

CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DO SUCO E DO RESÍDUO DE MIRTILO USANDO SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS

J. PAES¹, R. DOTTA¹ e J. MARTÍNEZ¹

¹ Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Engenharia de Alimentos
E-mail para contato: julian@fea.unicamp.br

RESUMO – O mirtilo é uma fruta rica em antioxidantes, com conteúdo elevado de polifenóis na casca e na polpa. Visando à concentração destes compostos, foi avaliado o desempenho de membranas de ultrafiltração (100 kDa) e nanofiltração (1 kDa), em diferentes condições de pressão e fator de concentração, comparando três diferentes alimentações: suco concentrado de mirtilo (65° Brix), resíduo de mirtilo e extrato obtido utilizando CO₂ supercrítico. O resíduo de mirtilo apresentou maiores retenções de antioxidantes, compostos fenólicos e antocianinas. Para a análise de antioxidantes, o retentado apresentou o dobro da alimentação ($83 \pm 1,4$ e $41 \pm 0,0$ $\mu\text{mol TE/g}$). Já para os fenólicos, o retido apresentou valor de $10,0 \pm 0,7$ e a alimentação de $5,9 \pm 0,4$ (ácido gálico (mg/g)). As antocianinas apresentaram maior retenção, sendo a alimentação com $4,7 \pm 0,1$ e o retentado $30,3 \pm 2,0$ (mg antocianinas/100g). Para as três análises realizadas, a concentração no permeado foi zero.

1. INTRODUÇÃO

O mirtilo (*Vaccinium myrtillus L.*) é uma pequena fruta nativa da América do Norte, onde é denominada “blueberry”. No Brasil sua cultura ainda é recente e pouco conhecida, porém as pesquisas com esta fruta têm se intensificado (Raseira et al, 2004). Do grupo das pequenas frutas que abrange, entre outras, as culturas de morango, framboesa, mirtilo e amora preta, o mirtilo é classificado como a fruta fresca mais rica em antioxidantes, tendo um conteúdo elevado de polifenóis tanto na casca quanto na polpa. Sua disponibilidade, versatilidade, e variedade de formas durante quase todo o ano permitem que o mirtilo seja incorporado em uma ampla variedade de formulações (Payne, 2005).

Os flavonoides se acumulam nas cascas e folhas das plantas porque a sua síntese é estimulada pela luz. Isso pode explicar a possível diferença de composição entre frutos de uma mesma planta, ou seja, os frutos que recebem uma maior quantidade de luz tendem a ter uma síntese pronunciada desses compostos (Price et al., 1995).

Antocianinas são o maior e mais importante grupo de pigmentos hidrossolúveis naturais, sendo responsáveis por cores que vão desde laranja e vermelho a violeta e azul de diversas flores, frutos e folhas (Cavalcanti et al, 2011; Reynertson et al., 2008). Além de sua capacidade corante, diversas são as atividades biológicas atribuídas às antocianinas, como: atividade anticarcinogênica (Hagiwara et al., 2001), antioxidante (Wang et al., 2000) e antiviral (Kapadia et al., 1997).

O método de extração com fluidos supercríticos (SFE) vem ganhando cada vez mais espaço. Na indústria alimentícia a grande vantagem dos extratos obtidos por esse processo é serem de origem natural, não apresentarem resíduo de solvente orgânico e cuja composição pode ser monitorada. Essa tendência das indústrias de alimentos se deve aos consumidores estarem cada vez mais preocupados com a saúde, o que tem impulsionado a indústria a disponibilizar no mercado produtos para a prevenção de doenças (Meireles, 2008).

Os processos de separação por membranas têm deixado nos últimos anos de ser apenas técnicas laboratoriais para serem utilizados industrialmente. Essa tecnologia não convencional de concentração e clarificação vem sendo muito utilizada com o intuito de se reduzir o consumo de energia, assim como melhorar a qualidade dos alimentos processados e obter subprodutos de alto valor agregado (Mulder, 1991).

Quando comparada aos processos convencionais, a tecnologia de membranas apresenta a vantagem de, geralmente, ser usada à temperatura ambiente, favorecendo, portanto, a preservação de nutrientes e constituintes do sabor, atributo importante para a qualidade do produto final (Strathmann, 1990).

As membranas estão entre as mais importantes aplicações industriais atuais e, a cada ano, mais finalidades são encontradas para esta tecnologia, como por exemplo: purificação de água, tratamento de efluentes industriais, desidratação de solventes, recuperação de voláteis orgânicos, concentração de proteínas, biosseparação e muitos outros (Scott, 1995).

Para o processamento de sucos e polpas de frutas com fins diversos, as membranas são atrativas, pois permitem obter produtos de alta qualidade, uma vez que são utilizadas baixas temperaturas. Dependendo do diâmetro do poro da membrana, é possível fracionar ou concentrar diferentes componentes.

Porém neste processo pode ocorrer o declínio do fluxo de permeado com o tempo no qual ocorre em três estágios entre eles, a polarização de concentração, a incrustação e por fim, a consolidação da incrustação caracterizada por um declínio contínuo e lento do fluxo (Marshall *et al*, 1995).

A ultrafiltração é também utilizada para separar compostos de alta massa molecular de compostos de baixa massa molecular. As membranas de ultrafiltração apresentam diâmetro de poro de 0,001 a 0,1 μm (1 a 100 nm). O valor do diâmetro de poro na ultrafiltração é normalmente expresso em massa molecular de corte, definida como a massa molecular de proteínas globulares que são 90% retidas pela membrana (Porter, 1990). O valor citado corresponderia aos valores de 500 a 300.000 daltons (Dziezak, 1990). As pressões utilizadas são da ordem de 0,1 a 1,5 bar. (Mulder, 1991).

A nanofiltração é um nome de utilização mais recente, e define um processo com membranas capaz de efetuar separações de moléculas de massa molar média situando-se entre o limite superior da ultrafiltração e o limite inferior da osmose inversa. Trata-se, portanto, de um processo que utiliza uma membrana “fechada” de ultrafiltração ou uma membrana “aberta” de osmose inversa. As membranas utilizadas em nanofiltração permitem a passagem de espécies iônicas e moléculas de baixa massa molar (300-1000 g/mol). O princípio básico é o mesmo dos demais processos com gradiente de pressão como força motriz, onde a solução circula sob pressão

em contato com uma membrana microporosa. Sob o efeito da pressão o solvente, em geral água, atravessa a membrana e dá origem ao fluxo de permeado, carregando sais e moléculas de baixa massa molar, enquanto as moléculas de maior massa molar não permeiam a membrana (Habert *et al.*, 2006).

Assim, este trabalho tem o objetivo de aplicar a ultrafiltração e nanofiltração para concentrar os compostos funcionais do suco concentrado de mirtilo, resíduo de mirtilo e extrato obtido pela extração com CO₂ supercrítico do resíduo de mirtilo, todos do gênero *Vaccinium*, viabilizando o seu uso em alimentos e fármacos.

2. OBJETIVOS

2.2. Geral

Concentrar compostos funcionais do suco concentrado de mirtilo, resíduo de mirtilo e extrato de resíduo de mirtilo obtido pela extração com CO₂ supercrítico através da ultrafiltração (UF) e nanofiltração (NF) utilizando membranas de 100 kDa e 1 kDa, respectivamente.

2.2. Específicos

- Separar as matérias-primas para a diluição: suco concentrado de mirtilo, resíduo de mirtilo e extrato do resíduo de mirtilo obtido a partir da melhor condição da extração supercrítica realizada em estudos anteriores.
- Estudar o efeito do material de membrana de ultrafiltração (100 kDa) e nanofiltração (1 kDa), pressão, temperatura e solventes utilizados na diluição da alimentação.
- Determinar a concentração de compostos fenólicos pelo método colorimétrico de Singleton *et al* (1999), atividade antioxidante pelo método DPPH (Brand-Williams *et al.* (1995) e antocianinas monoméricas pelo método de pH diferencial descrita por Giusti *et al* (2003) da alimentação, retido e permeado.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Matéria-prima

O suco concentrado de mirtilo (65° Brix) foi cedido pela empresa “San Leon”, do estado de São Paulo. O resíduo de mirtilo foi cedido pela empresa “Orgânicos Pérolas da Terra”, localizada no estado do Rio Grande do Sul. Todas as matérias primas utilizadas são provenientes de frutos mirtilo do gênero *Vaccinium*.

O extrato do resíduo de mirtilo utilizado é proveniente da melhor condição de extração com CO₂ supercrítico de trabalhos anteriores realizados por Paes *et al* (2014), no qual utilizou para a extração: resíduo de mirtilo fresco, nas condições de 20 MPa, 40°C e vazão de solventes de $1,4 \times 10^{-4}$ kg/s. Os cossolventes utilizados foram água e etanol, ambos nas proporções mássicas de 5%.

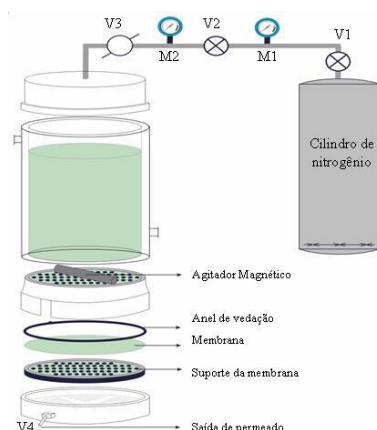
3.2. Caracterização da matéria-prima, alimentação, retido e permeado

As matérias-primas, alimentações, retidos e permeados foram caracterizados através de análises de compostos fenólicos, atividade antioxidante e antocianinas monoméricas.

3.3. Concentração por membranas

3.3. 1. Equipamento

Os experimentos foram conduzidos em célula laboratorial, que está instalada no Laboratório de Alta Pressão em Engenharia de Alimentos (LAPEA/DEA/FEA/Unicamp). A célula laboratorial é construída em aço inox AISI 304, constituída de um cilindro encamisado com capacidade de 800 mL e opera até uma pressão de 4 MPa. Sobre a base (saída de permeado) é montado um suporte que serve de apoio ao disco de membrana. Anéis de vedação (padrão sanitário) impedem o vazamento entre as partes. Na tampa superior do equipamento existe um eixo central fixo, em cuja extremidade inferior está encaixado o agitador magnético, que promoverá a agitação da alimentação. Na parte superior, existe a entrada de gás nitrogênio para criar a pressão no interior da célula gerando a força motriz do processo. A temperatura é controlada por meio da circulação de água na camisa do equipamento, através de um banho termostático modelo NT281 (Nova Técnica, Piracicaba, SP) (Figura 1).



- V₁ – Válvula abre/fecha do cilindro de nitrogênio
- M₁ – Manômetro 1: fornece a leitura da pressão interna do cilindro de nitrogênio quando V₁ está aberta
- V₂ – Válvula de regulagem: regula a pressão no interior da célula
- M₂ – Manômetro 2: fornece a leitura da pressão no interior da célula
- V₃ – Válvula de 3 vias (escape)
- V₄ – Válvula de saída de permeado

Figura 1. Esquema de célula de micro, ultra e nanofiltração de uso laboratorial.

3.3. 2. Procedimentos experimentais

As matérias-primas foram diluídas em diferentes solventes e foram aplicados diferentes procedimentos, conforme ilustrado na Tabela 1.

Tabela 1- Procedimentos experimentais

Matéria-prima	Alimentação (Solvente/diluição)	Membrana	Pressão (MPa)	Temperatura (°C)	Tempo de processo
Suco concentrado de mirtilo 65° Brix	60 g de suco /400 ml água	NF	1	20	1 hora
		NF	3	30	1 hora
Resíduo de mirtilo	6g resíduo/400 ml água acidificada (pH=2,0)	UF	3	30	7 min
		NF	3	30	15 min
Extrato de resíduo de mirtilo	4g de extrato/400 ml água acidificada (pH=2,0)	UF	3	30	15 min
		NF	3	30	25 min

Para as concentrações com resíduo de mirtilo e extrato de resíduo de mirtilo, primeiramente realizou-se a concentração por ultrafiltração, e do permeado resultante fez-se outra concentração por nanofiltração. Todas as matérias-primas após a diluição foram pré-filtradas em filtros de 1 Mesh de diâmetro.

3.3. 3. Teor de fenólicos

O conteúdo total de compostos fenólicos dos permeados e retidos foi determinado espectrofotometricamente, utilizando o método de Folin-Ciocalteu, de acordo com o procedimento proposto por Singleton *et al* (1999) com modificações. Resumidamente, misturou-se 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (1:10 v/v) a 0,5 ml de solução metanólica de extrato. Após 5 min, adicionou-se 2,0 mL de solução de carbonato de sódio (7,5%). A mistura foi mantida durante 2 h no escuro e à temperatura ambiente, e em seguida, a absorbância foi medida a 760 nm. Ácido gálico foi usado como padrão, e os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico (GAE) por grama de extrato.

3.3. 4. Atividade antioxidante

A determinação da capacidade antioxidante dos permeados e retidos foi realizado pelo método DPPH. , com a metodologia proposta por Brand-Williams *et al.* (1995) com modificações. Primeiramente, cerca de 50 µL de solução metanólica de extrato foi adicionada a 1950 µL de solução metanólica de DPPH em um tubo de ensaio. A mistura resultante foi mantida no escuro a temperatura ambiente por 6 horas. Após o repouso, a absorbância da solução foi determinada em espectrofotômetro em 517 nm. Uma curva de calibração com ácido gálico foi utilizada para quantificar a atividade antioxidante do extrato e os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico por grama de extrato.

3.3. 5. Antocianinas monoméricas

A determinação dos teores de antocianinas monoméricas foi realizada através da metodologia de pH diferencial descrita por Giusti *et al*, (2003). Foram preparadas duas soluções tampão, uma de pH 1,0 e outra de pH 4,5. Em seguida, foram pesadas as amostras em seis balões volumétricos, âmbar, de 25,00 mL entre 0,05 – 0,1 g de amostra. Três massas para m_1 (pH =1) e três massas para m_2 (pH = 4,5); e o volume foi completado até 25 mL com tampão adequado,

ficando em repouso por 25 minutos. Posteriormente fizeram-se as leituras após 30 minutos da adição do tampão. Para a leitura, primeiramente ajustou-se o comprimento de onda para 510 nm, zerou-se o equipamento com a solução tampão pH 1,0 e fez-se a leitura da amostra em tampão pH 1,0. Em seguida, ajustou-se o comprimento de onda para 700 nm, zerou-se o espectrofotômetro e foi novamente feita a leitura da amostra em solução tampão pH 1,0. Depois da leitura com as amostras pH 1,0, o mesmo procedimento se repetiu, porém com as amostras em pH 4,5. Para o cálculo da quantidade de antocianinas monoméricas, foram utilizadas as Equações 1 e 2:

$$Abs = (Abs_{510} - Abs_{700})_{pH1,0} - (Abs_{510} - Abs_{700})_{pH4,5} \quad (1)$$

$$C_{\text{expresso em cianidina 3 glicosídeo}} \left(\frac{mg}{L} \right) = \frac{Abs \times PM \times FD \times 1000}{e} \quad (2)$$

Onde: PM = Peso molecular da cianidina-3-glicosídeo = 449,2 g/mol, FD = Fator de diluição, e = absorvidade molar da cianidina-3-glicosídeo = 26900. Os cálculos são feitos considerando-se a cianidina 3-O-glicosídeo como a antocianina principal da amostra.

4. RESULTADOS

4.1. Resultados da caracterização das matérias-primas, alimentação, retido e permeado

A Tabela 2 apresenta os resultados da caracterização das matérias-primas, alimentação, retido e permeado.

Tabela 2 – Resultados da caracterização das matérias-primas, alimentação, retido e permeado

		Compostos fenólicos (mg GAE*/g)	DPPH (μmol TE*/g)	Antocianinas (MG C3G*/100g)
Matéria-prima	Resíduo de mirtilo	11,7 ± 0,6	446,0 ± 0,7	175 ± 17
	Extrato de resíduo de mirtilo	134 ± 11	1658 ± 160	1071 ± 64
Alimentação (matéria-prima diluída)	Suco concentrado de mirtilo 65°	8,53 ± 0,23	207 ± 0,5	141 ± 1,5
	Resíduo de mirtilo	5,89 ± 0,35	40,7 ± 0,0	4,7 ± 0,1
	Extrato de resíduo de mirtilo	6,86 ± 0,28	61,3 ± 0,4	1,8 ± 0,1
Retido	Suco concentrado de mirtilo 65°	10,28 ± 0,47	222 ± 1,6	146,4 ± 1,7
	Resíduo de mirtilo	9,94 ± 0,70	83,2 ± 1,4	30,3 ± 2,0
	Extrato de resíduo de mirtilo	8,43 ± 0,11	98,02 ± 1,4	3,4 ± 0,2
Permeado	Suco concentrado de mirtilo 65°	5,60 ± 0,32	46 ± 0,9	4,05 ± 0,2
	Resíduo de mirtilo	-	-	-
	Extrato de resíduo de mirtilo	-	-	-

*GAE – equivalente de ácido gálico

*TE – equivalente de Trolox

*C3G – equivalente de cianidina 3-O-glicosídeo

Verifica-se que houve retenção de compostos fenólicos, atividade antioxidante e antocianinas comparando os extratos de resíduo de mirtilo extraídos por tecnologia supercrítica. Estes resultados evidenciam que a extração foi eficiente nas condições pré-estabelecidas em trabalhos anteriores realizados por Paes *et al* (2014).

Pode-se verificar que o suco concentrado de mirtilo diluído (alimentação) apresentou os valores mais altos de compostos fenólicos, atividade antioxidante e antocianinas, comparado ao resíduo de mirtilo e extrato do resíduo, evidenciando que no processo de concentração do suco, estes compostos se mantiveram. Já o extrato de resíduo de mirtilo diluído (alimentação), apresentou resultados inferiores comparados às demais alimentações. Isso pode ser explicado pela alta diluição realizada no extrato.

Após as concentrações, pode-se verificar que, o resíduo de mirtilo apresentou maiores retenções de antioxidantes, compostos fenólicos e antocianinas durante o processo, comparando com as três diferentes alimentações. Para a análise de antioxidantes, o retentado apresentou o dobro da alimentação ($83 \pm 1,4$ e $41 \pm 0,0$ $\mu\text{mol TE/g}$). Já para os fenólicos, o retentado apresentou valor de $10 \pm 0,7$ e alimentação de $5,9 \pm 0,4$ (ácido gálico (mg/g)). As antocianinas apresentaram maior retenção, sendo a alimentação com $4,7 \pm 0,1$ e o retentado $30,3 \pm 2,0$ (mg antocianinas/100g). Para as três análises realizadas, a concentração no permeado foi zero, evidenciando a eficiência do processo de concentração.

6. REFERÊNCIAS

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, v. 28, p. 25-30, 1995.

CAVALCANTI, R. N.; SANTOS, D. T.; MEIRELES, M. A. A. Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems: an overview. *Food Research International*, v. 44, p. 499-509, 2011.

CHERYAN, M. *Ultrafiltration and Microfiltration Handbook*. Lancaster: Technomic Publ. Co., Illinois, 1998.

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

GIUSTI, M.M.; WROLSTAD, R.E.; Acylated Anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal*. v. 14, p. 227-225, 2003.

HABERT, A.C.; BORGES, C.P.; NOBREGA, R. *Processos de Separação por Membranas*. E-papers, Rio de Janeiro, 2006.

HAGIWARA, A. Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-16-phenylimidazol (4,5-b) pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Letters*, v. 171, p. 17-25, 2001.

KAPADIA, G. J.; BALASUBRAMANIAN, V.; TOKUDA, H.; I WASHINA, A; NISHINO, H. Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced Epstein virus early antigen activation by natural colorants. *Cancer Letters*, v. 115, p. 173 –178, 1997.

MARSHALL, A. D; DAUFIN, G. Physico-chemical aspects of membrane fouling by dairyfluids. In: FOULING and cleaning in pressure driven membrane processes. Brussels: *International Dairy Federation*, cap.1, p. 8-35, 1995.

MEIRELES, M. A. A. Extraction of Bioactive Compounds from Latin American Plants. In: MARTINEZ, J. L. (Ed.). *Supercritical fluid extraction of nutraceuticals and bioactive compounds*. Boca Raton, FL: CRC Press, 2008.

MULDER, M. *Basic principles of membrane technology*. [s.i.]: Kluwer Academic Publishers, 1991.

PAES, J.; DOTTA, R.; BARBERO, G. F.; MARTÍNEZ, J. Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) residues using supercritical CO₂. *14^o European Meeting on Supercritical Fluids*. Marselha, França, 2014.

PAYNE, T. J. *Formulating with Blueberries for Health*. *Cereal Foods World*, v. 50, p.262-264, 2005.

PORTER, M. C. *Handbook of industrial membrane technology*. New Jersey: Noyes, 1990.

PRICE, S. F.; BREEN, P. J.; VALLADAO, M.; WATSON, B. T. Cluster sun exposure and quercetin in Pinot nois grapes and wine. *Am. J. Enol. Viticult.* v.46, p.187-194, 1995.

RASEIRA, M., C., B.; ANTUNES, L., E., C.; *A Cultura do Mirtilo*. Pelotas, 29-36, 2004. Disponível em: <<http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes>> Acesso em 10 de abril de 2014.

REYNERTSON, K.A.; YANG, H.; JIANG, B.; BASILE, M.J.; KENNELLY, E.J. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible *Myrtaceae* fruits. *Food Chemistry*, v. 109, p. 883–890, 2008.

SCOTT, K; HUGHES, R. *Industrial membrane separation technology*. 2.ed. [s.i.]: Blackie Academic & Professional, 1996.

SINGLETON V. L., ORTHOFER R, LAMUELA-RAVENTOS R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, v.299, p.152-178, 1999.

STRATHMANN, H. Synthetic membranes and their preparation. In: PORTER, Mark C. (ed.) *Handbook of industrial membrane technology*. Park Ridge: Noyes Publications, 1990.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Food Chemistry*, vol. 45, 304-309, 1997. Em: SKREDE, G., WROLSTEAD, R. E., DURST, R. W.; Changes in Anthocyanins and Polyphenolics During Juice Processing of Highbush Blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Journal of Food Science*, v. 65, p.357-364, 2000.