

AVALIAÇÃO DOS PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS PARA A CONCENTRAÇÃO DE ANTOCIANINAS DO SUCO DE MORANGO

AREND, G.D.^{*1}, ADORNO, W.T.¹, REZZADORI, K.¹, CHAVES, V.C.²; REGINATTO, F.H.², PETRUS, J.C.C.¹

¹ Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.

² Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil

*giordana.darend@gmail.com

RESUMO – O interesse por produtos naturais tem aumentado nas últimas décadas, tanto para fins nutricionais quanto medicinais. Aliado a isso, a busca por alimentos enriquecidos em compostos funcionais tem se mostrado um mercado em crescimento, uma vez que estes metabólitos estão presentes em baixas concentrações em frutas e vegetais. Neste cenário, os processos de separação por membranas se mostram uma alternativa promissora para a obtenção de suco de morango concentrado em antocianinas. O objetivo deste trabalho foi concentrar as antocianinas presentes no suco de morango utilizando membranas de microfiltração e de nanofiltração. Suco de morango *in natura* foi microfiltrado para a remoção de sólidos em suspensão, sendo posteriormente nanofiltrado. Amostras do suco *in natura* e dos permeados da microfiltração e da nanofiltração foram avaliadas quanto à variação de cor e ao teor de antocianinas. O processo de microfiltração apresentou um fluxo médio de 3,60 L.h⁻¹.m⁻², enquanto que no processo de nanofiltração o fluxo médio foi de 1,60 L.h⁻¹.m⁻². A maior resistência visualizada no processamento durante a microfiltração foi o *fouling*, enquanto que para a nanofiltração predominou a polarização por concentração. A antocianina majoritária encontrada foi a pelargonidina-3-*O*-glicosídeo sendo que não foram detectadas antocianinas no permeado da nanofiltração e o índice de retenção dessa membrana foi próximo a 100%, evidenciando a eficiência do processo de nanofiltração para a obtenção de um produto com alto valor funcional.

Palavras-chave: morango, antocianinas, microfiltração, nanofiltração.

1. INTRODUÇÃO

Os cuidados com o estilo de vida e principalmente com uma alimentação correta devem ser realizados durante todos os estágios da vida (BRUGUÉS et al., 2016). Dentro deste cuidado com a alimentação, as frutas e vegetais tem grande destaque, uma vez que são ricos em compostos bioativos. Estes são compostos que não são sintetizados pelo organismo humano e quando consumidos possuem ação protetora à saúde humana (BIESALSKI et al., 2009; HORST; LAJOLO, 2009).

O morango é um dos frutos com alto valor nutricional e amplamente disponível. Ele é mundialmente consumido por apresentar cor e sabor atrativos, além de possuir grande adaptabilidade aos diversos ambientes, permitindo a sua produção em praticamente todos os países (ORNELAS-PAZ et al., 2013; SAMYKANNO et al., 2013).

Os compostos fenólicos são o grupo de compostos bioativos encontrados em maiores concentrações no morango, sendo as antocianinas responsáveis por 52 a 92% da concentração total dos metabólitos presentes (GIAMPIERI et al., 2012). Autores como Scalzo et al. (2005) relataram que a atividade antioxidante do morango chega a ser 27 vezes superior à verificada em frutos consumidos diariamente, como maçã e pêssego.

As antocianinas encontradas em frutos como o morango e também nas conhecidas “*berries*”, ou frutas vermelhas, são as responsáveis pela coloração dos alimentos, já que são pigmentos hidrossolúveis (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009; PASCUAL-TERESA; SANCHEZ-BALLESTA, 2008). O teor de antocianinas pode variar entre 8,5 e 65,9 mg.100 g⁻¹ de fruto fresco, o que influencia diretamente o potencial antioxidante destes frutos. Além disso, tanto os teores de metabólitos ativos como a capacidade antioxidante podem variar em função da cultivar utilizada e das condições externas, como temperatura e umidade (AABY et al., 2012). Silberberg et al. (2006) sugeriram que a ingestão mínima total diária é de 1 g de compostos fenólicos para que se obtenha as propriedades funcionais esperadas.

Os processos tradicionais de concentração normalmente utilizam altas temperaturas que podem levar a degradação dos compostos bioativos e reduzir sua atividade antioxidante, além de promover o aparecimento de coloração marrom, desagradável ao consumidor (PATRAS et al., 2010). A aplicação da tecnologia de membranas se mostra uma opção promissora para concentração de compostos bioativos, por empregar temperaturas moderadas de operação, o que pode reduzir a degradação e manter a atividade biológica destes compostos, além de evitar a alteração visual do produto (HABERT et al., 2006). A principal desvantagem dos processos de separação por membranas é a redução de fluxo permeado no decorrer do processo, causada pelos fenômenos de polarização por concentração e *fouling*. Esta redução é dependente de características do processo, como o tipo de membrana e o fluido utilizado (MULDER, 2000).

O objetivo deste trabalho foi concentrar as antocianinas presentes no suco de morango *in natura* em um processo conjugado utilizando membranas de microfiltração e nanofiltração e analisar as principais resistências ao fluxo permeado para ambos os processos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do suco *in natura*

Os morangos (*Fragaria ananassa* Duch variedade Oso Grande) foram lavados em água corrente e retiradas as sépalas e o cálice. A extração do suco foi realizada em extrator dotado de centrífuga (*juicer* Walita modelo RI1855). O produto obtido nesta etapa denominou-se de suco *in natura*. O suco *in natura* obtido foi então utilizado como alimentação para o processo de microfiltração imediatamente após a sua obtenção de maneira a evitar a oxidação dos compostos bioativos.

2.2 Filtração por membranas

Suco *in natura* foi alimentado em módulo de microfiltração com membrana de poliamida em configuração de fibra oca (PAM Membranas Seletivas, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) com um diâmetro de poro médio de 0,4 μm e uma área filtrante de 0,7 m^2 . Utilizou-se como condição padrão uma temperatura de 20 ± 2 $^\circ\text{C}$ e uma pressão de 3 bar. Este processo foi utilizado para a remoção de sólidos em suspensão de modo a facilitar o processo de concentração por nanofiltração.

O permeado obtido no processo de microfiltração foi alimentado em módulo de nanofiltração com membrana espiral de polivinilideno (PVDF) (GE Osmonics®, Philadelphia, USA), com massa molar de corte variando entre 150 e 300 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ e área de filtração de 1,2 m^2 . Utilizou-se como condição padrão uma temperatura de 20 ± 2 $^\circ\text{C}$ e uma pressão de 5 bar. O fluxo ao longo de ambos os processos foi calculado de acordo com Habert et al. (2006) pela Equação 1.

$$J = \frac{V}{A \cdot t} \quad (1)$$

Onde: J é o fluxo permeado ($\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$) calculado através da coleta de um volume V de permeado (L) em um tempo t (h) e em uma área de permeação A (m^2).

Ambos os processos foram realizados em sistema aberto e amostras do suco *in natura* e permeados foram coletados em duplicata. Estas foram avaliadas em relação ao teor de antocianinas por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) e também em relação aos parâmetros de cor através de colorímetro.

2.3 Determinação das resistências ao fluxo de massa

As determinações das resistências foram realizadas com os dados de fluxo permeado obtidos com água antes e depois do experimento, bem como os dados do experimento com suco de morango. Para a determinação das resistências as Equações (2) a (5) sugeridas por Cheryan (1998) foram utilizadas.

$$R_T = \frac{P_T}{\mu_p \cdot J_f} \quad (2)$$

$$R_M = \frac{P_T}{\mu_w \cdot J_w} \quad (3)$$

$$R_F = \left(\frac{P_T}{\mu_W J_W} \right) - R_M \quad (4)$$

$$R_P = R_T - R_M - R_F \quad (5)$$

Onde: R_T é a resistência total (m^{-1}),
 R_M é a resistência da membrana (m^{-1}),
 R_F é a resistência devido ao *fouling* (m^{-1}),
 R_P é resistência devido à polarização por concentração (m^{-1}),
 μ_W é a viscosidade da água (Pa.s),
 μ_P é a viscosidade do permeado (Pa.s),
 J_W é o fluxo de água ($m^3.s^{-1}.m^{-2}$),
 J_f é o fluxo final com suco ($m^3.s^{-1}.m^{-2}$),
 P_T é a pressão transmembrana utilizada no experimento (Pa).

2.4 Determinação de antocianinas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A quantificação e identificação de antocianinas foram realizadas pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando cromatógrafo líquido equipado com detector de arranjo de diodos (DAD). As análises foram realizadas em coluna C18 (150 x 4,6 mm; 5 μ m) sob fluxo constante de 1 mL.min⁻¹, temperatura de 21 \pm 2 °C, volume de injeção de 20 μ L. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

Um sistema de eluição em gradiente linear foi utilizado, composto de metanol (A) e uma solução aquosa de ácido fórmico 3% (B). A eluição iniciou de forma isocrática, com a proporção de 10% de A durante 2 minutos. Após, ocorreu um aumento na proporção de metanol chegando a 20% em 3 minutos. Ao término de 14 minutos a proporção de A aumentou para 41%, e ao final de 30 minutos a proporção de metanol chegou a 70%.

Os cromatogramas foram monitorados no comprimento de onda de 520 nm e os espectros foram adquiridos na faixa de 190 a 700 nm. Os picos majoritários foram caracterizados através de comparação dos tempos de retenção, comparação dos espectros e co-injeção com as substâncias de referência pelargonidina-3-*O*-glicosídeo e cianidina-3-*O*-glicosídeo.

2.5 Determinações de cor

A determinação de cor das amostras foi obtida em relação a variação total de cor em relação a um padrão (ΔE^*) calculada pela Equação 6 com os dados de luminosidade (L^*), intensidade de cor vermelha (a^*) e intensidade de cor amarela (b^*) obtidos em colorímetro (MiniScan Ez Hunterlab, USA).

$$\Delta E^* = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}} \quad (6)$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Concentração do suco de morango por membranas

Na Figura 1 (a) e (b) estão apresentadas as curvas de fluxo permeado obtidas nos processos de microfiltração e de nanofiltração do suco de morango, respectivamente.

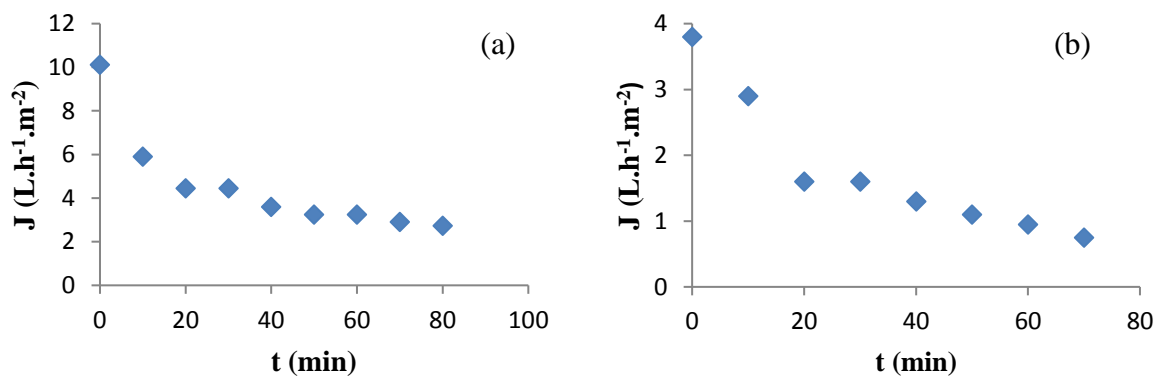


Figura 1 - Curva do fluxo permeado (J) para os processos de microfiltração (a) e nanofiltração (b), nas condições de 3 bar e 20 ± 2 °C e 5 bar e 20 ± 2 °C, respectivamente.

Verifica-se que ambas as curvas apresentaram o comportamento esperado para os processos de separação por membranas descrito por Marshall e Daufin (1995). Estes também observaram rápida redução de fluxo permeado nos primeiros instantes de filtração, relacionado à polarização por concentração e uma redução mais lenta, até atingir um estágio pseudo-estacionário, relacionado ao fenômeno de *fouling*.

Nos 20 minutos iniciais, observou-se uma redução de fluxo permeado de aproximadamente 56% para o processo de microfiltração e de 58% para o processo de nanofiltração. A maior redução de fluxo verificada na membrana de microfiltração pode estar relacionada ao maior tamanho de poro, onde diversos tamanhos de partícula são retidos, contribuindo para o aumento das resistências ao fluxo de massa (BAKER, 2004).

Além disso, aos maiores tamanhos de poros da membrana de microfiltração estão relacionados os maiores valores de fluxo permeado. O processo de microfiltração apresentou um fluxo máximo de aproximadamente $10 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$, reduzindo-se no decorrer do processo até um valor médio de $2,7 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ no estágio pseudo-estacionário. Enquanto que no processo de nanofiltração o fluxo inicial foi de $3,8 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ reduzindo até $0,75 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$. Verifica-se que os valores de fluxo para a microfiltração foram aproximadamente 2,8 vezes superiores que aos fluxos obtidos na nanofiltração. Esta redução nos valores de fluxo permeado, observada em ambos os processos, está relacionada às resistências ao fluxo permeado que vão se tornando mais influentes durante o processo.

Na Figura 2 são apresentadas as resistências para os processos de microfiltração e nanofiltração.

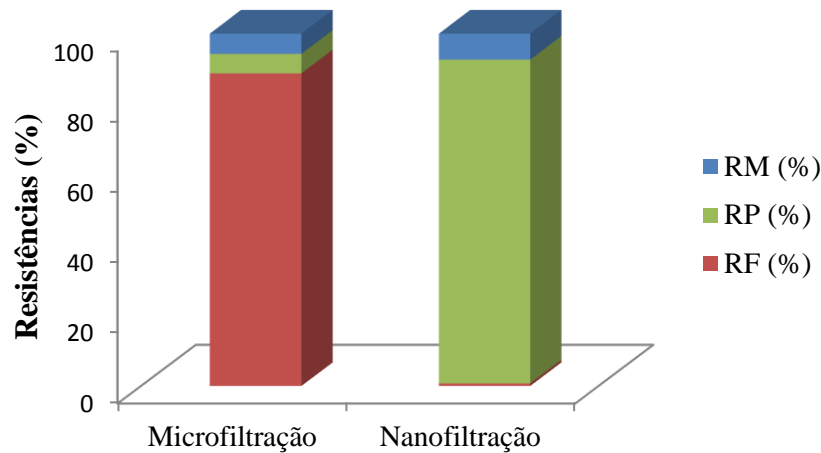


Figura 2 - Influência da resistência por polarização por concentração (R_P), resistência da membrana (R_M) e resistência ao *fouling* (R_F) no fluxo permeado.

As resistências causadas pela membrana (R_M) foram de 5,7% para a microfiltração e de 7,3% para a nanofiltração. A massa molar de corte (MMC) da membrana de nanofiltração é muito inferior à da membrana de microfiltração, fator este relacionado à menor resistência verificada para a microfiltração. Os maiores tamanhos de poro da microfiltração levam a um maior fluxo permeado e, conseqüentemente, menor resistência à transferência de massa (MIERZWA et al., 2008).

Em relação as demais resistências, verificou-se que para o processo de microfiltração a resistência predominante foi o *fouling* (89%), enquanto que para o processo de nanofiltração foi a polarização por concentração (92%).

Segundo Rezzadori (2010) os processos que utilizam pressões de operação mais elevadas têm maior tendência à deposição de compostos na superfície da membrana e, conseqüentemente, maiores valores de polarização por concentração. Os maiores valores de *fouling* verificados para o processo de microfiltração estão, principalmente, relacionados ao alto teor de polpa presente no suco *in natura* utilizado no processo. Durante o processo de microfiltração os sólidos em suspensão se depositam na superfície da membrana formando uma torta de filtração. Esta irá aumentando de espessura com o decorrer do processo de filtração, aumentando a resistência com conseqüente redução do fluxo permeado.

3.2 Caracterização das frações obtidas (suco *in natura* e permeado)

Na Tabela 1 estão apresentados os valores encontrados para cor e antocianinas totais no suco *in natura* e no permeado obtido após a microfiltração e nanofiltração.

Tabela 1 - Valores de variação total de cor em relação ao padrão (ΔE^*) e antocianinas totais pelo método de CLAE ($AT^{\#}$) para as diferentes frações dos processos de microfiltração e nanofiltração.

Amostra	ΔE^*	AT^* (mg.100 mL ⁻¹)
Suco <i>in natura</i>	Padrão	14,69
Permeado Micro	13,87	8,86
Permeado Nano	50,35	0,00

* equivalentes de pelargonidina-3-*O*-glicosídeo.

A maior variação de cor em relação ao padrão foi verificada para o permeado do processo de nanofiltração, comportamento este já esperado para o processo. Segundo Rein e Heinonen (2004) valores de ΔE^* superiores a 1 já apresentam diferença visual perceptível a olho humano, sendo que quanto mais afastado deste valor, maior será a diferença visual. O permeado da nanofiltração apresentou maior valor de ΔE^* em função da retenção de compostos de cor pela membrana (BARATO, 2008).

Ao avaliar-se os valores de ΔE^* do permeado no processo de microfiltração é possível observar um valor de 13,87. Como dito anteriormente valores de ΔE^* superiores a 1 já apresentam diferença visual perceptível a olho humano, o valor nesta fração encontra-se muito próximo a 1 quando comparado com o valor de ΔE^* obtido para o permeado da nanofiltração, que apresentou valor de 50,35. Ou seja, quanto mais afastado de 1, maior será a diferença visual perceptível ao olho humano. A pequena variação de cor do permeado da microfiltração em relação ao suco *in natura* evidencia a permeação de compostos de cor, como as antocianinas, pelo processo de microfiltração, sendo que a pequena diferença observada é justificada pela retirada da polpa durante o processo de microfiltração, resultando em um permeado clarificado.

Ainda na Tabela 1, verifica-se uma redução em torno de 40 % no teor de antocianinas após a microfiltração, comportamento esperado, uma vez que o processo de microfiltração é utilizado para a retirada da polpa, onde uma fração das antocianinas ficaram retidas. O permeado da nanofiltração avaliado por CLAE não apresentou teor de antocianinas quantificável. Dessa forma, o índice de retenção de antocianinas para o processo de nanofiltração foi de aproximadamente 100%. Este resultado está de acordo com os resultados de variação total de cor em relação a um padrão (ΔE^*) discutidos acima. Na Figura 3 está mostrado o perfil cromatográfico obtido nas amostras.

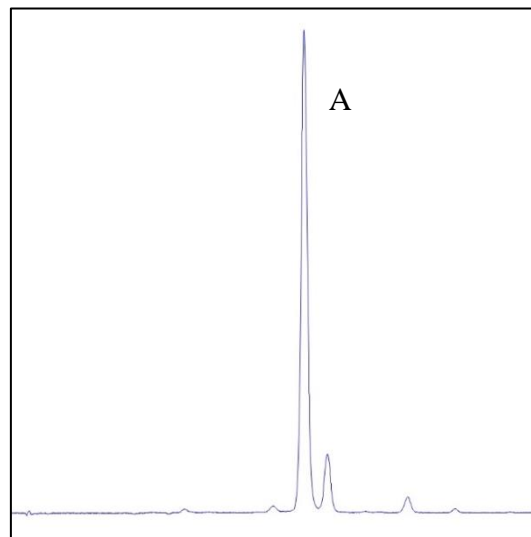


Figura 3: Perfil cromatográfico das amostras analisadas.

O pico A indica a presença de pelargonidina-3-*O*-glicosídeo como antocianina majoritária, em concordância com a literatura: Ornelas-Paz et al., (2013); Crecente-Campo et al. (2012). As amostras do suco *in natura* e do permeado da microfiltração apresentaram apenas variação no teor dos compostos antociânicos, enquanto que o permeado da nanofiltração não apresentou teores passíveis de quantificação.

A ausência de antocianinas no permeado da nanofiltração é um fator importante, pois representa uma retenção de 100% destes compostos, mostrando a eficiência deste processo para a concentração de compostos bioativos do suco de morango.

4. CONCLUSÃO

O processo de microfiltração manteve as características do permeado muito próximas ao suco *in natura*, sendo eficiente como pré-tratamento para o processo de nanofiltração. A principal resistência ao fluxo de massa para o processo de microfiltração foi o *fouling*, enquanto que para a nanofiltração a principal resistência foi a polarização por concentração. A antocianina majoritária encontrada foi a pelargonidina-3-*O*-glicosídeo. O processo de nanofiltração se mostrou eficiente para a concentração de antocianinas do suco de morango com retenção próxima a 100% deste composto.

5. REFERÊNCIAS

- AABY, K.; MAZUR, S.; NES, A.; SKREDE, G. Phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruits: Composition in 27 cultivars and changes during ripening. *Food Chem.*, v. 132, n. 1, p. 86-97, 2012.
- ANTUNES, L.E.C.; PERES, N.A. Strawberry Production in Brazil and South America. *Int. J. Fruit Sci.*, v. 13, p. 156-161, 2013.
- BAKER, R. W. *Membrane Technology and Applications*. John Wiley Sons, 2004.

- BARATO, N.C. *Clarificação de suco de caju através da separação por membranas*. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.
- BIESALSKI, H.; DRAGSTED, L.O.; ELMADFA, I.; GROSSKLAUS, R.; MÜLLER, M.; SCHRENK, D.; WALTER, P.; WEBER, P. Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. *Nutrition*, v. 25, p. 1202–1205, 2009.
- BRUGUÉS, J.; ARANDA, N.; GIRALT, M.; CHICA, M.; SOLA, R.; ARIJA, V.; LLAURADÓ, E.; VALLS, R.M.; ROMEU, M. Impact of a service learning (SL) experience on the improvement of knowledge in healthy eating habits in teenagers. *Procedia. Soc. Behav. Sci.*, v. 228, p. 202 – 208, 2016.
- CASTAÑEDA-OVANDO, A.; PACHECO-HERNÁNDEZ, M. D. L.; PÁEZ-HERNÁNDEZ, M. E.; RODRÍGUEZ, J. A.; GALÁN-VIDAL, C. A. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chem.*, v. 113, p. 859-871, 2009
- CHERYAN, M. *Ultrafiltration and Microfiltration Handbook*. Lancaster: Technomic Publishing Company, 1998.
- CRECENTE-CAMPO, J.; NUNES-DAMACENO, M.; ROMERO-RODRIGUEZ, M.A.; VAZQUEZ-ODERIZ, M.L. Color, anthocyanin pigment, ascorbic acid and total phenolic compound determination in organic versus conventional strawberries (*Fragaria ananassa* Duch, cv Selva). *J. Food Compos. Anal.*, v. 28, p. 23-30, 2012.
- FAO. *Agricultural Production/strawberry*. Food and agriculture organization of the united nations, 2011. Disponível em: < <http://www.faostat.fao.org> > Acesso em 15 de Janeiro de 2016.
- GIAMPIERI, F.; TULIPANI, S.; ALVAREZ-SUAREZ, J. M.; QUILES, J. L.; MEZZETTI, B.; BATTINO, M. The strawberry: composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition*, v. 28, p. 9-19, 2012.
- HABERT, A.; C; BORGES, C.P.; NÓBREGA, R. *Processos de Separação com Membranas*. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais Ltda, 2006.
- HORST, M.A.; LAJOLO, F.M. Biodisponibilidade de compostos bioativos em alimentos. In: *Biodisponibilidade de nutrientes*. v. 1, p. 772-807, 2009.
- MARSHALL, A.D.; DAUFIN, G. Physico-chemical aspects of membrane fouling by dairy fluids. In: *Fouling and cleaning in pressure driven membrane processes*. Brussels: International Dairy Federation, cap.1, p. 8-35, 1995.
- MIERZWA, J.C.; SILVA, M.C.C.; RODRIGUES, L.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. *Eng. Sanit. Ambient.*, v. 78, p. 78-87, 2008.
- MULDER, M. *Basic principles of membrane technology, center for membrane science and technology*, University of Twente, Enschede, The Netherlands, 2000
- ORNELAS-PAZ, J.; YAHIA, E.M.; RAMIREZ-BUSTAMANTE, N.; PEREZ-MARTINEZ, J.D.; ESCALANTE-MINAKATA MDEL, P.; IBARRA-JUNQUERA, V.; ACOSTA-MUNIZ, C.; GUERRERO-PRIETO, V.; OCHOA-REYES, E. Physical attributes and chemical composition of organic strawberry fruit (*Fragaria x ananassa* Duch, Cv. Albion) at six stages of ripening. *Food Chem.*, v. 138, p. 372-81, 2013.
- PASCUAL-TERESA, S.; SANCHEZ-BALLESTA, M. T. Anthocyanins: From plant to health. *Phytochem. Rev.*, v. 7, p. 281-299, 2008.

- PATRAS, A.; BRUNTON, N. P.; O'DONNELL, C.; TIWARI, B. K. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends Food Sci. Technol.*, v. 21, p. 3–11, 2010.
- REIN, M. J.; HEINONEN, M. Stability and enhancement of berry juice color. *J. Agric. Food Chem.*, v. 52, p. 3106-3114, 2004.
- REZZADORI, K. *Pasteurização térmica e com membranas do caldo de cana adicionado de suco de maracujá*. Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.
- SAMYKANNO, K.; PANG, E.; MARRIOTT, P. J. Chemical characterization of two Australian-grown strawberry varieties by using comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chem.*, v. 141, p. 1997-2005, 2013.
- SCALZO, J.; POLITI, A.; PELLEGRINI, N.; MEZZETTI, B.; BATTINO, M. Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. *Nutrition*, v. 21, p. 207–213, 2005.
- SILBERBERG, M.; MORAND, C.; MATHEVON, T.; BESSON, C.; MANACH, C.; SCALBERT, A.; REMESY, C. “The bioavailability of polyphenols is highly governed by capacity of the intestine and of the liver to secrete conjugated metabolites”. *Eur. J. Nutr.* v. 45, p.88-96, 2006.