nesta seção são apresentados aspectos importantes relacionados aos Processos de Separação com Membranas (PSM), assim como os fatores que afetam a eficiência destes processos e a enzima peroxidase.

6.1.1 Definição e Classificação dos Processos de Separação com Membranas (PSM)

Os PSM são operações que utilizam membranas no fracionamento de soluções e suspensões envolvendo espécies de tamanho e natureza química diferentes. O objetivo principal dos PSM é a separação de componentes presentes em solução e este pode ser alcançado devido à capacidade da membrana de transportar um determinado componente da corrente de alimentação mais prontamente que outros componentes presentes. Isso ocorre devido às diferenças existentes entre as propriedades físicas e/ou químicas da membrana e dos componentes que permeiam através dela (Mulder, 1996).

Durante as últimas três décadas, os PSM atraíram a atenção de diversos segmentos da indústria devido ao seu princípio da separação: o transporte seletivo e eficiente de separação em comparação com outros processos de separação bem estabelecidos. Separações com membranas não requerem o uso extensivo de aditivos, e podem ser realizadas isotermicamente em temperaturas baixas, com menor consumo de energia e menor degradação de compostos termolábeis em comparação com outros processos de separação. Além disso, devido ao seu caráter modular, eles apresentam ainda maior simplicidade de operação e facilidade de integração com outros processos e escalonamento (*upscaling* e *downscaling*) quando comparados a outras operações unitárias (Mulder, 1996; Saxena *et al.*, 2009).

O transporte através da membrana pode ocorrer tanto por difusão ou advecção, sendo induzido por um gradiente de potencial químico (pressão,

concentração ou temperatura) ou de potencial elétrico. Dependendo do mecanismo de transporte e da força motriz, os PSM podem ser divididos em três classes distintas (Van Den Berg e Smolders, 1992): a ultrafiltração (UF) e a microfiltração (MF), os quais utilizam a diferença entre o tamanho dos solutos e o tamanho dos poros da membrana para a separação das partículas, sendo que a força motriz é o gradiente de potencial químico expresso em termos de gradiente de pressão; a osmose inversa (OI), a permeação de gases (PG) e a diálise (D), cujas membranas possuem estruturas (parcialmente) densas, e cuja força motriz é o gradiente de potencial químico expresso em termos dos gradientes de pressão e/ou concentração, fazem uso da diferença de afinidade entre os componentes da alimentação com a membrana e da diferença de difusividade mássica através da membrana; a nanofiltração é um processo intermediário, que separa substâncias na faixa de 100 a 1000 Da, portanto, no extremo inferior da faixa se comporta como membrana densa e na faixa superior como porosa; e a eletrodialise (ED) usa membranas íon-seletivas (catiônicas e aniônicas) para separar as moléculas carregadas das neutras e a força motriz para o transporte dos íons é o gradiente de potencial elétrico.

O tópico seguinte discutirá com detalhes os processos de separação com membranas que utilizam o gradiente de potencial químico expresso em termos da diferença de pressão através da membrana como força motriz. A ultrafiltração, tema do presente trabalho, será discutida mais detalhadamente na seção 6.1.6.

6.1.2 Processos que Utilizam o Gradiente de Pressão como Força Motriz

Embora praticamente todos os PSM apresentem potencial para serem utilizados na indústria de alimentos, em especial a de sucos e derivados, para separação/purificação, o maior interesse tem sido na aplicação de processos que utilizam a pressão como força motriz: MF, OI, NF e UF (Ulbricht, 2006). Na Figura 6.1 estão apresentadas, esquematicamente, as características destes processos de separação por membranas. Nesta figura observa-se que os processos de OI e NF são os mais eficientes em relação à remoção de contaminantes, porém são os que consomem maior energia, devido às elevadas pressões de operação requeridas.

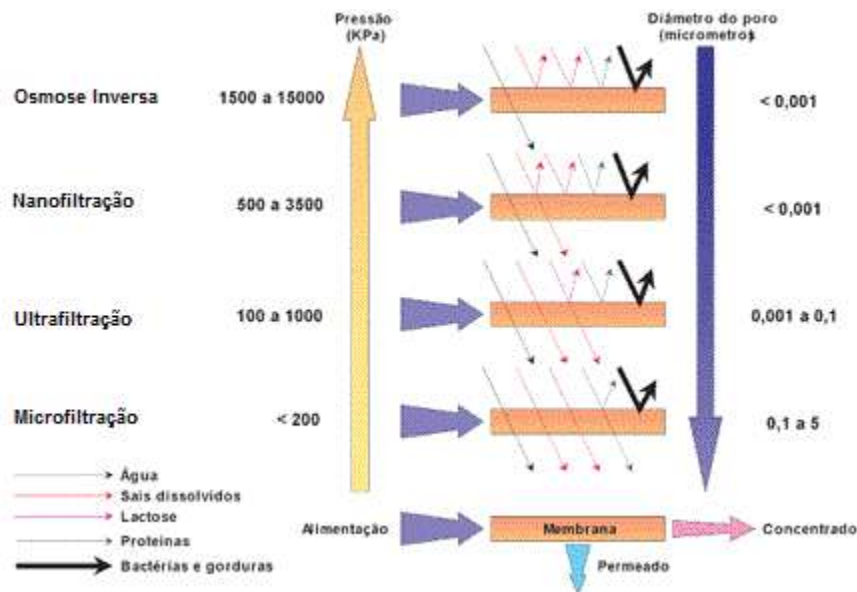


Figura 6.1 Características de separação (força motriz e tamanhos de poros) dos processos de separação por membranas que utilizam a pressão como força motriz: osmose inversa (OI), nanofiltração (NF), ultrafiltração (UF) e microfiltração (MF). Adaptado de Mierzwa *et al.* (2008).

Como regra geral, a MF é adequada para a remoção de sólidos suspensos, incluindo microrganismos maiores, tais como protozoários e bactérias. A UF é requerida para a remoção de vírus e macromoléculas orgânicas, com tamanhos de poros entre 100 e 2nm. Na indústria de frutos e derivados, MF e UF ou OI são utilizados para a clarificação, separação e fracionamento de proteínas (entre elas enzimas) remoção de microrganismos e concentração de sucos de frutas (Daufin *et al.*, 2001).

Moléculas orgânicas menores e íons multivalentes podem ser removidos através de NF, enquanto a OI é adequada para a remoção de espécies dissolvidas com baixa massa molar. Processos com membranas densas (NF e OI) são capazes de separar íons (e sólidos dissolvidos) da água. A separação conta com interações físico-químicas entre os componentes permeados e o material da membrana. Na indústria de sucos, a OI tem sido utilizada com o objetivo de concentração e a NF para a desmineralização e fracionamento de aminoácidos e peptídeos com o objetivo melhorar a qualidade e estabilizar o produto concentrado durante o armazenamento (Daufin *et al.*, 2001; Saxena *et al.*, 2009).

A operação efetiva dos sistemas de membranas depende do controle de fenômenos tais como polarização por concentração e *fouling*, por isso, a solução que alimenta esses processos, muitas vezes, necessita de pré-tratamentos apropriados.

6.1.3 Membranas: definição, características, morfologia, material e configuração

Uma membrana pode ser definida como um filme fino sólido ou líquido que serve de barreira semi-seletiva entre duas fases (alimentação e permeado) e que restringe, total ou parcialmente, o transporte de uma ou várias espécies químicas presentes nestas fases, quando aplicada algum tipo de força externa.

Várias características são importantes a fim de determinar a aplicabilidade das membranas nos diversos processos de separação. Dentre as mais importantes citam-se o tamanho dos poros, a porosidade, a morfologia, as propriedades do material, as resistências mecânica, térmica e química das membranas (Ho e Sirkar, 1992). Assim, elas podem ser porosas ou densas, naturais ou sintéticas, neutras ou carregadas, espessas ou finas, de estrutura simétrica ou assimétrica, entre outras. Na Figura 6.2 estão apresentadas as morfologias mais comuns observadas na seção transversal de membranas.

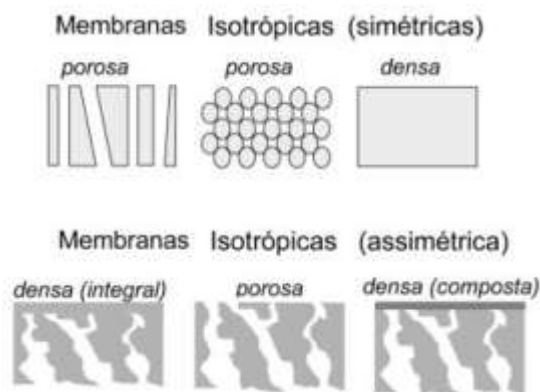


Figura 6.2 Representação esquemática da seção transversal dos diferentes tipos de morfologia de membranas sintéticas. Fonte: Habert *et al.* (2006).

As membranas sintéticas comerciais são produzidas a partir de duas classes distintas de material: os materiais orgânicos, em sua grande maioria polímeros, e os inorgânicos, como metais e cerâmicos.

O acetato de celulose foi o primeiro material a ser utilizado em processos de OI, NF e UF. O material apresenta algumas limitações quanto à sua sensibilidade frente a variações de pH e de temperatura. Além disso, pode ser facilmente degradado por ação microbiana. Tem como principais vantagens o seu baixo custo e o fato de ser hidrofílico. A polietersulfona (PES) tem sido usada na fabricação de membranas de MF e UF. A vantagem principal deste tipo de membrana é a sua excelente resistência a altas temperaturas e a grandes variações de pH (Ulbricht *et al.*, 2007). Outros polímeros que proporcionam melhorias significativas em nível de resistência mecânica, química e térmica das membranas de MF, OI e UF são, respectivamente, o polipropileno, a poliamida e a poliacrilonitrila.

Para a caracterização das membranas, dois tipos de parâmetros são normalmente levados em consideração: os parâmetros de natureza morfológica e os parâmetros relativos às suas propriedades de transporte. Os parâmetros de natureza morfológica envolvem a distribuição de diâmetro de poros, a porosidade superficial e a espessura, no caso de membranas porosas e a espessura do filme polimérico e as características físico-químicas do polímero (temperatura de transição vítrea e grau de cristalinidade), no caso das membranas densas.

As membranas são utilizadas em diversas configurações, denominadas módulos, as principais estão esquematizadas na Figura 6.3: tubular multi canais (a), fibras-ocas (b), placa e quadro (c) e espiral (d). As membranas planas podem ser utilizadas para fabricar módulos do tipo placa e quadro e espiral; os primeiros consistem de sanduíches de membranas e espaçadores e apresentam uma densidade de empacotamento baixa. A configuração em espiral é uma das mais utilizadas nas indústrias que operam com processos de separação por membranas, principalmente MF, UF e OI, estes módulos são constituídos por envelopes de membranas e espaçadores que são fixados e enrolados ao redor de um tubo coletor central por onde escoo o permeado. A partir da geometria cilíndrica podem ser confeccionados os módulos tubulares ($d > 5 \text{ mm}$), capilares ($0,5 \text{ mm} < d < 5 \text{ mm}$) e fibras-ocas ($d < 5 \text{ mm}$). Os módulos tubulares podem ser mono ou multi canais e não são auto-suportados, apresentam uma baixa densidade de empacotamento ($20 \text{ a } 30 \text{ m}^2/\text{m}^3$). Os módulos capilares e fibras-ocas são auto-suportados e diferem apenas pelo diâmetro dos tubos;

os de fibras ocas são os que apresentam a maior densidade de empacotamento, ($2.000-10.000 \text{ m}^2/\text{m}^3$), se comparados aos outros tipos de módulo.

A escolha do tipo de módulo depende de vários fatores relacionados com as características da corrente de alimentação (sólidos em suspensão, concentração, etc.) e das condições de operação do processo.

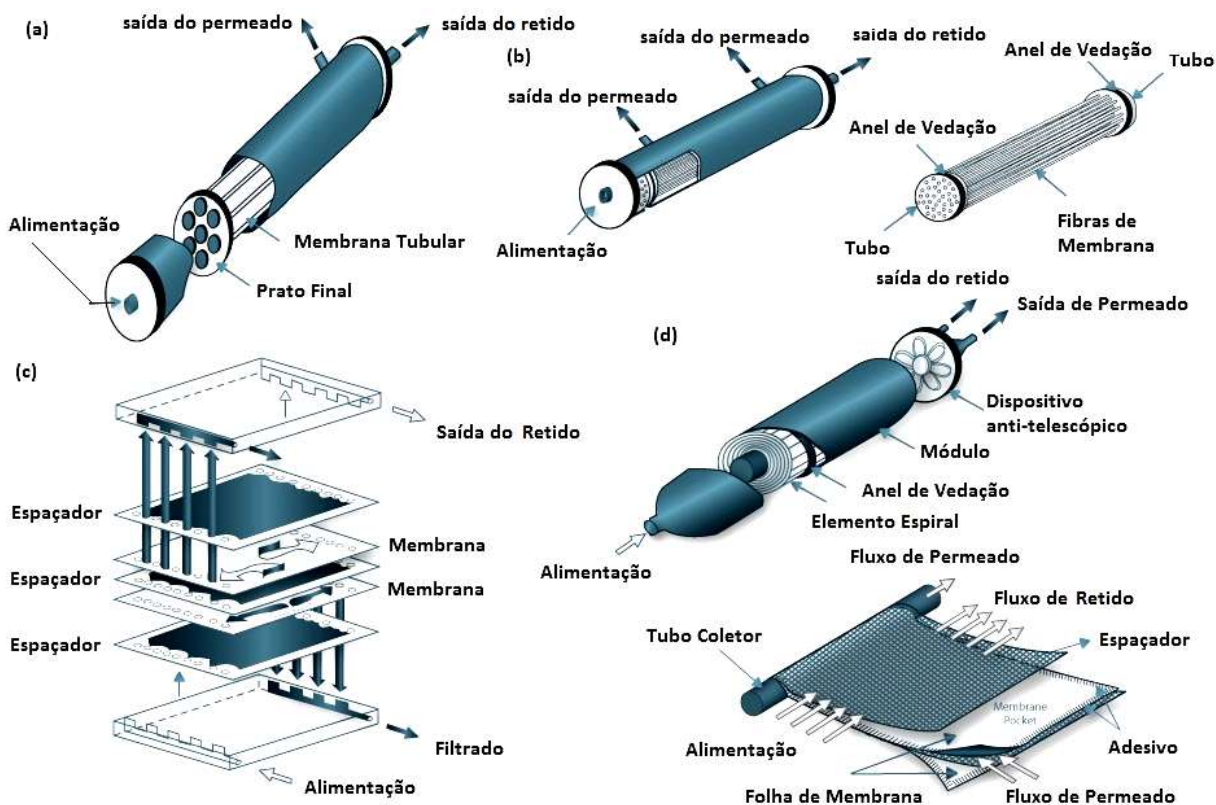


Figura 6.3 Tipos de configuração dos módulos de membranas; a) Tubular; b) Fibra oca; c) Placa e quadro; e d) Espiral. Fonte: Adaptado de Mulder (1996).

6.1.3 Parâmetros Característicos de Processo

Independente do tipo de membrana, propriedades de transporte como fluxo de permeado, permeabilidade a gases e líquidos, bem como a sua capacidade seletiva são utilizadas como parâmetros característicos dos processos que serão abordados nesta seção.

6.1.3.1 Fluxo de Permeado e Permeabilidade

O fluxo permeado (J), calculado de acordo com a Equação 6.1 representa a vazão volumétrica de permeado por unidade de área da membrana.

$$J_P = \frac{V}{A \times t} \quad (6.1)$$

onde: J_P é o fluxo permeado [$L \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$]; V é o volume de permeado coletado [L]; A é a área permeável do módulo da membrana [m^2]; e t representa o tempo [s] para coletar o permeado.

O fluxo é função das características da membrana, tais como espessura, tamanho dos poros, porosidade, morfologia, temperatura de transição vítrea, grau de cristalinidade, entre outros, bem como das características da solução a ser processada e das condições de operação.

De um modo geral, para os processos que utilizam o gradiente de pressão como força motriz, o fluxo permeado de solvente (geralmente água) é diretamente proporcional ao próprio gradiente de pressão de acordo com a Lei de Darcy, Equação 6.2.

$$J_P = -L_P \frac{\partial P}{\partial x} \quad (6.2)$$

onde: L_P é a constante de proporcionalidade conhecida como permeabilidade da membrana e $\partial P / \partial x$ é o gradiente de pressão através da membrana.

A permeabilidade hidráulica da membrana depende das características da membrana e da solução a ser processada e pode ser entendida como uma medida de maior ou menor facilidade que a membrana oferece à passagem de um dado solvente. A permeabilidade hidráulica apresenta uma forte dependência com as características da membrana.

Quando a alimentação consiste de uma solução, o fluxo apresenta um comportamento linear inicial e, à medida que a pressão aumenta, esse sofre um aumento assintótico até atingir o fluxo limite. O valor do fluxo limite é aquele atingido quando um aumento de pressão não acarreta mais um aumento de fluxo. Este comportamento está relacionado com os fenômenos de polarização por concentração e *fouling* que serão discutidos mais adiante na seção 6.1.5.

Outro conceito importante é o de fluxo crítico, que consiste em um valor de fluxo abaixo do qual a tendência ao "*fouling*" é reduzida ou a ocorrência do mesmo se torna desprezível. Desta forma, praticamente não ocorre acúmulo de partículas na

superfície da membrana e, se as interações entre o material da membrana e o soluto forem desprezíveis, a filtração ocorre sob condições estáveis, sem alterações no valor fluxo com o tempo (Bacchin *et al.*, 1995).

O fluxo através da membrana é influenciado pela temperatura da solução de alimentação, uma vez que o fluxo é função da viscosidade dinâmica da solução que, por sua vez, é função da temperatura. A velocidade de escoamento também influencia no fluxo permeado, pois com o aumento da velocidade, ocorre um aumento da turbulência do escoamento e conseqüente diminuição da camada polarizada de concentração. Outros parâmetros importantes que afetam o fluxo através da membrana são o pH e a força iônica; o efeito de cada um deles, entretanto, varia muito em função da solução de alimentação e da membrana utilizada. Estes parâmetros influenciam, principalmente, na solubilidade dos componentes da alimentação, alterando as interações entre os diversos componentes entre si e com a membrana.

O desempenho de um sistema de filtração por membranas é medido em termos de sua habilidade para produzir grandes volumes de filtrado em um pequeno período de tempo e um elevado grau de pureza do filtrado em relação à concentração de soluto. Desta forma, o fluxo permeado e a seletividade, esta última, será descrita a seguir, são os dois parâmetros utilizados para medir este desempenho.

6.1.3.2 Seletividade

O desempenho de uma membrana pode ser avaliado de acordo com seu fluxo de permeado e a seletividade. A seletividade depende da habilidade de retenção ou rejeição da membrana e, para o caso de misturas aquosas diluídas, que consistem em um solvente (água, na maioria das vezes) e solutos, é convenientemente expressa em função da retenção em relação a um soluto em particular. Nestes casos, o soluto é parcialmente, ou totalmente, retido pela membrana, enquanto que as moléculas de solvente passam livremente por ela. Assim sendo, a retenção observada ou rejeição do soluto é definida como sendo uma fração do soluto originalmente presente na corrente de alimentação e rejeitado pela membrana, sendo geralmente expressa em porcentagem, como mostra a Equação 6.3.

$$R_{obs} = \left(1 - \frac{C_p}{C_b}\right) \times 100 \quad (6.3)$$

onde: C_p é a concentração do permeado [g.L^{-1}] e C_b é a concentração da alimentação (bulk) do fluido recirculante [g.L^{-1}].

A capacidade seletiva de membranas porosas está diretamente associada à relação entre o tamanho das espécies presentes e o tamanho dos poros da membrana. Nas membranas densas, a capacidade seletiva depende da afinidade das diferentes espécies com o material da membrana e da difusão das mesmas através do filme polimérico.

6.1.3.3 Configuração de Escoamento

A configuração do escoamento nos PSM pode ser de duas maneiras: transversal (*deadend*) ou tangencial (*cross-flow*) como pode ser observado na Figura 6.4. Nos processos de filtração transversal, com o passar do tempo, as partículas retidas formam uma camada mais concentrada próximo à superfície da membrana, aumentando a resistência à filtração. Já na filtração tangencial, a fase concentrada é forçada a escoar ao longo da superfície da membrana, desestabilizando as partículas retidas próximas à superfície; desta forma, a camada concentrada permanece relativamente fina e a resistência à filtração é relativamente menor.

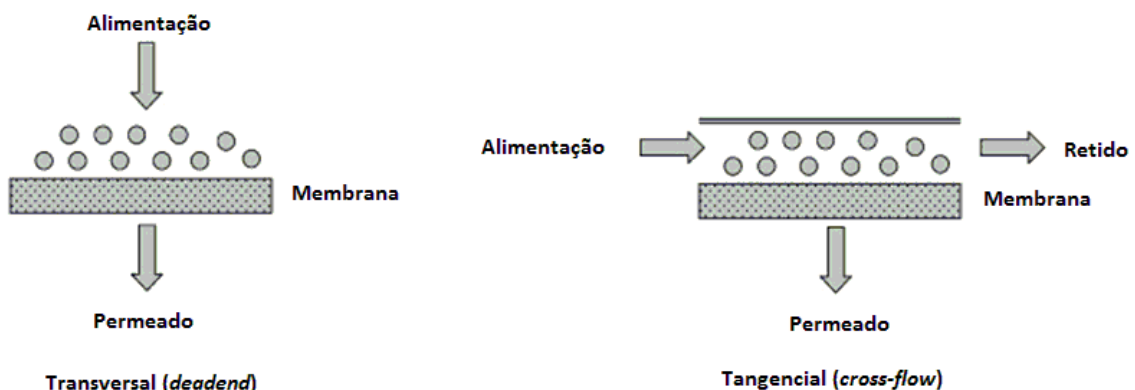


Figura 6.4 Configuração do escoamento nos PSM: transversal (*deadend*) e tangencial (*cross-flow*). Fonte: Habert *et al.* (2006).

A filtração tangencial é influenciada por um grande número de parâmetros, tais como, velocidade tangencial, pressão transmembrana, resistência da membrana, resistência da camada limite de concentração, distribuição do tamanho das partículas

da solução, forma das partículas, comportamento de aglomeração e efeitos de superfície das partículas, entre outros. Os autores acrescentam que um melhor entendimento desta formação da camada polarizada de concentração e da deposição de partículas na superfície da membrana pode resultar em um uso mais econômico da filtração tangencial em diversas aplicações.

6.1.4 Fenômenos que limitam o fluxo de permeado

O declínio do fluxo permeado pode ser causado por diversos fatores, destacando-se: deformação mecânica da microestrutura da membrana, fenômeno da polarização de concentração, adsorção de solutos, formação da camada gel e entupimento dos poros. Nos casos em que o único motivo para o decréscimo do fluxo de solvente puro com o tempo é a deformação mecânica da microestrutura, o fenômeno é conhecido como compactação, o qual é função do valor da pressão aplicada e das características estruturais da membrana.

A polarização por concentração é o aumento de concentração do soluto na interface membrana/solução, decorrente do fluxo convectivo do soluto em direção à superfície da membrana. Desta forma, ocorre um aumento da pressão osmótica da solução nas proximidades da membrana, o que diminui a força motriz para a separação e, conseqüentemente, reduz o fluxo de permeado. Este fenômeno é reversível, porém, a sua ocorrência pode intensificar e dar origem a outros tipos de fenômenos que podem prejudicar irremediavelmente o desempenho do processo como a formação de incrustações. Os possíveis efeitos negativos da polarização por concentração são: decréscimo do fluxo de permeado devido ao aumento na pressão osmótica na superfície da membrana; aumento da passagem de soluto através da membrana; precipitação de soluto se a concentração exceder o limite de solubilidade do composto; favorecimento de incrustações por deposição; formação de uma camada gel (Ho e Sirkar, 1992).

Fouling é qualquer depósito sobre ou no interior da membrana que gera um aumento na resistência à permeação. A queda do fluxo permeado pode ser provocada pela adsorção das moléculas de soluto na superfície da membrana, pelo entupimento dos poros por moléculas em suspensão ou por depósitos de material em suspensão

sobre a superfície da membrana. O termo *fouling* inclui diferentes processos, tais como adsorção de macromoléculas na superfície da membrana ou dentro dos poros, a deposição de substâncias na superfície da membrana, bloqueio total ou parcial dos poros e a formação da camada gel. A formação da camada de torta é uma importante causa do declínio do fluxo na filtração de suspensões coloidais, como no caso do processamento de sucos. Para limitar a formação da camada de torta, a limpeza da membrana é usualmente aplicada, sendo relativamente efetiva se a camada de torta for reversível (Huisman *et al.*, 1998).

A tendência ao *fouling* de uma membrana pode ser avaliada utilizando vários "testes de incrustação", através do qual é possível medir a queda do fluxo permeado em função do tempo no estado de equilíbrio e em condições de operação constante.

Wu *et al.* (2007) estudaram o *fouling* durante a ultrafiltração de efluente gerado da fabricação do óleo de palma usando com uma membrana de polissulfona de 20 kDa. A tendência ao *fouling* do sistema foi calculada comparando a permeabilidade à água destilada antes (WPa , em $L\ m^{-2}\ h^{-1}\ bar^{-1}$) e depois (WPd , em $L\ m^{-2}\ h^{-1}\ bar^{-1}$) da UF, como mostrado pela Equação 6.4.

$$Fouling\ (\%) = \left(1 - \frac{WPd}{WPa}\right) \times 100 \quad (6.4)$$

Os valores de WPa e WPb foram obtidos diretamente da inclinação das curvas relativas à diferença de pressão aplicada e ao fluxo de permeado destilado da água antes e após a ultrafiltração das soluções em estudo. Os autores obtiveram valores de WPa e WPb de 23,4 e 3,81 $L\ m^{-2}\ h^{-1}\ bar^{-1}$, respectivamente, com ΔP de 6 bar, e a tendência ao *fouling* encontrada para o sistema foi de 83,7%.

Geralmente, as fontes de depósitos indesejáveis na superfície da membrana podem ser divididas em quatro principais categorias: depósitos inorgânicos (*scaling*), adsorção de moléculas orgânicas (orgânico), deposição de partículas (coloidal), bloqueio de poros e adesão e crescimento microbiano (*biofouling*). Mais de uma dessas categorias podem ocorrer, simultaneamente, no mesmo sistema de membranas.

6.1.5 Ultrafiltração

A ultrafiltração (UF) é um processo de separação por membranas utilizado quando se deseja purificar e fracionar soluções contendo macromoléculas. As membranas de UF apresentam poros na faixa entre 1 e 100 nm, portanto mais fechadas do que as membranas de MF. Soluções contendo solutos numa ampla faixa de massa molar (1 a 1000 kDa) podem ser tratadas por este processo. Como os poros das membranas de UF são menores, uma força motriz maior é necessária para obter fluxos permeados elevados o suficiente para que o processo possa ser utilizado industrialmente. Por este motivo as diferenças de pressão através da membrana variam na faixa de 2 a 10 bar. As membranas de UF apresentam uma distribuição de diâmetro de poros e são caracterizadas através da chamada curva de retenção nominal, que relaciona o coeficiente de rejeição em função da massa molar do soluto.

Na Figura 6.5 estão mostradas, esquematicamente, quais as substâncias de interesse para a indústria de alimentos que se pode separar através da UF. É importante destacar que o objeto do estudo é separar as enzimas oxidases do suco de mirtilo, porém, como se pode observar nessa figura, ficam retidos também resíduos de pectina e bactérias, deixando permear as vitaminas, sais minerais, açúcares e aminoácidos que compõem a parte nutritiva do suco.

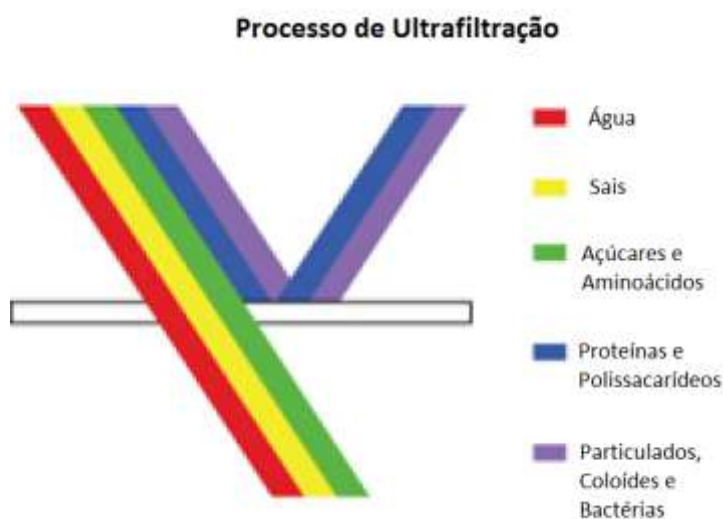


Figura 6.5 Desenho esquemático do processo de separação por UF evidenciando as substâncias que são retidas e permeadas durante o processo.

Por ser conduzida a baixas temperaturas e não necessitar de aditivos químicos, esta técnica preserva a qualidade do produto final, não afetando suas propriedades sensoriais, livrando o suco do sabor de cozido e preservando componentes termossensíveis, tais como compostos fenólicos, vitaminas e enzimas (Rodrigues *et al.*, 2003).

Tendo em vista que um dos maiores problemas encontrados no processamento de sucos por UF é o *fouling* e que esse está principalmente associado à presença de polissacarídeos na parede celular dos frutos tais como a pectina, vários métodos para o incremento do fluxo têm sido propostos, dentre eles, o pré-tratamento enzimático, o qual consiste na hidrólise dos polissacarídeos solúveis por enzimas pectinolíticas (Cho *et al.*, 2003). A massa molar da maioria das pectinesterases encontra-se na faixa de 35 a 50 kDa e a temperatura ótima de atividade é na faixa de 40-50°C (Jayani *et al.*, 2005). Estas enzimas devem ser removidas do suco, pois acredita-se que elas estão relacionadas com as principais causas de instabilidade, conhecidas como perda de turbidez e geleificação, no suco não pasteurizado ou em concentrados congelados (Rosenthal *et al.*, 2003). Com o processo de ultrafiltração, além da remoção da POD também espera-se a remoção dos resíduos das enzimas pectinolíticas.

Diversos estudos salientam a importância de um pré-tratamento do suco para o processo de ultrafiltração (Alvarez *et al.*, 1998; Sulaiman *et al.*, 1998; Liew Abdullah *et al.*, 2007). Para tanto, um tratamento enzimático do suco bruto antes de ultrafiltração é normalmente realizado com o objetivo de degradar as substâncias pécticas e outros polissacarídeos com enzimas, como amilases e pectinases (Gökmen e Çetinkaya, 2007). Pectinases hidrolisam pectina em complexos de proteínas-pectinas que flocculam e são facilmente separadas, melhorando assim, o fluxo de permeado (Alvarez *et al.*, 1998).

Matta *et al.* (2004) concluíram que o principal efeito do tratamento enzimático foi a redução da viscosidade e do conteúdo de polpa do suco de acerola; os resultados encontrados mostraram que a hidrólise foi eficiente na quebra de moléculas de pectina e outras substâncias como amido, celulose e hemicelulose, as quais provocam os fenômenos de polarização por concentração, formação da camada gel e *fouling* durante a filtração.

A UF tem sido particularmente indicada na separação de sólidos suspensos em líquidos e tem substituído o uso de filtros auxiliares, isto é, terra diatomácea e filtros de papel, para clarificação de sucos de frutas e vinhos (Hernandez *et al.*, 1992). A eliminação destes filtros ou a eliminação dos agentes de refino, como gelatina ou bentonite, reduz custos e evita problemas com tratamento de efluentes. Segundo Cheryan (1998), que comparou o processo convencional de clarificação com a ultrafiltração para suco de maçã, o tempo de processo pode ser reduzido de 12 para 2 h com o uso da UF.

Pigmentos naturais de extrato de casca de uva (antocianinas) e suco de beterraba (betanina) foram concentrados por ultrafiltração, utilizando membranas de acetato de celulose, em trabalho realizado por Philip (1984). Para o extrato de casca de uva, o autor obteve fluxo médio de 8,1 e 3,8 L m⁻² h⁻¹ e retenção de 98 e 99 % de antocianina em membranas de 1000 e 500 Da, respectivamente. Já para o suco de beterraba, obtiveram-se fluxos de até 8,3 e 4,5 L m⁻² h⁻¹ e retenção de betanina de 85 e 99 %, respectivamente, utilizando as mesmas membranas.

Em estudo mais recente, Kalbasi e Cisneros-Zevallos (2007) testaram a UF com membranas planas de PVDF (Massa Molar de Corte – MMC – variando de 10 a 1000 kDa) para fracionar as antocianinas (ACY) monoméricas das poliméricas. As ACY Poliméricas ficaram retidas quando utilizadas membranas com MMC < 100kDa, enquanto ACY monomérica ficaram no permeado. As propriedades antioxidantes, relacionadas linearmente com o conteúdo de fenólicos totais e índice de cor, estão também relacionadas ao conteúdo de ACY monoméricas. Os resultados indicam que a ultrafiltração pode ser usada para separar as frações diferentes frações de ACY, produzindo alimentos com potenciais efeitos na cor e propriedades bioativas.

Patil *et al.* (2009) com o objetivo de desenvolver um método eficiente para a extração e concentração de antocianina, utilizaram a UF para remover o resíduo de solvente de um extrato etanólico obtido a partir de cascas de nabo vermelho. Seus resultados mostraram que a UF foi capaz de reduzir o resíduo de solvente (eliminou quase completamente), e também concentrar a antocianina (de 37,26 mg/100 mL para 62,58 mg/100 mL).

Em um artigo recente, publicado em 2010 pela FAO (Food and Agriculture Organization, USA), eles recomendam o uso de ultrafiltração na indústria de sucos e vinhos, pois a UF é capaz de remover moléculas maiores como polifenoloxidase, que promovem a degradação do suco, mas não partículas de menor massa molar, como os polifenóis (Wageningen, 2010).

Tanada-Palmu *et al.* (1999) utilizaram membranas de 20 kDa para produzir um extrato de banana livre de polifenoloxidase por ultrafiltração. Duas pressões transmembrana, 600 e 800 kPa, foram utilizadas, porém a pressão de 600 kPa foi a que apresentou um fluxo de permeado mais estável com menos tempo de concentração do extrato.

Rodrigues *et al.* (2003) utilizaram a UF no processamento de suco de banana visando sua clarificação e remoção da polifenoloxidase. O módulo consistiu de uma célula plana, com escoamento transversal e 14,6 cm² de área de membrana. Em função da massa molar da enzima foram utilizadas duas membranas poliméricas de poli(éter-sulfona) com massas molares de corte de 10 e 30 kDa. O suco clarificado apresentou coloração amarela, elevada translucidez e aspecto atrativo. A membrana com massa molar de corte de 30 kDa apresentou um fluxo permeado superior ao da membrana de 10 kDa. A atividade da enzima polifenoloxidase foi reduzida em 97,5 e 96,2 % para as membranas de massa molar de corte de 10 e 30 kDa, respectivamente.

6.1.6 Peroxidase

6.1.7.1 Características gerais

O processo de degradação está relacionado com a oxidação de compostos fenólicos endógenos formando quinonas instáveis que são posteriormente polimerizadas formando pigmentos marrons, vermelhos e pretos (Carbonaro e Mattera, 2001).

A peroxidase (POD) (doador: peróxido de hidrogênio oxidoreductase; EC 1.11.1.7) é uma enzima amplamente distribuída no reino vegetal e sua presença foi descrita num grande número de espécies e partes de plantas, incluindo frutos climatéricos e não-climatéricos (Civello *et al.*, 1995). A peroxidase encontrada em plantas superiores contém ferro em sua estrutura, na forma de um grupo prostético

ferritoporfirina III (Onsa *et al.*, 2004). Muitas peroxidases são glicoproteínas e contém cálcio como parte de sua estrutura (Marangoni *et al.*, 1989).

A atividade de peroxidase está relacionada à presença de isoenzimas catiônicas e/ou aniônicas e uma mesma fruta pode conter ambos os tipos de isoenzimas (Lee *et al.*, 1984). Segundo o mesmo autor, um mesmo vegetal muitas vezes contém isoenzimas de peroxidase termolábeis e termoresistentes. Avaliações quantitativas de extratos de tecidos de plantas mostraram que a enzima ocorre na forma solúvel e também na forma ionicamente ligada à parede celular (Civello *et al.*, 1995; Clemente, 1998).

A peroxidase não é uma enzima específica. À custa da redução do peróxido de hidrogênio ou de peróxidos orgânicos, esta enzima é capaz de catalisar a oxidação de um grande número de substratos doadores de hidrogênio, incluindo aminas aromáticas primárias, secundárias e terciárias (Burnette, 1977), fenóis, antocianinas (López-Serrano e Barceló, 1996; Zhang *et al.*, 2005), vitamina C (Forsyth *et al.*, 1999), clorofila (Martínez *et al.*, 2001) e compostos heterocíclicos como os indóis (Haard e Tobin, 1971).

Uma característica marcante da peroxidase é sua grande termoestabilidade. A peroxidase é considerada por alguns autores a enzima mais termorresistente dentre aquelas presentes em frutas e vegetais (Lee *et al.*, 1984; Müftügil, 1985). Por esta razão, e também devido à sua facilidade de detecção, esta enzima é freqüentemente utilizada como índice de efetividade do branqueamento de frutas e vegetais, para prevenir a perda de qualidade na estocagem (Rodrigo, 1996). Assim, a inativação completa da peroxidase é a medida utilizada para determinar o tempo de branqueamento de vegetais, ao invés de se utilizar um tempo de branqueamento fixo (Ganthavorn e Powers, 1988). No entanto, para alguns vegetais como ervilhas e aspargos, enzimas como a lipoxigenase podem ser mais termorresistentes que a peroxidase (Ganthavorn e Powers, 1988).

6.1.7.2 Efeitos da atividade de peroxidase em alimentos

Muitas alterações de sabor em frutas e vegetais crus ou não branqueados podem ser relacionadas à atividade de peroxidase (Lamikanra e Watson, 2000b).

Existem dados empíricos relacionando a existência de atividade residual de peroxidase à ocorrência de *off-flavors* em alimentos processados (Burnette, 1977; Lamikanra e Watson, 2000b; Valderrama e Clemente, 2004; Ercan e Soysal, 2011).

A sua capacidade de oxidar uma grande quantidade de compostos fenólicos distintos, inclusive a antocianina, sugere que a peroxidase também está associada à descoloração dos tecidos de frutas e vegetais (Onsa *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005). A atividade de peroxidase está intimamente relacionada à perda de sabor de alimentos estocados, e também a uma série de reações de biodegradação. O escurecimento enzimático de frutas e vegetais se deve à oxidação de compostos fenólicos naturalmente presentes, que resulta na formação de pigmentos marrons, vermelhos ou negros (Valderrama e Clemente, 2004). O desenvolvimento de cor marrom em morangos processados por apertização foi correlacionado com a atividade residual de peroxidase (López-Serrano e Barceló, 1996). A ocorrência de sabores estranhos em frutas e vegetais enlatados foi atribuída à atividade residual de peroxidase remanescente após o processo térmico (Lu e Whitaker, 1974). A alta resistência a tratamentos térmicos, característica das peroxidases, torna o seu controle mais crítico no processamento de alimentos.

Os tratamentos tipo HTST (*High Temperature Short Time*), que se tornaram freqüentes na indústria de processamento de sucos, mostram-se menos eficientes no controle e inativação da peroxidase que os métodos tradicionais, que utilizam exposição mais prolongada à temperatura-alvo (Valderrama e Clemente, 2004). Além disso, peroxidases são capazes de agir em temperaturas abaixo de zero, e em baixa atividade de água. Foi relatada atividade residual de peroxidase em sistemas modelo a temperatura de -30°C , estocados durante 100 dias (Manzocco *et al.*, 1998). A peroxidase de couve-flor apresenta 35% de atividade residual na temperatura de 0°C (Lee *et al.*, 1984).

6.2 Materiais e Métodos

6.2.1 Suco de Mirtilo Despectinizado

Os mirtilos (*Vaccinium corymbosum* L.) foram obtidos da Italbraz Company® (Vacaria, RS/Brasil) da mesma forma descrita anteriormente. No dia anterior ao experimento os frutos são descongelados sob refrigeração; o suco foi preparado no dia do experimento e foi submetido ao tratamento enzimático.

Nesse processo os frutos descongelados foram desintegrados em um liquidificador comercial (Ultra mixer, Britânia, Brasil). A enzima NZ103 (Novozyme® 33103, Novozymes S/A®, Bagsvaerd, Dinamarca) foi adicionada às bagas trituradas na proporção de 2 % da quantidade de fruto e incubada a temperatura de 50 °C durante 1 h sob agitação (Agitador com impelidor de 2 pás planas, Tecnal, TE039, Piracicaba/SP, Brasil) em banho termostático (Quimis, Q226M, Diadema/SP, Brasil). O extrato foi então prensado e filtrado a vácuo (bomba Prismatec, Modelo 131, Itu/SP, Brasil). O suco obtido foi imediatamente submetido à ultrafiltração.

6.2.2 Membranas

No presente trabalho buscou-se avaliar o emprego da ultrafiltração na redução da atividade da peroxidase (POD) presentes no suco clarificado de mirtilo. Como a POD possui massa molar média na faixa de 40 a 45 kDa (Damodaran *et al.*, 2007), foram testadas três membranas com massas molares de corte (molecular weight cut off) de 10, 30 e 50 kDa.

As membranas de ultrafiltração utilizadas no experimento eram folhas planas com 1 m², fornecidas pela DBFiltros® (Ribeirão Preto/SP, Brasil) e fabricadas pela empresa Synder Filtration®(Vacaville, USA). De acordo com o fabricante, a temperatura máxima de operação das membranas é de 65 °C, operam na faixa de pH de 1 a 11 e a pressão máxima de operação é de 140 psi (9,84 kgf/cm²ou 9,65 bar). O material das membranas de 10 e 30 kDa é polietersulfona (PES) e da membrana de 50 kDa é fluoreto de polivinilideno (PVDF) sendo que seus nomes comerciais são 10STPES, 30MKPES e 50BNPVDF, respectivamente.

6.2.3 Sistema de Ultrafiltração

O sistema de ultrafiltração utilizado foi constituído de bomba de engrenagem, módulo de ultrafiltração com $63,8 \text{ cm}^2$ de área útil, rotâmetro, manômetros e tanques encamizados de armazenamento da alimentação e do permeado, conforme esquematizado na Figura 6.6 e mostrado na Figura 6.7. O modo de operação depende do objetivo do experimento e a configuração do escoamento foi tangencial. O fluxo permeado foi medido pelo método direto, isto é, recolheu-se um determinado volume ou massa de permeado para um tempo cronometrado e dividiu-se o valor de vazão mássica ou volumétrica pela área útil da membrana.

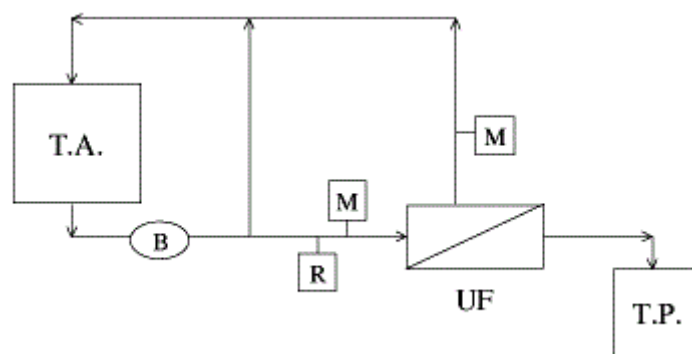


Figura 6.6 Fluxograma simplificado do sistema de ultrafiltração: T.A. é o tanque de alimentação; B é a bomba; R é o rotâmetro; M são os manômetros; UF é o módulo de membrana e T.P. é o tanque de permeado.



Figura 6.7 Fotografia do sistema de ultrafiltração utilizado: (1) banho termostático; (2) tanque; (3) manômetro de controle; (4) módulo de membrana e (5) coleta do permeado.

6.2.4 Compactação e Permeabilidade Hidráulica das Membranas

Previamente aos experimentos de ultrafiltração do suco, realizou-se a compactação da membrana para que uma parte do declínio de fluxo permeado durante a filtração do suco não fosse devido ao adensamento da microestrutura da membrana. A compactação foi realizada através da recirculação de água destilada com pressão de entrada de 5 bar e temperatura de 50 °C. Considerou-se que a membrana estava compactada quando as medidas de fluxo permeado de água se tornam constantes com o tempo.

Em seguida foi determinada a permeabilidade hidráulica da membrana, através da medição do fluxo permeado de água destilada para diferentes pressões de entrada (entre 2 e 7 bar). A permeabilidade hidráulica correspondeu ao coeficiente angular da equação da reta obtida no gráfico do fluxo permeado *versus* da pressão de operação.

6.2.5 Caracterização das Membranas por Medidas de Retenção e Microscopia Eletrônica de Varredura

Com o objetivo de fazer uma rápida avaliação das informações fornecidas pelo fabricante realizou-se medidas de retenção e a análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para caracterizar a superfície da membrana após a sua utilização, bem como a eficiência da limpeza química.

Os tratamentos de retenção foram conduzidos em cinco diferentes pontos de pressão de entrada (2, 3, 4, 5 e 6 bar). Para tanto foram recirculadas no sistema de filtração soluções de PEGs (polietilenoglicol P. A., Merk®) com diferentes massas molares conhecidas (2, 4, 6, 10, 20 e 35 kDa) na concentração de 1 g/L e recolhidas alíquotas de permeado e concentrado em triplicata. As amostras foram então quantificadas pelo teor de carbono orgânico total - TOC (modelo TOC-VCSH®, Shimadzu®, Kyoto, Japão). Uma vez determinadas as concentrações de carbono orgânico total em cada alíquota, foi possível determinar o coeficiente de retenção observada, R_o , de acordo com a Equação 6.3.

Com o objetivo de caracterizar a estrutura da membrana utilizou-se a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para as análises de MEV as amostras foram preparadas através da fixação direta das membranas, previamente secas, em uma fita metálica de carbono dupla face previamente colocada sobre suportes cilíndricos de alumínio (*stubs*) com 1 cm de altura e 1 cm de diâmetro. Em seguida as amostras foram metalizadas com ouro sob alto vácuo (*sputtering*), em um evaporador (Jeol Jee 4BSVG-IN®, Tóquio, Japão) por 75 segundos. A observação foi realizada em microscópio eletrônico de varredura (Jeol Scanning Microscope JSM-6060®, Tóquio, Japão, do Centro de Microscopia Eletrônica, UFRGS) e fotomicrografadas com aceleração de 10 kV com ampliações variando de 100 a 30.000 vezes.

6.2.6 Experimentos de ultrafiltração com suco de mirtilo

Inicialmente foram realizados experimentos para determinar as melhores condições de operação no modo reciclo total, isto é, as correntes de concentrado e de permeado retornam ao tanque de alimentação. Mediu-se o fluxo permeado em função da pressão transmembrana (2 a 5 bar) a temperatura de 30 a 50 °C e vazão de

alimentação de 40 L h^{-1} , a partir destes experimentos determinou-se o fluxo crítico e conseqüentemente a pressão crítica através da curva fluxo permeado *versus* pressão transmembrana.

Para os experimentos de retenção da POD foram adicionados 2,5 L de suco ao tanque alimentação (previamente ambientado com 3 vezes esse volume de suco) e, com o auxílio da bomba, iniciou-se seu escoamento através do sistema. Ao alcançar o módulo, onde estava localizada a membrana, o suco foi separado em duas correntes distintas: permeado e concentrado. Nestes experimentos o modo de operação foi batelada, isto é, o permeado foi recolhido, enquanto que o concentrado foi recirculado no sistema. O tempo de operação foi estipulado em 180 min, de acordo com a literatura (Rodrigues *et al.*, 2003), nas seguintes condições: pressão de entrada de 3,5 bar e vazão de alimentação de 40 L.h^{-1} . O fluxo permeado ($\text{L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$) foi medido em intervalos de 15 min. A partir dessas medidas, foram construídas as curvas de fluxo permeado em função do tempo de operação do sistema. As amostras de permeado e concentrado foram coletadas ao final de 180 min (3h).

6.2.7 Limpeza do Sistema, Recuperação da Membrana e análise da Tendência ao "Fouling"

A limpeza do sistema foi realizada em três etapas: primeiramente, realizou-se o enxágüe do sistema com água destilada a temperatura de $40 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 minutos e, após, mediu-se o fluxo permeado de água destilada; a limpeza da unidade foi realizada com uma solução cloro-alcálica, solução aquosa de NaOH (pH 10) e 0,4 % de NaClO durante 20 minutos a temperatura de $40 \text{ }^\circ\text{C}$; após a etapa da limpeza, realizou-se outro enxágüe com água destilada durante 20 minutos a uma temperatura de $40 \text{ }^\circ\text{C}$ e mediu-se novamente o fluxo permeado. Além da limpeza do sistema, este procedimento também teve como objetivo a análise da tendência ao *fouling*, a recuperação e posterior reutilização da membrana.

A tendência ao *fouling* do sistema foi calculada comparando a permeabilidade à água destilada antes (WP_a , em $\text{L m}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ bar}^{-1}$) e depois (WP_d , em $\text{L m}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ bar}^{-1}$) da UF, como sugerido por Wu *et al.*(2007) e mostrado na Equação 6.4.

6.2.8 Planejamento dos Experimentos e Análise Estatística

Um planejamento fatorial 2^3 com três repetições no ponto central (totalizando onze tratamentos) foi empregado para estudar o efeito das variáveis independentes sobre os parâmetros de qualidade do suco. As variáveis independentes estudadas foram: massa molar de corte da membrana (X_1), teor de sólidos solúveis totais - °Brix (X_2) e temperatura de processo (X_3). Os parâmetros de qualidade de suco a serem avaliados como parâmetros de resposta serão: fluxo de permeado médio (Y_1), tendência ao *fouling* (Y_2), teor de antocianidinas (Y_3) e atividade da enzima peroxidase (Y_4). A matriz do planejamento fatorial com os valores das variáveis independentes codificados (x_i) e os valores não codificados (X_i) são apresentados na Tabela 6.1. Nestes testes, serão utilizados dois litros de suco de mirtillo nas condições controladas de temperatura e pressão por três horas. Além dos testes referentes ao planejamento fatorial, foi executado mais um experimento adicional para a membrana de 30 kDa com o suco a 12 °Brix e a temperatura de 50 °C a fim de comparar com os resultados obtidos entre as membranas com diferentes massas molares de corte.

Tabela 6.1 Planejamento fatorial das variáveis de estudo (massa molar de corte, teor de sólidos solúveis e temperatura) empregado para ultrafiltração de suco de mirtillo durante 3 h a pressão de entrada de 3,5 bar.

Níveis	Massa Molar de Corte (kDa)	Sólidos Solúveis Totais Inicial (°Brix)	Temperatura (°C)
-1	10	8	30
0	30	10	40
+1	50	12	50

Os resultados dos experimentos realizados foram avaliados utilizando a metodologia de análise da variância (ANOVA) para definir a significância dos efeitos e gerar as curvas de contorno. Toda a análise estatística foi realizada utilizando o programa Statistica para Windows (versão 7.0, Statsoft®, Tulsa, USA) com grau de confiança de 95%.

6.2.9 Determinação do Fluxo Médio

O fluxo médio (J_{med}) foi calculado pela Equação 6.5 onde J_i e J_f foram o fluxo inicial e final obtido após 3 h de permeação, respectivamente (Cheryan, 1998).

$$J_{med} = J_f + 0,333 \times (J_i - J_f) \quad (6.5)$$

6.2.10 Determinação da Atividade da Peroxidase

A determinação da atividade enzimática da peroxidase (POD) foi adaptada da metodologia proposta por Freitas *et al.* (2008) para sucos de uva conforme etapas descrito a seguir.

Obtenção do extrato enzimático: 5 mL de suco foram homogeneizados com 5 mL de solução tampão (fosfato de sódio 100 mM e pH 6,0) por 2 minutos, utilizando um liquidificador (UltraMixer, Britânia, Curitiba, Brasil). O extrato foi mantido em banho de gelo até a determinação da atividade enzimática.

Atividade da POD: em 0,2 mL do extrato enzimático adicionou-se 2,7 mL de peróxido de hidrogênio 0,1%, preparado em solução tampão fosfato de sódio (100 mM e pH 6,0) e em seguida adicionou-se 0,1 mL de solução de o-dianisidina 1% em metanol. A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV1600 (Pro-análise, Brasil) a 460 nm. Uma unidade de atividade de peroxidase foi definida como a correspondente à variação de uma unidade de absorbância por minuto por mL de amostra.

6.2.11 Quantificação das Antocianidinas

Nesse estudo, primeiramente optou-se pelo método espectrofotométrico enquanto a metodologia de análise por CLAE estava sendo implementada e validada. Ainda, utilizou-se do método espectrofotométrico em ensaios preliminares onde o número de amostras era suficientemente grande ou quando se necessitava de uma resposta rápida dos resultados. Porém em ensaios finais e para a caracterização dos produtos obtidos, a caracterização mais detalhada nesse estudo foi feita pelo método cromatográfico. Ambos encontram-se descritos detalhadamente nos Capítulos 3 e 8, respectivamente. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

6.3 Resultados e Discussão

Nesta seção são apresentados primeiramente os resultados de caracterização das membranas de 10, 30 e 50 kDa, bem como os testes de retenção. Para a definição dos parâmetros de operação com o suco são apresentados testes de fluxo de permeado em função da pressão de entrada que serviram de base para a elaboração do planejamento fatorial executado neste trabalho. Posteriormente são apresentados os resultados obtidos para o fluxo de permeado do suco de mirtilo clarificado durante a ultrafiltração e as respostas obtidas para a retenção de antocianinas e remoção da peroxidase.

6.3.1 Compactação das Membranas

Na Figura 6.8 estão apresentados os resultados de compactação para as membranas de 10, 30 e 50 kDa com água destilada durante 3 momentos de compactação em dias consecutivos, vazão de alimentação de 40 L.h⁻¹, pressão de entrada de 5 bar e temperatura de 50 °C antes de iniciar o processo de operação. Os experimentos foram realizados durante 2,5 h em cada dia. Nesse gráfico é possível observar que as membranas inicialmente apresentam-se descompactadas, apresentando fluxos de permeado superior ao final. Além disso, as membranas apresentaram a característica de descompactar-se parcialmente ao entrarem em repouso, em virtude disso, foi adotado o procedimento de compactação das membranas antes dos experimentos com suco de mirtilo.

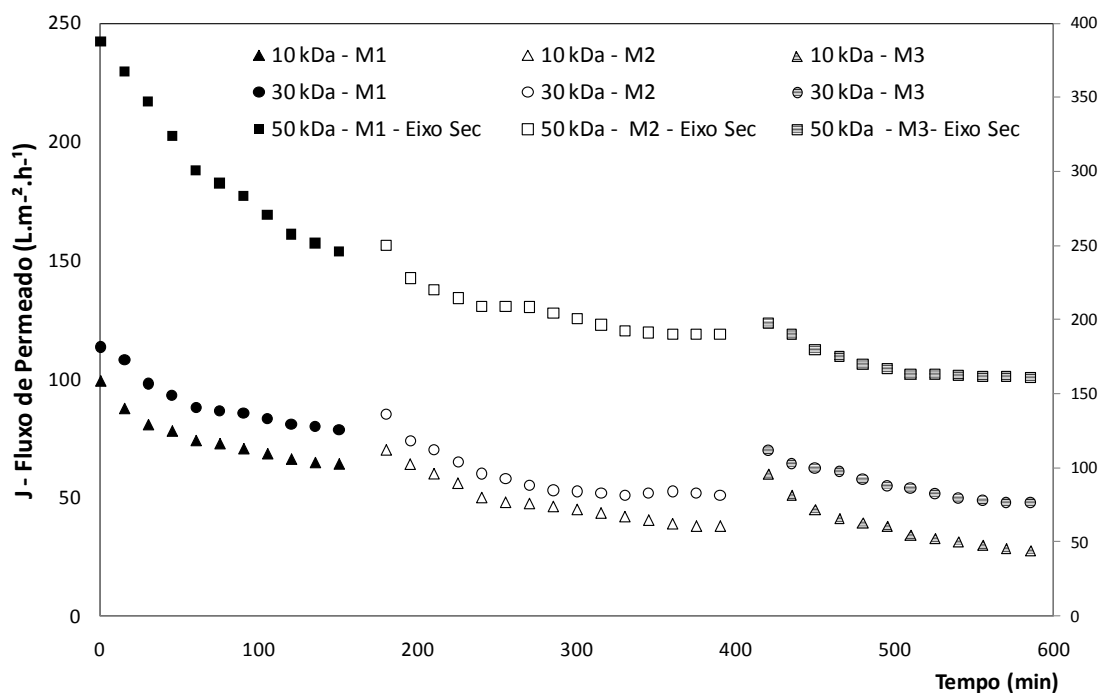


Figura 6.8 Fluxo de permeado em função do tempo para os experimentos de compactação das membranas de 10 e 30 kDa (eixo principal) e da membrana de 50 kDa (eixo secundário) durante 3 momentos de compactação em dias consecutivos. Condições de operação: vazão de alimentação 40 L.h^{-1} , pressão de entrada de 5 bar , temperatura de $50 \text{ }^\circ\text{C}$.

A membrana de 50 kDa iniciou com um fluxo de $388 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ e após a compactação o fluxo atingiu o valor de $161 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$. Considerou-se que a membrana de 50 kDa estava compactada quando o fluxo de permeado fosse da ordem de $165 \pm 10 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$.

Assim como para a membrana de 50 kDa, a membrana de 30 kDa apresentou a mesma característica de descompactar-se ao entrar em repouso, e o fluxo de permeado reduziu de 114 para $48 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ após a compactação. Considerou-se que a membrana estava compactada quando o fluxo de permeado era da ordem de $50 \pm 5 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$. Já a membrana de 10 kDa iniciou com um fluxo de permeado de $100 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ e após a compactação atingiu um fluxo de $28 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$. Considerou-se que a membrana estava compactada quando o fluxo de permeado era da ordem de $30 \pm 5 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$.

6.3.2 Permeabilidade Hidráulica

Para a exemplificação das curvas de permeabilidade hidráulica obtidas tomou-se como referência a membrana de 30 kDa, sendo que as demais membranas apresentaram comportamento semelhante. Assim, na Tabela 6.9 estão apresentados os resultados dos fluxos permeados da água em função da pressão de entrada para esta membrana. Nessa figura observa-se que para temperaturas e pressões mais elevadas, o fluxo de permeado aumenta. Com base nos dados desse tipo de experimento é possível o cálculo da permeabilidade hidráulica, representado pelo coeficiente angular da reta, para temperaturas variando de 30 a 50 °C, que são apresentados na Tabela 6.2 para todas as membranas testadas. Nessa tabela é possível observar que todas as curvas apresentaram um comportamento linear em virtude do coeficiente de correlação (R^2) ter sido superior a 0,99, possibilitando a determinação da permeabilidade hidráulica.

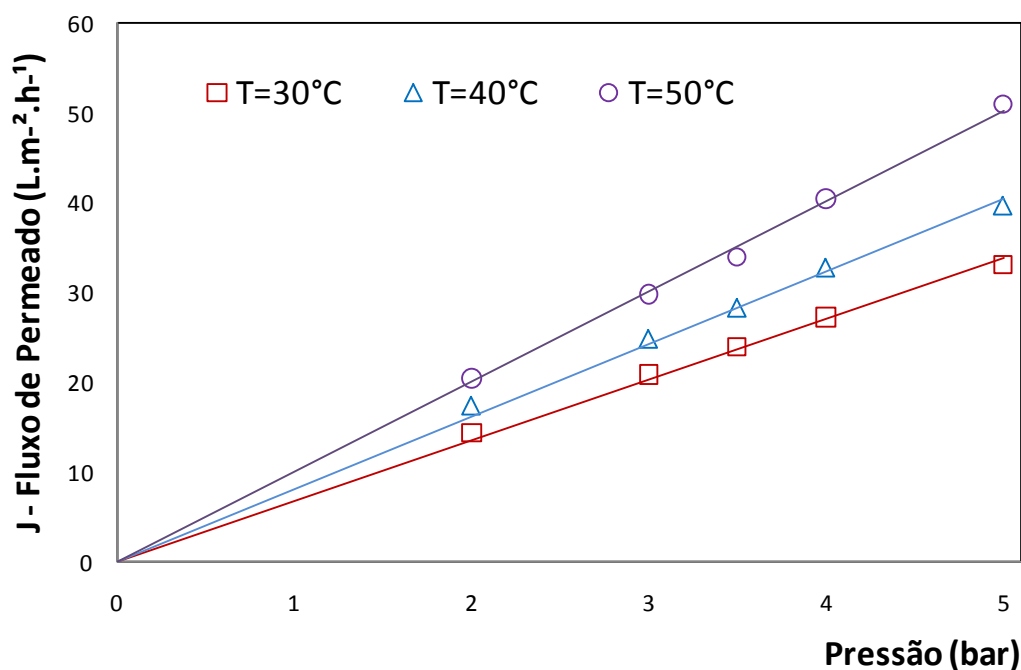


Figura 6.9 Fluxo permeado de água em função da pressão para a membrana de 30 kDa. Condições de operação: vazão de alimentação 40 L.h⁻¹, temperaturas de 30, 40 e 50°C, e pressões de 2, 3, 4 e 5 bar.

Tabela 6.2 Valores de permeabilidade hidráulica para as membranas de 10, 30 e 50 kDa a temperaturas de 30, 40 e 50°C para pressões entre 2 e 5 bar e vazão de alimentação 40 L.h⁻¹.

Membrana (kDa)	Temperatura (°C)	Permeabilidade Hidráulica (L m ⁻² h ⁻¹ bar ⁻¹)	R ²
10	30	8,2	0,999
	40	13,1	0,995
	50	15,0	0,996
30	30	10,6	0,995
	40	12,4	0,997
	50	15,7	0,998
50	30	20,9	0,999
	40	25,2	0,999
	50	26,4	0,994

A permeabilidade hidráulica depende de várias características da membrana, entre estas destacam-se o tamanho dos poros, a distribuição de tamanhos, a porosidade, a tortuosidade e a espessura da membrana. Os resultados mostraram que, para todas as membranas testadas, quanto maior a temperatura e/ou a massa molar de corte da membrana, maior o valor da permeabilidade hidráulica.

6.3.3 Caracterização das Membranas por Medidas de Retenção

Os resultados de caracterização das membranas serão apresentados em relação às medidas de retenção para a membrana de 30 e 50 kDa, respectivamente.

Para a membrana de 30 kDa o fluxo de permeado em função da rejeição observada do soluto quando permeadas soluções de PEG 6, 10, 20 e 35 kDa pode ser observado na Figura 6.10. No gráfico dessa figura observa-se que os PEGs de 20 e 35 ficam retidos na membrana, enquanto a maioria dos solutos dos PEGs de 6 e 10 permeiam pela membrana. Além disso, observa-se um efeito de diminuição da retenção com o aumento do fluxo permeado, este comportamento pode ser explicado porque a medida que aumenta o fluxo o efeito da camada polarizada de concentração se torna mais importante.

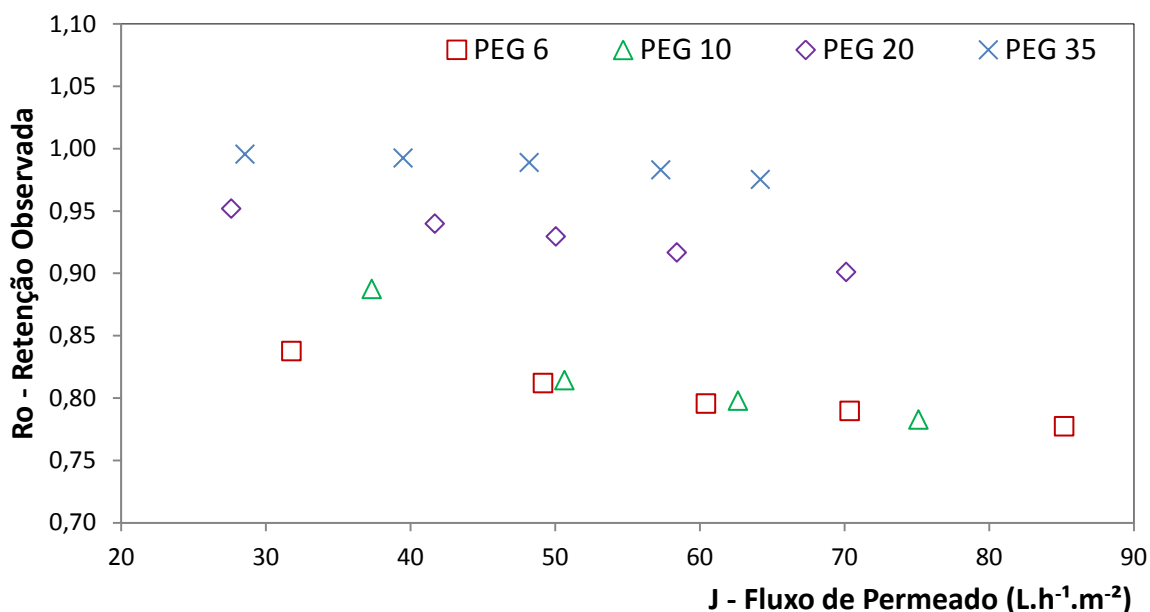


Figura 6.10 Retenção observada em função do fluxo permeado para soluções de PEG 6, 10, 20 e 35 kDa para a membrana de 30 kDa.

Na Tabela 6.3 estão apresentados os resultados obtidos para a retenção observada dos diferentes tamanhos de PEG em função da pressão. Nessa tabela observa-se que os PEGs de 6 e 10 apresentam uma retenção de 84 e 89% na pressão de 2 bar, quando a polarização por concentração é menor, enquanto que os PEGs de 20 e 35 kDa apresentam uma retenção superior a 95%. Com base nestes resultados pode-se considerar que a massa molar de corte da membrana é menor que aquela definida pelo fabricante.

Tabela 6.3 Retenção observada para os diferentes tamanhos de PEG em função da pressão para a membrana de 30 kDa.

P (bar)	2	3	4	5	6
	Retenção observada (%)				
PEG 6	83,76	81,20	79,55	78,96	77,72
PEG 10	88,74	81,42	79,78	79,03	78,28
PEG 20	95,18	93,96	92,95	91,67	90,10
PEG 35	99,55	99,23	98,87	98,30	97,53

Para a membrana de 50 kDa o fluxo de permeado em função da rejeição observada do soluto quando permeadas soluções de PEG 6, 10, 20 e 35 kDa pode ser

observado na Figura 6.11. Nesse gráfico observa-se que para todos os tamanhos de PEGs testados, a retenção foi baixa.

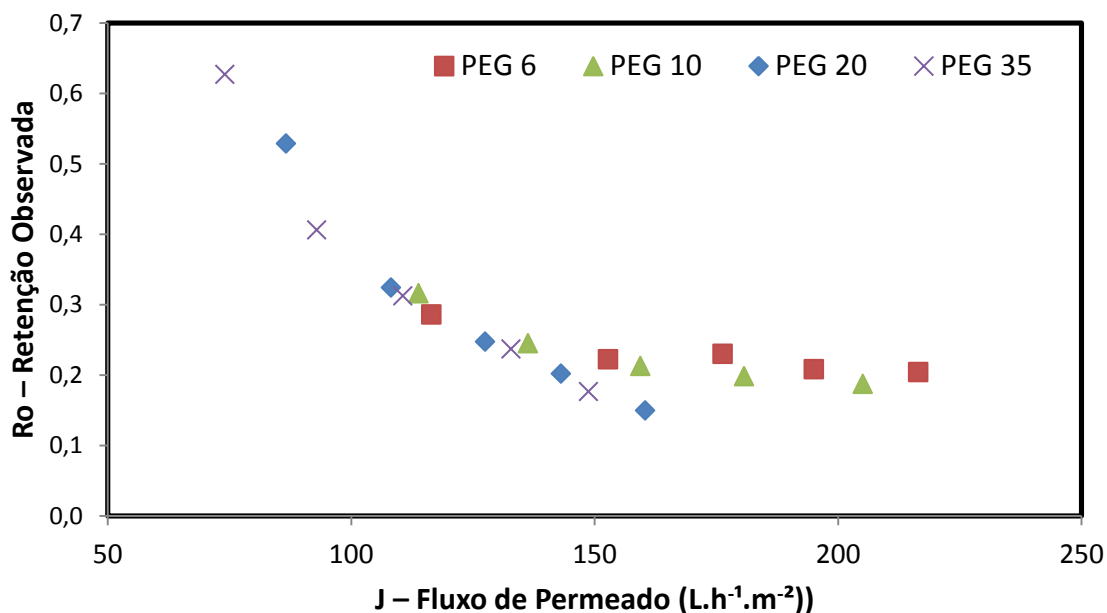


Figura 6.11 Fluxo de permeado em função da retenção observada do soluto quando permeadas soluções de PEG 6, 10, 20 e 35 kDa para a membrana de 50 kDa.

Na Tabela 6.4 estão apresentados os resultados obtidos para a retenção observada dos diferentes tamanhos de PEG em função da pressão. Nessa tabela observa-se que para todos os PEGs testados a retenção foi inferior a 63%. Este resultado mostra que moléculas com massa molar de 35 kDa permeiam parcialmente pela membrana e que existe a probabilidade de que as moléculas de POD também permeiem pela membrana.

Tabela 6.4 Retenção observada para os diferentes tamanhos de PEG em função da pressão para a membrana de 50 kDa.

P (bar)	2	3	4	5	6
	Retenção observada (%)				
PEG 6	28,63	22,24	23,05	20,85	20,44
PEG 10	31,62	24,52	21,32	19,86	18,74
PEG 20	52,91	32,44	24,75	20,2	14,99
PEG 35	62,71	40,62	31,26	23,72	17,69

6.3.4 Ultrafiltração do Suco de Mirtilo Clarificado

A discussão dos resultados relativa aos experimentos de ultrafiltração do suco de mirtilo clarificado está apresentada da seguinte forma: ensaios preliminares para a identificação das condições de operação e determinação do fluxo crítico; acompanhamento do comportamento do fluxo de permeado em função do tempo com o sistema operando com suco de mirtilo; avaliação da tendência ao fouling e eficiência da limpeza química sobre a membrana e resultados para os testes de retenção de antocianinas e inativação da peroxidase.

6.3.4.1 Determinação do Fluxo Crítico

Com o objetivo de determinar a pressão de operação do sistema de ultrafiltração com suco, fez-se uma análise do comportamento do fluxo de permeado em função da pressão para a seguinte condição: membrana de 10 kDa, temperatura de 30°C e suco a 12°Brix. Os resultados obtidos para o ensaio com o suco nessas condições como pode ser observado na Figura 6.12. Nessa figura observa-se uma linha tracejada de ajuste logarítmico aos dados experimentais e uma linha contínua. O descolamento dessa linha contínua a linha de ajuste dos dados experimentais indica o momento onde o fluxo deixa de ser linear, que no caso em questão foi para pressões próximas a 3,5 bar. Também é possível verificar que pressões superiores a 5 bar não influenciam significativamente no fluxo de permeado. Com base nestes resultados, a pressão escolhida para a operação foi de 3,5 bar. Rodrigues *et al.* (2003) ao estudarem a remoção de polifenoloxidase do suco de banana utilizaram uma pressão de operação de 3 bar.

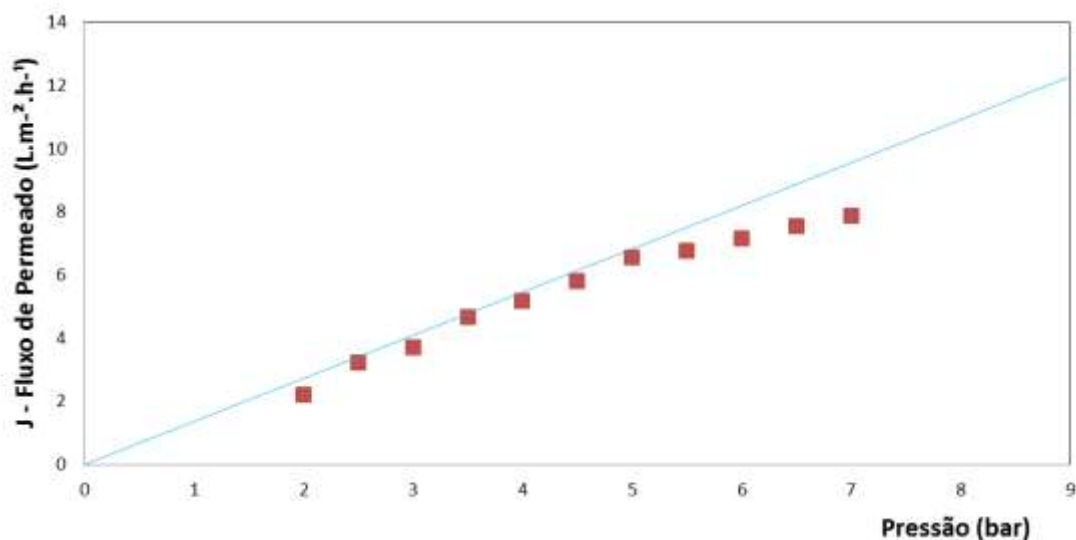


Figura 6.12 Fluxo de permeado em função da pressão para o suco de mirtilo a 12°Brix para a membrana de 10 kDa. Condições de operação: vazão de alimentação 40 L.h⁻¹, temperatura de 30 °C.

6.3.4.2 Operação com o Suco

No estudo desenvolvido verificou-se que as três membranas utilizadas proporcionaram sucos clarificados semelhantes, com coloração vermelho intenso, elevada translucidez e aspecto bastante atrativo ao comparar com o suco sem tratamento.

Após a compactação, caracterização das membranas e testes preliminares, realizaram-se os testes de ultrafiltração do suco de mirtilo clarificado conforme o planejamento experimental apresentado na Tabela 6.1. Todos os experimentos foram realizados na pressão de 3,5 bar e vazão da corrente de alimentação de 40L.h⁻¹.

No gráfico da Figura 6.13 são apresentados os comportamentos de fluxo permeado em função do tempo de operação para os quatro experimentos realizados para a membrana de MMC de 10kDa. Como se pode verificar, as curvas apresentaram características semelhantes, inicialmente o fluxo apresenta uma redução e posteriormente atinge uma região de estabilidade. Os sucos com menor teor de sólidos solúveis apresentaram fluxo maior do que os sucos a 12°Brix, o que era esperado, pois a maior concentração de sólidos solúveis aumenta a viscosidade do suco, levando a diminuição do fluxo de permeado.

Em relação à temperatura observa-se que para as amostras de 8°Brix quanto maior a temperatura maior o fluxo, isto indica que nesta concentração o efeito da temperatura é principalmente sobre a viscosidade do suco; para as amostras com maior teor de sólidos este comportamento não é observado podendo indicar algum tipo de interação entre os diferentes solutos com a membrana em temperaturas mais elevadas, como por exemplo, uma maior atividade de enzimas pectinolíticas que diminuem a viscosidade, uma vez que em temperatura maior o fluxo foi consideravelmente menor.

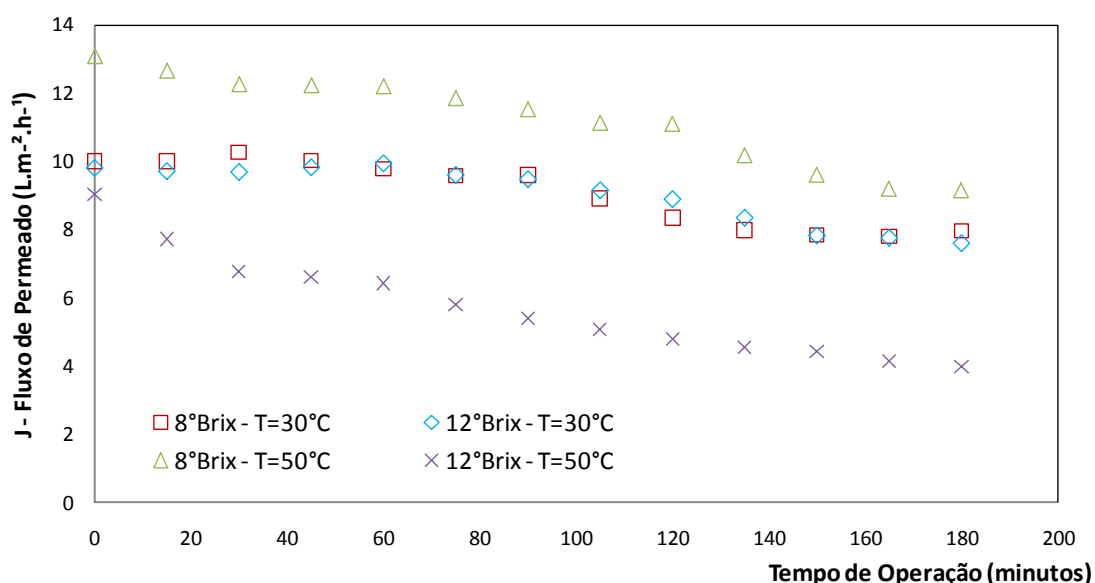


Figura 6.13 Fluxo de permeado em função do tempo para os experimentos com a membrana de 10kDa para o suco de mirtilo. Condições de operação: vazão de alimentação 40 L.h⁻¹ e 3,5 bar de pressão.

Na Figura 6.14 estão apresentadas as curvas de fluxo para os experimentos com a membrana de 30 kDa. Assim como para a membrana de 10 kDa, a membrana de 30 kDa também apresentou uma certa influência com o teor de sólidos solúveis. No entanto, como a membrana de 30 kDa representa o ponto central do planejamento experimental, nesse gráfico pode-se observar que as curvas apresentaram características semelhantes, o que foi um indicativo da reprodutibilidade do processo. Vale ressaltar que os três experimentos foram realizados com a mesma amostra de membrana, que foi submetida à limpeza química.

Além dos pontos que constituíam o planejamento fatorial, foi realizado um experimento adicional com o objetivo de comparar o efeito da temperatura de 50°C na ultrafiltração do suco de mirtilo utilizando a membrana de 30 kDa. Observa-se que houve uma diminuição do fluxo com o aumento do teor de sólidos.

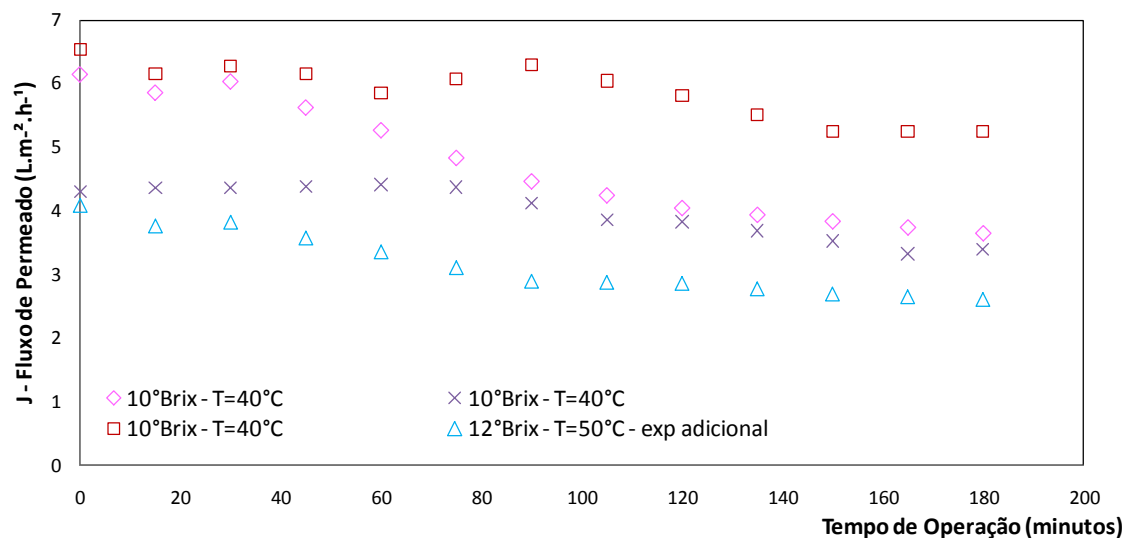


Figura 6.14 Fluxo de permeado em função do tempo para a ultrafiltração do suco de mirtilo com a membrana de 30 kDa. Condições de operação: vazão de alimentação 40 L.h⁻¹.

Na Figura 6.15 estão apresentadas as curvas de fluxo para os experimentos com a membrana de 50 kDa. Para essa membrana observa-se a interação entre a influência do teor de sólidos solúveis e da elevação da temperatura. Observa-se ainda nessa figura que os maiores fluxos de operação foram atingidos para a temperatura de 50°C. Para a temperatura de 30°C o teor de sólidos não apresentou uma influência significativa sobre o fluxo de permeado, mas com o aumento de temperatura o efeito do teor de sólidos é importante.

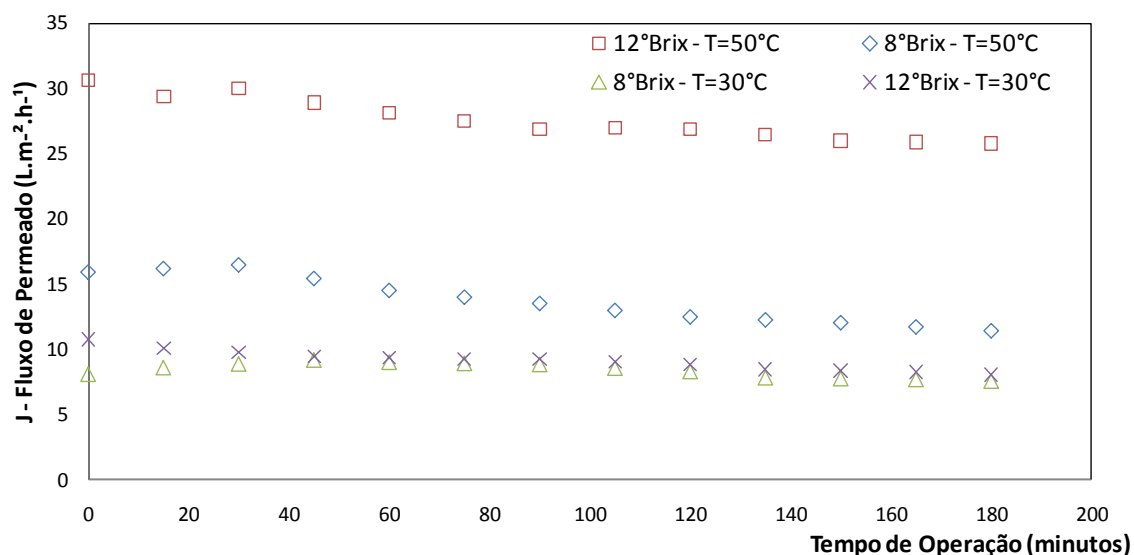


Figura 6.15 Fluxo de permeado em função do tempo para os experimentos de ultrafiltração do suco de mirtillo com a membrana de 50 kDa. Condições de operação: vazão de alimentação 40 L.h⁻¹ e 3,5 bar de pressão.

A fim de facilitar a análise do fluxo de permeado entre os diferentes experimentos foi elaborada a Tabela 6.5. Para tanto utilizou-se o valor do fluxo médio de permeado calculado a partir da Equação 6.5. Nessa tabela é possível observar que os fluxos de permeado são semelhantes entre os tratamentos que envolvem o mesmo tipo de membrana, estando na ordem de $8,3 \pm 2,0$, $4,2 \pm 1,1$ e $14,2 \pm 9,1$ L.m².h⁻¹ para as membranas com massa molar de corte de 10, 30 e 50 kDa, respectivamente. Apenas para a membrana de 50 kDa foi possível observar a influência da temperatura, para teor de sólidos inicial de 8°Brix na temperatura de 50°C o fluxo foi praticamente o dobro do fluxo a 30°C, mas com o aumento do teor de sólidos inicial, o aumento da temperatura triplicou o valor do fluxo permeado.

Tabela 6.5 Resultados obtidos para o fluxo de permeado médio durante a ultrafiltração do suco de mirtilo para os diferentes experimentos do planejamento experimental: MMC das membranas, teor de sólidos inicial e temperatura.

Experimento	Membrana (kDa)	Sólidos Solúveis (°Brix)	Temperatura (°C)	Fluxo de Permeado (L.m ⁻² .h ⁻¹)
1	10	8	30	8,65 ± 0,96
2	10	8	50	10,48 ± 1,33
3	10	12	30	8,35 ± 0,87
4	10	12	50	5,67 ± 1,51
5	50	8	30	7,70 ± 0,57
6	50	8	50	12,92 ± 1,81
7	50	12	30	8,94 ± 0,78
8	50	12	50	27,40 ± 1,62
9	30	10	40	5,68 ± 0,44
10	30	10	40	4,48 ± 0,93
11	30	10	40	3,70 ± 0,41
12*	30	12	50	3,10 ± 0,51

*experimento adicional para a membrana de MMC 30 kDa.

Os resultados mostram que para a membrana de 10 kDa o teor de sólidos para a temperatura de 30°C não tem influência, no entanto para a temperatura de 50°C a redução de fluxo permeado com o aumento do teor de sólidos é acentuada. Este comportamento pode indicar uma possível modificação e/ou interação entre os diversos componentes do suco e a membrana em temperaturas maiores.

Na Tabela A.6.1 está apresentada a Análise de Variância (ANOVA) para o fluxo de permeado médio durante a ultrafiltração do suco de mirtilo para os diferentes pontos do planejamento experimental ($R^2 = 0,6774$). Nessa tabela observa-se que tanto a massa molar de corte (MMC) da membrana quanto a temperatura de operação (T), além das interações membrana x teor de sólidos solúveis inicial e membrana x temperatura influenciaram significativamente ($p < 0,05$) no fluxo de permeado médio.

Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente e os efeitos encontrados para as variáveis podem ser observados no Gráfico de Pareto apresentado na Figura 6.16, onde observa-se que a MMC da membrana, a temperatura e a interação entre ambas, além da interação MMC x °Brix, exercem influência positiva no fluxo de permeado.

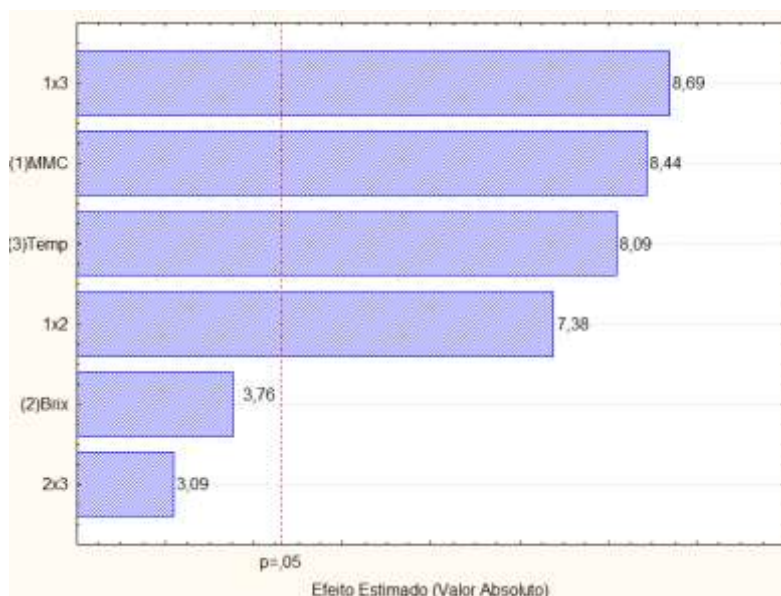


Figura 6.16 Gráfico de Pareto para análise de efeito das variáveis estudadas na retenção do conteúdo de antocianinas totais monoméricas em diferentes pontos do planejamento experimental.

6.3.4.3 Avaliação da tendência ao “fouling” e eficiência da limpeza química

Para avaliar se o sistema adotado para limpeza da membrana foi eficiente, realizaram-se medidas de fluxo permeado de água antes e após o sistema operar com suco. As medidas de fluxo permeado refletem a integridade das membranas e são utilizadas para avaliar o grau de limpeza das mesmas após a realização de cada experimento de ultrafiltração.

Para exemplificar esse fenômeno tomou-se como referência o ponto 2 do planejamento fatorial que envolvia a membrana de 10 kDa, o suco de mirtilo com 8°Brix e temperatura de operação de 50°C e os dados de fluxo de permeado *versus* pressão transmembrana estão apresentados na Figura 6.18. Nesta figura é possível observar que o fluxo de permeado antes da passagem do suco de mirtilo, para uma pressão de 3,5 bar estava na ordem de 21 L.m⁻².h⁻¹. Após a passagem do suco esse fluxo foi reduzido para 3 L.m⁻².h⁻¹ e a limpeza com solução cloro-alkalina foi suficiente para que o fluxo retornasse próximo ao valor inicial, minimizando os efeitos causados pela de polarização por concentração e *fouling*. Rodrigues et al. (2003) conseguiram, através de uma limpeza com solução cloro-alkalina, a recuperação do fluxo permeado

inicial para a UF em suco de banana, sendo um indicativo da possibilidade de reutilização da membrana.

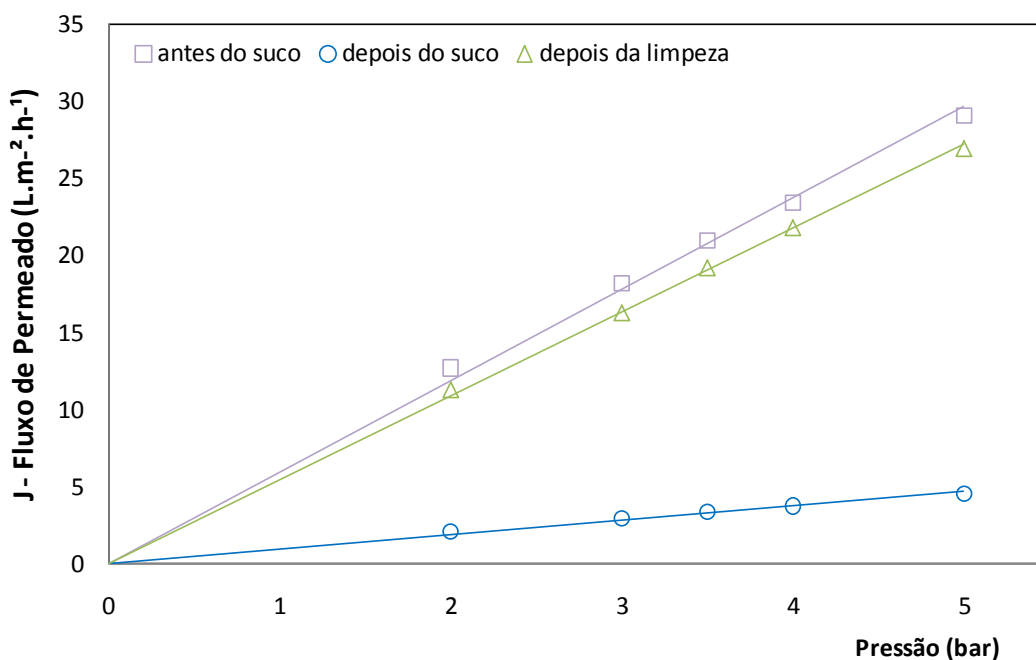


Figura 6.17 Fluxo de permeado com água destilada em função da pressão em três momentos: antes da passagem do suco (a 8°Brix) pelo sistema, depois da passagem do suco e depois da limpeza. Condições de operação: vazão de alimentação 40 L.h⁻¹, temperatura de 50°C e membrana de 10 kDa.

Com o objetivo de avaliar o efeito da passagem do suco sobre a superfície da membrana, foi realizada análise por MEV de membranas novas, de membranas que foram utilizadas no processamento do suco e não passaram pela etapa de limpeza e de membranas que foram utilizadas com suco e passaram por uma limpeza cloro-alcálica (NaOH (pH 10) e 0,4 % de NaClO durante 20 minutos). A superfície das membranas foi avaliada no microscópio eletrônico de varredura) e as fotomicrografias obtidas podem ser observadas na Figura 6.18. Nesta figura, em (b), observa-se a camada de torta formada na superfície da membrana em função da passagem do suco, o que explica a redução do fluxo de permeado. Em (c) pode-se observar que essa camada de torta é reduzida por meio da limpeza cloro-alcálica, mas não é completamente eliminada. Em (a) observa-se a superfície da membrana nova (sem uso).

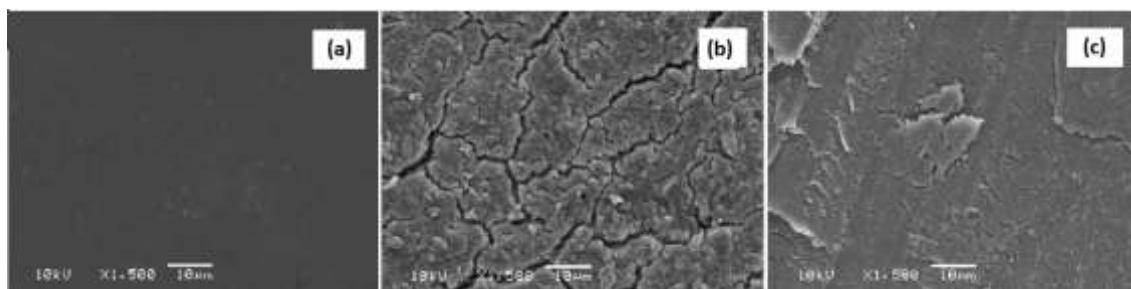


Figura 6.18 Fotomicrografias para a membrana de 30 kDa. (a) membrana nova, (b) membrana após o processamento do suco e sem passar pela etapa de limpeza e (c) membrana após limpeza cloro-alkalina (NaOH (pH 10) e 0,4 % de NaClO durante 20 minutos). Condições de operação: vazão de alimentação 40 L.h⁻¹, suco de mirtilo a 10°Brix, pressão de operação de 3,5 bar, temperatura de 50°C.

Muitos autores relatam a elevada tendência ao *fouling* em membranas de ultrafiltração aplicadas na indústria de sucos (Jiraratananon e Chanachai, 1996; De Barros *et al.*, 2003; De Bruijn e Bórquez, 2006; Saha *et al.*, 2006; Cassano, Donato *et al.*, 2007; Cassano, Marchio *et al.*, 2007; Saha *et al.*, 2007; 2009; Yazdanshenas *et al.*, 2010). Como um exemplo, Susanto *et al.* (2009) estudaram a ultrafiltração (UF) de compostos fenólicos utilizando membranas de polietersulfona (PES) com massas molares de corte de 10 e 100 kDa. Os autores observaram fortes interações soluto-membrana (*fouling* de adsorção) e interações membrana-soluto-soluto, bem como os efeitos do pH e concentração de sólidos no suco. Seus resultados indicaram que ambas as incrustações reversíveis e irreversíveis, contribuem para a redução do fluxo de permeado.

A tendência ao *fouling* para os experimentos de 1 a 12 foi obtida a partir da inclinação das curvas de fluxo de permeado com água destilada antes e após a permeação do suco de mirtilo e com o auxílio da Equação 6.4. Os resultados encontrados estão apresentados na Tabela 6.6. Nesta tabela é possível observar que os dados obtidos para a permeabilidade hidráulica tanto antes, quanto após a permeação do suco foram bem ajustadas ao modelo linear fornecendo um coeficiente de correlação (R^2) superior a 0,99. Em relação à tendência ao *fouling* os valores encontrados neste trabalho estão na faixa de 47 a 89%, muito inferiores aos valores encontrados por Wu *et al.* (2007), o que pode ser explicado pela natureza complexa do suco quando comparada com o efluente tratado estudado por esses autores.

Para a membrana de 10 kDa a tendência ao *fouling* aumenta com o aumento do teor de sólidos inicial e com a temperatura, no entanto, para a membrana 50 kDa ocorre o oposto, isto é, a tendência ao *fouling* diminui com o aumento de temperatura de modo mais intenso do que com o aumento do teor de sólidos inicial. Este comportamento pode ser atribuído às diferenças entre o material das membranas, membranas de 10 e 30 kDa são de polietersulfona (PES) e a membrana de 50 kDa é de fluoreto de polivinilideno (PVDF).

Tabela 6.6 Valores de permeabilidade hidráulica (WP) antes e após a permeação do suco de mirtilo e determinação da tendência ao *fouling* para os diferentes pontos do planejamento experimental.

Experimento	Membrana (kDa)	Sólidos Solúveis (°Brix)	Temperatura (°C)	WPa (L m ⁻² h ⁻¹ bar ⁻¹)	R ²	WPd (L m ⁻² h ⁻¹ bar ⁻¹)	R ²	Fouling (%)
1	10	8	30	8,21	0,999	4,35	0,996	47
2	10	8	50	5,93	0,991	0,94	0,997	84
3	10	12	30	23,20	0,997	4,65	0,997	80
4	10	12	50	3,07	0,993	0,49	0,997	84
5	50	8	30	17,25	1,000	1,89	0,992	89
6	50	8	50	12,29	0,992	5,35	1,000	56
7	50	12	30	26,86	0,998	4,35	0,992	84
8	50	12	50	26,93	0,991	14,51	0,993	46
9	30	10	40	11,48	0,994	5,10	0,995	56
11	30	10	40	8,11	0,992	3,03	0,996	63
12*	30	12	50	11,84	0,998	3,03	0,996	74

WPa é a permeabilidade hidráulica antes da passagem do suco e WPd é a permeabilidade hidráulica depois da passagem do suco.
*O ponto 12 foi um experimento adicional ao planejamento fatorial. O ponto 10 foi retirado da análise estatística por ter sido executado com uma outra amostra de membrana.

Na Tabela 6.6 é possível identificar os tratamentos onde a tendência ao *fouling* foi menos expressiva (47%): para a permeação com a membrana de 10 kDa, suco com 8°Brix e temperatura de operação de 30°C, este comportamento está de acordo com o esperado, uma vez que o *fouling* tende a diminuir com a diminuição da concentração e do fluxo. Além disso, este resultado indica que as substâncias que causam *fouling* têm massa molar maior que 10 kDa.

Na Tabela A.6.2 está apresentada a Análise de Variância (ANOVA) para a tendência ao *fouling* para os diferentes pontos do planejamento experimental (R² = 0,8602). Observa-se que, com base nos dados obtidos, nenhum dos fatores estudados (massa molar de corte da membrana, teor de sólidos solúveis inicial e

temperatura de operação) influenciaram significativamente ($p < 0,05$) na tendência ao *fouling*.

6.3.4.4 Retenção de antocianinas

Nesta seção será avaliado primeiramente o teor de antocianinas totais monoméricas e posteriormente a influência da formulação sobre as formas glicosiladas, as antocianidinas.

Na Tabela 6.7 estão apresentados os resultados obtidos para o teor de antocianinas totais monoméricas em função das condições de permeação do suco de mirtillo. Nesta tabela observa-se que as menores retenções de antocianinas totais monoméricas encontram-se nos experimentos que foram realizados com a membrana de 50 kDa, a qual diminui com o aumento de ambos, temperatura e °Brix. A diminuição da retenção com o aumento do °Brix pode ser atribuída ao fenômeno de polarização por concentração, que torna-se mais intenso para maiores teores de sólidos. Também observa-se que o experimento que resultou na maior retenção de antocianinas foi o ponto 1 do planejamento experimental, com uma retenção de 63% (membrana de 10 kDa, 8°Brix e 30°C). Para a membrana de 10 kDa observou-se que ao elevar a temperatura de 30 para 50°C consegue-se uma diminuição na retenção de antocianinas.

Tabela 6.7 Resultados obtidos para a retenção de antocianinas totais monoméricas após 3 h de ultrafiltração do suco de mirtillo para os diferentes pontos do planejamento experimental.

Experimento	Membrana (kDa)	Sólidos Solúveis (°Brix)	Temperatura (°C)	ACY Permeado (mg/100mL)	ACY Reciclo (mg/100mL)	Retenção (%)
1	10	8	30	16,90 ± 1,10	45,51 ± 3,05	63
2	10	8	50	25,58 ± 0,58	39,70 ± 0,37	36
3	10	12	30	23,73 ± 0,28	51,17 ± 2,47	54
4	10	12	50	40,37 ± 0,62	67,33 ± 0,94	40
5	50	8	30	34,36 ± 0,67	44,80 ± 1,55	23
6	50	8	50	23,58 ± 0,33	28,63 ± 1,02	18
7	50	12	30	53,73 ± 0,57	63,46 ± 0,94	15
8	50	12	50	38,27 ± 1,46	40,90 ± 1,43	6
9	30	10	40	21,86 ± 0,42	40,08 ± 1,00	45
11	30	10	40	21,26 ± 0,70	39,21 ± 1,80	46
12*	30	12	50	33,58 ± 0,39	53,64 ± 2,18	37

*O ponto 12 foi um experimento adicional ao planejamento fatorial. O ponto 10 foi retirado da análise estatística por ter sido executado com uma outra amostra de membrana.

Na Tabela A.6.3 está apresentada a ANOVA da retenção do conteúdo de antocianinas totais monoméricas em diferentes pontos do planejamento experimental ($R^2 = 0,8875$). Nesta tabela é possível observar que todas as variáveis estudadas influenciam significativamente ($p < 0,05$) na retenção das antocianinas.

Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente e os efeitos encontrados para as variáveis podem ser observados no Gráfico de Pareto apresentado na Figura 6.19, permitindo observar que a MMC da membrana exerce a maior influência na retenção das antocianinas, sendo que quanto maior a massa molar de corte, menor a retenção. Analogamente, a temperatura exerce efeito negativo sobre a retenção de antocianinas, porém com um efeito menos intenso que a massa molar de corte da membrana.

O teor de sólidos inicial tem influência sobre a retenção, mas esta não é de fácil interpretação uma vez que à medida que ocorre a filtração o teor de sólidos na corrente de alimentação tende a aumentar, e este aumento depende simultaneamente do fluxo e da retenção da membrana em questão. Para a membrana de 10 kDa a medida que aumenta o teor de sólidos para a temperatura de 30°C a retenção diminui, enquanto que para a temperatura de 50°C aumenta pouco. Para a membrana de 50 kDa observa-se que a retenção diminui com o aumento do teor de

sólidos e com o aumento de temperatura. Este comportamento deverá ser melhor investigado.

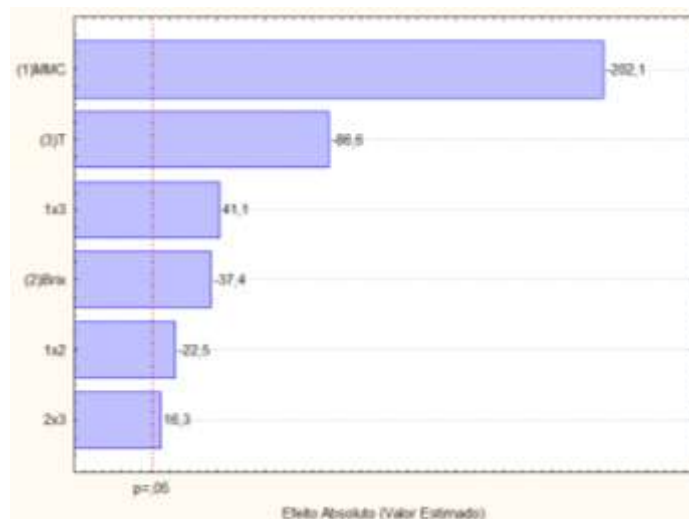


Figura 6.19 Gráfico de Pareto para análise de efeito das variáveis estudadas na retenção do conteúdo de antocianinas totais monoméricas em diferentes pontos do planejamento experimental.

Entre as seis agliconas possíveis de serem identificadas e quantificadas pela metodologia de análise validada no Capítulo 8, a cianidina, pelargonidina, petunidina e peonidina apresentaram picos com áreas superiores ao limite de detecção, mas inferiores ao limite de quantificação, em virtude disso, os resultados a seguir são expressos em função das antocianidinas majoritárias no suco clarificado de mirtilo: a delfinidina e malvidina.

Na Tabela 6.8 estão apresentados os resultados obtidos para o teor de antocianidinas (delfinidina e malvidina) para os diferentes pontos do planejamento experimental. Nesta tabela observa-se que as maiores recuperações de antocianidinas foram obtidas para a membrana de 50 kDa e temperaturas de 50°C, o que vai de encontro aos valores encontrados para o teor de antocianinas totais monoméricas. Tanto para a delfinidina, quanto para a malvidina, o experimento que apresentou a maior retenção foi o ponto 1 do planejamento experimental (membrana de 10 kDa, suco a 8°Brix e temperatura de operação de 30°C) chegando a valores de retenção de 53 e 58%, respectivamente.

Tabela 6.8 Resultados obtidos para a retenção de antocianidinas (delfinidina e malvidina) para os diferentes pontos do planejamento experimental após 3 h de ultrafiltração suco de mirtilo.

Exp	Membrana (kDa)	Sólidos (°Brix)	Temp (°C)	Df P (mg/100mL)	Df R (mg/100mL)	Ret Df (%)	MI P (mg/100mL)	MI R (mg/100mL)	Ret MI (%)
1	10	8	30	14,25 ± 0,02	30,45 ± 0,24	53	9,85 ± 0,15	23,22 ± 0,30	58
2	10	8	50	17,10 ± 0,06	23,94 ± 0,68	29	11,82 ± 0,06	18,91 ± 0,04	38
3	10	12	30	16,41 ± 0,03	26,71 ± 0,85	39	12,83 ± 0,05	22,25 ± 0,49	42
4	10	12	50	33,13 ± 2,43	40,15 ± 0,06	17	17,39 ± 0,38	22,72 ± 0,69	23
5	50	8	30	20,29 ± 1,45	23,98 ± 1,43	15	11,31 ± 0,22	12,38 ± 0,43	9
6	50	8	50	24,35 ± 1,82	24,84 ± 1,22	2	13,57 ± 0,18	13,71 ± 0,18	1
7	50	12	30	17,01 ± 0,27	19,84 ± 0,69	14	13,01 ± 0,20	15,75 ± 0,33	17
8	50	12	50	35,16 ± 0,56	38,56 ± 0,36	9	22,68 ± 0,06	23,91 ± 0,40	5
9	30	10	40	13,09 ± 0,01	22,35 ± 0,85	41	11,22 ± 0,01	17,49 ± 0,19	36
11	30	10	40	11,81 ± 0,01	19,31 ± 0,45	39	12,34 ± 0,06	18,58 ± 0,18	34
12*	30	12	50	24,96 ± 1,40	34,73 ± 2,49	28	10,46 ± 0,57	16,57 ± 0,23	37

Exp = Experimento; Sólidos = Teor de Sólidos Solúveis; Temp = Temperatura; Df P = conteúdo de delfinidina no permeado; Df R = conteúdo de delfinidina no concentrado; Ret Df = retenção de delfinidina; MI P = conteúdo de malvidina no permeado; MI R = conteúdo de malvidina no concentrado e Ret MI = retenção de malvidina.

Para a retenção de delfinidina, os resultados obtidos para a ANOVA estão apresentados na Tabela A.6.4. Nesta tabela é possível observar que a MMC da membrana influencia significativamente ($p < 0,05$) na retenção de delfinidina ($R^2 = 0,7937$). Nesse caso ainda, se o nível de significância fosse levemente superior (cerca de 5,1%), a temperatura de operação também poderia ser considerada significativa.

Os efeitos encontrados para as variáveis podem ser observados no Gráfico de Pareto apresentado na Figura 6.20, permitindo observar que a massa molar de corte da membrana exerce influência negativa na retenção de delfinidina, sendo que quanto maior a massa molar de corte, menor a retenção.

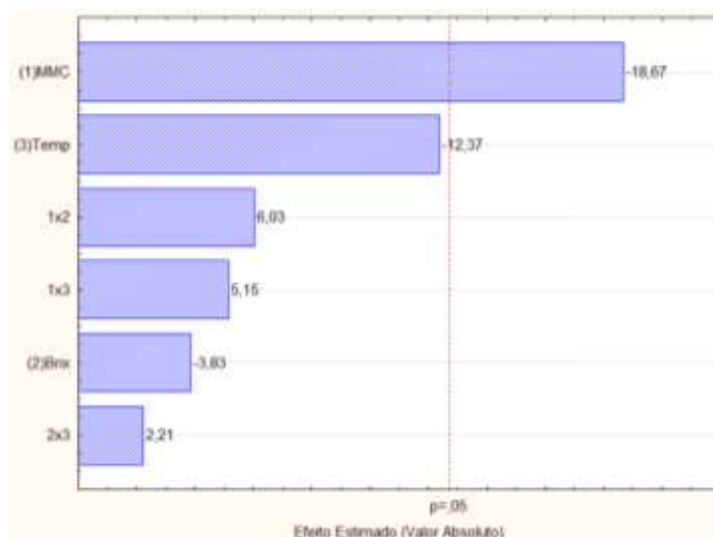


Figura 6.20 Gráfico de Pareto para análise de efeito das variáveis estudadas na retenção de delfinidina durante a ultrafiltração do suco de mirtilo: MMC, °Brix e temperatura.

A ANOVA para a retenção de malvidina está apresentada na Tabela A.6.5. Nesta tabela é possível observar que a massa molar de corte da membrana e a temperatura influenciam significativamente ($p < 0,05$) na retenção de delfinidina ($R^2 = 0,9378$).

Os efeitos encontrados para as variáveis estão apresentados no Gráfico de Pareto da Figura 6.21, observa-se que a massa molar de corte da membrana e a temperatura de operação exercem influência negativa na retenção de malvidina, sendo que quanto maior a massa molar de corte, menor a retenção.

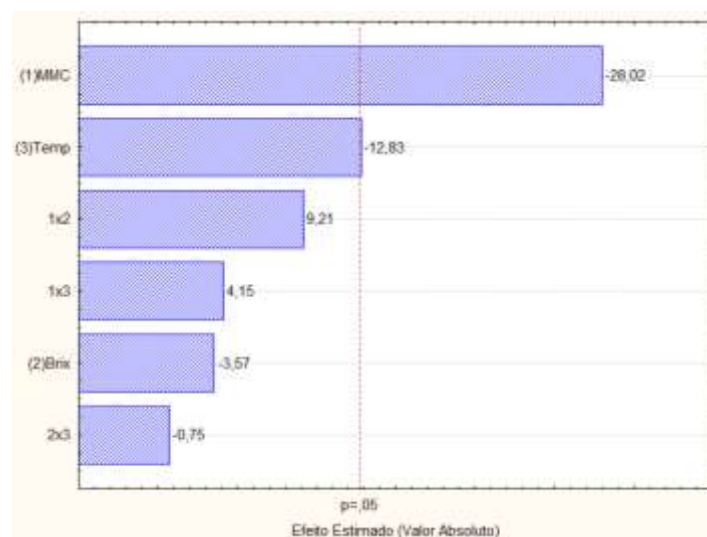


Figura 6.21 Gráfico de Pareto para análise de efeito das variáveis estudadas na retenção de malvidina durante a ultrafiltração do suco de mirtilo: MMC, °Brix e temperatura.

6.3.4.5 Redução da atividade da enzima peroxidase

Tendo em vista verificar a eficiência do processo de UF em relação à inativação de enzimas deteriorantes e de microrganismos, utilizou-se a inativação da peroxidase como referência (Rodrigo, 1996). Na Tabela 6.9 é apresentada uma comparação entre os resultados de atividade da peroxidase para os fluxos de permeado e concentrado após 3 h de ultrafiltração para todos os experimentos do planejamento experimental. Nesta tabela é possível observar que, em todos os experimentos, a atividade da peroxidase (APOD) apresentou um bom comportamento cinético fornecendo curvas de absorbância *versus* tempo com alta linearidade, caracterizada pelo elevado coeficiente de correlação ($R^2 > 0,99$). Os coeficientes angulares dessas curvas variaram entre 0,0005 a 0,0048 min^{-1} e 0,0036 a 0,1811 min^{-1} para as amostras coletadas da corrente de permeado e concentrado, respectivamente. Ainda nesta tabela observa-se que a APOD em todas amostras coletadas de permeado apresentaram-se praticamente nulas, identificando que o tratamento foi efetivo. Ao analisar os resultados da redução da APOD verifica-se que os tratamentos conseguiram reduções superiores a 80%. Para as temperaturas de operação de 50°C observa-se que tanto o fluxo de permeado como o de concentrado apresentaram baixos valores de atividade, indicando que para temperaturas de operação superiores a 50°C não é necessário o uso de membranas de ultrafiltração. Porém como os sucos apresentam compostos

nutricionais, facilmente degradados pelo calor, deve ser dada uma atenção maior aos tratamentos que utilizam baixas temperaturas. Nesse sentido, ao analisar os dados para as temperaturas de 30 e 40°C, observa-se que o uso de membranas de ultrafiltração é capaz de reduzir em mais de 97% a APOD.

Tabela 6.9 Resultados obtidos para a atividade da peroxidase para os fluxos de permeado e concentrado após 3 h de ultrafiltração do suco de mirtilo para todos os experimentos do planejamento experimental.

Exp	Membrana (kDa)	Sólidos Sol (°Brix)	Temp (°C)	Permeado			Concentrado			Redução (%)
				a	APOD	R ²	a	APOD	R ²	
1	10	8	30	0,0017	0,01	0,996	0,1530	0,77	0,991	98,9
2	10	8	50	0,0030	0,01	0,999	0,0139	0,07	0,996	84,0
3	10	12	30	0,0048	0,02	0,993	0,1811	0,91	0,991	97,4
4	10	12	50	0,0009	0,00	0,996	0,0115	0,06	0,994	92,1
5	50	8	30	0,0009	0,00	0,991	0,0602	0,30	0,995	98,5
6	50	8	50	0,0017	0,01	0,996	0,0148	0,07	0,999	88,3
7	50	12	30	0,0008	0,00	0,996	0,0395	0,20	1,000	98,1
8	50	12	50	0,0004	0,00	0,995	0,0026	0,01	0,991	84,4
9	30	10	40	0,0007	0,00	1,000	0,1344	0,67	0,992	99,5
10	30	10	40	0,0007	0,00	0,995	0,1104	0,55	0,992	99,3
11	30	10	40	0,0007	0,00	0,999	0,1234	0,62	0,995	99,4
12*	30	12	50	0,0005	0,00	0,997	0,0036	0,02	0,992	85,6

Nota: "a" é o coeficiente angular da reta de ajuste dos dados cinéticos (absorbância *versus* tempo) de atividade da peroxidase (APOD) durante 5 minutos, com seu corresponde coeficiente de correlação (R²) e, a APOD está expressa em variação de uma unidade de absorbância, por minuto e por mL de extrato.

A ANOVA para a redução da atividade da peroxidase está apresentada na Tabela A.6.6. Observa-se que todos os fatores estudados (a massa molar de corte da membrana, temperatura e operação e teor de sólidos solúveis totais) e suas respectivas interações, influenciam significativamente ($p < 0,05$) na redução da atividade dessa enzima ($R^2 = 0,6900$).

Os efeitos encontrados para as variáveis estão no Gráfico de Pareto apresentado na Figura 6.22, observa-se que a temperatura exerce o maior efeito, e negativo, sobre a redução da atividade da POD, ou seja, quanto maior a temperatura de operação, maior a redução da atividade. Um efeito negativo, menor, mas não menos importante, também pode ser observado na massa molar de corte da membrana, ou seja, quanto menor a MMC, maior a redução da atividade da POD.

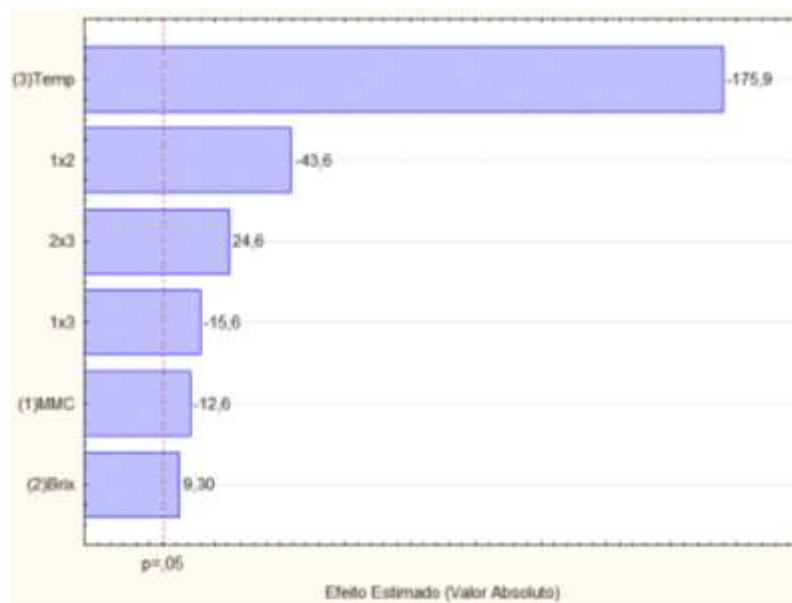


Figura 6.22 Gráfico de Pareto para análise de efeito das variáveis estudadas na inativação da peroxidase durante a ultrafiltração do suco de mirtillo.

6.4 Conclusões

O presente estudo avaliou o emprego da ultrafiltração na redução da atividade da peroxidase (POD) presente no suco clarificado de mirtillo visando a manutenção do conteúdo de antocianinas. Com esse propósito, a ultrafiltração demonstrou ser uma técnica adequada ao processamento do suco de mirtillo, proporcionando um produto clarificado, com coloração característica, elevada translucidez e aspecto atrativo.

As membranas testadas apresentaram a característica de descompactar-se ao cessar a operação, em virtude disso, recomenda-se que seja adotado o procedimento de compactação das membranas antes da operação do sistema. Além disso, este conhecimento é importante na análise do declínio do fluxo permeado durante o processamento do suso. Os testes de permeabilidade hidráulica mostraram que, para todas as membranas testadas, quanto maior a temperatura e/ou a massa molar de corte da membrana, maior o valor da permeabilidade hidráulica.

Dentre as membranas comerciais testadas com massas molares de corte de 10, 30 e 50 kDa, esta última apresentou um fluxo permeado superior as demais, principalmente quando associada a temperatura de 50°C. A tendência ao *fouling* para os experimentos foi determinada a partir da inclinação das curvas de fluxo de

permeado com água destilada antes e depois da permeação do suco de mirtilo e os resultados encontrados estiveram na faixa de 47 a 89%.

O emprego de uma etapa de limpeza com solução cloro-alkalina, em todos os experimentos, permitiu a recuperação do fluxo permeado inicial, sendo um indicativo da possibilidade de reutilização da membrana.

A retenção do teor de antocianinas totais monoméricas, tanto quanto o de suas agliconas (delfinidina e malvidina) foram inferiores com a membrana de 50 kDa, em média 16% de retenção. Para esse mesmo parâmetro, observou-se que a massa molar de corte da membrana e a temperatura exerceram influência na retenção das antocianinas, sendo que quanto maior a massa molar de corte (até 50 kDa) e maior a temperatura (até 50°C), menor a retenção.

A atividade da enzima peroxidase, nos tratamentos a 50°C foi reduzida independentemente da massa molar de corte da membrana, porém para os tratamentos a 30 e 40°C essa atividade foi reduzida em 97,5 e 96,2% para as membranas com massa molar de corte de 10 e 30 kDa, respectivamente.

Com base nestes resultados pode-se considerar o processo de ultrafiltração como uma alternativa promissora para a clarificação do suco de mirtilo, pois ao mesmo tempo em que são eliminados os compostos que degradam o suco, é possível manter a sua capacidade antioxidante, caracterizada pela presença das antocianinas.

Capítulo 7

Extração de Antocianinas do Bagaço de Mirtilo

O mirtilo tem sido utilizado pela indústria tanto *in natura* como processado para a fabricação de sucos e derivados. Entretanto, esse processamento gera cerca de 20 % de resíduo sólido (bagaço) que é composto basicamente de cascas e sementes e é rico em compostos antociânicos. Como mostrado no Capítulo 4, o teor de antocianinas presente no bagaço proveniente da extração enzimática de sucos é da ordem de 63 % do conteúdo de antocianinas presentes no fruto. Os experimentos com suco e a grande produção de resíduos foram a principal motivação para a realização dos estudos apresentados neste Capítulo. Além disso, há uma preocupação considerável no desenvolvimento de corantes alimentícios provenientes de fontes naturais como alternativas para os corantes sintéticos em virtude de uma legislação mais rigorosa e uma maior exigência do público consumidor por alimentos funcionais.

Para o aproveitamento dos pigmentos contidos em resíduos de frutas, o método mais utilizado tem sido a extração com solventes orgânicos. As moléculas de antocianinas são polares em função dos grupos substituintes (hidroxilas, carboxilas e metoxilas) e glicosilas residuais ligadas aos seus anéis aromáticos, assim os solventes mais utilizados são misturas aquosas de metanol, etanol e acetona. Alguns estudos com bagaço de uva mostram que o metanol foi mais eficiente para esta extração (Metivier *et al.*, 1980; Kammerer *et al.*, 2004; Cataneo, 2008; Rockenbach *et al.*, 2008), no entanto, devido a sua elevada toxicidade, o metanol tem sido substituído pelo etanol na indústria alimentícia.

Na literatura a grande maioria dos trabalhos avalia o potencial antioxidante e os compostos fenólicos de bagaço de outras frutas, como a uva. Em contrapartida, estudos visando o aproveitamento de partes do mirtilo que são rejeitadas durante o processo de fabricação do suco, são escassos, principalmente em se tratando da variedade de mirtilo cultivado na América do Sul, embora contenham grande quantidade de compostos fenólicos.

Neste contexto, o objetivo desta etapa do trabalho foi avaliar as melhores condições para a extração das antocianinas do bagaço de mirtilo utilizando misturas de etanol e água em diferentes proporções e para diferentes valores de pH. O extrato obtido nesta etapa será utilizado para a elaboração de micropartículas a fim de viabilizar o uso deste extrato como corante pela indústria de alimentos. Para tanto se determinou as condições ótimas de pH e da razão etanol/água para a extração de antocianinas a partir do bagaço de mirtilo empregando a metodologia de superfície de resposta.

7.1 Fundamentos Teóricos e Revisão Bibliográfica

Nesta seção são apresentados aspectos importantes relacionados ao aproveitamento do bagaço tais como a extração de antocianinas do bagaço de frutas e as alterações físico-químicas dos corantes naturais.

7.1.1 Antocianinas como Corantes Naturais e suas Alterações Físico-Químicas

O uso de corantes naturais na indústria de alimentos tem aumentado significativamente em virtude de uma legislação mais rigorosa e uma maior exigência por parte do público consumidor, que está evitando o uso de corantes de origem sintética, principalmente para produtos destinados a infantes. Os corantes naturais possuem as seguintes desvantagens frente aos sintéticos: alta sensibilidade à luz; grande suscetibilidade à oxidação; baixa solubilidade; baixa durabilidade e perda de cor ao longo do tempo.

Várias tentativas foram feitas para produzir e extrair antocianinas de plantas e frutas com o objetivo de utilizá-las como corantes. O extrato de antocianina mais

abundante e com histórico mais antigo é o obtido do bagaço de uva (Wrolstad, 2000). Outros extratos, seja comercialmente disponíveis ou utilizados como extratos naturais e corantes pela indústria de alimentos, incluem as pétalas de flor (Kamei *et al.*, 1995), cascas de uva e arroz vermelho (Koide *et al.*, 1996), soja e feijão vermelhos (Koide *et al.*, 1997), espécies de mirtilo (Bomser *et al.*, 1996), milho roxo (Hagiwara *et al.*, 2001; Jing, P. e Giusti, M., 2007), diferentes extratos de cereja (Harris *et al.*, 2001; Katsube *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2003), mirtilo (Lee e Wrolstad, 2004; Su e Silva, 2006), açaí (Tonon *et al.*, 2008) e batata vermelha e rabanete (Wrolstad *et al.*, 2001). No entanto, em todos esses casos, um dos principais obstáculos na comercialização desses extratos é o efeito de escurecimento (Gould *et al.*, 2009). Isso se refere à formação de uma cor marrom nesses extratos como resultado de duas etapas: inicialmente as antocianinas são oxidadas por enzimas presentes no extrato, tais como a polifenoloxidase (PPO) e a peroxidase (POD) (Oszmianski e Lee, 1990; McLellan *et al.*, 1995; Tsai *et al.*, 2004); após, as antocianinas oxidadas sofrem condensação e formam pigmentos marrons, que são geralmente indesejáveis pela indústria de alimentos (Gould *et al.*, 2009).

7.1.2 Extração de antocianinas do bagaço de frutas

O processamento de frutas gera uma grande quantidade de resíduo sólido (bagaço) que é composto basicamente de cascas e sementes (Silva, 2003). Vários autores apontam o potencial antioxidante do bagaço de frutas como a uva e a maçã (Silva, 2003; Rockenbach *et al.*, 2008; Soares *et al.*, 2008).

Dos extratos vegetais testados por Katsube e colaboradores (2004), os extratos obtidos de mirtilo e seus subprodutos continham grande quantidade de compostos fenólicos, principalmente antocianinas. Solventes alcoólicos têm sido comumente empregados para extrair compostos fenólicos de fontes naturais, pois providenciam um alto rendimento apesar de não serem muito seletivos para os fenóis. Misturas de álcoois e água têm sido mais eficientes na extração do que o álcool isoladamente (Pinelo *et al.*, 2005; Yilmaz e Toledo, 2006; Oliveira *et al.*, 2008). Além dos solventes orgânicos, Lee e Wrolstad (2004) destacam ainda o uso associado de temperatura, dióxido de enxofre e ácido cítrico para aumentar a extração de antocianinas de casca de mirtilo.

A adição de uma solução de ácido clorídrico 0,1% como um acidulante em solventes orgânicos tem sido proposta por vários autores, pois fornece um meio favorável para a formação do íon flavílio estável e não promove a degradação de antocianinas em concentrações inferiores a 1 % (Revilla *et al.*, 1998; Ju e Howard, 2003; Konczak e Zhang, 2004). Além do ácido clorídrico, outros ácidos podem ser utilizados, tais como cítrico, tartárico, acético, fórmico e propiônico (Metivier, 1980). Main (1978) utilizou 0,01 % de ácido cítrico junto ao etanol na extração de antocianinas de uvas, pois esse ácido, além de ser menos corrosivo que o ácido clorídrico e apresentar a capacidade de quelar os metais, pode servir como conservante do extrato durante o processamento e o armazenamento.

Cacace e Mazza (2003) estudaram a extração de antocianinas de groselhas negras utilizando solução aquosa de etanol acidificado com ácido acético (pH 4,1) a diferentes temperaturas. As concentrações de etanol estudadas foram 39, 50, 67, 84 e 95 % e as temperaturas de 6, 20, 40 e 74 °C. Os fenólicos totais aumentaram com a concentração de etanol, até um máximo de 60 % e, em seguida, diminuiu com o aumento da concentração de etanol, independentemente da proporção de solvente para a quantidade de bagaço. A temperatura afetou somente a extração de antocianinas e em temperaturas superiores a 35 °C ocorreu a degradação das antocianinas e conseqüentemente o rendimento foi reduzido.

Ju e Howard (2003) utilizaram o método de Extração Líquida Pressurizada (PLE) para extrair as antocianinas de casca de uva com seis tipos de solventes a 50 °C, 10,1 MPa. Os solventes testados foram: água acidificada 0,1% HCl (pH=2,3); etanol 60 % em água acidificado 0,1% HCl (pH 2,2); metanol 60 % em água acidificado 0,1% HCl (pH 2,3); mistura de metanol, acetona e água na proporção de 40:40:20 acidificado 0,1% HCl (pH 1,9); mistura de ácido acético, metanol e água na proporção de 7:70:23 (pH 2,0); e mistura de ácido trifluoracético, metanol e água na proporção de 0,1:70:29,9 (pH 2,1). O metanol 60 % acidificado extraiu os mais altos níveis de antocianinas monoglicosídicas totais, enquanto a mistura metanol, acetona e água acidificados extraiu os maiores níveis de fenóis totais e antocianinas aciladas totais.

Rockenbach e colaboradores (2008) mostraram que diferentes sistemas de solventes foram aplicados para determinar a eficiência de extração de compostos com capacidade antioxidante em bagaço de uva. Os autores realizaram a quantificação de

compostos fenólicos totais, antocianinas totais e atividade antioxidante nos extratos de bagaço de uva *Vitis vinifera* das variedades Tannat e Ancelota. As soluções aquosas utilizadas foram etanol e acetona a 0, 30, 50, 70 e 100% (v/v), acidificados com HCl a 0,1%. Conteúdos de compostos fenólicos totais em acetona 50 e 70% foram maiores nas duas variedades, enquanto que os conteúdos de antocianinas totais extraídos em ambas as variedades foram maiores para etanol em concentrações de 50 e 70%.

Valduga e colaboradores (2008) obtiveram um corante natural (antocianina), na forma de pó a partir do bagaço de uva da cultivar Isabel (*Vitis labrusca*), onde foram realizados estudos de extração e encapsulação. Neste estudo foi empregado o método de extração por imersão mediante técnica de planejamento experimental, onde as variáveis avaliadas foram pH da solução de extração (1-2), volume de etanol (100-250 mL), tempo de extração (3-7 h) e temperatura de extração (15-35 °C). A concentração máxima de antocianinas totais obtidas foi no pH de 1,0, tempo de 3 h, temperatura de 35 °C e volume de etanol de 250 mL.

7.2 Materiais e Métodos

7.2.1 O bagaço de mirtilo

O bagaço utilizado foi o resíduo obtido pela extração do suco de mirtilo (*Vaccinium corymbosum* L.) pelo método enzimático (descrito no Capítulo 4). O resíduo passou por um processo de secagem a 60 °C em estufa (DeLeo tipo A3, DG Temp, Brasil) com ar circulante por 48 horas. Em seguida, o bagaço contendo um teor inicial de antocianinas de 559 mg/100g foi triturado em liquidificador doméstico (Twist, Walita, Brasil) e armazenado à temperatura ambiente em recipiente protegido da luz.

7.2.2 Extração das antocianinas do bagaço de mirtilo

Em cada extração foram utilizados 10 g do bagaço em 100 mL de solvente, nas condições do planejamento experimental apresentado na seção 7.2.3. Foi realizado o ajuste de pH com ácido cítrico ou hidróxido de sódio, então, as soluções contendo bagaço e solvente foram submetidas à agitação magnética durante 2 h, filtradas a vácuo e armazenadas para posterior análise. Todas as extrações foram feitas em duplicata.

7.2.3 Planejamento Fatorial da Extração e Análise Estatística

O planejamento experimental seguiu um fatorial 2^2 com delineamento composto central rotacional (DCCR) e modelo quadrático. As variáveis independentes para extração de antocianidinas foram: concentração de etanol, X_1 (15% a 85% m/m) e pH, X_2 (1,0 a 4,0). Na **Erro! Fonte de referência não encontrada.** estão apresentados os níveis com os respectivos valores utilizados para a extração de antocianinas do bagaço de mirtilo. Observa-se que cada variável independente possui 5 níveis codificados (x_i , $i=1, 2$) com os seguintes valores: -1,4; -1, 0; +1 e +1,4, totalizando 11 experimentos incluindo 3 repetições do ponto central (codificado por 0). Os experimentos foram realizados de modo aleatório para minimizar o erro experimental (Rodrigues e lemma, 2005). As variáveis dependentes foram o teor de antocianinas e antocianidinas. Todas as análises foram feitas em triplicata.

Tabela 7.1 Valores utilizados no delineamento fatorial em função dos níveis para as variáveis de estudo (concentração de etanol e pH) empregadas para a extração de antocianinas do bagaço de mirtilo.

Nível	Concentração	pH
	de Etanol (%)	
	X_1	X_2
-1,41	15	1,0
-1	25	1,5
0	50	2,5
1	75	3,5
1,41	85	4,0

As curvas de contorno foram obtidas por meio do programa estatístico Statistica para Windows (versão 7.0, Statsoft®, Tulsa, USA) e a otimização da condição de extração foi realizada através do uso dos mínimos quadrados no software Matlab® (Matlab 5.3®, MathWorks Inc., Natick, USA).

7.2.4 Quantificação das Antocianinas Monoméricas Totais

Para a quantificação das antocianinas monoméricas totais foi utilizado o método espectrofotométrico descrito no Capítulo 3.

7.2.5 Quantificação das Antocianidinas

A quantificação das antocianidinas foi feita pelo método cromatográfico descrito mais detalhadamente no Capítulo 8.

7.3 Resultados e Discussão

A apresentação e discussão dos resultados foram divididas em duas partes: a primeira em relação ao teor total de antocianinas monoméricas determinadas pelo método espectrofotométrico e, posteriormente, uma discussão mais detalhada da extração em função da obtenção do teor das diferentes agliconas, baseadas no método cromatográfico.

7.3.1 Efeito da Concentração de Etanol e do pH na Extração de Antocianinas Monoméricas Totais

Na Tabela 7.2 está apresentada a resposta do planejamento fatorial experimental realizado: a concentração de antocianinas totais. Verifica-se que a menor concentração de antocianinas foi de 229,9 mg/100g de bagaço obtida no ensaio 5 (pH 2,5 e concentração de etanol de 15 %). Aumentando a quantidade de etanol de 15 % a 50 % os teores de antocianinas aumentaram e para uma quantidade de etanol de 50 % a 85 %, diminuíram. Para o valor de 50 % de etanol a concentração de antocianinas permaneceu constante. Comportamento semelhante foi relatado por Spigno *et al.* (2007) na extração de antocianinas do bagaço de uva. Rockenbach *et al.* (2008) ao extraír antocianinas do bagaço de uva, também verificou a extração com 100% de etanol extraía menos antocianinas que em soluções aquosas de 50 e 70% de etanol.

Tabela 7.2 Teores de antocianinas monoméricas totais para as diferentes amostras obtidas dos experimentos definidos no planejamento experimental.

Ensaio	Concentração de etanol (%)	pH	Antocianina
	$X_1 (x_1)$	$X_2 (x_2)$	(mg/100g)
1	75 (+1)	1,5 (-1)	395,4 ± 14,4
2	25 (-1)	1,5 (-1)	428,5 ± 9,0
3	75 (+1)	3,5 (+1)	447,4 ± 11,7
4	25 (-1)	3,5 (+1)	264,0 ± 21,6
5	15 (-1,4)	2,5 (0)	229,9 ± 4,2
6	85 (-1,4)	2,5 (0)	444,6 ± 24,2
7	50 (0)	1,0 (+1,4)	401,1 ± 0,1
8	50 (0)	4,0 (-1,4)	459,3 ± 7,5
9*	50 (0)	2,5 (0)	520,6 ± 19,0

* média das 3 repetições do ponto central.

A concentração máxima de antocianinas foi de 520,6 mg/100g de bagaço para o pH 2,5 e volume de 50 mL de etanol (ponto central), representando uma recuperação de 93%. Valores semelhantes a esse foram encontrados por outros autores em polpa de mirtilo (Su e Silva, 2006) e no bagaço de uva (Valduga *et al.*, 2008).

Na Tabela A.7.1 está mostrada a Análise da Variância (ANOVA) dos resultados experimentais de extração de antocianinas do bagaço de mirtilo. Nesta tabela é possível observar que as variáveis independentes (pH e concentração de etanol) são estatisticamente significativas ($p < 0,05$) durante o processo de extração.

Através de uma estimativa dos parâmetros significativos dos resultados da ANOVA obtém-se um modelo matemático estatístico, representado pela Equação 7.1.

$$ACY = 520,2 (\pm 3,9) + 59,7 (\pm 2,5) \cdot x_1 - 96,6 (\pm 3,0) \cdot x_1^2 - 10,0 (\pm 3,0) \cdot x_2 - 30,2 (\pm 3,1) \cdot x_2^2 + 57,3 (\pm 3,7) x_1 \cdot x_2 \quad (7.1)$$

onde: ACY é a quantidade de antocianinas monoméricas (mg/100g), x_1 e x_2 são as variáveis codificadas de concentração de etanol e pH, respectivamente.

O modelo foi validado, com coeficiente de determinação de 0,9216, e o valor de $F_{\text{calculado}}$ (119,9) foi 27 vezes maior que o valor que o de F_{tabelado} permitindo a construção das curvas de contorno da observar do teor de antocianinas totais

monoméricas em função do pH e da concentração de etanol que podem ser observadas na Figura 7.1. Ao analisar essa figura identifica-se a região ótima de extração: pH entre 2,0 e 3,3 e de 50 a 70% de etanol.

Outros estudos, utilizando metanol acidificado, apresentam resultados um pouco superiores, porém sem aplicação para alimentos devido a alta toxicidade. Como os estudos de: Ruberto *et al.* (2007), que relataram extrair do bagaço de diferentes cultivares de uva chegando a valores médios de antocianinas totais na faixa de 380 a 2.900 mg/100 g; e, de Negro *et al.* (2003) que encontraram conteúdos de antocianinas totais de 980 mg/100 g.

Cacace e Mazza (2003), ao extraírem antocianinas de groselhas negras, sugeriram a melhor solubilidade das antocianinas seria em soluções de etanol:água. Isso porque os sólidos que se dissolvem como moléculas teriam um baixo grau de solubilidade na água devido à energia necessária para superar a atração entre as moléculas de água. Essa energia que surge a partir da atração entre as cargas parciais dos dipolos água torna-se importante quando uma interação muito fraca com moléculas covalentes é considerada (Frank *et al.*, 1999). Para moléculas covalentes apolares, a energia necessária para quebrar a ligação com a água é dominante, e os autores sugerem que esta poderia ser a situação que afeta as antocianinas, que apresentam baixa solubilidade em água (Cacace e Mazza, 2003). As antocianinas, que permaneceriam na forma catiônica flavilium (AH^+) em pH ácido podem ser consideradas como moléculas iônicas. Ácidos fenólicos com um grupo carboxílico e um anel benzenico glicosilado (hidrofóbico) podem ser considerados moléculas covalente polares com uma interação intermediária.

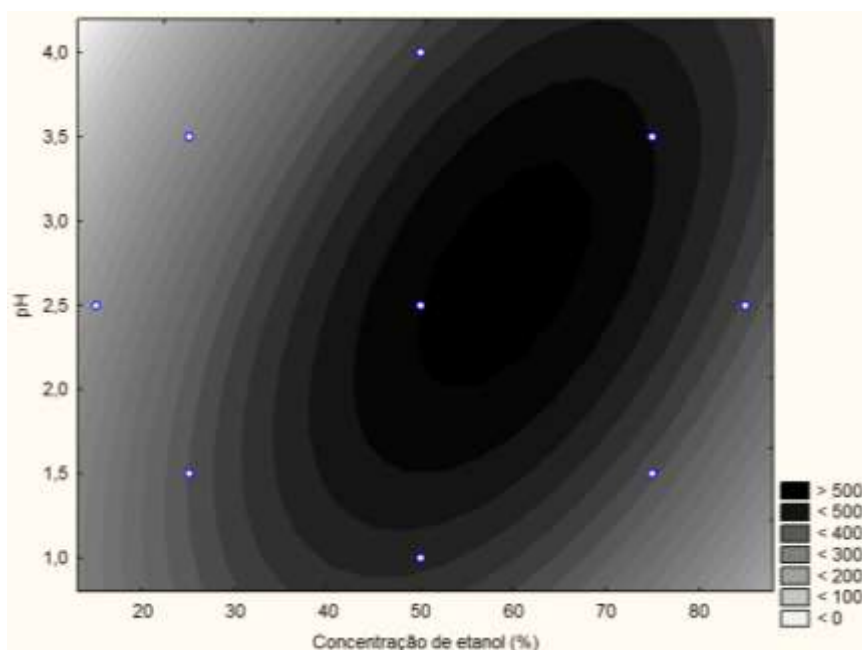


Figura 7.1 Curva de contorno para o teor de antocianina total monomérica (mg/100g) em função do pH e concentração de etanol.

7.3.2 Efeito da Concentração de Etanol e do pH na Extração de Antocianidinas

Das seis agliconas possíveis de serem identificadas e quantificadas pela metodologia de análise validada no Capítulo 8, a pelargonidina, petunidina e peonidina apresentaram picos com áreas superiores ao limite de detecção, mas inferiores ao limite de quantificação, em virtude disso, os resultados a seguir são expressos em função das antocianidinas majoritárias no extrato etanólico do bagaço de mirtilo: a delphinidina, cianidina e malvidina.

Na Tabela 7.3 estão apresentados os resultados de concentração, em mg/100g de bagaço, para as agliconas em função dos diferentes tratamentos. Nela observa-se que para a delphinidina e cianidina as maiores concentrações foram encontradas nos tratamentos referentes ao ponto central. Já para a malvidina as maiores concentrações foram para os tratamentos com maior concentração de etanol (ensaio 3 e 6) e maiores pH (tratamento 3 e 8).

Tabela 7.3 Resultados de concentração (em ppm) para as agliconas delphinidina, cianidina e malvidina extraídas do bagaço de mirtilo.

Ensaio	Etanol (%) $X_1 (x_1)$	pH $X_2 (x_2)$	Delfinidina (mg/100g)	Cianidina (mg/100g)	Malvidina (mg/100g)
1	75 (+1)	1,5 (-1)	118,4 ± 2,2	11,7 ± 0,4	58,3 ± 0,2
2	25 (-1)	1,5 (-1)	199,0 ± 9,3	12,5 ± 1,0	50,1 ± 0,4
3	75 (+1)	3,5 (+1)	248,6 ± 4,1	37,2 ± 0,4	74,2 ± 0,9
4	25 (-1)	3,5 (+1)	147,2 ± 7,1	6,7 ± 0,2	44,6 ± 0,0
5	15 (-1,4)	2,5 (0)	79,1 ± 2,6	2,3 ± 0,1	46,3 ± 1,1
6	85 (-1,4)	2,5 (0)	382,3 ± 11,3	47,4 ± 2,2	73,1 ± 8,9
7	50 (0)	1,0 (+1,4)	128,8 ± 7,1	16,2 ± 0,5	53,6 ± 2,3
8	50 (0)	4,0 (-1,4)	343,9 ± 9,4	34,3 ± 1,7	71,4 ± 1,0
9*	50 (0)	2,5 (0)	389,7 ± 34,7	40,1 ± 1,8	69,1 ± 2,6

* média das 3 repetições do ponto central.

Na Tabela A.7.2 estão apresentadas as Análises da Variância (ANOVA) dos resultados experimentais de extração para as diferentes agliconas extraídas do bagaço de mirtilo. Nesta tabela é possível observar que as variáveis independentes (pH e concentração de etanol) são estatisticamente significativas ($p < 0,05$) para todas as diferentes agliconas durante o processo de extração.

Com base nos resultados da ANOVA, uma equação geral (Equação 7.2) foi proposta para atender essas três agliconas: delphinidina (*Df*), cianidina (*Cy*) e malvidina (*Ml*). Em função das variáveis codificadas da concentração de etanol (x_1) e do pH (x_2).

$$Df, Cy, Ml = a_0 + a_1 \cdot x_1 + a_{11} \cdot x_1^2 + a_2 \cdot x_2 + a_{22} \cdot x_2^2 + a_{12} \cdot x_1 \cdot x_2 \quad (7.2)$$

onde a_s são constantes. Na Tabela 7.4 são apresentados os valores para as constantes a_0 , a_1 , a_{11} , a_2 , a_{22} e a_{12} da Equação 7.2 para cada variável, os coeficientes de determinação e os valores de $F_{\text{calculado}}$ correspondentes. Como o F_{tabelado} , para as três agliconas, foi de 4,47, todos os valores apresentaram $F_{\text{calculado}}$ maior que F_{tabelado} , validando os modelos dessa tabela.

Tabela 7.4 Valores para as constantes a_0 , a_1 , a_{11} , a_2 , a_{22} e a_{12} da Equação 7.2 para delphinidina (*Df*), cianidina (*Cy*) e malvidina (*Ml*), coeficientes de determinação (R^2) e $F_{\text{calculado}}$ correspondentes.

Parâmetro	<i>Df</i>	<i>Cy</i>	<i>Ml</i>
a_0	387,75 ± 5,88	39,86 ± 0,39	68,96 ± 0,89
a_1	56,24 ± 3,62	11,73 ± 0,24	9,50 ± 0,55
a_{11}	-96,98 ± 4,39	-10,02 ± 0,29	-5,96 ± 0,67
a_2	47,19 ± 3,50	5,52 ± 0,23	4,37 ± 0,53
a_{22}	-80,10 ± 3,91	-8,28 ± 0,26	-3,82 ± 0,59
a_{12}	45,47 ± 5,10	7,80 ± 0,34	5,34 ± 0,77
R^2	0,763	0,878	0,890
$F_{\text{calculado}}$	24,50	54,73	61,56

A região ótima de extração, para a faixa de concentração de etanol e pH testados, pode ser identificada pela análise simultânea dos gráficos das curvas de contorno (Figura 7.2) para as diferentes agliconas, em função da concentração de etanol e do pH, obtidos a partir dos modelos descritos na Tabela 7.4. Para as agliconas delphinidina e cianidina a região ideal de extração está localizada nas concentrações entre 50 a 70% de etanol e pH entre 2,5 e 3,5. Porém para a malvidina essa região se desloca para concentrações de etanol superiores a 70% e pH superior a 3,5. Esses valores são coerentes com os encontrados a partir do método espectrofotométrico descrito anteriormente.

O fato de a malvidina necessitar de uma maior concentração de etanol para ser extraída pode estar relacionado com a estrutura de sua molécula. De acordo com Mazza e Brouillard (1987), para a malvidina, à medida que o pH aumenta, há um aumento da concentração, pelo ataque nucleofílico da água ao cátion flavilium, da estrutura do carbinol que existe em equilíbrio com a forma chalcona (vide Figura 3.2). Segundo Jing e Giusti (2007) esse aumento de carbinol \leftrightarrow chalcona fornece um aumento da molaridade da molécula fazendo com que sua afinidade seja maior em soluções com uma maior concentração de etanol.

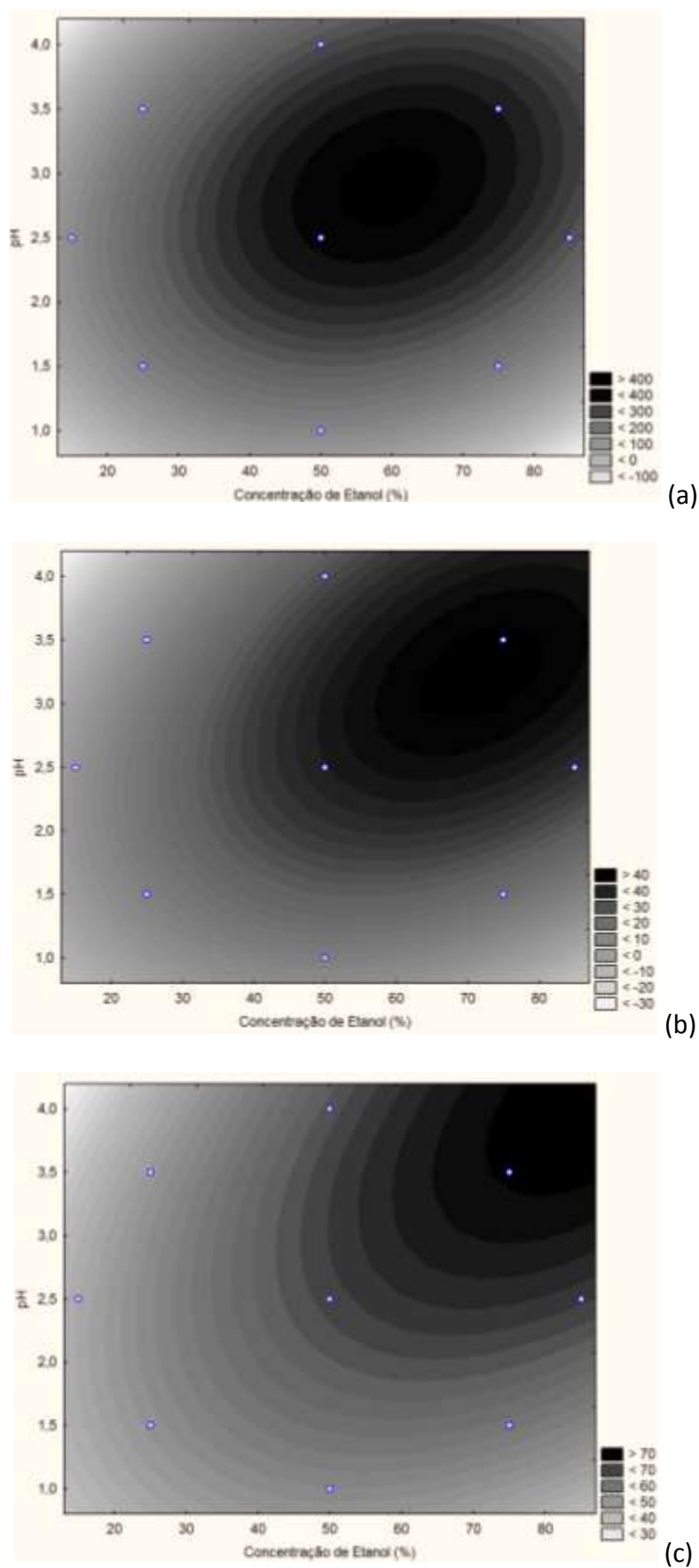


Figura 7.2 Curvas de contorno em função da concentração de etanol e do pH para: (a) delphinidina, (b) cianidina e (c) malvidina.

7.4 Conclusões

Neste estudo foi investigada a influência do pH e da concentração de etanol durante a extração de antocianinas e antocianidinas do bagaço de mirtilo. Observou-se que estes dois parâmetros influenciam o processo de extração. Os resultados mostraram que a melhor condição para a extração de antocianinas monoméricas do bagaço de mirtilo foi com pH entre 2,0 e 3,3 e de 50 a 70% de etanol. Já para a extração das antocianidinas observa-se que uma concentração de 60% de etanol e o pH de 3,40 atingem os maiores níveis de antocianidinas. A aglicona malvidina necessita de uma maior concentração de solvente e pH para a sua extração em relação as demais.

Capítulo 8

Validação da Metodologia Analítica por Cromatografia Líquida para a Separação e Quantificação de Antocianinas Extraídas do Bagaço de Mirtilo

O desenvolvimento de um método analítico, a adaptação ou implementação de um método conhecido, envolve um processo de avaliação que estime sua eficiência na rotina do laboratório. Este processo é denominado de validação. Determinado método é considerado validado se suas características estiverem de acordo com os pré-requisitos estabelecidos. Portanto, existe diferença entre a execução de experimentos que determinam os diversos parâmetros (coleta dos dados experimentais) e a validação. Esta deve avaliar a relação entre os resultados experimentais e as questões que o método se propõe a responder. O objetivo da validação consiste em demonstrar que o método analítico é adequado para o seu propósito. A validação deve ser considerada quando se desenvolve ou efetua adaptações em metodologias já validadas, inclusão de novas técnicas ou uso de diferentes equipamentos.

A literatura dispõe de vários trabalhos que relatam a validação de métodos analíticos e definem os critérios que devem ser seguidos durante seu desenvolvimento. Tais artigos abordam os critérios de validação de acordo com sua área específica, enfatizando a exatidão, a precisão e os limites de detecção e quantificação. Porém há poucos estudos referentes à validação de metodologias para a extração e quantificação de compostos antocianínicos. Para a quantificação das

antocianinas são utilizados principalmente dois métodos: pH diferencial e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O primeiro é um método espectrofotométrico mais simples, rápido e barato, porém com pouca sensibilidade para baixas concentrações. A cromatografia, apesar de ser uma técnica mais precisa e cara, é o método mais utilizado devido a sua facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação das espécies químicas presentes em uma amostra, mesmo em misturas muito complexas.

As alternativas apresentadas pela literatura para separação e identificação de antocianinas por cromatografia líquida são basicamente duas: das próprias antocianinas e das antocianidinas. Existem mais de seis centenas de antocianinas identificadas e disponíveis na natureza e, para uma razoável caracterização, seria necessária a aquisição de um grande número de padrões. As antocianidinas são as agliconas obtidas pela hidrólise ácida das antocianinas, ou seja, as antocianinas sem a ligação com os açúcares; dentre as encontradas na natureza, apenas seis estão presentes em alimentos: pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina, que diferem entre si quanto ao número de hidroxilas e grau de metilação, presentes no anel B (mostrado na Figura 3.1). Desta forma, o número de antocianinas para análise pode ser reduzido.

Conforme apresentado nos capítulos anteriores, o mirtilo, seus derivados e subprodutos aparecem como fonte de compostos antociânicos que trazem vários benefícios para a saúde humana; portanto é importante conhecer a distribuição e a estrutura química das antocianidinas nesses produtos e o efeito das condições de processamento. Considerando o exposto, este Capítulo tem como objetivo apresentar uma metodologia analítica para a separação e quantificação das antocianidinas do bagaço de mirtilo através de cromatografia líquida de alta eficiência.

8.1 Fundamentos Teóricos e Revisão Bibliográfica

A precisão de medições químicas está sendo cada vez mais exigida como um parâmetro de qualidade, para que os resultados obtidos sejam confiáveis e possam ser comparados e rastreados com facilidade. Dados analíticos não confiáveis podem

conduzir a decisões errôneas e a prejuízos financeiros. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis para a amostra, ele deve passar por um processo de avaliação denominado de validação. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência.

Para registro de novos produtos, todos os órgãos reguladores do Brasil e de outros países exigem que a sua caracterização seja obtida a partir de uma metodologia analítica validada e, para isso, a maioria deles tem estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo de validação. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para a caracterização desejada. Para tanto nessa seção são apresentados conceitos básicos relacionados à validação e aos parâmetros analíticos que podem ser utilizados nesse processo. No final desta revisão são apresentados estudos de separação e quantificação de antocianinas em alimentos.

8.1.1 Conceitos básicos para o processo de validação

Existem muitos estudos relacionados com a validação de métodos e pode-se dizer que os conceitos continuam evoluindo e estão constantemente sob consideração pelas agências reguladoras. De acordo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (ANVISA, 2003b). Assim, a validação de métodos assegura a credibilidade destes durante o uso rotineiro, sendo algumas vezes mencionado como o processo que fornece uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado a fazer.

Vários artigos e revisões têm sido publicados a respeito de validação de métodos analíticos, os quais descrevem definições, procedimentos, parâmetros e estratégias de validação (Ribani *et al.*, 2004; Pellati *et al.*, 2009; Bouabidi *et al.*, 2010). Dentro do âmbito geral de validação de métodos é possível distinguir dois tipos: a

validação no laboratório (“*in house validation*”) e a validação completa (“*full validation*”) (Thompson, 2002). O primeiro, chamado de validação no laboratório consiste das etapas de validação dentro de um único laboratório, seja para validar um método novo que tenha sido desenvolvido localmente ou para verificar se um método adotado de outras fontes está bem aplicado. A validação no laboratório é utilizada nas etapas preliminares do desenvolvimento de uma metodologia e na publicação de artigos para revistas científicas, em que são avaliadas todas as características de desempenho da validação da metodologia, porém sem verificar a reprodutibilidade. O segundo, denominado de validação completa, envolve todas as características de desempenho e um estudo interlaboratorial que é utilizado para verificar como a metodologia se comporta com uma determinada matriz em vários laboratórios, estabelecendo a reprodutibilidade da metodologia e a incerteza expandida associada à metodologia como um todo. Só assim a metodologia pode ser aceita como uma metodologia oficial para uma determinada aplicação.

8.1.2 Aspectos de Legislação

Existem razões legais, técnicas e comerciais que justificam a implantação da validação de métodos analíticos de separação, apesar de não haver uma norma estabelecida de âmbito nacional ou internacional. Atualmente, para mostrar competência técnica, os laboratórios que executam as análises devem submeter-se a um credenciamento (“*accreditation*”) de um órgão vigente de âmbito nacional ou internacional.

No Brasil, há duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, respectivamente, a Resolução ANVISA RE nº 899, de 29/05/2003 (ANVISA, 2003b) e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de março/2003 (INMETRO, 2003). As similaridades e as diferenças entre os parâmetros de validação empregados pelos dois órgãos podem ser visualizadas na Tabela 8.1. Além desses dois órgãos, também se

pode utilizar os preceitos da *International Conference on Harmonization* (ICH, 1996) que, na maioria dos casos convergem entre si.

Tabela 8.1 Parâmetros para validação de métodos analíticos do INMETRO e da ANVISA.

INMETRO	ANVISA
Especificidade/Seletividade	Especificidade/Seletividade
Faixa de trabalho e Faixa linear de trabalho	Intervalos da curva de calibração
Linearidade	Linearidade
-	Curva de Calibração
Limite de Detecção (LD)	Limite de Detecção (LD)
Limite de Quantificação (LQ)	Limite de Quantificação (LQ)
Sensibilidade (inclinação da curva)	-
Exatidão e tendência (bias)	Exatidão
Precisão	Precisão
Repetitividade	Repetibilidade (precisão intra-corrida)
Precisão Intermediária	Precisão intermediária (precisão inter-corrida)
Reprodutibilidade	Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial)
Robustez	Robustez
Incerteza de medição	-

Fonte: (ANVISA, 2003; INMETRO, 2003).

8.1.3 Processo de Validação

É essencial que os estudos de validação sejam representativos e conduzidos de modo que a variação da faixa de concentração e os tipos de amostras sejam adequados. Além disso, os parâmetros analíticos devem ser baseados na intenção do uso do método. Um método para quantificação de um composto majoritário requer um critério de aceitação e uma abordagem diferente de um método desenvolvido para a análise de traços. Por exemplo, se um método será usado para análise qualitativa em

nível de traços, não há necessidade de testar e validar a linearidade do método sobre toda a faixa linear dinâmica do equipamento. A frequência com que o método será utilizado (muitas vezes em um dia, uma vez em um dia para um estudo rápido, uma vez em um mês, etc.) também influencia o tipo de estudo de validação que é necessário.

O objetivo do método pode incluir também os diferentes tipos de equipamentos e os lugares em que o método será utilizado, ou seja, se o método é desenvolvido para ser utilizado em instrumento e laboratório específicos, não há necessidade de usar instrumentos de outras marcas ou incluir outros laboratórios nos experimentos de validação. Desta forma, para o presente estudo, não foram avaliados os itens robustez e precisão interlaboratorial, limitando a análise aos experimentos realmente necessários no âmbito local.

8.1.4 Parâmetros analíticos para a validação de métodos

Os parâmetros analíticos normalmente encontrados para validação de métodos de separação são: seletividade, linearidade e faixa de aplicação, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez. Estes termos são conhecidos como parâmetros de desempenho analítico (Swartz, 1998), características de desempenho (Thompson, 2002; INMETRO, 2003) e, algumas vezes, como figuras analíticas de mérito (Swartz, 1998) e estão apresentados a seguir.

a) Especificidade e Seletividade: uma amostra, de maneira geral, consiste dos analitos a serem medidos, da matriz e de outros componentes que podem ter algum efeito na medição, mas que não se quer quantificar. A especificidade e a seletividade estão relacionadas ao evento da detecção. Um método que produz resposta para apenas um analito é chamado específico. Já aquele que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo (INMETRO, 2003). Entretanto, os termos especificidade e seletividade são frequentemente utilizados indistintamente ou com diferentes interpretações.

A medição pode ser alterada porque os reagentes, matriz da amostra ou outros componentes alteram a sensibilidade do detector que mede o analito de interesse ou porque estes compostos afetam diretamente a resposta. O efeito de erros constantes (interferências) e erros proporcionais (efeito de matriz) podem ocorrer ao mesmo tempo. Uma vez conhecidos, estes problemas podem ser superados através de adição-padrão, análise de múltiplos componentes ou por uma mudança no pré-tratamento, no método de separação ou de detecção.

Dependendo da técnica analítica utilizada, a quantidade relativa da substância de interesse da matriz pode diminuir conforme a amostra é processada durante as etapas do ensaio. A matriz está presente nas fases de amostragem, no pré-tratamento da amostra e nas etapas de preparação. Uma porção da matriz entra no sistema de separação e alguns componentes podem ainda estar presentes na fase de detecção.

A determinação da seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação e deve ser reavaliada continuamente durante a validação e subsequente uso do método. Algumas amostras podem sofrer degradação, gerando compostos que não foram observados inicialmente, que podem coeluir com a substância de interesse. A seletividade pode ser obtida de várias maneiras. A primeira forma de se avaliar a seletividade é comparando a amostra sem adição da substância padrão de interesse e a matriz adicionada com esta substância padrão, sendo que, nesse caso, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse, que deve estar bem separada dos demais compostos presentes na amostra.

b) Faixa de Trabalho: para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentrações do analito ou valores da propriedade no qual o método pode ser aplicado. No limite inferior da faixa de concentração, os fatores limitantes são os valores dos limites de detecção e de quantificação. No limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição.

Dentro da faixa de trabalho pode existir uma faixa de resposta linear na qual a resposta do sinal terá uma relação linear com a concentração do analito ou com o

valor da propriedade. A extensão dessa faixa pode ser estabelecida durante a avaliação da faixa de trabalho.

c) Linearidade: corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação. O INMETRO recomenda que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes (INMETRO, 2003). O GARP (Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas) também sugere cinco concentrações que devem ser injetadas em ordem crescente de concentração, no mínimo três vezes cada, com estimativa do desvio padrão relativo (RSD) entre as injeções inferior a 5% (Ribani *et al.*, 2004). A correlação entre o sinal medido (área ou altura do pico) e a massa ou concentração da espécie a ser quantificada muito raramente é conhecida a priori. Na maior parte dos casos, a relação matemática entre o sinal e a concentração ou massa da espécie de interesse deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas dessa espécie. Essa relação matemática, muitas vezes, pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica. Matematicamente, a estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada usando o método matemático conhecido como regressão linear. Além dos coeficientes de regressão a e b , também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação (R^2). Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Para verificar se a equação de regressão é estatisticamente significativa podem ser efetuados os testes de ajuste do modelo linear, validade da regressão, sua eficiência e sua eficiência máxima. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (Shabir, 2003). A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 (ANVISA, 2003) e o INMETRO um valor acima de 0,90 (INMETRO, 2003).

d) Curva de Calibração: a quantificação do composto de interesse em validação pode ser obtida através dos seguintes métodos: padronização externa; padronização interna; superposição de matriz; adição de substância padrão.

O método de padronização externa compara a área da substância a ser quantificada na amostra com as áreas obtidas com soluções de concentrações conhecidas preparadas a partir de um padrão. Preparam-se soluções da substância a ser quantificada em diversas concentrações; obtém-se o cromatograma correspondente a cada uma delas e, em um gráfico, relacionam-se as áreas obtidas com as concentrações. Utilizando este gráfico ou a equação da curva resultante, pode-se calcular a concentração desta substância na amostra a partir da área da substância obtida no cromatograma resultante de uma injeção separada.

O método de padronização interna consiste na preparação das soluções padrão de concentrações conhecidas da substância de interesse, às quais se adiciona a mesma quantidade conhecida de um composto chamado padrão interno. Após análise dessas soluções, constrói-se um gráfico, relacionando a razão de áreas (área da substância/área do padrão interno que tem concentração constante) com a concentração (variada) da substância. Através da razão de áreas obtidas no cromatograma tem-se a concentração da substância na amostra.

O método de superposição de matriz ("*matrix-matched*") consiste na adição do padrão da substância em diversas concentrações em uma matriz similar à da amostra, isenta da substância, e construção do gráfico de calibração relacionando as áreas obtidas com as concentrações dos padrões. O método de superposição de matriz pode ser utilizado para calibração, tanto com a padronização interna como com a padronização externa. Este método é usado para compensar o efeito da matriz ou de possíveis interferentes e é de suma importância em determinações quando a matriz pode interferir na pré-concentração, extração, separação ou detecção da substância de interesse.

O método de adição de substância padrão consiste na adição de quantidades conhecidas da substância de interesse que está sendo analisada a quantidades conhecidas da amostra, antes do seu preparo. Estas amostras com o padrão

incorporado são utilizadas para a obtenção dos cromatogramas. Constrói-se uma curva analítica relacionando as quantidades da substância adicionada à amostra com as respectivas áreas obtidas. O ponto onde a reta corta o eixo das ordenadas corresponde à área do pico da substância que está sendo determinada, sem qualquer adição do padrão. A extrapolação da reta define, no eixo das abcissas, a concentração da substância na amostra analisada. O método de adição padrão é trabalhoso, mas é especialmente importante quando a amostra é muito complexa, quando as interações com a matriz são significativas e quando houver dificuldade de encontrar um padrão interno adequado ou uma matriz isenta da substância de interesse (Snyder, 1997).

e) Limite de Detecção (LD): é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. Ele é estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável. No caso de métodos instrumentais como a CLAE a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de três vezes o ruído da linha de base e pode ser calculado de acordo com a Equação 8.3.

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC} \quad (8.1)$$

onde: *DPa* é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação. Este desvio padrão pode ainda ser obtido a partir da curva de calibração proveniente da análise de um número apropriado de amostras do branco; *IC* é a inclinação da curva de calibração.

f) Limite de Quantificação (LQ): é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação é estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do analito até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis. Pode ser expresso pela equação 8.2,

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC} \quad (8.2)$$

onde: *DPa* é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, três curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação. Este desvio padrão pode ainda ser obtido a partir da curva de calibração proveniente da análise de um apropriado número de amostras do branco; *IC* é a inclinação da curva de calibração.

g) Exatidão: é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. A exatidão é calculada como percentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança. A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente conforme a Equação 8.3.

$$Exatidão = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (8.3)$$

h) Precisão: é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (*DPR*) ou coeficiente de variação (*CV%*), segundo a Equação 8.4. O valor máximo aceitável não deve ser superior a 5% (ANVISA, 2003).

$$DPR = \frac{DP \times 100}{CMD} \quad (8.4)$$

onde: *DP* é o desvio padrão e *CMD*, a concentração média determinada.

A precisão pode ser considerada no nível de repetitividade, de precisão intermediária e de reprodutividade. A repetitividade expressa a precisão nas mesmas

condições de operação (equipamento, analista, reagentes, dia e mesmas condições ambientais) em pequeno espaço de tempo. A repetitividade, também conhecida como precisão intra-ensaios, pode ser avaliada com no mínimo nove determinações dentro do intervalo de três diferentes concentrações e três replicatas cada, ou com no mínimo seis determinações para uma única concentração-teste. A precisão intermediária expressa as variações no mesmo laboratório em diferentes dias, analistas e/ou equipamentos. A reprodutividade expressa a precisão entre laboratórios, mediante estudos colaborativos usualmente aplicados para padronização de metodologias.

i) Robustez: é a medida da capacidade do método em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal. Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método a variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e as precauções necessárias devem ser incluídas no procedimento.

j) Incerteza de Medição: os estudos de validação produzem dados de desempenho global do método e fatores de influência individuais que podem ser aplicados à estimativa da incerteza associada aos resultados do método em rotina.

8.1.5 Alternativas para a extração, separação e quantificação de compostos antociânicos

Valls *et al.* (2009) apresentaram uma revisão das técnicas avançadas de separação e identificação polifenóis que atualmente são aplicadas para análise de alimentos. Entre as técnicas levantadas, os autores sugeriram que a cromatografia líquida de alta pressão é a técnica de separação mais utilizada para analisar os polifenóis. Os autores salientam ainda que a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a cromatografia de massas proporciona maior sensibilidade para a análise de polifenóis, além de ser mais rápida e consumir menos solventes.

A primeira etapa para a quantificação das antocianinas por CLAE é a extração. Como estas são instáveis em soluções com pH neutro ou alcalino, e mesmo em soluções com pH ácido a cor pode desaparecer gradualmente quando a solução sofre exposição à luz, além disso, por serem solúveis em solventes polares, devem ser extraídas utilizando-se soluções alcoólicas de metanol ou etanol contendo ácido acético ou ácido clorídrico (Março *et al.*, 2008). O ácido empregado na solução diminui o pH, prevenindo a degradação de antocianinas não aciladas (Da Costa *et al.*, 2000). A maioria dos estudos emprega soluções alcoólicas de metanol acidificadas com HCl, no entanto, na análise de alimentos a solução de metanol deve ser substituída por etanol, devido à toxicidade deste composto (Francis, 2000). A acetona também pode ser utilizada para extrair antocianinas a partir de diversas plantas. Em comparação com metanol acidificado, o uso de acetona para a extração de antocianinas dos frutos vermelhos permite uma extração eficaz e mais reprodutível, evitando problemas com as pectinas, e permitindo uma temperatura inferior à concentração da amostra (Bobbio, 2001). Após a desintegração de quantidade adequada de amostra embebida na solução extratora, pode-se obter um extrato suficientemente concentrado que seguirá para a etapa de purificação com posterior ou não hidrólise.

Vários métodos têm sido utilizados com sucesso para a purificação dos extratos brutos de antocianinas, contudo, o método mais utilizado atualmente é a extração em fase sólida (Solid Phase Extraction, SPE) em cartuchos C₁₈ e Sephadex. Isto se deve à simplicidade relativa para eliminação das impurezas, tais como substâncias polares e não fenólicas. O procedimento para purificação das antocianinas envolve a aplicação do extrato antociânico bruto no cartucho contendo material sorvente, seguido da eluição dos componentes individuais com solventes apropriados. As antocianinas ficam fortemente ligadas aos adsorventes por seus grupos hidroxil não-substituídos. Desta forma, primeiramente são eluídas as substâncias mais polares que as antocianinas, tais como açúcares, ácidos e substâncias solúveis, e posteriormente são eluídos os pigmentos antociânicos (Molnár-Perl e Füzfai, 2005).

Para identificar e quantificar as antocianinas, individualmente, por meio da CLAE de fase reversa, o maior desafio é a disponibilidade dos padrões de referência para mais de 600 compostos já identificados, conforme Wrolstad (2000). Esta

diversidade é resultante do número de grupos hidroxila e metoxila, da natureza e do número de açúcares e de ácidos alifáticos e/ou aromáticos, bem como da localização desses compostos presentes na aglicona. No entanto, por hidrólise ácida, o número de antocianinas pode ser reduzido, gerando estruturas menos complexas, as antocianidinas. Com essa metodologia, o número de padrões necessários para a caracterização completa reduz-se a seis: cianidina, delphinidina, pelargonidina, petunidina, peonidina e malvidina.

Uma vez separadas e purificadas, as antocianinas podem ser identificadas por várias técnicas, sendo que as mais utilizadas são a espectrometria de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN 13C) e de próton (RMN 1H), e espectrometria de massas (MS), que, na maioria das vezes, aparece combinada com CLAE. Para a identificação das antocianinas em alimentos e plantas por CLAE podem ser utilizados dois procedimentos: comparação direta, quando há disponibilidade de padrões, ou comparação indireta, se não houver material padrão.

A cromatografia líquida em fase reversa é o método mais comum usado para a separação de antocianinas. A detecção é normalmente realizada utilizando um detector com arranjo de diodos (CLAE-DAD), que permite a obtenção dos espectros on-line. O espectro de absorção no UV-Visível de uma antocianina pode dar informações sobre a natureza da aglicona, padrão de glicosilação, e a possibilidade de acilação (Hong e Wrolstad, 1990b). Detectores, sem arranjo de diodo, com um único comprimento de onda também podem ser utilizados com comprimentos de onda variando entre 520 e 546 nm. Colunas C₁₈ são mais comumente usadas para a separação, mas as colunas de poliestireno também têm sido utilizadas (Giusti *et al.*, 1998; Rodriguez-Saona *et al.*, 1998). As características de separação das antocianinas nas colunas C₁₈ variam consideravelmente entre os diferentes fabricantes. Da Costa *et al.* (2000) observaram o alargamento de alguns picos entre colunas de fabricantes distintos e atribuíram a isto a interação de grupos hidroxilas livres, presentes nas antocianinas e outros compostos fenólicos, com grupos silanóis na superfície da sílica.

A separação dos compostos fenólicos de estrutura semelhante é realizada de forma mais eficaz por eluição gradiente, usando metanol ou acetonitrila como modificador orgânico. O pH do sistema de eluição é normalmente mantido abaixo de 2

por adição de uma pequena quantidade de ácido fórmico, ou ácido acético, ou trifluoroacético (Da Costa *et al.*, 2000). Segundo Wulf e Nagel (1978) 96% das antocianinas está na forma de flavílio em pH 1,5, mas apenas 67% está nesta forma em pH 2,5.

A polaridade das agliconas (antocianidinas) é o fator mais importante que afeta os tempos de retenção na CLAE. Nas condições habituais, a ordem de eluição é delfinidina e derivados, seguida pelas cianidina, petunidina, pelargonidina, peonidina e derivados e malvidina. Assim, a retenção diminui com a polaridade crescente (isto é, número crescente de grupos hidroxila no núcleo flavílio). A presença de açúcares aumenta a retenção das antocianinas, com diglucosídeos normalmente eluídos antes monoglicosídeos. A acilação também aumenta o tempo de retenção das antocianinas quando comparado com o derivado semelhante não acilados.

8.1.6 Estudos envolvendo cromatografia líquida para análise de antocianinas em frutas e derivados

As avaliações de cor e do teor de antocianinas em frutas e derivados são comercialmente importantes. As antocianinas nas frutas vermelhas variam grandemente com a espécie, o grau de maturação, a área de produção, as condições climáticas e produção de frutos. Diferenças no processo de fabricação e maturação também influenciam a quantidade e o tipo das antocianinas. Na Tabela 8.2 é apresentada uma lista de referências relacionadas à separação dos pigmentos antocianínicos em frutas e derivados.

Apesar de constar na literatura uma vasta gama de trabalhos com a caracterização das antocianinas do mirtilo, nenhum desses trabalhos apresenta uma caracterização completa em termos de antocianidinas. Em virtude disso surge a necessidade de validar um método analítico para que essa análise possa ser feita.

Tabela 8.2 Lista de referências relacionadas à separação dos pigmentos antociânicos em frutas e derivados.

Fonte de antocianina	Referência
Acerola	(Lima <i>et al.</i> , 2006; De Brito <i>et al.</i> , 2007)
Amora	(Hong e Wrolstad, 1990a; Seeram <i>et al.</i> , 2006)
Bagaço de uva	(Amico <i>et al.</i> , 2004; Kammerer <i>et al.</i> , 2004)
Camu-camu	(Zanatta <i>et al.</i> , 2005)
Empetrum (<i>crowberrie</i>)	(Koskela <i>et al.</i> , 2010)
Framboesa	(Goiffon <i>et al.</i> , 1999; Ochoa <i>et al.</i> , 1999; Tian <i>et al.</i> , 2005)
Ginja	(Goiffon <i>et al.</i> , 1999)
Groselha	(Goiffon <i>et al.</i> , 1999)
Jambolão	(De Brito <i>et al.</i> , 2007)
Mirtilo	(Goiffon <i>et al.</i> , 1999; Durst e Wrolstad, 2001; Tian <i>et al.</i> , 2005; Castrejón <i>et al.</i> , 2008; Lohachoompol <i>et al.</i> , 2008; Barnes <i>et al.</i> , 2009)
Morango	(Goiffon <i>et al.</i> , 1999; Seeram <i>et al.</i> , 2006; Tulipani <i>et al.</i> , 2008)
Oxicoco (<i>cranberry</i>)	(Prior <i>et al.</i> , 2001; Seeram <i>et al.</i> , 2006)
Suco de laranja	(Hong e Wrolstad, 1990a)
Uva	(Goiffon <i>et al.</i> , 1999; Favretto e Flamini, 2000; García-Beneytez <i>et al.</i> , 2003)
Vinhos	(Brenna e Pagliarini, 2001; García-Beneytez <i>et al.</i> , 2003)

8.2 Materiais e Métodos

8.2.1 Materiais

O bagaço utilizado foi o resíduo obtido pela extração do suco de mirtilo (*Vaccinium corymbosum* L.) pelo método enzimático (descrito no Capítulo 4). O resíduo passou por um processo de secagem a 60°C em estufa (DeLeo tipo A3, DG Temp, Brasil) com ar circulante por 48 horas. Em seguida, o bagaço contendo um teor inicial de antocianinas monoméricas de 559 mg/100 g de bagaço foi triturado em liquidificador doméstico (Twist, Walita, Brasil) e armazenado à temperatura ambiente em recipiente protegido da luz.

Para a extração das antocianinas foi utilizado o método apresentado no Capítulo 7. Neste método a 1 g de bagaço foram adicionados 10 mL de solvente (etanol:água na proporção 60:40 v/v) e o pH foi ajustado para 2,75; as amostras foram submetidas à agitação a 2500 rpm (agitador tipo *Shaker*, modelo MA563, Marconi, Brasil) durante 2 h, filtradas a vácuo e armazenadas sob refrigeração e protegidas da luz para posterior análise. O extrato foi então denominado extrato etanólico de antocianinas provenientes do bagaço de mirtilo. Esse extrato foi utilizado diretamente na etapa de hidrólise ácida.

Os reagentes utilizados para a obtenção do extrato etanólico foram de grau P.A. (para análise) e os reagentes utilizados nas etapas posteriores a extração foram de grau HPLC.

8.2.2 Identificação e Quantificação das Antocianidinas

8.2.2.1 Hidrólise Ácida

As agliconas das antocianinas do extrato etanólico foram obtidas por meio de hidrólise ácida conforme descrito por Durst e Wrolstad (2001), com algumas modificações propostas por Lima *et al.* (2006). Em tubos tipo falcon, cerca de 3 mg de extrato etanólico de antocianinas foram dissolvidas em 2-3 gotas de metanol (0,01% HCl), adicionou-se 10 mL de HCl 2M e, após aplicação de um fluxo de gás nitrogênio, os frascos foram fechados. Os pigmentos foram hidrolisados por 60 min em banho de água fervente e, então, imediatamente resfriados a 4°C.

8.2.2.2 Purificação

Uma alíquota de 3 mL do hidrolisado foi purificado pela extração em fase sólida utilizando cartuchos Sep-Pak C₁₈ (Waters), previamente ativados com metanol (0,01% HCl) seguido por água acidificada (0,01% HCl), lavados com 10 mL de água acidificada (0,01% HCl) e, por fim, as antocianidinas, foram eluídas com 5 mL de metanol acidificado (0,01% HCl). Este volume foi coletado e evaporado em fluxo de nitrogênio até que o metanol fosse removido à secura.

Antes de serem injetadas no cromatógrafo, as amostras de antocianidinas foram dissolvidas com 0,5 mL de metanol e 2 mL de ácido fosfórico 4% (em água Milli-Q) e filtradas em membranas Millipore tipo HV (Millipore Corp. Bedford, MA), de tamanho de poro nominal de 0,45 µm e 13 mm de diâmetro.

8.2.2.3 Separação e quantificação das antocianidinas

As antocianidinas foram separadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC - *High-performance liquid chromatography*) segundo metodologia descrita por Durst (2001). Esta etapa foi realizada na Central Analítica do Departamento de Engenharia Química/UFRGS, utilizando um cromatógrafo analítico PerkinElmer® série 200, equipado com desgaseificador, bomba quaternária, forno e detectores de ultravioleta-visível e de índice de refração. Todo o cromatógrafo é controlado através do software TACNAV, também responsável pela obtenção e tratamento dos dados.

A separação foi realizada com uma coluna de fase reversa C₁₈ (Brownlee Validated, RP-18, Spheri-5, PerkinElmer®, Waltham, Massachusetts, USA), de 250 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e com partículas de 5 µm de diâmetro médio, acoplada a uma coluna de guarda (Validated C₁₈, PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA) de 4 mm de comprimento e 3 mm diâmetro interno.

O volume de injeção foi de 20 µL, o comprimento de onda 520 nm e, a temperatura e a vazão controladas em 30 °C e 1 mL.min⁻¹, respectivamente. Para eluição, foi utilizada uma alimentação em gradiente formada a partir de duas soluções: solvente A (100% acetonitrila, grau HPLC) e solvente B (1% ácido fosfórico, 10% ácido acético e 5% acetonitrila (v/v), em água Milli-Q). A eluição seguiu um gradiente linear

variando de 5 a 17,8% a participação do solvente A na composição da fase móvel num intervalo de 17 min e, então, um gradiente linear para este mesmo solvente de 17,8 a 5% durante 3 min, retornando à composição inicial da fase móvel (5% solvente A e 95% solvente B).

8.2.2.4 Identificação das antocianidinas

A identificação das antocianidinas foi realizada a partir da comparação dos tempos de retenção obtidos nos cromatogramas das amostras, com os tempos de retenção dos padrões de cloretos de delphinidina, cianidina, pelargonidina e malvidina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) e cloreto de peonidina e petunidina (Extrasynthese®, Genay, França) diluídos em água MiliQ®. Todas as amostras foram injetadas pelo menos em triplicata.

8.2.3 Parâmetros Analíticos de Validação

A validação da metodologia analítica foi realizada segundo os critérios propostos pelo INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial), seguindo o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de março/2003 (INMETRO, 2003) e pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) de acordo com a Resolução ANVISA RE nº 899, de 29/05/2003 (ANVISA, 2003). Para a validação foram utilizados os seguintes parâmetros analíticos: seletividade; linearidade e faixa de aplicação; precisão; exatidão; limite de detecção e limite de quantificação conforme descritos na Seção 8.1.4 desse Capítulo e detalhados a seguir.

A faixa de trabalho foi determinada através de no mínimo três injeções com concentrações conhecidas de cada aglicona, variando de 10 em 10 mg.L⁻¹, a fim de determinar uma faixa de resposta linear do analito em relação a sua área no cromatograma. Após, identificada a faixa de trabalho, procedeu-se a escolha dos 6 pontos de concentração que seriam escolhidos para a curva de calibração. O método escolhido para a curva de calibração foi o de padronização externa com base nos padrões adquiridos da Sigma® (delphinidina, cianidina, pelargonidina e malvidina) e da Extrasynthese® (peonidina e petunidina) diluídos em água MiliQ®. Com base nos gráficos obtidos de concentração *versus* área, uma relação linear é estabelecida e o coeficiente de correlação (R^2) é determinado. Para tanto os resultados dos testes

foram analisados com o programa Statistica para Windows (versão 7.0, Statsoft®, Tulsa, USA) através de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey em um nível de 5% de significância, para comparação das médias. A partir dos dados da curva de calibração, estimou-se os parâmetros a e b da Equação 8.5 que correlacionam a área do cromatograma com a concentração em mg.L^{-1} . Como os resultados dos cromatogramas são em função das áreas, esse formato de equação foi escolhido por permitir a correlação direta da área com a concentração.

$$\text{Concentração} = a \times \text{Área} + b \quad (8.5)$$

Para o cálculo dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) uma nova estimativa, utilizando a Equação 8.6 e os dados obtidos na curva de calibração de cada aglicona, foi realizada a fim de obter os parâmetros DP_a e IC das Equações 8.1 e 8.2.

$$\text{Área} = (IC \pm DP_{IC}) \times \text{Concentração} + (a \pm DP_a) \quad (8.6)$$

Para avaliar a precisão (intra-corrída) e a precisão intermediária (inter-corrídas) do método, quatro das seis agliconas identificadas foram escolhidas em função das suas disponibilidades nas seguintes concentrações: cianidina (20 mg.L^{-1}); petunidina (20 mg.L^{-1}); peonidina (15 mg.L^{-1}) e malvidina (70 mg.L^{-1}). As amostras foram injetadas em triplicada e em três dias consecutivos, sendo o resultado da análise expresso em termos de desvio padrão relativo (DPR) calculado pela Equação 8.4.

O teste de recuperação (exatidão) foi realizado adicionando-se uma quantidade conhecida das agliconas à solução-amostra. As agliconas utilizadas nessa etapa foram as mesmas, e nas mesmas concentrações, utilizadas nos testes de precisão. Para a comparação da recuperação foram utilizadas as áreas obtidas para a aglicona (STD), para a amostra sem a adição do padrão (BCO) e para a amostra adicionada de uma concentração conhecida do padrão (BAT) e a recuperação percentual foi calculada de acordo com a Equação 8.7.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{(BAT - BCO)}{STD} \times 100 \quad (8.7)$$

8.3 Resultados e Discussão

Os resultados serão apresentados em duas etapas: a validação da metodologia analítica e a caracterização do extrato etanólico obtido a partir do bagaço de mirtilo.

8.3.1 Validação da Metodologia Analítica

8.3.1.1 Especificidade e Seletividade

A fase móvel composta de acetonitrila e solução aquosa com ácido fosfórico e ácido acético foi considerada adequada seguindo o gradiente de eluição proposto. Os picos referentes às agliconas (Figura 8.1) apresentaram-se bem definidos, sem contaminantes, e com tempo de análise relativamente curto (20 min) em relação ao descrito na literatura para o método empregando gradiente de solventes na fase móvel para antocianinas em colunas poliméricas C₁₈ (70 min) (Durst e Wrolstad, 2001). Na Figura 8.1 ainda é possível observar a seletividade do método analítico através da completa separação dos picos das diferentes agliconas. Entre os tempos de retenção de 2 a 2,5 min pode-se observar um pico característico do solvente.

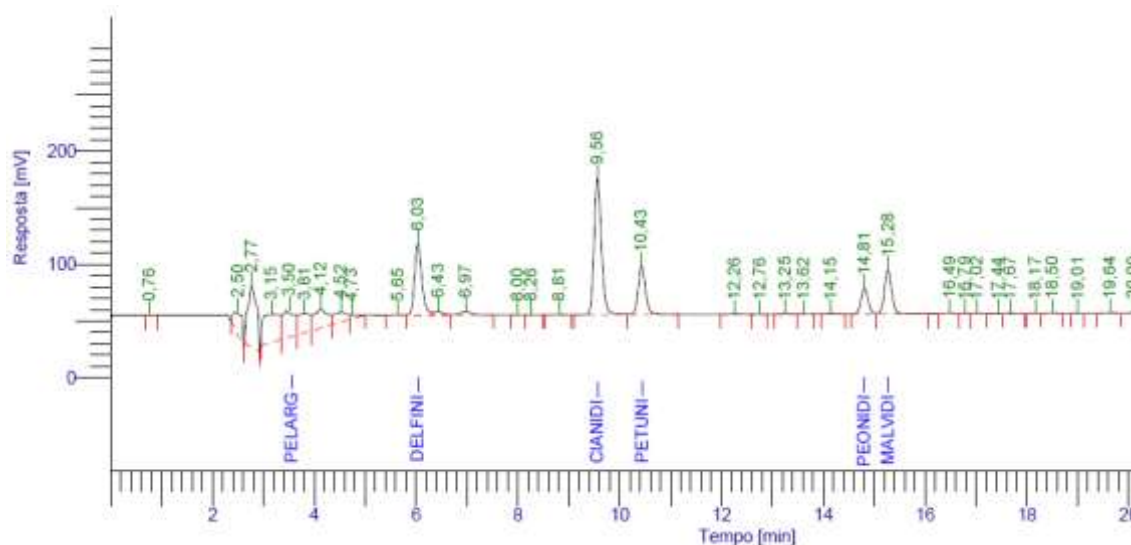


Figura 8.1 Perfil cromatográfico obtido por CLAE das antocianidinas presentes no extrato etanólico proveniente do bagaço de mirtilo. Condições cromatográficas: coluna de fase reversa RP-18, Spheri-5, PerkinElmer® (250 x 4,6 mm), acoplada a uma coluna de guarda Validated C₁₈, PerkinElmer (4 x 3 mm). Solvente A: 100% acetonitrila, grau HPLC). Solvente B: 1% ácido fosfórico, 10% ácido acético e 5% acetonitrila (v/v), em água Milli-Q. Gradiente linear variando de 5 a 17,8% a participação do solvente A na composição da fase móvel num intervalo de 17 min e, então, um gradiente linear para este mesmo solvente de 17,8 a 5% durante 3 min. Injeção de 20 µL, comprimento de onda 520 nm e a temperatura e a vazão controladas em 30 °C e 1 mL.min⁻¹, respectivamente.

Zhang *et al.* (2004) encontraram mais de 15 picos referentes à presença de antocianinas em mirtilos que, após a hidrólise ácida, foram reduzidos a cinco, identificados como delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina e malvidina, nessa ordem de eluição. No presente trabalho, analisando o perfil cromatográfico da Figura 8.1 também pode ser observado a presença de 5 picos distintos, que pela comparação com os padrões foram identificados na mesma ordem encontrada pelos referidos autores, na figura os tempos de retenção para delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina e malvidina foram 6,03, 9,56, 10,43, 14,81 e 15,28 min, respectivamente. O erro do tempo de retenção foi no máximo de 3,16%, mostrando confiabilidade das médias obtidas. Convém ressaltar que o tempo de retenção, parâmetro baseado na hidrofobicidade da molécula, é influenciado pelo grau de glicosilação e pela natureza dos açúcares presentes nesses pigmentos além das condições do cromatógrafo e das soluções utilizadas (Durst e Wrolstad, 2001).

Ainda, analisando o perfil cromatográfico apresentado na Figura 8.1 pode-se observar vários picos não identificados, de menor expressão, entre 2 e 6 min e um pico a 6,97 min. De acordo com Zhang *et al.* (2004) esses picos estariam relacionados com frações que não foram hidrolisadas completamente e com as características do próprio solvente. Porém, de acordo com Durst e Wrolstad (2001), um tempo de hidrólise muito grande pode ocasionar a degradação das antocianidinas presentes na amostra.

A ordem de eluição deve ser do composto mais simples, como a pelargonidina que apresenta hidrogênio nos radicais R₁ e R₂ (Figura 3.1), para o composto mais complexo, a malvidina, que apresenta o radical metoxi (OCH₃) nas mesmas posições R₁ e R₂ (Takeoka e Dao, 2008). Análises com o padrão de pelargonidina mostraram que a aglicona é a primeira a eluir com um tempo de retenção de 3,4±0,2 min. Resultados divergentes a este podem ser encontrados na literatura: Lima *et al.* (2006) identificaram a pelargonidina presente em morangos em um tempo de retenção de 15,16 min enquanto que petunidina eluiu em 11,47 min para uvas e peonidina em 16,02 min em mangas; Durst e Wrolstad (2001) identificaram essa aglicona em um tempo de cerca de 16 min, enquanto que a petunidina eluiu 12,8 min e a 17,25 min em morangos. Fato que deve ser destacado é que ambos os autores não utilizaram padrões externos para essa identificação e sim extratos obtidos de morangos, o qual é rico em pelargonidina. Acredita-se que o composto identificado por estes autores possa ser uma das formas glicosiladas da pelargonidina que teria um tempo de retenção maior que a aglicona pura. No entanto, como vários autores que trabalharam com mirtilos (Kader *et al.*, 1997; Su e Silva, 2006; Barnes *et al.*, 2009) e neste estudo a pelargonidina apresentou-se inexpressiva com áreas nos cromatogramas inferiores ao limite de detecção, a elucidação a essa divergência não se faz necessária no momento.

8.3.1.2 Faixa de trabalho, linearidade e curva de calibração

Na Tabela 8.3 estão apresentadas as médias das áreas dos picos de cada antocianidina em relação à sua concentração com seus respectivos desvios padrões. A partir dos dados desta tabela é possível observar que para a delphinidina uma pequena área no cromatograma corresponde a uma concentração superior a das demais agliconas. Em virtude disso a faixa de trabalho da delphinidina difere das demais.

Com base nos dados que geraram a Tabela 8.3 foi possível realizar o estudo da linearidade do método analítico por meio de uma Análise de Variância (ANOVA), verificando-se regressão linear significativa e desvio da linearidade não significativo ($p < 0,05$) com injeção de concentrações compreendidas entre 10 e 250 mg.L^{-1} , em triplicata, cujos resultados estão apresentados na Tabela 8.4. Nesta tabela é possível observar que para todas as agliconas testadas a regressão linear apresentou um bom ajuste, pois todos dos valores para o $F_{\text{calculado}}$ da regressão foram altamente significativos, ou seja, maiores que o F_{tabelado} que é 4,49. A faixa de trabalho ficou na faixa de 10 a 90 mg.L^{-1} para a pelargonidina, de 50 a 250 mg.L^{-1} para a delphinidina, de 10 a 60 mg.L^{-1} para a cianidina, petunidina e peonidina e de 50 a mg.L^{-1} para a malvidina.

Tabela 8.3 Área dos picos, expressos em mV, em relação às diferentes concentrações para cada aglicona com os seus respectivos desvios padrões.

Concentração (mg.L ⁻¹)	Pelargonidina	Delfinidina	Cianidina	Petunidina	Peonidina	Malvidina
10	873.694 ± 14.808	-	1.567.750 ± 29.500	2.491.291 ± 75.286	1.523.183 ± 30.579	-
20	1.407.831 ± 8.402	-	3.065.922 ± 33.998	4.379.838 ± 144.801	2.939.245 ± 58.015	-
30	1.899.152 ± 22.807	-	4.258.913 ± 53.199	6.651.190 ± 253.202	4.424.300 ± 94.570	-
40	-	-	5.560.499 ± 43.556	8.432.205 ± 108.727	6.190.326 ± 9.808	-
50	3.107.243 ± 45.396	471.715 ± 10.955	6.968.678 ± 76.324	10.248.744 ± 100.628	7.679.682 ± 100.511	1.591.727 ± 25.201
60	-	-	8.085.135 ± 47.902	12.479.694 ± 309.200	9.161.259 ± 309.180	2.228.437 ± 37.919
70	4.416.338 ± 91.807	-	-	-	-	2.794.693 ± 27.466
80	-	938.568 ± 25.756	-	-	-	3.390.621 ± 65.027
90	5.496.128 ± 164.761	-	-	-	-	3.923.586 ± 82.332
100	-	1.294.548 ± 48.251	-	-	-	4.527.390 ± 95.594
150	-	2.029.149 ± 57.739	-	-	-	-
200	-	2.805.117 ± 104.283	-	-	-	-
250	-	3.573.141 ± 63.397	-	-	-	-

* cada valor de área corresponde a média de, no mínimo, três repetições.

Tabela 8.4 Análise estatística da falta de ajuste e regressão linear para as diferentes antocianidinas.

Antocianidina	Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	Fcalc
Pelargonidina	Regressão Linear	4,9E+13	1	4,9E+13	5470,18
	Desvios da Regressão	1,43E+11	16	8,96E+09	
	Falta de Ajuste	6,49E+10	4	1,62E+10	2,48
	Erro Puro	7,85E+10	12	6,54E+09	
	Total	1,97E+14	18	1,1E+13	
Delfinidina	Regressão Linear	2,09E+13	1	2,09E+13	7016,15
	Desvios da Regressão	4,76E+10	16	2,97E+09	
	Falta de Ajuste	4,87E+09	4	1,22E+09	0,34
	Erro Puro	4,27E+10	12	3,56E+09	
	Total	8,26E+13	18	4,59E+12	
Cianidina	Regressão Linear	8,91E+13	1	8,91E+13	10206,14
	Desvios da Regressão	1,4E+11	16	8,73E+09	
	Falta de Ajuste	1,1E+11	4	2,75E+10	11,09
	Erro Puro	2,97E+10	12	2,48E+09	
	Total	5,25E+14	18	2,91E+13	
Petunidina	Regressão Linear	2,06E+14	1	2,06E+14	4966,64
	Desvios da Regressão	6,64E+11	16	4,15E+10	
	Falta de Ajuste	2,47E+11	4	6,18E+10	1,78
	Erro Puro	4,17E+11	12	3,47E+10	
	Total	1,2E+15	18	6,69E+13	
Peonidina	Regressão Linear	1,26E+14	1	1,26E+14	5859,49
	Desvios da Regressão	3,43E+11	16	2,15E+10	
	Falta de Ajuste	1,05E+11	4	2,64E+10	1,33
	Erro Puro	2,38E+11	12	1,98E+10	
	Total	6,36E+14	18	3,53E+13	
Malvidina	Regressão Linear	1,78E+13	1	1,78E+13	5226,44
	Desvios da Regressão	5,44E+10	16	3,4E+09	
	Falta de Ajuste	8,44E+09	4	2,11E+09	0,55
	Erro Puro	4,59E+10	12	3,83E+09	
	Total	1,88E+14	18	1,05E+13	

SQ é a Soma dos Quadrados; GL são os Graus de Liberdade; MQ são os Quadrados Médios e Fcalc é o valor de F calculado.

Uma vez que a análise de linearidade foi satisfatória foi possível determinar os parâmetros da equação geral proposta (Equação 8.5) que correlaciona a área com a concentração. Os parâmetros *a* e *b* dessa estimativa com os seus respectivos desvios

padrão e coeficientes de correlação (R^2) estão apresentados na Tabela 8.5. Os resultados apresentados nesta tabela mostram uma relação satisfatória entre as concentrações e as áreas dos picos, pois o valor de R^2 foi superior a 0,99 para todas antocianidinas analisadas. Estes valores mostram que a linearidade das retas está de acordo com a requisição da legislação brasileira para validação de metodologia analítica que requer valores de R^2 superior a 0,99 (ANVISA, 2003).

Tabela 8.5 Estimação dos parâmetros a e b da Equação 8.5 com os seus respectivos desvios padrão e coeficientes de correlação (R^2) para as diferentes antocianidinas.

Antocianidina	a^*	b	R^2
Pelargonidina	1,70E-05	-3,78 ± 0,76	0,997
Delfinidina	6,45E-05	18,81 ± 1,65	0,998
Cianidina	7,66E-06	-2,69 ± 0,41	0,998
Petunidina	5,03E-06	-2,48 ± 0,58	0,997
Peonidina	6,44E-06	0,73 ± 0,50	0,997
Malvidina	1,71E-05	22,28 ± 0,77	0,997

*Os desvios foram inferiores a 0,01E-5.

8.3.1.3 Limites de Detecção e Quantificação

Com os dados provenientes da avaliação da linearidade foram calculados os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), através das Equações 8.1 e 8.2, respectivamente, os quais estão apresentados na Tabela 8.6. Os valores obtidos para o limite de detecção e quantificação variaram de 1,16 a 5,55 mg.L^{-1} e de 3,85 a 18,49 mg.L^{-1} para a cianidina e delfinidina, respectivamente. Todos os valores encontrados para LD e LQ encontram-se abaixo das concentrações testadas indicando que a faixa de valores testada é válida e pode ser utilizada para a quantificação das antocianidinas em geral. Ramirez (2008) utilizando CLAE para determinação de cianidina obteve limites de detecção e quantificação inferiores (0,026 e 0,079 mg.L^{-1}), porém a fase móvel utilizada em seu estudo era constituída de acetonitrila, água e TFA e sem gradiente de eluição. Porém, neste estudo, para a completa separação das 6 agliconas, o gradiente de eluição se fez necessário.

Tabela 8.6 Estimação dos parâmetros DPa e IC da Equação 8.6 e valores de limites de detecção e quantificação do método analítico para as diferentes antocianidinas. DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de 3 pontos de calibração e IC é a inclinação da curva de calibração (área versus concentração).

Antocianidina	DPa	IC	Limite de Detecção (mg.L ⁻¹)	Limite de Quantificação (mg.L ⁻¹)
Pelargonidina	42087	58651	2,15	7,18
Delfinidina	28583	15460	5,55	18,49
Cianidina	50220	130277	1,16	3,85
Petunidina	109462	198085	1,66	5,53
Peonidina	78753	154793	1,53	5,09
Malvidina	61893	58171	3,19	10,64

8.3.1.4 Precisão (intra-corrída) e a precisão intermediária (inter-corrídas)

Os resultados de repetibilidade (precisão intra-corrída) e precisão intermediária (inter-corrídas) foram expressos em termos dos desvios padrão relativos (DPR) e estão apresentados na Tabela 8.7. A repetibilidade das áreas, para um mesmo dia, apresentou DPR máximo de 4,24% para a peonidina enquanto que a repetibilidade do tempo de eluição apresentou DPR máximo de 1,87% para a cianidina. Ao analisar a repetibilidade das áreas para os demais dias observa-se que, dentro de cada dia, todos os resultados mostram valores menores que 5%, tolerância máxima de precisão estabelecida pela Legislação Brasileira (ANVISA, 2003), com base neste resultado considerou-se o método analítico para a separação e quantificação das antocianidinas preciso.

A precisão intermediária obtida apresentada na Tabela 8.7 foi avaliada em três dias consecutivos, com amostras de mesma concentração. Os valores de DPR foram inferiores a 5,78% entre os diferentes dias, demonstrando repetibilidade e precisão intermediária adequadas para o método analítico em questão. De acordo com Lohachoompol *et al.* (2008) um limite de 5 a 10% é geralmente aceito para este tipo de análise, devido à complexidade da metodologia de extração. Nesta tabela pode-se observar que houve um deslocamento dos picos, ou seja, um aumento no tempo de

retenção entre os dias 1, 2 e 3 que pode estar relacionado com a diminuição da solubilidade do analito no eluente com o passar dos dias (Hanai, 1999).

Tabela 8.7 Valores de desvio padrão relativo à avaliação da precisão intermediária e da repetibilidade do método analítico para as diferentes antocianidinas.

	Padrão	Cianidina		Petunidina		Peonidina		Malvidina	
		t	A	t	A	t	A	t	A
dia 1	Média	9,32	2.581.752	10,39	4.207.268	14,80	1.522.114	15,49	2.348.864
	Desvio	0,17	57.147	0,16	48.884	0,15	64.589	0,16	90.636
	DPR	1,87%	2,21%	1,53%	1,16%	1,01%	4,24%	1,05%	3,86%
dia 2	Média	9,56	2.484.273	10,56	4.398.384	15,01	1.708.831	15,64	2.434.202
	Desvio	0,25	93.632	0,19	66.875	0,15	33.697	0,15	57.393
	DPR	2,59%	3,77%	1,84%	1,52%	1,03%	1,97%	0,98%	2,36%
dia 3	Média	9,96	2.322.081	11,02	3.989.786	15,53	1.618.212	16,15	2.303.766
	Desvio	0,04	81.951	0,04	142.137	0,04	71.799	0,03	86.237
	DPR	0,44%	3,53%	0,36%	3,56%	0,23%	4,44%	0,18%	3,74%
	DPR - áreas		5,33%		4,87%		5,78%		2,80%
	DPR - tempo		3,36%		3,04%		2,48%		2,18%

t = tempo (min) e A = área do cromatograma (mV)

8.3.1.5 Testes de Recuperação (exatidão)

No que diz respeito à exatidão, conforme os dados mostrados na Tabela 8.8, o método permitiu a recuperação de cerca de 80% para a cianidina e peonidina e valores superiores a 95% para a petunidina e malvidina, o que caracteriza o método como exato, segundo os preceitos da *International Conference on Harmonization* (ICH, 1996).

Tabela 8.8 Valores de desvio padrão relativo (*DPR*) das áreas (mV) e de recuperação (%) para as diferentes agliconas a fim de avaliar a exatidão do método analítico.

	Cianidina	Petunidina	Peonidina	Malvidina
Média <i>STD</i>	2.612.066	5.037.512	2.371.010	3.203.898
Desvio	76.504	145.110	82.465	113.410
<i>DPR</i>	2,93%	2,88%	3,48%	3,54%
Média <i>BCO</i>	2.581.586	1.623.564	964.467	3.106.107
Desvio	74.454	75.618	39.633	58.113
<i>DPR</i>	2,88%	4,66%	4,11%	1,87%
Média <i>BAT</i>	4.657.739	6.404.529	2.846.578	6.190.334
Desvio	137.511	164.158	78.352	69.051
<i>DPR</i>	2,95%	2,56%	2,75%	1,12%
Recuperação (%)	79%	95%	79%	96%

STD são as áreas obtidas para a solução padrão da aglicona, *BCO* é a amostra sem a adição do padrão e *BAT* é a amostra adicionada de uma concentração conhecida do padrão (*STD*).

8.3.2 Caracterização do extrato etanólico obtido a partir do bagaço de mirtilo

O mirtilo apresenta um alto teor de compostos antociânicos, substâncias com poder antioxidante que vem sendo associados a uma série de benefícios para a saúde. A redução das antocianinas em antocianidinas, por meio de uma hidrólise ácida, possibilita a completa caracterização da amostra. O presente estudo mostrou que o bagaço do mirtilo é rico em antocianinas e concentra cerca de 70% das antocianinas do fruto (Capítulo 7) e a completa caracterização desse subproduto ainda não foi apresentada na literatura.

A partir do presente método validado, que revelou apresentar boa seletividade, precisão e exatidão, foi possível identificar e quantificar seis diferentes tipos de antocianidinas: a pelargonidina, delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina e a malvidina, nessa ordem de eluição.

Na Tabela 8.9 são apresentados os resultados obtidos para as áreas e concentrações das diferentes agliconas. Nesta tabela é possível observar que a maior área no cromatograma é gerada pela cianidina (39%), o que vai ao encontro aos

estudos de Ramirez (2008), porém, a maior concentração está associada à delphinidina, cerca de 70% do teor total de antocianidina do extrato. Este resultado está associado ao fato de que o fator de resposta para essa aglicona é maior que para as demais, como comprovado durante a realização dos testes para a determinação das curvas padrão. Ainda, observa-se que o teor identificado para todas as agliconas foi superior ao limite de quantificação, com exceção da petunidina cujo valor encontra-se próximo ao limite inferior.

Tabela 8.9 Caracterização e quantificação das antocianidinas do extrato etanólico obtido a partir do bagaço de mirtilo.

	Área (mV)	Concentração (mg.L ⁻¹)
Pelargonidina	568.720 ± 13.291	11,77 ± 0,45
Delfinidina	2.255.259 ± 24.885	328,71 ± 3,21
Cianidina	3.129.199 ± 33.779	42,58 ± 0,52
Petunidina	1.019.499 ± 13.289	5,31 ± 0,13
Peonidina	394.276 ± 5.358	6,54 ± 0,07
Malvidina	737.447 ± 10.815	69,84 ± 0,37

Segundo os estudos de Kader *et al.* (1996), a delphinidina seguida da malvidina glicosiladas também apresentam grandes concentrações nos frutos de mirtilo e a delphinidina 3-monogalactosídeo é majoritária.

Skrede *et al.* (2000) identificaram as antocianinas em mirtilos do grupo *highbush* como malvidina 3-galactosídeo (20,2%), malvidina 3-arabnosídeo (13,5%), delphinidina 3-galactosídeo (12,3%), delphinidina 3-arabnosídeo + cianidina 3-galactosídeo (12,0%), malvidina 3-glicosídeo (10,6%), petunidina 3-galactosídeo (9,1%), petunidina 3-glicosídeo (7,2%), petunidina 3-arabnosídeo (6,3%) e delphinidina 3-glicosídeo (5,4%).

Prior *et al.* (2001) verificaram mais de 16 antocianinas individuais em mirtilos: malvidina 3-galactosídeo (14,4%), malvidina 3-glicosídeo (14,1%), petunidina 3-glicosídeo (10,7%), delphinidina 3-glicosídeo (7,8%) e delphinidina 3-galactosídeo (7,7%) em mirtilos do grupo *lowbush*.

Cho *et al.* (2004) encontraram 14 diferentes antocianinas e três antocianidinas em cinco genótipos de mirtilo. Eles afirmaram que a delphinidina (27,1 a 40,4%), malvidina (22,1 a 32,9%) e petunidina (18,9 a 26,2%) foram as antocianidinas predominantes, seguidas da cianidina (5,7 a 14,0%) e peonidina (1,4 a 4,5%).

Uma das principais características das antocianidinas com substituições hidroxilas (OH) nos radicais R_1 e/ou R_2 do anel B (da Figura 3.1) como o caso da cianidina, delphinidina e petunidina, é a sua capacidade de formar complexos com os íons metálicos (Boulton, 2001). Alguns estudos sobre a estabilidade de cor em plantas, sugerem que as cores azul são devido a uma complexação entre antocianinas e alguns metais como Al, Fe, Cu e Sn (Starr e Francis, 1973) ou Mg e Mo (Hale *et al.*, 2001). Na presença desses íons as antocianinas formam produtos insolúveis que, no caso do alumínio, encontram aplicações como corantes que apresentam estabilidade ao calor, pH e oxigênio superior à das antocianinas livres (Março *et al.*, 2008). Fatores como este indicam que o uso do extrato etanólico, rico em antocianinas, obtidos nesse estudo é um insumo potencial para aplicação como corante natural pela indústria de alimentos.

8.4 Conclusões

Neste trabalho foi desenvolvido e validado um método analítico para a caracterização do extrato etanólico rico em antocianidinas obtido a partir do bagaço de mirtilo.

A metodologia analítica proposta para detecção e quantificação das antocianidinas por CLAE mostrou-se sensível, precisa e linear na faixa de concentrações estudada, sendo adequada para avaliação de antocianidinas em extratos alimentícios assim como no corante natural obtido do bagaço de mirtilo.

Além disso, a metodologia escolhida que envolve a redução das antocianinas, por meio de uma hidrólise ácida, a antocianidinas foi capaz de reduzir o número de compostos a serem identificados para apenas seis, proporcionando uma caracterização completa do extrato.

Em relação à seletividade do método os picos referentes às agliconas testadas apresentaram-se bem definidos, separados e sem contaminantes, e com tempo de análise relativamente curto (20 min) sendo que a ordem de eluição encontrada foi: pelargonidina, delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina e malvidina.

Os testes de linearidade e faixa de trabalho mostraram que a regressão linear apresentou um bom ajuste, com valores para o $F_{\text{calculado}}$ altamente significativos, e que a faixa de trabalho ficou entre 10 e 90 mg.L⁻¹ para a pelargonidina, 50 e 250 mg.L⁻¹ para a delphinidina, 10 e 60 mg.L⁻¹ para a cianidina, petunidina e peonidina e entre 50 e 100 mg.L⁻¹ para a malvidina. Com base nas curvas padrão obtidas foi possível obter as equações que correlacionam diretamente a área obtida no cromatograma com a concentração da aglicona no extrato, dentro da faixa de trabalho estudada.

Para o extrato etanólico obtido do bagaço de mirtilo observou-se que a maior área no cromatograma foi gerada pela cianidina (39%), porém, a maior concentração está associada à delphinidina, cerca de 70% do teor total de antocianidina do extrato. Devido à capacidade das antocianinas de formar complexos com os íons metálicos estabilizando a propriedade de cor, os extratos com elevados teores desses compostos apresentam-se como um corante natural potencial a ser utilizado pela indústria de alimentos.

Capítulo 9

Micropartículas Ricas em Antocianinas Extraídas do Bagaço de Mirtilo por Liofilização

No Capítulo 7 obteve-se um extrato etanólico a partir do bagaço de mirtilo rico em antocianinas. Em relação à aplicação desse extrato em alimentos, o principal problema a ser enfrentado é a sensibilidade das antocianinas (principalmente frente ao calor, luz e oxigênio) o que limita seu uso como agente funcional em alimentos ou como constituinte de formulações farmacêuticas. Entre os principais fatores relacionados com a instabilidade das antocianinas durante o processamento de sucos podem ser citados aqueles associados à composição inicial da fruta, tal como o tipo de antocianina e estrutura química, o pH, a temperatura, a luz, a presença de oxigênio, a degradação enzimática e as interações entre os componentes dos alimentos, tais como ácido ascórbico, íons metálicos, açúcares e copigmentos. Nesse sentido, a fim de preservar as antocianinas destes extratos, a microencapsulação representa um método econômico para a preservação de antocianinas presentes no extrato de mirtilo, promovendo a encapsulação do composto bioativo em um material de revestimento. Este processo consiste no empacotamento de materiais sólidos, líquidos ou gasosos em cápsulas extremamente pequenas, as quais podem liberar o conteúdo de forma controlada e sob condições específicas.

A antocianina encapsulada pode apresentar aplicabilidade em diferentes alimentos, podendo atuar como substância funcional, aditivo e corante natural, melhorar a qualidade nutricional, preservar ou mascarar cor, entre outras aplicações.

Em virtude desta gama de aplicações, o objetivo desse capítulo foi obter um corante natural mais estável que viabilize o uso desse extrato tanto pela indústria de alimentos quanto para outras indústrias como a farmacêutica. Para tanto foram testados três diferentes agentes encapsulantes: maltodextrina (MD), caboximetilcelulose (CMC) e hidroximetilpropilcelulose (HPMC).

9.1 Fundamentos Teóricos e Revisão Bibliográfica

Nesta seção são apresentados os seguintes temas: conceito de microencapsulação de alimentos, agentes encapsulantes, alternativas de microencapsulação por secagem, metodologias para a caracterização das micropartículas e avaliação da sua fotoestabilidade.

9.1.1 Microencapsulação de Alimentos

A encapsulação envolve a incorporação de ingredientes alimentícios, enzimas, células ou outros materiais, denominados núcleo, em pequenas cápsulas (Gibbs *et al.*, 1999). O conceito de microcápsula surgiu da idealização do modelo celular; neste, a membrana que envolve e protege o citoplasma e os demais componentes exerce ao mesmo tempo outras funções, como controlar a entrada e saída de material na célula. De modo semelhante, uma microcápsula consiste, em geral, em uma camada de polímero que atua como um filme protetor, isolando a substância ativa e evitando os efeitos de sua exposição inadequada (Suave *et al.*, 2006).

O principal objetivo da encapsulação é proteger o material do núcleo de condições ambientais adversas, tais como os efeitos indesejáveis da luz, umidade e oxigênio, contribuindo assim para um aumento da vida útil do produto podendo promover, além disto, uma liberação controlada do núcleo no organismo (Shahidi e Han, 1993). Na indústria alimentícia, o processo de microencapsulação pode ser aplicado para diversos fins, podendo-se citar: *i)* proteger o material do núcleo da degradação por reduzir a sua reatividade com o ambiente externo retardando alterações que possam resultar em perda de sabor, aroma, cor ou perda do valor nutricional; *ii)* reduzir a evaporação ou a taxa de migração do material do núcleo para o ambiente externo, promovendo melhor dissolução do núcleo e melhor incorporação

em sistemas secos; *iii*) modificar as características físicas do material original para facilitar o processamento, tais como dissolução em diferentes pHs e temperaturas; *iv*) adaptar a liberação do material do núcleo lentamente ao longo do tempo, ou em um determinado momento; *v*) mascarar um sabor indesejado ou gosto do núcleo encapsulado; *vi*) diluir o material do núcleo, quando apenas pequenas quantidades são necessárias; *vii*) separar os componentes reativos ou incompatíveis (Shahidi e Han, 1993; Gibbs *et al.*, 1999; Desai *et al.*, 2005; Fang e Bhandari, 2010), entre outras.

Vários autores têm observado os efeitos positivos das técnicas de microencapsulação sobre a estabilidade de compostos suscetíveis à degradação química, podendo-se destacar as antocianinas (Chandra *et al.*, 1993; Gradinaru *et al.*, 2003; Ersus e Yurdagel, 2007; Osorio *et al.*, 2010; Tonon *et al.*, 2010) e o ácido ascórbico (Kirby *et al.*, 1991; Trindade e Grosso, 2000; Lee *et al.*, 2004). Esses efeitos dependem de vários fatores, como o tipo de núcleo, a escolha do agente encapsulante ou material de parede, tecnologia de encapsulação adotada, o alimento onde essa microcápsula será aplicada, as propriedades físicas e químicas do núcleo (porosidade e solubilidade) e da parede (viscosidade, propriedades mecânicas, transição vítrea e capacidade de formação de filme), compatibilidade do núcleo com a parede, e fatores econômicos (Brazel, 1999; Azeredo, 2005).

9.1.2 Agentes Microencapsulantes

Um dos principais fatores que influenciam a estabilidade de compostos encapsulados é a natureza do material encapsulante (Rosenberg *et al.*, 1990). Os principais requisitos de um bom agente encapsulante são: fácil manipulação durante o processo; baixa higroscopicidade, para facilitar a manipulação e evitar aglomeração; baixa viscosidade a altas concentrações de sólidos; habilidade para dispersar ou emulsificar e estabilizar o material do núcleo; não reatividade com o núcleo; boas propriedades de formação de filme; liberação completa do solvente ou outros materiais utilizados durante o processo de encapsulação; máxima proteção ao núcleo contra condições adversas, como luz, pH e oxigênio; solubilidade em solventes comumente utilizados; fácil reconstituição; ausência de sabor ou odor desagradável e finalmente, baixo custo (Cardello e Celestino, 1996; Shahidi, 1997; Azeredo, 2005).

Dentre os materiais que podem ser utilizados como agentes encapsulantes destacam-se: os hidrocolóides como a goma arábica, ágar, pectina, polipectato, alginato e carragena; os carboidratos, amidos modificados, dextrinas e sacarose; os derivados de celulose tais como metil e etil-celulose, carboximetilcelulose (CMC), hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), acetilcelulose e nitrocelulose; os lipídios parafina, mono e diacilgliceróis, óleos e gorduras, ácido láurico, cáprico, ácido palmítico e esteárico, e seus sais; os materiais inorgânicos sulfato de cálcio e silicatos; as proteínas do glúten, caseína, gelatina, proteína de soja e albumina; e as ceras hidrofílicas ou lipofílicas como a goma laca, cera de PEG (polietileno glicol), carnaúba ou de abelha (Shahidi e Han, 1993; Gibbs *et al.*, 1999; Gunasekaran *et al.*, 2007; Fang e Bhandari, 2010).

As maltodextrinas são largamente usadas para a encapsulação de aromas e, recentemente, para compostos fenólicos (Bhandari *et al.*, 1999; Fang e Bhandari, 2010). São materiais solúveis em água e protegem o ingrediente encapsulado da oxidação (Shahidi e Han, 1993), têm baixa viscosidade quando em meios com alto teor de sólidos e são disponíveis comercialmente em diferentes pesos moleculares, o que pode conferir diferentes densidades de parede (Cai e Corke, 2000; Ersus e Yurdagel, 2007). Zhang *et al.* (2007) usou uma mistura de maltodextrina (60%) e goma arábica (40%) para a encapsulação de procianidinas das sementes da uva e a eficiência de encapsulação foi superior a 88%, protegendo a procianidina durante a secagem e melhorando a estabilidade do produto. Tonon *et al.* (2010) avaliaram como material de parede para a encapsulação de antocianinas do suco de açaí diferentes maltodextrinas (10 e 20 DE), goma arábica e amido de tapioca. Os melhores resultados para a estabilidade das antocianinas durante o armazenamento foram obtidos para as amostras produzidas com a Maltodextrina 10 DE seguido da goma arábica.

Goma arábica ou acácia é um hidrocolóide produzido pela exudação natural das árvores de acácia e é um agente de encapsulação eficaz devido à sua alta dissolução em água, a baixa viscosidade das soluções concentradas em relação a outros hidrocolóides, boas propriedades emulsificantes, sabor suave e alta estabilidade oxidativa conferida a óleos (Mcnamee *et al.*, 1998). Por outro lado, tem alto custo e problemas de disponibilidade, já que é produzida em regiões sujeitas a variações climáticas imprevisíveis e conflitos políticos, o que pode comprometer sua oferta

(Mcnamee *et al.*, 1998). Assim, a busca por substitutos totais ou parciais para a goma arábica tem sido incentivada.

Neste trabalho, além da maltodextrina, foram selecionadas duas celulosas modificadas: CMC e HPMC como agente encapsulante (Uddin *et al.*, 2001; Pierucci *et al.*, 2006; Liu e Liu, 2009; Singh *et al.*, 2009). O CMC tem sido produzido comercialmente desde o início da década de 1920 e tem sido aplicado em muitas áreas, especialmente devido à sua biodegradabilidade e por não ser tóxico. Na indústria de alimentos vem sendo utilizado como agente de corpo, espessante, estabilizador de emulsão, agente de suspensão e como um meio para melhorar a textura. Pierucci *et al.* (2007) mostrou que a retenção do tocoferol foi superior a 96% quando utilizaram o CMC associado à maltodextrina como agente de parede.

O HPMC é um polímero de boa solubilidade em água, grande capacidade emulsificante e de parede e, devido a isso, tem sido utilizado como agente encapsulante. A solução de HPMC pode formar coacervados devido à diminuição da solubilidade, quando se acrescenta uma substância de melhor solubilidade em água. Como a maltodextrina é um hidrolisado de amido com melhor solubilidade que HPMC e, conseqüentemente, a sua dissolução em uma emulsão com HPMC causa desidratação, as gotas de concentração de HPMC e coacervação, seguida de óleo na emulsão são envoltas por coacervados de HPMC e micropartículas são formadas (Dobetti e Pantaleo, 2002). Wu *et al.* (2005) elaboraram micropartículas de óleo de peixe para maltodextrina (10 DE), 5% de HPMC e 40% de óleo de peixe.

9.1.3 Principais Métodos de Encapsulação

Vários métodos são utilizados para a encapsulação. Em geral, três etapas são envolvidas na encapsulação de agentes bioativos: *i*) preparação de uma dispersão a fim de formar uma parede em torno do material a ser encapsulado; *ii*) homogeneização para certificação de que não ocorrerá vazamentos indesejados do composto bioativo; e *iii*) secagem para assegurar que os materiais indesejados são mantidos fora da cápsula (Gibbs *et al.*, 1999; Madene *et al.*, 2006; Mozafari *et al.*, 2008). Os métodos atuais de encapsulação incluem atomização, extrusão, fluidização, coacervação, lipossomas, inclusão molecular, separação centrífuga, liofilização, criocristalização, adsorção e emulsão (Gibbs *et al.*, 1999; Azeredo, 2005; Augustin e

Hemar, 2009; Fang e Bhandari, 2010). Para a encapsulação de corantes e compostos fenólicos, o *spray drying* é método mais utilizado pela indústria (Madene *et al.*, 2006). Porém, a liofilização aparece como uma técnica promissora, pois não envolve altas temperaturas e tende a apresentar uma menor degradação dos nutrientes. As principais aplicações da liofilização para a encapsulação de compostos fenólicos, em especial antocianinas, são apresentadas na Tabela 9.1.

Tabela 9.1 Aplicações da microencapsulação por liofilização indústria de alimentos.

Agente Encapsulante	Composto Bioativo	Referência
Maltodextrina	Carotenóides, antocianinas e betalainas	(Delgado-Vargas <i>et al.</i> , 2000)
Maltodextrina	Polifenóis de amora-branca silvestre (Cloudberry)	(Laine <i>et al.</i> , 2008)
Polisacarídeo (Pullulan)	Antocianinas de extrato de quiabo-roxo (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.)	(Gradinaru <i>et al.</i> , 2003)

Como o processo adotado nesse estudo foi a liofilização, uma abordagem mais detalhada desse processo segue. A liofilização é um processo utilizado para a desidratação de quase todos os materiais sensíveis ao calor como corantes e aromas. O processo consiste em congelar a água disponível no material e, em seguida, com temperatura e pressão controlados, permitir que essa água sublime diretamente da fase sólida para a fase gasosa, geralmente resultando em formas irregulares como mostra a Figura 9.1. Esse método gera produtos de excelente qualidade, uma vez que minimiza as alterações associadas a altas temperaturas. De fato, Desobry *et al.* (1997) observaram que a encapsulação por liofilização resultou em menor degradação de beta-caroteno durante o processo (8%), quando comparada à atomização (11%) e à secagem em tambor (14%). Por outro lado, seu alto custo e longo tempo de processo (geralmente 20 horas) prejudicam sua aplicabilidade comercial (Azeredo, 2005).

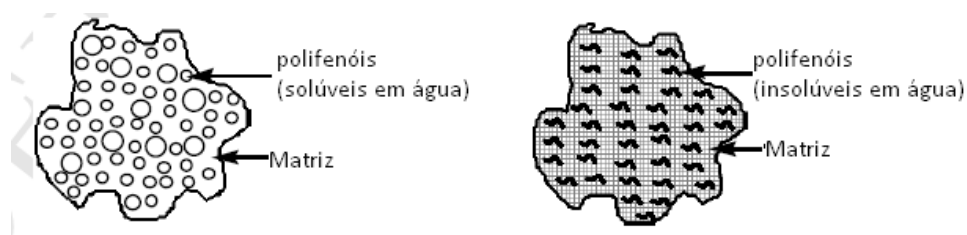


Figura 9.1 Ilustração da característica morfológica das partículas de polifenólicos produzidos por liofilização. **Fonte:** adaptado de (Fang e Bhandari, 2010).

As principais vantagens oferecidas por esse método são: manutenção da forma original, manutenção do valor nutritivo, manutenção das características sensoriais e redução de processos indesejáveis tais como desnaturação protéica, perda de compostos voláteis, formação de camadas duras e impermeáveis, migração de sólidos solúveis para a superfície durante a secagem e dificuldade de reidratação (Martins, 2000).

9.1.4 Caracterização das Micropartículas

A otimização das propriedades das micropartículas é de grande importância para o desenvolvimento de produtos. Em geral, as principais técnicas de caracterização utilizadas para este propósito são: avaliação morfológica via microscopia óptica e eletrônica – para avaliar a estrutura geral, externa e interna; análise térmica de calorimetria exploratória diferencial (DSC) – para avaliar a estrutura fina e a interação da casca com o núcleo; análise de tamanho de partículas – para avaliar o tamanho e distribuição das partículas; testes de fotoestabilidade; e, testes de dissolução em água, permeabilidade, bem como a estabilidade mecânica, incluindo a elasticidade e compressão (Rosiski *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2005; Favaro-Trindade *et al.*, 2008).

9.1.4.1 Avaliação morfológica

As microscopias eletrônicas de varredura (MEV) ou de transmissão (MET) têm sido muito empregadas na obtenção de informações relativas à estrutura interna e externa das micropartículas, a forma e ao tamanho das micropartículas (Horisawa *et al.*, 2002). Muitas das propriedades de um sistema microparticulado é resultado de sua estrutura. A retenção de materiais voláteis (aroma) e a proteção destes materiais em um produto microparticulado estão relacionados com a porosidade e o grau de integridade das micropartículas (Rosenberg *et al.*, 1985). A MET pode permitir também a diferenciação entre micropartículas e microesferas, possibilitando, inclusive, a determinação da espessura da parede das partículas (Mosqueira *et al.*, 2000).

Um exemplo de aplicação dessa técnica é o trabalho de Saénz e colaboradores (2009) que verificaram a morfologia das micropartículas de betalaínas de extrato etanólico de opuntia com maltodextrina. A Figura 9.2 (a) mostra a fotografia das micropartículas identificando um formato esférico e irregular. Morfologia semelhante

foi observada em micropartículas de antocianinas de extrato dos frutos da palmeira de bactris – Figura 9.2 (b) (Osorio *et al.*, 2010). No entanto, as esferas lisas foram observadas em microcápsulas de antocianinas extrato de cenoura preta com maltodextrina – Figura 9.2 (c) (Ersus e Yurdagel, 2007).

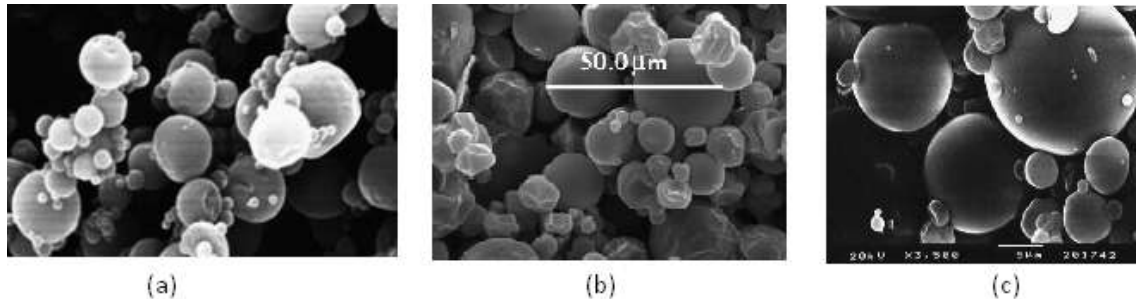


Figura 9.2 Micrografias de micropartículas de (a) extrato de betalaínas de opuntia com maltodextrina (Saézn *et al.*, 2009); (b) extrato dos frutos de pupunha com maltodextrina (Osorio *et al.*, 2010); e (c) extrato de cenoura preta com maltodextrina (Ersus e Yurdagel, 2007).

Ainda, Man *et al.* (1999) compararam o tipo de processo de secagem na estrutura dos grânulos de pó. Os autores compararam a atomização e a liofilização para a microencapsulação do suco de durio (*Durio zibethinus Murr*) com maltodextrina. Na Figura 9.3 observa-se a estrutura obtida por eles para os dois diferentes processos: os pós obtidos por atomização apresentam estrutura mais esférica, enquanto os pós obtidos por liofilização apresentam-se irregulares.

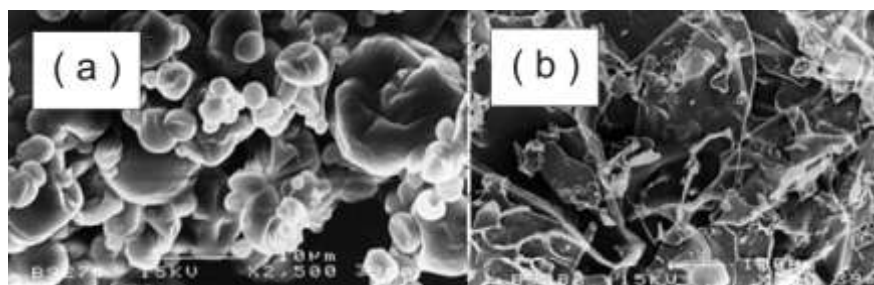


Figura 9.3 Micrografias de micropartículas de suco de durio (*Durio zibethinus Murr*) com maltodextrina secos por: (a) atomização e (b) liofilização. **Fonte:** (Man *et al.*, 1999).

9.1.4.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Os métodos termo-analíticos, tais como calorimetria exploratória diferencial (DSC), são de grande utilidade para a caracterização de micropartículas, e têm sido

utilizados também para investigar interações entre os agentes encapsulantes e o compostos bioativos diversas formulações (Calvo *et al.*, 1997). Análises através de DSC têm sido utilizadas também para estudar as interações intermoleculares entre os compostos bioativos e agentes encapsulantes (Parize *et al.*, 2008), sendo de grande utilidade em estudos de pré-formulação, na medida em que podem ser obtidas informações sobre potenciais incompatibilidades físicas ou químicas entre eles (Venkataram *et al.*, 1995). Também é possível investigar reações químicas, como polimerização, depolimerização e degradação.

9.1.4.3 Distribuição de tamanho de partícula

Normalmente determina-se a distribuição do tamanho de partícula por difratometria laser após dispersão com água. De uma forma geral, as micropartículas obtidas através de diferentes métodos, após a preparação, apresentam uma distribuição unimodal, com um baixo índice de polidispersão (Avgoustakis *et al.*, 2002). A composição quali-quantitativa e o método de preparação das micropartículas são fatores determinantes do diâmetro médio e da polidispersão das partículas.

Segundo Ravi Kumar (2000), micropartículas podem ser definidas como partículas esféricas com tamanho entre 50 nm e 2 mm contendo uma substância como núcleo. O tamanho das partículas produzidas por atomização e coacervação, é de 5 a 150 e 1 a 500 μm , respectivamente (Desai *et al.*, 2005; Madene *et al.*, 2006; Favaro-Trindade *et al.*, 2008). Desobry e colaboradores (1997) encapsularam o beta-caroteno com maltodextrina e o tamanho de partícula obtido pelo processo de liofilização foi maior do que pelo processo de atomização. Ainda, é importante mencionar que a tendência à agregação e sedimentação das micropartículas, em função do tempo, pode ser monitorada pela determinação de mudanças na distribuição de tamanho de partículas (Guterres *et al.*, 1995).

9.1.4.4 Fotoestabilidade

A fotodegradação de corantes no estado sólido depende da superfície das partículas, do seu tamanho, estrutura cristalina e do polimorfismo (Tonnesen, 2006).

Só a radiação absorvida participa de fotodegradação e da diluição do ativo, bem como o agente encapsulante pode afetar a fotoestabilidade (Glass *et al.*, 2004).

Bakowska *et al.* (2003) investigou a influência da radiação UV, durante 3 meses de armazenamento (na presença e ausência de luz) sobre a fotoestabilidade de antocianinas. A irradiação UV teve um efeito mais forte de degradação da cor do que a luz solar direta, determinando a instabilidade do pigmento de antocianinas durante o armazenamento. Prentice-Hernández e Rusig (1999), por sua vez, verificou que a bixina presente no extrato microparticulado apresentou-se mais estável à luz que a bixina do extrato purificado. Ainda, Provenzi *et al.* (2006) avaliaram a influência da β - e γ -ciclodextrinas (CD) sobre a estabilidade de antocianinas extraídas da casca de uvas Cabernet Sauvignon, sob presença e ausência de luz e de nitrogênio. As amostras de antocianinas adicionadas de γ -CD apresentaram maior estabilidade da cor, refletindo valores de tempo de meia vida superiores quando comparadas às demais amostras.

9.1.4.5 Testes de Dissolução em Água

A diferença nas formas (amorfa ou cristalina) das micropartículas afeta diretamente no tamanho e forma das partículas, densidade, propriedades físico-químicas, estabilidade química, dissolução em água, higroscopicidade, propriedades de fluxo e compactibilidade (Sun e Grant, 2001). O estado amorfo de um pó sólido pode alterar a biodisponibilidade de um composto bioativo pouco solúvel em água devido a mudanças na dissolução e, portanto, a absorção do mesmo no trato gastrointestinal (Gombás *et al.*, 2003). Em geral, sólidos amorfos têm maior dissolução e as vezes melhores características de compressão que seus cristais correspondentes (Yu, 2001). Gombás *et al.* (2003) mostraram em seus estudos que a adição de celulosas modificadas tiveram efeito significativo sobre a dissolução do pó do suco de manga.

9.1.4.6 Avaliação da Cor

A cor é um dos atributos mais importantes em alimentos, sendo percebido como indicador de qualidade e muitas vezes determinando a decisão de compra de um produto. Muitas matérias-primas da indústria de alimentos não têm cores atraentes, não podendo, portanto, conferir o atrativo da cor ao produto final. Outras matérias-

primas são naturalmente coloridas (ex: a maioria das frutas e hortaliças), mas sofrem alterações de cor durante o processamento, o que ocorre especialmente quando o produto é submetido a altas temperaturas, que promovem degradação dos pigmentos naturais. Estas situações requerem muitas vezes o uso de corantes para conferir ou restaurar a cor. Os corantes naturais têm várias desvantagens em relação aos sintéticos, tais como: maiores custos, menor poder tintorial e estabilidade química muito inferior, entre outros.

A escala CIE Lab (esquemática na Figura 9.4) inclui três variáveis principais de cor: L^* é a luminosidade da amostra, que varia de 0 (preto) a 100 (branco); a variável a^* define a intensidade de vermelho (a^* positivo) ou verde (a^* negativo), e a variável b^* mede a intensidade de amarelo (b^* positivo) ou azul (b^* negativo) conforme esquematizado na Figura 9.4. A leitura é feita direcionando o leitor óptico do equipamento para a amostra, que é colocada sobre a superfície de uma folha de papel em branco.

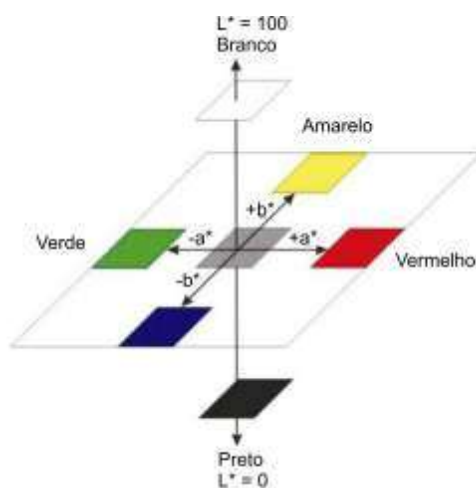


Figura 9.4 Coordenadas do sistema CIE Lab de cor. **Fonte:** (Minolta, 1994).

O índice de cor ($^{\circ}$ Hue) é definido por um ângulo entre 0 e 360° com vértices separados em intervalos de 60°. Cada vértice possui uma cor, o ângulo de 0° representa a cor vermelha, 60° a amarela, a verde em 120°, oposto ao vermelho em 180° o ciano, azul em 240°, magenta em 300° e novamente o vermelho aos 360° (Minolta, 1994). A Figura 9.5 mostra como essas cores estão dispostas no espaço cromático do ângulo Hue.

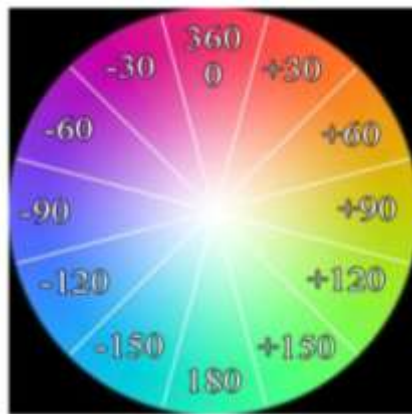


Figura 9.5 Espaço cromático para o ângulo Hue. **Fonte:** (Minolta, 1994).

O Cromo refere-se à saturação, percebida como intensidade da cor. Estágio em que o vermelho apresenta-se mais vermelho; o verde mais verde e o azul mais azul (Pedrosa, 2003). O croma define a intensidade da cor, assumindo valores próximos a zero para cores neutras (cinza) e ao redor de 60 para cores vívidas (Mcguirre, 1992).

9.2 Materiais e Métodos

9.2.1 Preparo das Micropartículas e Planejamento Fatorial

O extrato etanólico obtido como descrito na seção 7.2.2 e otimizado de acordo com o planejamento fatorial da seção 7.2.3 com ponto ótimo de 60 % etanol e pH de 2,75, contendo 1,05 g de sólidos, foi utilizado para os experimentos de microencapsulação. Por motivos de segurança, o etanol foi evaporado em evaporador rotativo até que o residual de álcool ficasse inferior a 5%. As formulações das amostras foram preparadas de acordo com o planejamento 2^2 com 3 repetições no ponto central descrito na Tabela 9.2. A hidroxipropilmetilcelulose, HPMC, foi doada pela Colorcon (Opadry II®, Colorcon, Harleysville, USA); a carboximetilcelulose, CMC, foi doada pela Hexus Foods (CMC, Hexus – Food Ingredients, Portão/RS, Brasil) e a maltodextrina, MD, foi doada pela Cargill (Maltogil10, Minneapolis, USA). Para a elaboração da suspensão primeiramente foram misturados os ingredientes secos e posteriormente adicionou-se o extrato etanólico de antocianina (EEA) sob agitação (UltraMixer, Britânia, Curitiba, Brasil). Essa mistura foi então homogeneizada por

10 minutos (T 25 Ultra-Turrax®, Ika, Wilmington, USA) e imediatamente congelada. Todos os experimentos foram executados em triplicata.

Tabela 9.2 Planejamento das formulações para os experimentos de microencapsulação.

Amostra	HPMC (g)	CMC (g)
L1	1 (0)	1 (0)
L2	2 (+1)	0 (-1)
L3	0 (-1)	2 (+1)
L4	0 (-1)	0 (-1)
L5	2 (+1)	2 (+1)

HPMC é a hidroxipropilmetilcelulose e CMC é a carboximetilcelulose. Para todas as amostras foram utilizadas 30 g de maltodexina 10 DE e 100 mL de extrato etanólico de antocianina. Os valores entre parênteses representam os níveis codificados das amostras.

Os experimentos de liofilização foram realizados no liofilizador (Liofilizador Modelo LS 3000-B, Terroni, São Carlos/SP, Brasil) do Laboratório de Tecnologia e Processos em Alimentos (LATEPA) do Departamento de Engenharia Química (DEQUI) desta universidade. Previamente à liofilização, as amostras foram congeladas a -40 °C (Ultrafreezer MVF 374, Terroni, São Carlos/SP, Brasil) e colocadas nos manifoldes da canópola do equipamento sob vácuo com pressão de 0,1 mm de Hg. O ponto final de secagem foi estabelecido quando a amostra atingiu o peso constante, o que resultou num tempo médio de processo de 96 horas. Após a secagem o produto foi reduzido a pó em almofariz, padronizado em peneiras de 40 *mesh* e armazenado a 25°C ao abrigo da umidade e luz até a sua caracterização.

9.2.3 Caracterização das Micropartículas

As micropartículas foram caracterizadas através das seguintes técnicas: microscopia ótica e eletrônica para avaliação morfológica, distribuição de tamanho de partícula, dissolução em água, teor de antocianidinas, cor e fotoestabilidade.

9.2.3.1 Avaliação Morfológica

As análises de microscopia eletrônica foram realizadas de acordo com os procedimentos descritos por Rosenberg *et al.* (1985). Nessa técnica as amostras são preparadas através da fixação direta dos encapsulados em uma fita metálica de carbono dupla face previamente colocada sobre suportes cilíndricos de alumínio (*stubs*) com 1 cm de altura e 1 cm de diâmetro. Em seguida as amostras são metalizadas com ouro sob alto vácuo (*sputtering*), em um evaporador (Jeol Jee 4BSVG-IN®, Tóquio, Japão) por 75 segundos. A observação é realizada em microscópio eletrônico de varredura (Jeol Scanning Microscope JSM-6060®, Tóquio, Japão, localizado no Centro de Microscopia Eletrônica, UFRGS) e fotografadas com aceleração de 10 kV com ampliações variando de 100 a 30.000 vezes.

9.2.3.2 Distribuição de Tamanho de Partícula

As distribuições de tamanho de partícula foram determinadas por difratometria laser (Mastersizer 2000 E, Malvern Instruments®, Malvern, Reino Unido, localizado na Faculdade de Farmácia/Laboratório de Nanotecnologia/UFRGS) a seco. O tamanho médio de partícula é expresso como o diâmetro do volume médio. A Polidispersão é dada por um índice de amplitude (*Span*), calculado pela Equação 8.1.

$$Span = \frac{D_{0,9} - D_{0,1}}{D_{0,5}} \quad (8.1)$$

onde $D_{0,9}$, $D_{0,5}$ e $D_{0,1}$ são os diâmetros de partícula determinados, respectivamente, no percentil 90, 50 e 10 da distribuição de partículas inferior à curva.

9.2.3.3 Dissolução em água

Os testes de dissolução em água seguiram o método descrito por Cano-Chauca *et al.* (2005). A técnica consiste em diluir 1 g de amostra em 100 mL de água destilada sob agitação a 2500 rpm (agitador tipo *Shaker*, modelo MA563, Marconi, Brasil) por 5 min. A solução é então transferida para um tubo e centrifugada a 10.000 rpm por 10 min (modelo CT5000R, Cientec Instrumentos Científicos S.A., Santiago/Chile). Uma alíquota de 25 mL do sobrenadante é transferida para uma cápsula de alumínio previamente pesada e submetida a secagem a vácuo por 5 h a 105 °C. Por diferença de

peso, o peso final de pó na placa é determinado, e calcula-se o percentual de dissolução.

9.2.3.4 Teor de Antocianidinas

Para a extração das antocianidinas das micropartículas 1 g da amostra foi dissolvida em 10 mL de metanol 0,01% HCl e submetida à agitação (agitador tipo *Shaker*, modelo MA563, Marconi, Brasil) a 2500 rpm durante 1 h. Esse extrato foi então centrifugado (modelo CT5000R, Cientec Instrumentos Científicos S.A., Santiago/Chile) a 10.000 rpm por 10 min e o sobrenadante seguiu para a etapa identificação e quantificação de antocianidinas conforme descrito na Seção 8.2.2.

9.2.3.5 Análise de Cor

A análise de cor foi realizada em colorímetro digital (modelo CR400, Minolta®, Japão) na escala CIE Lab, que inclui três variáveis principais de cor: L^* é a luminosidade da amostra, que varia de 0 (preto) a 100 (branco); a variável a^* define a intensidade de vermelho (a^* positivo) ou verde (a^* negativo), e a variável b^* mede a intensidade de amarelo (b^* positivo) ou azul (b^* negativo). A leitura foi feita direcionando o leitor óptico do equipamento para três pontos distintos da amostra, que é espalhada sobre uma placa de petri colocada sobre a superfície de uma folha de papel em branco. Os parâmetros de cor utilizados para a comparação foram $^{\circ}Hue$ (Equação 8.2) e $Croma$ (Equação 8.3) (Minolta, 1994).

$$^{\circ}Hue = \arctg(b^*/a^*) \quad (8.2)$$

$$Croma = (a^{*2} + b^{*2})^{0,5} \quad (8.3)$$

9.2.3.6 Fotoestabilidade

As micropartículas dos corantes obtidos foram avaliadas de acordo com metodologia proposta por Raffin *et al.* (2008) para a análise de fotoestabilidade de microencapsulados. Nessa técnica utiliza-se como fonte de luz um conjunto de lâmpadas fluorescentes UVA/UVB, 130 V de 30 W (Starlux) fixadas a 42 centímetros das amostras. A câmara é revestida internamente com espelhos, a fim de distribuir a

luz de forma homogênea e dois *coolers* são utilizados para garantir que a temperatura interna fique em torno de 25 °C. As micropartículas de corante são dispostas em uma fina camada em frascos transparentes, em triplicata, e transferidas para a câmara de luz durante 18 dias. As mesmas amostras, como controles escuros, são protegidas completamente com papel alumínio, a fim de avaliar a influência das mudanças de temperatura e presença de oxigênio no interior da câmara. As amostras foram coletadas no tempo zero e após 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16 e 18 dias e avaliadas quanto ao teor de antocianinas totais monoméricas e cor. Para a análise de cor as amostras foram lidas diretamente conforme descrito na Seção 9.2.3.5. As micropartículas foram suspensas em metanol 0,01% HCl e mantidas sob sob agitação (agitador tipo *Shaker*, modelo MA563, Marconi, Brasil) a 2500 rpm durante 1 h protegidas da luz e centrifugadas (centrífuga modelo CT5000R, Cientec Instrumentos Científicos S.A., Santiago/Chile) a 10.000 rpm por 10 min, para a obtenção do extrato metanólico (sobrenadante) que foi utilizado para a determinação do teor de antocianinas monoméricas descrita na Seção 3.2.3.

A modelagem matemática dos perfis de degradação das antocianinas foi realizada utilizando uma reação de primeira ordem, como mostrada na Equação 8.4 e o tempo de meia vida foi calculado segundo a Equação 8.5.

$$\ln\left(\frac{C}{C_0}\right) = -k \times t \quad (8.4)$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k} \quad (8.5)$$

9.2.4 Análise Estatística

Os resultados dos experimentos do planejamento fatorial descrito na seção 9.2.1 foram analisados pela Metodologia da Superfície de Resposta (MSR), que permite a construção de um modelo linear, com a forma geral (para dois fatores) mostrada na Equação 8.6.

$$y = a_0 + a_1 \times CMC + a_2 \times HPMC + a_{12} \times CMC \times HPMC \quad (8.6)$$

Nessa equação y é a variável de resposta e a_1 , a_2 e a_{12} são parâmetros a serem estimados (pela técnica dos mínimos quadrados) e CMC e $HPMC$ são as quantidades desses compostos (codificados) a serem adicionados a 100 mL de EEA e 30 g de MD.

O modelo foi avaliado com base nos seguintes parâmetros: coeficiente de determinação (R^2), que define o percentual de variação na resposta que é explicada pelo modelo e o valor de F da regressão; um valor de R^2 superior a 0,75, segundo Myers e Montgomery (2002) indica a aptidão do modelo. Para o cálculo do F da regressão, comparou-se os valores gerados pela análise de variância do modelo com valores tabelados a fim de definir se o modelo foi significativo, a um nível de significância de 5%. Segundo Barros Neto (1995), se a razão $F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}}$ for maior que 1, o modelo é estatisticamente significativo e, se maior que 5, modelo é, além de significativo, preditivo.

Para os modelos considerados significativos, os coeficientes não significativos foram eliminados do modelo e a curva de contorno foi gerada. Já para os modelos considerados não significativos, a discussão dos resultados foi feita com base nas análises dos efeitos do gráfico de Pareto.

9.3 Resultados e Discussão

A morfologia das micropartículas, distribuição de tamanho, retenção do núcleo, dissolução, cor e fotoestabilidade são parâmetros fundamentais que devem ser investigados quando sistemas microparticulados são desenvolvidos. Diferentes estudos que abordam o desenvolvimento e caracterização de micropartículas demonstraram que os parâmetros citados acima interferem diretamente com o perfil de estabilidade e liberação do material encapsulado (Yamamoto *et al.*, 2002). Assim, as produções de partículas pequenas e homogêneas, com retenção do núcleo de alta e sem defeitos são necessários para um sistema de controle satisfatório. Em face disto, nesta seção estão apresentados e discutidos os resultados da microencapsulação do extrato etanólico rico em antocianinas obtido do bagaço de mirtillo.

9.3.1 Avaliação Morfológica

Na Figura 9.6 são apresentadas micrografias das micropartículas de extrato etanólico rico em antocianinas obtidas do bagaço de mirtillo com diferentes formulações. Observa-se que as micropartículas produzidas apresentam estruturas

irregulares e semelhantes, que é típico dos pós preparados por liofilização (Man *et al.*, 1999; Kaushik e Roos, 2007). Inclusive, as micrografias dos tratamentos referentes às três repetições do ponto central apresentaram o mesmo comportamento, por isso não são mostradas aqui. Morfologia semelhante foi observada em micropartículas de outras fontes de antocianinas utilizando maltodextrina, como amaranto (Cai e Corke, 2000), pupunha (Osorio *et al.*, 2010), romã (Robert *et al.*, 2010) e opuntia (Saénz *et al.*, 2009). No entanto, alguns autores conseguiram obter micropartículas de antocianinas em esferas lisas utilizando maltodextrina e secando por atomização (*spray-dryer*) (Ersus e Yurdagel, 2007; Ahn *et al.*, 2008).

De acordo com Man *et al.* (1999) o tipo de processo de secagem influencia na estrutura dos grânulos de pó. Para os pós obtidos a partir do suco de durio (*Durio zibethinus* Murr) com maltodextrina por atomização apresentam estrutura mais esférica, enquanto os pós obtidos por liofilização apresentam-se irregulares. Eles relacionam essa diferença às condições de operação do processo, a liofilização utiliza alto vácuo e baixas temperaturas, de modo que pressiona as partículas dos produtos, produzindo assim partículas com menor teor de umidade e maior tamanho.

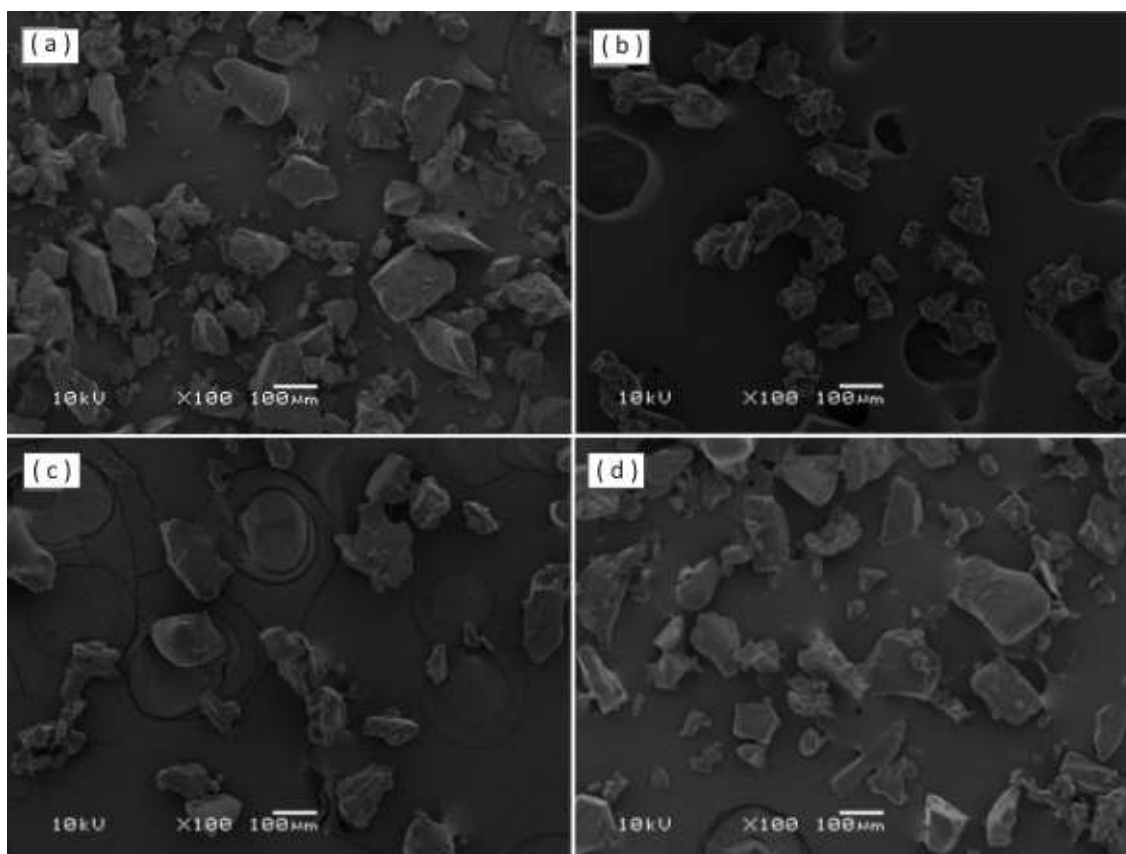


Figura 9.6 Micrografias das micropartículas de extrato etanólico rico em antocianinas obtidas do bagaço de mirtilo com diferentes formulações. Para 100 mL de EEA: (a) 30 g de MD; (b) 30 g de MD + 2 g de HPMC; (c) 30 g de MD + 2 g de CMC e (d) 30 g de MD + 2 g de HPMC + 2 g de CMC.

9.3.2 Distribuição de Tamanho de Partícula

As partículas obtidas por encapsulação podem ser classificadas por tamanho em três categorias: macro (partículas maiores de 5.000 μm), micro (partículas entre 0,2 e 5000 μm) e nano (partículas menores que 0,2 μm) (Ravi Kumar, 2000). Na Figura 9.7 é apresentada a distribuição do tamanho das partículas para os pós produzidos pelas diferentes formulações. Nessa figura observa-se uma distribuição unimodal, com um baixo índice de polidispersão e tamanhos de partícula dentro da faixa entre 10 e 1000 μm caracterizando que as antocianinas extraídas do bagaço de mirtilo foram microencapsuladas com sucesso.

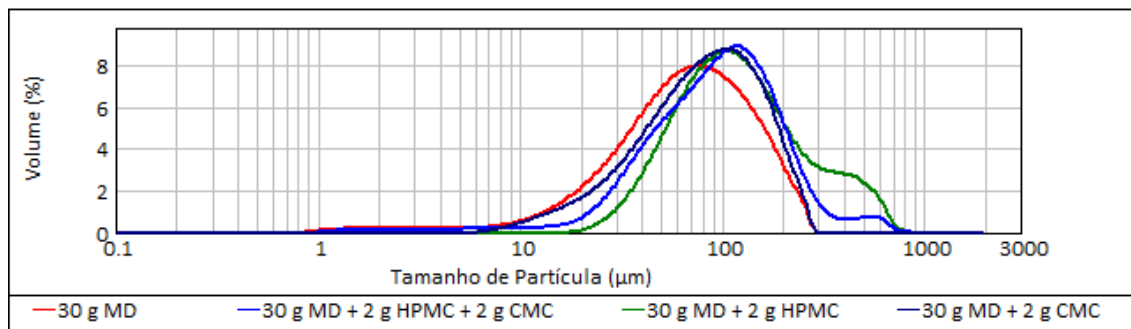


Figura 9.7 Distribuição do tamanho das partículas para os pós produzidos pelas diferentes formulações.

Na Tabela 9.3 estão apresentados os resultados obtidos para o tamanho médio de partícula e para o índice de polidispersão para as diferentes formulações do planejamento experimental. Observa-se que as micropartículas apresentaram tamanhos médios na faixa entre 80 e 250 μm e um índice de polidispersão próximo de 2,0. Um baixo índice de polidispersão está associado com a estabilidade do produto visto que ele apresentará uma baixa tendência a aglomeração (Desai *et al.*, 2005). A formulação que continha MD+CMC foi a de maior índice de polidispersão, indicando maior tendência à aglomeração e pior estabilidade.

Tabela 9.3 Resultados obtidos para o tamanho médio de partícula e para o índice de polidispersão para as diferentes formulações do planejamento experimental.

CMC (g)	HPMC (g)	Tamanho médio de partícula (D4,3) (μm)	Índice de Polidispersão
0	0	82,40 \pm 1,94 ^a	2,07 \pm 0,06 ^a
0	2	163,10 \pm 12,74 ^b	2,75 \pm 0,34 ^b
1	1	99,16 \pm 6,63 ^a	2,06 \pm 0,33 ^a
2	0	244,08 \pm 46,41 ^b	3,38 \pm 0,36 ^c
2	2	108,91 \pm 9,04 ^a	1,86 \pm 0,03 ^a

*letras minúsculas iguais na mesma coluna representam que não há diferença significativa (Tuckey HSD, $p < 0,05$).

Na Tabela A.9.1 está apresentada a Análise de Variância (ANOVA) para o tamanho médio de partícula para as diferentes formulações do planejamento experimental ($R^2 = 0,7509$). Nessa tabela observa-se que tanto a adição de CMC quanto a de HPMC e a interação de ambas influenciaram significativamente ($p < 0,05$) no tamanho das partículas. Utilizando apenas os efeitos significativos desta tabela

chegou-se a um modelo significativo ($F_{\text{calculado}} = 14,06$; $F_{\text{calculado}} / F_{\text{tabelado}} = 1,61$) cujos coeficientes estão apresentados na Equação 8.7.

$$\text{Tamanho } (\mu\text{m}) = 132,8(\pm 4,6) + 53,7(\pm 11,3) \times \text{CMC} - 27,2(\pm 11,3) \times \text{HPMC} - 107,9(\pm 11,3) \times \text{CMC} \times \text{HPMC} \quad (8.7)$$

Com base nesse modelo foi possível construir a curva de contorno apresentada na Figura 9.8 onde é possível observar que o menor tamanho é atingido para as menores concentrações de CMC e HPMC.

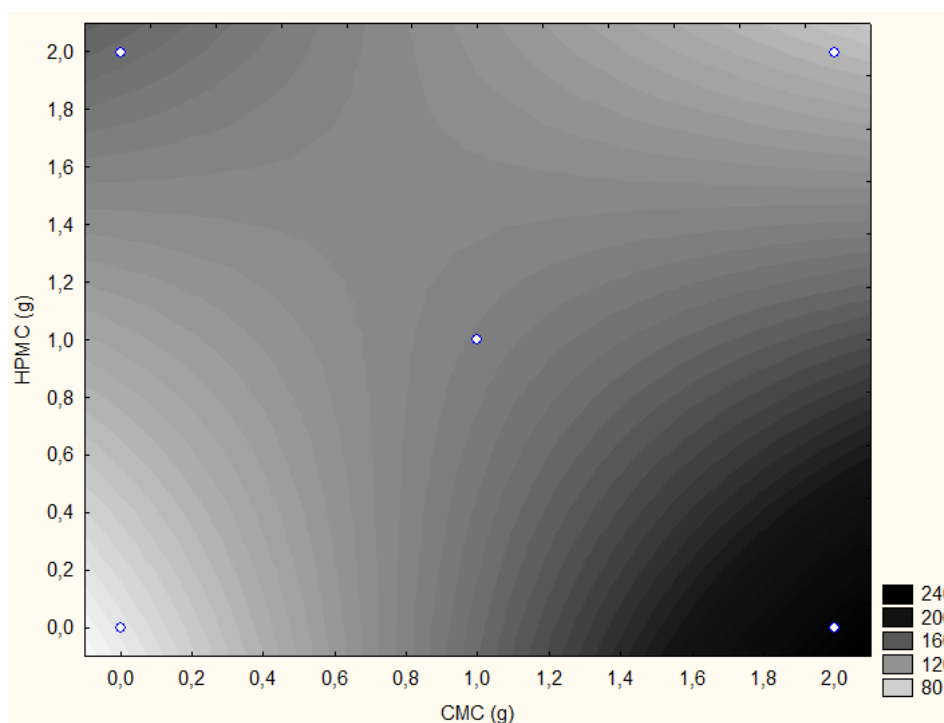


Figura 9.8 Curva de contorno para o tamanho médio de partículas (μm) dos microparticulados em função da formulação.

Na Tabela A.9.2 está apresentada a Análise de Variância (ANOVA) para o índice de polidispersão das partículas para as diferentes formulações do planejamento experimental ($R^2 = 0,7948$). Nessa tabela observa-se que a adição HPMC e a interação HPMC x CMC influenciaram significativamente ($p < 0,05$) no índice de polidispersão. Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente e os efeitos encontrados para as variáveis podem ser observados no Gráfico de Pareto apresentado na Figura 9.9, permitindo observar que a interação entre o conteúdo de HPMC e CMC e a

concentração de HPMC afetam negativamente ($p < 0,05$) no índice de polidispersão dos encapsulados.

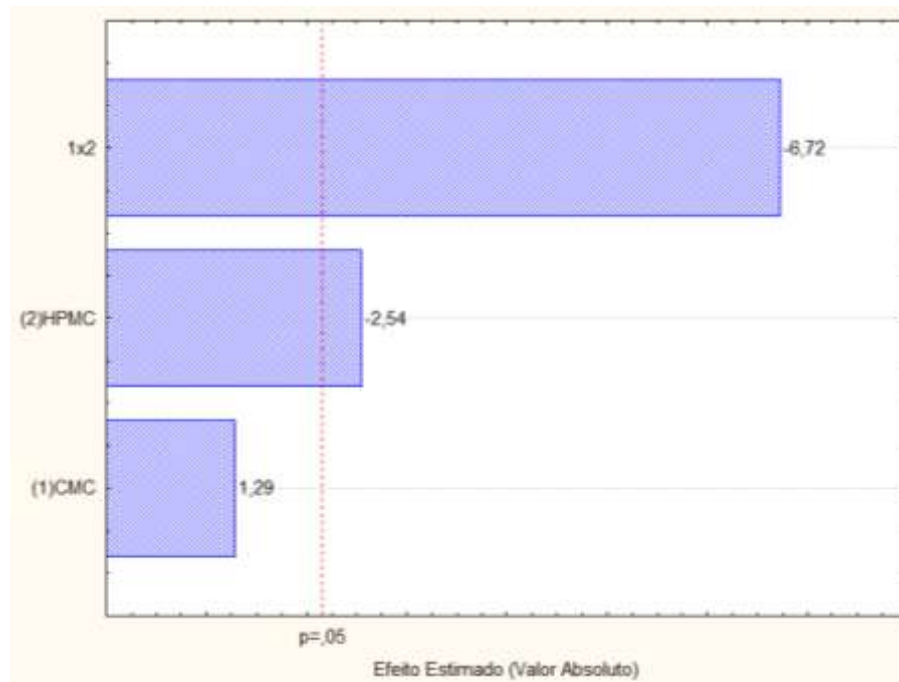


Figura 9.9 Gráfico de Pareto para análise de efeito do índice de polidispersão dos microencapsulados em função da formulação.

9.3.3 Dissolução em água

Os microparticulados obtidos a partir das diferentes formulações apresentaram boa dissolução em água (média de 65%). Segundo Meyers (1995) os microparticulados apresentam um bom desempenho quando liberam cerca de 60 a 70% do recheio dentro de 15 minutos sob agitação. Na Tabela 9.4 estão apresentados os resultados obtidos para o teste de dissolução em água. Nela é possível observar que a adição de HPMC melhora a dissolução da micropartícula enquanto que a presença do CMC afeta negativamente. Apesar do CMC ser amplamente utilizado para aumentar a dissolução de fármacos hidrofóbicos devido à sua propriedade de formação de emulsão (Feddersen e Thorp, 1993), vários autores relatam que o aumento dos níveis de material encapsulante pode reduzir a dissolução dos pós, como os dados encontrados por Abadio *et al.* (2004) e Cano-Chauca *et al.* (2005), que trabalharam com microencapsulação de sucos de abacaxi e de manga, respectivamente.

Tabela 9.4 Resultados obtidos para a dissolução em água das partículas para as diferentes formulações do planejamento experimental.

CMC (g)	HPMC (g)	Dissolução (%)	
0	0	65,04 ± 0,18	b
0	2	67,89 ± 1,65	c
1	1	64,91 ± 0,43	b
2	0	62,80 ± 1,90	a
2	2	64,55 ± 0,85	b

*letras minúsculas iguais na mesma coluna representam que não há diferença significativa (Tuckey HSD, $p < 0,05$).

Na Tabela A.9.3 está apresentada a ANOVA para a dissolução em água das partículas onde é possível observar que tanto a adição de CMC quanto de HPMC influenciam significativamente ($p < 0,05$) na dissolução ($R^2 = 0,8193$). Utilizando apenas os efeitos significativos desta tabela chegou-se a um modelo preditivo ($F_{\text{calculado}} = 21,22$; $F_{\text{calculado}} / F_{\text{tabelado}} = 5,98$) cujos coeficientes estão apresentados na Equação 8.8.

$$\text{Dissolução}(\%) = 65,00(\pm 0,22) - 1,40(\pm 0,29) \times \text{CMC} + 1,15(\pm 0,29) \times \text{HPMC} \quad (8.8)$$

Com base nesse modelo foi possível construir a curva de contorno apresentada na Figura 9.10 onde é possível observar que a maior dissolução é atingida para as menores concentrações de CMC e maiores concentrações de HPMC.

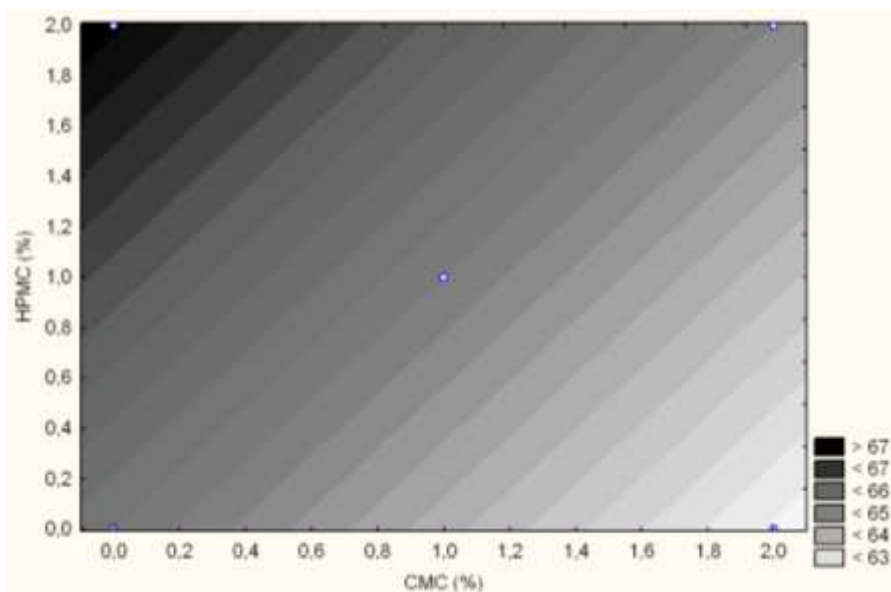


Figura 9.10 Curva de contorno para a dissolução dos microparticulados em função da formulação.

9.3.4 Análise de Cor

Na Tabela 9.5 estão apresentados os resultados obtidos para a análise de cor em função do parâmetro L^* da escala CIELab, Croma e $^{\circ}$ Hue. Nessa tabela observa-se que a luminosidade das amostras (L^*) que continham CMC foram superiores as das demais formulações. Este fato pode estar relacionado à menor retirada de água (maior umidade), que resultou em produtos um pouco mais diluídos e, conseqüentemente, mais claros.

Em relação ao índice de cor ($^{\circ}$ Hue), valores entre 330° (ou -30°) e 0° indicam coloração roxa, característica da antocianina. Quanto mais próximo do -30° esse valor se aproxima da cor magenta e quanto mais próximo do zero, mais próximo da cor vermelha. Os valores encontrados nesse estudo para o ângulo de cor de todas as amostras encontram-se na faixa entre $-9,31$ e $-2,12^{\circ}$, sendo que as amostras que não continham HPMC na sua formulação apresentaram uma coloração menos avermelhada.

Os maiores valores de croma encontrados, de acordo com os dados da Tabela 9.5 foram obtidos para a formulação que continha MD+CMC (44,27). Ersus e Yurdagel (2007) ao microencapsular antocianinas extraídas da cenoura preta com maltodextrina por atomização encontraram valores semelhantes ao encontrados nesse estudo para o ângulo de cor ($-3,68^{\circ}$), mas valores maiores para o croma (11,37). Os valores para o

ângulo de cor e croma encontrados por Malien-Aubert *et al.* (2000), para pós obtidos a partir de extratos ricos em antocianinas de diferentes fontes, variaram de 16 a 26° e de -17 a 23, respectivamente.

Tabela 9.5 Resultados obtidos para os parâmetros de cor das partículas produzidas por diferentes formulações do planejamento experimental.

CMC (g)	HPMC (g)	L*		Croma		°Hue	
0	0	29,66 ± 0,01	^a	30,86 ± 0,07	^c	-9,31 ± 0,06	^a
0	2	31,13 ± 0,01	^a	35,77 ± 0,06	^d	-8,08 ± 0,03	^b
1	1	39,33 ± 1,93	^b	29,32 ± 1,13	^b	-3,85 ± 0,42	^c
2	0	38,92 ± 0,01	^b	44,27 ± 0,03	^e	-8,97 ± 0,05	^a
2	2	40,73 ± 0,01	^b	26,89 ± 0,01	^a	-2,12 ± 0,02	^d

*letras minúsculas iguais na mesma coluna representam que não há diferença significativa (Tuckey HSD, $p < 0,05$).

Na Tabela A.9.4 está apresentada a ANOVA para a luminosidade (L^*) das partículas onde é possível verificar que apenas a concentração de CMC influencia significativamente ($p < 0,05$) na luminosidade ($R^2 = 0,7934$). Utilizando apenas os efeitos significativos desta tabela chegou-se a um modelo preditivo ($F_{\text{calculado}} = 39,1$; $F_{\text{calculado}} / F_{\text{tabelado}} = 11,01$) cujos coeficientes estão apresentados na Equação 8.9.

$$L^* = 36,9(\pm 0,3) + 9,4(\pm 0,8) \times CMC \quad (8.9)$$

Com base nesse modelo foi possível construir a curva de contorno apresentada na Figura 9.11 onde é possível observar que a menor luminosidade é atingida para as menores concentrações de CMC.

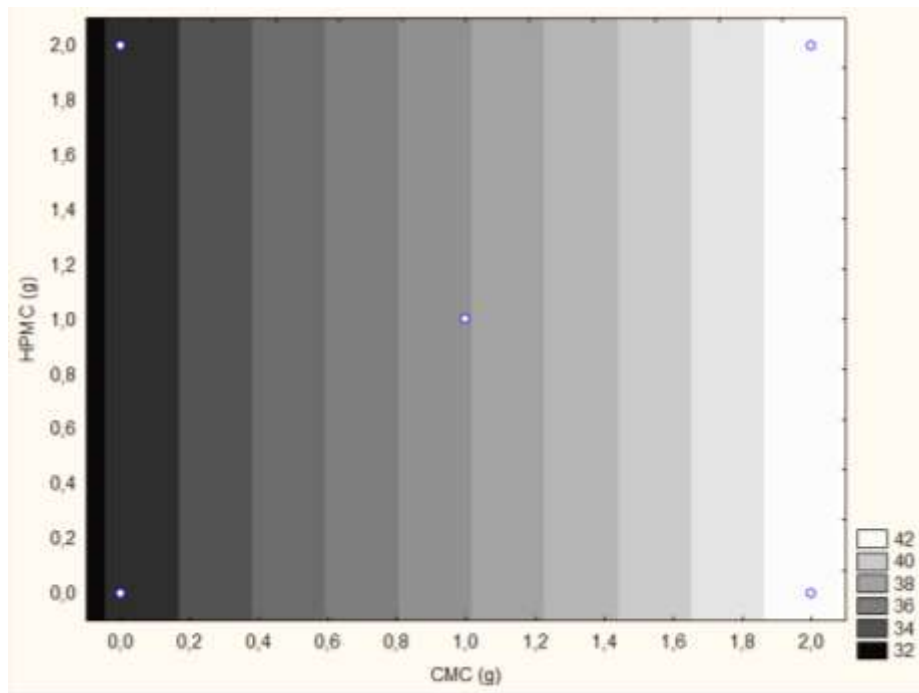


Figura 9.11 Curva de contorno para a luminosidade (L^*) dos microparticulados em função da formulação.

Na Tabela A.9.5 está apresentada a ANOVA para o croma das partículas onde é possível verificar que tanto a concentração de CMC quanto a concentração de HPMC, e a interação de ambas influenciam significativamente ($p < 0,05$) no croma ($R^2 = 0,7761$). Utilizando apenas os efeitos significativos desta chegou-se a um modelo preditivo ($F_{\text{calculado}} = 10,3$; $F_{\text{calculado}} / F_{\text{tabelado}} = 5,53$) cujos coeficientes estão apresentados na Equação 8.10.

$$\text{Croma} = 32,2(\pm 0,2) + 2,3(\pm 0,5) \times \text{CMC} - 6,2(\pm 0,5) \times \text{HPMC} - 11,1(\pm 0,5) \times \text{CMC} \times \text{HPMC} \quad (8.10)$$

Com base nesse modelo foi possível construir a curva de contorno apresentada na Figura 9.12 onde é possível observar que o maior croma é atingido para as maiores concentrações de CMC.

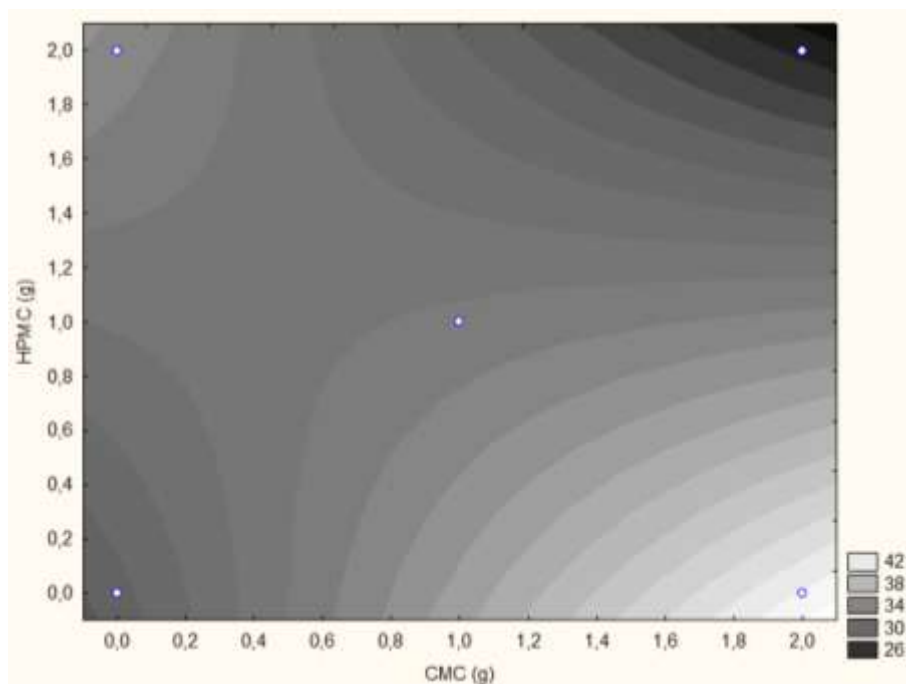


Figura 9.12 Curva de contorno para o croma dos microparticulados em função da formulação.

Na Tabela A.9.6 está apresentada a ANOVA para o ângulo de cor ($^{\circ}$ Hue) das partículas onde é possível verificar que tanto a concentração de CMC quanto a concentração de HPMC, e a interação de ambas influenciam significativamente ($p < 0,05$) no ângulo de cor ($R^2 = 0,7450$). Utilizando apenas os efeitos significativos desta tabela chegou-se a um modelo significativo ($F_{\text{calculado}} = 10,3$; $F_{\text{calculado}} / F_{\text{tabelado}} = 2,90$) cujos coeficientes estão apresentados na Equação 8.11.

$$^{\circ}\text{Hue} = 5,72(\pm 0,06) - 3,15(\pm 0,17) \times \text{CMC} - 4,04(\pm 0,17) \times \text{HPMC} - 2,81(\pm 0,17) \times \text{CMC} \times \text{HPMC} \quad (8.11)$$

Com base nesse modelo foi possível construir a curva de contorno apresentada na Figura 9.13 onde é possível observar que o menor ângulo de cor é atingido para as maiores concentrações de CMC.

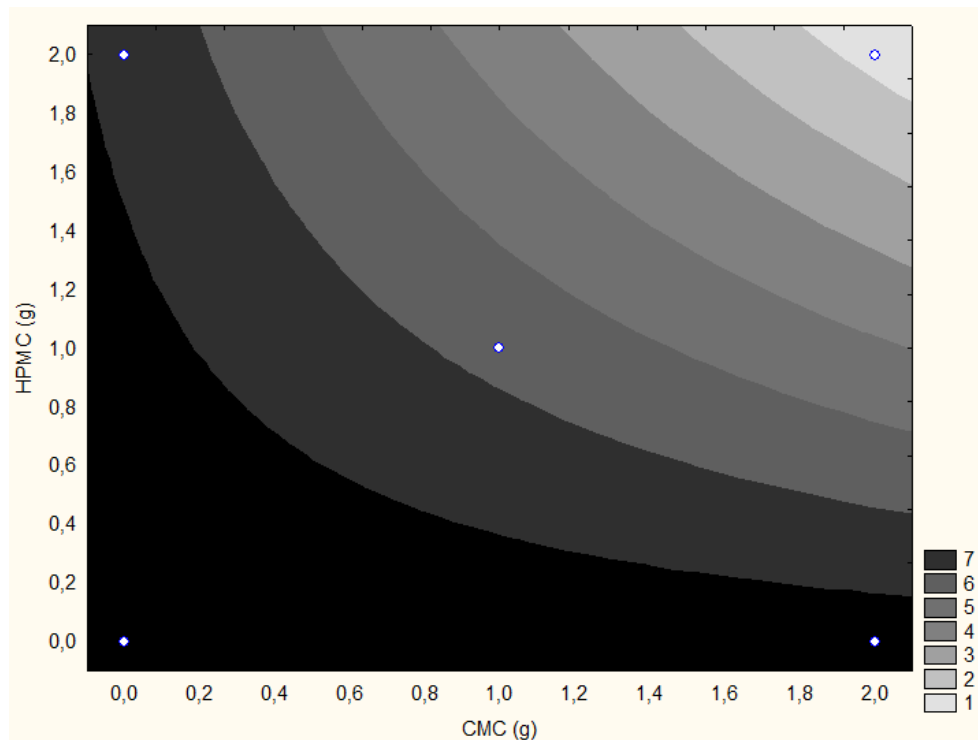


Figura 9.13 Curva de contorno para o ângulo de cor ($^{\circ}$ Hue), em módulo, dos microparticulados em função da formulação.

9.3.5 Teor de Antocianinas

Nessa seção será avaliado primeiramente o teor de antocianinas totais monoméricas e posteriormente a influência da formulação sobre as formas glicosiladas, as antocianidinas.

Na Tabela 6.7 estão apresentados os resultados obtidos para o teor de antocianinas totais monoméricas em função da formulação. Nessa tabela observa-se que as amostras contendo apenas maltodextrina e as amostras contendo 1 g de HPMC e 1 g de CMC apresentaram um elevado teor de antocianinas. O contrário foi obtido para as amostras contendo CMC e HPMC em separado, que obtiveram os menores teores de antocianinas, indicando que o uso combinado das duas celuloses modificadas potencializa o teor de antocianinas.

Tabela 9.6 Resultados obtidos para o conteúdo de antocianinas totais monoméricas das partículas produzidas por diferentes formulações do planejamento experimental.

CMC (g)	HPMC (g)	Antocianinas Monoméricas (mg/100g)
0	0	158,13 ± 5,22 ^c
0	2	89,56 ± 0,57 ^a
1	1	164,06 ± 12,92 ^c
2	0	75,98 ± 0,78 ^a
2	2	131,38 ± 5,35 ^b

*letras minúsculas iguais na mesma coluna representam que não há diferença significativa (Tuckey HSD, $p < 0,05$).

Na Tabela A.9.7 está apresentada a ANOVA para o teor de antocianinas monoméricas totais das partículas onde é possível verificar que tanto a concentração de CMC quanto a interação concentração de CMC e HPMC influenciam significativamente ($p < 0,05$) no teor de antocianinas. Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente e os efeitos encontrados para as variáveis podem ser observados no Gráfico de Pareto apresentado na Figura 6.13, permitindo observar que a interação entre o conteúdo de HPMC e CMC, assim como a concentração CMC, apresentaram influência significativa ($p < 0,05$) no conteúdo de antocianinas. Ainda, nessa figura observa-se um efeito negativo da concentração de CMC na formulação.

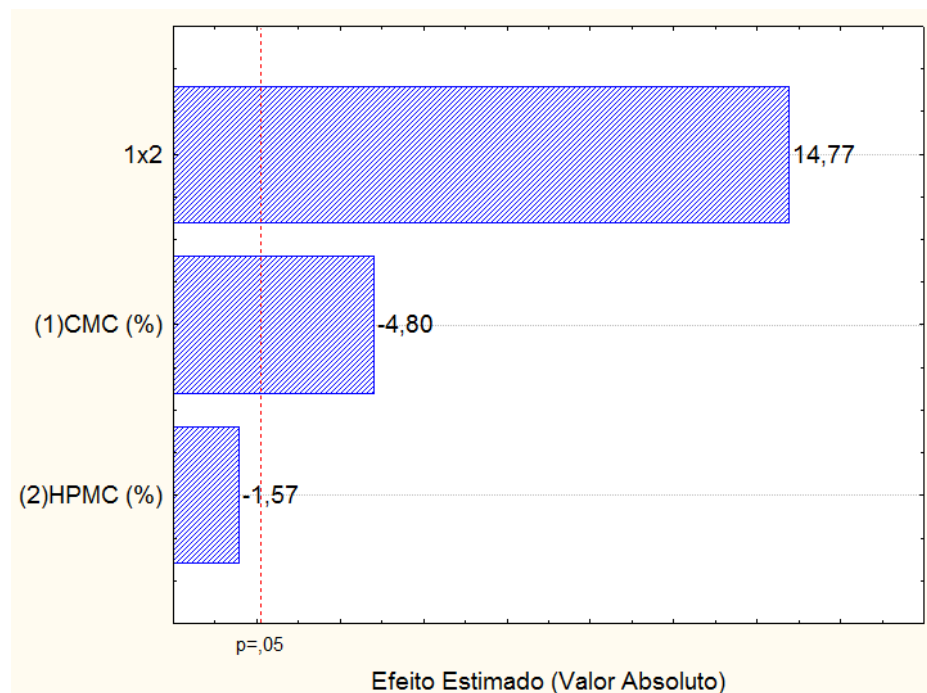


Figura 9.14 Gráfico de Pareto para análise de efeito das variáveis de estudo sobre o teor de antocianinas totais monoméricas dos microparticulados em função da formulação.

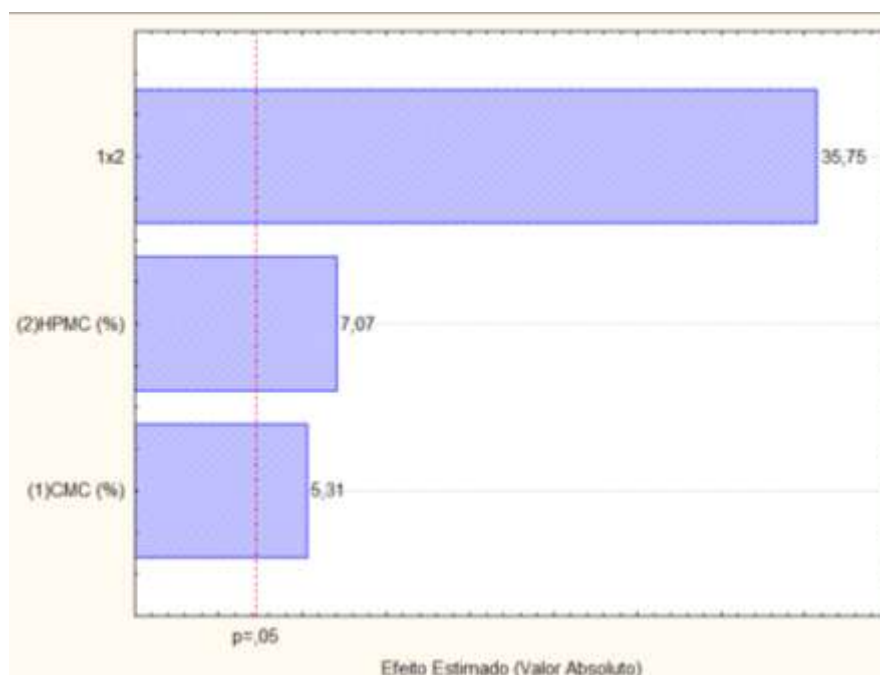
Das seis agliconas possíveis de serem identificadas e quantificadas pela metodologia de análise validada no Capítulo 8, a pelargonidina, petunidina e peonidina apresentaram picos com áreas superiores ao limite de detecção, mas inferiores ao limite de quantificação, em virtude disso, os resultados a seguir são expressos em função das antocianidinas majoritárias no microparticulado antociânico obtido a partir de extrato etanólico do bagaço de mirtillo: a delfinidina, cianidina e malvidina.

Na Tabela 9.7 estão apresentados os resultados obtidos para o teor de antocianidinas (delfinidina, cianidina e malvidina). Nessa tabela observa-se que o maior conteúdo das antocianidinas em questão foi para a formulação que envolvia 2 g de CMC e 2g de HPMC.

Tabela 9.7 Conteúdo de antocianidinas das partículas produzidas por diferentes formulações do planejamento experimental.

CMC (g)	HPMC (g)	Delfinidina (mg/100g)	Cianidina (mg/100g)	Malvidina (mg/100g)
0	0	97,03 ± 3,64 ^b	12,78 ± 0,44 ^c	31,46 ± 1,57 ^d
0	2	51,73 ± 1,18 ^a	5,31 ± 0,19 ^a	24,08 ± 0,33 ^b
1	1	124,08 ± 0,96 ^d	11,81 ± 0,44 ^b	29,15 ± 0,32 ^c
2	0	48,96 ± 0,06 ^a	4,86 ± 0,03 ^a	21,27 ± 0,16 ^a
2	2	116,58 ± 4,68 ^c	13,37 ± 0,14 ^c	28,91 ± 0,30 ^c

Na Tabela A.9.8 está apresentada a ANOVA para o teor delfinidina das partículas onde é possível verificar que tanto a concentração de CMC quanto a de HPMC e a interação entre as concentrações de CMC e HPMC influenciam significativamente ($p < 0,05$) no teor de delfinidina ($R^2 = 0,7680$). Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente e os efeitos encontrados para as variáveis podem ser observados no Gráfico de Pareto apresentado na Figura 9.15, permitindo observar que a interação entre o conteúdo de HPMC e CMC, assim como a concentração de CMC e HPMC, apresentaram influência positiva ($p < 0,05$) no conteúdo de delfinidina.

**Figura 9.15** Gráfico de Pareto para análise de efeito da formulação no teor de delfinidina.

Na Tabela A.9.9 está apresentada a ANOVA para o conteúdo de cianidina das partículas onde é possível verificar que tanto a concentração de HPMC quanto a interação das concentrações de HPMC e CMC influenciam significativamente ($p < 0,05$) no teor de cianidina ($R^2 = 0,9109$). Utilizando apenas os efeitos significativos desta chegou-se a um modelo significativo ($F_{\text{calculado}} = 61,32$; $F_{\text{calculado}} / F_{\text{tabelado}} = 3,16$) cujos coeficientes estão apresentados na Equação 8.12.

$$\text{Cianidina} \left(\frac{\text{mg}}{100\text{g}} \right) = 9,62(\pm 0,08) + 0,52(\pm 0,18) \times \text{HPMC} + 7,99(\pm 0,17) \times \text{CMC} \times \text{HPMC} \quad (8.12)$$

Com base nesse modelo foi possível construir a curva de contorno apresentada na Figura 9.16 onde é possível observar que o maior conteúdo de cianidina foi atingido com as maiores concentrações de CMC e HPMC.

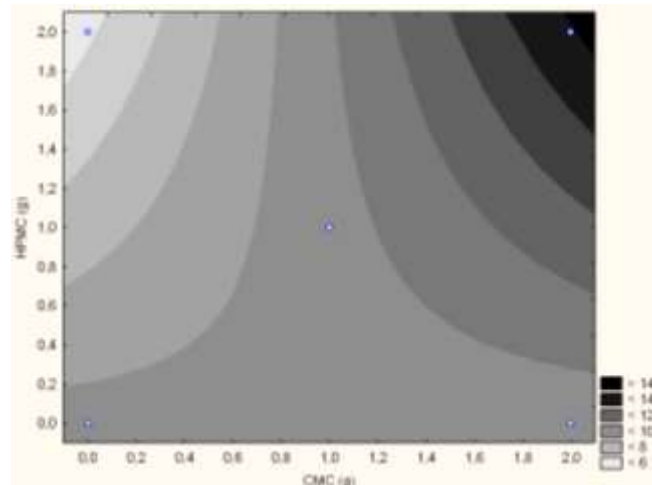


Figura 9.16 Curva de contorno para o teor de cianidina (mg/100g) dos microparticulados em função da formulação.

Na Tabela A.9.10 está apresentada a ANOVA para o conteúdo de partículas onde é possível verificar que tanto a concentração de CMC interação das concentrações de HPMC e CMC influenciam no teor de malvidina ($R^2 = 0,8913$). Utilizando apenas os efeitos significativos da SQ é a Soma dos Quadrados; GL são os Graus de Liberdade; MQ são os quadrados médios e F_{calc} é o valor de F calculado.

Tabela A.9. chegou-se a um modelo significativo ($F_{\text{calculado}} = 49,08$; $F_{\text{calculado}} / F_{\text{tabelado}} = 2,53$) cujos coeficientes estão apresentados na Equação 8.13.

$$\text{Malvidina} \left(\frac{\text{mg}}{100\text{g}} \right) = 26,97(\pm 0,19) - 2,68(\pm 0,43) \times \text{CMC} + 7,52(\pm 0,43) \times \text{CMC} \times \text{HPMC} \quad (8.13)$$

Com base nesse modelo foi possível construir a curva de contorno apresentada na Figura 9.17 onde é possível observar que a maior concentração de malvidina é atingida para as menores concentrações de CMC.

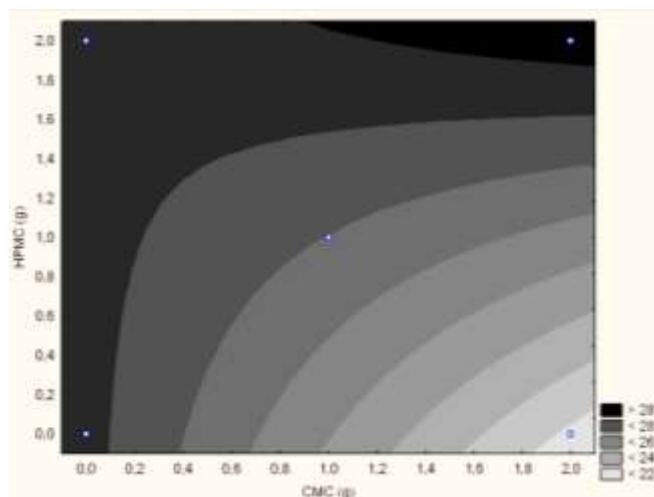


Figura 9.17 Curva de contorno para o teor de malvidina dos microparticulados em função da formulação.

9.3.6 Fotoestabilidade

Na Figura 9.18 são mostrados os gráficos obtidos para a fotoestabilidade dos parâmetros de cor (luminosidade, croma e ângulo de cor) dos microparticulados de acordo com as diferentes formulações. Nessa figura é possível observar que todas as amostras apresentaram boa estabilidade à luz; apesar de partirem de valores distintos, todas as formulações apresentam boa capacidade de manter a sua coloração.

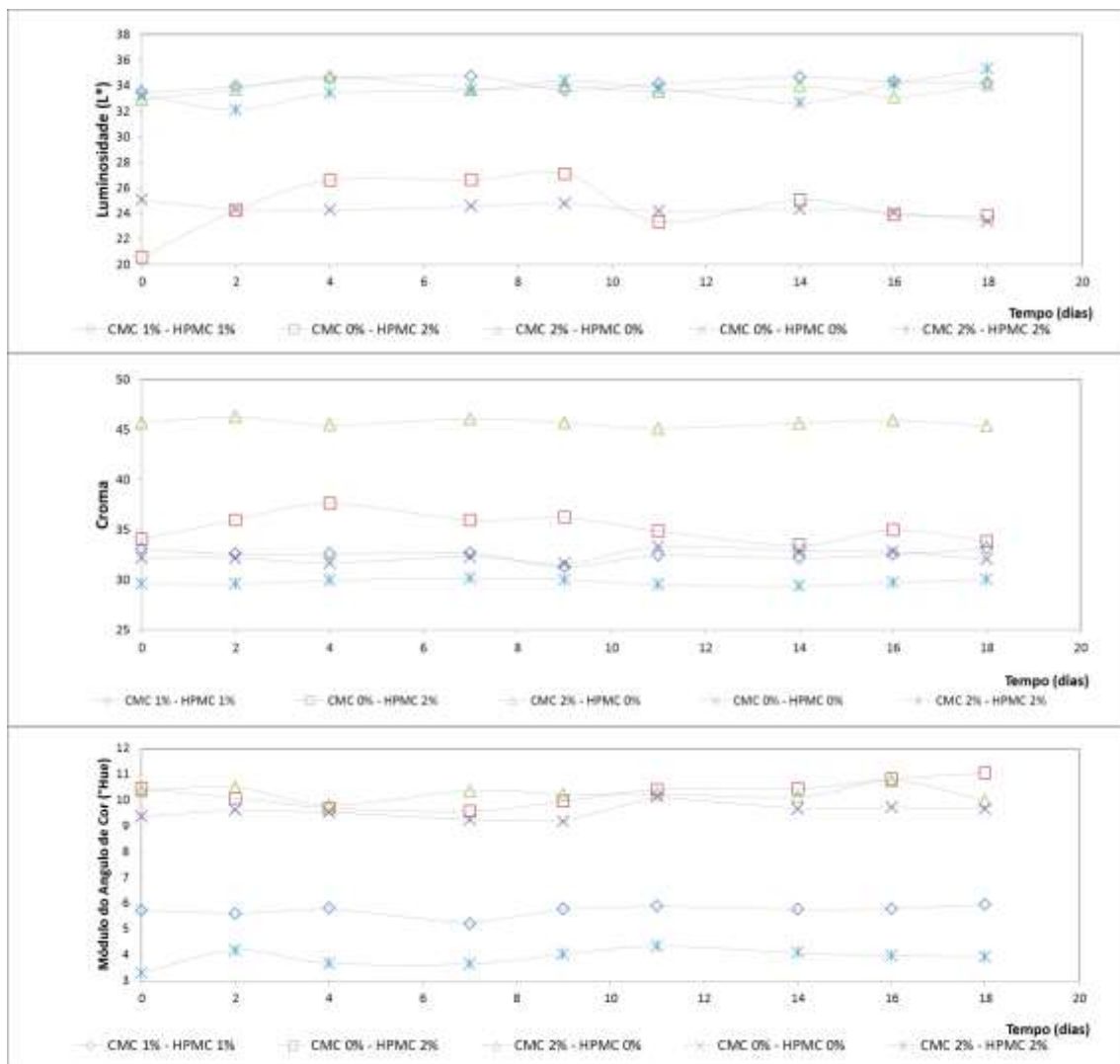


Figura 9.18 Gráficos obtidos para a fotoestabilidade dos parâmetros de cor (luminosidade, croma e ângulo de cor) dos microparticulados de acordo com as diferentes formulações.

Na Figura 9.19 são mostrados os gráficos obtidos para a fotoestabilidade do conteúdo de antocianinas totais monoméricas dos microparticulados de acordo com as diferentes formulações. Nessa figura é possível observar que, apesar de apresentar boa estabilidade de cor, a amostra contendo 1 g de CMC e 1 g de HPMC foi a que conseguiu melhor retenção no teor de antocianinas.

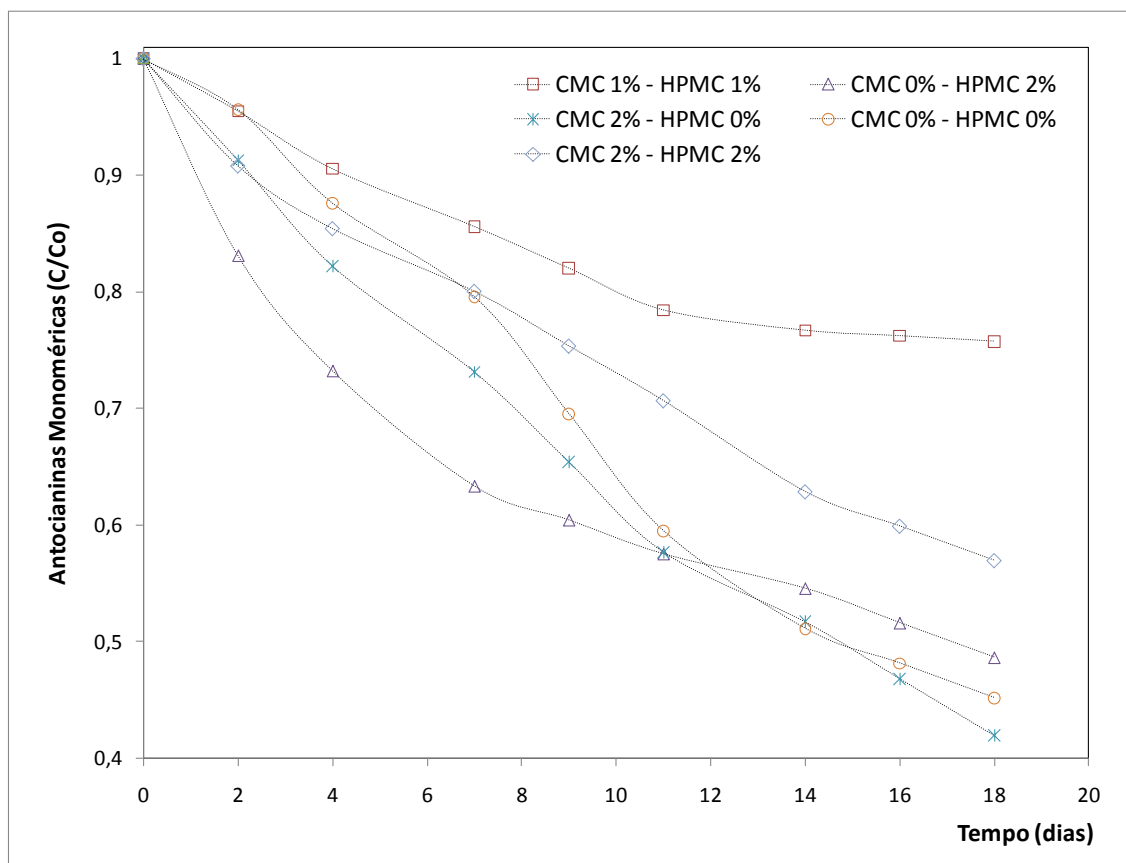


Figura 9.19 Fotoestabilidade do conteúdo de antocianinas totais monoméricas dos microparticulados de acordo com as diferentes formulações.

A degradação das antocianinas microparticuladas em função do tempo seguiu uma reação de primeira ordem, o que está de acordo com pesquisas realizadas previamente (Cemeroglu *et al.*, 1994; Giusti e Wrolstad, 1996). Matioli e Rodriguez-Amaya (2002) ao encapsularem o licopeno extraído de goiaba vermelha também obtiveram uma cinética de degradação de primeira ordem.

Na Tabela 9.8 são apresentados os resultados para o valor do coeficiente cinético de degradação das antocianinas a luz ultravioleta (k), do tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) e do coeficiente de correlação da curva de ajuste (R^2). Nessa tabela é possível observar que a amostra que apresentou melhor fotoestabilidade, caracterizada pelo maior tempo de meia vida e menor coeficiente cinético, foi a que continha 1 g de CMC e 1 g de HPMC em sua formulação.

Tabela 9.8 Resultados para o valor do coeficiente cinético de degradação das antocianinas a luz ultravioleta (k), do tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) e do coeficiente de correlação da curva de ajuste (R^2) das partículas para as diferentes formulações do planejamento experimental.

CMC (g)	HPMC (g)	k (dias ⁻¹) x10 ²	$t_{1/2}$ (dias)	R^2
0	0	4,45	15,57	0,978
0	2	4,54	15,28	0,840
1	1	1,82	38,03	0,912
2	0	4,78	14,50	0,998
2	2	3,21	21,62	0,992

Alguns autores registraram o efeito positivo de agentes encapsulantes sobre a estabilidade de pigmentos durante a estocagem: Saito *et al.* (1994) encapsularam pigmentos de cúrcuma em géis de alginato; Desobry *et al.* (1999) trabalharam com β -caroteno em micropartículas de maltodextrina; Prentice-Hernández e Rusig (1999) encapsularam carotenóides de urucum; Gradinaru *et al.* (2003) encapsularam antocianinas de hibisco em pululana e Higuera-Ciapara *et al.* (2004) encapsularam astaxantina em quitosana.

A presença de luz interferiu negativamente na estabilidade das antocianinas assim como para Gris *et al.* (2007) verificaram que a luz degradou significativamente as antocianinas de cascas de uvas Cabernet Sauvignon conferindo uma redução do tempo de meia vida de cerca de 50%. A influência da luz na estabilidade da antocianina cianidina 3-glicosídeo arabinosídeo isolada da *Euphorbia caracasana* foi avaliada por Bobbio *et al.* (1994), que verificaram que a presença de luz promoveu diminuição dos valores de tempo de meia vida destes pigmentos.

Provenzi *et al.* (2006) avaliaram a influência da β - e γ -ciclodextrinas (CD) sobre a estabilidade de antocianinas extraídas da casca de uvas Cabernet Sauvignon sob presença e ausência de luz e de nitrogênio, à temperatura de $15\pm 2^\circ\text{C}$ e pH 3,5. As amostras de antocianinas adicionadas de γ -CD apresentaram maior estabilidade da cor, refletindo valores de tempo de meia vida superiores quando comparadas às demais amostras. O melhor resultado obtido por eles de tempo de meia vida foi de 497 horas, referente à amostra γ -CD3, mantida na presença de nitrogênio e ausência de luz.

9.4 Conclusões

O processo descrito, envolvendo extração seguida de microencapsulação por liofilização, é bastante promissor para obtenção de um pó rico em antocianinas que pode ser usado como aditivo alimentar exercendo função de corante e/ou antioxidante.

A morfologia das micropartículas produzidas apresentam estruturas irregulares e semelhantes, para as diferentes formulações testadas, o que é típico dos pós preparados por liofilização.

A distribuição de tamanho médio de partículas apresenta-se unimodal, com um baixo índice de polidispersão (próximo de 2) e tamanhos médios de partícula dentro da faixa entre 80 e 250 μm . A formulação que continha MD+CMC foi a de maior índice de polidispersão, indicando maior tendência à aglomeração e pior estabilidade; o menor tamanho de partículas, por sua vez, é atingido para as menores concentrações de CMC e HPMC. A adição de HPMC melhora a dissolução em água das micropartículas enquanto que a presença do CMC afeta negativamente esse parâmetro.

O CMC além de proporcionar menores valores para o ângulo de cor e maiores valores de Croma e luminosidade afeta negativamente no teor de antocianinas totais.

O maior conteúdo das antocianidinas em questão é obtido com 2 g de CMC e 2g de HPMC adicionados a 100 mL de extrato e 30 g de maltodextrina. O maior conteúdo de cianidina foi atingido com as maiores concentrações de CMC e HPMC enquanto que a maior concentração de malvidina é atingida para as menores concentrações de CMC.

A degradação das antocianinas à luz ultravioleta em função do tempo seguiu uma reação de primeira ordem e a amostra com melhor fotoestabilidade, caracterizada pelo maior tempo de meia vida (38,03) e menor coeficiente cinético (1,82), foi a que continha 1 g de CMC e 1 g de HPMC em sua formulação.

A seleção criteriosa dos adjuvantes de secagem é capaz de promover a estabilização das antocianinas frente aos processos aos quais serão submetidas.

Capítulo 10

Reologia do Purê de Mirtilo

O consumo de alimentos processados para bebês, tais como as “papinhas” têm aumentado nos últimos anos em países desenvolvidos ou em desenvolvimento. Estes produtos são normalmente formulados à base de frutas e legumes que são normalmente ricos em nutrientes e fontes naturais de compostos antioxidantes. Estudos recentes relatam que as antocianinas são capazes de reverter a diminuição na tradução de sinais neurais e déficits de funções motoras e cognitivas (Ramirez *et al.*, 2005). Especialmente para os bebês, a prevenção do estresse oxidativo está entre os benefícios de dietas ricas em antioxidantes (Buonocore *et al.*, 2002). Em vista disto, a elaboração de purês com apelo funcional aparece como uma alternativa interessante quando se considera o desenvolvimento do mercado de produtos à base de mirtilo.

Os possíveis benefícios à saúde dos produtos derivados de mirtilo são dependentes do tipo de produto, formulação e as condições de processamento, uma vez que vários estudos, inclusive o apresentado no Capítulo 3, apresentam a sensibilidade das antocianinas a altas temperaturas ao longo do processo de obtenção da polpa e suco. A aplicação de calor durante longos períodos de tempo juntamente com agitação contínua durante o bombeamento pode provocar o colapso estrutural irreversível em alimentos líquidos e torná-los pouco atraente para os consumidores. Uma alternativa tecnológica ainda pouco utilizada no Brasil, mas largamente utilizada nos Estados Unidos é a estruturação de frutas (Silva *et al.*, 2009), um produto que procura manter as características nutricionais e sensoriais por um período

relativamente prolongado (Santos, 2003). Estruturados de frutas são produtos obtidos de purê de frutas devidamente formulado para a obtenção de produtos nutritivos, com boa textura e sabor. Para tanto são utilizados hidrocolóides, responsáveis pela redução da umidade do alimento e estruturação da polpa, por meio de uma gelatinização, proporcionando textura e aspecto agradáveis ao produto final. Estas características e, conseqüentemente, a otimização de qualquer operação de transformação de produtos alimentares estão intimamente relacionados com as características reológicas das formulações utilizadas.

Devido à importância da caracterização reológica e modelagem de formulações de alimentos, o número de estudos científicos publicados sobre este assunto tem aumentado significativamente nos últimos anos. Na reologia de polpas de frutas, a grande maioria dos estudos relata um comportamento pseudoplástico, frequentemente combinado com a ocorrência de tensão de cisalhamento e/ou efeitos dependentes do tempo. Para representar o comportamento reológico destes produtos normalmente é utilizado o modelo de Ostwald-de Waele (ou Lei da Potência), porém trabalhos mais recentes têm apresentado modelos melhores, como os de Casson (de dois parâmetros) e o de Sisko (com três parâmetros). Além disso, as polpas e purês apresntam-se como não newtonianos, em virtude da sua complexa estrutura, relacionadas com as alterações estruturais induzidas por cisalhamento (Duran e Costell, 2007).

Além das propriedades de fluxo previamente estudadas para suco (Nindo *et al.*, 2005) e purê de mirtilo formulado com glicose (Nindo *et al.*, 2007), é importante entender o comportamento reológico de purê de mirtilo que utilizam hidrocolóides em sua formulação, especialmente para o processamento e manipulação de aplicações que envolvam bombeamento e mistura. Sob essa perspectiva, o objetivo deste estudo foi realizar uma caracterização do comportamento reológico do purê de mirtilo contendo goma xantana e frutose como ingredientes. Esta caracterização foi baseada em: *i*) medição e avaliação das propriedades reológicas em estado estacionário; *ii*) adequação dos diferentes modelos constitutivos aos dados experimentais, e *iii*) avaliação da influência do uso de goma xantana e frutose na formulação, bem como a temperatura sobre a resposta reológica (curvas de fluxo e os efeitos dependentes do tempo). Para tanto, o presente Capítulo mostra primeiramente uma breve revisão

bibliográfica sobre reologia de alimentos, seguido da aplicação destes conceitos para a caracterização reológica de diferentes formulações testadas neste estudo para purê de mirtilo.

10.1 Fundamentos Teóricos e Revisão Bibliográfica

Nesta seção são apresentados aspectos importantes relacionados a reologia de alimentos tais como: fundamentos de reologia, reometria, modelos reológicos para estado estacionário, efeito da temperatura sobre a viscosidade, efeito da composição no comportamento reológico e estudos reológicos realizados em sucos e purês de frutas.

10.1.1 Fundamentos de Reologia de Alimentos

A reologia descreve a deformação de um material sob a influência de tensões (Schramm, 2006). A palavra reologia (do grego: *rheo* = fluxo e *logos* = estudo) foi sugerida pela primeira vez por Bingham e Crawford, para descrever o fluxo, no caso de materiais fluidos (gases e líquidos) e deformação, no caso de materiais sólidos (Steffe, 1996).

Na área de alimentos, o conhecimento do comportamento reológico é útil para projetos de controle e processos e o dimensionamento de sistemas de tubulação, trocadores de calor, extrusores, misturadores, viscosímetros *online*, filtros, bombas, entre outros, bem como para a determinação da estrutura do alimento, caracterização física dos sólidos, líquidos e semi-sólidos, incluindo mudanças físico-químicas que ocorrem durante o processamento e armazenamento, testes de vida de prateleira ou *shelf-life* e avaliação da textura correlacionando com avaliação sensorial (Steffe, 1996; Vidal e Gasparetto, 2000; Moura *et al.*, 2003; Melo *et al.*, 2008).

Os líquidos ideais são chamados de Newtonianos, ou seja, seguem a Lei de Newton e apresentam a propriedade de escoar quando uma tensão de cisalhamento é aplicada. Enquanto isso nos fluidos que fogem dessa idealidade, os não-newtonianos, quando essa tensão é retirada, o líquido continua escoando até que a energia aplicada seja dissipada na forma de calor (McClements, 2005).

Para os fluídos ditos Newtonianos a viscosidade (μ) é influenciada somente pela temperatura do fluído e da sua composição, ou seja, quando a relação entre tensão de cisalhamento e o gradiente de velocidade possui um comportamento constante. Como a tensão de cisalhamento aplicada ao fluído é igual à força tangencial dividida pela área sobre a qual está agindo ($\tau = F/A$), e a taxa de deformação é dada pelo deslocamento das camadas por unidade de tempo ($\dot{\gamma} = d\gamma/dt$), para esse tipo de fluído tem-se a Equação 10.1:

$$\tau = \mu \cdot \dot{\gamma} \quad (10.1)$$

De acordo com Rao (2007) alguns alimentos costumam apresentar comportamento newtoniano, tais como leite, óleos, chás, bebidas carbonatadas, mel, vinhos e sucos clarificados. Todos os demais alimentos apresentam característica não-newtoniana.

O comportamento não-newtoniano pode se manifestar de diversas maneiras em um líquido, como ilustrado na Figura 9.20, de modo que a viscosidade dos sistemas pode depender da taxa de deformação ou do tempo de aplicação da tensão (Fasolin, 2009). A viscosidade destes materiais (η) é uma medida da sua resistência ao escoamento, ou seja, quanto mais alta a viscosidade, maior é a resistência ao escoamento (Malkin e Isayev, 2006). Para esse tipo de fluído tem-se a Equação 10.2:

$$\tau = \eta \cdot \dot{\gamma} \quad (10.2)$$

Os alimentos fluidos, devido à sua grande variedade em estrutura e composição, apresentam características reológicas que podem ir desde um simples comportamento newtoniano até um não-newtoniano que pode ou não ser dependente do tempo (Rao, 2007) como podemos observar na Figura 9.20.

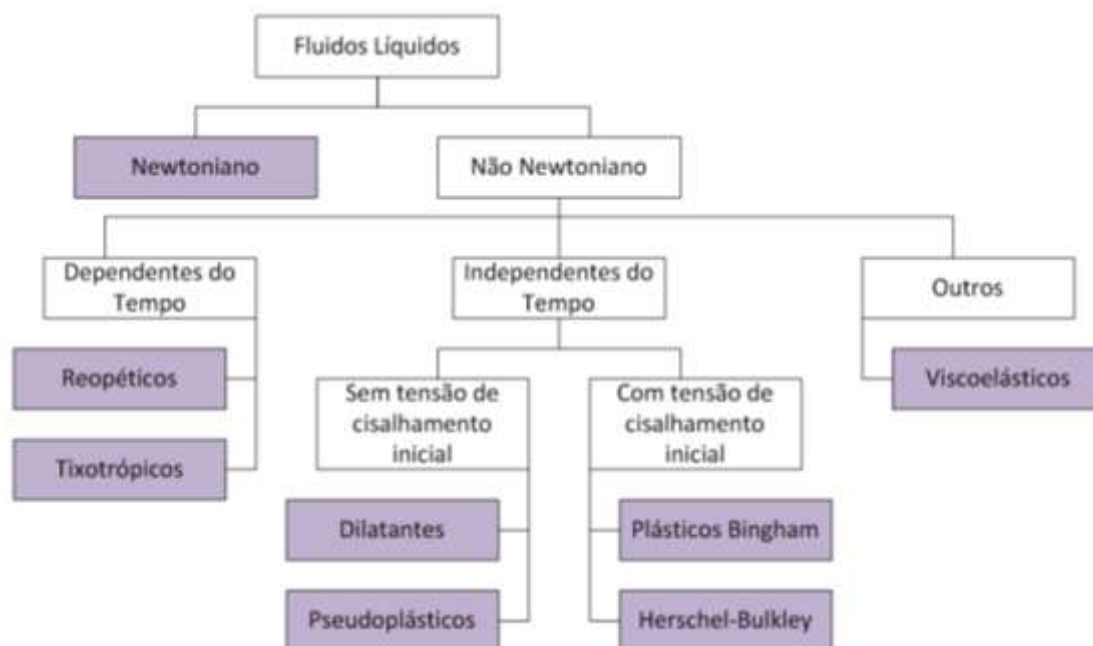


Figura 9.20 Classificação do comportamento reológico dos fluidos. **Fonte:** adaptado de Rao (2007).

A Figura 9.21 apresenta as curvas de escoamento típicas de fluidos independentes do tempo conforme descritas na Figura 9.20. Quando se trata de fluidos não newtonianos dependentes da taxa de deformação, os tipos mais comuns são os fluidos pseudoplásticos com ou sem tensão de cisalhamento inicial, τ_0 . A tensão de cisalhamento inicial ou residual pode ser utilizada para avaliar a força necessária para que um fluido saia da embalagem e para impedir a sedimentação de partículas suspensas, o que poderia ser fator determinante para a vida de prateleira de um produto alimentício (Rao, 2007).

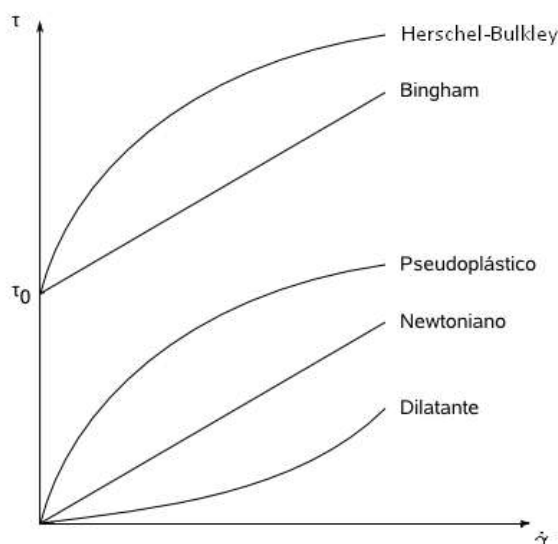


Figura 9.21 Curvas de escoamento típicas de fluidos independentes do tempo. Onde τ é a tensão de cisalhamento; τ_0 é a tensão de cisalhamento inicial e $\dot{\gamma}$ é a taxa de deformação. **Fonte:** adaptado de Schramm (2006).

Os fluidos pseudoplásticos são aqueles cuja viscosidade diminui com o aumento da taxa de deformação. Esse fato ocorre provavelmente devido ao alinhamento de partículas não-esféricas, remoção de moléculas de solvente ligadas às partículas ou ruptura e deformação de aglomerados (McClements, 2005). Podem ser citados, como exemplo deste tipo de comportamento, o chocolate fundido, catchup, maionese, creme de leite, polpas e sucos de frutas. A escolha da taxa de deformação a ser utilizada no cálculo da viscosidade aparente é de fundamental importância, considerando que ela é característica nos processos que ocorrem nos processos alimentícios, como agitação, escoamento através de tubulação, ou mastigação.

Já no caso dos sistemas dependentes do tempo, tem-se que a viscosidade dos fluidos pode aumentar ou diminuir com o tempo de cisalhamento. Essa dependência do tempo é usualmente associada com algum tipo de processo de relaxação, já que quando uma força externa é aplicada a um material em equilíbrio, este demora um determinado intervalo de tempo para atingir uma nova condição de equilíbrio, que é denominado tempo de relaxação (Fasolin, 2009). Assim, os comportamentos reológicos dependentes do tempo podem ser classificados como tixotrópico e reopético como mostrado na Figura 9.22. No comportamento tixotrópico, a viscosidade aparente do fluido diminui com o tempo de cisalhamento sob uma taxa de deformação constante, enquanto que no comportamento reopético ocorre o oposto

(McClements, 2005). Dentre os alimentos que apresentam tixotropia encontram-se leite condensado açucarado, clara de ovo, maionese (Rao, 2007) entre outros, enquanto que fluidos reopéticos são raros e não são muito frequentes na área de alimentos.

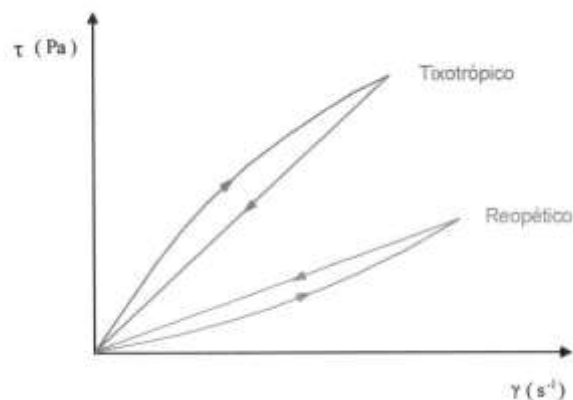


Figura 9.22 Curvas de escoamento para vários tipos de fluidos dependentes do tempo. Onde τ é a tensão de cisalhamento (Pa) e $\dot{\gamma}$ é a taxa de deformação (s^{-1}). Fonte: adaptado de Schramm (2006).

10.1.2 Reometria de Alimentos

A viscosidade é uma importante propriedade física relacionada com a qualidade dos produtos alimentícios fluidos. Como a viscosidade de fluidos não-newtonianos pode ser dependente da taxa de deformação, os reômetros são mais adequados para a medida das propriedades visco-elásticas. Já os viscosímetros são utilizados para a medida de escoamento com comportamento viscoso constante, como os newtonianos (Schramm, 2006).

O princípio dos reômetros rotacionais aliado aos sistemas de medição permite o desenvolvimento e a fabricação de versáteis reômetros. Os reômetros são classificados em: reômetros com tensão de cisalhamento controlada (*CS - Controlled Stress*) onde se determina a taxa de deformação; e os de taxa de deformação controlada (*CR - Controlled Rate*) em que se mede a tensão de cisalhamento. Alguns reômetros mais modernos podem trabalhar com ambos os modos de teste.

Os reômetros realizam medidas diretas da tensão de cisalhamento (τ) e da taxa de deformação ($\dot{\gamma}$) do fluido. Estes instrumentos possuem diversos arranjos, variando de acordo com a forma do fluxo, que podem ser utilizados: pratos paralelos, cone-prato e cilindros concêntricos. Nesses casos o fluxo ocorre entre uma geometria que se

move e outra que permanece estacionária (Schramm, 2006). A Tabela 9.9 mostra as principais geometrias e as suas respectivas relações mais usadas. A escolha da geometria mais apropriada para materiais complexos, como alimentos, é um ponto extremamente importante. Na prática, para qualquer fluido, é difícil encontrar a geometria que forneça uma taxa de deformação homogênea entre os pratos (cones, cilindros, discos). Então, na maioria dos casos, têm-se uma taxa de deformação heterogênea e os dados reométricos mostram apenas as características médias do escoamento (torque, velocidade de rotação, pressão)(Rao, 2007). Dentre estes sistemas, a geometria de cilindros concêntricos oferece bons resultados para sistemas de baixa viscosidade e para suspensões ou situações onde se necessite de altas taxas de deformação. Por outro lado, requer grande quantidade de amostra, apresentando, além disso, o problema dos diferentes regimes de fluxo (Silva, 2006).

Tabela 9.9 Exemplos de relações para determinar a viscosidade em arranjos experimentais padrões.

Geometria	Diagrama	Taxa de Deformação ($\dot{\gamma}$)	Viscosidade (η)
Pratos paralelos		$\dot{\gamma} = \frac{\Omega R}{B}$	$\eta(\dot{\gamma}) = \frac{(M/2\pi R^3)}{\dot{\gamma}} \left[3 + \frac{d \ln(M/2\pi R^3)}{d \ln \dot{\gamma}} \right]$
Cone-e-prato		$\dot{\gamma} = \frac{\Omega}{\alpha}$	$\eta(\dot{\gamma}) = \frac{3M}{2\pi R^3 \dot{\gamma}}$
Cilindros Concêntricos (Couette)		$\dot{\gamma} = \frac{ \Omega_e - \Omega_i R_0}{R_1 - R_0}$	$\eta(\dot{\gamma}) = \frac{M(R_1 - R_0)}{2\pi R_0^3 B \Omega_e - \Omega_i }$

M é o torque necessário para manter a velocidade angular (N.m); Ω é a velocidade angular (rad/s); α é o ângulo formado entre o cone e o prato (rad) – usualmente menor que 4°; Ω_i é a velocidade angular do cilindro interno (rad/s) e Ω_e é a velocidade angular do cilindro externo (rad/s). Fonte: adaptado de Bird *et al.* (1987).

10.1.3 Modelos Reológicos em estado estacionário

O comportamento dos fluidos é descrito através de modelos reológicos, que relacionam tensão de cisalhamento com a taxa de deformação. O modelo reológico mais simples é o newtoniano, que apresenta uma relação linear entre tensão de cisalhamento e taxa de deformação. No entanto, a maioria dos alimentos fluidos não apresenta esse tipo de comportamento e requer modelos mais complexos para sua caracterização (Rao, 2007). A escolha do modelo a ser utilizado é uma função das características do fluido como se pode observar na Tabela 9.10 que lista os modelos mais comumente utilizados de acordo com o tipo de alimento, com destaque para derivados de frutas. Além das equações dispostas nesta tabela, Ribas e Barbosa-Cánovas (2005) citam ainda outros modelos reológicos para alimentos viscosos independentes do tempo, como as equações de: Casson modificada, Elson, Vocadlo, Shangraw, Sutterby, Springs Truncado e Williamson. Porém, no estudo desses mesmos autores não foi localizada a aplicação dessas equações em derivados de frutas.

Tabela 9.10 Modelos mais comumente utilizados de acordo com o tipo de alimento.

Denominação	Equação	Aplicação
<i>Modelos com 1 parâmetro</i>		
Newton	$\tau = \mu\dot{\gamma}$	Água, suco de cenoura (Vandresen <i>et al.</i> , 2009) e leite, mel e sucos clarificados (Steffe, 1996).
<i>Modelos com 2 parâmetros</i>		
Oswald-de Waele ou Lei da Potência	$\tau = K_{OW}\dot{\gamma}^{n_{OW}}$	Geléias e purês de framboesa, morango, ameixa e pêssego (Maceiras <i>et al.</i> , 2007), extrato de sementes de balangu (Razavi e Karazhiyan, 2009), suco concentrado do toranja (Chin <i>et al.</i> , 2009), suco de cenoura (Vandresen <i>et al.</i> , 2009), mirtilo (Nindo <i>et al.</i> , 2007) e polpa de abacaxi (Pelegrine <i>et al.</i> , 2002).
Casson	$\tau^{0,5} = k_{0C} + K_C\dot{\gamma}^{0,5}$	Popla de cupuaçu (Cabral <i>et al.</i> , 2002), suco de cenoura (Vandresen <i>et al.</i> , 2009), mirtilo (Nindo <i>et al.</i> , 2007), polpa de abacaxi (Pelegrine <i>et al.</i> , 2002) e chocolate (Steffe, 1996)
Bingham	$\tau = \tau_0 + \eta_{\infty}\dot{\gamma}$	Suco de cenoura (Vandresen <i>et al.</i> , 2009) e purê de tomate (Steffe, 1996).
<i>Modelos com 3 parâmetros</i>		
Mizrahi-Berk	$\tau^{0,5} = k_0 + K_{MB}\dot{\gamma}^{n_{MB}}$	Polpa de manga (Vidal <i>et al.</i> , 2004), polpa de cupuaçu (Cabral <i>et al.</i> , 2002), suco de cenoura (Vandresen <i>et al.</i> , 2009), polpa de abacaxi (Pelegrine <i>et al.</i> , 2002)
Herschel-Bulkley	$\tau = \tau_0 + K_{HB}\dot{\gamma}^{n_{HB}}$	Polpa de jabuticaba (Sato e Cunha, 2009), suco de cenoura (Vandresen <i>et al.</i> , 2009), mirtilo (Nindo <i>et al.</i> , 2007), polpa de tomate (Sharma <i>et al.</i> , 1996) e purês e géleias de framboesa, morango, ameixa e pêssego (Maceiras <i>et al.</i> , 2007).
Sisko	$\eta_a = \eta_{\infty} + K_S\dot{\gamma}^{n_S-1}$	Mirtilo (Nindo <i>et al.</i> , 2007)

τ é a tensão de cisalhamento (Pa); $\dot{\gamma}$ é a taxa de deformação (s^{-1}); μ é a viscosidade de fluidos newtonianos; K_{OW} é o índice de consistência de Oswald-de Waele ($Pa \cdot s^n$); n é o índice de comportamento do fluido (adimensional); K_0 é a raiz quadrada da tensão inicial ($Pa^{0,5}$); k_{0C} ou $\tau_0^{0,5}$ é a tensão de cisalhamento inicial de Casson ($Pa^{0,5}$); K_C é a viscosidade plástica de Casson ($Pa \cdot s^{0,5}$); η_{∞} é o índice de consistência de Bingham ($Pa \cdot s^n$); K_{MB} é o índice de consistência de Mizrahi-Berk ($Pa^{0,5} \cdot s^{n_{MB}}$); n_{MB} é o índice de comportamento do fluido de Mizrahi-Berk (adimensional); K_{HB} é o índice de consistência de Herschel-Bulkley ($Pa \cdot s^{n_{HB}}$); n_{HB} é o índice de comportamento do fluido de Herschel-Bulkley (adimensional); $\eta_a = \tau/\dot{\gamma}$ é a viscosidade aparente (Pa.s); η_{∞} é a viscosidade para a taxa de deformação infinita (Pa.s); K_S é o coeficiente de consistência de Sisko ($Pa \cdot s^{n-1}$); e n_S é o índice de comportamento de Sisko (adimensional).

10.1.4 Estudos reológicos em derivados de frutas

Devido à importância da caracterização reológica para a indústria de alimentos, o número de estudos científicos publicados sobre este assunto tem aumentado significativamente nos últimos anos (Lorenzo *et al.*, 2008; Fischer *et al.*, 2009; Karazhiyan *et al.*, 2009; Sato e Cunha, 2009; Laca *et al.*, 2010). Focalizando exclusivamente na reologia de polpas de frutas e purês, a maioria dos estudos relata comportamento pseudoplástico, frequentemente combinada com a ocorrência de estresse rendimento e/ou efeitos dependentes do tempo. A reologia complexa destes produtos é consequência da natureza bifásica, com as suas características não-newtonianas, estar relacionada a alterações estruturais induzidas por cisalhamento (Duran e Costell, 2007).

De acordo com Vidal e Gasparetto (2000) apesar do comportamento reológico ocupar posição de grande destaque há escassez de dados sobre propriedades reológicas de sucos, polpas e misturas de frutas brasileiras. Essa seção apresenta brevemente alguns estudos realizados no sentido de caracterizar e modelar a reologia de polpas de frutas diferentes e purês.

Harnanan *et al.* (2001) investigaram o comportamento reológico de polpas de goiaba branca e rosa variando a taxa de deformação de 0,6 a 145,8 s⁻¹. Para o ajuste dos dados experimentais utilizaram os modelos da lei de potência, Casson, Herschel-Bulkley e Michaels-Bolger. Para o modelo da Lei da Potência, os valores do índice de comportamento ficaram na faixa de 0,14 a 0,19. Ditchfield *et al.* (2004) determinaram as curvas reológicas do purê de banana em temperaturas variando de 30 a 120 °C, utilizando um reômetro do tipo CR (tensão de cisalhamento variável), e indicaram que o modelo de Herschel-Bulkley apresentou melhor ajuste dos dados experimentais para toda a faixa de temperatura estudada. Sato e Cunha (2009), estudaram a reologia de jabuticaba em reômetro tipo CR em diferentes temperaturas (5, 25, 45, 65 e 85 °C), também identificaram o modelo de Herschel-Bulkley como o melhor para o ajuste dos dados experimentais.

Maceiras *et al.* (2007) estudaram o comportamento reológico de diferentes frutos (framboesa, morango, pêssego e ameixa) frescos e cozidos com temperaturas de 20 e 40 °C, relatando que ambos os modelos, Ostwald-de Waele e Herschel-Bulkley,

forneceram bom ajuste. Haminiuk *et al.* (2006) investigaram o comportamento reológico da polpa de araçá em um intervalo de taxa de deformação de 2,80 a 70 s⁻¹. A polpa integral foi devidamente descrita pelo modelo de lei de potência e exibiu um comportamento pseudoplástico.

Nindo *et al.* (2007) investigaram a influência da temperatura e do teor de sólidos sobre as propriedades reológicas de polpas de mirtilo, para taxas de deformação variando de 1 a 10 s⁻¹. Os autores identificaram o modelo de Sisko, entre os modelos de três parâmetros, como o que melhor representava o comportamento da polpa.

O fato de que se destaca entre esses estudos é que não existe um modelo universal para a resposta da tensão de cisalhamento de polpas de frutas e purês, o que torna a escolha de um modelo reológico adequado para um sistema específico uma questão relevante. Por outro lado, relativamente pouca informação pode ser encontrada na literatura sobre os efeitos do tempo sobre as propriedades reológicas deste tipo de sistema e sobre a influência da formulação sobre essas propriedades.

10.2 Materiais e Métodos

Nesta seção são apresentados os materiais, a descrição dos testes reológicos, o planejamento do experimento e os detalhes da modelagem dos dados.

10.2.1 Materiais

O mirtilo (*Vaccinium ashei*), adquirido em um mercado local, passou por um processo de classificação e seleção com a finalidade de eliminar os frutos deteriorados e padronizar o tamanho. A polpa a ser utilizada para as diferentes formulações de purê foi obtida a partir de uma única batelada de processamento. O despulpamento foi realizado em despulpadeira de facas com tela de 1,6 mm de abertura. As polpas (pH=4,5 e 9,5 °Brix) foram então embaladas em porções de aproximadamente 60 g, em frascos plásticos estéreis e descartáveis, congeladas e estocadas a -18 °C por um período de 2 semanas até o momento dos tratamentos. A polpa utilizada para todas as formulações foi obtida de uma mesma batelada.

As diferentes formulações de purê foram homogeneizadas manualmente a temperatura ambiente de acordo com a formulação definida pelo desenho experimental da seção 10.2.3.

10.2.2 Testes Reológicos

O comportamento reológico das amostras foi medido em reômetro rotacional (Ares, TA Instruments, New Castle, E.U.A.) utilizando uma geometria de cilindros concêntricos com as seguintes dimensões: diâmetro do cilindro interno de 27 mm; diâmetro do cilindro externo de 25 mm e comprimento de 32 mm. A quantidade de purê usada em cada tratamento foi de aproximadamente 8 g. As etapas seguidas em cada teste foram: *i)* carregamento da amostra no suporte de medição; *ii)* homogeneização da temperatura da amostra durante 5 min; *iii)* leitura da taxa de deformação ascendente ($2-300\text{ s}^{-1}$) e *iv)* leitura da taxa de deformação descendente ($300-2\text{ s}^{-1}$). Em ambas as rampas (ascendente e descendente), 10 valores de taxa de deformação foram utilizados (2, 30, 60, 95, 130, 165, 200, 235, 270 e 300 s^{-1}), com uma duração de 3 min para cada ciclo. O erro experimental observado nas medidas ficou em torno de 7%. A tixotropia das amostras foi quantificada como a diferença entre as áreas das curvas ascendente e descendente (Razavi e Karazhiyan, 2009).

10.2.3 Desenho experimental e análise estatística

Um planejamento fatorial 2^3 composto central rotacional (CCR), com seis pontos axiais ($\alpha = 1,67$) e cinco repetições no ponto central (total de 19 experimentos) foi empregado para estudar o efeito das variáveis independentes sobre o comportamento reológico das formulações de purê de mirtilo. A fim de melhorar a estrutura do purê e aumentar a sua estabilidade, foi utilizada como hidrocolóide a goma xantana e para melhorar o sabor e palatibilidade do purê utilizou-se a frutose como fonte de carboidrato. Ainda, durante o processamento dos purês costuma-se utilizar temperaturas entre 25 e 90°C e o comportamento desses aditivos, assim como o do próprio purê, sofre alterações significativas que impactam nas operações unitárias. Assim, as variáveis independentes desse estudo foram: teor de goma xantana (Goma xantana, Hexus Food[®], São Leopoldo, Brasil), (X_1), teor de frutose (frutose, Doce Menor[®], São Paulo, Brasil), (X_2) e temperatura do tratamento

reológico, (X_3). Os níveis com os respectivos valores utilizados para o teor de goma xantana e frutose e para a temperatura estão apresentados na Tabela 9.11 onde é possível observar que cada variável independente possui 5 níveis codificados (-1,67, -1, 0, +1 e +1,67). Os experimentos foram realizados em modo aleatório, para minimizar os efeitos dos erros sistemáticos.

Tabela 9.11 Valores utilizados no delineamento fatorial em função dos níveis para as variáveis de estudo empregado para o purê de mirtilo.

Níveis	Goma Xantana (%)	Frutose (%)	Temperatura (°C)
	X_1	X_2	X_3
-1,67	1,6	6,6	27
-1	2	10	40
0	2,5	15	60
1	3	20	80
1,67	3,3	23,4	93

Os resultados dos experimentos realizados foram avaliados utilizando a metodologia de análise da variância (ANOVA) para definir a significância de efeitos e gerar as curvas de contorno. Toda a análise estatística foi realizada utilizando o programa Statistica para Windows (versão 7.0, Statsoft®, Tulsa, USA) e, com base no erro experimental observado nas medidas reológicas, utilizou um grau de confiança de 93% para a análise da variância.

10.2.4 Modelos Reológicos

Seis diferentes modelos reológicos para fluidos não-newtonianos (Ibartz *et al.*, 1996; Akdogan e Mchugh, 2000; Dak *et al.*, 2006; Gratão *et al.*, 2007; Nindo *et al.*, 2007; Vandresen *et al.*, 2009) foram testados para o ajuste dos dados experimentais:

$$\text{Bingham:} \quad \tau = \tau_0 + \eta_{\infty B}(\dot{\gamma}) \quad (10.3)$$

$$\text{Ostwald-de Waele:} \quad \tau = K(\dot{\gamma})^n \quad (10.4)$$

$$\text{Herschel-Bulkley:} \quad \tau = \tau_0 + K(\dot{\gamma})^n \quad (10.5)$$

$$\text{Mizrahi-Berk:} \quad \tau^{0,5} = \tau_0^{0,5} + K(\dot{\gamma})^n \quad (10.6)$$

$$\text{Casson:} \quad \tau^{0,5} = k_{0C} + K_C(\dot{\gamma})^{0,5} = \tau_{0C}^{0,5} + (\eta_C \dot{\gamma})^{0,5} \quad (10.7)$$

$$\text{Sisko:} \quad \frac{\tau}{\dot{\gamma}} = \eta_a = \eta_{\infty S} + K_S \dot{\gamma}^{n_S-1} \quad (10.8)$$

onde: τ é a tensão de cisalhamento (Pa), τ_0 é a tensão de cisalhamento inicial (Pa); $\eta_{\infty B}$ é o índice de consistência de Bingham (Pa.s); $\dot{\gamma}$ é a taxa de deformação (s^{-1}); n é o índice de fluxo (adimensional), K é o índice de consistência ($Pa \cdot s^n$); τ_{0C} é a tensão de cisalhamento inicial de Casson (Pa); η_C é a viscosidade plástica de Casson (Pa.s); k_{0C} é a raiz quadrada da tensão de cisalhamento de Casson ($Pa^{0,5}$); K_C é a raiz quadrada da viscosidade plástica de Casson ($Pa^{0,5} \cdot s^{0,5}$); η_a é a viscosidade aparente (Pa.s); $\eta_{\infty S}$ é o viscosidade de cisalhamento infinita de Sisko (Pa.s), K_S é o índice de consistência Sisko ($Pa \cdot s^{n-1}$) e n_S é o índice de fluxo de Sisko (adimensional). A segunda forma do modelo de Casson na Equação 10.6, foi apresentada apenas para uma melhor compreensão da natureza dos parâmetros envolvidos (τ_{0C} e η_C). Para a estimativa de parâmetros e ANOVA a primeira forma (com k_{0C} e K_C), que também é comum na literatura (Haminiuk *et al.*, 2006; Nindo *et al.*, 2007), foi usada para atingir menor variabilidade dos parâmetros estimados.

A estimação de parâmetros para todos os modelos foi realizada pelo método dos mínimos quadrados, utilizando o software Origin® 7 (OriginLab Corporation, Northampton, E.U.A.). O erro percentual médio entre os valores experimentais e preditos foram calculados de acordo com a Equação 10.9:

$$E (\%) = \frac{100}{n} \sum_{i=1}^n \left| \frac{y_{exp} - y_{calc}}{y_{exp}} \right| \quad (10.9)$$

onde N é o número de dados experimentais, e y_{exp} e y_{calc} são, respectivamente, os valores experimentais e preditos.

10.3 Resultados e Discussão

Nesta seção estão apresentados e discutidos os resultados dos tratamentos reológicos. Primeiramente são apresentados os resultados para a caracterização geral do comportamento reológico do purê, considerando o ponto central do planejamento fatorial. Na sequencia discute-se a influência da composição no comportamento pseudoplástico do purê por meio da adequação dos dados experimentais aos modelos

constitutivos e a avaliação dos efeitos das variáveis de interesse nos parâmetros estimados. Por fim faz-se uma avaliação da característica tixotrópica das amostras.

10.3.1 Descrição geral do comportamento reológico apresentado pelas formulações de purê de mirtilo

Em termos gerais todas as formulações de purê analisadas apresentaram características reológicas semelhantes. Portanto, para simplificar a discussão dos resultados, as características gerais do comportamento reológico do purê de mirtilo são discutidas tomando o exemplo do ponto central do planejamento fatorial (Tratamento 19).

Na Figura 9.23 são apresentadas as curvas acendentes e descendentes referentes ao Tratamento 19. A dependência da viscosidade com o tempo é evidenciada pelo fato de que estas curvas não são coincidentes, indicando que o purê de mirtilo formulado com goma xantana e frutose apresenta um comportamento tixotrópico. Resultados semelhantes foram relatados para *Lepidium sativum* (Karazhiyan *et al.*, 2009), suco de uva concentrado (Arslan *et al.*, 2005) e as polpas de abacaxi e manga (Kaya e Belibagli, 2002; Pelegrine *et al.*, 2002). Esse comportamento pode ser atribuído às mudanças estruturais na amostra devido às forças hidrodinâmicas geradas e ao conseqüente alinhamento das moléculas na direção do escoamento (Alparsalan e Hayta, 2002).

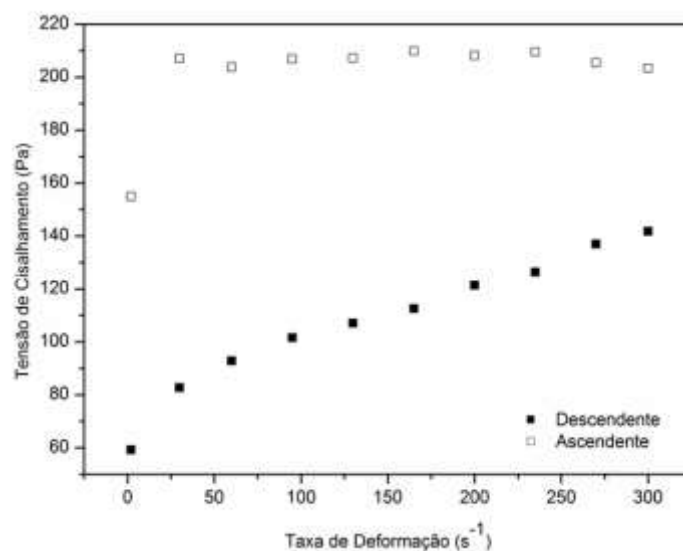


Figura 9.23 Curvas de taxa de deformação ascendente e descendente para purê de mirtilo (Formulação 19).

Visando minimizar os efeitos relacionados com a tixotropia do material, na análise dos efeitos da taxa de deformação e da temperatura sobre a viscosidade do purê de mirtilo utilizou-se somente os dados da etapa de taxa de deformação decrescente, como sugerido por Sato e Cunha (2009).

As referidas curvas nas temperaturas de 27, 40, 50, 60, 70, 80 e 93 °C para uma formulação com 2,5% de goma xantana e 15% de frutose (ou seja, uma formulação equivalente à utilizada no Tratamento 19) são mostradas na Figura 9.24. Nesta figura pode-se observar que o purê de mirtilo formulado com goma xantana apresenta comportamento pseudoplástico em todas as condições analisadas. O mesmo comportamento foi relatado para as formulações de purê de mirtilo contendo apenas glucose e polpa de mirtilo (Nindo *et al.*, 2007). Quanto ao efeito da temperatura (Figura 9.24) o comportamento típico descrito na literatura para diferentes tipos de purê foi observada: diminuição da viscosidade com o aumento da temperatura.

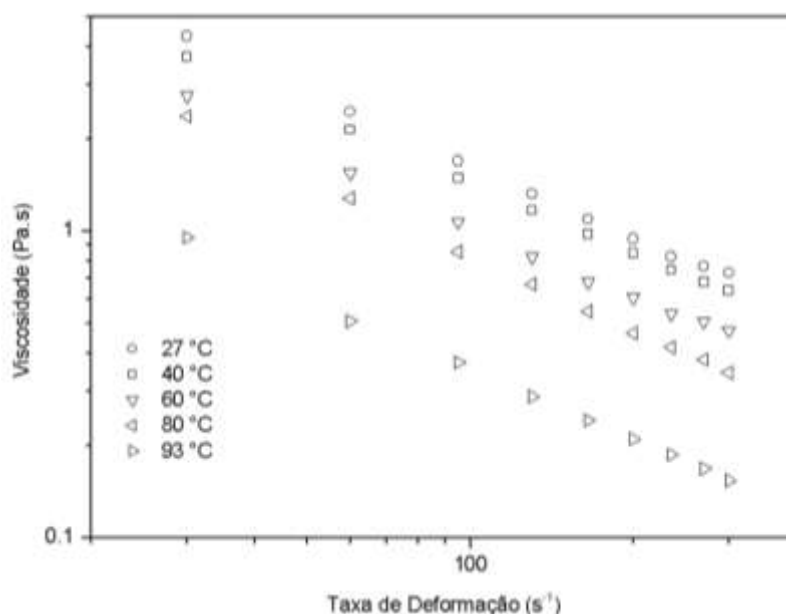


Figura 9.24 Curvas de taxa de deformação decrescente (em escala logarítmica) para purê de mirtilo formulado com 2,5 % de Goma Xantana e 15 % de frutose avaliados nas temperaturas de 27, 40, 50, 60, 70, 80 e 93 °C.

10.3.2 Efeito da composição sobre o comportamento pseudoplástico de purês de mirtilo

As curvas de escoamento obtidas nos experimentos realizados de acordo com a Tabela 9.11 são mostradas na Figura 9.25. Também neste caso são apresentados

somente os dados correspondentes à etapa de taxa de deformação decrescente. Devido ao comportamento pseudoplástico das amostras, além das variáveis estipuladas no planejamento experimental (% de goma, % de frutose e temperatura), a taxa de deformação aparece como uma variável adicional na etapa de análise dos resultados. Assim, a fim de sistematizar a análise estatística dos resultados do planejamento, adotou-se uma estratégia baseada em duas etapas: *i)* estudo da adequação de diferentes modelos constitutivos na representação dos dados de viscosidade do purê de mirtilo e *ii)* estudo do efeito das variáveis de interesse sobre os parâmetros do modelo reológico selecionado, utilizando a análise da variância (ANOVA) e a metodologia de superfície de resposta (RSM).

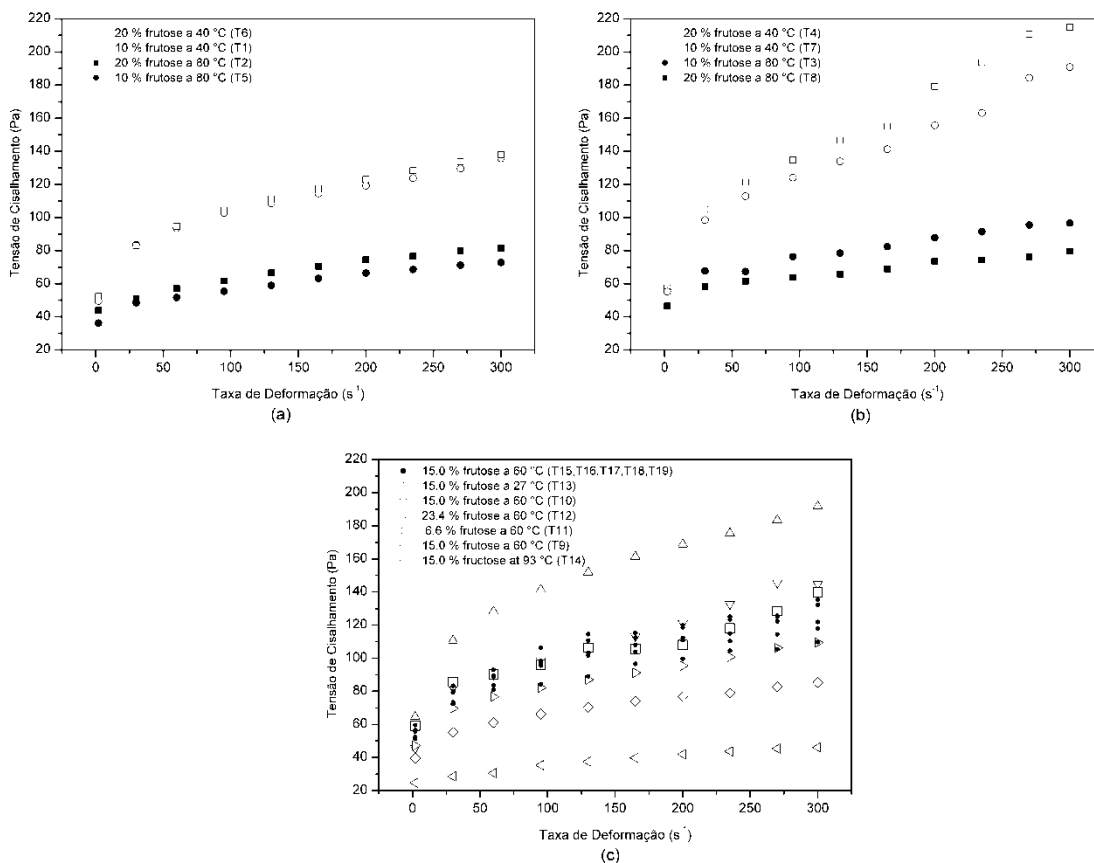


Figura 9.25 Comportamento reológico de purê de mirtilo para diferentes percentuais de Goma Xantana: (a) 2 %; (b) 3 % e (c) 2,5 %.

10.3.2.1 Estudo da adequação de modelos constitutivos para o purê de mirtilo

No estudo da adequação de modelos constitutivos, foram testados os 6 modelos reológicos descritos na Seção 10.2.4 (Bingham, Ostwald-de Waele, Herschel-Bulkley, Mizrahi-Berk, Casson e Sisko). Os resultados da estimação de parâmetros são apresentados na Tabela B.10. para os modelos de dois parâmetros (Bingham, Ostwald-de Waele e Casson) e nas Tabela B.10.2, Tabela B.10.3 e Tabela B.10.4 para os modelos de três parâmetros (Mizrahi -Berk, Herschel-Bulkley e Sisko).

A partir dos dados dessas tabelas calcularam-se os valores médios dos desvios padrão dos parâmetros estatísticos (desvio padrão médio de cada parâmetro do modelo considerado, coeficientes de correlação, e χ^2), que são apresentados na Tabela 9.12. Observa-se que entre os modelos de dois parâmetros o modelo de Casson é o que apresenta melhor qualidade de ajuste, caracterizada pelos valores mais baixo do desvio padrão médio dos parâmetros, do erro médio e de χ^2 e pelo valor mais elevado de R^2 . Análise similar mostra que o melhor desempenho entre os modelos de três parâmetros foi apresentado pelo modelo de Sisko.

Tabela 9.12 Valores médios dos parâmetros estatísticos para os diferentes modelos.

Parâmetro	Bingham	Ostwald-de Waele	Casson	Mizrahi-Berk	Herschel-Bulkley	Sisko
τ_0	6,00%	---	---	19,31%	14,99%	20,19%
η_∞	10,97%	---	---	---	---	---
K	---	8,00%	2,40%	42,74%	39,43%	5,03%
κ_{oc}	---	---	5,95%	---	---	---
n	---	8,63%	---	17,52%	13,78%	15,20%
Erro	4,94	3,30	2,76	1,76	1,81	1,58
R^2	0,953	0,977	0,987	0,994	0,994	0,995
χ^2	62,40	24,28	19,39	10,10	10,63	7,79

Na comparação entre os modelos de Casson e Sisko observa-se que esse último obteve um melhor ajuste dos dados experimentais (Figura 9.26), caracterizado pelos maiores valores de R^2 e χ^2 (Tabela 9.12). Por outro lado, os desvios-padrão dos parâmetros estimados para o modelo de Sisko foram superiores aos obtidos para Casson, que pode ser atribuído ao maior número de parâmetros no modelo de Sisko e ao número relativamente pequeno de pontos experimentais. Considerando o objetivo de utilizar os parâmetros do modelo reológico como base para a análise do efeito das variáveis de interesse (conteúdo de goma xantana e frutose e temperatura) na reologia purê de mirtilo, a pequena variabilidade dos parâmetros constitui um

requisito essencial para a aplicação confiável da ANOVA. Por esta razão, o modelo de Casson foi escolhido para ser utilizado nas demais seções deste trabalho, onde os efeitos da formulação e da temperatura no comportamento reológico do purê de mirtilo foram estudados.

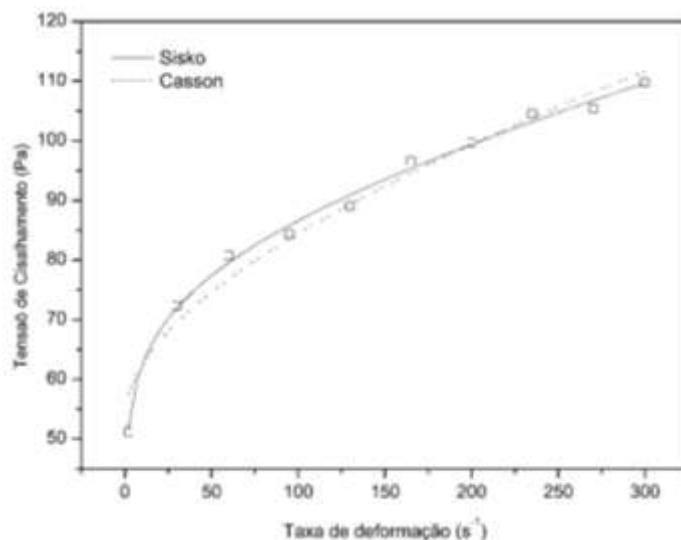


Figura 9.26 Valores experimentais e preditos pelos modelos de Casson e Sisko para o Tratamento 15 (ponto central).

10.3.2.2 Efeito das variáveis de interesse sobre o limite de escoamento de Casson (k_{OC})

A Tabela A.10.1 mostra a Análise de Variância (ANOVA) para o limite de escoamento de Casson (k_{OC}). Nela podemos observar que o teor de Goma Xantana e a temperatura exercem uma influência significativa ($p < 0,07$) sobre este parâmetro, enquanto que o teor de frutose não apresentou influência significativa ($p > 0,07$) sobre o limite de escoamento na faixa de teores estudada.

Fazendo-se a estimação de parâmetros a partir dos resultados da ANOVA, obteve-se para o limite de escoamento de Casson o seguinte modelo estatístico:

$$k_{OC} = 7,53(\pm 0,09) + 0,17(\pm 0,07) \times x_1 - 0,25(\pm 0,06) \times x_1^2 - 0,75(\pm 0,07) \times x_3 - 0,29(\pm 0,07) \times x_3^2 + 0,22(\pm 0,09) \times x_1 \times x_3 \quad (10.10)$$

onde a notação $\alpha_i(\pm \sigma_{\alpha_i})$ foi utilizada para facilitar apresentação da informação relativa ao desvio padrão (σ) de cada parâmetro estimado. Nesta notação α_i representa cada um dos parâmetros estimados e σ_{α_i} indica o desvio padrão do respectivo parâmetro. O valor de R^2 obtido com este modelo foi de 0,8230. As curvas

de contorno obtidas para k_{OC} com a Equação 10.10 são apresentadas na Figura 9.27, onde observa-se que o valor máximo de k_{OC} para as formulações estudadas do purê de mirtilo é obtido a baixas temperaturas e teores de goma em torno de 2,5%.

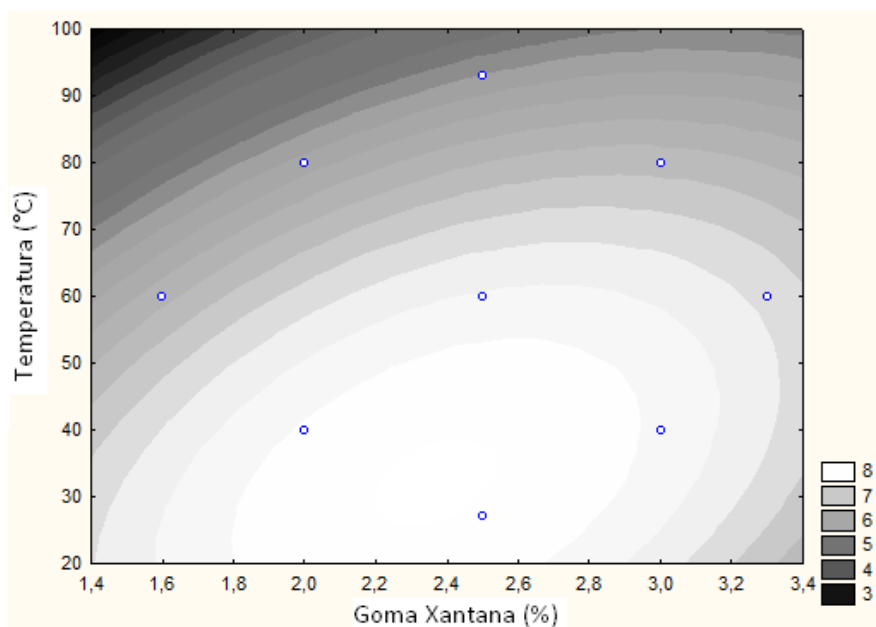


Figura 9.27 Curva de Contorno para o limite de escoamento de Casson (k_{OC}) para amostras com 15% de frutose.

10.3.2.3 Efeito das variáveis de interesse sobre a viscosidade plástica de Casson (K_C)

A Tabela A.10.2 mostra a Análise de Variância (ANOVA) para a viscosidade plástica de Casson (K_C). Nela podemos observar que o teor de goma xantana, a temperatura e a interação entre ambos exercem uma influência significativa ($p < 0,07$) sobre a viscosidade plástica de Casson, enquanto que o teor de frutose, dentro da faixa estudada, não apresentou influencia significativa ($p > 0,07$) sobre este índice.

O modelo estatístico obtido usando os efeitos significativos definidos na Tabela A.10.2 foi o seguinte:

$$K_C = 0,2220(\pm 0,0046) + 0,0332(\pm 0,0054) \times x_1 - 0,0749(\pm 0,0054) \times x_1^2 - 0,0397(\pm 0,0070) \times x_1 \times x_3 \quad (10.11)$$

o qual resultou em um R^2 de 0,9214. A superfície de resposta obtida com esse modelo (Figura 9.28) o teor de goma aparece como o fator determinante para a definição de K_C e, conseqüentemente, da viscosidade em longos períodos de cisalhamento nas formulações estudadas purê de mirtilo, embora os efeitos da temperatura só se tornem importantes para altos teores de goma xantana.

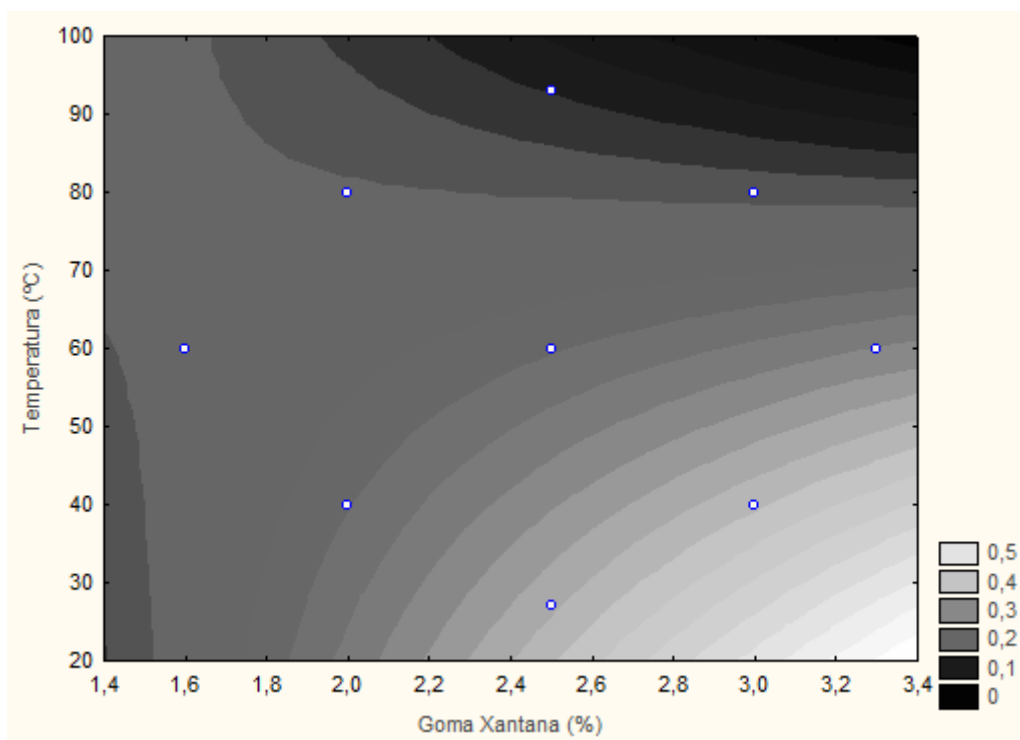


Figura 9.28 Curva de Contorno para a viscosidade plástica de Casson (K_C) para amostras com 15% de frutose.

10.3.3 Dependência com o tempo das Amostras

Tomando como base a área de histerese entre as curvas de fluxo ascendente e descendente analisou-se a dependência com o tempo do purê de mirtilo em função da composição. Os resultados para a área de histerese para os diferentes experimentos e a análise de variância são apresentados na Tabela 9.13 e Tabela A.10.3,

respectivamente. Pode-se observar que a dependência do tempo, representada pela área de histerese, sobre as variáveis estudadas é mais complexa do que a observada anteriormente, em termos dos parâmetros do modelo de Casson. Para essa dependência, todas as três variáveis estudadas apresentaram efeitos significativos, além da interação significativa entre elas (x_1x_2 e x_2x_3). Embora a interação entre goma xantana e monossacarídeos tenha sido relatada por outros autores (Launay *et al.*, 1997; Wei *et al.*, 2001; Ptaszek *et al.*, 2007) um ponto interessante a ser notado é o fato de que o teor de frutose influenciou a dependência com o tempo, mas não os parâmetros do modelo de Casson. A principal diferença entre essas variáveis é que os parâmetros do modelo de Casson foram determinados exclusivamente a partir de longas taxas de deformação enquanto a dependência com o tempo foi calculada a partir da diferença entre curtas e longas taxas de deformação. Como consequência, esses resultados sugerem que a interação goma xantana/frutose seja mais eficaz antes do alinhamento das moléculas de goma induzidas pelo cisalhamento.

Tabela 9.13 Valores de dependência com o tempo para as amostras de purê de mirtilo.

Tratamento	Área de Histerese (Pa.s ⁻¹)	Tratamento	Área de Histerese (Pa.s ⁻¹)
T1	14.815	T11	23.840
T2	15.800	T12	27.428
T3	21.525	T13	22.799
T4	36.003	T14	14.859
T5	10.283	T15	21.958
T6	15.619	T16	26.342
T7	30.591	T17	26.949
T8	40.201	T18	24.006
T9	9.151	T19	27.229
T10	40.478		

O modelo estatístico obtido considerando somente as variáveis com efeitos significativos (Tabela A.10.3) foi o seguinte:

$$Dtempo = 25489(\pm 678) + 18144(\pm 1214) \times x_1 + 5341(\pm 1222) \times x_2 - 3320(\pm 1230) \times x_3 - 4849(\pm 1237) \times x_3^2 + 4442(\pm 1596) \times x_1 \times x_2 + 4494(\pm 1596) \times x_2 \times x_3 \quad (10.12)$$

o qual *Dtempo* rerepresenta a dependência com o tempo e o modelo apresenta um R² de 0,9598. A análise das curvas de contorno obtidas com este modelo (Figura 9.29)

evidencia a complexa relação entre a dependência com o tempo do purê de mirtilo e a sua formulação, sendo possível observar a existência de uma concentração crítica de goma (próximo a 2,5% de goma na temperatura de 40 °C) para a qual o efeito do teor de frutose não tem influência sobre a dependência com o tempo do purê. Abaixo dessa concentração crítica, a qual depende da temperatura, o aumento da concentração de frutose causa diminuição da dependência com o tempo, enquanto acima dela o efeito é no sentido oposto, ou seja, do aumento da dependência com o tempo.

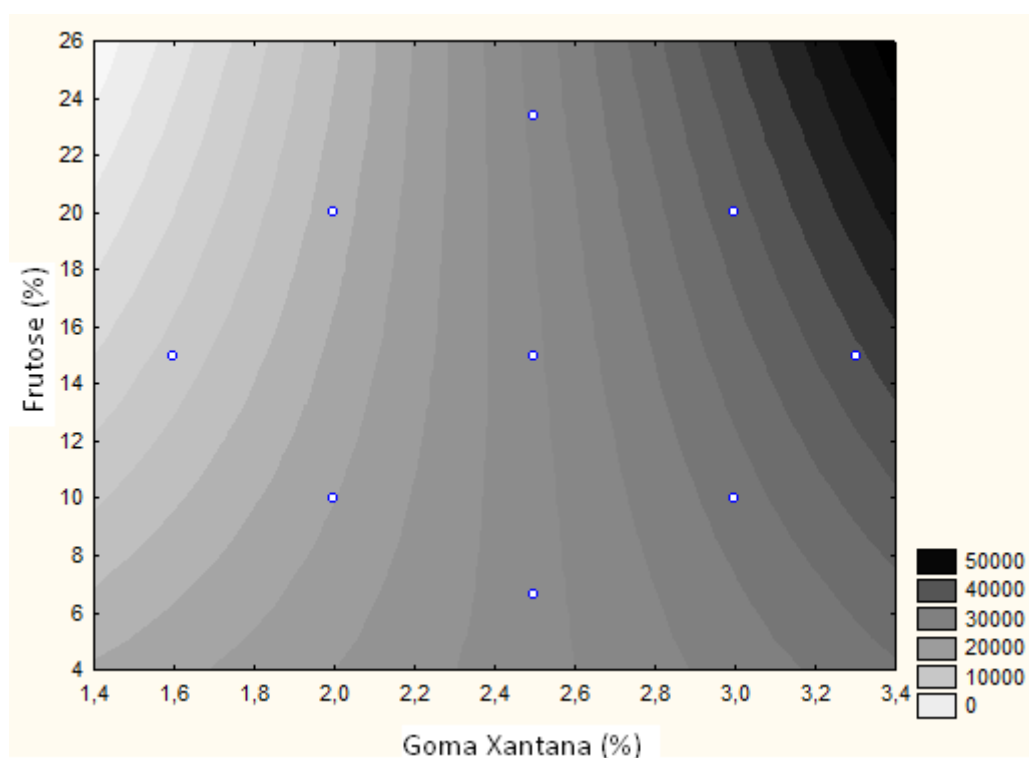


Figura 9.29 Curva de contorno para a dependência com o tempo do purê de mirtilo em função da formulação para temperatura de 40°C.

10.4 Conclusões

O presente trabalho estudou a influência da adição de goma xantana e frutose e da temperatura no comportamento reológico de purês de mirtilo. Os resultados mostraram que esses purês apresentam tixotropia e comportamento pseudoplástico. O modelo de Casson foi selecionado para representar o comportamento pseudoplástico do purê devido à baixa variação de seus parâmetros. O comportamento reológico do purê mostrou uma dependência complexa sobre a concentração dos aditivos e da temperatura. O teor de goma xantana aparece como

uma variável determinante no comportamento reológico do purê. Em contraste, a frutose tem um efeito pronunciado sobre a dependência com o tempo, mas não uma influência significativa sobre a resposta viscosa de purê. O teor de goma xantana aparece como uma variável determinante para a viscosidade do purê. Na faixa de concentração dos aditivos estudados, os modelos estatísticos obtidos poderiam ser utilizados para o desenvolvimento de formulações com viscosidade especificada, constituindo uma ferramenta útil para a modelagem e desenvolvimento de operações unitárias relacionadas com a produção de purê de mirtilo.

Capítulo 11

Considerações Finais

Com o intuito de auxiliar os produtores de mirtilo, os Arranjos Produtivos Locais (APL) e as indústrias processadoras do fruto, o presente trabalho apresentou, de uma forma prática, alternativas tecnológicas para o processamento do mirtilo. Estas alternativas incluem a transformação do fruto em suco, os cuidados necessários para a inativação de enzimas indesejáveis (como a polifenoloxidase e peroxidase), o conhecimento da degradação dos compostos de interesse – as antocianinas – e também a aplicação destes produtos como insumo pela indústria de alimentos. Além disso, o trabalho visou o aproveitamento dos sub-produtos gerados, proporcionando um aproveitamento ainda maior das antocianinas e agregando ainda mais valor aos derivados do mirtilo.

No Capítulo 2 foram apresentados dos principais aspectos relacionados ao mirtilo como o histórico do fruto no Brasil, as suas características botânicas e organolépticas, bem como sua composição química e propriedades nutracêuticas. Em seguida foi abordada a fisiologia pós-colheita destes frutos, e os aspectos relativos ao seu armazenamento, que justificam sua aplicabilidade para o processamento industrial, bem como as perspectivas mercadológicas.

Muitas Operações Unitárias visando o processamento e conservações dos derivados do mirtilo envolvem o calor, como o branqueamento, a pasteurização e a concentração do suco. Porém, as antocianinas são facilmente degradadas pela ação do calor, alterações de pH, presença de oxigênio e luz. Na literatura são apresentadas algumas referências sobre a instabilidade das antocianinas ao calor, mas nada a

respeito das antocianinas presentes no mirtilo; em virtude disso, o Capítulo 3 apresentou um estudo sobre a estabilidade das antocianinas do suco de mirtilo e determinou a sua cinética de degradação. Os resultados mostraram que a degradação de antocianinas de mirtilo seguiu uma cinética de reação de primeira ordem e que a variação nas constantes de taxa de degradação em função da temperatura obedeceu à relação de Arrhenius. Os valores de $t_{1/2}$ variaram de 180,5 a 5,1 h em temperaturas variando de 40 a 80 °C e a energia de ativação (E_a) calculada foi de 80,42 kJ.mol⁻¹. Este estudo mostrou, aos processadores de derivados de mirtilo, que as antocianinas são mais estáveis ao calor que outros nutrientes, como a vitamina C. Assim, durante um processamento a 80°C, são necessárias 5 h de processamento para que o conteúdo inicial de antocianinas seja reduzido à metade. Etapas como a pasteurização e branqueamento apresentariam uma baixa degradação. Processos como a concentração de sucos e fabricação de geleias, que apresentam longos períodos de altas temperaturas, são os que merecem maior atenção em relação aos componentes funcionais.

Dos derivados do mirtilo, o mais importante é o suco e, no Capítulo 4, foram abordadas alternativas tecnológicas de extração do suco de mirtilo frente à recuperação de compostos antociânicos proporcionando assim subsídios para que a indústria produza um suco com maior rendimento e, para o consumidor, a disponibilidade no mercado de produtos diferenciados, com elevados níveis de compostos bioativos. Como o processamento do suco de mirtilo é recente no Brasil, para comparação fez-se o uso dos métodos de extração mais utilizados para a extração do suco de uva: centrifugação, desintegração, arraste a vapor e extração enzimática. Entre esses métodos, a extração enzimática foi a que apresentou a maior recuperação de compostos antociânicos (superior a 30%) o que motivou tratamentos com diferentes preparados enzimáticos disponíveis atualmente no mercado. Para o processamento do suco de uva, os fabricantes das enzimas sugerem o uso de dois tratamentos enzimáticos consecutivos, o primeiro para a potencialização da extração dos compostos fenólicos e um segundo para a redução da viscosidade. Este estudo mostrou que para o suco de mirtilo, um único estágio enzimático foi suficiente para atingir esses dois objetivos. Dentre as enzimas Novozyme® 33095 (NZ95), Novoferm® 61 (NF61), Pectinex SMASH XXL® (PXXL) e Novozyme® 33103 (NZ103), aplicadas na

proporção de 0,01% em relação à quantidade de fruto, esta última foi a que mais reduziu a viscosidade e apresentou maior recuperação do conteúdo de antocianinas. No final desse Capítulo foi otimizado o uso da enzima NZ103 e recomenda-se então, para a extração do suco de mirtilo a temperatura de extração de 50°C durante 1 h e a proporção de 200 g de enzima NZ103 por tonelada de fruto.

Ao longo dos experimentos de obtenção dos sucos observou-se o fenômeno denominado “escurecimento enzimático” durante o armazenamento dos mesmos (causado principalmente pela ação de um grupo de enzimas conhecidas como oxiredutases, em especial a polifenoloxidase - PPO). Em virtude disso, um terceiro estudo com o objetivo de avaliar a atividade da PPO em polpas de mirtilo frente ao tratamento térmico foi conduzido e está apresentado no Capítulo 4. Nesse estudo observou-se que a inativação dessa enzima é atingida para tratamentos térmicos com tempo entre 200 e 500 segundos e temperaturas superiores a 72 °C. Portanto, a fim de inativar a PPO, recomenda-se que para qualquer tipo de processamento do mirtilo, assim que os frutos forem desintegrados, se acrescente uma etapa de branqueamento 80°C por 4 minutos.

A degradação das antocianinas do suco durante o processamento também pode ser causada pela peroxidase (POD). Essa enzima é reconhecida como sendo uma das mais estáveis ao calor e, por isso é utilizada como um indicador para os tratamentos térmicos. Como um dos objetivos principais desse estudo foi a manutenção das antocianinas, buscou-se um método onde pudessem ser utilizadas temperaturas amenas, alternativo ao térmico, para a inativação dessa enzima, como a ultrafiltração. Em virtude disso, no Capítulo 5, a redução da atividade de POD foi investigada utilizando membranas de ultrafiltração de 10, 30 e 50 kDa. A retenção das antocianinas foi menor com a membrana de 50 kDa, chegando a 2%, foi observado que, em geral, quanto maior a massa molar de corte da membrana e a temperatura, menor a retenção. A atividade POD nos tratamentos a 50°C foi reduzida independentemente da membrana utilizada; porém para os tratamentos a 30 e 40°C, essa atividade foi reduzida em 97,5 e 96,2% para as membranas de 10 e 30 kDa, respectivamente. Para indústrias que concentram o suco de mirtilo, a ultrafiltração, além de separar a POD, resulta em suco com baixa turbidez, facilitando o processo e

reduzindo o tempo, sendo assim, recomenda-se a ultrafiltração como um pré-tratamento.

Com o propósito de minimizar as perdas e a geração de resíduos da produção do suco de mirtilo, o Capítulo 7 abordou a recuperação das antocianinas contidas no bagaço gerado (que contém cerca de 70% das antocianinas do fruto). O bagaço foi submetido à extração de antocianinas com solventes orgânicos, variando o pH e razão etanol/água e empregando a metodologia de superfície de resposta. Os resultados mostraram que a melhor condição para a extração de antocianinas monoméricas do bagaço de mirtilo foi para pH de 2,75 e 60% de etanol obtendo um extrato etanólico com 521 mg de cianidina-3-glicosídeo/100 g de bagaço. Para a extração das antocianidinas observou-se que uma concentração de 60% de etanol e o pH de 3,40 otimizam a extração. As agliconas peonidina e malvidina necessitaram de uma maior concentração de solvente e pH para a sua extração em relação as demais. Recomenda-se que o bagaço gerado pela indústria seja submetido a um prévio processo de secagem, pois o mesmo apresenta uma rápida capacidade de fermentação. O aproveitamento do bagaço mostrou-se bastante promissor para obtenção de um extrato rico em antocianinas, podendo ser usado como aditivo alimentar com função corante ou antioxidante.

Esse estudo foi baseado na manutenção das antocianinas ao longo do processamento do mirtilo e uma reflexão sobre as metodologias de quantificação pode ser feita. Neste estudo foram utilizadas duas metodologias: a das antocianidinas pelo método cromatográfico (CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) e o das antocianinas totais monoméricas, espectrofotométrico. O método espectrofotométrico é uma alternativa rápida, fácil e de boa reprodutibilidade à cromatografia. A correlação entre os dois métodos se mostrou muito boa com erros na ordem de 5 a 10%. O método cromatográfico, cuja validação foi apresentada no Capítulo 8, é um método mais preciso e completo, pois através da metodologia de purificação escolhida, foi possível uma completa caracterização, com base nas agliconas majoritárias presentes nas amostras em estudo. Em um estudo com muitas etapas ou envolvendo um número muito grande de amostras, sugere-se o uso preliminar de quantificação das antocianinas pelo método espectrofotométrico.

A aplicação do extrato etanólico, obtido durante os estudos apresentados no Capítulo 7, diretamente em alimentos é limitada pela presença de solvente orgânico e pela instabilidade das antocianinas ao calor, variações de pH e à luz. Visando minimizar estes efeitos, no Capítulo 9 está apresentado um estudo propondo a microencapsulação das antocianinas extraídas do bagaço de mirtilo via liofilização. Foram testados três diferentes agentes encapsulantes: maltodextrina (MD), carboximetilcelulose (CMC) e hidroximetilpropilcelulose (HPMC). A morfologia das micropartículas produzidas, visualizadas por microscopia eletrônica de varredura, apresentaram estruturas irregulares e semelhantes, o que é típico dos pós preparados por liofilização. Os microparticulados apresentaram boa dissolução em água e estabilidade das antocianinas à luz, apresentado um tempo de meia vida superior a 38 dias.

Por fim, um estudo complementar de aplicação da polpa de mirtilo para a produção de diferentes formulações de purê a partir do uso de hidrocolóides e açúcares foi apresentado no Capítulo 10. Esse estudo avaliou o comportamento reológico de diferentes formulações de purê a temperaturas variando de 27 a 93°C, identificando qual o modelo matemático que melhor representou esse comportamento. Com base no modelo e utilizando a metodologia de superfície de resposta, foi possível determinar correlações entre os parâmetros desse modelo e a formulação do purê, para a faixa de temperatura testada. Essas equações são de grande importância para indústria, principalmente para o processamento e manipulação de aplicações que envolvam bombeamento e mistura.

Capítulo 12

Sugestões para Trabalhos Futuros

Como projeto futuro, sugere-se a concentração do suco de mirtilo obtido por processos de separação com membranas, tais como a osmose direta, inversa e a destilação osmótica. Esse estudo possibilitará a obtenção de sucos de mirtilo com diferentes teores de sólidos solúveis, que viabilizaria a investigação da influência do teor de açúcares na cinética de degradação das antocianinas do suco de mirtilo. Ainda, a avaliação da estabilidade das antocianinas em derivados de mirtilo frente a ciclos de congelamento e descongelamento também poderia ser conduzida.

Outra análise que poderia ser realizada para dar continuidade a este trabalho refere-se a verificação da estabilidade das micropartículas de antocianinas obtidas via isotermas de sorção e testes de estabilidade à presença de oxigênio. O processo de atomização também poderia ser avaliado como alternativa mais barata ao processo de secagem liofilização, porém, como a atomização utiliza altas temperaturas, a perda de compostos antociânicos deverá ser avaliada cuidadosamente. Além disso, outros agentes encapsulantes poderiam ser avaliados.

Por fim, em relação aos testes reológicos apresentados, os mesmos foram conduzidos em estado estacionário e, como sugestão para trabalhos futuros, coloca-se a possibilidade de testes em estado dinâmico que possibilitam uma maior compreensão da estrutura e estabilidade das amostras. Estudos reológicos com o suco também poderiam ser conduzidos, porém, devido a limitações do equipamento disponível, não foram realizados.

Referências Bibliográficas

ABADIO, F.D.B.; DOMINGUES, A.M.; BORGES, S.V.; OLIVEIRA, V.M. Physical properties of powdered pineapple (*Ananas comosus*) juice-effect of malt dextrin concentration and atomization speed. *Journal of Food Engineering*, v. 64, n. 3, p. 285-287, 2004.

AEHLE, W. *Enzymes in industry: production and applications* 3. ed. Weinheim: Wiley-VCH. 489 p., 2007.

AHN, J.-H.; KIM, Y.-P.; SEO, E.-M.; CHOI, Y.-K.; KIM, H.-S. Antioxidant effect of natural plant extracts on the microencapsulated high oleic sunflower oil. *Journal of Food Engineering*, v. 84, n. 2, p. 327-334, 2008.

AKDOGAN, H.; MCHUGH, T.H. Flow characterization of peach products during extrusion. *Journal of Food Science*, v. 65, n. 3, p. 471-475, 2000.

AL-ZUBAIDY, M.M.I.; KHALIL, R.A. Kinetic and prediction studies of ascorbic acid degradation in normal and concentrate local lemon juice during storage. *Food Chemistry*, v. 101, n. 1, p. 254-259, 2007.

ALPARSALAN, M.; HAYTA, M. Rheological and sensory properties of pekmez (*grape molasses*)/tahin(*sesame paste*) blends. *Journal of Food Engineering*, v. 54, n. 1, p. 89-93, 2002.

ALVAREZ, S.; ALVAREZ, R.; RIERA, F.A.; COCA, J. Influence of depectinization on apple juice ultrafiltration. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 138, n. 2-3, p. 377-382, 1998.

AMICO, V.; NAPOLI, E.M.; RENDA, A.; RUBERTO, G.; SPATAFORA, C.; TRINGALI, C. Constituents of grape pomace from the Sicilian cultivar [']Nerello Mascalese'. *Food Chemistry*, v. 88, n. 4, p. 599-607, 2004.

ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 66, p. 232-240, 2007.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Resolução RE nº 899*, de 29/05/2003. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm. Acesso em: 12 de dezembro de 2010.

AOAC942.15. Official Methods of Analysis, Gaithersburg. MD., 2002.

ARSLAN, E.; YENER, M.E.; ESIN, A. Rheological characterization of tahin/pekmez (sesame paste/concentrated grape juice) blends. *Journal of Food Engineering*, v. 69, p. 167-172, 2005.

AUGUSTIN, M.A.; HEMAR, Y. Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chemical Society Reviews*, v. 38, n. 4, p. 902-912, 2009.

AVGOUSTAKIS, K.; BELETSI, A.; PANAGI, Z.; KLEPETSANIS, P.; KARYDAS, A.G.; ITHAKISSIOS, D.S. PLGA-mPEG nanoparticles of cisplatin: in vitro nanoparticle degradation, in vitro drug release and in vivo drug residence in blood properties. *Journal of Controlled Release*, v. 79, n. 1-3, p. 123-135, 2002.

AYAZ, F.A.; DEMIR, O.; TORUN, H.; KOLCUOGLU, Y.; COLAK, A. Characterization of polyphenoloxidase (PPO) and total phenolic contents in medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit during ripening and over ripening. *Food Chemistry*, v. 106, n. 1, p. 291-298, 2008.

AZEREDO, H.M.C.D. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. *Alimentos e Nutrição*, v. 16, n. 1, p. 89-97, 2005.

BACCHIN, P.; AIMAR, P.; SANCHEZ, V. Model for colloidal fouling of membranes. *AIChE Journal*, v. 41, n. 2, p. 368-376, February, 1995.

BAILONI, M.A.; BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F.O. Preparação e estabilidade do extrato antocianico das folhas da *Acalypha hispida*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 18, n. 1, Apr. 1998, 1998.

BAKOWSKA, A.; KUCHARSKA, A.Z.; OSZMIANSKI, J. The effects of heating, UV irradiation, and storage on stability of the anthocyanin-polyphenol copigment complex. *Food Chemistry*, v. 81, n. 3, p. 349-355, 2003.

BARNES, J.S.; NGUYEN, H.P.; SHEN, S.; SCHUG, K.A. General method for extraction of blueberry anthocyanins and identification using high performance liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap-time of flight-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, n. 23, p. 4728-4735, 2009.

BARROS NETO, B.S., I.S.; BRUNS, R.E. *Planejamento e otimização de experimentos*. Campinas: Editora da Unicamp. 302 p., 1995.

BHANDARI, B.R.; D'ARCY, B.D.; PADUKKA, I. Encapsulation of lemon oil by paste method using β -cyclodextrin: encapsulation efficiency and profile of oil volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 47, p. 5194-5197, 1999.

BIRD, R.B.; ARMSTRONG, R.C.; HASSAGER, O. *Dynamics of polymeric liquids. Vol. 1, 2nd Ed. : Fluid mechanics*. 2. ed. New York: John Wiley & Sons. (Related Information: Fluid Mechanics. Dynamics of Polymeric Liquids). 784 p., 1987.

BOBBIO, F.O.; DO NASCIMENTO VARELLA, M.T.; BOBBIO, P.A. Effect of light and tannic acid on the stability of anthocyanin in DMSO and in water. *Food Chemistry*, v. 51, n. 2, p. 183-185, 1994.

BOBBIO, P.A.B., F. O. *Química de processamento de alimentos*. 3. ed. São Paulo: Varela. 143 p., 2001.

BOMSER, J.; MADHAVI, D.L.; SINGLETARY, K.; SMITH, M.A. In vitro anticancer activity of fruit extracts from *Vaccinium* species. *Planta Medica*, v. 62, n. 3, p. 212-216, 1996.

BOUABIDI, A.; ROZET, E.; FILLET, M.; ZIEMONS, E.; CHAPUZET, E.; MERTENS, B.; KLINKENBERG, R.; CECCATO, A.; TALBI, M.; STREEL, B.; BOUKLOUZE, A.; BOULANGER, B.; HUBERT, P. Critical analysis of several analytical method validation strategies in the framework of the fit for purpose concept. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, n. 19, p. 3180-3192, 2010.

BOULTON, R. The Copigmentation of Anthocyanins and Its Role in the Color of Red Wine: A Critical Review. *Am. J. Enol. Vitic.*, v. 52, n. 2, p. 67-87, June 1, 2001, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura. *Regulamento da Lei N° 8.918, de 14 de julho de 1994*, de. Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=212>. Acesso em: 19 de maio de 2010.

_____. Ministério da Agricultura. *Instrução Normativa N° 12, de 4 de setembro de 2003*, de Publicado no Diário Oficial da União de 09/09/2003 , Seção 1 , Página 2 Aprovar o Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade Gerais para Suco Tropical; os Padrões de Identidade e Qualidade dos Sucos Tropicais de Abacaxi, Acerola, Cajá, Caju, Goiaba, Graviola, Mamão, Manga, Mangaba, Maracujá e Pitanga; e os Padrões de Identidade e Qualidade dos Néctares de Abacaxi, Acerola, Cajá, Caju, Goiaba, Graviola, Mamão, Manga, Maracujá, Pêssego e Pitanga. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2831>. Acesso em: 19 de maio de 2010.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Resolução RE nº 899, de 29/05/2003*. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm. Acesso em: 12 de dezembro de 2010.

_____. Ministério da Agricultura. *Decreto N° 6871, de 04 de junho de 2009*, de Publicado no Diário Oficial da União de 05/06/2009 , Seção 1 , Página 20. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=20271>. Acesso em: 19 de maio de 2010.

BRAZEL, C.S. Microencapsulation: Offering Solutions in the Food Industry. *Cereal Foods World*, v. 44, p. 388-393, 1999.

BRENNA, O.V.; PAGLIARINI, E. Multivariate Analysis of Antioxidant Power and Polyphenolic Composition in Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, n. 10, p. 4841-4844, 2001.

BRIDLE, P.; TIMBERLAKE, C.F. Anthocyanins as natural food coloursselected aspects. *Food Chemistry*, v. 58, p. 103-109, 1997.

BRITO, C.A.K. *Estudo bioquímico das peroxidases de novas variedades de abacaxi (Ananas comosus L. Merrill)*. (2001). 85 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

BUCHERT, J.; KOPONEN, J.M.; SUUTARINEN, M.; MUSTRANTA, A.; LILLE, M.; OUML; RR; OUML; NEN, R.; POUTANEN, K. Effect of enzyme-aided pressing on anthocyanin yield and profiles in bilberry and blackcurrant juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 85, p. 2548-2556, 2005.

BUONOCORE, G.; PERRONE, S.; LONGINI, M.; VEZZOSI, P.; MARZOCCHI, B.; PAFFETTI, P.; BRACCI, R. Oxidative Stress in Preterm Neonates at Birth and on the Seventh Day of Life. *Pediatric Research*, v. 52, n. 1, p. 46-49, 2002.

BURDURLU, H.S.; KOCA, N.; KARADENIZ, F. Degradation of vitamin C in citrus juice concentrates during storage. *Journal of Food Engineering*, v. 74, n. 2, p. 211-216, May 2006, 2006.

BURNETTE, F.S. Peroxidase and its relationship to food flavor and quality: a review. *Journal of Food Science*, v. 42, n. 1, p. 1-6, 1977.

BUSHWAY, R.J.; MCGANN, D.F.; COOK, W.P.; BUSHWAY, A.A. Mineral and vitamin content of lowbush blueberries (*Vaccinium angustifolium Aiot.*). *Journal of Food Science*, v. 48, p. 1878-1880, 1983.

CABRAL, M.F.P.; QUEIROZ, A.J.D.M.; FIGUEIRÊDO, R.M.F.D. Comportamento reológico da polpa de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum schum.*) peneirada. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v. 4, n. 1, p. 37-40, 2002.

CACACE, J.E.; MAZZA, G. Optimization of Extraction of Anthocyanins from Black Currants with Aqueous Ethanol. *Journal of Food Science*, v. 68, n. 1, p. 240-248, 2003.

CAI, Y.; CORKE, H. Production and Properties of Spray-dried Amaranthus Betacyanin Pigments. *Journal of Food Science*, v. 65, n. 7, p. 1248-1252, 2000.

CALVO, P.; REMUÑÁN-LÓPEZ, C.; VILA-JATO, J.; ALONSO, M. Development of positively charged colloidal drug carriers: Chitosan-coated polyester nanocapsules and submicron-emulsions. *Colloid & Polymer Science*, v. 275, n. 1, p. 46-53, 1997.

CAMARGO, R. *Tecnologia dos Produtos Agropecuários*. São Paulo: Nobel. 298 p., 1986.

CANO-CHAUCA, M.; STRINGHETA, P.C.; RAMOS, A.M.; CAL-VIDAL, J. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 6, n. 4, p. 420-428, 2005.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R.L. Antioxidant Capacity of Tea and Common Vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 44, n. 11, p. 3426-3431, 1996.

CARBONARO, M.; MATTERA, M. Polyphenoloxidase activity and polyphenol levels in organically and conventionally grown peach (*Prunus persica* L., cv. *Regina bianca*) and pear (*Pyrus communis* L., cv. *Williams*). *Food Chemistry*, v. 72, n. 4, p. 419-424, 2001.

CARDELLO, H.M.A.B.; CELESTINO, E.M. Encapsulação de aromas e sabores: utilização de amidos como agentes encapsulantes. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30, n. 2, p. 166-171, 1996.

CASSANO, A.; DONATO, L.; DRIOLI, E. Ultrafiltration of kiwifruit juice: Operating parameters, juice quality and membrane fouling. *Journal of Food Engineering*, v. 79, n. 2, p. 613-621, 2007.

CASSANO, A.; MARCHIO, M.; DRIOLI, E. Clarification of blood orange juice by ultrafiltration: analyses of operating parameters, membrane fouling and juice quality. *Desalination*, v. 212, n. 1-3, p. 15-27, 2007.

CASTANEDA-OVANDO, A.; PACHECO-HERNANDEZ, M.D.L.; PAEZ-HERNANDEZ, M.E.; RODRIGUEZ, J.A.; GALAN-VIDAL, C.A. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, v. 113, n. 4, p. 859-871, 15 April 2009, 2009.

CASTREJÓN, A.D.R.; EICHHOLZ, I.; ROHN, S.; KROH, L.W.; HUYSKENS-KEIL, S. Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during fruit maturation and ripening. *Food Chemistry*, v. 109, n. 3, p. 564-572, 2008.

CATANEO, C.C., V.; GONZAGA, L.; KUSKOSKI, E.; FETT, R. Atividade antioxidante e conteúdo fenólico do resíduo agroindustrial da produção de vinho. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 29, n. 1, p. 93-102, jan./mar., 2008.

CEMEROGLU, B.; VELIOGLU, S.; ISIK, S. Degradation Kinetics of Anthocyanins in Sour Cherry Juice and Concentrate. *Journal of Food Science*, v. 59, n. 6, p. 1216-1218, 1994.

_____. Degradation Kinetics of Anthocyanins in Sour Cherry Juice and Concentrate. *Journal of Food Science*, v. 59, n. 6, p. 1216 - 1218, 26 Aug 2006, 2006.

CHANDRA, A.; NAIR, M.G.; IEZZONI, A.F. Isolation and stabilization of anthocyanins from tart cherries (*Prunus cerasus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 41, n. 7, p. 1062-1065, 1993.

CHERYAN, M. *Ultrafiltration and microfiltration handbook*. Lancaster: Technomic Publishing. 527 p., 1998.

CHIN, N.L.; CHAN, S.M.; YUSOF, Y.A.; CHUAH, T.G.; TALIB, R.A. Modelling of rheological behaviour of pummelo juice concentrates using master-curve. *Journal of Food Engineering*, v. 93, n. 2, p. 134-140, July 2009, 2009.

CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. *Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio*. . 2. ed. Lavras: UFLA. 783 p., 2005.

CHO, C.-W.; LEE, D.-Y.; KIM, C.-W. Concentration and purification of soluble pectin from mandarin peels using crossflow microfiltration system. *Carbohydrate Polymers*, v. 54, n. 1, p. 21-26, 2003.

CHO, M.J.; HOWARD, L.R.; PRIOR, R.L.; CLARK, J.R. Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry, blueberry and red grape genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 84, n. 13, p. 1771-1782, 2004.

CHURCHILL, H.M.; SCOTT, A.O. A study of the biochemical and chemical causes of quality changes in frozen vegetables. *Food Preservation Research Association*, v. 426, p. 1-45, 1986.

CISSE, M.; VAILLANT, F.; ACOSTA, O.; DHUIQUE-MAYER, C.; DORNIER, M. Thermal Degradation Kinetics of Anthocyanins from Blood Orange, Blackberry, and Roselle Using the Arrhenius, Eyring, and Ball Models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, p. 6285-6291, 2009.

CIVELLO, P.M.; MARTINEZ, G.A.; CHAVES, A.R.; ANON, M.C. Peroxidase from Strawberry Fruit (*Fragaria ananassa* Duch.): Partial Purification and Determination of Some Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 43, n. 10, p. 2596-2601, 1995.

CLEMENTE, E. Purification and thermostability of isoperoxidase from oranges. *Phytochemistry*, v. 49, n. 1, p. 29-36, 1998.

CLEMENTE, E.; PASTORE, G.M. Peroxidase and polyphenoloxidase, the importance for food technology. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 32, n. 2, p. 167-171, 1998.

CONCELLÓN, A.; AÑÓN, M.C.; CHAVES, A.R. Characterization and changes in polyphenol oxidase from eggplant fruit (*Solanum melongena* L.) during storage at low temperature. *Food Chemistry*, v. 88, n. 1, p. 17-24, 2004.

DA COSTA, C.T.; HORTON, D.; MARGOLIS, S.A. Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, v. 881, n. 1-2, p. 403-410, 2000.

DAK, M.; VERMA, R.C.; SHARMA, G.P. Flow characteristics of juice of "Totapuri" mangoes. *Journal of Food Engineering*, v. 76, n. 4, p. 557-561, 2006.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. *Fennema's Food Chemistry*. 4. ed. Boca Raton, FL, USA: Taylor and Francis group, CRC Press (Food Science and Technology). 1160 p., 2007.

DANGLES, O.; SAITO, N.; BROUILLARD, R. Anthocyanin Intramolecular copigment effect. *Phytochemistry*, v. 34, n. 1, p. 119-124, 1993.

DAUFIN, G.; ESCUDIER, J.P.; CARRÈRE, H.; BÉROT, S.; FILLAUDEAU, L.; DECLoux, M. Recent and Emerging Applications of Membrane Processes in the Food and Dairy Industry. *Food and Bioproducts Processing*, v. 79, n. 2, p. 89-102, 2001.

DE BARROS, S.T.D.; ANDRADE, C.M.G.; MENDES, E.S.; PERES, L. Study of fouling mechanism in pineapple juice clarification by ultrafiltration. *Journal of Membrane Science*, v. 215, n. 1-2, p. 213-224, 2003.

DE BRITO, E.S.; DE ARAÚJO, M.C.P.; ALVES, R.E.; CARKEET, C.; CLEVIDENCE, B.A.; NOVOTNY, J.A. Anthocyanins Present in Selected Tropical Fruits: Acerola, Jambolão, Jussara, and Guajiru. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, n. 23, p. 9389-9394, 2007.

DE BRUIJN, J.; BÓRQUEZ, R. Analysis of the fouling mechanisms during cross-flow ultrafiltration of apple juice. *LWT - Food Science and Technology*, v. 39, n. 8, p. 861-871, 2006.

DEGÁPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N. PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DE COMPOSTOS FENÓLICOS. *Visão Acadêmica*, v. 5, n. 1, p. 33-40., 2005.

DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A.R.; PAREDES-LÓPEZ, O. Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains - Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 40, n. 3, p. 173 - 289, 2000.

DESAI; KASHAPPA GOUD, H.; HYUN JIN, P. *Recent developments in microencapsulation of food ingredients*. Philadelphia, PA, ETATS-UNIS: Taylor & Francis. 34 p., 2005.

DESOBRY, S.A.; NETTO, F.M.; LABUZA, T.P. Comparison of Spray-drying, Drum-drying and Freeze-drying for β -Carotene Encapsulation and Preservation. *Journal of Food Science*, v. 62, n. 6, p. 1158-1162, 1997.

_____. Influence of maltodextrin systems at an equivalent 25DE on encapsulated β -carotene loss during storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, v. 23, n. 1, p. 39-55, 1999.

DINCER, B.; COLAK, A.; AYDIN, N.; KADIOGLU, A.; GÜNER, S. Characterization of polyphenoloxidase from medlar fruits (*Mespilus germanica* L., Rosaceae). *Food Chemistry*, v. 77, n. 1, p. 1-7, 2002.

DITCHFIELD, C.; TADINI, C.C.; SINGH, R.; TOLEDO, R.T. Rheological properties of banana puree at high temperatures. *International Journal of Food Properties*, v. 7, p. 571-584, 2004.

DOBETTI, L.; PANTALEO, V. Application of a hydrodynamic model to microencapsulation by coacervation. *Journal of Microencapsulation: Micro and Nano Carriers*, v. 19, n. 2, p. 139 - 151, 2002.

DURAN, L.; COSTELL, E. Rheology of Apricot Puree: Characterization of Flow. *Journal of Texture Studies*, v. 13, n. 1, p. 43-58, 2007.

DURST, R.W.; WROLSTAD, R.E. Unit F1.3: Anthocyanins: Separation and Characterization of Anthocyanins by HPLC. In: WROLSTAD, R. E. (Ed.). *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. New York: John Wiley and Sons, 2001. p. 1-13.

DUST, R.W.W., R. E. Unit F1.3: Anthocyanins: Separation and Characterization of Anthocyanins by HPLC. In: WROLSTAD, R. E. (Ed.). *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. New York: John Wiley and Sons, 2001. p. 1-13.

DYRBY, M.; WESTERGAARD, N.; STAPELFELDT, H. Light and heat sensitivity of red cabbage extract in soft drink model systems. *Food Chemistry*, v. 72, n. 4, p. 431-437, 2001.

ECK, P.; GOUGH, R.E.; HALL, I.V.; SPIERS, J.M. *Blueberry Management*. 1990. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>. Acesso em: 18 de setembro de 2009.

ERCAN, S.S.; SOYSAL, Ç. Effect of ultrasound and temperature on tomato peroxidase. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 18, n. 2, p. 689-695, 2011.

ERSUS, S.; YURDAGEL, U. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier. *Journal of Food Engineering*, v. 80, n. 3, p. 805-812, 2007.

ESCRIBANO, J.; CABANES, J.; CHAZARRA, S.; GARCIA-CARMONA, F. Characterization of Monophenolase Activity of Table Beet Polyphenol Oxidase. Determination of Kinetic Parameters on the Tyramine/Dopamine Pair. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 45, n. 11, p. 4209-4214, 1997.

EVANGELISTA, J. *Tecnologia de alimentos*. 2. ed. São Paulo: Atheneu. 652 p., 2001.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols - A review. *Trends in Food Science & Technology*, v. In Press, Accepted Manuscript, 2010.

FAO. Food and Agriculture Organization of United Nations - CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. *ALINORM 01/39*, de 2-7 July 2001. Proposed Draft Codex General Standard for Fruit Juices and Nectars. Disponível em:

<http://www.fao.org/docrep/meeting/005/x8626e/x8626e07.htm#bm07.1>. Acesso em: 20 de maio de 2010.

_____. 2009. Disponível em:<Erro! A referência de hiperlink não é válida.>. Acesso em: 14 de novembro de 2009.

FASOLIN, L.H. *Extração e estudo do polissacarídeo solúvel de soja e sua avaliação na estabilidade e reologia de suco de graviola adicionado de isolado protéico de soja*. (2009). 144 f. (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2009.

FAVARO-TRINDADE, C.S.; PINHO, S.C.D.; ROCHA, G.A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 11, n. 2, p. 103-112, abr./jun. 2008, 2008.

FAVRETTO, D.; FLAMINI, R. Application of Electrospray Ionization Mass Spectrometry to the Study of Grape Anthocyanins. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 51, n. 1, p. 55-64, March 1, 2000, 2000.

FEDDERSEN, R.L.; THORP, S.N. Sodium carboxymethylcellulose. In: L., W. R.; N., B. J. (Ed.). *Industrial gums - polysaccharides and their derivatives*. London: Academic Press, 1993. p. 537-577.

FELLOWS, P.J. *Tecnologia do Processamento de Alimentos: princípios e prática*; tradução OLIVERA, F. C. et al. Porto Alegre: Artmed, 2. ed, p.602, 2006.

FISCHER, P.; POLLARD, M.; ERNI, P.; MARTI, I.; PADAR, S. Rheological approaches to food systems. *Comptes Rendus Physique*, v. 10, n. 8, p. 740-750, 2009.

FORSYTH, J.L.; OWUSU APENTEN, R.K.; ROBINSON, D.S. The thermostability of purified isoperoxidases from *Brassica oleracea* VAR. *gemmifera*. *Food Chemistry*, v. 65, n. 1, p. 99-109, 1999.

FRANCIS, F.J. Anthocyanins and betalains: composition and applications. *Cereal Foods World*, v. 45, p. 208-213, 2000.

FRANCIS, F.J.; MARKAKIS, P.C. Food colorants: Anthocyanins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 28, n. 4, p. 273 - 314, 1989.

FRANK, T.C.; DOWNEY, J.R.; GUPTA, S.K. Quickly screen solvents for organic solids. *Chemical Engineering Progress*, v. 95, n. 12, p. 41-61, 1999.

FREITAS, A.A.D.; FRANCELIN, M.F.; HIRATA, G.F.; CLEMENTE, E.; SCHMIDT, F.L. Atividades das enzimas peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) nas uvas das cultivares *benitaka* e *rubi* e em seus sucos e geléias. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, p. 172-177, 2008.

FUJITA, S.; SAARI, N.B.; MAEGAWA, M.; TETSUKA, T.; HAYASHI, N.; TONO, T. Purification and Properties of Polyphenol Oxidase from Cabbage (*Brassica oleracea* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 43, n. 5, p. 1138-1142, 1995.

GABAS, A.L.; TELIS-ROMERO, J.; MENEGALLI, F.C. Cinética de degradação do ácido ascórbico em ameixas liofilizadas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 23, p. 66-70, 2003.

GALLETTA, G.J.; HIMELRICK, D.G. *Small fruit crop management*. New Jersey: Prentice Hall. 602 p., 1990.

GANTHAVORN, C.; POWERS, J.R. Changes in Peroxidase Activity, Hexanal, Ascorbic Acid and Free Sulfhydryl in Blanched Asparagus During Frozen Storage. *Journal of Food Science*, v. 53, n. 5, p. 1403-1405, 1988.

GARCÍA-BENEYTEZ, E.; CABELLO, F.; REVILLA, E. Analysis of Grape and Wine Anthocyanins by HPLC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, n. 19, p. 5622-5629, 2003.

GARCÍA-VIGUERA, C.; ZAFRILLA, P. Color stability of strawberry jam as affected by cultivar and storage temperature. *Journal of Food Science*, v. 64, n. 2, p. 243-247, 1999.

GAVA, A.J.; SILVA, C.A.B.D.; FRIAS, J.R.G. *Tecnologia de Alimentos: princípios e aplicações*. São Paulo: Nobel. 511 p., 2008.

GIBBS, B.F.; KERMASHA, S.; ALLI, I.; MULLIGAN, C.N. Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, v. 50, n. 3, p. 213-224, 1999.

GIUSTI, M.M.; RODRÍGUEZ-SAONA, L.E.; BAGGETT, J.R.; REED, G.L.; DURST, R.W.; WROLSTAD, R.E. Anthocyanin Pigment Composition of Red Radish Cultivars as Potential Food Colorants. *Journal of Food Science*, v. 63, n. 2, p. 219-224, 1998.

GIUSTI, M.M.; WROLSTAD, R.E. Radish Anthocyanin Extract as a Natural Red Colorant for Maraschino Cherries. *Journal of Food Science*, v. 61, n. 4, p. 688-694, 1996.

_____. Anthocyanins: characterization and measurement with UV-visible spectroscopy. In: *Current protocols in food analytical chemistry*, New York. Wiley, 2001. p.1-13.

GLASS, B.; NOVÁK, C.; BROWN, M. The thermal and photostability of solid pharmaceuticals. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 77, n. 3, p. 1013-1036, 2004.

GOIFFON, J.-P.; MOULY, P.P.; GAYDOU, E.M. Anthocyanic pigment determination in red fruit juices, concentrated juices and syrups using liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, v. 382, n. 1-2, p. 39-50, 1999.

GÖKMEN, V.; ÇETINKAYA, Ö. Effect of pretreatment with gelatin and bentonite on permeate flux and fouling layer resistance during apple juice ultrafiltration. *Journal of Food Engineering*, v. 80, n. 1, p. 300-305, 2007.

GOMBÁS, Á.; ANTAL, I.; SZABÓ-RÉVÉSZ, P.; MARTON, S.; ERŐS, I. Quantitative determination of crystallinity of alpha-lactose monohydrate by Near Infrared Spectroscopy (NIRS). *International Journal of Pharmaceutics*, v. 256, n. 1-2, p. 25-32, 2003.

GOULD, K.; DAVIES, K.M.; WINEFIELD, C. *Anthocyanins: biosynthesis, functions, and applications*. New York: Springer. 335 p., 2009.

GRADINARU, G.; BILIADERIS, C.G.; KALLITHRAKA, S.; KEFALAS, P.; GARCIA-VIGUERA, C. Thermal stability of *Hibiscus sabdariffa* L. anthocyanins in solution and in solid state: effects of copigmentation and glass transition. *Food Chemistry*, v. 83, n. 3, p. 423-436, 2003.

GRATÃO, A.C.A.; SILVEIRA JR, V.; TELIS-ROMERO, J. Laminar flow of soursop juice through concentric annuli: friction factors and rheology. *Journal of Food Engineering*, v. 78, p. 1343-1354, 2007.

GRIS, E.F.; FERREIRA, E.A.; FALCÃO, L.D.; BORDIGNON-LUIZ, M.T. Caffeic acid copigmentation of anthocyanins from Cabernet Sauvignon grape extracts in model systems. *Food Chemistry*, v. 100, n. 3, p. 1289-1296, 2007.

GUIMARÃES, D.P. *Estudo bioquímico de algumas características da peroxidase, polifenoloxidase e pectinametilesterase de amora preta (Rubus spp) (2006)*. (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

GUMMADI, S.N.; PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases--a review. *Process Biochemistry*, v. 38, n. 7, p. 987-996, 2003.

GUNASEKARAN, S.; KO, S.; XIAO, L. Use of whey proteins for encapsulation and controlled delivery applications. *Journal of Food Engineering*, v. 83, n. 1, p. 31-40, 2007.

GUTERRES, S.S.; FESSI, H.; BARRATT, G.; DEVISSAGUET, J.P.; PUISIEUX, F. Poly (D,L-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 113, n. 1, p. 57-63, 1995.

HAARD, N.F.; TOBIN, C.L. Patterns of soluble peroxidase in ripening banana fruit. *Journal of Food Science*, v. 36, n. 6, p. 854-857, 1971.

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

HAGIWARA, A.; MIYASHITA, K.; NAKANISHI, T.; SANO, M.; TAMANO, S.; KADOTA, T.; KODA, T.; NAKAMURA, M.; IMAIDA, K.; ITO, N.; SHIRAI, T. Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Letters*, v. 171, n. 1, p. 17-25, 2001.

HAKKINEN, S.H.; KARENLAMPI, S.O.; HEINONEN, I.M.; MYKKANEN, H.M.; TORRONEN, A.R. Content of the Flavonols Quercetin, Myricetin, and Kaempferol in 25 Edible Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 47, n. 6, p. 2274-2279, 1999.

HALE, K.L.; MCGRATH, S.P.; LOMBI, E.; STACK, S.M.; TERRY, N.; PICKERING, I.J.; GEORGE, G.N.; PILON-SMITS, E.A.H. Molybdenum Sequestration in Brassica Species. A Role for Anthocyanins? *Plant Physiol.*, v. 126, n. 4, p. 1391-1402, August 1, 2001, 2001.

HAMINIUK, C.W.I.; SIERAKOWSKI, M.R.; VIDAL, J.R.M.B.; MASSON, M.L. Influence of temperature on the rheological behavior of whole araca pulp (*Psidium cattleianum sabine*). *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, v. 39, n. 4, p. 427-431, 2006.

HANAI, T. *HPLC: a practical guide*. Great Britain: Royal Society of Chemistry. 134 p., 1999.

HARBOURNE, N.; JACQUIER, J.C.; MORGAN, D.J.; LYNG, J.G. Determination of the degradation kinetics of anthocyanins in a model juice system using isothermal and non-isothermal methods. *Food Chemistry*, v. 111, n. 1, p. 204-208, 1 November 2008, 2008.

HARNANAN, S.W.; TEJINDER, S.; BAINS, G.S. Effect of processing, preservation and storage on Rheology of Guava Pulp. *Journal of Texture Studies*, v. 32, n. 4, p. 271-284, 2001.

HARRIS, C.S.; BURT, A.J.; SALEEM, A.; LE, P.M.; MARTINEAU, L.C.; HADDAD, P.S.; BENNETT, S.A.L.; ARNASON, J.T. A single HPLC-PAD-APCI/MS method for the quantitative comparison of phenolic compounds found in leaf, stem, root and fruit extracts of *Vaccinium angustifolium*. *Phytochemical Analysis*, v. 18, n. 2, p. 161-169, March/April 2007, 2007.

HARRIS, G.; GUPTA, A.; NINES, R.; KRESTY, L.; HABIB, S.; FRANKE, L.W.; LAPERLE, K.; GALLAHER, D.; SCHWARTZ, S.; STONER, G. Effects of lyophilized black raspberries on azoxymethane-induced colon cancer and. *Nutrition and Cancer*, v. 40, n. 2, p. 125-133, 2001.

HERNANDEZ, E.; CHEN, C.S.; SHAW, P.E.; CARTER, R.D.; BARROS, S. Ultrafiltration of orange juice: effect on soluble solids, suspended solids, and aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 40, n. 6, p. 986-988, 1992.

HIGUERA-CIAPARA, I.; FELIX-VALENZUELA, L.; GOYCOOLEA, F.M.; ARGÜELLES-MONAL, W. Microencapsulation of astaxanthin in a chitosan matrix. *Carbohydrate Polymers*, v. 56, n. 1, p. 41-45, 2004.

HO, W.S.W.; SIRKAR, K.K. *Membrane Handbook*. 2. ed. New York: Chapman&Hall. p., 1992.

HONG, V.; WROLSTAD, R.E. Characterization of anthocyanin-containing colorants and fruit juices by HPLC/photodiode array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 38, n. 3, p. 698-708, 1990a.

_____. Use of HPLC separation/photodiode array detection for characterization of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 38, n. 3, p. 708-715, 1990b.

HORISAWA, E.; KUBOTA, K.; TUBOI, I.; SATO, K.; YAMAMOTO, H.; TAKEUCHI, H.; KAWASHIMA, Y. Size-dependency of DL-lactide/glycolide copolymer particulates for intra-articular delivery system on phagocytosis in rat synovium. *Pharm Res*, v. 19, n. 2, p. 132-9, Feb, 2002.

HUISMAN, I.H.; ELZO, D.; MIDDELINK, E.; TRÄGÅRDH, A.C. Properties of the cake layer formed during crossflow microfiltration. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 138, n. 2-3, p. 265-281, 1998.

IBARTZ, A.; GARVIN, A.; COSTA, J. Rheological Behaviour of Sloe (*Prunus Spinosa*) Fruit juices. *Journal of Food Engineering*, v. 27, p. 423-430, 1996.

ICH. Guidance for Industry - Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology, Londres. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 1996.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). *DOQ-CGCRE-008*, de março/2003. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos. Disponível em: http://www.farmacia.ufmg.br/lato/downloads/validacao_inmetro.pdf. Acesso em: 12 de dezembro de 2010.

JAYANI, R.S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*, v. 40, n. 9, p. 2931-2944, 2005.

JIMÉNEZ, N.; BOHUON, P.; LIMA, J.; DORNIER, M.; VAILLANT, F.; PREZ, A.M. Kinetics of Anthocyanin Degradation and Browning in Reconstituted Blackberry Juice Treated at High Temperatures (100–180 °C). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, n. 4, p. 2314-2322, January 28, 2010, 2010.

JING, P.; GIUSTI, M. Effects of Extraction Conditions on Improving the Yield and Quality of an Anthocyanin-Rich Purple Corn (*Zea mays* L.) Color Extract. *Journal of Food Science*, v. 72, n. 7, p. C363-C368, 2007.

JING, P.; GIUSTI, M.M. Effects of Extraction Conditions on Improving the Yield and Quality of an Anthocyanin-Rich Purple Corn (*Zea mays* L.) Color Extract. *Journal of Food Science*, v. 72, n. 7, p. C363-C368, 2007.

JIRARATANANON, R.; CHANACHAI, A. A study of fouling in the ultrafiltration of passion fruit juice. *Journal of Membrane Science*, v. 111, n. 1, p. 39-48, 1996.

JU, Z.Y.; HOWARD, L.R. Effects of Solvent and Temperature on Pressurized Liquid Extraction of Anthocyanins and Total Phenolics from Dried Red Grape Skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, n. 18, p. 5207-5213, 2003.

KADER, A.A. *Postharvest Technology of Horticultural Crops*. 2nd. ed. Davis, United States: University of California. 535 p. p., 1992.

KADER, F.; ROVEL, B.; GIRARDIN, M.; METCHE, M. Fractionation and identification of the phenolic compounds of Highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum*, L.). *Food Chemistry*, v. 55, n. 1, p. 35-40, 1996.

_____. Mechanism of Browning in Fresh Highbush Blueberry Fruit (*Vaccinium corymbosum* L). Role of Blueberry Polyphenol Oxidase, Chlorogenic Acid and Anthocyanins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 74, n. 1, p. 31-34, 1997.

KALBASI, A.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Fractionation of Monomeric and Polymeric Anthocyanins from Concord Grape (*Vitis labrusca* L.) Juice by Membrane Ultrafiltration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, n. 17, p. 7036-7042, 2007.

KALT, W.; DUFOUR, D. Health Functionality of Blueberries. *HortTechnology*, v. 7, n. 3, p. 216-221, July 1, 1997, 1997.

KALT, W.; FORNEY, C.F.; MARTIN, A.; PRIOR, R.L. Antioxidant Capacity, Vitamin C, Phenolics, and Anthocyanins after Fresh Storage of Small Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 47, n. 11, p. 4638-4644, 1999.

KALT, W.; MCDONALD, J.E.; DONNER, H. Anthocyanins, Phenolics, and Antioxidant Capacity of Processed Lowbush Blueberry Products. *Journal of Food Science*, v. 65, n. 3, p. 390-393, 2000.

KAMEI, H.; KOJIMA, T.; HASEGAWA, M.; KOIDE, T.; UMEDA, T.; YUKAWA, T.; TERABE, K. Suppression of Tumor Cell Growth by Anthocyanins In Vitro. *Cancer Investigation*, v. 13, n. 6, p. 590 - 594, 1995.

KAMMERER, D.; CLAUS, A.; CARLE, R.; SCHIEBER, A. Polyphenol Screening of Pomace from Red and White Grape Varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, n. 14, p. 4360-4367, 2004.

KANG, S., Y; SEERAM, N., P; NAIR, M., G; BOURQUIN, L., D. Tart cherry anthocyanins inhibit tumor development in Apc(Min) mice and reduce. *Cancer Letters*, v. 194, n. 1, p. 13-19, 2003.

KARAZHIYAN, H.; RAZAVI, S.M.A.; YAPENG, G.O.P.; SAPHWAN, F.; NISHINARI, A.-A.K.; FARHOOSH, R. Rheological properties of *Lepidium sativum* seed extract as a function of concentration, temperature and time. *Food Hydrocolloids*, v. 23, n. 8, p. 2062-2068, 2009.

KATSUBE, N.; IWASHITA, K.; TSUSHIDA, T.; YAMAKI, K.; KOBORI, M. Induction of Apoptosis in Cancer Cells by Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the Anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, n. 1, p. 68-75, 2002.

KATSUBE, T.; TABATA, H.; OHTA, Y.; YAMASAKI, Y.; ANUURAD, E.; SHIWAKU, K.; YAMANE, Y. Screening for Antioxidant Activity in Edible Plant Products: Comparison of Low-Density Lipoprotein Oxidation Assay, DPPH Radical Scavenging Assay, and Folin Ciocalteu Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, n. 8, p. 2391-2396, 2004.

KAUSHIK, V.; ROOS, Y.H. Limonene encapsulation in freeze-drying of gum Arabic-sucrose-gelatin systems. *LWT - Food Science and Technology*, v. 40, n. 8, p. 1381-1391, 2007.

KAVRAYAN, D.; AYDEMIR, T. Partial purification and characterization of polyphenoloxidase from peppermint (*Mentha piperita*). *Food Chemistry*, v. 74, n. 2, p. 147-154, 2001.

KAYA, A.; BELIBAGLI, K.B. Rheology of solid Gaziantep Pekmez. *Journal of Food Engineering*, v. 54, p. 221-226, 2002.

KECHINSKI, C.P.; GUIMARÃES, P.V.R.; NOREÑA, C.P.Z.; TESSARO, I.C.; MARCZAK, L.D.F. Degradation Kinetics of Anthocyanin in Blueberry Juice during Thermal Treatment. *Journal of Food Science*, v. 75, p. C173-C176, 2010.

KIRBY, C.J.; WHITTLE, C.J.; RIGBY, N.; COXON, D.T.; LAW, B.A. Stabilization of ascorbic acid by microencapsulation in liposomes. *International Journal of Food Science & Technology*, v. 26, n. 5, p. 437-449, 1991.

KIRCA, A.; OZKAN, M.; CEMEROĞLU, B. Stability of black carrot anthocyanins in various fruit juices and nectars. *Food Chemistry*, v. 97, n. 4, p. 598-605, August 2006, 2006.

KIRCA, A.; ÖZKAN, M.; CEMEROĞLU, B. Stability of black carrot anthocyanins in various fruit juices and nectars. *Food Chemistry*, v. 97, p. 598-605, 2006.

KOIDE, T.; HASHIMOTO, Y.; KAMEI, H.; KOJIMA, T.; HASEGAWA, M.; TERABE, K. Antitumor effect of anthocyanin fractions extracted from red soybeans and red. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, v. 12, n. 4, p. 277-280, 1997.

KOIDE, T.; KAMEI, H.; HASHIMOTO, Y.; KOJIMA, T.; HASEGAWA, M. Antitumor Effect of Hydrolyzed Anthocyanin from Grape Rinds and Red Rice. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, v. 11, n. 4, 1996.

KONCZAK, I.; ZHANG, W. Anthocyanins: More Than Nature's Colours. Hindawi Publishing Corporation, 2004.

KONG, J.-M.; CHIA, L.-S.; GOH, N.-K.; CHIA, T.-F.; BROUILLARD, R. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, v. 64, n. 5, p. 923-933, 2003.

KOSKELA, A.K.J.; ANTTONEN, M.J.; SOININEN, T.H.; SAVIRANTA, N.M.M.; AURIOLA, S.; JULKUNEN-TIITTO, R.; KARJALAINEN, R.O. Variation in the Anthocyanin Concentration of Wild Populations of Crowberries (*Empetrum nigrum* L subsp. *hermaphroditum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, n. 23, p. 12286-12291, 2010.

KRIKORIAN, R.; SHIDLER, M.D.; NASH, T.A.; KALT, W.; VINQVIST-TYMCHUK, M.R.; SHUKITT-HALE, B.; JOSEPH, J.A. Blueberry Supplementation Improves Memory in Older Adults. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, n. 7, p. 3996-4000, 2010.

LABIB, A.A.S.; EL-ASHWAK, F.A.; OMRAN, H.T.; ASKAR, A. Heat inactivation of mango pectinesterase and polygalacturonase. *Food Chemistry*, v. 53, p. 137-142, 1995.

LABUZA, T. *Enthalpy-entropy compensation in food reactions*. Food Technology. 67-77 p., 1980.

LACA, A.; SÁENZ, M.C.; PAREDES, B.; DÍAZ, M. Rheological properties, stability and sensory evaluation of low-cholesterol mayonnaises prepared using egg yolk granules as emulsifying agent. *Journal of Food Engineering*, v. 97, n. 2, p. 243-252, 2010.

LAINE, P.; KYLLI, P.; HEINONEN, M.; JOUPPILA, K. Storage Stability of Microencapsulated Cloudberry (*Rubus chamaemorus*) Phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, n. 23, p. 11251-11261, 2008.

LAMIKANRA, O.; WATSON, M.A. Cantaloupe melon peroxidase: Characterization and effects of additives on activity. *Food Nahrung*, v. 44, n. 3, p. 168-172, 2000a.

_____. Cantaloupe melon peroxidase: Characterization and effects of additives on activity. *Food / Nahrung*, v. 44, n. 3, p. 168-172, 2000b.

LANDBO, A.-K.; KAACK, K.; MEYER, A.S. Statistically designed two step response surface optimization of enzymatic prepress treatment to increase juice yield and lower turbidity of elderberry juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 8, n. 1, p. 135-142, 2007.

LANDBO, A.-K.; MEYER, A.S. Effects of different enzymatic maceration treatments on enhancement of anthocyanins and other phenolics in black currant juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 5, n. 4, p. 503-513, 2004.

LAUNAY, B.; CUVELIER, G.; MARTINEZ-REYES, S. Viscosity of locust bean, guar and xanthan gum solutions in the Newtonian domain: a critical examination of the log ([eta]sp)/c master curves. *Carbohydrate Polymers*, v. 34, n. 4, p. 385-395, 1997.

LEE, C.Y.; PENNESI, A.P.; DICKSON, M.H. Characterization of the cauliflower peroxidase isoenzyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 32, n. 1, p. 18-21, 1984.

LEE, J.-B.; AHN, J.; LEE, J.; KWAK, H.-S. L-Ascorbic Acid Microencapsulated with Polyacylglycerol Monostearate for Milk Fortification. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 68, n. 3, p. 495-500, 2004.

LEE, J.; DURST, R.W.; WROLSTAD, R.E. Impact of Juice Processing on Blueberry Anthocyanins and Polyphenolics: Comparison of Two Pretreatments. *Journal of Food Science*, v. 67, n. 5, p. 1660-1667, 2002.

LEE, J.; RENNAKER, C.; WROLSTAD, R.E. Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry*, v. 110, n. 3, p. 782-786, 1 October 2008, 2008.

LEE, J.; WROLSTAD, R. Extraction of Anthocyanins and Polyphenolics from Blueberry Processing Waste. *Journal of Food Science*, v. 69, n. 7, p. 564-573, 2004.

LEE, W.C.; YUSOF, S.; HAMID, N.S.A.; BAHARIN, B.S. Optimizing conditions for enzymatic clarification of banana juice using response surface methodology (RSM). *Journal of Food Engineering*, v. 73, n. 1, p. 55-63, 2006a.

_____. Optimizing conditions for hot water extraction of banana juice using response surface methodology (RSM). *Journal of Food Engineering*, v. 75, n. 4, p. 473-479, 2006b.

LIEW ABDULLAH, A.G.; SULAIMAN, N.M.; AROUA, M.K.; MEGAT MOHD NOOR, M.J. Response surface optimization of conditions for clarification of carambola fruit juice using a commercial enzyme. *Journal of Food Engineering*, v. 81, n. 1, p. 65-71, 2007.

LIMA, E.D.P.A. *Purificação e caracterização bioquímica da polifenoloxidase (PPO) em fruto da família anonácea - pinha (Annona squamosa L.)*. (1999). 132 f. (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

LIMA, V.L.A.G.D.; PINHEIRO, I.O.; NASCIMENTO, M.S.D.; GOMES, P.B.; GUERRA, N.B. Identificação de antocianinas em acerolas do Banco Ativo de Germoplasma da Universidade Federal Rural de Pernambuco. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, p. 927-935, 2006.

LIU, C.P.; LIU, S.D. Formulation and characterization of the microencapsulated entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* MA126. *Journal of Microencapsulation: Micro and Nano Carriers*, v. 26, n. 5, p. 377 - 384, 2009.

LOHACHOOMPOL, V.; MULHOLLAND, M.; SRZEDNICKI, G.; CRASKE, J. Determination of anthocyanins in various cultivars of highbush and rabbiteye blueberries. *Food Chemistry*, v. 111, n. 1, p. 249-254, 2008.

LÓPEZ-SERRANO, M.; BARCELÓ, A.R. Purification and characterization of a basic peroxidase isoenzyme from strawberries. *Food Chemistry*, v. 55, n. 2, p. 133-137, 1996.

LORENZO, G.; ZARITZKY, N.; CALIFANO, A. Modeling rheological properties of low-in-fat o/w emulsions stabilized with xanthan/guar mixtures. *Food Research International*, v. 41, n. 5, p. 487-494, 2008.

LU, A.T.; WHITAKER, J.R. Some factors affecting rates of heat inactivation and reactivation of horseradish peroxidase. *Journal of Food Science*, v. 39, n. 6, p. 1173-1178, 1974.

LULE, S.U.; XIA, W. Food Phenolics, Pros and Cons: A Review. *Food Reviews International*, v. 21, n. 4, p. 367 - 388, 2005.

LUND, D.B. Heat processing. In: LUND, D. B. (Ed.). *Principles of food science: part II: principles of food preservation*. New York: M. Dekker, 1975.

MACEIRAS, R.; ALVAREZ, E.; CANCELA, M.A. Rheological properties of fruit purees: Effect of cooking. *Journal of Food Engineering*, v. 80, n. 3, p. 763-769, 2007.

MADENE, A.; JACQUOT, M.; SCHER, J.; DESOBRY, S. Flavour encapsulation and controlled release – a review. *International Journal of Food Science & Technology*, v. 41, n. 1, p. 1-21, 2006.

MAEDA, R.N.; PANTOJA, L.; YUYAMA, L.K.O.; CHAAR, J.M. Estabilidade de ácido ascórbico e antocianinas em néctar de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H. B. K.) McVaugh). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, n. 2, p. 313-316, 2007.

MAIN, J.H.; CLYDESDALE, F.M.; FRANCIS, F.J. Spray drying anthocyanin concentrates for use as food colorants. *Journal of Food Science*, v. 43, n. 6, p. 1693-1694, 1978.

MALACRIDA, C.R.; MOTTA, S.D. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, p. 659-664, 2005.

MALIEN-AUBERT, C.; DANGLES, O.; AMIOT, M.J. Color Stability of Commercial Anthocyanin-Based Extracts in Relation to the Phenolic Composition. Protective Effects by Intra- and Intermolecular Copigmentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, n. 1, p. 170-176, 2000.

MALKIN, A.Y.; ISAYEV, A.I. *Rheology: concepts, methods & applications*. Toronto: ChemTech Publisher. 449 p., 2006.

MAN, Y B.C.; IRWANDI, J.; ABDULLAH, W J W. Effect of different types of maltodextrin and drying methods on physico-chemical and sensory properties of encapsulated durian flavour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 79, n. 8, p. 1075-1080, 1999.

MANZOCCO, L.; NICOLI, M.C.; ANESE, M.; PITOTTI, A.; MALTINI, E. Polyphenoloxidase and peroxidase activity in partially frozen systems with different physical properties. *Food Research International*, v. 31, n. 5, p. 363-370, 1998.

MARANGONI, A.G.; BROWN, E.D.; STANLEY, D.W.; YADA, R.Y. Tomato Peroxidase: Rapid Isolation and Partial Characterization. *Journal of Food Science*, v. 54, n. 5, p. 1269-1271, 1989.

MARÇO, P.H.; POPPI, R.J.; SCARMINIO, I.S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. *Química Nova*, v. 31, p. 1218-1223, 2008.

MARTÍ, N.; PÉREZ-VICENTE, A.; GARCÍA-VIGUERA, C. Influence of storage temperature and ascorbic acid addition on pomegranate juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 82, n. 2, p. 217-221, 2002.

MARTÍNEZ, G.A.; CIVELLO, P.M.; CHAVES, A.R.; AÑÓN, M.C. Characterization of peroxidase-mediated chlorophyll bleaching in strawberry fruit. *Phytochemistry*, v. 58, n. 3, p. 379-387, 2001.

MARTINEZ, M.V.; WHITAKER, J.R. The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science & Technology*, v. 6, n. 6, p. 195-200, 1995.

MARTINS, B.T. Tecnologia de secagem preservam as características dos alimentos. *Revista Engenharia de Alimentos*, v. 6, n. 30, p. 40-42, 2000.

MATIOLI, G.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Licopeno Encapsulado em Goma Arábica e Maltodextrina: Estudo da Estabilidade. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 5, p. 197-203, 2002.

MATTA, V.M.D.; CABRAL, L.M.C.; SILVA, L.F.M. Suco de acerola microfiltrado: avaliação da vida-de-prateleira. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 24, p. 293-297, 2004.

MAZZA, G.; BROUILLARD, R. Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. *Food Chemistry*, v. 25, n. 3, p. 207-225, 1987.

MCCLEMENTS, D.J. *Food emulsions: principles, practice, and techniques*. Washington: CRC Press. p., 2005.

MCGUIRRE, R.G. Reporting of objective color measurements. *Horticultural Science*, v. 27, p. 1254-1255, 1992.

MCLELLAN, M.; KIME, R.; LEE, C.; LONG, T. Effect of honey as an antibrowning agent in light raisin processing. *Journal of Food Processing and Preservation*, v. 19, n. 1, p. 1-8, 1995.

MCNAMEE, B.F.; O'RIORDA, E.D.; O'SULLIVAN, M. Emulsification and Microencapsulation Properties of Gum Arabic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 46, n. 11, p. 4551-4555, 1998.

MELO, K.D.S.; FIGUEIRÊDO, R.M.F.D.; QUEIROZ, A.J.D.M. Comportamento reológico da polpa de buriti com leite. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v. 8, n. 2, 2º Semestre 2008, 2008.

METIVIER, R.P.; FRANCIS, F.J.; CLYDESDALE, F.M. Solvent extraction of anthocyanins from wine pomace. *Journal of Food Science*, v. 45, n. 4, p. 1099-1100, 1980.

MEYERS, M. High performance encapsulation (HPE). Applications in meat processing technology. *Agro-Food Industry Hi-Tech*, v. 6, n. 5, p. 23-25, 1995.

MIERZWA, J.C.; SILVA, M.C.C.D.; RODRIGUES, L.D.B.; HESPANHOL, I. Tratamento de Água para abastecimento público por ultrafiltração: avaliação comparativa através dos custos diretos de implantação e operação com os sistemas convencional e convencional com carvão ativado. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, v. 13, p. 78-87, 2008.

MIGUEL, G.; DANDLEN, S.; ANTUNES, D.; NEVES, A.; MARTINS, D. The Effect of Two Methods of Pomegranate (*Punica granatum* L) Juice Extraction on Quality During Storage at 4°C. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2004, n. 5, p. 332-337, 2004 December 1, 2004.

MINOLTA. *Precise color communication: color control from feeling to instrumentation*. Japão: Minolta Corporation. 49 p., 1994.

MOLNÁR-PERL, I.; FÜZFAI, Z. Chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrochromatographic techniques in the analysis of flavonoids. *Journal of Chromatography A*, v. 1073, n. 1-2, p. 201-227, 2005.

MORAIS, H.; RAMOS, C.; FORGÁCS, E.; CSERHÁTI, T.; OLIVIERA, J. Influence of storage conditions on the stability of monomeric anthocyanins studied by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 770, n. 1-2, p. 297-301, 2002.

MOSQUEIRA, V.C.F.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRATT, G. Poly(D, L-lactide) Nanocapsules prepared by a solvent displacement process : Influence of the composition on physicochemical and structural properties. *Journal of pharmaceutical sciences*, v. 89, n. 5, p. 614-626, 2000.

MOTA, R.V.D. Caracterização do suco de amora-preta elaborado em extrator caseiro. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, p. 303-308, 2006.

MOURA, S.C.S.R.D.; FRANÇA, V.C.L.; LEAL, Á.M.C.B. Propriedades termofísicas de soluções modelo similares a sucos - Parte I. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 23, p. 62-68, 2003.

MOZAFARI, M.R.; KHOSRAVI-DARANI, K.; BORAZAN, G.G.; CUI, J.; PARDAKHTY, A.; YURDUGUL, S. Encapsulation of Food Ingredients Using Nanoliposome Technology. *International Journal of Food Properties*, v. 11, n. 4, p. 833 - 844, 2008.

MÜFTÜGİL, N. The peroxidase enzyme activity of some vegetables and its resistance to heat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 36, n. 9, p. 877-880, 1985.

MULDER, M. *Basic Principles of Membrane Technology*. 2. ed. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 564 p., 1996.

MUTLU, M.; SARIOGLU, K.; DEMIR, N.; ERCAN, M.T.; ACAR, J. The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part I: viscosimetric determination of enzyme activity. *Journal of Food Engineering*, v. 41, n. 3-4, p. 147-150, 1999/9//, 1999.

MYERS, R.H.; MONTGOMERY, D.C. *Response surface methodology*. New York: John Wiley & Sons Inc. 1 - 17 p., 2002.

NEGRO, C.; TOMMASI, L.; MICELI, A. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Bioresource Technology*, v. 87, n. 1, p. 41-44, 2003.

NICHENAMETLA, S.N.; TARUSCIO, T.G.; BARNEY, D.L.; EXON, J.H. A Review of the Effects and Mechanisms of Polyphenolics in Cancer. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 46, n. 2, p. 161 - 183, 2006.

NINDO, C.I.; TANG, J.; POWERS, J.R.; SINGH, P. Viscosity of blueberry and raspberry juices for processing applications. *Journal of Food Engineering*, v. 69, n. 3, p. 343-350, 2005.

NINDO, C.I.; TANG, J.; POWERS, J.R.; TAKHAR, P.S. Rheological properties of blueberry puree for processing applications. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, v. 40, p. 292-299, 2007.

OCHOA, M.R.; KESSELER, A.G.; VULLIQUOD, M.B.; LOZANO, J.E. Physical and Chemical Characteristics of Raspberry Pulp: Storage Effect on Composition and Color. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, v. 32, n. 3, p. 149-153, 1999.

OKTAY, M.; KÜFREVIOLU, I.; KOCAÇALISKAN, I.; SAKLROLU, H. Polyphenoloxidase from Amasya Apple. *Journal of Food Science*, v. 60, n. 3, p. 494-496, 1995.

OLIVEIRA, K.H.; SOUZA, J.A.R.D.; MONTEIRO, A.R. Caracterização reológica de sorvetes. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, p. 592-598, 2008.

OLIVEIRA, M.C.S.D.; SILVA, N.C.C.; NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Avaliação do método de liquefação enzimática na extração de suco de maçã. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, p. 906-915, 2006.

ONSA, G.H.; BIN SAARI, N.; SELAMAT, J.; BAKAR, J. Purification and characterization of membrane-bound peroxidases from Metroxylon sagu. *Food Chemistry*, v. 85, n. 3, p. 365-376, 2004.

OSORIO, C.; ACEVEDO, B.; HILLEBRAND, S.; CARRIAZO, J.; WINTERHALTER, P.; MORALES, A.L. Microencapsulation by Spray-Drying of Anthocyanin Pigments from Corozo (*Bactris guineensis*) Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, n. 11, p. 6977-6985, 2010.

OSZMIANSKI, J.; LEE, C.Y. Inhibition of polyphenol oxidase activity and browning by honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 38, n. 10, p. 1892-1895, 1990.

ÖZKAN, M. Degradation of anthocyanins in sour cherry and pomegranate juices by hydrogen peroxide in the presence of added ascorbic acid. *Food Chemistry*, v. 78, n. 4, p. 499-504, 2002.

PAGOT, E. *Cultivo de pequenas frutas : amora-preta, framboesa, mirtilo*. Porto Alegre: EMATER/RS-ASCAR. 41 p., 2006.

PARIZE, A.L.; SOUZA, T.C.R.D.; BRIGHENTE, I.M.D.C. Obtenção e caracterização de microesferas de quitosana contendo o corante urucum. *Tecnologia & Ciência Agropecuária*, v. 2, n. 1, p. 15-18, 2008.

PARK, E.Y.; LUH, B.S. Polyphenol Oxidase of Kiwifruit. *Journal of Food Science*, v. 50, n. 3, p. 678-684, 1985.

PATIL, G.; MADHUSUDHAN, M.C.; RAVINDRA BABU, B.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. Extraction, dealcoholization and concentration of anthocyanin from red radish. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, v. 48, n. 1, p. 364-369, 2009.

PAZMIÑO-DURÁN, E.A.; GIUSTI, M.M.; WROLSTAD, R.E.; GLÓRIA, M.B.A. Anthocyanins from *Oxalis triangularis* as potential food colorants. *Food Chemistry*, v. 75, n. 2, p. 211-216, 2001.

PEDROSA, I. *O universo da cor*. São Paulo: SENAC. 153 p., 2003.

PELEGRINE, D.H.; SILVA, F.C.; GASPARETTO, C.A. Rheological behavior of pineapple and mango pulps. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, v. 35, n. 8, p. 645-648, 2002.

PELLATI, F.; BRUNI, R.; BELLARDI, M.G.; BERTACCINI, A.; BENVENUTI, S. Optimization and validation of a high-performance liquid chromatography method for the analysis of cardiac glycosides in *Digitalis lanata*. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, n. 15, p. 3260-3269, 2009.

PÉREZ-GILABERT, M.; CARMONA, F.G. Characterization of catecholase and cresolase activities of eggplant polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, p. 695-700, 2000.

PHILIP, T. Purification and concentration of natural colorants by membranes. *Food Technology*, v. 38, n. 12, p. 107-108, 1984.

PIERUCCI, A.P.T.R.; ANDRADE, L.R.; BAPTISTA, E.B.; VOLPATO, N.M.; ROCHA-LEÃO, M.H.M. New microencapsulation system for ascorbic acid using pea protein concentrate as coat protector. *Journal of Microencapsulation*, v. 23, n. 6, p. 654-662, 2006.

PIERUCCI, A.P.T.R.; ANDRADE, L.R.; FARINA, M.; PEDROSA, C.; ROCHA-LEÃO, M.H.M. Comparison of α -tocopherol microparticles produced with different wall materials: pea protein a new interesting alternative. *Journal of Microencapsulation*, v. 24, n. 3, p. 201-213, 2007.

PINELO, M.; DEL FABBRO, P.; MARZOCCO, L.; NUNEZ, M.J.; VICOLI, M.C. Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* by-products. *Food Chemistry*, v. 92, p. 109-117, 2005.

POLYDERA, A.C.; STOFOROS, N.G.; TAOUKIS, P.S. Comparative shelf life study and vitamin C loss kinetics in pasteurised and high pressure processed reconstituted orange juice. *Journal of Food Engineering*, v. 60, n. 1, p. 21-29, November 2003, 2003.

PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; RUSIG, O. Efeito da Luz na Estabilidade de um Extrato Microencapsulado Obtido a Partir do Urucum (*Bixa orellana* L.). *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 2, n. 1,2, p. 185-189, 1999.

PRIOR, R.L.; CAO, G.; MARTIN, A.; SOFIC, E.; MCEWEN, J.; O'BRIEN, C.; LISCHNER, N.; EHLENFELDT, M.; KALT, W.; KREWER, G.; MAINLAND, C.M. Antioxidant Capacity As Influenced by Total Phenolic and Anthocyanin Content, Maturity, and Variety of *Vaccinium* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 46, n. 7, p. 2686-2693, 1998.

PRIOR, R.L.; LAZARUS, S.A.; CAO, G.; MUCCITELLI, H.; HAMMERSTONE, J.F. Identification of Procyanidins and Anthocyanins in Blueberries and Cranberries (*Vaccinium* Spp.) Using High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, n. 3, p. 1270-1276, 2001.

PROVENZI, G.; FALCÃO, L.D.; FETT, R.; LUIZ, M.T.B. Estabilidade de Antocianinas de Uvas Cabernet Sauvignon com β - e γ -Ciclodextrinas. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 9, n. 3, p. 165-170, jul./set. 2006, 2006.

PTASZEK, P.; LUKASIEWICZ, M.; ACHREMOWICZ, B.; GRZESIK, M. Interaction of hydrocolloid networks with mono- and oligosaccharides. *Polymer Bulletin*, v. 58, n. 1, p. 295-303, 2007.

RAFFIN, R.P.; COLOMÉ, L.M.; SCHAPOVAL, E.E.S.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Increasing sodium pantoprazole photostability by microencapsulation: Effect of the

polymer and the preparation technique. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 69, n. 3, p. 1014-1018, 2008.

RAI, P.; MAJUMDAR, G.C.; DASGUPTA, S.; DE, S. Optimizing pectinase usage in pretreatment of mosambi juice for clarification by response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, v. 64, n. 3, p. 397-403, 2004.

RAMASWAMAMY, H.S.; VOORT, F.R.V.D.; GHAZALA, S. An analysis of TDT and arrhenius methods for handling process and kinectic data. *Journal of Food Science*, v. 54, p. 1322-1326, 1989.

RAMIREZ, M.R. *Análise química e avaliação das atividades biológicas e comportamentais de extratos de frutas ricas em compostos fenólicos (mirtilo e amora-preta)*. (2008). 223 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

RAMIREZ, M.R.; IZQUIERDO, I.; RASEIRA, M.D.C.B.; ZUANAZZI, J.A.; BARROS, D.; HENRIQUES, A.T. Effect of lyophilised vaccinium Berries on memory, anxiety and locomotion in adult rats. *Pharmacological Research*, v. 52, p. 457-462, 2005.

RAO, M.A. *Rheology of fluid and semisolid foods*. New York: Springer. 481 p., 2007.

RAPEANU, G.; LOEY, A.V.; SMOUT, C.; HENDRICKX, M. Biochemical characterization and process stability of polyphenoxidase extracted from Victoria grape (*Vitis vinifera* ssp. *Sativa*). *Food Chemistry*, v. 94, n. 2, p. 253-261, 2006.

RASEIRA, M.D.C.B.; ANTUNES, L.E.C. *A cultura do mirtilo (Vaccinium myrtillus)*. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. 69 p., 2004.

RASSIS, D.; SAGUY, I. Oxygen effect nonenzymatic browning and vitamin C in commercial citrus juices and concentrate. *Labensmittel- Wissenschaft u-Technology*, v. 28, p. 285-290, 1995.

RAVI KUMAR, M.N. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, v. 3, n. 2, p. 234-258, 2000.

RAZAVI, M.A.; KARAZHIYAN, H. Flow properties and thixotropy of selected hydrocolloids: Experimental and modeling studies. *Food Hydrocolloids*, v. 23, p. 908-912, 2009.

REVILLA, E.; RYAN, J.-M.; MARTIN-ORTEGA, G. Comparison of Several Procedures Used for the Extraction of Anthocyanins from Red Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 46, n. 11, p. 4592-4597, 1998.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, p. 771-780, 2004.

RIBAS, A.I.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. *Operaciones unitarias en la ingeniería de alimentos*. Madrid: Mundi-Prensa Libros. 865 p., 2005.

RIEGER, M. *Introduction to Fruit Crops*. Binghamton: Food Products Press, an Imprint of the Haworth Press, Inc. 462 p., 2006.

ROBERT, P.; GORENA, T.; ROMERO, N.; SEPULVEDA, E.; CHAVEZ, J.; SAENZ, C. Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. *International Journal of Food Science & Technology*, v. 45, n. 7, p. 1386-1394, 2010.

ROCKENBACH, I.I.; SILVA, G.L.D.; RODRIGUES, E.; KUSKOSKI, E.M.; FETT, R. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, p. 238-244, 2008.

RODRIGO, C.R., M.; ALVARRUIZ, A.; FRÍGOLA, A. Thermal Inactivation at High Temperatures and Regeneration of Green Asparagus Peroxidase. *Journal of Food Protection*, v. 59, p. 1065-1071, 1996.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. *Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos*. 1. ed. Campinas, SP: Casa do Pão. 326 p., 2005.

RODRIGUES, R.M.A.; VÁZQUEZ ODERIZ, M.L.; SIMAL-LOZANO, J.; LÓPEZ HERNÁNDEZ, J. Estudio de la composición química de pequeños frutos, arandano, framboesa, grosella blanca, grosella negra, grosella roja y zarzamora producidos en Galicia. *Industria conserve*, v. 67, p. 29-33, 1992.

RODRIGUES, S.Á.; GULARTE, M.A.; PEREIRA, E.R.B.; BORGES, C.D.; VENDRUSCOLO, C.T. Influência da cultivar nas características físicas, químicas e sensoriais de topping de mirtilo. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, v. 1, n. 1, 2007.

RODRIGUES, S.L.C.; MOREIRA, R.L.D.S.; CARDOSO, M.H.; MERÇON, F. Avaliação de parâmetros de ultrafiltração de suco de banana. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 23, p. 98-101, 2003.

RODRIGUEZ-SAONA, L.E.; GIUSTI, M.M.; WROLSTAD, R.E. Anthocyanin Pigment Composition of Red-fleshed Potatoes. *Journal of Food Science*, v. 63, n. 3, p. 458-465, 1998.

ROSENBERG, M.; KOPELMAN, I.J.; TALMON, Y. A Scanning Electron Microscopy Study of Microencapsulation. *Journal of Food Science*, v. 50, n. 1, p. 139-144, 1985.

_____. Factors affecting retention in spray-drying microencapsulation of volatile materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 38, n. 5, p. 1288-1294, 1990.

ROSENTHAL, A.; MATTA, V.M.; CABRAL, L., M. C.; FURTADO, A.A.L. Processo de produção de sucos. In: ROSENTHAL, A. *et al* (Ed.). *Iniciando um pequeno grande negócio agroindustrial: polpa e suco de frutas*. Brasília: SEBRAE/Embrapa Informação Tecnológica: Embrapa Hortaliças, 2003. p. 123.

ROSISKI, S.; GRIGORESCU, G.; LEWISKA, D.; RITZ; EACUTE; N, L.G.; VIERNSTEIN, H.; TEUNOU, E.; PONCELET, D.; ZHANG, Z.; FAN, X.; SERP, D.; MARISON, I.; HUNKELER, D. Characterization of microcapsules: recommended methods based on round-robin testing. *Journal of Microencapsulation*, v. 19, p. 641-659, 2002.

ROSSI, M.; GIUSSANI, E.; MORELLI, R.; LO SCALZO, R.; NANI, R.C.; TORREGGIANI, D. Effect of fruit blanching on phenolics and radical scavenging activity of highbush blueberry juice. *Food Research International*, v. 36, n. 9-10, p. 999-1005, 2003.

RUBERTO, G.; RENDA, A.; DAQUINO, C.; AMICO, V.; SPATAFORA, C.; TRINGALI, C.; TOMMASI, N.D. Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. *Food Chemistry*, v. 100, n. 1, p. 203-210, 2007.

SABBE, S.; VERBEKE, W.; DELIZA, R.; MATTA, V.M.; DAMME, P.V. Consumer Liking of Fruit Juices with Different Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) Concentrations. *Journal of Food Science*, v. 74, n. 5, p. S171-S176, 2009.

SADILOVA, E.; STINTZING, F.C.; CARLE, R. Thermal degradation of acylated and nonacylated anthocyanins. *Journal of Food Science*, v. 71, p. C504-C512, 2006.

SAÉNZ, C.; TAPIA, S.; CHÁVEZ, J.; ROBERT, P. Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry*, v. 114, n. 2, p. 616-622, 2009.

SAHA, N.K.; BALAKRISHNAN, M.; ULBRICHT, M. Polymeric membrane fouling in sugarcane juice ultrafiltration: role of juice polysaccharides. *Desalination*, v. 189, n. 1-3, p. 59-70, 2006.

_____. Sugarcane juice ultrafiltration: FTIR and SEM analysis of polysaccharide fouling. *Journal of Membrane Science*, v. 306, n. 1-2, p. 287-297, 2007.

_____. Fouling control in sugarcane juice ultrafiltration with surface modified polysulfone and polyethersulfone membranes. *Desalination*, v. 249, n. 3, p. 1124-1131, 2009.

SAITO, K.; MURATA, T.; MORI, T. Encapsulation of carthamin and safflor yellow B in calcium alginate beads — technical stabilization of the colours. *International Journal of Food Science & Technology*, v. 29, n. 6, p. 715-719, 1994.

SANTOS, A.B.D.; FÁVARO-TRINDADE, C.S.; GROSSO, C.R.F. Preparo e caracterização de microcápsulas de oleoresina de páprica obtidas por atomização. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, p. 322-326, 2005.

SANTOS, C.N.P. *Elaboração de um estruturado de polpa de manga (Mangifera indica. Cv Tommy Atkins) parcialmente desidratada por osmose*. (2003). 80 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

SANTOS, H.R. *Caracterização bioquímica da peroxidase e polifenoloxidase de açai (Euterpe oleracea)*. (2001). 109 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2001.

SATO, A.C.K.; CUNHA, R.L. Effect of particle size on rheological properties of jaboticaba pulp. *Journal of Food Engineering*, v. 91, p. 566-570, 2009.

SAXENA, A.; TRIPATHI, B.P.; KUMAR, M.; SHAHI, V.K. Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: An overview. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 145, n. 1-2, p. 1-22, 2009.

SCHRAMM, G. *Reologia e Reometria: fundamentos teóricos e práticos*; tradução MOTHÉ, C. G. et al. São Paulo: Artliber, p.234, 2006.

SECEX. *Importações e Exportações Brasileiras*. Aliceweb, 2009. Disponível em:<<http://alicesweb.desenvolvimento.gov.br/>>. Acesso em: 22 de setembro de 2009.

SEERAM, N.P.; ADAMS, L.S.; ZHANG, Y.; LEE, R.; SAND, D.; SCHEULLER, H.S.; HEBER, D. Blackberry, Black Raspberry, Blueberry, Cranberry, Red Raspberry, and Strawberry Extracts Inhibit Growth and Stimulate Apoptosis of Human Cancer Cells In Vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n. 25, p. 9329-9339, 2006.

SELLAPPAN, S.; AKOH, C.C.; KREWER, G. Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Georgia-Grown Blueberries and Blackberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 8, p. 2432-2438, 2002.

SERRADELL, M.D.L.A.; ROZENFELD, P.A.; MARTÍNEZ, G.A.; CIVELLO, P.M.; CHAVES, A.R.; AÑÓN, M.C. Polyphenoloxidase activity from strawberry fruit (*Fragaria ananassa, Duch., cv Selva*): characterisation and partial purification. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 80, n. 9, p. 1421-1427, 2000.

SHABIR, G.A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A*, v. 987, n. 1-2, p. 57-66, 2003.

SHAHIDI, F. Natural antioxidants chemistry health effects and application. *AOCS Press*, p. 414 1997.

SHAHIDI, F.; HAN, X.-Q. Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 33, n. 6, p. 501-547, 1993.

- SHARMA, S.K.; LEMAGUER, M.; LIPTAY, A.; POYSA, V. Effect of composition on the rheological properties of tomato thin pulp. *Food Research International*, v. 29, n. 2, p. 175-179, 1996.
- SILVA, L. Caracterização dos subprodutos da vinificação. *Revista do Instituto Superior Politécnico de Viseu*. v. 282003. p. 123-133.
- SILVA, M.A.D. *Transição sol-gel em soluções orgânico-aquosas de lisozima e o efeito indutor do solvente: caracterização cinética e estrutural*. (2006). 164 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- SILVA, P.A.; CARVALHO, A.V.; PINTO, C.A. Elaboração e caracterização de fruta estruturada mista de goiaba e cajá. *Revista de Ciência Agrária*, v. 51, p. 99-113, jan./jun., 2009.
- SILVA, P.R. Mercado e Comercialização de Amora, Mirtilo e Framboesa. *Análises e Indicadores do Agronegócio*, v. 2, n. 12, dezembro, 2007.
- SIN, H.N.; YUSOF, S.; SHEIKH ABDUL HAMID, N.; RAHMAN, R.A. Optimization of enzymatic clarification of sapodilla juice using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, v. 73, n. 4, p. 313-319, 2006.
- SINGH, C.; JAIN, K.; KUMAR, C.; AGARWAL, K. Design and *in vitro* evaluation of mucoadhesive microcapsules of pioglitazone. *J Young Pharmacists*, v. 1, p. 195-198, 2009.
- SKREDE, G.; WROLSTAD, R.E.; DURST, R.W. Changes in Anthocyanins and Polyphenolics During Juice Processing of Highbush Blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Journal of Food Science*, v. 65, n. 2, p. 357-364, 2000.
- SNYDER, L.R.K., J. J.; GLAJCH, J. L. *Practical HPLC Method Development*. 2. ed. New York: Wiley. 800 p., 1997.
- SOARES, M.; WELTER, L.; GONZAGA, L.; LIMA, A.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Avaliação da atividade antioxidante e identificação dos ácidos fenólicos presentes no bagaço de maçã cv. Gala. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, p. 727-732, 2008.
- SOUSA, M.B.; CURADO, T.; VASCONCELLOS, F.N.; TRIGO, M.J. Mirtilo: qualidade pós-colheita. *Agro divulgação* v. 556, n. 8, 2007.
- SPAGNA, G.; PIFFERI, P.G.; TRAMONTINI, M.; ALBERTINI, A. Pectinlyase immobilization on polyamides for application in the food processing industry. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 59, n. 4, p. 341-348, 1994.
- SPIGNO, G.; TRAMELLI, L.; DE FAVERI, D.M. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, v. 81, n. 1, p. 200-208, 2007.

SREENATH, H.K.; SANTHANAM, K. The use of commercial enzymes in white grape juice clarification. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 73, n. 3, p. 241-243, 1992.

STARR, M.S.; FRANCIS, F.J. Effect of metallic ions on color and pigment content of cranberry juice cocktail. *Journal of Food Science*, v. 38, n. 6, p. 1043-1046, 1973.

STEFFE, J.F. *Rheological methods in food process engineering*. East Lansing: Freeman Press. 418 p., 1996.

STILES, W.C.; ABDALLA, D.A. Blueberry culture. In: ECK, P.; CHILDRES, N. (Ed.). *Harvesting, processing and storage*. Brunswick: Rutgers University, 2009. p. 280-301.

STINTZING, F.C.; CARLE, R. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, v. 15, n. 1, p. 19-38, 2004.

SU, M.-S.; SILVA, J.L. Antioxidant activity, anthocyanins, and phenolics of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) by-products as affected by fermentation. *Food Chemistry*, v. 97, n. 3, p. 447-451, 2006.

SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E.C.; PEZZIN, A.P.T.; SILVA, D.A.K.; MEIER, M.M.; SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. *Health and Environment Journal*, v. 7, n. 2, p. 12-20, 2006.

SULAIMAN, M.Z.; SULAIMAN, N.M.; YIH, L.S. Limiting permeate flux in the clarification of untreated starfruit juice by membrane ultrafiltration. *Chemical Engineering Journal*, v. 69, n. 2, p. 145-148, 1998.

SUN, C.; GRANT, D.J.W. Influence of Crystal Structure on the Tableting Properties of Sulfamerazine Polymorphs. *Pharmaceutical Research*, v. 18, n. 3, p. 274-280, 2001.

SUSANTO, H.; FENG, Y.; ULBRICHT, M. Fouling behavior of aqueous solutions of polyphenolic compounds during ultrafiltration. *Journal of Food Engineering*, v. 91, n. 2, p. 333-340, 2009.

SWARTZ, M.E.K., I.S. Validação de métodos cromatográficos. *Pharmaceutical Technology*, v. 2, n. 3, p. 12-20, 1998.

TAKEOKA, G.; DAO, L. *Anthocyanins*. Boca Raton: Taylor and Francis Group. (Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals). 247 p., 2008.

TANADA PALMU, P.; JARDINE, J.; MATTA, V. Production of a banana (*Musa cavendishii*) extract containing polyphenol oxidase by ultrafiltration. *Journal of the Science of Food and Agriculture* v. 79, n. 5, p. 643-647, 1999.

TANRIÖVEN, D.; EKSI, A. Phenolic compounds in pear juice from different cultivars. *Food Chemistry*, v. 93, n. 1, p. 89-93, 2005.

TARAGANO, V.M.; PILOSOFF, A.M.R. Application of Doehlert designs for water activity, pH, and fermentation time optimization for *Aspergillus niger* pectinolytic activities production in solid-state and submerged fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 25, n. 3-5, p. 411-419, 1999.

THOMPSON, M.E., S. L. R.; WOOD, R. Harmonized Guidelines for Singlelaboratory Validation of Methods of Analysis. *International Union of Pure And Applied Chemistry*, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

TIAN, Q.; GIUSTI, M.M.; STONER, G.D.; SCHWARTZ, S.J. Screening for anthocyanins using high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry with precursor-ion analysis, product-ion analysis, common-neutral-loss analysis, and selected reaction monitoring. *Journal of Chromatography A*, v. 1091, n. 1-2, p. 72-82, 2005.

TONNESEN, H.H. Photodecomposition of Drugs. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology: Third Edition*, p. 2859 - 2865, 2006.

TONON, R.V.; BRABET, C.; HUBINGER, M.D. Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying. *Journal of Food Engineering*, v. 88, n. 3, p. 411-418, 2008.

_____. Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. *Food Research International*, v. 43, n. 3, p. 907-914, 2010.

TORALLES, R.P.; VENDRUSCOLO, J.L.; VENDRUSCOLO, C.T.; PINO, F.A.B.D.; ANTUNES, P.L. Determinação das constantes cinéticas de degradação do ácido ascórbico em purê de pêsego: efeito da temperatura e concentração. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, n. 1, p. 18-23, 2008.

TRINDADE, M.A.; GROSSO, C.R.F. The stability of ascorbic acid microencapsulated in granules of rice starch and in gum arabic. *Journal of Microencapsulation*, v. 17, n. 2, p. 169-176, 2000.

TROIANI, E.P.; TROPIANI, C.T.; CLEMENTE, E. Peroxidase (POD) and polyphenoloxidase (PPO) in grape (*Vitis vinifera* L.). *Ciência e Agrotecnologia*, v. 27, n. 3, p. 635-642, maio/jun, 2003.

TSAI, P.-J.; HSIEH, Y.-Y.; HUANG, T.-C. Effect of Sugar on Anthocyanin Degradation and Water Mobility in a Roselle Anthocyanin Model System Using 17O NMR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, n. 10, p. 3097-3099, 2004.

TULIPANI, S.; MEZZETTI, B.; CAPOCASA, F.; BOMPADRE, S.; BEEKWILDER, J.; DE VOS, C.H.R.; CAPANOGLU, E.; BOVY, A.; BATTINO, M. Antioxidants, Phenolic Compounds, and Nutritional Quality of Different Strawberry Genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, n. 3, p. 696-704, 2008.

UDDIN, M.S.; HAWLADER, M.N.A.; ZHU, H.J. Microencapsulation of ascorbic acid: effect of process variables on product characteristics. *Journal of Microencapsulation*, v. 18, n. 2, p. 199-209, 2001.

UENOJO, M.; PASTORE, G.M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. *Química Nova*, v. 30, p. 388-394, 2007.

ULBRICHT, M. Advanced functional polymer membranes. *Polymer*, v. 47, n. 7, p. 2217-2262, 2006.

ULBRICHT, M.; SCHUSTER, O.; ANSORGE, W.; RUETERING, M.; STEIGER, P. Influence of the strongly anisotropic cross-section morphology of a novel polyethersulfone microfiltration membrane on filtration performance. *Separation and Purification Technology*, v. 57, n. 1, p. 63-73, 2007.

VAILLANT, F.; MILLAN, A.; DORNIER, M.; DECLoux, M.; REYNES, M. Strategy for economical optimisation of the clarification of pulpy fruit juices using crossflow microfiltration. *Journal of Food Engineering*, v. 48, n. 1, p. 83-90, 2001.

VALDERRAMA, P.; CLEMENTE, E. Isolation and thermostability of peroxidase isoenzymes from apple cultivars Gala and Fuji. *Food Chemistry*, v. 87, n. 4, p. 601-606, 2004.

VALDUGA, E.; LIMA, L.; PRADO, R.D.; PADILHA, F.F.; TREICHEL, H. Extração, secagem por atomização e microencapsulamento de antocianinas do bagaço da uva "Isabel" (*Vitis labrusca*). *Ciência e Agrotecnologia*, v. 32, p. 1568-1574, 2008.

VALLS, J.; MILLÁN, S.; MARTÍ, M.P.; BORRÀS, E.; AROLA, L. Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, n. 43, p. 7143-7172, 2009.

VAN DEN BERG, G.B.; SMOLDERS, C.A. Diffusional phenomena in membrane separation processes. *Journal of Membrane Science*, v. 73, n. 2-3, p. 103-118, 1992.

VANDRESEN, S.; QUADRI, M.G.N.; SOUZA, J.A.R.D.; HOTZA, D. Temperature effect on the rheological behavior of carrot juices. *Journal of Food Engineering*, v. 92, n. 3, p. 269-274, June 2009, 2009.

VENDRUSCOLO, J.L.S.; VENDRUSCOLO, C.T. *Sistemas de Produção*. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. p., 2005.

VENKATARAM, S.; KHOHLOKWANE, M.; WALLIS, S.H. Differential Scanning Calorimetry as a Quick Scanning Technique for Solid State Stability Studies. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 21, n. 7, p. 847-855, 1995.

VIDAL, J.R.M.B.; GASPARETTO, C.A. Comportamento reológico da polpa de manga (*Mangifera indica* L) - efeito dos sólidos insolúveis. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 20, p. 172-175, 2000.

VIDAL, J.R.M.B.; PELEGRINE, D.H.; GASPARETTO, C.A. Efeito da temperatura no comportamento reológico da polpa de manga (*mangifera indica* L-Keitt). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 24, p. 39-42, 2004.

WAGENINGEN, U. *Enzymatic browning* 2010. Disponível em: <<http://www.fao.org/AG/ags/agsi/ENZYMFINAL/Enzymatic%20Browning.htm> >. Acesso em: 11 de setembro de 2010.

WANG, S.Y.; JIAO, H. Scavenging Capacity of Berry Crops on Superoxide Radicals, Hydrogen Peroxide, Hydroxyl Radicals, and Singlet Oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, n. 11, p. 5677-5684, 2000.

WANG, W.-D.; XU, S.-Y. Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate. *Journal of Food Engineering*, v. 82, n. 3, p. 271-275, 2007.

WEI, Y.P.; WANG, C.S.; WU, J.S.B. Flow properties of fruit fillings. *Food Research International*, v. 34, n. 5, p. 377-381, 2001.

WIGHTMAN, J.D.; WROLSTAD, R.E. b-glucosidase Activity in Juice-Processing Enzymes Based on Anthocyanin Analysis. *Journal of Food Science*, v. 61, n. 3, p. 544-548, 1996.

WROLSTAD, R.E. *Colors and pigment analysis in fruit products*. Corvallis: Oregon Agricultural Experimental Station. 17 p., 1976.

_____. Anthocyanins. In: FRANCIS, F. J.; LAURO, G. J. (Ed.). *Natural Food Colorants*. New York: Marcel Dekker, Inc., 2000. p. 237-252.

WROLSTAD, R.E.; DURST, R.W.; LEE, J. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science & Technology*, v. 16, n. 9, p. 423-428, 2005.

WROLSTAD, R.E.; GIUSTI, M.M.; RODRIGUEZ-SAONA, L.E.; DURST, R.W. Anthocyanins from Radishes and Red-Fleshed Potatoes *Chemistry and Physiology of Selected Food Colorants*: American Chemical Society, 2001. p. 66-89. (ACS Symposium Series).

WU, K.-G.; CHAI, X.-H.; CHEN, Y. Microencapsulation of Fish Oil by Simple Coacervation of Hydroxypropyl Methylcellulose. *Chinese Journal of Chemistry*, v. 23, p. 1569-1572, 2005.

WU, T.Y.; MOHAMMAD, A.W.; MD. JAHIM, J.; ANUAR, N. Palm oil mill effluent (POME) treatment and bioresources recovery using ultrafiltration membrane: Effect of pressure on membrane fouling. *Biochemical Engineering Journal*, v. 35, n. 3, p. 309-317, 2007.

WULF, L.W.; NAGEL, C.W. High-pressure liquid chromatographic separation of anthocyanins of *Vitis vinifera*. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 29, n. 1, p. 42-49, 1978.

YADAV, S.; YADAV, P.K.; YADAV, D.; YADAV, K.D.S. Pectin lyase: A review. *Process Biochemistry*, v. 44, n. 1, p. 1-10, 2009.

YAMAMOTO, T.; DOBASHI, T.; KIMURA, M.; CHANG, C.P. An approach to analysis of pigment release from microcapsules with size distribution. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 25, n. 4, p. 305-311, 2002.

YAMASHITA, F.; BENASSI, M.D.T.; TONZAR, A.C.; MORIYA, S.; FERNANDES, J.G. Produtos de acerola: estudo da estabilidade de vitamina C. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 23, n. 1, p. 92-94, 2003.

YAZDANSHENAS, M.; TABATABAEE-NEZHAD, S.A.R.; SOLTANIEH, M.; ROOSTAAZAD, R.; KHOSHFETRAT, A.B. Contribution of fouling and gel polarization during ultrafiltration of raw apple juice at industrial scale. *Desalination*, v. 258, n. 1-3, p. 194-200, 2010.

YILMAZ, Y.; TOLEDO, R.T. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 19, p. 41-44, 2006.

YU, L. Amorphous pharmaceutical solids: preparation, characterization and stabilization. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 48, n. 1, p. 27-42, 2001.

YUE, X.; XU, Z. Changes of Anthocyanins, Anthocyanidins, and Antioxidant Activity in Bilberry Extract during Dry Heating. *Journal of Food Science*, v. 73, n. 6, p. C494 - C499, 2008.

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

ZHANG, L.; MOU, D.; DU, Y. Procyanidins: extraction and microencapsulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 87, p. 2192-2197, 2007.

ZHANG, Z.; KOU, X.; FUGAL, K.; MCLAUGHLIN, J. Comparison of HPLC Methods for Determination of Anthocyanins and Anthocyanidins in Bilberry Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, n. 4, p. 688-691, 2004.

ZHANG, Z.; PANG, X.; XUEWU, D.; JI, Z.; JIANG, Y. Role of peroxidase in anthocyanin degradation in litchi fruit pericarp. *Food Chemistry*, v. 90, n. 1-2, p. 47-52, 2005/4//, 2005.

ZUTTER, U.; IDING, H.; SPURR, P.; WIRZ, B. New, Efficient Synthesis of Oseltamivir Phosphate (Tamiflu) via Enzymatic Desymmetrization of a meso-1,3-

Cyclohexanedicarboxylic Acid Diester. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 73, n. 13, p. 4895-4902, 2008.

Anexo A.4

Tabela A.4.1 Resultados da Análise de Variância (ANOVA) para viscosidade, teor de antocianinas monoméricas e índice de refração para o suco de mirtilo extraído com a enzima NZ103.

	SQ	GL	MQ	F	p
Viscosidade Cinemática					
(1) Concentração Enzima (x_1)	0,2099	1	0,2099	3186,0	<0,0001
Concentração Enzima (x_1) ²	0,0367	1	0,0367	557,1	<0,0001
(2) Temperatura (x_2)	0,0000	1	0,0000	0,1	0,7198
Temperatura (x_2) ²	0,0271	1	0,0271	411,2	<0,0001
1 × 2 (x_1, x_2)	0,0016	1	0,0016	24,2	<0,0001
Erro puro	0,0016	24	0,0001		
Total	0,2791	32			
Antocianina Monomérica					
(1) Concentração Enzima (x_1)	425,94	1	425,94	90,85	<0,0001
Concentração Enzima (x_1) ²	0,63	1	0,63	0,13	0,7178
(2) Temperatura (x_2)	2173,83	1	2173,83	463,67	<0,0001
Temperatura (x_2) ²	207,04	1	207,04	44,16	<0,0001
1 × 2 (x_1, x_2)	10,72	1	10,72	2,29	0,1436
Erro puro	112,52	24	4,69		
Total	3015,48	32			
Índice de Refração					
(1) Concentração Enzima (x_1)	0,010	1	0,010	0,139	0,7126
Concentração Enzima (x_1) ²	0,253	1	0,253	3,664	0,0676
(2) Temperatura (x_2)	4,693	1	4,693	67,855	<0,0001
Temperatura (x_2) ²	40,900	1	40,900	591,331	<0,0001
1 × 2 (x_1, x_2)	9,363	1	9,363	135,373	<0,0001
Erro puro	1,660	24	0,069		
Total	61,650	32			

* Os valores entre parênteses representam o valor das variáveis codificadas. SQ = soma dos quadrados; GL = graus de liberdade; MQ = quadrados médios; F = valor de F e p = probabilidade. Influência significativa para $p < 0,05$.

Anexo A.5

Tabela A.5.1 Análise de Variância (ANOVA) do planejamento fatorial para as diferentes combinações de tempo e temperatura do tratamento térmico em polpa de mitilo.

	SQ	GL	MQ	F	p
(1)Tempo (L)	3,161	1	3,161	73,7	0,0133
Tempo (Q)	3,760	1	3,760	87,6	0,0112
(2)Temperatura (L)	57,419	1	57,419	1338,0	0,0007
Temperatura (Q)	5,402	1	5,402	125,9	0,0079
1L x 2L	3,138	1	3,138	73,1	0,0134
Erro Puro	0,086	2	0,043		
Total SS	72,491	10			

* Diferença significativa ($p < 0,05$); (L) = efeito linear; (Q) = efeito quadrático; SQ = soma dos quadrados; GL = graus de liberdade; MQ = quadrados médios e F = valor de F; p = probabilidade.

Anexo A.6

Tabela A.6.1 Análise de Variância (ANOVA) para a o fluxo de permeado médio durante a ultrafiltração do suco de mirtilo.

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F _{calc}	p
(1)MMC	70,9	1	70,9	71,2	0,014
(2)°Brix	14,1	1	14,1	14,1	0,064
(3)Temperatura	65,2	1	65,2	65,5	0,015
1 x 2	54,2	1	54,2	54,5	0,018
1 x 3	75,2	1	75,2	75,6	0,013
2 x 3	9,5	1	9,5	9,6	0,090
Falta de Ajuste	135,7	2			
Erro Puro	2,0	2			
Total MQ	426,7	10			

SQ é a Soma dos Quadrados; GL são os Graus de Liberdade; MQ são os quadrados médios e F_{calc} é o valor de F calculado.

Tabela A.6.2 Análise de Variância (ANOVA) para a tendência ao *fouling* dos diferentes pontos do planejamento experimental.

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F _{calc}	p
(1)MMC	49,2	1	49,2	1,9	0,396
(2)°Brix	37,5	1	37,5	1,5	0,438
(3)Temperatura	104,8	1	104,8	4,2	0,290
1 x 2	294,4	1	294,4	11,7	0,181
1 x 3	1556,8	1	1556,8	61,7	0,081
2 x 3	180,8	1	180,8	7,2	0,228
Falta de Ajuste	336,2	2	168,1	6,7	0,264
Erro Puro	25,2	1	25,2		
Total MQ	2585,0	9			

SQ é a Soma dos Quadrados; GL são os Graus de Liberdade; MQ são os quadrados médios e F_{calc} é o valor de F calculado.

Tabela A.6.3 Análise de Variância (ANOVA) para a o teor de antocianinas totais monoméricas durante a ultrafiltração do suco de mirtilo.

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F _{calc}	p
(1)MMC	2093	1	2093	40861	0,003
(2)°Brix	72	1	72	1399	0,017
(3)Temperatura	384	1	384	7504	0,007
1 x 2	26	1	26	507	0,028
1 x 3	87	1	87	1690	0,015
2 x 3	14	1	14	268	0,039
Falta de Ajuste	339	2			
Erro Puro	0	1			
Total MQ	3014	9			

SQ é a Soma dos Quadrados; GL são os Graus de Liberdade; MQ são os quadrados médios e F_{calc} é o valor de F calculado.

Tabela A.6.4 Análise de Variância (ANOVA) para a retenção de delphinidina durante a ultrafiltração do suco de mirtilo.

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F _{calc}	p
(1)MMC	1186	1	1186	349	0,034
(2)°Brix	50	1	50	15	0,162
(3)Temperatura	521	1	521	153	0,051
1 x 2	124	1	124	36	0,105
1 x 3	90	1	90	27	0,122
2 x 3	17	1	17	5	0,270
Falta de Ajuste	513	2			
Erro Puro	3	1			
Total MQ	2505	9			

SQ é a Soma dos Quadrados; GL são os Graus de Liberdade; MQ são os quadrados médios e F_{calc} é o valor de F calculado.

Tabela A.6.5 Análise de Variância (ANOVA) para a retenção de malvidina durante a ultrafiltração do suco de mirtilo.

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F _{calc}	p
(1)MMC	2068	1	2068	785	0,023
(2)°Brix	34	1	34	13	0,174
(3)Temperatura	434	1	434	165	0,050
1 x 2	223	1	223	85	0,069
1 x 3	45	1	45	17	0,150
2 x 3	1	1	1	1	0,590
Falta de Ajuste	183	2			
Erro Puro	3	1			
Total MQ	2991	9			

SQ é a Soma dos Quadrados; GL são os Graus de Liberdade; MQ são os quadrados médios e F_{calc} é o valor de F calculado.

Tabela A.6.6 Análise de Variância (ANOVA) para a redução da atividade da peroxidase durante a ultrafiltração do suco de mirtilo.

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F _{calc}	p
(1)MMC	1,24	1	1,24	159	0,006
(2)°Brix	0,68	1	0,68	87	0,011
(3)Temperatura	242,36	1	242,36	30931	0,000
1 x 2	14,86	1	14,86	1897	0,001
1 x 3	1,90	1	1,90	243	0,004
2 x 3	4,73	1	4,73	604	0,002
Falta de Ajuste	119,43	2			
Erro Puro	0,02	2			
Total MQ	385,22	10			

SQ é a Soma dos Quadrados; GL são os Graus de Liberdade; MQ são os quadrados médios e F_{calc} é o valor de F calculado.

Anexo A.7

Tabela A.7.1 Análise da Variância (ANOVA) dos resultados experimentais da extração de antocianinas do bagaço de mirtilo para as variáveis independentes pH e concentração de etanol.

Efeito	SS	df	MS	F	p
(1) CE (L)	153844	1	153844	566	<0,0001
CE (Q)	287476	1	287476	1058	<0,0001
(2) pH(L)	3094	1	3094	11	0,0015
pH(Q)	25880	1	25880	95	<0,0001
(1) x (2)	65003	1	65003	239	<0,0001
Erro Puro	13040	48	272		
Total SS	552790	56			

CE: Concentração de Etanol; Efeito Significativo ($p < 0,05$); SS = Máximo Quadrático ; df = graus de liberdade; MS = quadrados médios; F = F valor; p = probabilidade; (L) = modelo linear; (Q) = modelo quadrático.

Tabela A.7.2 Resultados da Análise de Variância (ANOVA) para as diferentes agliconas obtidas durante a extração de antocianidinas do bagaço de mirtilo.

Delfinidina	SS	df	MS	F	p
(1) CE (L)	100.195	1	100.195	240,8	<0,0001
CE (Q)	202.613	1	202.613	487,0	<0,0001
(2) pH(L)	75.709	1	75.709	182,0	<0,0001
pH(Q)	174.632	1	174.632	419,7	<0,0001
(1) x (2)	33.074	1	33.074	79,5	<0,0001
Erro Puro	14.561	35			
Total SS	650.037	43			
Cianidina	SS	df	MS	F	p
(1) CE (L)	4.358	1	4.358	2420,5	<0,0001
CE (Q)	2.164	1	2.164	1201,7	<0,0001
(2) pH(L)	1.035	1	1.035	575,0	<0,0001
pH(Q)	1.864	1	1.864	1035,4	<0,0001
(1) x (2)	974	1	974	541,1	<0,0001
Erro Puro	63	35			
Total SS	10.744	43			
Malvidina	SS	df	MS	F	p
(1) CE (L)	2.861	1	2.861	299,7	<0,0001
CE (Q)	765	1	765	80,2	<0,0001
(2) pH(L)	651	1	651	68,2	<0,0001
pH(Q)	396	1	396	41,5	<0,0001
(1) x (2)	456	1	456	47,7	<0,0001
Erro Puro	334	35			
Total SS	5.473	43			

CE: Concentração de Etanol; Efeito Significativo ($p < 0,05$); SS = Máximo Quadrático ; df = graus de liberdade; MS = quadrados médios; F = F valor; p = probabilidade; (L) = modelo linear; (Q) = modelo quadrático.

Anexo A.9

Tabela A.9.1 Análise de Variância para o tamanho médio de partícula para as diferentes formulações do planejamento experimental.

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F _{calc}	p
(1)CMC	8666	1	8666	22,43	0,0004
(2)HPMC	2225	1	2225	5,76	0,0321
1 x 2	34950	1	34950	90,45	<0,0001
Falta de Ajuste	10188	1			
Erro Puro	5023	13			
Total	61052	17			

SQ é a Soma dos Quadrados; GL são os Graus de Liberdade; MQ são os quadrados médios e F_{calc} é o valor de F calculado.

Tabela A.9.2 Análise de Variância (ANOVA) para o índice de polidispersão das partículas para as diferentes formulações do planejamento experimental.

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F _{calc}	P
(1)CMC	0,13	1	0,13	1,66	0,2199
(2)HPMC	0,52	1	0,52	6,47	0,0245
1 x 2	3,64	1	3,64	45,20	<0,0001
Falta de Ajuste	0,84	1			
Erro Puro	1,05	13			
Total	6,18	17			

SQ é a Soma dos Quadrados; GL são os Graus de Liberdade; MQ são os quadrados médios e F_{calc} é o valor de F calculado.

Tabela A.9.3 Análise de Variância (ANOVA) a dissolução em água das partículas para as diferentes formulações do planejamento experimental.

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F _{calc}	p
(1)CMC	23,40	1	23,40	23,96	0,0002
(2)HPMC	15,87	1	15,87	16,25	0,0010
1 x 2	0,90	1	0,90	0,92	0,3508
Falta de Ajuste	0,13	1			
Erro Puro	15,63	16			
Total	55,93	20			

SQ é a Soma dos Quadrados; GL são os Graus de Liberdade; MQ são os quadrados médios e F_{calc} é o valor de F calculado.

Tabela A.9.4 Análise de Variância (ANOVA) para a luminosidade (L*) das partículas para as diferentes formulações do planejamento experimental.

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F _{calc}	p
(1)CMC	266,77	1	266,77	143,55	<0,0001
(2)HPMC	8,07	1	8,07	4,34	0,0536
1 x 2	0,09	1	0,09	0,05	0,8317
Falta de Ajuste	91,78	1			
Erro Puro	29,73	16			
Total	396,44	20			

SQ é a Soma dos Quadrados; GL são os Graus de Liberdade; MQ são os quadrados médios e F_{calc} é o valor de F calculado.

Tabela A.9.5 Análise de Variância (ANOVA) para o cromas das partículas para as diferentes formulações do planejamento experimental.

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F _{calc}	p
(1)CMC	15,40	1	15,40	23,97	0,0002
(2)HPMC	116,57	1	116,57	181,42	<0,0001
1 x 2	372,70	1	372,70	580,07	<0,0001
Falta de Ajuste	135,29	1			
Erro Puro	10,28	16			
Total	650,23	20			

SQ é a Soma dos Quadrados; GL são os Graus de Liberdade; MQ são os quadrados médios e F_{calc} é o valor de F calculado.

Tabela A.9.6 Análise de Variância (ANOVA) para o ângulo de cor ($^{\circ}$ Hue) das partículas para as diferentes formulações do planejamento experimental.

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F _{calc}	P
(1)CMC	29,83	1	29,83	331,47	<0,0001
(2)HPMC	48,88	1	48,88	543,16	<0,0001
1 x 2	23,75	1	23,75	263,95	<0,0001
Falta de Ajuste	54,90	1			
Erro Puro	1,44	16			
Total	158,80	20			

SQ é a Soma dos Quadrados; GL são os Graus de Liberdade; MQ são os quadrados médios e F_{calc} é o valor de F calculado.

Tabela A.9.7 Análise de Variância (ANOVA) para o teor de antocianinas totais monoméricas das partículas para as diferentes formulações do planejamento experimental.

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F _{calc}	p
(1)CMC	1626	1	1626	23,08	0,0001
(2)HPMC	173	1	173	2,46	0,1332
1 x 2	15370	1	15370	218,14	<0,0001
Falta de Ajuste	13490	1			
Erro Puro	1339	19			
Total	31998	23			

SQ é a Soma dos Quadrados; GL são os Graus de Liberdade; MQ são os quadrados médios e F_{calc} é o valor de F calculado.

Tabela A.9.8 Análise de Variância (ANOVA) para o teor de delfinidina das partículas para as diferentes formulações do planejamento experimental.

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F _{calc}	p
(1)CMC	211	1	211	28,23	0,0003
(2)HPMC	374	1	374	49,98	<0,0001
1 x 2	9564	1	9564	1278,14	<0,0001
Falta de Ajuste	4969	1			
Erro Puro	75	10			
Total	15194	14			

SQ é a Soma dos Quadrados; GL são os Graus de Liberdade; MQ são os quadrados médios e F_{calc} é o valor de F calculado.

Tabela A.9.8 Análise de Variância (ANOVA) para o conteúdo de cianidina das partículas para as diferentes formulações do planejamento experimental.

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F _{calc}	p
(1)CMC	0,01	1	0,01	0,16	0,6967
(2)HPMC	0,80	1	0,80	8,89	0,0138
1 x 2	191,61	1	191,61	2116,91	<0,0001
Falta de Ajuste	17,91	1			
Erro Puro	0,91	10			
Total	211,24	14			

SQ é a Soma dos Quadrados; GL são os Graus de Liberdade; MQ são os quadrados médios e F_{calc} é o valor de F calculado.

Tabela A.9.9 Análise de Variância (ANOVA) para o teor de malvidina das partículas para as diferentes formulações do planejamento experimental.

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F _{calc}	p
(1)CMC	21,52	1	21,52	38,50	0,0001
(2)HPMC	0,05	1	0,05	0,09	0,7708
1 x 2	169,48	1	169,48	303,22	<0,0001
Falta de Ajuste	17,71	1			
Erro Puro	5,59	10			
Total	214,34	14			

SQ é a Soma dos Quadrados; GL são os Graus de Liberdade; MQ são os quadrados médios e F_{calc} é o valor de F calculado.

Anexo A.10

Tabela A.10.1 Análise de Variância para o limite de escoamento de Casson (k_{OC}).

Fator	Efeito	SQ	GL	MQ	F	p
Goma Xantana	Linear (x_1)	0,415	1	0,415	6,78	0,0598
Goma Xantana	Quadrático (x_1^2)	0,933	1	0,933	15,26	0,0174
Frutose	Linear (x_2)	0,078	1	0,078	1,27	0,3221
Frutose	Quadrático (x_2^2)	0,022	1	0,022	0,36	0,5807
Temperatura	Linear (x_3)	7,495	1	7,495	122,63	0,0004
Temperatura	Quadrático (x_3^2)	1,113	1	1,113	18,21	0,0130
Goma × Frutose	Interação (x_1x_2)	0,093	1	0,093	1,53	0,2842
Goma × Temperatura	Interação (x_1x_3)	0,379	1	0,379	6,21	0,0674
Frutose × Temperatura	Interação (x_2x_3)	0,001	1	0,001	0,01	0,9144
Erro Puro		0,244	4	0,061		
Total SS		12,643	18			

* Efeito significativo ($p < 0,07$); SQ = Soma dos Quadrados; GL = graus de liberdade; MQ = quadrados médios; F = valor de F e p = probabilidade.

Tabela A.10.2 Análise de Variância para a viscosidade plástica de Casson (K_C).

Fator	Efeito	SQ	GL	MQ	F	p
Goma Xantana	Linear (x_1)	0,0163	1	0,0163	41,07	0,0030
Goma Xantana	Quadrático (x_1^2)	0,0015	1	0,0015	3,78	0,1239
Frutose	Linear (x_2)	0,0004	1	0,0004	1,09	0,3561
Frutose	Quadrático (x_2^2)	0,0001	1	0,0001	0,13	0,7322
Temperatura	Linear (x_3)	0,0753	1	0,0753	190,28	0,0002
Temperatura	Quadrático (x_3^2)	0,0003	1	0,0003	0,66	0,4630
Goma × Frutose	Interação (x_1x_2)	0,0000	1	0,0000	0,07	0,8030
Goma × Temperatura	Interação (x_1x_3)	0,0127	1	0,0127	32,15	0,0048
Frutose × Temperatura	Interação (x_2x_3)	0,0009	1	0,0009	2,39	0,1969
Erro Puro		0,0016	4	0,0004		
Total SS		0,1122	18			

* Efeito significativo ($p < 0,07$); SQ = Soma dos Quadrados; GL = graus de liberdade; MQ = quadrados médios; F = valor de F e p = probabilidade.

Tabela A.10.3 Análise de Variância para a dependência com o tempo.

Fator	Efeito	SQ	GL	MQ	F	P
Goma Xantana	Linear (x_1)	1,12E+09	1	1,12E+09	220,92	0,000
Goma Xantana	Quadratico (x_1^2)	1,98E+05	1	1,98E+05	0,04	0,853
Frutose	Linear (x_2)	9,73E+07	1	9,73E+07	19,11	0,012
Frutose	Quadratico (x_2^2)	1,36E+05	1	1,36E+05	0,03	0,878
Temperatura	Linear (x_3)	3,71E+07	1	3,71E+07	7,28	0,054
Temperatura	Quadratico (x_3^2)	7,38E+07	1	7,38E+07	14,50	0,019
Goma × Frutose	Interação (x_1x_2)	3,95E+07	1	3,95E+07	7,75	0,050
Goma × Temperatura	Interação (x_1x_3)	3,34E+04	1	3,34E+04	0,01	0,939
Frutose × Temperatura	Interação (x_2x_3)	4,04E+07	1	4,04E+07	7,93	0,048
Puro erro		2,04E+07	4	5,09E+06		
Total SS		1,48E+09	18			

* Efeito significativo ($p < 0,07$); SQ = Soma dos Quadrados; GL = graus de liberdade; MQ = quadrados médios; F = valor de F e p = probabilidade.

Anexo B.10

Tabela B.10.1 Resultados da estimação para os parâmetros dos modelos de Bingham, Ostwald-de-Walle e Casson.

Trat	Bingham				Ostwald-de Waele				Casson			
	t_0	η_2	Erro (%)	R^2	K	n	Erro (%)	R^2	k_{0c}	K_c	Erro (%)	R^2
T1	71,67 ± 5,79	0,231 ± 0,033	6,94	0,929	41,33 ± 1,62	0,202 ± 0,008	1,77	0,996	7,510 ± 0,256	0,243 ± 0,020	4,00	0,978
T2	48,29 ± 1,51	0,121 ± 0,008	1,99	0,981	33,11 ± 3,23	0,150 ± 0,019	3,16	0,953	6,355 ± 0,037	0,157 ± 0,003	0,50	0,999
T3	61,03 ± 1,48	0,128 ± 0,008	1,78	0,983	45,31 ± 4,25	0,124 ± 0,019	3,93	0,934	7,255 ± 0,089	0,148 ± 0,007	1,26	0,992
T4	81,35 ± 6,53	0,474 ± 0,037	7,59	0,977	33,84 ± 5,55	0,316 ± 0,032	8,40	0,979	7,516 ± 0,261	0,415 ± 0,020	4,52	0,993
T5	43,15 ± 1,85	0,109 ± 0,010	2,26	0,965	28,91 ± 2,12	0,155 ± 0,015	2,09	0,976	5,989 ± 0,069	0,150 ± 0,005	0,77	0,995
T6	72,74 ± 5,51	0,241 ± 0,031	6,65	0,940	41,61 ± 1,74	0,206 ± 0,008	1,92	0,996	7,553 ± 0,216	0,250 ± 0,017	3,43	0,985
T7	78,45 ± 6,25	0,387 ± 0,035	7,04	0,968	36,84 ± 5,13	0,277 ± 0,027	7,12	0,979	7,542 ± 0,267	0,357 ± 0,020	5,05	0,989
T8	53,18 ± 1,75	0,092 ± 0,010	2,06	0,957	40,41 ± 2,24	0,110 ± 0,011	2,04	0,969	6,826 ± 0,082	0,119 ± 0,006	1,16	0,989
T9	49,84 ± 2,74	0,129 ± 0,015	3,40	0,947	32,29 ± 1,65	0,164 ± 0,010	1,60	0,990	6,402 ± 0,115	0,167 ± 0,009	1,56	0,990
T10	65,09 ± 5,16	0,289 ± 0,029	5,75	0,962	32,64 ± 4,02	0,255 ± 0,024	5,38	0,980	6,955 ± 0,246	0,299 ± 0,019	3,88	0,987
T11	60,69 ± 3,49	0,174 ± 0,020	3,94	0,953	37,96 ± 2,52	0,178 ± 0,013	2,66	0,986	7,012 ± 0,146	0,201 ± 0,011	1,94	0,989
T12	72,01 ± 4,04	0,213 ± 0,023	5,34	0,958	45,99 ± 5,90	0,175 ± 0,025	5,89	0,946	7,653 ± 0,251	0,221 ± 0,019	4,23	0,973
T13	95,55 ± 8,27	0,351 ± 0,047	10,08	0,936	51,60 ± 1,95	0,225 ± 0,007	2,12	0,997	8,562 ± 0,299	0,313 ± 0,023	5,49	0,982
T14	26,82 ± 0,87	0,071 ± 0,005	1,16	0,982	18,09 ± 2,03	0,157 ± 0,022	1,93	0,945	4,718 ± 0,054	0,122 ± 0,004	0,05	0,996
T15	64,83 ± 3,66	0,165 ± 0,021	4,50	0,943	42,24 ± 2,25	0,162 ± 0,011	2,06	0,988	7,311 ± 0,149	0,188 ± 0,012	2,17	0,987
T16	73,08 ± 4,70	0,175 ± 0,026	5,99	0,919	47,92 ± 1,99	0,157 ± 0,008	1,93	0,992	7,781 ± 0,207	0,190 ± 0,016	3,52	0,975
T17	76,28 ± 4,84	0,208 ± 0,027	5,88	0,938	48,02 ± 2,80	0,173 ± 0,012	2,42	0,988	7,879 ± 0,192	0,217 ± 0,015	3,00	0,984
T18	67,93 ± 4,83	0,202 ± 0,027	5,58	0,935	40,91 ± 2,77	0,188 ± 0,013	2,86	0,987	7,374 ± 0,210	0,221 ± 0,016	3,06	0,981
T19	72,06 ± 5,00	0,222 ± 0,028	5,89	0,941	43,03 ± 3,27	0,192 ± 0,015	3,43	0,984	7,579 ± 0,210	0,233 ± 0,016	2,83	0,983

Tabela B.10.2 Resultados da estimação para os parâmetros do modelo de Mizrahi-Berk.

Trat	τ_0	K_{MB}	n_{MB}	Erro (%)	R^2	χ^2
T1	15,76 ± 8,58	2,768 ± 0,937	0,176 ± 0,035	1,29	0,998	3,64
T2	40,72 ± 1,09	0,146 ± 0,031	0,511 ± 0,033	0,48	0,999	0,50
T3	55,37 ± 2,33	0,080 ± 0,042	0,599 ± 0,084	1,22	0,993	3,07
T4	49,69 ± 10,79	0,617 ± 0,332	0,440 ± 0,080	4,30	0,993	43,95
T5	31,79 ± 1,91	0,326 ± 0,092	0,383 ± 0,041	0,53	0,998	0,80
T6	25,72 ± 2,97	1,871 ± 0,234	0,222 ± 0,015	0,61	1,000	0,64
T7	45,22 ± 11,73	0,746 ± 0,448	0,390 ± 0,086	4,80	0,991	39,13
T8	42,45 ± 3,31	0,281 ± 0,146	0,370 ± 0,075	1,06	0,992	2,04
T9	28,70 ± 1,94	0,792 ± 0,130	0,276 ± 0,021	0,38	0,999	0,37
T10	35,40 ± 10,44	0,812 ± 0,506	0,352 ± 0,087	3,38	0,990	24,30
T11	35,46 ± 5,51	0,809 ± 0,315	0,298 ± 0,052	1,47	0,996	3,77
T12	57,33 ± 9,72	0,256 ± 0,258	0,477 ± 0,154	4,20	0,973	35,36
T13	22,46 ± 6,33	2,913 ± 0,556	0,198 ± 0,021	1,16	0,999	2,85
T14	22,99 ± 1,08	0,092 ± 0,036	0,544 ± 0,062	0,52	0,996	0,57
T15	36,29 ± 5,33	0,975 ± 0,327	0,265 ± 0,043	1,16	0,997	2,49
T16	28,11 ± 10,91	1,938 ± 0,884	0,186 ± 0,049	1,40	0,996	4,24
T17	38,90 ± 8,50	1,237 ± 0,514	0,253 ± 0,052	1,54	0,996	5,91
T18	32,20 ± 9,45	1,271 ± 0,627	0,253 ± 0,061	2,04	0,994	7,76
T19	37,26 ± 9,80	1,106 ± 0,572	0,277 ± 0,067	1,85	0,993	10,54

Tabela B.10.3 Resultados da estimação para os parâmetros do modelo de Herschel-Bulkley.

Trat	τ_0	K_{HB}	n_{HB}	Erro (%)	R^2	χ^2
T1	22,22 ± 8,28	23,23 ± 6,27	0,273 ± 0,036	1,31	0,998	0,27
T2	41,42 ± 0,88	1,38 ± 0,25	0,594 ± 0,030	0,43	0,999	0,39
T3	55,85 ± 2,23	0,90 ± 0,48	0,671 ± 0,087	1,23	0,993	3,17
T4	53,54 ± 10,08	5,80 ± 3,02	0,582 ± 0,084	4,68	0,992	49,38
T5	32,83 ± 1,77	2,88 ± 0,81	0,461 ± 0,043	0,56	0,997	0,89
T6	31,63 ± 2,80	16,80 ± 1,90	0,322 ± 0,016	0,65	1,000	0,76
T7	48,70 ± 10,81	7,32 ± 4,15	0,513 ± 0,090	5,00	0,990	42,89
T8	43,17 ± 3,07	3,10 ± 1,57	0,425 ± 0,077	1,08	0,991	2,14
T9	30,99 ± 1,77	6,97 ± 1,10	0,357 ± 0,023	0,42	0,999	0,42
T10	38,53 ± 9,46	7,35 ± 4,23	0,467 ± 0,089	3,55	0,989	26,10
T11	38,00 ± 4,96	7,88 ± 2,88	0,381 ± 0,054	1,53	0,995	4,10
T12	58,28 ± 9,18	3,06 ± 3,03	0,556 ± 0,159	4,30	0,972	37,13
T13	31,43 ± 6,13	27,35 ± 4,31	0,306 ± 0,022	1,21	0,999	3,11
T14	23,37 ± 0,93	0,64 ± 0,23	0,632 ± 0,059	0,47	0,997	0,50
T15	39,37 ± 4,65	9,78 ± 2,98	0,344 ± 0,044	1,18	0,997	2,61
T16	33,73 ± 9,23	18,86 ± 7,11	0,264 ± 0,049	1,38	0,996	4,22
T17	43,35 ± 7,14	12,78 ± 4,63	0,339 ± 0,052	1,53	0,996	5,87
T18	36,86 ± 7,76	11,73 ± 4,93	0,348 ± 0,060	2,00	0,994	7,53
T19	41,58 ± 8,19	10,75 ± 4,86	0,373 ± 0,066	1,87	0,993	10,41

Tabela B.10.4 Resultados da estimação para os parâmetros do modelo de Sisko.

Trat	$\eta_?$	K_S	n_S	Erro (%)	R^2	χ^2
T1	0,05 ± 0,01	44,89 ± 1,56	0,170 ± 0,011	1,08	0,999	2,29
T2	0,08 ± 0,01	41,33 ± 1,33	0,058 ± 0,010	0,76	0,997	1,34
T3	0,10 ± 0,01	55,00 ± 1,91	0,039 ± 0,011	1,13	0,994	2,69
T4	0,30 ± 0,05	54,30 ± 5,76	0,148 ± 0,033	3,58	0,995	30,05
T5	0,06 ± 0,00	34,22 ± 0,77	0,086 ± 0,007	0,50	0,999	0,48
T6	0,07 ± 0,00	46,62 ± 0,35	0,162 ± 0,002	0,22	1,000	0,12
T7	0,22 ± 0,04	52,42 ± 5,36	0,148 ± 0,031	3,92	0,994	26,03
T8	0,05 ± 0,01	44,98 ± 1,26	0,062 ± 0,009	0,84	0,995	1,22
T9	0,05 ± 0,00	36,52 ± 0,45	0,114 ± 0,004	0,23	1,000	0,17
T10	0,15 ± 0,04	43,46 ± 4,31	0,148 ± 0,030	2,83	0,993	16,82
T11	0,08 ± 0,01	44,24 ± 1,42	0,116 ± 0,010	0,98	0,998	1,72
T12	0,14 ± 0,04	58,16 ± 5,92	0,079 ± 0,032	3,67	0,979	27,74
T13	0,08 ± 0,01	57,10 ± 1,16	0,187 ± 0,006	0,75	1,000	1,32
T14	0,05 ± 0,01	23,28 ± 1,11	0,053 ± 0,015	0,72	0,993	0,93
T15	0,06 ± 0,01	47,44 ± 1,49	0,115 ± 0,010	0,98	0,998	1,88
T16	0,04 ± 0,02	51,03 ± 2,28	0,131 ± 0,014	1,55	0,995	4,54
T17	0,07 ± 0,02	53,75 ± 2,75	0,128 ± 0,016	1,80	0,995	6,59
T18	0,06 ± 0,03	45,88 ± 3,33	0,143 ± 0,022	2,37	0,992	9,95
T19	0,08 ± 0,03	49,57 ± 3,70	0,137 ± 0,023	2,02	0,992	12,12