



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

ESCOLA DE ENGENHARIA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

ENG07053 - TRABALHO DE CONCLUSÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Extração, Purificação e Fracionamento das Antocianinas do Bagaço de Uva

Nataly Leidens

Orientadoras: Isabel Cristina Tessaro

Carolina Pereira Kechinski

Porto Alegre, julho de 2011.

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo apoio e por tornar possível este momento.

Às minhas orientadoras, Isabel e Carolina, pelos conhecimentos transmitidos, paciência, orientação e dedicação.

À UFRGS, ao DEQUI, seus professores e funcionários, que fazem desta uma das melhores universidades do país.

Aos amigos, colegas e a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 O Cultivo da Uva no Brasil	2
2.2 Processamento do Suco de Uva.....	3
2.3 Bagaço de Uva.....	5
2.4 Antocianinas: Definição, Estrutura Química e Estabilidade	6
2.5 Processos de Separação com Membranas (PSM).....	10
2.5.1 Aspectos Gerais dos PSM.....	10
2.5.2 Osmose Inversa (OI)	14
2.5.3 Ultrafiltração (UF).....	15
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1 Secagem do Bagaço de Uva e Preparação do Extrato	18
3.2 Purificação do Extrato por Osmose Inversa	18
3.3 Fracionamento das Antocianinas por Ultrafiltração.....	20
3.4 Análises das Antocianinas Monoméricas e Poliméricas	21
3.4.1 Quantificação das Antocianinas Monoméricas.....	22
3.4.2 Percentual de Antocianinas Poliméricas	22
3.4.3 Percentual de Antocianinas Monoméricas.....	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1 Secagem do Bagaço de Uva e Preparação do Extrato	25
4.2 Osmose Inversa	26
4.2.1 Permeabilidade Hidráulica	27
4.2.2 Experimento com o Extrato de Antocianinas	28
4.3 Ultrafiltração	29
4.3.1 Compactação e Permeabilidade Hidráulica	30
4.3.2 Experimento com o Extrato de Antocianinas	31
5 CONCLUSÕES	34
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Fluxograma simplificado do processo de fabricação do suco de uva.....	4
Figura 2.2 Estrutura geral da molécula de antocianina e as seis principais formas de antocianidinas encontradas na natureza (anel B).	7
Figura 2.3 Formas estruturais de antocianinas em equilíbrio em solução aquosa	8
Figura 2.4 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	9
Figura 2.5 Representação genérica de um processo de separação com membranas.....	11
Figura 2.6 Representação da seção transversal dos diferentes tipos de morfologia de membranas sintéticas.....	11
Figura 2.7 Configuração do escoamento dos PSM	13
Figura 2.8 Representação do processo de OI evidenciando as substâncias que são retidas e permeadas durante o processo.....	15
Figura 2.9 Representação do processo de UF evidenciando as substâncias que são retidas e permeadas durante o processo.....	16
Figura 3.1 Sistema de osmose inversa. TA: tanque de alimentação; B: bomba; M: manômetro; OI: módulo de membrana de osmose inversa e TP: tanque de permeado.....	19
Figura 3.2 Fotografia do sistema de osmose inversa: (1) tanque de alimentação, (2) manômetro, (3) módulo de membrana de OI, (4) coleta de permeado	19
Figura 4.1 Fotografias do bagaço de uva (a) Bagaço úmido (b) Bagaço seco (c) Bagaço moído	25
Figura 4.2 Resíduo obtido após a extração de antocianinas com etanol acidificado e água (direita) em comparação com o bagaço seco	26

Figura 4.3 Fluxo permeado em função do tempo para a membrana de osmose inversa durante estabilização para pressão de entrada de 5 bar, temperatura de 50 °C e vazão de alimentação de 40 L.h ⁻¹	27
Figura 4.4 Fluxo permeado em função da pressão de entrada para a membrana de osmose inversa na temperatura de 50 °C e vazão de alimentação de 40 L.h ⁻¹	28
Figura 4.5 Fluxo permeado em função do tempo durante o processo de osmose inversa com o extrato de antocianinas.	29
Figura 4.6 Fluxo permeado em função do tempo para as membranas de ultrafiltração de 10, 30 e 50 kDa durante compactação na pressão de entrada de 5 bar, temperatura de 50 °C e vazão de alimentação de 40 L.h ⁻¹	30
Figura 4.7 Fluxo permeado em função da pressão de entrada para as membranas de ultrafiltração de 10, 30 e 50 kDa na temperatura de 50 °C e vazão de alimentação de 40 L.h ⁻¹	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 PSM relacionados pelo tamanho de poros das membranas e respectivas pressões de operação	12
Tabela 4.1 Retenção observada e teores de antocianinas monoméricas presentes nas correntes concentrado e permeado dos experimentos com membranas de 10, 30 e 50 kDa	32
Tabela 4.2 Percentuais de antocianinas monoméricas e poliméricas presentes nas correntes concentrado e permeado dos experimentos com membranas de 10, 30 e 50 kDa	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A	Área permeável do módulo de membrana (m^2)
C_B	Concentração da alimentação ($kg.m^{-3}$)
C_P	Concentração do permeado ($kg.m^{-3}$)
ϵ	Coefficiente de extinção molar ($L.mol^{-1}.cm^{-1}$)
FD	Fator de diluição
J_P	Fluxo volumétrico de permeado ($L.m^{-2}.h^{-1}$)
L	Caminho ótico da cubeta (cm)
L_P	Permeabilidade hidráulica ($L.m^{-2}.h^{-1}.bar^{-1}$)
M	Massa molar da cianidina-3-glicosídeo ($g.mol^{-1}$)
MA	Antocianinas monoméricas (mg de cianidina-3- glicosídeo/100 mL de extrato)
MMC	Massa molar de corte (Da)
OI	Osmose inversa
PSM	Processos de separação com membranas
R^2	Coefficiente de correlação
R_{obs}	Retenção percentual observada
t	Tempo (h)
UF	Ultrafiltração
V	Volume de permeado coletado (L)
$V_{EXTRATO}$	Volume de extrato (mL)
V_T	Volume de tampão (mL)
λ	Comprimento de onda (nm)

RESUMO

O consumo de uva e seus derivados aumenta a cada ano no Brasil e no mundo, por apresentarem componentes comprovadamente benéficos à saúde. A cultivar 'Isabel' é uma das principais variedades plantadas no país e esta possui características apropriadas para a elaboração de suco de uva. Este processamento gera cerca de 20 % de bagaço, composto pela semente, casca e engaço de uva, e seu conteúdo é rico em pigmentos chamados antocianinas. Visando o aproveitamento destes compostos, os objetivos deste trabalho foram extraí-los utilizando etanol e água, purificar este extrato com um sistema de osmose inversa (OI) e fracionar as antocianinas monoméricas e poliméricas testando membranas de ultrafiltração (UF) com massa molar de corte de 10, 30 e 50 kDa. Bagaço seco contendo teor de antocianinas totais de $457,66 \pm 55,49$ mg de cianidina 3-glicosídeo/100 g de bagaço foi submetido ao processo de extração durante 3 horas. O extrato com teor de 18 % de etanol permeou no módulo de osmose inversa por 3 horas, reduzindo a concentração de etanol para 2 %. A membrana de OI foi previamente estabilizada e o valor de permeabilidade hidráulica encontrado foi $2,95 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}.\text{bar}^{-1}$. Para fracionar as antocianinas monoméricas e poliméricas, foram utilizadas membranas de UF de 10, 30 e 50 kDa, com permeabilidades hidráulicas de 5,17, 14,73 e $37,1 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}.\text{bar}^{-1}$, respectivamente. Concluiu-se que a membrana de 50 kDa foi a mais eficiente, apresentando em seu permeado a maior concentração de antocianinas monoméricas ($1,10 \pm 0,01$ mg de cianidina 3-glicosídeo/100 mL de extrato) e também o maior percentual destes compostos ($31,92 \pm 3,29$ %). Estes resultados mostraram que a osmose inversa pode ser utilizada na purificação das antocianinas, mas para melhor fracionamento das antocianinas poliméricas das monoméricas novos estudos testando diferentes condições de operação e outras membranas podem ser realizados.

1 INTRODUÇÃO

As antocianinas são um importante grupo de pigmentos responsáveis pelas tonalidades de vermelho e azul presentes no reino vegetal, apresentando, assim, um alto potencial para a utilização na elaboração de corantes naturais. Nos últimos anos houve uma redução no uso de corantes artificiais, devido a legislações cada vez mais rígidas. Existe, portanto, um grande campo para a pesquisa e desenvolvimento de corantes alimentícios a partir de fontes naturais, para diminuir ou eliminar, gradativamente, a dependência do uso de produtos sintéticos no processamento de alimentos.

Os compostos antociânicos estão presentes em diversas frutas e em quantidades expressivas nas pequenas frutas vermelhas (morango, framboesa, amora e mirtilo) e nas uvas. Além disso, as antocianinas apresentam propriedades antioxidantes e antiinflamatórias, que ajudam na prevenção de doenças cardiovasculares, câncer e diabetes, entre outras, podendo ser usadas também nas indústrias farmacêutica e de cosméticos.

Atualmente, o Brasil está inserido no quadro dos 20 maiores produtores mundiais de uva, e uma parte desta colheita é destinada para a fabricação de suco. Na elaboração desse produto há a geração de uma quantidade significativa de bagaço, sendo que seu conteúdo é rico em antocianinas e, portanto, a extração destes compostos pode representar uma alternativa para a obtenção de corantes naturais e o aproveitamento de um resíduo que ainda é pouco utilizado.

Em virtude do exposto, os objetivos deste trabalho foram extrair, purificar e fracionar as antocianinas presentes no bagaço de uva. Para a extração, utilizou-se como solvente uma mistura de etanol e água; a purificação foi feita utilizando sistema de osmose inversa para a remoção do etanol; e, a ultrafiltração para a separação das antocianinas monoméricas e poliméricas. Ao final, foram analisadas as concentrações de antocianinas presente no bagaço e nas soluções obtidas em cada etapa dos experimentos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo é apresentada uma revisão da literatura sobre a uva, seu processamento e a geração do bagaço como subproduto da fabricação do suco. Também são apresentados alguns fundamentos teóricos sobre as antocianinas e sobre os processos de separação com membranas, com ênfase na osmose inversa e na ultrafiltração que foram os processos utilizados nesse trabalho.

2.1 O Cultivo da Uva no Brasil

As primeiras variedades de uva foram introduzidas no Brasil pelos portugueses. Eram uvas finas (*Vitis vinifera*), cultivadas na Europa e selecionadas com base em informações e experiência pessoal dos vitivicultores europeus. No entanto, a viticultura brasileira somente se consolidou em meados do século XIX, com a introdução da cultivar de uva americana ‘Isabel’ (*Vitis labrusca*) pelos imigrantes italianos, culminando na rápida substituição dos vinhedos de uvas europeias. No século XX, as uvas finas voltam a ganhar expressão para produção de vinhos e para o consumo *in natura* e, atualmente, observa-se uma tendência de expansão da cultura no país (Camargo *et al.*, 2010).

A maior concentração do cultivo de uvas ocorre na Europa, mesmo havendo uma redução na área plantada no período de 2005 a 2007. Em contrapartida, ocorreu um aumento na área e na produção nos demais continentes. A Itália detém a maior produção mundial, seguida pela França, Estados Unidos, China e Espanha (Mello, 2007).

O Brasil produziu, no ano de 2010, o equivalente a 1.295.442 toneladas de uvas. Maior produtor nacional, com 692.692 toneladas, o Estado do Rio Grande do Sul também apresenta a maior área plantada de videiras (50.389 ha). A vitivicultura é uma atividade de grande importância econômica e social no Estado, sobretudo no Nordeste Gaúcho, onde se destacam os municípios de Bento Gonçalves, Flores da Cunha, Garibaldi, Farroupilha, Caxias do Sul, Antonio Prado, São Marcos, entre outros. Os estados de Pernambuco, São Paulo e Santa Catarina também contribuem significativamente na produção nacional de uvas (Mello, 2010).

No cenário internacional a vitivicultura brasileira ocupou em 2007, o 17º lugar em área cultivada com uvas e o 19º em produção. No que se refere às transações internacionais, o

Brasil foi o 11º colocado em quantidade de uvas exportadas, o 7º em valor das exportações de uvas e o 10º maior exportador de suco de uva, em quantidade e em valor (Mello, 2011).

Na fabricação de suco é utilizada uma parcela considerável da colheita de uva, sendo que a sua comercialização no mercado brasileiro vem aumentando a cada ano. Em 2010 estima-se, um total de mais de 180 milhões de litros, entre sucos de uva concentrado, integral e adoçado. No mesmo ano, 10 % da uva produzida no Brasil foram destinados ao processamento para elaboração de sucos (Mello, 2010). A uva ‘Isabel’ (*Vitis labrusca*) é atualmente a base para o suco brasileiro; originária do sul dos Estados Unidos, é uma cultivar de uva tinta, muito rústica e fértil, proporcionando colheitas abundantes com poucas intervenções de manejo, sendo a mais plantada no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina. Além de originar suco de boa qualidade, pode ser utilizada como uva de mesa, como matéria-prima de doces e geleias e na elaboração de vinhos branco, rosado e tinto, os quais, muitas vezes, são utilizados para a destilação ou na elaboração de vinagre (Camargo *et al.*, 2010).

2.2 Processamento do Suco de Uva

A produção brasileira de suco de uva está concentrada no Rio Grande do Sul, mas observa-se, em anos recentes, uma forte tendência de expansão para regiões tropicais como Mato Grosso, Goiás e Vale do Rio São Francisco. Além da cultivar ‘Isabel’, são utilizadas na fabricação do suco as cultivares ‘Concord’, ‘Jacquez’ e ‘Bordô’ (Camargo *et al.*, 2010).

Na Figura 2.1 está apresentado um fluxograma com as etapas do processo de fabricação do suco de uva. Após a colheita e o transporte, as uvas são prensadas, dando origem ao mosto, que é aquecido em temperatura na faixa de 65 a 90 °C. As enzimas são adicionadas para degradar a ação das substâncias pécticas da uva, agindo favoravelmente na extração e na clarificação do suco. Quando o suco adquiriu a intensidade de cor e o equilíbrio gustativo desejado, é necessário separá-lo da parte sólida da uva – chamada etapa de extração, onde há a geração do bagaço, composto basicamente por cascas e sementes. Nessa parte do processo, o suco obtido apresenta-se turvo, devido à presença de pectinas, mucilagens, gomas e compostos fenólicos. A legislação brasileira estabelece um teor máximo de 5% de sólidos em suspensão no suco de uva e, para diminuir essa quantidade, torna-se necessária a operação de clarificação. A seguir, o suco de uva é pasteurizado, já que o elevado teor de açúcar e o oxigênio oferecem condições especiais para o desenvolvimento de microrganismos que

causam deteriorações no suco. Além de destruir a população microbiana, o calor favorece a estabilidade protéica e inativa as enzimas presentes na uva ou produzidas por fungos. Ao final de todas essas etapas, o suco está pronto para ser envasado, mas antes é importante efetuar uma análise físico-química da bebida, para certificar-se de que os parâmetros analíticos estejam enquadrados nos limites estabelecidos pela legislação brasileira. Outro aspecto relevante é fazer uma avaliação sensorial do produto, para detectar possíveis defeitos organolépticos (Rizzon e Meneguzzo, 2007).

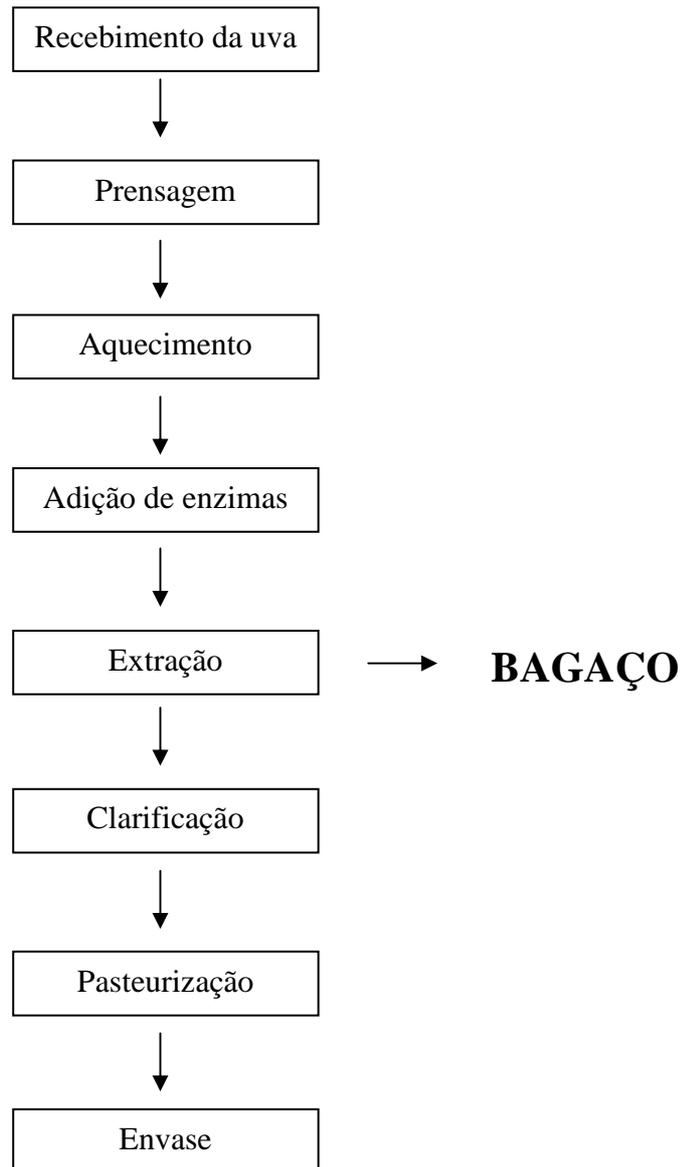


Figura 2.1 Fluxograma simplificado do processo de fabricação do suco de uva. **Fonte:** Rizzon e Meneguzzo, 2007.

Além da água, constituinte quantitativamente mais importante, o suco de uva possui teor elevado de açúcar, que lhe garante sabor doce e lhe atribui característica de bebida energética. Os dois açúcares presentes no suco de uva são a glicose e a frutose, em partes aproximadamente iguais. A acidez do suco de uva é devida principalmente à presença do ácido tartárico, ácido málico e ácido cítrico, que lhe conferem um pH baixo, variável entre 2,90 e 3,43. Entre os elementos minerais, o suco de uva apresenta alto teor de potássio, além de teores consideráveis de cálcio, magnésio, cloretos, sulfatos e fosfatos. (Rizzon *et al.*, 1998).

A uva é uma importante fonte de compostos fenólicos e antocianinas, no entanto, a quantidade e a composição destes compostos diferem de acordo com a espécie, variedade, maturidade, condições climáticas e cultivar. Segundo Rizzon *et al.* (1998), o teor médio de antocianinas totais presente no suco de uva é de 144,3 mg de cianidina 3-glicosídeo/L. Entre as principais cultivares utilizadas para a fabricação do suco, a ‘Bordô’ e a ‘Jacquez’ são as mais ricas em pigmentos antociânicos (Malacrida e Motta, 2005).

2.3 Bagaço de Uva

O processo de elaboração do suco de uva gera um importante subproduto: o bagaço. Do total de uvas processadas, o bagaço representa cerca de 20 % dessa quantidade, em massa. Ou seja, anualmente são gerados, aproximadamente, 10 milhões de toneladas de resíduos provenientes de vinícolas em todo o mundo (Kammerer *et al.*, 2005).

O bagaço de uva é composto pela semente, casca e engaço. A semente contém fibra, óleo, proteínas, compostos fenólicos complexos (taninos), além de açúcares e sais minerais. O engaço é rico em compostos tânicos, os quais apresentam alto potencial nutracêutico e farmacológico. A casca, por sua vez, é uma fonte de antocianidinas e antocianinas e representa cerca de 50 % da massa total do bagaço (Luque – Rodríguez *et al.*, 2007).

Atualmente, esse resíduo é utilizado como ração animal e como adubo de vinhedos, mas uma quantidade significativa ainda é desperdiçada. A importância em reutilizar o bagaço deve-se ao fato de seu conteúdo ser rico em compostos fenólicos, antioxidantes, antocianinas, corantes e outros compostos com atividades fitoterápicas, e que são de importância para as indústrias farmacêutica, alimentícia e de cosméticos (Rockenbach *et al.*, 2011).

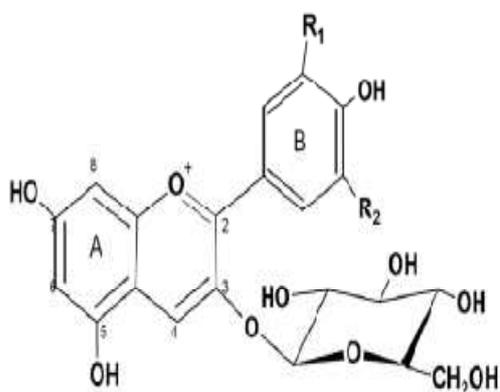
Valduga *et al.* (2008) determinaram a concentração máxima de antocianinas totais e encontraram um valor de 300 mg de cianidina 3-glicosídeo/100 g de bagaço de uva 'Isabel'. Portanto, devido à presença de compostos antociânicos no bagaço de uva, este resíduo pode ter um destino mais nobre, representando uma alternativa para a elaboração de corantes naturais. Além disso, a reutilização do bagaço pode resolver problemas de armazenagem, transformação ou de eliminação dos resíduos das vinícolas.

2.4 Antocianinas: definição, estrutura química e estabilidade

As antocianinas (do grego *anthos* = flor e *kianos* = azul) são compostos fenólicos pertencentes ao grupo dos flavonóides, amplamente distribuídos no reino vegetal, sendo que, entre as frutas, a uva é uma das maiores fontes. São responsáveis pelas cores vermelha, roxa e azul presentes em frutas, vegetais e grãos, bem como seus derivados. Também são solúveis em meio aquoso e essas características tornam as antocianinas atrativas para o uso em corantes (Malacrida e Motta, 2005).

As antocianidinas (agliconas) são estruturas básicas das antocianinas e, quando são encontradas nas formas glicolisadas, são conhecidas como antocianinas. A glicolisação pode ocorrer em várias posições, sendo observada com maior frequência na posição 3 (Wrolstad *et al.*, 2005). Glicose, ramnose, xilose, galactose, arabinose e frutose são os açúcares mais comumente ligados às antocianidinas, ocorrendo como monoglicosídeos, diglicosídeos e triglicosídeos glicosilados diretamente na aglicona (Malacrida e Motta, 2006).

Aproximadamente 22 agliconas são conhecidas, sendo que a pelargonidina, a cianidina, a peonidina, a delphinidina, a petunidina e a malvidina são as seis antocianidinas mais comuns encontradas na natureza (Lee *et al.*, 2008). Além de serem utilizadas como corantes em alimentos, em substituição a corantes artificiais, as antocianinas e suas agliconas apresentam propriedades antioxidantes e antiinflamatórias, que ajudam na prevenção de doenças cardiovasculares, neurológicas, câncer e diabetes, entre outras (Castañeda – Ovando *et al.*, 2009). A estrutura geral da molécula de antocianina e as seis principais formas de antocianidinas encontradas na natureza estão mostradas na Figura 2.2.



<i>Antocianidina</i>	<i>R1</i>	<i>R2</i>	$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm) visível/cor
Pelargonidina	H	H	494/laranja
Cianidina	OH	H	506/vermelho-laranja
Peonidina	OCH3	H	506/vermelho-laranja
Delfinidina	OH	OH	508/vermelho
Petunidina	OCH3	OH	508/vermelho
Malvidina	OCH3	OCH3	510/azul-vermelho

Figura 2.2 Estrutura geral da molécula de antocianina e as seis principais formas de antocianidinas encontradas na natureza (anel B). **Fonte:** Giusti e Wrolstad, 2003.

Na Figura 2.3 estão apresentadas as quatro formas estruturais de antocianinas em equilíbrio em solução aquosa: o cátion flavílico (AH^+), a base quinoidal (A), a pseudobase carbinol (B) e a chalcona (C). As antocianinas são mais estáveis em soluções ácidas do que em neutras e alcalinas. Em condições ácidas (pH inferior a 3), a antocianina existe primariamente na forma de cátion flavílico, na cor laranja ou vermelha. Aumentando o pH, ocorre a perda do próton para produzir as formas quinoidais, azuis ou violetas. Em paralelo, ocorre a hidratação do cátion flavílico gerando a pseudobase carbinol, incolor, que atinge o equilíbrio lentamente com a chalcona, também incolor. As quantidades relativas de cátion flavílico, formas quinoidais, pseudobase carbinol e chalcona na condição de equilíbrio variam conforme o pH e a estrutura da antocianina (Giusti e Wrolstad, 2001; Malacrida e Motta, 2006).

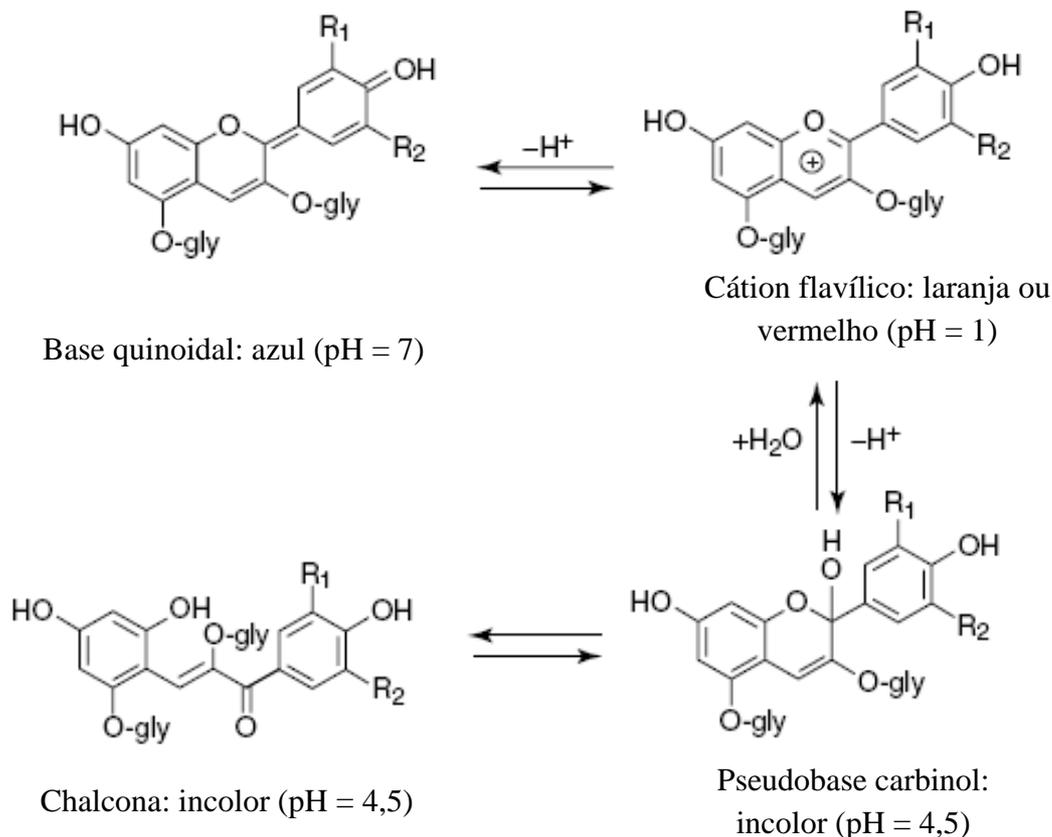


Figura 2.3 Formas estruturais de antocianinas em equilíbrio em solução aquosa. **Fonte:** Giusti e Wrolstad, 2001.

Antocianinas isoladas são altamente instáveis e suscetíveis à degradação. A sua estabilidade é afetada por fatores como temperatura de armazenamento, estrutura química, concentração, luz, oxigênio, solventes, presença de enzimas, flavonóides, proteínas e íons metálicos. Porém, o maior problema na estabilidade das antocianinas é a mudança de comportamento sob diferentes faixas de pH (Castañeda – Ovando *et al.*, 2009).

As antocianinas sofrem transformações estruturais reversíveis com uma mudança de pH manifestada por diferentes espectros de absorvância como mostrado na Figura 2.4. Neste gráfico pode-se observar que, em comprimentos de onda entre 500 e 530 nm, a amostra apresenta um pico de absorvância quando em tampão a pH 1,0, diferentemente da amostra submetida a pH 4,5 (Giusti e Wrolstad, 2001).

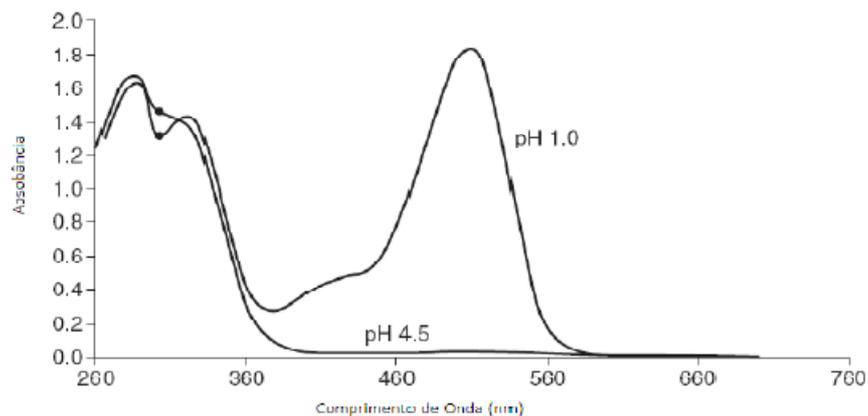


Figura 2.4 Características espectrais de antocianinas de rabanete purificadas (derivados acilados de pelargonidina – 3 – sofrósido – 5 – glicosídeo) em soluções tampão de pH 1,0 e pH 4,5. **Fonte:** Giusti e Wrolstad (2001).

Em uvas, o conteúdo de antocianinas totais monoméricas é da ordem de 30 – 750 mg de cianidina 3-glicosídeo/100 g, sendo que esse número pode variar de acordo com a cultivar e fatores ambientais. A principal antocianidina presente em uvas é a malvidina (Bridle e Timberlake, 1997).

A uva e outras frutas e vegetais apresentam antocianinas monoméricas, responsáveis pela pigmentação de cor vermelha, e poliméricas, que fornecem a coloração marrom. O conteúdo de antocianinas poliméricas é menor em frutas e vegetais frescos (em torno de 10 %); em alimentos provenientes destes produtos, esse teor é maior (30 %). Este aumento, devido às condições de processamento e armazenagem, pode acabar afetando as propriedades funcionais destes produtos, como atividade antioxidante, aroma, sabor e coloração, tornando-a menos intensa e mais escurecida. As reações responsáveis por essas transformações incluem, frequentemente, a condensação direta entre antocianinas e flavonóis e a polimerização das próprias antocianinas (Giusti e Wrolstad, 2001; Malacrida e Motta, 2005).

Apesar de largamente disseminadas na natureza, são poucas as fontes comercialmente utilizáveis de antocianinas. Entre essas, pode-se citar o resíduo da fabricação do vinho e do suco de uva que produz o pigmento utilizado em alimentos com o nome de enocianina. Isso evidencia a importância da reutilização do bagaço de uva para o fim de extração de antocianinas (Malacrida e Motta, 2006).

Uma das maneiras para reaproveitar o conteúdo de compostos antociânicos presentes no bagaço de uva é realizar uma extração com solventes, mais comumente com uma mistura de água e etanol, em meio acidificado. Em seguida, para a purificação do extrato e o fracionamento das antocianinas monoméricas e poliméricas, os processos de separação com membranas são uma alternativa promissora; a osmose inversa com a função de remover o etanol e a ultrafiltração para a separação das antocianinas. Os processos com membranas foram utilizados com os objetivos citados acima por Kalbasi e Cisneros – Zevallos (2007), nas amostras de suco de uva da cultivar ‘Concord’, Chung *et al.* (1986) nos extratos das folhas de ‘perilla’ e Patil *et al.* (2009) nas cascas de rabanete vermelho.

2.5 Processos de Separação com Membranas (PSM)

Os processos de separação com membranas são operações que utilizam membranas para separar, concentrar e/ou purificar misturas e soluções envolvendo espécies de tamanho e natureza química diferentes. Neste tópico são abordadas algumas características importantes dos PSM, focando nos processos que serão utilizados nesse trabalho: a osmose inversa e a ultrafiltração. Os fundamentos teóricos desta seção foram adaptados de Mulder (1996) e Habert *et al.* (2006).

2.5.1 Aspectos Gerais dos PSM

De uma maneira geral, uma membrana é uma barreira que separa duas fases e que restringe total ou parcialmente o transporte de uma ou várias espécies químicas presentes nas fases. Através da aplicação de uma força motriz, a corrente de alimentação é separada em duas novas correntes: o permeado (parte da alimentação que passou pela membrana) e o concentrado (parte da alimentação que não passou pela membrana), conforme é mostrado na Figura 2.5.

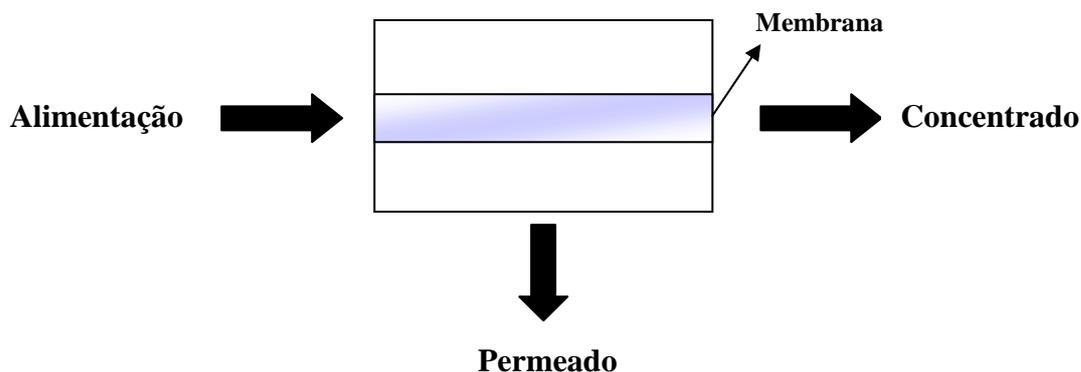


Figura 2.5 Representação genérica de um processo de separação com membranas.

Quanto à morfologia, as membranas podem ser porosas ou densas e, ainda, simétricas ou assimétricas, de acordo com a Figura 2.6. Em processos que utilizam membranas porosas, a separação está diretamente associada à relação entre o tamanho das espécies presentes e o tamanho dos poros da membrana; em 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.

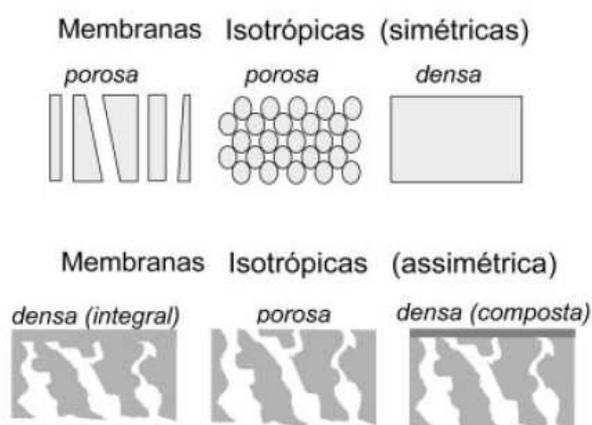


Figura 2.6 Representação da seção transversal dos diferentes tipos de morfologia de membranas sintéticas. **Fonte:** Habert *et al.*, 2006.

Para que ocorra o transporte de uma espécie através de uma membrana é necessária a existência de uma força motriz agindo sobre a mesma. Os processos comerciais de separação com membranas utilizam como força motriz o gradiente de potencial químico (expresso em termos do gradiente de pressão e de concentração) e/ou o gradiente de potencial elétrico. Na

Tabela 2.1 está apresenta a faixa de tamanhos de poros das membranas para os PSM que utilizam o gradiente de pressão como força motriz e as faixas de pressão aplicáveis para cada processo.

Tabela 2.1 PSM relacionados pelo tamanho de poros das membranas e respectivas pressões de operação. **Fonte:** Mulder, 1996.

<i>PSM</i>	<i>Tamanho dos poros (nm)</i>	<i>Faixas de pressão (bar)</i>
Microfiltração	50 - 10000	0,1 - 2,0
Ultrafiltração	1 - 100	1,0 - 5,0
Nanofiltração	< 1	5,0 - 20
Osiose inversa	Sem poros	10 - 100

As membranas sintéticas comerciais são produzidas a partir de duas classes de material: os materiais orgânicos (polímeros) e os inorgânicos (metais e cerâmicos). Os polímeros mais utilizados são o acetato de celulose, a polietersulfona, o polipropileno, a poliamida e a poliacrilonitrila.

Os sistemas de membranas podem apresentar configuração espiral, placa e quadro, tubular, capilar e fibra-oca. A escolha do módulo para uma determinada separação depende de uma série de fatores, tais como: densidade de empacotamento, custo, resistência ao *fouling*, considerações operacionais, características da mistura a ser fracionada, facilidade de operação, limpeza e manutenção.

A configuração do escoamento dos PSM pode ser transversal ou tangencial. Nos processos de filtração transversal, com o passar do tempo, as partículas retidas formam uma camada mais concentrada próximo à superfície da membrana, formando uma 'torta' e aumentando a resistência à filtração. 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 menor. As duas configurações estão esquematizadas na Figura 2.7.

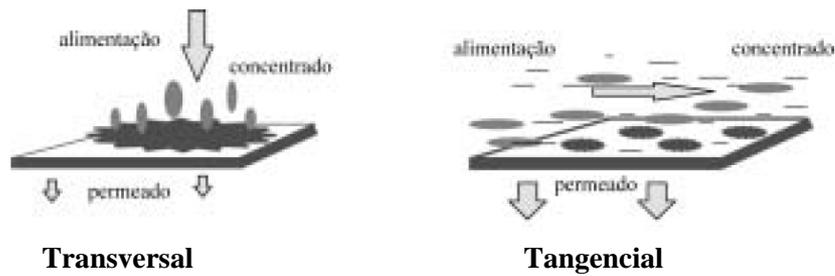


Figura 2.7 Configuração do escoamento dos PSM. **Fonte:** Habert *et al.*, 2006.

Dois fenômenos comuns nos PSM são o *fouling* e a polarização por concentração, que acarretam em diminuição do fluxo de permeado ao longo do tempo. A polarização por concentração ocorre quando o soluto acumula-se próximo à superfície da membrana, aumentando a concentração do mesmo nesta região. O *fouling* se caracteriza por uma série de processos que causam a diminuição do fluxo e, quando alguns incrustantes podem ser removidos por limpeza química e/ou mecânica, este fenômeno é considerado reversível.

Os processos de separação com membranas têm sido utilizados nos mais diferentes setores da indústria química, alimentícia e farmacêutica. Alguns exemplos: fracionamento do ar, purificação de enzimas, concentração de sucos de frutas, clarificação e desalcoolização de vinhos e cervejas, dessalinização de águas, produção de água ultrapura, separação água/óleo, tratamento de águas residuais, entre outros. Também apresentam significativas vantagens em comparação aos processos tradicionais de separação, tais quais: economia de energia, seletividade, separação de compostos termolábeis e simplicidade de operação e escalonamento.

Um dos termos específicos utilizados na descrição dos processos de separação com membranas é o fluxo volumétrico de permeado (J_p), que pode ser calculado segundo a Equação 2.1:

$$J_p = \frac{V}{A \cdot t} \quad (2.1)$$

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

O fluxo é função das características da membrana, tais como espessura, tamanho dos poros, porosidade, morfologia, 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 2.2:

$$J_p = -L_p \frac{\partial P}{\partial x} \quad (2.2)$$

onde: L_p é a permeabilidade hidráulica da membrana [$L \cdot m^{-2} \cdot h^{-1} \cdot bar^{-1}$], e $\partial P / \partial x$ é o gradiente de pressão [$bar \cdot m^{-1}$].

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

A purificação e concentração de antocianinas usando os processos de separação com membranas são de interesse tecnológico, devido ao fato de não necessitar temperaturas altas, o que evita a degradação térmica destes componentes. Também é possível obter diferentes frações de produto enriquecidas em compostos diversificados (por exemplo, a separação de antocianinas monoméricas e poliméricas), além do fato de os PSM consumirem menos energia em comparação aos processos convencionais de separação (Brazinha e Crespo, 2010).

2.5.2 Osmose Inversa (OI)

A osmose inversa (OI) é utilizada quando se deseja reter solutos de baixa massa molar, tais como sais inorgânicos ou pequenas moléculas orgânicas, como a glicose. Por este motivo, as membranas de OI devem ser mais fechadas (poros menores) apresentando, portanto, uma maior resistência à permeação e, conseqüentemente, exigindo pressões de operação mais elevadas do que as utilizadas em micro, ultra e nanofiltração. As membranas de OI são densas e o mecanismo de transporte é denominado de solução-difusão, onde a separação ocorre pela afinidade entre os componentes da alimentação e o material da membrana. Na Figura 2.8 estão mostradas as principais substâncias que se pode separar através da osmose inversa.

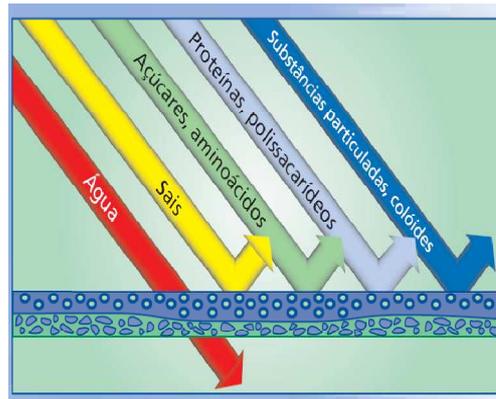


Figura 2.8 Representação do processo de OI evidenciando as substâncias que são retidas e permeadas durante o processo.

Neste trabalho, a etapa de osmose inversa foi utilizada com o objetivo de remover o etanol dos extratos de antocianinas. O produto é bombeado a uma pressão maior do que a pressão osmótica, através de uma membrana que é permeável ao etanol, mas não aos outros componentes dissolvidos. Trabalhos anteriores fizeram uso desse mesmo processo, entre eles Chung *et al.* (1986) nos extratos das folhas de ‘perilla’ e Patil *et al.* (2009) para o extrato das cascas de rabanete vermelho.

2.5.3 Ultrafiltração (UF)

A ultrafiltração (UF) é um processo de separação com membranas utilizado quando se deseja purificar e fracionar soluções contendo macromoléculas. As membranas de UF apresentam poros na faixa entre 1 e 100 nm e utilizam o gradiente de pressão como força motriz, sendo que as diferenças de pressão através da membrana variam de 2 a 10 bar. Soluções contendo solutos numa ampla faixa de massa molar ($10^3 - 10^6$ Dalton) podem ser tratadas por este processo. Na Figura 2.9 estão mostradas as principais substâncias que se pode separar através da ultrafiltração.

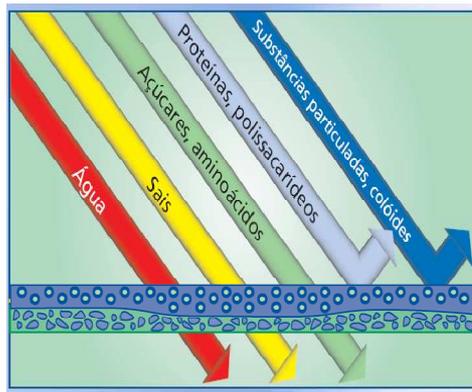


Figura 2.9 Representação do processo de UF evidenciando as substâncias que são retidas e permeadas durante o processo.

Na UF, a rejeição é determinada pelo tamanho e formato dos solutos relativos ao tamanho dos poros da mesma. O transporte através de membranas de ultrafiltração pode ser descrito pela Lei de Darcy, onde o fluxo através da membrana é diretamente proporcional à pressão aplicada.

A capacidade seletiva de uma membrana é dependente de vários fatores, incluindo a pressão transmembrana, concentração dos sólidos dissolvidos, massa molar de corte, velocidade de escoamento e características de *fouling*. A massa molar de corte (MMC) é o termo associado ao tamanho dos poros e é usada para descrever a capacidade de separação de uma membrana de UF; refere-se à massa molar para a qual a membrana apresenta uma retenção pelo menos igual a 95 %. A retenção é calculada conforme a Equação 2.3.

$$R_{obs} = 1 - \left(\frac{C_P}{C_B} \right) \times 100 \quad (2.3)$$

onde: R_{obs} é a retenção observada de solutos pela membrana, C_B é a concentração de solutos na corrente de alimentação [$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$], e C_P é a concentração de solutos na corrente permeada [$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$].

O processo de ultrafiltração tem sido aplicado no fracionamento das antocianinas dos produtos a base de uva, como o bagaço, o vinho e o suco. As massas molares de antocianinas monoméricas são da faixa de 350 – 600 Da e das poliméricas de 12000 Da (Kalbasi e Cisneros – Zevallos, 2007). Os mesmos autores testaram membranas de UF com MMC de 10 a 1000 kDa, para fracionar as antocianinas monoméricas e poliméricas. As poliméricas

ficaram retidas quando utilizadas membranas com MMC menores que 100 kDa, enquanto que as monoméricas ficaram no permeado. Os resultados indicam que a ultrafiltração pode ser usada para separar as diferentes frações de antocianinas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção são apresentadas as etapas de secagem do bagaço, extração das antocianinas com solvente, remoção do etanol por osmose inversa, fracionamento das antocianinas monoméricas e poliméricas através da ultrafiltração e métodos para análise destes compostos.

3.1 Secagem do Bagaço de Uva e Preparação do Extrato

O bagaço utilizado foi obtido pela fabricação de suco de uva da cultivar 'Isabel' (*Vitis labrusca*), da vinícola Aurora (Bento Gonçalves, RS, Brasil). O resíduo foi dividido em porções de aproximadamente 600 g e cada parte passou por um processo de secagem a 70 °C com ar circulante a uma velocidade de 0,65 m/s, permanecendo, em média, 2 horas no interior do secador (Secador Piloto, Ralf Winter, Brasil). Em seguida, o bagaço seco foi triturado em um moinho de facas (Wiley Mill, Arthur H. Thomas Co., USA) e as amostras armazenadas à temperatura ambiente.

Na etapa de extração das antocianinas, foi utilizado 1 kg de bagaço de uva seco e moído. Adicionaram-se 6 L de etanol, acidificado com ácido clorídrico na concentração de 0,1 % e 4 L de água. O recipiente foi mantido em banho de aquecimento a 50 °C e a solução mantida sob agitação magnética durante 3 horas. Ao final, o extrato foi filtrado e armazenado sob refrigeração.

3.2 Purificação do Extrato por Osmose Inversa

Através do uso do processo de osmose inversa buscou-se purificar o extrato contendo antocianinas, com o objetivo de remover o etanol.

O sistema de OI utilizado está localizado no Laboratório de Separação por Membranas (LASEM) da UFRGS, e constitui-se de bomba de engrenagem, manômetro, módulo espiral de OI (BW30-2514, Filmtec) com 0,7 m² de área e tanques de armazenamento da alimentação e do permeado, conforme esquematizado na Figura 3.1 e mostrado na Figura 3.2.

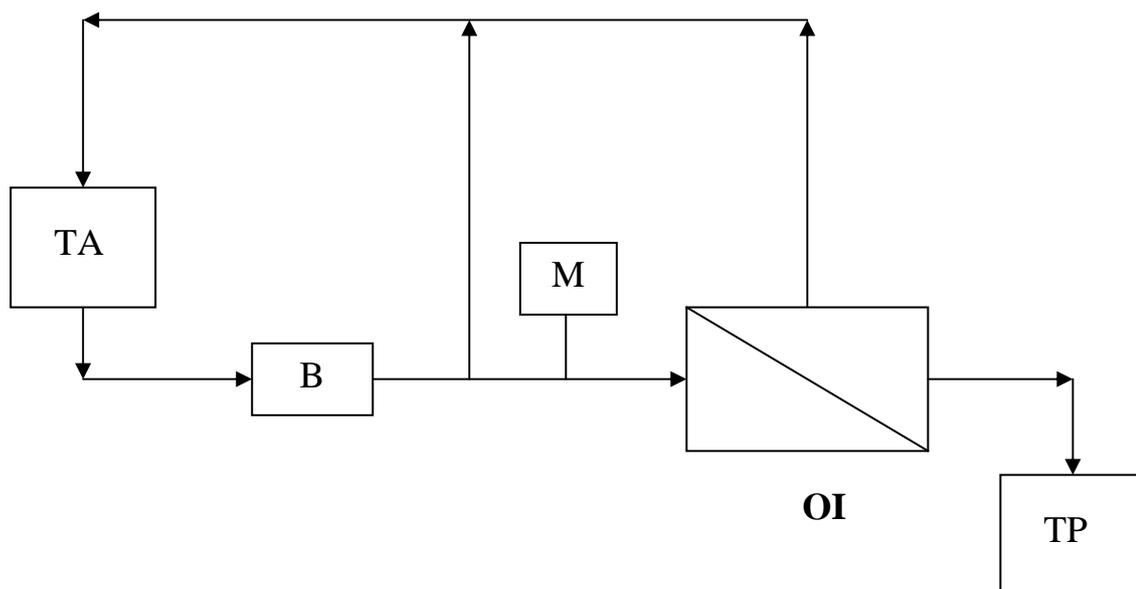


Figura 3.1 Sistema de osmose inversa. TA: tanque de alimentação; B: bomba; M: manômetro; OI: módulo de membrana de osmose inversa e TP: tanque de permeado.

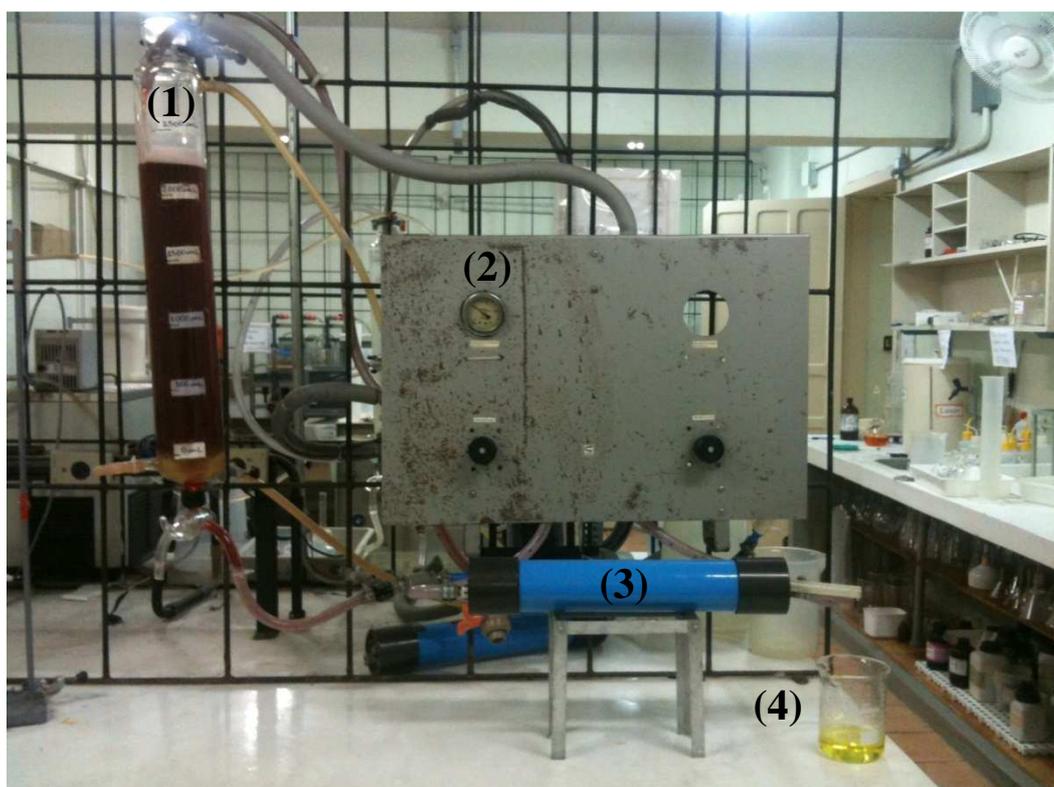


Figura 3.2 Fotografia do sistema de osmose inversa: (1) tanque de alimentação, (2) manômetro, (3) módulo de membrana de OI, (4) coleta de permeado. O banho de aquecimento termostático e a bomba estão acoplados sob a bancada.

Previamente aos experimentos de osmose inversa com o extrato, realizou-se a estabilização da membrana para que não ocorressem variações do fluxo permeado durante o processo, visto que o módulo encontrava-se armazenado. A estabilização foi realizada através da recirculação de água destilada com pressão de entrada de 5 bar, temperatura de 50 °C e vazão de alimentação de 40 L.h⁻¹ e o fluxo permeado foi medido a cada 15 minutos.

Em seguida, foi determinada a permeabilidade hidráulica da membrana, através da medição do fluxo permeado de água destilada para diferentes pressões de entrada (entre 1 e 5 bar). A permeabilidade hidráulica corresponde ao coeficiente angular da equação da reta obtida no gráfico do fluxo permeado versus a pressão de operação.

Para os experimentos com o extrato, foram colocados no tanque de alimentação 2,5 L de solução na temperatura de 50 °C, pressão de entrada de 5 bar e vazão de alimentação de 40 L.h⁻¹. Porém, nestas condições, não foi constatado fluxo permeado; isto ocorreu provavelmente devido ao elevado teor de etanol presente na solução, uma vez que em membranas de osmose inversa a separação é devida principalmente à afinidade entre os compostos que se deseja separar e a membrana, neste caso a membrana apresenta uma maior afinidade pela água. Para contornar este problema, diluiu-se o extrato, de modo que a concentração de etanol resultou em 18 %. Em seguida, iniciou-se a permeação através do sistema nas mesmas condições de operação mencionadas anteriormente. O tempo de operação foi estipulado até que a solução no tanque de alimentação atingisse uma concentração de etanol inferior a 5 %. Essas medidas foram realizadas com um alcoômetro.

Ao final do processo foi realizada a limpeza do sistema de membranas. Primeiramente, foi feito um enxágue com água destilada na temperatura de 50 °C e na pressão de 5 bar durante 5 minutos. Em seguida, diluiu-se 50 mL de hipoclorito de sódio (NaOCl) em 2,5 L de água destilada e essa solução foi recirculada no sistema por 10 minutos sob as mesmas condições. O enxágue com água destilada foi feito novamente por 5 minutos.

3.3 Fracionamento das Antocianinas por Ultrafiltração

O concentrado obtido na OI consiste de uma solução contendo água, antocianinas e um baixo teor de etanol. Assim, o objetivo desta parte do estudo foi fracionar as antocianinas monoméricas e poliméricas presentes, utilizando a separação por ultrafiltração.

O sistema de UF utilizado constitui-se dos mesmos equipamentos conforme descrito anteriormente, apenas com a diferença do módulo de membrana. Este tem uma configuração do tipo plana e uma área de 63,8 cm², sendo que foram testadas membranas com massa molar de corte (MMC) de 10, 30 e 50 kDa, fabricadas pela empresa Synder Filtration (Vacaville, USA). 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. Foram realizados testes de compactação e caracterização das membranas de UF, nas mesmas condições utilizadas no sistema de OI.

Nos experimentos com o extrato, a temperatura foi fixada em 50 °C, a pressão em 5 bar e a vazão de alimentação em 40 L.h⁻¹. Para cada membrana, o processo teve duração de 2 horas. A limpeza do sistema de UF foi feita através de enxágue com água destilada, recirculação de uma solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) e mais uma lavagem com água destilada.

3.4 Análises das Antocianinas Monoméricas e Poliméricas

Os métodos diferenciais têm sido os mais utilizados na determinação quantitativa das antocianinas. Esses métodos baseiam-se nas mudanças de absorvância resultantes da variação do pH das soluções e no fato das características espectrais dos produtos de degradação não serem alteradas por mudanças no pH.

O conteúdo de antocianinas monoméricas e poliméricas foi determinado pelo método do pH diferencial descrito por Giusti e Wrolstad (2001), utilizando-se espectrofotômetro UV1600 (Pró-análise, Brasil) para as medidas de absorvâncias das amostras. Foram feitas análises dos extratos obtidos em cada etapa do processo.

O comprimento de onda adotado para as análises foi de 510 nm. As amostras foram diluídas em tampão cloreto de potássio (pH 1,0) até que a relação entre a absorvância da amostra a 510 nm e a concentração estivesse dentro do intervalo que apresenta comportamento linear (entre 0,8 e 1,2). A diluição encontrada foi de 0,6 mL de extrato para 3,4 mL de tampão cloreto de potássio. O Fator de Diluição (*FD*) foi calculado de acordo com a Equação 3.1:

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

onde: V_T é o volume do tampão (mL) e $V_{EXTRATO}$ é o volume de extrato (mL). O FD encontrado foi de 6,67 e o mesmo foi utilizado em todas as análises, para antocianinas monoméricas e poliméricas.

3.4.1 Quantificação das Antocianinas Monoméricas

As antocianinas, em pH baixo, encontram-se predominantemente na forma de cátion flavílico, o qual apresenta coloração vermelha em solução aquosa. Em pH alto, esse cátion é convertido em outras espécies incolores.

Na análise das antocianinas monoméricas, as amostras foram diluídas (FD=6,67) em tampão cloreto de potássio (pH 1,0) e acetato de sódio (pH 4,5). As leituras foram feitas seis vezes para cada amostra, em dois comprimentos de onda: 510 e 700 nm (este para eliminar os interferentes da reação). A absorbância foi então calculada de acordo com a Equação 3.2.

$$A = (A_{510} - A_{700})_{pH=1,0} - (A_{510} - A_{700})_{pH=4,5} \quad (3.2)$$

A concentração de antocianinas monoméricas (MA) final é expressa em mg de cianidina-3-glucosídeo/100 mL de extrato de acordo com a Equação 3.3.

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

onde: A é a absorbância calculada pela Equação 3.2, M é a massa molar da cianidina-3-glucosídeo (449,2 g.mol⁻¹), FD é o fator de diluição, ϵ é o coeficiente de extinção molar (26900 L.mol⁻¹.cm⁻¹) e L é o caminho óptico da cubeta (1 cm).

3.4.2 Percentual de Antocianinas Poliméricas

Para a determinação do percentual de antocianinas poliméricas, as absorbâncias foram medidas nos comprimentos de onda de 420, 510 e 700 nm, este último para eliminação de interferentes. As amostras foram diluídas (FD=6,67) em água destilada e em cada uma de duas cubetas transferiu-se 2,8 mL desta amostra. Em seguida, adicionou-se 0,2 mL de uma

solução de metabissulfito de potássio ($K_2S_2O_5$) em uma cubeta e 0,2 mL de água destilada na outra. Foram realizadas seis repetições por amostra.

A densidade de cor é determinada pela soma das absorbâncias da amostra a 420 e 510 nm. O primeiro comprimento de onda absorve os produtos de escurecimento e o segundo constitui o comprimento de máxima absorção das antocianinas. Assim, avalia-se a contribuição das antocianinas e também de seus produtos de degradação para a cor.

Para a amostra tratada com água, a densidade de cor é calculada de acordo com a Equação 3.4 e a cor polimérica da amostra tratada com a solução de metabissulfito de potássio de acordo com a Equação 3.5.

$$\text{Densidade de cor} = [(A_{420} - A_{700}) + (A_{510} - A_{700})] \times FD \quad (3.4)$$

$$\text{Cor polimérica} = [(A_{420} - A_{700}) + (A_{510} - A_{700})] \times FD \quad (3.5)$$

O percentual de antocianinas poliméricas é calculado conforme a Equação 3.6.

$$\text{Antocianinas poliméricas (\%)} = [\text{Cor polimérica} / \text{Densidade de cor}] \times 100 \quad (3.6)$$

A cor polimérica corresponde à contribuição das antocianinas poliméricas e dos pigmentos marrons provenientes de escurecimento enzimático e degradação de antocianinas. Essa medida baseia-se no fato de que os pigmentos polimerizados são resistentes ao branqueamento com metabissulfito. Desta forma, após a adição de metabissulfito de potássio, a soma das absorbâncias nos comprimentos de onda de 420 e 510 nm corresponde à cor polimérica.

3.4.3 Percentual de Antocianinas Monoméricas

O procedimento adotado para as análises do percentual de antocianinas monoméricas presentes nas amostras é o mesmo descrito na seção 3.4.2. A densidade de cor é calculada conforme a Equação 3.4; a cor monomérica de acordo com a Equação 3.7, onde as absorbâncias medidas se referem às amostras tratadas com água e com a solução de metabissulfito de potássio.

$$\text{Cor monomérica} = [(A_{510} - A_{700})_{\text{água}} - (A_{510} - A_{700})_{\text{solução}}] \times FD \quad (3.7)$$

O percentual de antocianinas monoméricas é calculado conforme a Equação 3.8.

$$\text{Antocianinas monoméricas (\%)} = [\text{Cor monomérica/Densidade de cor}] \times 100 \quad (3.8)$$

O percentual correspondente às outras formas de antocianinas presentes é obtido de acordo com a equação 3.9.

$$\text{Outras formas (\%)} = 100 - [\text{Antocianinas monoméricas} + \text{Antocianinas poliméricas}] \quad (3.9)$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados das etapas de secagem do bagaço, preparação do extrato de antocianinas, purificação por osmose inversa e fracionamento das antocianinas monoméricas e poliméricas por ultrafiltração.

4.1 Secagem do Bagaço de Uva e Preparação do Extrato

Nesta etapa foram utilizados 3,66 kg de bagaço úmido, que resultaram em 1,46 kg após a secagem. Devido às perdas de amostras no equipamento, depois da moagem restaram 1,29 kg de bagaço. Na Figura 4.1 são apresentadas as fotografias do bagaço úmido, seco e moído.



Figura 4.1 Fotografias do bagaço de uva (a) Bagaço úmido (b) Bagaço seco (c) Bagaço moído

A caracterização do bagaço seco mostrou que o teor de antocianinas monoméricas é de $57,48 \pm 3,25$ mg de cianidina 3-glicosídeo/100 g de bagaço seco, representando $12,61 \pm 0,41$ % do total de compostos antociânicos presentes. O percentual encontrado de antocianinas poliméricas foi de $82,00 \pm 2,17$ %, indicando um teor de antocianinas totais de $457,66 \pm 55,49$ mg/100 g de bagaço seco. Esse valor é um pouco superior ao encontrado por Valduga *et al.* (2008), que obtiveram um teor total de 300 mg/100 g de bagaço de uva 'Isabel'.

A fotografia da Figura 4.2 ilustra o resíduo obtido após a extração, onde é possível notar a diminuição na intensidade da coloração em comparação com o bagaço seco. Esse resíduo apresenta em sua composição uma concentração de antocianinas monoméricas de $15,03 \pm 2,36$ mg/100 g de resíduo, indicando que a extração não foi completa.



Figura 4.2 Resíduo obtido após a extração de antocianinas com etanol acidificado e água (direita) em comparação com o bagaço seco.

A quantidade de solvente utilizada na extração foi adaptada dos experimentos com bagaço de mirtilo de Kechinski (2011), que verificou que a faixa de concentração ótima de etanol era entre 50 e 70 % para obtenção de um teor máximo de antocianinas. No entanto, os estudos de Ruberto *et al.* (2007) com extratos de bagaço de diferentes variedades de uva relataram que a quantidade de antocianinas extraída é superior utilizando metanol como solvente. Porém, devido à alta toxicidade, o metanol não tem aplicação na elaboração de produtos alimentícios.

Como neste trabalho as análises não foram feitas imediatamente após cada etapa do processo, é possível que reações de polimerização tenham ocorrido devido à armazenagem dos produtos, aumentando assim o teor de antocianinas poliméricas e diminuindo a concentração de antocianinas monoméricas. Ao estudar o conteúdo de antocianinas do suco de framboesa, Hager *et al.* (2008) verificaram que, após seis meses de armazenagem, restaram apenas 25 % da composição original de compostos monoméricos e essa perda foi acompanhada por um acréscimo na concentração de antocianinas poliméricas.

4.2 Osmose Inversa

A apresentação dos resultados da etapa de purificação a partir da remoção de etanol com a membrana de osmose inversa foi dividido em duas partes: permeabilidade hidráulica e resultados obtidos dos experimentos com o extrato de antocianinas.

4.2.1 Permeabilidade Hidráulica

Na Figura 4.3 estão apresentados os resultados da estabilização do fluxo permeado da membrana de osmose inversa, com água destilada, pressão de entrada de 5 bar, temperatura de 50 °C e vazão de alimentação de 40 L.h⁻¹. O fluxo permeado foi medido a cada 15 minutos.

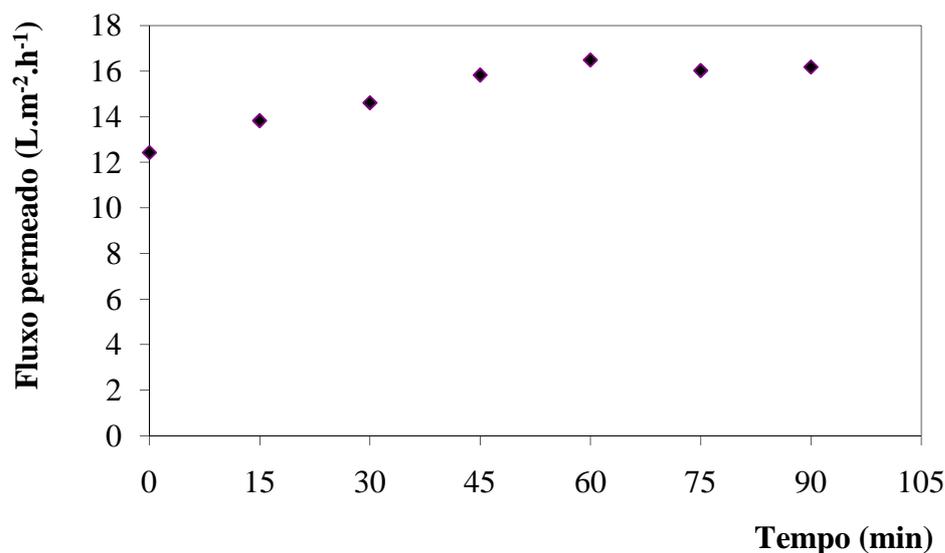


Figura 4.3 Fluxo permeado em função do tempo para a membrana de osmose inversa durante estabilização para pressão de entrada de 5 bar, temperatura de 50 °C e vazão de alimentação de 40 L.h⁻¹.

O fluxo permeado permaneceu praticamente constante (em torno de 15 L.m⁻².h⁻¹), indicando que a membrana encontrava-se estável em relação a sua estrutura.

A permeabilidade hidráulica para a membrana de OI foi determinada e as medidas fluxo de permeado versus pressão de entrada no módulo estão apresentadas na Figura 4.4. Com base nesses dados, a permeabilidade hidráulica, representada pelo coeficiente angular da reta, é 2,95 L.m⁻².h⁻¹.bar⁻¹, sendo que a curva apresenta um comportamento linear, em virtude do coeficiente de correlação (R^2) ser superior a 0,99. Este experimento mostra que o fluxo permeado aumenta linearmente com o aumento da pressão e que o valor de permeabilidade hidráulica encontrado é adequado para uma membrana de OI.

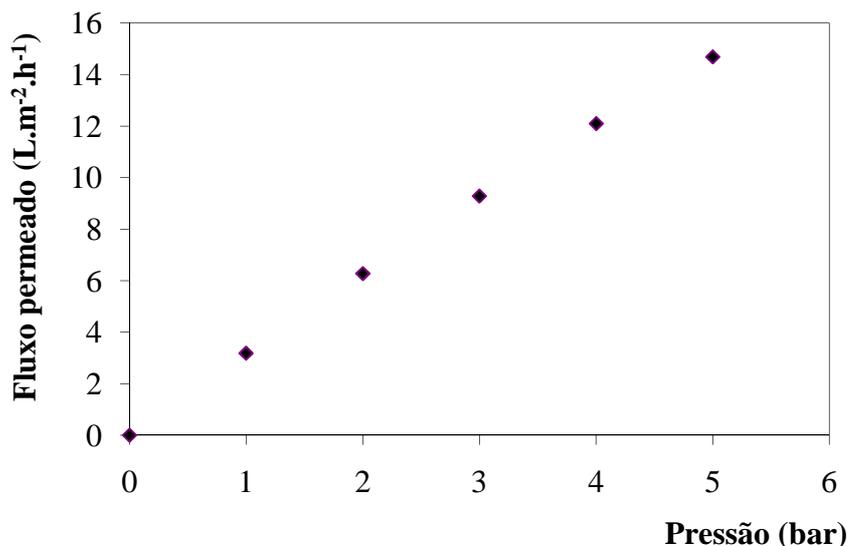


Figura 4.4 Fluxo permeado em função da pressão de entrada para a membrana de osmose inversa na temperatura de 50 °C e vazão de alimentação de 40 L.h⁻¹.

4.2.2 Experimento com o Extrato de Antocianinas

O extrato original contendo 60 % de etanol, inicialmente apresentou um fluxo permeado muito baixo, provavelmente devido à presença de um teor elevado de etanol, uma vez que a membrana tem um caráter hidrofílico, elevando a pressão osmótica da solução. Com o objetivo de aumentar o fluxo, diluiu-se o extrato de 60 para 18 % em etanol. Ao testar uma membrana de osmose inversa, Chung *et al.* (1986) encontraram dificuldades no escoamento do extrato das folhas de ‘perilla’ devido à alta pressão osmótica do etanol e do ácido cítrico utilizados na extração das antocianinas. Para tanto, modificaram o experimento, testando membranas de ultrafiltração de 0,5, 1 e 6 kDa.

O processo de osmose inversa com o extrato foi conduzido na pressão de 5 bar, temperatura de 50 °C e vazão de alimentação de 40 L.h⁻¹. Esta etapa durou 3 horas e foi finalizada quando a corrente concentrado atingiu uma concentração baixa de etanol (2 %). Ao final desse período, o permeado também apresentou um teor baixo de etanol (3 %), o que significa que a separação do solvente praticamente não estava mais ocorrendo. Os resultados de Patil *et al.* (2009) também mostraram a eficiência dos processos com membranas na desalcoolização dos extratos de cascas de rabanete vermelho, reduzindo o teor de etanol de 25 % para 0,2 % em 2 horas.

Na Figura 4.5 estão apresentados os valores do fluxo permeado medidos a cada 25 minutos durante o processo de osmose inversa, mostrando que o fluxo permeado com o extrato de antocianinas sofreu uma diminuição em relação aos valores obtidos com água destilada.

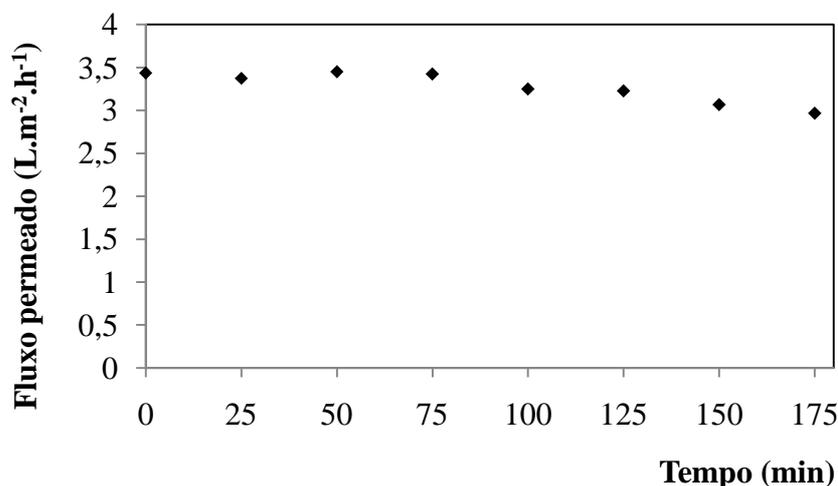


Figura 4.5 Fluxo permeado em função do tempo durante o processo de osmose inversa com o extrato de antocianinas.

A solução diluída, utilizada como corrente de alimentação da membrana de osmose inversa, passou pela análise de antocianinas e o valor encontrado foi de $3,35 \pm 0,01$ mg/100 mL de extrato para as monoméricas e $66,37 \pm 1,25$ % para as poliméricas.

A primeira fração do permeado apresentou cor amarelada, indicando que houve a permeação de outros compostos fenólicos. À medida que a permeação prosseguiu, essa coloração se tornou menos intensa, permanecendo transparente, apontando que houve a passagem apenas de etanol e água pela membrana. A análise da quantificação de antocianinas monoméricas resultou em um valor menor do que 0,05 mg/100 mL de permeado, resultado que mostra a ausência destes compostos na corrente. Pode-se dizer, então, que a membrana de osmose inversa foi adequada para a purificação do extrato, removendo o etanol e outros compostos fenólicos indesejáveis, e ainda impediu a permeação das antocianinas.

4.3 Ultrafiltração

A primeira parte desta seção apresenta os testes de compactação e permeabilidade hidráulica das membranas de UF. Em seguida, são mostrados os resultados obtidos com as

membranas de 10, 30 e 50 kDa no fracionamento das antocianinas monoméricas e poliméricas.

4.3.1 Compactação e Permeabilidade Hidráulica

Os resultados da compactação das membranas de ultrafiltração de 10, 30 e 50 kDa na pressão de entrada de 5 bar, temperatura de 50 °C e vazão de alimentação de 40 L.h⁻¹ estão apresentados na Figura 4.6. O fluxo permeado foi medido a cada 15 minutos.

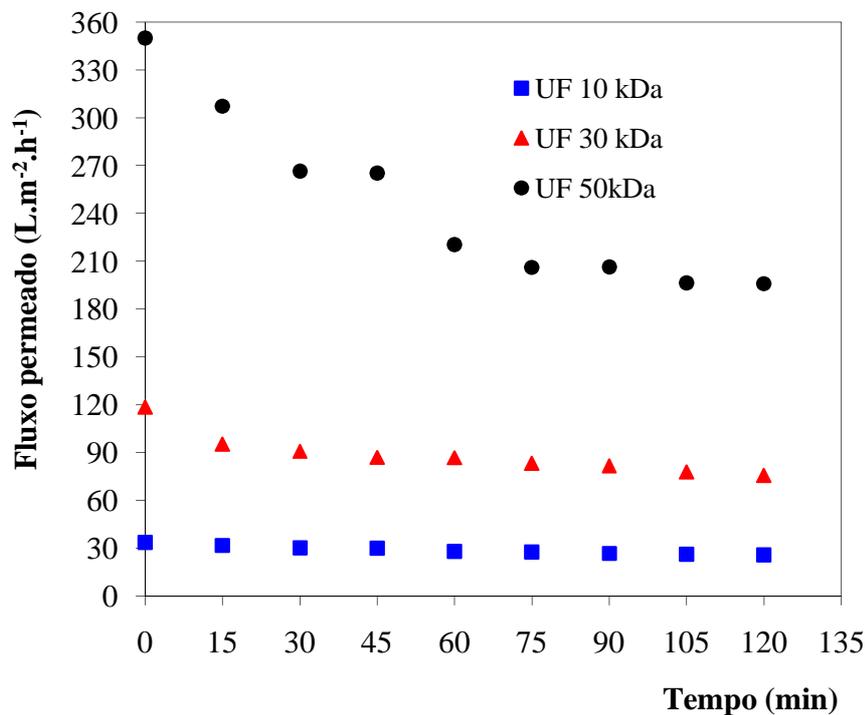


Figura 4.6 Fluxo permeado em função do tempo para as membranas de ultrafiltração de 10, 30 e 50 kDa durante compactação na pressão de entrada de 5 bar, temperatura de 50 °C e vazão de alimentação de 40 L.h⁻¹.

Nesse gráfico é possível observar que inicialmente as membranas estavam descompactadas, apresentando decaimento do fluxo permeado em função do tempo. A membrana de 10 kDa iniciou o processo com um fluxo de 33,6 L.m⁻².h⁻¹ e, ao final da compactação, atingiu o valor de 25,8 L.m⁻².h⁻¹. A membrana de 30 kDa apresentou um valor de 118,5 L.m⁻².h⁻¹ para o fluxo inicial e 75,7 L.m⁻².h⁻¹ para o fluxo final. O fluxo permeado inicial da membrana de 50 kDa foi elevado, 350,1 L.m⁻².h⁻¹, ocorrendo uma diminuição significativa para o valor de 196,1 L.m⁻².h⁻¹ ao final do experimento.

A partir dos dados apresentados na Figura 4.7, que relaciona o fluxo permeado com a pressão de entrada, foi possível determinar a permeabilidade hidráulica das membranas de UF, previamente compactadas. Observa-se que, para pressões mais elevadas, o fluxo permeado aumenta. Os dados também mostram que quanto maior a massa molar de corte da membrana, maior o valor do fluxo permeado e da permeabilidade hidráulica.

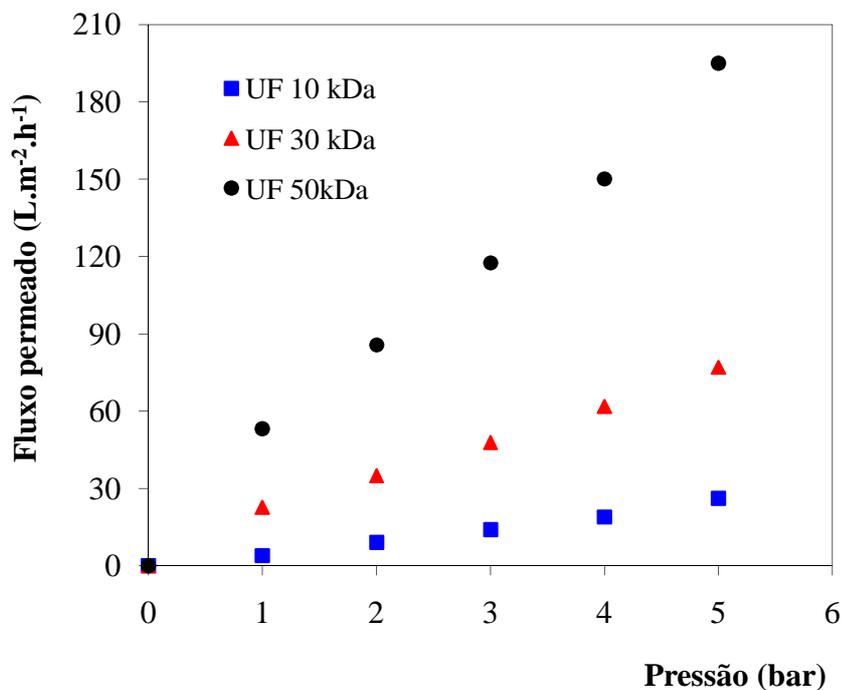


Figura 4.7 Fluxo permeado em função da pressão de entrada para as membranas de ultrafiltração de 10, 30 e 50 kDa na temperatura de 50 °C e vazão de alimentação de 40 L.h⁻¹.

Através da determinação do coeficiente angular da reta, verifica-se que a permeabilidade hidráulica da membrana com MMC de 10 kDa é 5,17 L.m⁻².h⁻¹.bar⁻¹, da membrana de 30 kDa é 14,73 L.m⁻².h⁻¹.bar⁻¹ e da membrana de 50 kDa é 37,1 L.m⁻².h⁻¹.bar⁻¹. Todas apresentaram comportamento linear, com coeficiente de correlação (R^2) maior do que 0,99.

4.3.2 Experimento com o Extrato de Antocianinas

No processo de UF com o extrato foram mantidas as mesmas condições de operação: pressão de 5 bar, temperatura de 50 °C e vazão de alimentação de 40 L.h⁻¹. Nos três experimentos, o concentrado obtido na etapa de osmose inversa com teor de etanol de 2 % foi

utilizado como corrente de alimentação. Esta solução foi recirculada no sistema durante 2 horas para todas as membranas testadas.

Para cada membrana, o fluxo permeado inicial foi medido, sendo que os valores encontrados foram $1,2 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ para a membrana de 10 kDa, $4,5 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ para a de 30 kDa e $11,8 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ para a de 50 kDa, indicando uma forte redução dos fluxos em comparação com os experimentos com água destilada, devido aos componentes presentes no extrato.

A Tabela 4.1 apresenta as análises da quantificação das antocianinas monoméricas obtidas nas correntes concentrado e permeado de cada membrana, bem como suas respectivas retenções observadas.

Tabela 4.1 Retenção observada e teores de antocianinas monoméricas presentes nas correntes concentrado e permeado dos experimentos com membranas de 10, 30 e 50 kDa.

<i>Membrana</i>	<i>Corrente</i>	<i>Antocianinas monoméricas (mg/100mL de extrato)</i>	<i>Retenção Observada (%)</i>
10 kDa	Concentrado	$2,70 \pm 0,49$	98,1
	Permeado	$< 0,05$	
30 kDa	Concentrado	$2,40 \pm 0,02$	95,4
	Permeado	$0,11 \pm 0,01$	
50 kDa	Concentrado	$2,07 \pm 0,02$	46,9
	Permeado	$1,10 \pm 0,01$	

O permeado da membrana de 10 kDa apresentou-se transparente e a análise de antocianinas monoméricas mostrou um teor muito baixo destes componentes nesta corrente. A membrana de 30 kDa também não foi adequada ao fracionamento das antocianinas para as condições experimentais testadas, uma vez que a concentração dos compostos monoméricos obtida no permeado foi baixa. A membrana de 50 kDa foi a mais eficiente na separação, já que seu permeado contém a maior concentração e a menor retenção observada de antocianinas monoméricas em comparação com as membranas de 10 e 30 kDa.

Os percentuais de antocianinas monoméricas e poliméricas presentes nas correntes concentrado e permeado das três membranas testadas podem ser visualizados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 Percentuais de antocianinas monoméricas e poliméricas presentes nas correntes concentrado e permeado dos experimentos com membranas de 10, 30 e 50 kDa.

<i>Membrana</i>	<i>Corrente</i>	<i>Antocianinas monoméricas (%)</i>	<i>Antocianinas poliméricas (%)</i>
10 kDa	Concentrado	16,31 ± 0,35	71,78 ± 4,25
	Permeado	15,77 ± 0,39	14,75 ± 0,66
30 kDa	Concentrado	19,23 ± 0,44	66,57 ± 1,60
	Permeado	20,69 ± 2,01	39,07 ± 3,67
50 kDa	Concentrado	17,99 ± 0,42	69,87 ± 0,86
	Permeado	31,92 ± 3,29	46,21 ± 0,08

À medida que a massa molar de corte das membranas aumenta, a proporção de antocianinas poliméricas em relação às monoméricas no permeado também aumenta, passando de 14,75 ± 0,66% na membrana de 10 kDa para 46,21 ± 0,08% na membrana de 50 kDa. Pelo fato de seu permeado conter um percentual maior de antocianinas monoméricas (31,92 ± 3,29 %), a membrana de 50 kDa é a mais adequada para o fracionamento destes compostos, mostrando-se a melhor alternativa dentre as três testadas para concentrar as antocianinas monoméricas. No entanto, já que todos os permeados apresentaram antocianinas poliméricas, os resultados não foram conclusivos e experimentos em diferentes condições de operação e outras membranas deverão ser testados para se obter resultados mais promissores.

5 CONCLUSÕES

O presente trabalho analisou a possibilidade de extração das antocianinas do bagaço de uva e a aplicação dos processos de separação com membranas para a purificação e o fracionamento de antocianinas. A análise do bagaço seco indicou um teor de antocianinas monoméricas de $57,48 \pm 3,25$ mg de cianidina 3-glicosídeo/100 g de bagaço e um total de antocianinas de $457,66 \pm 55,49$ mg/100 g de bagaço. A extração utilizando etanol acidificado e água não foi completa, pois o resíduo ainda apresentou em sua composição uma quantidade de antocianinas.

Após diluição, onde o teor de etanol diminuiu para 18 %, o extrato passou pelo sistema de osmose inversa, previamente estabilizado, onde a concentração de etanol foi reduzida para 2 % em 3 horas, outros compostos presentes no extrato foram removidos e não houve a permeação de compostos antociânicos. Portanto, o processo de OI foi eficaz para a purificação do extrato.

Para o fracionamento das antocianinas monoméricas e poliméricas foram testadas membranas de ultrafiltração com massa molar de corte de 10, 30 e 50 kDa. Essas membranas passaram por testes de compactação e determinação da permeabilidade hidráulica antes da operação. Os resultados mostraram que, inicialmente, as membranas estavam descompactadas e que quanto maior a massa molar de corte, maior o valor da permeabilidade hidráulica e do fluxo de permeado. Dentre os três experimentos de UF com o extrato, o permeado da membrana de 50 kDa obteve a maior concentração e proporção de componentes monoméricos presentes ($1,10 \pm 0,01$ mg/100 mL de extrato, representando $31,92 \pm 3,29$ % do total de antocianinas), sendo assim, a mais indicada no fracionamento dos pigmentos antociânicos.

Considera-se que o fato de as análises não terem sido realizadas logo após cada etapa do processo ocasionou um aumento na quantidade de antocianinas poliméricas e uma diminuição de monoméricas em cada amostra analisada.

Como projeto futuro, sugere-se o estudo da extração de antocianinas utilizando outros solventes e alterando a temperatura e o pH da solução. Para obter resultados mais satisfatórios no fracionamento de antocianinas, diferentes condições de operação e outras membranas podem ser testadas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRAZINHA, C.; CRESPO, J.G. *Ultrafiltração para produção de antioxidantes naturais*. Revista Meio Filtrante, v. 47, nº 2, 2010. Disponível em www.meiofiltrante.com.br (acessado em 10/04/2011).
- BRIDLE, P.; TIMBERLAKE, C.F. *Anthocyanins as natural food colors – selected aspects*. Food Chemistry, v. 58, p. 103 – 109, 1997.
- CAMARGO, U.A.; MAIA, J.D.G.; RITSCHKEK, P. *Novas cultivares brasileiras de uva*. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 64 p., 2010.
- CASTAÑEDA – 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, p. 859 – 871, 2009.
- CHUNG, M.Y.; HWANG, L.S.; CHIANG, B.H. *Concentration of perilla anthocyanins by ultrafiltration*. Journal of Food Science, v. 51, p. 1494 – 1497, 1986.
- GIUSTI, M.M.; WROLSTAD, R.E. *Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems*. Biochemical Engineering Journal, v. 14, p. 217 – 225, 2003.
- GIUSTI, M.M.; WROLSTAD, R.E. *Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy*. Protocols in Food Analytical Chemistry, Unit F 1.2, 2001.
- HABERT, A.C.; BORGES, C.P.; NOBREGA, R. *Processos de separação por membranas*. Rio de Janeiro: E – papers. 180 p., 2006.
- HAGER, A.; HOWARD, L.R.; PRIOR, R.L.; BROWNMILLER, C. *Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed black raspberry products*. Journal of Food Science, v. 73, p. 134 – 140, 2008.
- 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, p. 7036 – 7042, 2007.

KAMMERER, D.; KLJUSURIC, J.G.; CARLE, R.; SCHIEBER, A. *Recovery of anthocyanins from grape pomace extracts (Vitis vinifera L. cv. Cabernet Mito) using a polymeric adsorber resin*. European Food Research Technology, v. 220, p. 431 – 437, 2005.

KECHINSKI, C.P. *Estudo de diferentes formas do processamento do mirtilo visando à preservação dos compostos antocianicos*. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 320 p., 2011.

LEE, J.; RENNAKER, C.; WROLSTAD, R.E. *Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods*. Food Chemistry, v. 110, p. 782 – 786, 2008.

LUQUE – RODRÍGUEZ, J.M.; LUQUE DE CASTRO, M.D.; PÉREZ – JUAN, P. *Dynamic superheated liquid extraction of anthocyanins and other phenolics from red grape skins of winemaking residues*. Bioresource Technology, v. 98, p. 2705 – 2713, 2007.

MALACRIDA, C.R.; MOTTA, S. *Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade*. Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, v. 24, p. 59 – 82, 2006.

MALACRIDA, C.R.; MOTTA, S. *Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva*. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 25, p. 659 – 664, 2005.

MELLO, L.M.R. *Área e produção de uvas: panorama mundial*. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. 06 p., 2007.

MELLO, L.M.R. *Atuação do Brasil no mercado vitivinícola mundial – panorama 2010*. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 03 p., 2011.

MELLO, L.M.R. *Vitivinicultura brasileira: panorama 2010*. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. 04 p., 2010.

MULDER, M. *Basic principles of membrane technology*. 2. ed. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 564 p., 1996.

PATIL, G.; MADHUSUDHAN, M.C.; BABU, B.R.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. *Extraction, dealcoholization and concentration of anthocyanin from red radish*. Chemical Engineering and Processing, v. 48, p. 364 – 369, 2009.

RIZZON, L.A.; MANFROI, V.; MENEGUZZO, J. *Elaboração de suco de uva na propriedade vitícola*. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. 22 p., 1998.

RIZZON, L.A.; MENEGUZZO, J. *Suco de uva*. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 50 p., 2007.

ROCKENBACH, I.I.; RODRIGUES, E.; GONZAGA, L.V.; CALIARI, V.; GENOVESE, M.I.; GONÇALVES, A.E., FETT, R. *Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (Vitis vinifera L. and Vitis labrusca L.) widely produced in Brazil*. Food Chemistry, v. 127, p. 174 – 179, 2011.

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.

VALDUGA, E.; LIMA, L.; PRADO, R.; PADILHA, F.F.; TREICHEL, H. *Extração, secagem por atomização e microencapsulamento de antocianinas do bagaço de uva 'Isabel'*. Ciências Agrotécnicas, v. 32, p. 1568 – 1574, 2008.

WROLSTAD, R.E.; DURST, R.W.; LEE, J. *Tracking color and pigment changes in anthocyanin products*. Food Science and Technology, v. 16, p. 423 – 428, 2005.