



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
ESCOLA DE QUÍMICA**

**PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS  
QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS**

**MANUELA CRISTINA PESSANHA DE ARAUJO SANTIAGO**

**AVALIAÇÃO DE PROCESSOS PARA OBTENÇÃO DE PRODUTOS RICOS EM  
ANTOCIANINAS UTILIZANDO SUCO DE ROMÃ (*Punica granatum* L.)**

Rio de Janeiro

2014

Santiago, Manuela Cristina Pessanha de Araujo.

Título: Avaliação de processos para obtenção de produtos ricos em antocianinas utilizando suco de romã (*Punica granatum L.*). – 2014.

f.135 : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Rio de Janeiro, 2014.

Orientador: Suely Pereira Freitas

1. Antocianinas. 2. Microencapsulação. 3. Microfiltração. 4. Osmose inversa. I. Freitas, Suely Pereira. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Escola de Química. III. Avaliação de processos para obtenção de produtos ricos em antocianinas utilizando suco de romã (*Punica granatum L.*).

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**  
**ESCOLA DE QUÍMICA**

Manuela Cristina Pessanha de Araujo Santiago

Avaliação de processos para obtenção de produtos ricos em antocianinas utilizando suco de romã (*Punica granatum* L.)

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Orientadoras: Dr<sup>a</sup>. Suely Pereira Freitas

Dr<sup>a</sup>. Regina Isabel Nogueira

Rio de Janeiro

2014

**Manuela Cristina Pessanha de Araujo Santiago**

Avaliação de processos para obtenção de produtos ricos em antocianinas utilizando suco de romã (*Punica granatum* L.)

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Aprovada em 28 de abril de 2014.

---

Suely Pereira Freitas, D. Sc., EQ/ UFRJ (orientadora)

---

Maria Alice Zarur Coelho, D. Sc., EQ/ UFRJ

---

Karen Signori Pereira, D. Sc., EQ/ UFRJ

---

Neusa Pereira Arruda, D. Sc., IFRJ

---

Alexandre Porte, D. Sc., Unirio

---

Jane de Jesus da Silveira Moreira, D. Sc., UFSe

## DEDICATÓRIA

Ao Senhor Deus que me permitiu a concepção deste trabalho, colocando pessoas maravilhosas em meu caminho e me dando força para continuar.

À razão da minha vida, minha filha Giovana, a quem tanto amo e que um dia com certeza compreenderá todo meu esforço.

Ao meu esposo Robson, pelo carinho, pela paciência, por toda ajuda nas tarefas de casa, com nossa filha e no campo emocional.

Aos meus pais, que mais uma vez se mostraram os melhores do mundo, me apoiando e suprimdo a minha ausência em determinados momentos com minha filha.

Ao meu irmão, que mesmo sem saber, aposta tanto em mim que me faz ter mais confiança no meu potencial.

Aos meus sogros e cunhada por terem me apoiado em todos os momentos em que precisei.

A todos que de alguma forma torceram por mim e me fizeram acreditar que no fim tudo daria certo.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio de Janeiro, por todo apoio científico dado ao longo destes últimos anos.

À Escola de Química, ao Departamento de Engenharia Química, por toda a infraestrutura fornecida.

À Embrapa Agroindústria de Alimentos, por toda a infra-estrutura e apoio técnico fornecidos.

À Professora D. Sc. Suely Pereira Freitas, pela excelente orientação, por todo carinho e por toda confiança em mim depositada, a qual espero ter correspondido.

À D. Sc. Regina Isabel Nogueira, por toda dedicação na orientação deste trabalho e pelas palavras amigas e sinceras que me motivaram a continuar.

Ao D. Sc. Ronoel Luiz de Oliveira Godoy por toda amizade, todas as oportunidades e por todos os ensinamentos que vem me dando ao longo de tantos anos.

À D. Sc. Renata Galhardo Borguini por todo incentivo e troca de conhecimentos durante o período de execução do trabalho.

À D. Sc. Lourdes Maria Corrêa Cabral que sempre apoiou meu crescimento profissional, desde o mestrado.

Às grandes amigas Ana Cristina e Fernanda por terem me socorrido em diversos momentos e por toda sabedoria que me passaram nestes anos.

Aos amigos e parceiros de laboratório Sidney e Luzimar por todo apoio para a conclusão do trabalho.

Aos alunos Allien, Diego, Filipe, Raysa, Aline, Luciana, Elaine e Víctor por toda contribuição que deram ao longo dos estudos.

A todos os colegas de outros laboratórios da Embrapa Agroindústria de Alimentos, em especial Sérgio Pontes, Luiz Fernando, José Carlos e Simone, pela contribuição em várias etapas do trabalho.

Aos integrantes da banca, por toda a atenção dada ao trabalho final.

Aos coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, por toda a preocupação em organizar e manter um curso aprimorado.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, por toda a dedicação e esforço na arte de lecionar.

Ao D.Sc. Paulo Roberto Coelho Lopes, da Embrapa Semiárido, por todo apoio na condução do projeto.

À Fazenda Boa Fruta pelo fornecimentos dos frutos de romã.

Ao CNPQ e à FAPERJ por todo suporte financeiro para execução deste trabalho.

A todas as pessoas de outras Instituições que de alguma forma contribuíram para a realização deste estudo seja por parceria técnica ou por troca de informações.

A todas as pessoas que auxiliaram na revisão deste trabalho, apontando possíveis erros e indicando correções para os mesmos.

A todos os pesquisadores de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, por conseguirem através de seus estudos disponibilizarem uma série de dados que contribuem consideravelmente para a continuidade deste segmento de pesquisa.

## RESUMO

SANTIAGO, Manuela Cristina Pessanha de Araujo. Avaliação de processos para obtenção de produtos ricos em antocianinas utilizando suco de romã (*Punica granatum* L.). Rio de Janeiro, 2014. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

A romã (*Punica granatum* L.) é uma fruta originária do Oriente Médio, apresentando sementes revestidas por uma polpa avermelhada onde estão presentes compostos fenólicos, principalmente as antocianinas. As antocianinas, além de possuírem propriedades potencialmente benéficas à saúde, são também responsáveis pela coloração dos produtos obtidos a partir do suco de romã, sendo este um dos parâmetros de qualidade que mais influencia na aceitação sensorial pelos consumidores. A ampliação do seu cultivo no Brasil tem promovido a avaliação de tecnologias que favoreçam um maior aproveitamento do fruto e de seus compostos benéficos à saúde. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar os processos de microfiltração, osmose inversa e microencapsulação por *spray drying* do suco de romã visando à preservação das antocianinas nos produtos gerados. O isolamento de padrões e o aperfeiçoamento de procedimentos analíticos para análise de antocianinas monoméricas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência permitiram um monitoramento preciso de todas as correntes de processo. No processo de microencapsulação do suco por *spray drying* a formulação de agentes encapsulantes contendo amido modificado (Capsul<sup>®</sup>): goma arábica (1:1) foi a que melhor reteve as antocianinas, possibilitando a retenção de 70% das mesmas presentes na alimentação do processo. Registrou-se uma perda de 18% das antocianinas totais durante a microfiltração do suco, e um fator de concentração igual a 2,3 para tais compostos durante o processo de osmose inversa. Avaliou-se também a estabilidade das antocianinas nos produtos obtidos, não tendo sido observada diferença significativa no teor de antocianinas totais do suco clarificado após 2 meses de avaliação, e redução de 11% das mesmas no suco concentrado durante igual período. Para as microcápsulas, observou-se redução de 40% das antocianinas totais ao final de 4 meses de avaliação. Em relação à análise de cor observou-se para os três produtos, de uma forma geral, manutenção dos parâmetros avaliados, principalmente  $h^{\circ}$  (ângulo de matiz). Neste trabalho pôde-se confirmar o potencial das técnicas de processamento avaliadas para obtenção de diferentes produtos derivados de romã com elevada retenção de antocianinas e estabilidade da cor.

Palavras-chave: Antocianinas. Microencapsulação. Microfiltração. Osmose inversa.



## ABSTRACT

SANTIAGO, Manuela Cristina Pessanha de Araujo. Avaliação de processos para obtenção de produtos ricos em antocianinas utilizando suco de romã (*Punica granatum* L.). Rio de Janeiro, 2014. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

The pomegranate (*Punica granatum* L.) is a fruit originating in the Middle East, containing seeds surrounded by a translucent reddish pulp enriched with phenolic compounds, especially anthocyanins. Besides these compounds potential benefits to health, they are also responsible for the characteristic color of the products from pomegranate juice, which has been considered the quality parameter that most influences the sensory acceptability by consumers. Pomegranate increased cultivation in Brazil has promoted the emergence of technologies capable of providing greater application of the fruit and its health beneficial compounds. In this context, this work aimed to evaluate the use of microfiltration, reverse osmosis and microencapsulation by spray drying processes with pomegranate juice, by studying the preservation of anthocyanin in the generated products. Encapsulating agent formulation containing the modified starch (Capsul<sup>®</sup>): gum Arabic (1:1) was considered the best anthocyanin retention after spray drying process, been able to retain 70% of total anthocyanins from the feedstock. It was observed a loss of 18% of total anthocyanins after microfiltration process and a concentration factor of 2.3 for these compounds after reverse osmosis process. Standards isolation and the improvement of analytical procedures for High Performance Liquid Chromatography analysis of monomeric anthocyanins allowed a precise monitoring of the process streams. Also, anthocyanin stability was evaluated in the obtained products, and after 2 months of evaluation it was observed no significant difference of total anthocyanins content of clarified juice, and 11% of loss for the concentrated juice. For the microcapsules, it was observed a loss of 40% of total anthocyanins after 4 months of evaluation. Regarding to color retention, it was observed, in general, the maintenance of the evaluated parameters, mainly  $h^\circ$  (hue angle) for the 3 products. This work could confirm the potential of the evaluated processing techniques in order to obtain different products derived from pomegranate juice with high retention of anthocyanins and color stability.

Keywords: Anthocyanins. Microencapsulation. Microfiltration. Reverse osmosis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 – Estrutura básica dos flavonoides	20
Figura 3.2 – Cátion flavilium	22
Figura 3.3 – Estruturas químicas das antocianinas	22
Figura 3.4 – Estrutura do ácido elágico	24
Figura 3.5 – Estrutura da punicalagina	25
Figura 3.6 – Romãzeira	26
Figura 3.7 – Fruto da romã	27
Figura 3.8 – Produtos derivados da romã	28
Figura 3.9 – Estrutura das antocianinas presentes no fruto da romã	29
Figura 3.10 – Comparação entre suco de romã e outras bebidas quanto ao teor de compostos fenólicos e à atividade antioxidante	30
Figura 3.11 - Esquema ilustrativo de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência	32
Figura 3.12 – Esquema ilustrativo de um espectrômetro de massas	35
Figura 3.13 – Esquema de permeação por membranas	36
Figura 3.14 – Figura representativa de um <i>spray dryer</i>	39
Figura 3.15 – Bico atomizador	39
Figura 4.1– Frutos de romã oriundos da Fazenda Boa Fruta	44
Figura 4.2 – Caracterização físico-química da matéria-prima	45
Figura 4.3 – Despulpamento da romã	48
Figura 4.4 – Malha de 150µm utilizada na etapa de filtração	48
Figura 4.5 – Fluxograma representativo das etapas dos processos para obtenção de produtos a partir do suco de romã	49
Figura 4.6 – <i>Spray dryer</i> da marca Buchii, modelo B190	50
Figura 4.7 – Sobreposição dos cromatogramas da análise de antocianinas das matrizes selecionadas como fontes de padrão	56

Figura 4.8 – Esquema de funcionamento da válvula seletora de colunas	57
Figura 4.9 – Espectrômetro de massa de alta resolução Waters Synapt®	59
Figura 4.10 – Microcápsulas acondicionadas para estudo de estabilidade	61
Figura 4.11 – Sucos acondicionadas para estudo de estabilidade	62
Figura 5.1 – Entupimento das membranas do sistema de microfiltração ocasionado pela passagem do suco integral de romã	67
Figura 5.2 – Efeito do tratamento enzimático sobre a viscosidade do suco de romã: T= 35 °C e taxa de deformação = 100 s <sup>-1</sup>	67
Figura 5.3 – Influência da temperatura sobre a viscosidade do suco de romã. Taxa de deformação = 100s <sup>-1</sup>	69
Figura 5.4 – Influência da taxa de deformação sobre a viscosidade do suco de romã filtrado	70
Figura 5.5 – Torta obtida durante etapa de filtração do suco de romã integral	71
Figura 5.6 – Produto em pó obtido a partir do processo de microencapsulação do suco de romã em spray dryer	72
Figura 5.7 – Comportamento do fluxo permeado e evolução do fator de redução volumétrica (FRV) durante o processamento, por microfiltração, do suco de romã, previamente submetido à filtração em malha de 150 µm	73
Figura 5.8 – A: Processo de microfiltração do suco de romã; B: Frações do processo de microfiltração do suco de romã: alimentação, retido e permeado (suco clarificado)	74
Figura 5.9 – Evolução do teor de sólidos solúveis e comportamento do fluxo de permeado durante o processamento, por osmose inversa, do suco de romã microfiltrado	75
Figura 5.10 – Evolução do teor de sólidos solúveis e comportamento do fluxo de permeado durante o processamento, por osmose inversa, do suco de romã microfiltrado	76
Figura 5.11 – Evolução do teor de sólidos solúveis e comportamento do fluxo de permeado durante o processamento, por osmose inversa, do suco de romã microfiltrado	76
Figura 5.12 – Cromatograma da análise de açúcares do retido do processo de osmose inversa do suco de romã (pico 1: frutose; pico 2: glicose).	78
Figura 5.13 – Cromatograma da análise de vitamina C do suco de romã integral (pico 1: vitamina C)	78
Figura 5.14 – Espectro de absorção de UV/Vis a 243 nm do pico de vitamina C detectado no suco de romã integral	79

Figura 5.15 – Cromatograma do padrão analítico comercial de vitamina C	79
Figura 5.16 – Espectro de absorção de UV/Vis a 243 nm do padrão analítico comercial de vitamina C	79
Figura 5.17 – I: Cromatograma obtido do padrão comercial de punicalagina (picos 1 e 2: isômeros da punicalgina). II: Espectro de absorção UV/Visível a 260 nm (em vermelho: espectro do pico 1; em azul: espectro do pico 2).	80
Figura 5.18 – Cromatograma obtido do padrão comercial de ácido elágico. II: Espectro de absorção UV/Visível a 260nm	81
Figura 5.19 – I:Cromatograma obtido do extrato do suco de romã integral a 260 nm (picos 1 e 2: isômeros da punicalagina; pico 3: ácido elágico livre). II: Espectro de absorção UV/Visível dos isômeros de punicalagina e ácido elágico a 260 nm (em vermelho: espectro do pico 1; em azul: espectro do pico 2; em verde: espectro do pico 3)	81
Figura 5.20 – Cromatograma da análise de antocianinas do suco de romã, com metodologia convencional	83
Figura 5.21 – Cromatograma da análise de antocianinas do suco de romã, com metodologia modificada	83
Figura 5.22 – Cromatograma da análise de antocianinas do suco de romã (pico 1: delphinidina 3,5 – diglicosídeo; pico 2: cianidina 3,5 – diglicosídeo; delphinidina 3 – glicosídeo; pico 4: pelargonidina 3,5 – diglicosídeo; pico 5: cianidina 3 – glicosídeo; pico 6: pelargonidina 3 – glicosídeo)	84
Figura 5.23 – Cromatograma e espectro UV/Vis a 520 nm da delphinidina-3,5-diglicosídeo isolada do fruto de jambolão (Pureza = 98%)	85
Figura 5.24 – Cromatograma e espectro UV/Vis a 520 nm da cianidina-3,5-diglicosídeo isolada do fruto de jambolão (Pureza = 99,2%)	86
Figura 5.25 – Cromatograma e espectro UV/Vis a 520 nm da delphinidina-3-glicosídeo isolada do fruto de jabuticaba (Pureza = 98%)	86
Figura 5.26 – Cromatograma e espectro UV/Vis a 520 nm da pelargonidina-3,5-diglicosídeo isolada da flor de romã (Pureza = 99,1%)	86
Figura 5.27 – Cromatograma e espectro UV/Vis a 520 nm da cianidina-3-glicosídeo isolada do fruto de amora-preta (Pureza = 99,6%)	87
Figura 5.28 – Cromatograma e espectro UV/Vis a 520 nm da pelargonidina-3-glicosídeo isolada do fruto de morango (Pureza = 99,9%)	87

- Figura 5.29 – Esquerda: arilos de frutos de romã do segundo lote com baixa concentração de antocianinas ( $5,45 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ). Direita: arilos dos frutos do primeiro lote com maior concentração de antocianinas ( $28,31 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ) 91
- Figura 5.30 – Gráfico de Pareto mostrando a influência dos agentes encapsulantes na retenção da antocianina delfinidina-3,5-diglicosídeo 98
- Figura 5.31 – Diagrama de mistura ternária mostrando a influência dos agentes encapsulantes na retenção da antocianina delfinidina-3,5-diglicosídeo 99
- Figura 5.32 – Estabilidade das microcápsulas de romã por 4 meses 100
- Figura 5.33 – Estudo de estabilidade do suco de romã clarificado por microfiltração conduzido por 2 meses 101
- Figura 5.34 – Estabilidade do suco de romã concentrado por osmose inversa conduzido por dois meses 103

## LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 – Planejamento experimental para análise de viscosidade do suco de romã	46
Tabela 4.2 – Planejamento de mistura utilizado para preparo do material encapsulante	51
Tabela 4.3 – Gradiente de eluição utilizado para análise de punicalagina e ácido elágico	54
Tabela 4.4 – Condições cromatográficas	54
Tabela 4.5 - Gradiente de eluição usado para análise de antocianinas-método modificado	55
Tabela 4.6 – Matrizes utilizadas como fontes de antocianinas	56
Tabela 4.7 – Gradiente de eluição utilizado para coleta das frações de interesse	58
Tabela 4.8 – Absorção máxima ( $\lambda$ ), solução específica e absortividade molar de cada antocianina da romã	60
Tabela 5.1– Parâmetros físico-químicos dos frutos de romã	65
Tabela 5.2 – Balanço de massa da etapa de despulpamento da romã	66
Tabela 5.3 – Parâmetros da Equação de Arrhenius para o suco de romã filtrado	69
Tabela 5.4 – Parâmetros do modelo da Lei da Potência em função da temperatura para o suco de romã filtrado	70
Tabela 5.5 – Balanço de massa da etapa de filtração em malha do suco	71
Tabela 5.6 – Balanço de massa da etapa de microfiltração do suco de romã filtrado em malha de 150 $\mu\text{m}$	73
Tabela 5.7 – Balanço de massa da etapa de osmose inversa do suco de romã	74
Tabela 5.8 – Concentração em $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ de açúcares nas correntes dos processos de microfiltração e osmose inversa	77
Tabela 5.9 – Concentração em $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ de isômeros de punicalagina e ácido elágico no suco de romã integral	82
Tabela 5.10 – Comparação dos impactos entre os métodos de análise de antocianinas em Romã	84
Tabela 5.11 – Identificação das antocianinas isoladas por espectrometria de massa	88
Tabela 5.12 – Concentração dos padrões isolados	89
Tabela 5.13 – Dados das curvas analíticas	89

Tabela 5.14 - Concentração em $\text{mg.100g}^{-1}$ de antocianinas nos sucos integrais de romã	90
Tabela 5.15 – Concentração em $\text{mg.100}^{-1}$ g de antocianinas na torta da filtração	92
Tabela 5.16 – Concentração em $\text{mg.100g}^{-1}$ de antocianinas totais nas frações dos processos de MF e OI	92
Tabela 5.17 – Massa total de antocianina (g) nas diferentes correntes dos processos de separação em membrana - Balanço de massa	94
Tabela 5.18 – Concentração em $\text{mg.100g}^{-1}$ de antocianinas no suco integral e nos produtos em pó obtidos por spray drying nas formulações testadas (base seca)	95
Tabela 5.19 – Variação da concentração de antocianinas totais ( $\text{mg.100g}^{-1}$ ) das microcápsulas de romã em função do tempo de armazenamento	100
Tabela 5.20 – Variação da concentração de antocianinas totais ( $\text{mg.100g}^{-1}$ ) do suco clarificado de romã ao longo do estudo de estabilidade	101
Tabela 5.21 – Variação da concentração de antocianinas totais ( $\text{mg.100g}^{-1}$ ) do suco concentrado de romã ao longo do estudo de estabilidade	102
Tabela 5.22 – Parâmetros de cor (média $\pm$ desvio padrão) observados durante o armazenamento sob diferentes condições das microcápsulas, sucos clarificado e concentrado de romã	104
Tabela 5.23 – Avaliação microbiológica durante estudo de estabilidade das microcápsulas, dos sucos clarificado e concentrado de romã	109

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>19</b>
<b>3.1</b>	<b>Compostos Fenólicos</b>	<b>19</b>
3.1.1	Flavonoides	19
	<b>Figura 3.1. Estrutura básica dos flavonoides</b>	<b>20</b>
3.1.1.1	Antocianinas	20
3.1.2	Ácido elágico	24
3.1.3	Punicalagina	24
<b>3.2</b>	<b>Romã</b>	<b>25</b>
3.2.1	Romãzeira	25
3.2.2	Fruto	26
3.2.3	Caracterização do fruto	27
3.2.4	Benefícios à saúde	30
<b>3.3</b>	<b>Procedimentos analíticos</b>	<b>31</b>
3.3.1	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	31
3.3.2	Espectrometria de Massa	34
3.3.3	Isolamento de padrões analíticos	35
<b>3.4</b>	<b>Processos de separação por membrana</b>	<b>35</b>
<b>3.5</b>	<b>Processo de secagem por <i>spray drying</i></b>	<b>38</b>
<b>3.6</b>	<b>Processo de microencapsulação</b>	<b>40</b>
3.6.1	Métodos de microencapsulação	40
3.6.2	Agentes encapsulantes	41
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>44</b>
<b>4.1</b>	<b>Matéria-prima</b>	<b>44</b>
<b>4.2</b>	<b>Solventes e reagentes</b>	<b>44</b>
<b>4.3</b>	<b>Caracterização físico-química</b>	<b>45</b>
4.3.1	Sólidos solúveis em <sup>o</sup> Brix	45
4.3.2	pH	45
4.3.3	Acidez total	45
4.3.4	Composição centesimal	45
<b>4.4</b>	<b>Processamento</b>	<b>46</b>
4.4.1	Avaliação de pré-tratamento para o suco de romã	46
4.4.1.1	Tratamento matemático dos dados	47
4.4.2	Despolpamento da romã	47
4.4.3	Filtração em malha	48
4.4.4	Processos de microfiltração e concentração em membranas e de secagem por <i>spray drying</i>	48
4.4.4.1	Microencapsulação por <i>spray drying</i>	49
4.4.4.1.1	Avaliação da influência dos agentes encapsulantes	50
4.4.4.2	Microfiltração (MF)	51
4.4.4.3	Osiose Inversa (OI)	52
<b>4.5</b>	<b>Etapa analítica</b>	<b>52</b>
4.5.1	Análise de açúcares por CLAE	52
4.5.2	Análise de ácido ascórbico por CLAE	53



4.5.3	Análise de punicalagina e ácido elágico por CLAE	53
4.5.4	Modificação do método cromatográfico para análise de antocianinas	54
4.5.5	Caracterização das antocianinas do suco de romã	55
4.5.6	Obtenção dos padrões de antocianinas	55
4.5.6.1	Isolamento das antocianinas por CLAE	57
4.5.6.2	Concentração das antocianinas isoladas	58
4.5.6.3	Confirmação por espectrometria de massas	58
4.5.6.4	Cálculo da concentração dos padrões	59
4.5.6.5	Elaboração das curvas analíticas	60
4.5.7	Análise das antocianinas por CLAE	60
<b>4.6</b>	<b>Avaliação estatística</b>	<b>61</b>
<b>4.7</b>	<b>Avaliação da estabilidade dos produtos obtidos</b>	<b>61</b>
4.7.1	Estabilidade das antocianinas	62
4.7.2	Estabilidade da cor	62
4.7.3	Estabilidade microbiológica	63
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>64</b>
<b>5.1</b>	<b>Caracterização físico-química</b>	<b>64</b>
<b>5.2</b>	<b>Processamento</b>	<b>66</b>
5.2.1	Despolpamento da romã	66
5.2.2	Avaliação de pré-tratamento para o suco de romã	66
5.2.2.1	Filtração em malha	71
5.2.3	Microencapsulação do suco de romã por spray drying	71
5.2.4	Microfiltração (MF)	72
5.2.5	Osmose Inversa (OI)	74
<b>5.3</b>	<b>Técnicas analíticas</b>	<b>76</b>
5.3.1	Análise de açúcares por CLAE	76
5.3.2	Análise de ácido ascórbico por CLAE	78
5.3.3	Análise de punicalagina e ácido elágico por CLAE	80
5.3.4	Modificação do método cromatográfico para a análise de antocianinas	82
5.3.5	Identificação das antocianinas da romã	84
5.3.6	Obtenção dos padrões de antocianinas	85
5.3.6.1	Isolamento das antocianinas por CLAE	85
5.3.6.2	Confirmação por espectrometria de massas	87
5.3.6.3	Cálculo da concentração dos padrões	88
5.3.6.4	Elaboração das curvas analíticas	89
5.3.7	Análise das antocianinas do suco de romã por CLAE	90
5.3.8	Perfil de antocianinas nas correntes do processo de filtração em malha	91
5.3.9	Perfil de antocianinas nas correntes dos processos de separação em membrana	92
5.3.10	Perfil de antocianinas das microcápsulas	94
<b>5.4</b>	<b>Avaliação da estabilidade dos produtos obtidos</b>	<b>99</b>
5.4.1	Estabilidade das antocianinas	99
5.4.1.1	Microcápsulas	99
5.4.1.2	Suco clarificado (microfiltrado)	101
5.4.1.3	Suco concentrado	102
5.4.2	Estabilidade da cor	103
5.4.3	Estabilidade microbiológica	107
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>110</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>112</b>
<b>ANEXO 1</b>		<b>135</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A Região Nordeste, mediante a participação dos seus pólos irrigados, é a principal região produtora e exportadora de frutas tropicais frescas do Brasil. Nessa região, estão os quatro maiores estados produtores e exportadores de frutas frescas do Brasil em 2009: Bahia, Pernambuco, Ceará e Rio Grande do Norte, todos exportando acima de cem milhões de dólares anualmente. A região possui mais de 300.000 ha irrigados, cultivados, principalmente, com as culturas da mangueira, videira, bananeira, cajueiro, citrus, coqueiro, goiabeira, aceroleira, meloeiro, melancia, cebola, tomateiro, dentre outras. Pesquisas realizadas na Embrapa Semiárido têm revelado que existe a possibilidade de cultivo de espécies de climas tropical úmido, subtropical e temperada, com potencial econômico para as áreas irrigadas da região. As condições edafoclimáticas da região têm sido capazes de assegurar o bom desempenho agrônomo de diferentes espécies vegetais. Culturas de novas fruteiras que possam trazer divisas à região constituem uma ação estratégica de política pública do Governo Federal, no intuito de promover a diversificação da produção, aumentar a eficiência das propriedades e atender os anseios dos pequenos, médios e grandes produtores dos perímetros irrigados do Nordeste.

A romã (*Punica granatum* L.) é uma fruta originária do Oriente Médio e cresce em regiões de clima árido. É uma fruta com uma longa história medicinal, amplamente utilizada por muitos povos, principalmente os orientais. A fruta apresenta sementes revestidas por uma polpa avermelhada onde estão presentes compostos fenólicos, principalmente as antocianinas.

A cultura da romãzeira despertou o interesse de produtores da região do semiárido brasileiro devido às propriedades que a fruta apresenta, como a elevada concentração de substâncias bioativas. Assim, a Embrapa Semiárido importou cultivares de romãzeiras dos Estados Unidos e da Turquia com o objetivo de avaliar sua adaptabilidade à região.

Os plantios de romã atualmente existentes na região do semiárido são oriundos de pomares de produtores que têm interesse na cultura, porém de cultivares não identificadas que apresentam muitos problemas por ataque de pragas que danificam os frutos diminuindo a qualidade dos mesmos. Faz-se também necessário o desenvolvimento de pesquisas para um manejo mais adequado e também de técnicas de aproveitamento e de agregação de valor à cultura, uma vez que somente parte dos frutos é próprio para comercialização na forma fresca devido às perdas no campo. Considerando a presença de substâncias bioativas nos frutos das

romãzeiras, novas tecnologias para seu beneficiamento são importantes de forma a complementar os avanços a respeito desta cultura.

A cultura da romãzeira apresenta também um grande apelo comercial mundial, devido ao aumento da demanda por frutas *in natura* e produtos com propriedades funcionais. Da romã, a polpa é utilizada para preparação de sucos e concentrados, conhecidos mundialmente por suas características antioxidantes, a semente para extração de óleos e a casca para a produção de extratos contendo compostos fenólicos, que apresentam propriedades antifúngicas e antibacterianas, dentre outras. No setor de cosméticos, vários produtos novos formulados à base da romã estão sendo comercializados por tradicionais fabricantes.

O mercado para sucos com elevados teores de vitaminas e outras características funcionais apresenta um potencial de expansão, e tem motivado o desenvolvimento de processos que preservem as principais características da fruta no produto final. Do ponto de vista das propriedades funcionais fisiológicas, esses alimentos têm sido recomendados devido ao alto teor de vitamina C, carotenoides, compostos fenólicos, entre outros compostos, os quais pela ação antioxidante reduzem os efeitos adversos produzidos pelo excesso de radicais livres no organismo, protegendo contra o estresse oxidativo. A agregação de valor a determinadas culturas de frutas através de seu processamento tem sido muito estudada com o objetivo de disponibilizar produtos diferenciados, que minimizem a perda de suas propriedades originais ou, ainda, concentrando seus componentes bioativos, principalmente os antioxidantes.

As antocianinas, importantes antioxidantes naturais com grande destaque na composição do fruto, além das propriedades potencialmente benéficas à saúde, são também responsáveis pela coloração dos produtos obtidos a partir do suco de romã, sendo este um dos parâmetros de qualidade que mais influenciam na aceitação sensorial pelos consumidores.

Neste trabalho foram avaliados os processos de microfiltração, osmose inversa e microencapsulação por *spray drying* do suco de romã em relação à influência na concentração de antocianinas dos produtos finais obtidos, com o objetivo de se disponibilizar alternativas de agregação de valor à cultura da romãzeira no Brasil, já que o fruto apresenta propriedades potencialmente benéficas a saúde.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar os processos de microfiltração, osmose inversa e microencapsulação por *spray drying* do suco de romã em relação à preservação de antocianinas.

Objetivos específicos:

- Identificar e quantificar compostos fenólicos presentes na matéria-prima pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Isolar antocianinas por CLAE com confirmação por Espectrometria de Massas de Alta Resolução para obtenção de padrões analíticos;
- Avaliar os processos de microfiltração e osmose inversa para obtenção de sucos clarificado e concentrado de romã, respectivamente;
- Avaliar processo de secagem por *spray drying* com diferentes agentes encapsulantes para a obtenção de microcápsulas a partir do suco de romã;
- Identificar e quantificar por CLAE as antocianinas presentes nos sucos clarificado e concentrado de romã, bem como nas microcápsulas obtidas por *spray drying*;
- Avaliar a estabilidade das antocianinas presentes nas correntes de interesse dos processos de separação por membrana e nas microcápsulas;
- Acompanhar a estabilidade microbiológica e da cor dos produtos obtidos nos três processos avaliados.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Compostos Fenólicos

Não só nutrientes essenciais necessários à vida são fornecidos pelos alimentos, mas também compostos benéficos à saúde que podem reduzir o risco de desenvolvimento de determinadas doenças. Os compostos fenólicos, dentre outros, são exemplos destes compostos que apresentam propriedades antioxidantes, anti-inflamatória e hipocolesterolêmica, possuindo assim potencial para promover a saúde, principalmente no combate aos radicais livres (GONÇALVES, 2008; FISHER et al., 2011).

Os compostos fenólicos de origem natural são produtos secundários do metabolismo de vegetais e alguns têm como função a proteção da planta contra condições adversas e contribuem para as características de adstringência, cor e sabor e sua estabilidade oxidativa (NACZK e SHAHIDI, 2004).

A presença de tais compostos na dieta pode auxiliar a minimizar a deficiência do nosso sistema endógeno de defesa em relação à prevenção, proteção ou redução dos efeitos causados por estresse oxidativo (HUANG, OU e PRIOR, 2005; PIETTA, 2000).

Os compostos fenólicos são muito utilizados como flavorizantes e corantes na indústria alimentícia e na de cosméticos (PROENÇA DA CUNHA, SILVA e ROQUE, 2003). Estes compostos incluem diversidade de estruturas simples e complexas, com pelo menos um anel aromático no qual ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila (SIMÕES et al., 2001).

Os três maiores grupos de fenólicos da dieta são os flavonoides, os ácidos fenólicos e os taninos (NACZK e SHAHIDI, 2004).

##### 3.1.1 Flavonoides

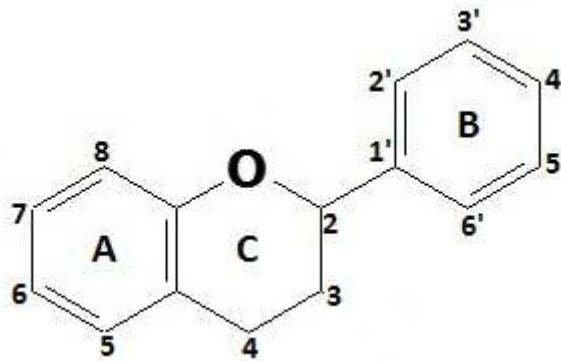
Dentre os compostos fenólicos de maior interesse para a saúde, os flavonoides destacam-se por apresentarem como efeitos a redução do risco de desenvolvimento de várias doenças, como as cardiovasculares e o câncer (WALLE, 2004).

Pode-se atribuir a atividade antioxidante dos flavonoides a sua capacidade de sequestrar radicais livres, atuando como doadores de hidrogênio, e quelar metais, reduzindo o potencial de ocorrência de doenças crônico-degenerativas (GONZALO e ALONSO, 2002).

Uma diversidade de estudos *in vitro* tem mostrado que os flavonoides podem inibir e, às vezes, induzir uma grande variedade de enzimas, envolvidas em etapas diversas de

processos reguladores como divisão e proliferação celular, agregação plaquetária, atuação da resposta inflamatória e imune do organismo humano, etc. (PINTO, 2008).

Os flavonoides apresentam uma estrutura básica comum composta por dois anéis aromáticos ligados por três carbonos e um átomo de oxigênio (Figura 3.1). O grau de oxidação e o padrão de substituição do anel C determinam as classes de flavonoides e dentro destas o padrão de substituição nos anéis A e B definem os compostos específicos (RHODES, 1996).



**Figura 3.1.** Estrutura básica dos flavonoides

Dentre as subclasses de flavonoides 6 são os grupos que se incluem na dieta humana. Estes são denominados por flavanóis, flavonóis, flavonas, antocianinas, isoflavonoides e flavononas (MARTÍNEZ-FLORES, 2002; YILMAZ e TOLEDO, 2004).

### 3.1.1.1 Antocianinas

As antocianinas, subclasse dos flavonoides, formam o maior grupo de pigmentos hidrossolúveis na natureza. Elas estão presentes em diversos vegetais, podendo ser encontrada em todas as partes da planta, e em maior concentração nas flores e frutos. São responsáveis pelo atrativo espectro de cor que varia do vermelho ao azul, apresentando-se também como uma mistura de ambas as cores resultando em tons de púrpura (BROUILLARD, 1982; DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004).

Devido as suas propriedades antioxidantes as antocianinas possuem importante papel na redução do risco de várias doenças crônicas não transmissíveis (DOWNHAM e COLLINS, 2000; MARTÍNEZ-FLORES, 2002; KUSKOSKI et al., 2004).

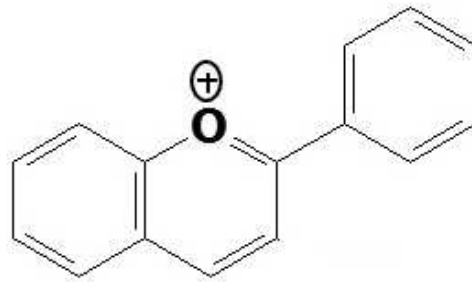
Nos Estados Unidos, as antocianinas são de interesse nutricional uma vez que a dose diária de ingestão recomendada para as mesmas é de 180 a 215 mg.dia<sup>-1</sup>, o que é muito maior do que a recomendada (23 mg.dia<sup>-1</sup>) para outros flavonoides, incluindo a quercetina, kaempferol, miricetina, entre outros (GALVANO et al., 2004).

Atualmente observa-se um crescente interesse no uso de antocianinas em diversos segmentos, dentre os quais se destacam as indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética, onde podem ser aplicadas, por exemplo, como corantes, principalmente corantes vermelhos, que são os corantes naturais mais difíceis de encontrar na natureza em forma estável (FAVARO, 2008).

A síntese artificial de antocianinas é um processo complexo e de alto custo. Em geral, a obtenção desses compostos envolve sua extração a partir de espécies vegetais, principalmente frutas, nas quais o teor de antocianinas é mais alto. O custo de comercialização de antocianinas isoladas e quimicamente puras é muito alto (um miligrama de antocianina pode custar mais de 1.000 dólares). Portanto, é necessário expandir as possibilidades de sua obtenção em larga escala, a partir de fontes naturais de forma sustentável, para viabilizar o desenvolvimento de suas aplicações, com grandes benefícios para a sociedade (CANAL CIÊNCIA, 2011).

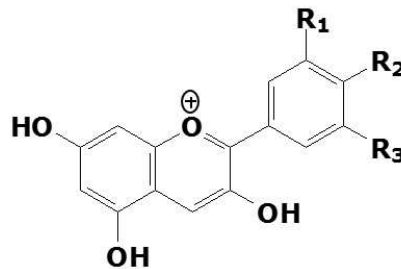
Quanto a sua estabilidade, sabe-se que durante o armazenamento, as antocianinas podem sofrer modificações devido à sensibilidade à elevadas temperaturas, oxigênio, luz e ação enzimática (JACKMAN et al., 1987; FRANCIS, 1989).

Na natureza, as antocianinas ocorrem glicosiladas, sendo as agliconas conhecidas como antocianidinas, cuja forma básica é a do cátion flavilium (Figura 3.2) (MALACRIDA e MOTTA, 2006). Além do grupo de açúcares, a molécula de antocianina pode vir, frequentemente, ligada a um grupo de ácidos orgânicos e outros substituintes.



**Figura 3.2.** Cátion flavilium

As antocianinas encontradas em alimentos são todas derivadas das agliconas pertencentes aos seguintes pigmentos básicos: malvidina, delphinidina, petunidina, peonidina, cianidina e pelargonidina, as quais diferem entre si quanto ao número de hidroxilas e ao grau de metoxilas presentes no anel B (LIMA et al., 2006) (Figura 3.3). A formação do glicosídeo e a maior presença de grupos OCH<sub>3</sub> conferem, em geral, cor mais avermelhada e maior estabilidade à oxidação e ao calor do que o aumento das hidroxilações, que por sua vez proporcionam predomínio das cores rosa e azul (BELITZ, GROSCH e SCHIEBERLE, 2004).



Antocianidina	R1	R2	R3	MW
Pelargonidina - Pg	H	OH	H	271
Cianidina - Cy	OH	OH	H	287
Delfinidina - Dp	OH	OH	OH	303
Peonidina - Pn	OMe	OH	H	301
Petunidina - Pt	OMe	OH	OH	317
Malvidina - Mv	OMe	OH	OMe	331

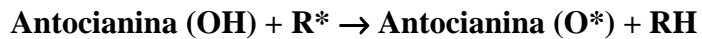
**Figura 3.3.** Estrutura química das antocianinas

A glicosilação pelos açúcares glicose, arabinose, xilose, galactose, ramnose, rutinose e sambubiose podem ocorrer nas posições 3 e 5, enquanto a acilação se dá através da esterificação da hidroxila dos açúcares (MALACRIDA e MOTTA, 2006).

As antocianinas podem prevenir danos causados pelos radicais livres através de vários mecanismos, como por exemplo, o carregamento direto do radical livre. As antocianinas são



oxidadas pelos radicais, resultando em um radical menos reativo. Em outras palavras, as antocianinas estabilizam as espécies reativas de oxigênio através de sua reação com o componente reativo do radical. O alto poder de reação do grupo hidroxil das antocianinas com o radical torna-o inativo (NIJVELDT, 2001). Esta reação pode ser observada na representação abaixo:



onde:  $\text{R}^*$  = radical livre e  $\text{O}^*$  = radical livre de oxigênio.

Este mecanismo ilustra a importância dos grupos hidroxilas para a elevada capacidade antioxidante das antocianinas, como por exemplo, das delphinidinas e cianidinas (KUSKOSKI et al., 2004).

As antocianinas apresentam cores diferentes dependendo do pH do meio em que se encontram. Formam soluções incolores ou coloridas, podendo ser vermelha, violeta, azul ou amarela (TERCI e ROSSI, 2002). Esta possibilidade de mudança de coloração é considerada uma das desvantagens das antocianinas quando comparadas aos corantes sintéticos (ANDERSEN, CABRITA e FOSSEN, 1998).

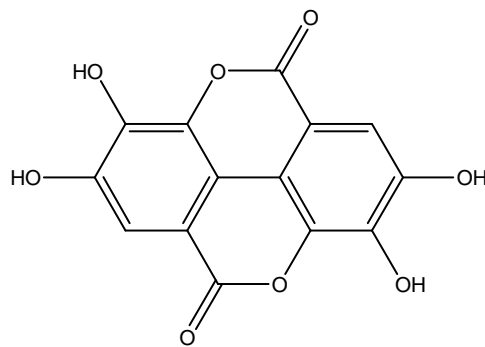
Segundo Xavier (2004), em soluções aquosas, as antocianinas se encontram comumente na forma de uma mistura de diferentes estruturas químicas em equilíbrio: cátion flavilium (vermelho), base anidra quinoidal (azul), pseudo-base carbitol (incolor), e chalcona (incolor ou levemente amarela). Em pH abaixo de 2, as antocianinas apresentam-se basicamente na forma catiônica; com o aumento do pH, ocorre uma rápida desprotonação para formar a base quinoidal. Em meio aquoso a hidratação do cátion flavilium leva ao equilíbrio entre a forma carbitol e chalcona. A temperatura ambiente e em meio levemente acidificado, o equilíbrio entre as formas carbitol e chalcona é muito lento e leva horas para ser atingido. O aumento da temperatura desloca o equilíbrio na direção da formação da base chalcona (HEREDIA et al., 1998).

O meio ácido faz com que o cátion flavilium não seja desprotonado, preservando assim a estrutura. Em pH mais alto ocorre a desprotonação das antocianinas e com isso o oxigênio fica mais reativo ficando mais fácil de ocorrer associação com outra molécula, o que pode dar origem às antocianinas poliméricas.

### 3.1.2 Ácido elágico

O ácido elágico (Figura 3.4) é um composto fenólico de baixo peso molecular que pode ser encontrado em algumas frutas e castanhas. Pode estar presente em matrizes como romã (*Punica granatum* L.), morango (*Fragaria ananassa*), framboesa (*Rubus fruticosus*), avelã (*Coryllus avelana*), entre outras (DANIEL et al., 1989; CLIFFORD e SCALBERT, 2000).

O ácido elágico, o qual corresponde a uma dilactona de ácido gálico, pode ocorrer na forma livre, glicosilada, ou ligado como elagitaninos, esterificado com glicose.

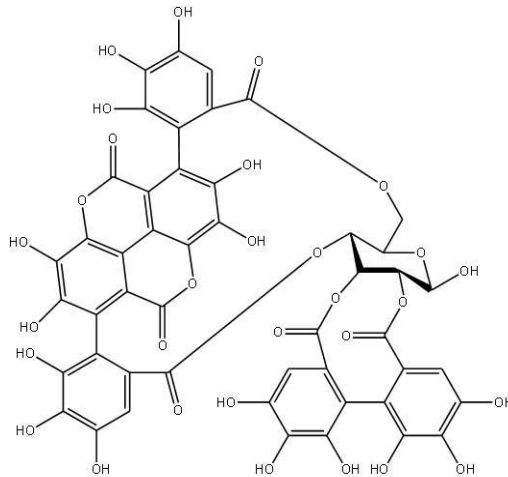


**Figura 3.4.** Estrutura do ácido elágico

É conhecido que os teores de ácido elágico livre costumam ser baixos nos frutos, sendo detectadas quantidades maiores quando ocorre a hidrólise dos extratos, havendo a quebra dos elagitaninos presentes (BEATTIE, CROZIER, DUTHIE, 2005). Deve-se levar em consideração que no fruto ou vegetal in natura, o ácido elágico é mais facilmente encontrado na forma de derivados hidrossolúveis (elagitaninos), enquanto em alimentos processados/armazenados, grande parte do ácido pode se encontrar na forma livre (insolúvel) (PINTO,2008).

### 3.1.3 Punicalagina

A punicalagina (Figura 3.5) é um polifenol, sendo classificada como tanino hidrolisável (elagitanino) de alto peso molecular, com reconhecidas atividades antioxidante e antiinflamatória, se destacando como uma promissora molécula com várias funções benéficas à saúde (GONZÁLEZ-MOLINA, MORENO e GARCÍA-VIGUERA, 2009).



**Figura 3.5.** Estrutura da punicalagina

Os taninos, como a punicalagina, representam a classe predominante de substâncias bioativas da romã, se concentrando em maior parte na casca e no mesocarpo do fruto (FISHER et al., 2011).

A complexação entre taninos e proteínas é a base para suas propriedades como fatores de controle de insetos, fungos e bactérias tanto quanto para suas atividades farmacológicas (SIMÕES et al., 2001).

É encontrada em diferentes espécies de plantas, estando presente em grande quantidade no fruto da romã, onde é encontrada nas formas alfa e beta. Sua molécula pode ser hidrolisada em polifenóis menores, com a liberação do grupo hexahidroxidifênico (HHDP) que rapidamente sofre lactonização, formando o ácido elágico. Possui alta biodisponibilidade, e uma taxa de absorção de 95% (PINTO, 2008; TYAGI et al., 2012).

Um estudo em Taiwan mostrou que a punicalagina pode atuar como um forte supressor do câncer, sendo este um grande benefício para a saúde humana (SEERAN, LEE e HEBER, 2004; LARROSA et al., 2006).

## 3.2 Romã

### 3.2.1 Romãzeira

A romãzeira (*Punica granatum* L.) (Figura 3.6) é um arbusto lenhoso, ramificado, da família Punicaceae, apresentando folhas pequenas, rijas, brilhantes e membranáceas, flores vermelho-alaranjadas dispostas nas extremidades dos ramos, originando frutos esféricos, com muitas sementes angulosas em camadas as quais se acham envolvidas em arilo polposo (LORENZI e SOUZA, 2001).



**Figura 3.6.** Romãzeira. Fonte: <http://www.compojardineria.es/es/pt/plant-guide/plants/Romazeira.html>

A cultura da romãzeira remete à antiguidade, sendo considerada uma árvore frutífera bíblica, como a videira, a oliveira e a palmeira. É uma árvore frutífera muito interessante para muitas áreas do mundo, especialmente para as regiões áridas e semi-áridas, devido principalmente as suas propriedades benéficas à saúde. Atualmente, seu cultivo encontra-se distribuído por países como Espanha, Estados Unidos, Irã, Turquia, Índia, Israel, China e países da costa norte da África, entre outros. A Espanha tem sido o mais importante produtor na Europa (SÁNCHEZ e BARRACHINA, 2013).

A Embrapa importou cultivares de romãzeiras dos Estados Unidos e da Turquia, com o objetivo de avaliar sua adaptabilidade ao semiárido brasileiro. A empresa estuda a adaptação desta cultura no país, à procura de frutas que proporcionem a obtenção de produtos de alto valor agregado.

### 3.2.2 *Fruto*

O fruto da romãzeira (Figura 3.7) é formado por uma baga globosa, do tamanho de uma laranja pequena, de casca coriácea, amarela ou avermelhada manchada de escuro, com inúmeras sementes angulosas, cobertas por tegumento espesso, polposo, de sabor doce ligeiramente ácido (GOMES, 2007).



**Figura 3.7.** Fruto da romã

O fruto pode ainda ser consumido na forma fresca, como bebidas (sucos e vinhos) e na forma de outros produtos (JAISWAL, DERMARDEROSIAN e PORTER, 2010) (Figura 3.8).



Foto: Raphael Santos

**Figura 3.8.** Produtos derivados da romã

### 3.2.3 Caracterização do fruto

Santos et al. (2010) realizaram a caracterização físico-química da polpa de romã, sendo os resultados reportados no quadro 3.1.

**Quadro 3.1.** Caracterização físico-química da polpa de romã (SANTOS et al., 2010)

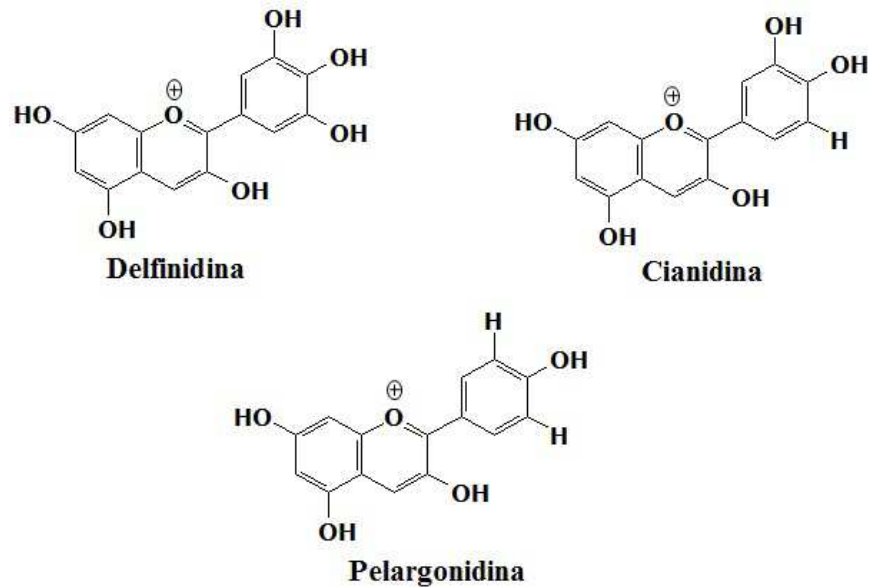
Análises	Média
SST ( $^{\circ}$ Brix)	12,89 $\pm$ 0,00
pH	3,54 $\pm$ 0,02
Umidade (g.100g <sup>-1</sup> )	73,93 $\pm$ 0,52
Glicose (g.100g <sup>-1</sup> )	2,67 $\pm$ 1,39
Sacarose (g.100g <sup>-1</sup> )	ND
Amido (g.100g <sup>-1</sup> )	ND
Cinzas (%)	0,46 $\pm$ 0,01
Ferro (mg.100g <sup>-1</sup> )	1,08 $\pm$ 0,14
Fibras (g.100g <sup>-1</sup> )	2,43 $\pm$ 0,07
Pectina (g.100g <sup>-1</sup> )	0,84 $\pm$ 0,19
Gordura (g.100g <sup>-1</sup> )	10,53 $\pm$ 0,93
Proteína (%)	1,48 $\pm$ 0,25
Vitamina C	ND

ND.: não detectado

Segundo Al-Maiman e Ahmad (2002), as características físicas e físico-químicas do fruto da romã são influenciadas diretamente pelo processo de maturação, o que justifica a variação existente na coloração, tamanho e até mesmo teor de determinados compostos presentes no mesmo.

Investigações sobre os componentes químicos (principalmente os compostos fenólicos) e sua atividade biológica em todas as partes da romã, incluindo folhas, sementes, suco e casca, estão despertando o interesse tanto do ponto de vista de saúde como econômico (GIL et al., 2000; SINGH, CHIDAMBARA MURTHY e JAYAPRAKASHA, 2002; LANSKY e NEWMAN, 2007).

A romã possui alta concentração de flavonoides e polifenóis, os quais apresentam atividades antioxidante, antiviral e antitumoral (TYAGI, 2012). A fruta apresenta em sua composição compostos fenólicos como: antocianinas (delfinidina, cianidina e pelargonidina) (Figura 3.9), ácidos fenólicos e taninos (JARDINI e FILHO, 2007). Dentre os ácidos fenólicos, o ácido elágico é um dos mais encontrados na romã (QU, BRESKA e PAN, 2012).

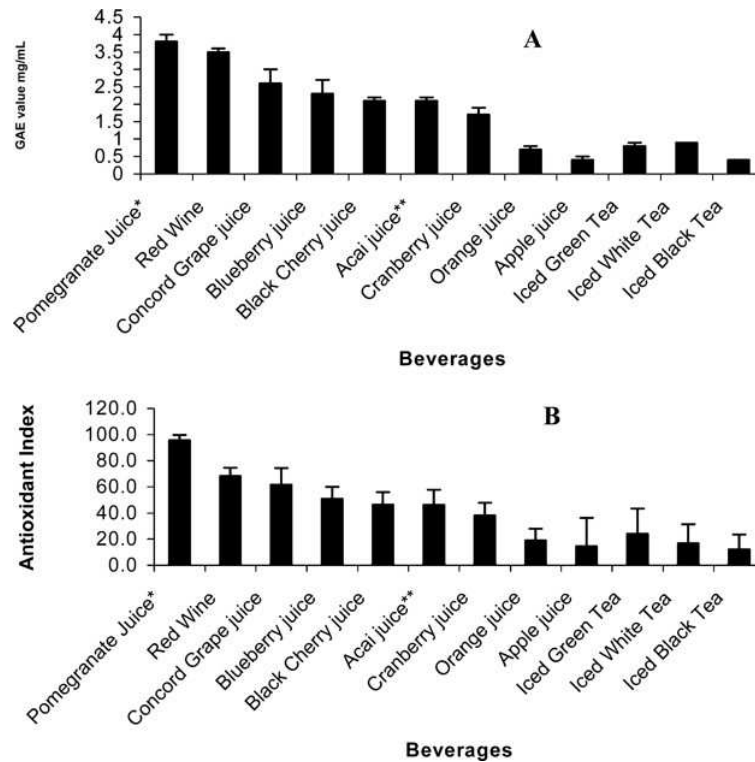


**Figura 3.9.** Estrutura das antocianinas presentes no fruto da romã

As antocianinas têm grande destaque na composição do fruto, pois além de atuarem como um dos mais importantes antioxidantes naturais, elas são as responsáveis pela intensa coloração vermelha do suco de romã obtido dos arilos, a qual é um dos parâmetros de qualidade que mais influenciam na aceitação sensorial pelos consumidores (ALIGHOURCHI e BARZEGAR, 2009; BOROCHOV-NEORI et al., 2009; GIL et al., 2000; PATRAS et al., 2010).

As antocianinas são consideradas instáveis e susceptíveis à degradação, levando ao aparecimento de coloração marrom durante o processamento e o armazenamento de produtos onde as mesmas estejam presentes. A deterioração da cor em sucos de frutas contendo antocianinas ocorre como resultado da degradação de antocianinas monoméricas, polimerização das mesmas e subsequente formação da cor marrom. Esta alteração na cor afeta fortemente a aceitação pelos consumidores e resulta na perda de mercado de produtos processados de romã (TURFAN et al., 2011) Diante destes fatos, a avaliação e compreensão do comportamento do perfil de antocianinas nos produtos derivados de romã tem sido objeto de estudos científicos (SOMERS e EVANS, 1986).

Seeram et al. (2008) compararam o suco de romã com outras bebidas ricas em compostos antioxidantes consumidas nos Estados Unidos e observaram que o mesmo apresentou maior concentração de compostos fenólicos (em ácido gálico equivalente), bem como maior atividade antioxidante do que os outros produtos avaliados (Figura 3.10).



**Figura 3.10.** Comparação entre suco de romã e outras bebidas quanto ao teor de compostos fenólicos e à atividade antioxidante (SEERAM et al., 2008).

Os polifenóis representam a classe predominante de fitoquímicos da romã, consistindo principalmente nos taninos, como a punicalagina, os quais se concentram em maior parte na casca e no mesocarpo do fruto (FISCHER et al., 2011).

Gil et al. (2000) atribuíram a elevada atividade antioxidante do suco comercial de romã à presença de taninos, os quais têm sua presença no suco diretamente ligada ao modo de extração do mesmo. Quanto mais frações do mesocarpo passarem para o suco, maior será a concentração de taninos do mesmo, porém mais diluída será sua cor e possivelmente maior sabor amargo será conferido à bebida (VARDIN e FENERCIOĞLU, 2003).

### 3.2.4 Benefícios à saúde

O fruto da romã tem uma longa história medicinal, amplamente utilizada por muitos povos, principalmente os orientais. Nos últimos anos tem havido um renovado interesse mundial sobre os benefícios funcionais deste fruto (SUMNER et al., 2005).

O estudo dos componentes bioativos de romã e seus efeitos sobre a melhoria da saúde humana é um campo de pesquisa muito oportuno e interessante. Provou-se por numerosos estudos científicos que tanto a romã e os seus derivados contêm componentes que podem ser usados para a prevenção de doenças e manutenção da saúde (LARROSA et al., 2006;



SARTIPPOUR et al., 2008; KOYAMA et al., 2010), apresentando influência sobre fatores biológicos, como a atenuação de fatores arterogênicos (AVIRAN et al., 2000;), modulação das respostas antiinflamatórias (ROSS, SELVASUBRAMANIAN e JAYASUNDAR, 2001) e de enzimas do sistema de defesa antioxidante endógeno (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase) (AJAIKUMAR et al., 2005).

Os flavonóides extraídos do suco fermentado e do óleo da semente de romã apresentaram atividade inibitória de enzimas oxidantes (SCHUBERT, LANSKY e NEEMAN, 1999; CATÃO, 2006; TAUFNER, FERRAÇO e RIBEIRO, 2006).

Através de pesquisas sobre a indução de atividade tumoral por substâncias carcinogênicas em epiderme de ratos, Afaq et al. (2003) observaram que a aplicação tópica de extratos da romã funcionava como agente anti-tumoral.

Além da atividade antioxidante, atividades antibacteriana e antifúngica também já foram observadas para o fruto da romã. Anesini e Perez (1993), avaliando 132 extratos de plantas usadas na medicina popular em atividades antimicrobianas, observaram que extratos do pericarpo do fruto da romã inibiram o crescimento de *S. aureus* (amostras resistentes à penicilina G), *E. coli* e *Aspergillus niger*.

Vasconcelos et al. (2003) avaliaram a capacidade antifúngica de um gel contendo extrato de romã (do fruto íntegro) na infecção por cândida associada à estomatite pelo uso de dentadura, comprovada em exames clínicos e microbiológicos. Concluíram que o extrato pode ser usado como agente antifúngico tópico.

### **3.3 Procedimentos analíticos**

O uso de um sistema cromatográfico, de um espectrômetro de massas ou, ainda, o acoplamento dos dois, consiste em técnicas analíticas precisas e específicas para identificação e quantificação de diferentes tipos de compostos (BARRABIN, 2012).

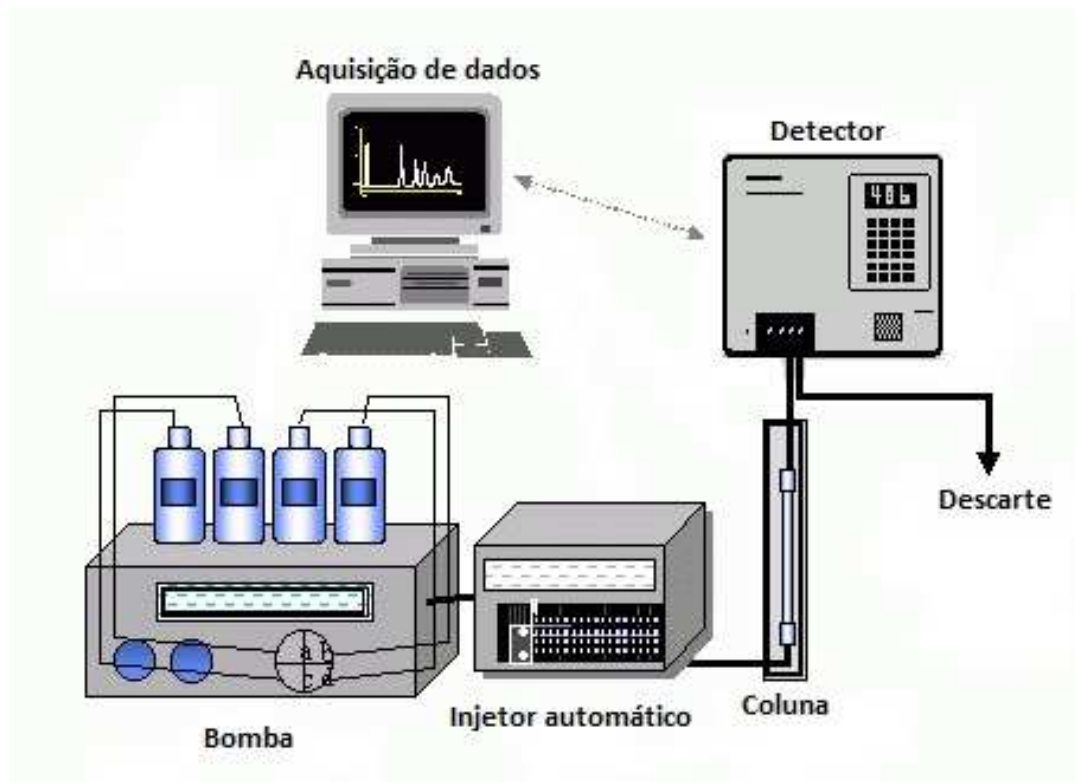
#### *3.3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)*

O perfil de compostos fenólicos é distinto para diferentes frutas, podendo ainda sofrer alterações de acordo com as variedades analisadas e ainda com as condições de cultivo, podendo estas últimas interferir na produção de tais compostos por parte da planta. Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa acoplada a um detector de arranjo de diodos (DAD) e com o uso de padrões analíticos tem sido a ferramenta mais usada ultimamente para a identificação de tais compostos.

Autores como Brito et al. (2007) têm utilizado esta técnica para identificação de compostos fenólicos em frutos até então não caracterizados, o que certamente auxilia na busca por fontes de compostos bioativos potencialmente benéficos à saúde humana.

A cromatografia é um método contemporâneo que ganhou relevância por volta de 1903, com o botânico Mikhail Semenovitch Tswett, o qual foi considerado o pai da cromatografia moderna, devido aos vários trabalhos experimentais que realizou, principalmente na separação de diversos pigmentos corados presentes em extratos de plantas por adsorção diferencial em colunas de vidro (ETTRE, 2000).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica de alta precisão, eficiência e sensibilidade, a qual utiliza os princípios da cromatografia líquida clássica em equipamentos. Um sistema de CLAE é composto por um reservatório de solvente, uma bomba, um injetor (manual ou automático), uma coluna, um detector e um computador para aquisição e processamento de dados (ROSA, 2005) (Figura 3.11).



**Figura 3.11.** Esquema ilustrativo de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência. Fonte – com adaptações: <https://mundodababsi.wordpress.com/category/controle-de-qualidade/>

Na cromatografia líquida de alta eficiência as colunas são constituídas por material inerte, na maioria das vezes aço inoxidável, com diâmetro interno uniforme e resistente às altas pressões em que serão utilizadas. Na cromatografia líquida de fase reversa, as colunas utilizadas são aquelas que possuem grupos funcionais apolares ( $C_8$ ,  $C_{18}$  e  $C_{30}$ ) quimicamente ligados ao suporte de sílica (ROSA, 2005).

Os detectores mais utilizados em CLAE são os detectores de absorvância de radiação ultra-violeta. Neles a fase móvel que elui da coluna passa através de uma pequena célula que é mantida no caminho de um feixe de radiação UV-Visível, sendo a radiação não absorvida medida em um dispositivo denominado fotodiodo (SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 1997).

Nos detectores de arranjo de fotodiodos a radiação policromática após passar através da amostra é dispersa por uma grade fixa (monocromadores), atingindo o arranjo de fotodiodos (de 512 a 1024 diodos). Cada diodo mede uma banda estreita de comprimento de onda no espectro, dessa forma o DAD tem uma aquisição de dados paralela, todos os pontos do espectro sendo medidos simultaneamente. Estes detectores têm maior sensibilidade uma vez que possibilitam a alta absorvância para vários componentes devido à escolha de comprimentos de onda diferenciados. Desta mesma forma, também são considerados seletivos, já que um determinado comprimento de onda onde o analito de interesse absorve mais que os outros pode ser escolhido. A habilidade de fazer medidas de múltiplos comprimentos de onda e a alta velocidade de aquisição significa que várias técnicas de amostragem de sinal podem ser usadas para reduzir o ruído e aumentar a sensibilidade (SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 1997). Outro ponto importante do uso do detector de arranjo de fotodiodos é que através da aquisição de espectros do componente puro e de possíveis impurezas, ou seja, da possibilidade de se realizar uma varredura, torna-se viável avaliar a pureza de cada pico (HARBONE, 1993).

Muitos dos avanços da cromatografia líquida foram alcançados pelo desenvolvimento de novas partículas de fases estacionárias que fossem capazes de gerar colunas mais seletivas, eficientes e estáveis. No início da cromatografia líquida, em 1950, eram utilizadas colunas recheadas com partículas irregulares de 100-200  $\mu\text{m}$  que alcançavam eficiência de apenas 200 pratos/15cm. Na década de 60, surgiram colunas com partículas de 40-50  $\mu\text{m}$ , alcançando 1000 pratos/15cm. Nos anos 70 surgiram as partículas com diâmetros de aproximadamente 10 $\mu\text{m}$ , possibilitando que as separações alcançassem a eficiência de 6000 pratos/15cm. Nos anos 80 foram introduzidas partículas de 3,3-5  $\mu\text{m}$  e finalmente, no ano de 1996, as primeiras partículas de 1,6  $\mu\text{m}$  com eficiências superiores a 22000pratos/15cm. Com o passar dos anos os cientistas passaram a buscar o desenvolvimento de partículas de formato esférico, que

devido ao menor tamanho, tendem a formar um leito cromatográfico mais compacto e homogêneo, permitindo enchimentos mais reprodutíveis. Após 50 anos de desenvolvimento, surgiram as partículas esféricas porosas de 2,5  $\mu\text{m}$  com as quais são obtidas colunas com eficiência de 25000 pratos/15cm. Nestas colunas os enchimentos também são reprodutíveis e as análises são mais rápidas devido à concomitante diminuição dos tamanhos das colunas (MALDANER; JARDIM, 2009).

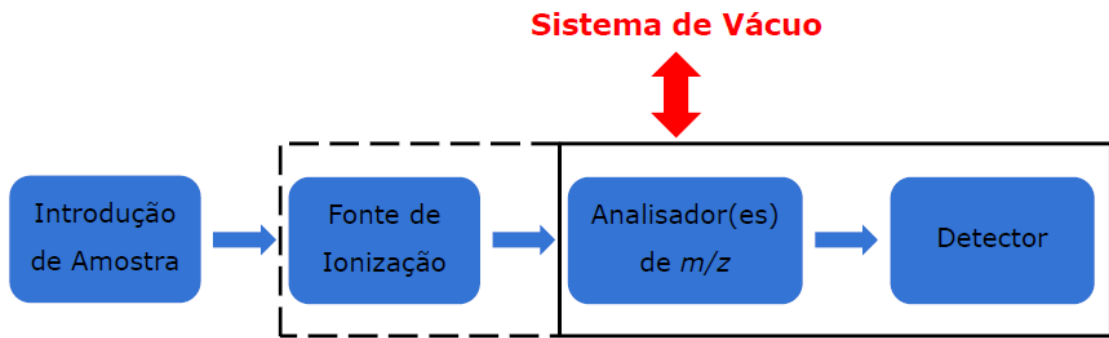
A redução do tamanho da partícula com maior empacotamento da coluna resulta em um grande aumento na pressão, a qual mesmo com a redução do tamanho da coluna, continua elevada e incompatível com um sistema convencional de CLAE. Para tornar possível o uso de colunas empacotadas com partículas menores que 2  $\mu\text{m}$ , uma vez que a atual instrumentação disponível para CLAE não era projetada para trabalhar nas pressões alcançadas, um novo equipamento foi lançado em 2004 pela empresa Waters capaz de suportar pressões de até 15000 psi, tendo sido denominado de *Acquity® ultra performance liquid chromatography system* (UPLC™). Em português o termo foi traduzido como Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE) (BARRABIN, 2012).

### 3.3.2 *Espectrometria de Massa*

Na espectrometria de massas a solução contendo o composto de interesse é injetada em um espectrômetro (injeção direta) ou através de um cromatógrafo acoplado ao mesmo, sendo primeiramente ionizado. Os íons formados são separados na base da razão massa/carga ( $m/z$ ) e o número de íons que corresponde a cada “unidade” de massa/carga é registrado na forma de um espectro (ABDELNUR, 2010).

Um espectrômetro de massas (Figura 3.12) consiste em três principais setores:

- Fonte de íons ou câmara de ionização: onde ocorre a formação de íons em fase gasosa, a partir de amostras sólidas, líquidas ou gasosas, dependendo da forma de inserção da amostra. Como exemplos de métodos de ionização podem ser citadas a ionização por elétrons e a ionização química.
- Analisador de íons: onde ocorre separação de íons de acordo com sua relação massa/carga ( $m/z$ ). Exemplos de analisadores de massas: setor magnético, quadrupolo, *iontrap* e tempo de voo.
- Detector: tem a função de capturar e amplificar o sinal da corrente de íons que são ejetados do analisador e transferir o sinal para o sistema de processamento de dados. Exemplos: fotomultiplicador, multiplicador de elétrons.



**Figura 3.12.** Esquema ilustrativo de um espectrômetro de massas.

### 3.3.3 Isolamento de padrões analíticos

A maior dificuldade na análise por CLAE é a obtenção de padrões analíticos confiáveis, sendo estes a maior fonte de erros analíticos, influenciando diretamente no resultado final obtido (KIMURA e RODRIGUEZ-AMAYA, 2002).

A aquisição de padrões analíticos de alta pureza geralmente depende de importação e possui elevado custo. Além disso, em alguns casos, as substâncias não se encontram disponíveis comercialmente (PACHECO et al., 2013).

A cromatografia em coluna aberta é considerada como uma técnica alternativa para o isolamento de substâncias em uma quantidade relativamente alta, as quais podem posteriormente ser usadas como padrões analíticos (PACHECO, 2009).

Campos (2006) isolou antocianinas presentes em extrato de jamelão previamente purificado pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência. As frações foram coletadas manualmente diretamente do cromatógrafo para tubos de ensaio, sendo em seguida realizadas leituras de absorvância em espectrofotômetro a 517 nm. Após este procedimento, as frações foram mantidas por aproximadamente 4 horas em evaporador para eliminação do solvente.

Gouvêa et al. (2012) também realizaram o isolamento das antocianinas presentes no açaí por CLAE, com o uso de válvula seletora de canais acoplada à saída do detector, como coletor de frações. Com este procedimento foi possível obter padrões analíticos das antocianinas cianidina-3-glicosídeo e cianidina-3-rutenosídeo com pureza maior do que 95%.

## 3.4 Processos de separação por membrana

Os processos com membranas são aplicados nos mais diferentes setores industriais, para as operações de separação, purificação ou concentração. Esta tecnologia apresenta-se adequada para aplicações específicas, nas quais os métodos convencionais de separação se mostram ineficientes, gerando grande quantidade de efluentes e/ou custo operacional elevado.

O rigor imposto pelas regulamentações ambientais nas últimas décadas também contribuiu de forma positiva para o crescente uso da tecnologia de separação por membranas. Neste sentido, a utilização de membranas possibilita redução dos desperdícios e aumento nas oportunidades de recuperação e reciclagem de substâncias, além da possibilidade de separação de compostos termolábeis (HABERT, BORGES e NÓBREGA, 2006).

Uma membrana (Figura 3.13) pode ser definida como uma barreira que separa duas fases e que restringe, total ou parcialmente, o transporte de uma ou várias espécies químicas presentes (CHERYAN, 1986; NOBLE, 1993).

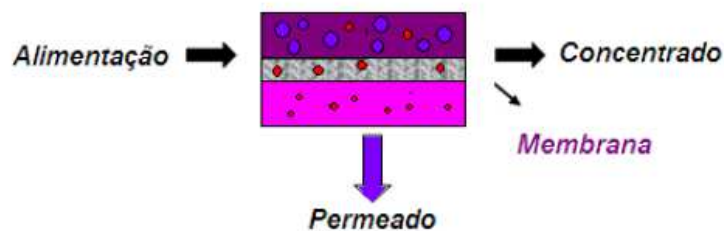


Figura 3.13. Esquema de permeação por membranas (GOUVÊA, 2010)

A classificação das membranas pode ser feita a partir das suas características morfológicas como, por exemplo, a presença ou ausência de poros, o tamanho dos mesmos e o grau de simetria; a partir de características químicas associadas ao material que a constitui e, ainda, de acordo com a forma e tipo de módulo em que estão inseridas (MULDER, 1991). O tipo de força motriz utilizado e a composição da membrana definem os diferentes processos: microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração, diálise, osmose inversa, evaporação osmótica, pervaporação, permeação de gases (PORTER, 1990).

Os modelos matemáticos visando relacionar a força motriz com o fluxo permeado são importantes para se entender os mecanismos de separação envolvidos nos processos com membranas. A força motriz pode ser a diferença ou gradiente de pressão hidrostática, de pressão parcial, de concentração e de potencial elétrico (LOPES et al., 2007; MATEUS, SANTOS e CABRAL, 1993). Nos processos que utilizam a diferença de pressão como força motriz o fluxo permeado ( $J_p$ ) é diretamente proporcional à diferença de pressão efetiva ( $\Delta P$ ).

Os processos de micro, ultra e nanofiltração utilizam membranas porosas cuja seletividade é caracterizada pela diferença de tamanho entre as moléculas da solução e os poros da membrana; promovendo, então, um fluxo convectivo com escoamento do permeado por entre os poros. Estes processos diferem entre si pelo tamanho dos poros, que diminuem da microfiltração para a nanofiltração (0,6  $\mu\text{m}$  para 100 Da) aumentando a resistência à

permeação e, conseqüentemente, a diferença de pressão aplicada (CRUZ, 2008). No processo de osmose inversa (OI) são utilizadas membranas densas onde os poros quase inexistem, sendo a força motriz a diferença de pressão para o transporte de massa (MUDLER, 1991).

O decréscimo no fluxo de filtrado ou permeado é um dos principais fatores limitantes nestes processos de separação. Tal situação pode estar associada a fenômenos como a polarização por concentração, adsorção e bloqueio de poros. Estes fenômenos podem ser minimizados através de pré-tratamentos que promovam uma diminuição dos sólidos em suspensão presentes na polpa como a centrifugação, tratamento enzimático ou refino, ou ainda através de alterações das condições de processamento (CRUZ, 2008; LOPES et al., 2007).

O fato do uso de membranas possibilitar uma maior preservação de compostos termolábeis vai de encontro à demanda dos atuais consumidores por alimentos industrializados e com a qualidade nutricional próxima à dos alimentos não processados. Os sucos de frutas tropicais atendem a esses requisitos, por serem ricos em vitaminas, sais minerais, açúcares e substâncias antioxidantes, além de proporcionarem sabor e aroma agradáveis. Assim, é necessário que as técnicas de processamento e conservação adotadas para elaboração de sucos sejam eficazes em alterar o menos possível as características originais das frutas (CIANCI et al., 2005).

Segundo Paula et al. (2002), a maior aplicação da tecnologia de membranas na indústria de suco de frutas é voltada para a obtenção de sucos de frutas clarificados por meio da remoção de celulose, hemicelulose e pectinas, por microfiltração ou ultrafiltração. As substâncias responsáveis pela turbidez do suco são retidas pela membrana, e o produto permeado é o suco clarificado. Estes processos vêm sendo testados com sucesso, como uma alternativa à clarificação enzimática, que em geral necessita de duas etapas de filtração, além de necessitar de grandes quantidades de auxiliares de filtração, o que aumenta o custo do processo e contribui para o aumento de efluentes tóxicos.

Durante a microfiltração de sucos de polpa de frutas, o aumento da resistência à passagem do fluído pela membrana, pode ser resultante tanto da diminuição da porosidade (entupimento, adsorção) quanto da polarização de concentração e formação de camada gel na superfície da membrana. Este fenômeno pode ser causado por pectinas, taninos, proteínas, amido, hemicelulose e celulose (PREVENTING, 2001, CARNEIRO et al., 2002; CRUZ, 2008).

### 3.5 Processo de secagem por *spray drying*

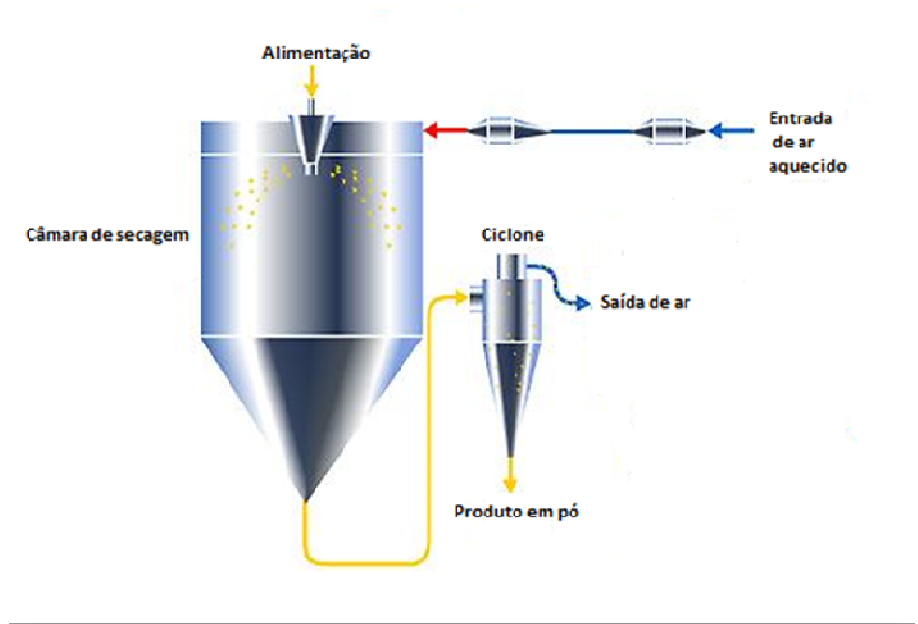
A secagem por *spray drying* ou atomização consiste na transformação de um produto no estado fluído para o estado sólido em forma de pó, através da dispersão de gotículas do material dentro de uma câmara, em contato com uma corrente de ar quente (MASTERS, 1979). O material a ser desidratado pode estar na forma de solução ou suspensão e o produto é obtido na forma de partículas isoladas, grânulos ou aglomerados. Estas formas dependem das propriedades físicas e químicas do material, do projeto e operação do secador. A secagem por *spray drying* fornece um produto versátil e seguro com características adequadas para diferentes aplicações (NOGUEIRA, 2002).

Este tipo de processo teve seu início em 1865, quando foi patenteada a primeira operação de secagem de ovos. Sua utilização em escala industrial se deu a partir da década de 20, onde os primeiros produtos a serem obtidos em larga escala foram o leite e o sabão em pó (ROSA et al., 2006).

A secagem por *spray drying* é muito utilizada nas indústrias alimentícia e farmacêutica, apresentando grande versatilidade operacional, onde o baixo tempo de residência dos produtos na câmara de secagem, torna este processo um dos mais indicados para secagem de materiais termo sensíveis. Outro fato que corrobora a importância deste processo para produtos sensíveis ao calor, é que durante a secagem, a temperatura na superfície externa do material é inferior à temperatura do ar de secagem (RÉ, 1998). Isto ocorre devido ao fato da água remover calor latente da superfície sólida das gotículas para mudança de fase (evaporação) mantendo a mesma na temperatura de equilíbrio termodinâmico (temperatura de bulbo úmido).

Um sistema de secagem por *spray drying* é composto por um atomizador para transformar o líquido em uma névoa, um aquecedor ou uma fonte de ar quente, uma câmara de secagem onde ocorre a mistura da névoa com o ar e um separador que permite recuperar os sólidos secos (Figuras 3.14 e 3.15) (ROSA et al., 2006)





**Figura 3.14.** Figura representativa de um *spray dryer*. Fonte – com adaptações: <http://blogs.lt.vt.edu/fstpilotplant/2013/10/08/spray-drying-lab/>



**Figura 3.15.** Bico atomizador. Fonte: <http://imk209.wikispaces.com/CJW--+Chapter+4>

A qualidade dos produtos obtidos por este processo de secagem depende das características do atomizador e da transferência de calor e massa entre o ar aquecido e as gotículas na câmara de secagem. O líquido é disperso usando-se um atomizador de alta pressão ou força centrífuga. Para aumentar a área superficial e expor as gotículas de pequeno diâmetro ao contato direto com o ar aquecido a altas temperaturas. Em geral, o tamanho das partículas do líquido atomizado situa-se entre 10 a 200  $\mu\text{m}$  e o tempo de secagem entre 5 a 30 segundos (FURUTA, HAYASHY e OHASHI, 1994). Nonhebel e Moss (1971) citam tamanho de partículas na faixa de 1 a 300  $\mu\text{m}$ , e quando o produto está na forma de esferas ocas, a densidade é baixa. Furuta et al. (1994) afirmam que o incremento na área superficial do material a ser atomizado aumenta com o aumento da vazão do ar de secagem e que o

diâmetro das partículas desidratadas em *spray dryer* é afetado pelas condições termodinâmicas da fase gás.

Embora a tecnologia de secagem por *spray drying* necessite de investimentos de capital mais elevados, quando comparado a outras tecnologias de secagem, a facilidade de operação em modo contínuo, a capacidade de processar diversos tipos de matérias-primas e a qualidade do produto final, levaram à ampla adoção desta tecnologia em grande escala (WENDEL e ÇELIK, 1998).

Atualmente, empresas fornecedoras de equipamentos de secagem por *spray drying* têm se comprometido com o aumento a eficiência e redução do custo operacional do processo. O mercado destes secadores mostra uma tendência em se utilizar equipamentos mais eficientes e que ocupem menos espaço, tornando a construção dos mesmos menos dispendiosa. Empresas como a *GEA Process Engineering* têm se comprometido em desenvolver projetos capazes de reduzir em 50% o tamanho dos *spray dryers*, mantendo a capacidade, tempo de operação e qualidade do produto final (ULLUM, 2014).

### **3.6 Processo de microencapsulação**

#### *3.6.1 Métodos de microencapsulação*

A microencapsulação é um processo de empacotamento de materiais sólidos, líquidos ou gasosos em cápsulas, na faixa micrométrica, as quais podem liberar o conteúdo de forma controlada sob condições específicas. É descrita como uma técnica em que um composto ativo é encapsulado por um polímero a fim de melhorar a sua estabilidade e também para facilitar sua manipulação. Trata-se de uma tecnologia que tem sido empregada com êxito na indústria de cosméticos, farmacêutica, alimentícia e química. Várias técnicas podem ser empregadas na elaboração de microcápsulas, tais como: *spray drying*, *spray cooling*, coacervação, extrusão, extrusão centrífuga, recobrimento em leito fluidizado, lipossomas e complexação por inclusão. A transformação de um material em microcápsulas tem solucionado limitações no emprego de ingredientes alimentícios, visto que pode suprimir ou atenuar *flavors* indesejáveis, reduzir a volatilidade e a reatividade e aumentar a estabilidade destes em condições ambientais adversas, como na presença de luz, oxigênio e pH extremos (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007; FAVARO-TRINDADE, PINHO e ROCHA, 2008).

A romã é uma fruta com elevada concentração de compostos fenólicos que podem ser utilizados como ingredientes ativos em diferentes aplicações na indústria alimentícia. No

entanto, estes compostos podem se degradar quando expostos ao oxigênio ou mesmo à luz. A estabilização de tais compostos para utilização em fins industriais pode ser melhorada utilizando-se as técnicas de microencapsulação (DESAI e PARK, 2005).

Há uma tendência mundial que aponta para a necessidade de que os alimentos não sejam mais somente vistos como uma fonte de nutrientes com apelo sensorial, mas também como fonte de bem-estar e de saúde para os indivíduos. Esta mudança de perspectiva requer mudanças de paradigma no desenvolvimento de novos produtos, observando-se a necessidade do controle da bioacessibilidade de determinados componentes dos alimentos. Esta abordagem se tornou ainda mais relevante a partir das correlações entre genética, alimentação e saúde. A microencapsulação tem sido uma técnica efetiva para se alcançar tais objetivos, onde o componente ativo fica protegido em uma microcápsula e pode ser liberado sob condições controladas.

No caso particular da microencapsulação de sucos de frutas pelo processo de *spray drying*, o elevado teor de açúcares das matrizes pode levar à obtenção de produtos com elevada viscosidade e higroscopicidade, diminuindo o rendimento do processo (BHANDARI, DATTA e HOWES, 1997). A solução mais comum para reduzir esta dificuldade é a adição de formulações com materiais de parede antes de atomização para facilitar o processo de secagem, o transporte e o armazenamento do pó obtido (BHANDARI BHANDARI, DATTA e HOWES, 1997; JAYA e DAS, 2005; TONON et al., 2009).

### 3.6.2 Agentes encapsulantes

No processo de microencapsulação por *spray drying* pequenas gotas de material líquido ou partículas sólidas (material ativo ou núcleo) são recobertas com um fino filme protetor (material de parede ou agente encapsulante).

Os agentes encapsulantes com elevada massa molar são úteis para aumentar a temperatura de transição vítrea dos produtos, visando evitar problemas causados pela viscosidade, como a retenção do material nas paredes da câmara de secagem (TONON et al., 2010).

Dentre os materiais recobertos pelos agentes carreadores estão também as moléculas de carboidratos, ocorrendo assim a inibição ou redução da ação indesejável dessas substâncias durante o processo de secagem (SHEU e ROSENBERG, 1995).

Para corresponder às funções de recobrimento, um agente encapsulante deve ter boas propriedades emulsificantes, formar facilmente a película envolvente; ter baixa viscosidade em altas concentrações de sólidos; apresentar baixa higroscopicidade; ser de fácil

reconstituição do componente microencapsulado, ser econômico, de sabor leve e de fácil obtenção. Na maioria das vezes, um mesmo encapsulante não engloba todas essas propriedades, usando-se então combinações desses para a obtenção dos resultados desejados (NOGUEIRA, 2002).

A escolha do material de parede para secagem por *spray drying* é muito importante para a eficiência do processo de microencapsulação. Os agentes mais utilizados são goma arábica, amidos hidrolisados (maltodextrinas), amidos modificados entre outros. Alguns fatores como custo, disponibilidade e qualidade podem restringir o uso da goma arábica para fins de microencapsulação, porém é um agente com melhor estabilidade e eficiência de recobrimento. Uma área de pesquisa de interesse crescente é o desenvolvimento de polímeros de baixo custo ou de misturas de polímeros, que possam encapsular materiais com igual ou maior eficiência que a goma arábica (KANAKDANDE, BHOSALE e SINGHAL, 2007).

Goma é o nome genérico dado a uma classe de extratos, ocorrendo em diferentes espécies vegetais. A goma arábica, extraída da *Acacia senegal*, é a mais conhecida e utilizada das gomas. Esta goma é um polissacarídeo com quantidades variáveis de D-galactose, L-arabinose, L-ramnose e múltiplas glicoproteínas, sendo produzida somente em países africanos, principalmente no Sudão (CEINFO, 2013).

De acordo com Charve e Reineccius (2009) a goma arábica é geralmente usada como material de parede para a formulação de líquidos para a microencapsulação por processo de secagem por pulverização, uma vez que apresenta algumas características, tais como elevada solubilidade, baixa viscosidade e boas propriedades emulsificantes que tornam esta substância um bom agente encapsulante. É habitualmente utilizada em combinação com outros materiais de parede, como o amido hidrolisado ou modificado com o intuito de promover a melhor resposta na retenção das moléculas de interesse (BHANDARI et al., 1997; KENYON e ANDERSON, 1988; REINECCIUS, 1991).

As maltodextrinas [(C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>)<sub>n</sub>.H<sub>2</sub>O], segundo a Food and Drug Administration são polímeros sacarídeos nutritivos, não doces que consistem de unidades D-glicose unidas por ligações α (1,4) e que tem dextrose equivalente (DE) menor que 20. Apresentam-se como um produto em pó branco ou solução concentrada pela hidrólise parcial do amido de milho com ácidos ou enzimas. Aromatizantes microencapsulados com este material resultam em produtos de escoamento livre; uma propriedade importante é que a higroscopicidade aumenta com o aumento da DE (KENYON e ANDERSON, 1988).

A maltodextrina é muito utilizada na microencapsulação de ingredientes alimentícios oferecendo vantagens como baixo custo, aroma e sabor neutro e baixa viscosidade em altas

concentrações de sólidos (AVALTRONI et al., 2004; JAFARI, ASSADPOOR e BHANDARI, 2008). A maltodextrina não apresenta propriedade emulsificante, uma vez que é apenas um material de parede hidrofílico. Considerando este fato, pesquisas foram realizadas para modificar quimicamente amidos, incorporando grupos lipofílicos (REINECCIUS, 1991).

Nos Estados Unidos, a *National Starch and Chemical Corporation* desenvolveu um amido modificado chamado Capsul<sup>®</sup>, a partir de modificação enzimática de amido de milho ceroso. A modificação consistiu em acrescentar um componente lipofílico (succinato de octanil) ao amido, o que aumenta nas formulações onde o mesmo é utilizado a capacidade e estabilidade de emulsões (ABURTO, TAVARES, MARTUCI, 1998; RUAN et al., 2009; WANG et al., 2011).

O amido modificado pela adição de um componente lipofílico tem se mostrado uma alternativa ao uso de goma arábica, por custar aproximadamente três vezes menos, ser usado em menor quantidade e ter maior disponibilidade comercial (ABURTO, TAVARES, MARTUCI, 1998; FINOTELLI, 2002).

O amido modificado proporciona excelente retenção de componentes voláteis durante a secagem por atomização e pode ser usado com alta concentração de sólidos aumentando menos a viscosidade que a goma arábica. O uso da goma é geralmente limitado em 35% da concentração de sólidos do alimento, enquanto que os amidos modificados podem ser usados em concentrações de até 50% (REINECCIUS, 1991).

De acordo com King, Trubiano e Perry (1976) os amidos modificados têm capacidade para formar misturas com baixa consistência evitando a aglomeração e formação de película antes da secagem por atomização.

É possível observar que quando o objetivo do processo é ter maior preservação de compostos específicos, além de uma elevada eficiência de secagem, recomenda-se avaliar outros agentes e selecionar aquele que responde melhor às especificações do produto.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Matéria-prima

Os frutos de romã (Figura 4.1) foram fornecidos pela Fazenda Boa Fruta (localizada em Petrolina/PE). Foram utilizados dois lotes de frutos do mesmo produtor para execução dos estudos.



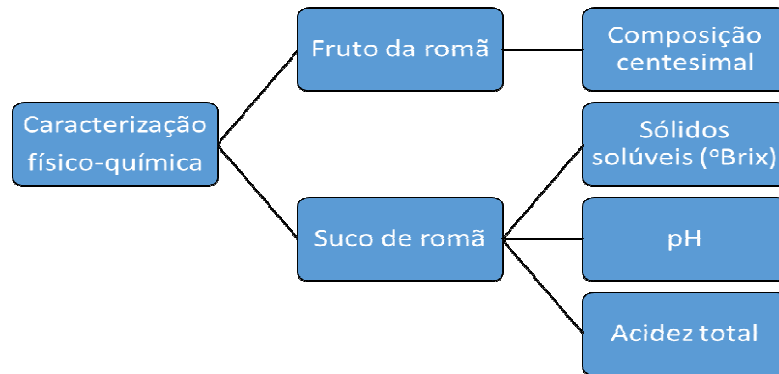
Figura 4.1. Frutos de romã oriundos da Fazenda Boa Fruta

### 4.2 Solventes e reagentes

- Acetonitrila, metanol e ácido fórmico, grau de pureza CLAE, da marca Tedia.
- Água ultrapura obtida do sistema Milli-Q<sup>®</sup> Gradient 10A.
- Padrões das antocianinas isolados segundo Gouvêa *et al.* (2012): delphinidina-3,5-diglicosídeo (98,0%), cianidina-3,5-diglicosídeo (99,2%), delphinidina-3-glicosídeo (98,0%), pelargonidin-3,5-diglicosídeo (99,1%), cianidina-3-glicosídeo (99,6%) e pelargonidin-3,5-diglicosídeo (99,9%).
- Padrão analítico comercial de cloreto de delphinidina-3,5- diglicosídeo (98,3%) da marca Chomadex.
- Padrões analíticos da marca Sigma: frutose (99,0%), glicose (99,5%), sacarose (100%), ácido ascórbico (99,0%), punicalagina (85,0%) e ácido elágico (100%).
- Agentes encapsulantes: goma arábica instantânea (VETEC), amido modificado (Capsul<sup>®</sup> AKY-0800, National Starch) e maltodextrina DE5 (Globe<sup>®</sup> 1805, Corn Products Brasil).
- Enzima pectinolítica Rapidase<sup>®</sup> TF, DSM *Food Specialities*.

### 4.3 Caracterização físico-química

A etapa de caracterização da matéria-prima foi realizada de acordo com o fluxograma abaixo (Figura 4.2).



**Figura 4.2.** Fluxograma representativo da caracterização físico-química da matéria-prima.

#### 4.3.1 Sólidos solúveis em °Brix

O teor de sólidos solúveis do suco de romã foi determinado em refratômetro modelo *Bellingham + Stanley Limited* com correção de temperatura (20 °C) e expresso em °Brix.

#### 4.3.2 pH

A determinação de pH do suco de romã foi realizada em titulador automático Metrohm®, modelo 785 DMP – Titrino após calibração do aparelho com tampões de pH 4,00 e 7,00.

#### 4.3.3 Acidez total

A acidez total do suco de romã foi determinada em titulador automático Metrohm®, modelo 785 DMP – Titrino, com reagente hidróxido de sódio fatorado com biftalato de sódio.

#### 4.3.4 Composição centesimal

Para a determinação da composição centesimal do fruto, as análises de umidade, cinzas, proteína, fibra e extrato etéreo foram realizadas de acordo com os métodos descritos na AOAC (2005-revisão 2010) e o teor de carboidratos e valor calórico foram calculados segundo a Resolução – RDC n.º 360 de 23 de dezembro de 2003.

## 4.4 Processamento

### 4.4.1 Avaliação de pré-tratamento para o suco de romã

A hidrólise enzimática e a filtração do suco de romã em malha com porosidade de 150  $\mu\text{m}$  foram testadas como um pré-tratamento para remover sólidos em suspensão, reduzir a viscosidade do suco integral e viabilizar a etapa de filtração por membranas.

A Rapidase® TF é uma preparação enzimática líquida oriunda de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei*, apresentando atividade de pectinase e hemicelulase, com temperatura ótima na faixa de 10 a 50 °C e pH entre 3,0 e 5,5 (MONTEIRO, 2011).

O tratamento enzimático foi realizado segundo planejamento apresentado na tabela 4.1. A faixa de concentração do extrato enzimático Rapidase foi selecionada com base em dados da literatura para microfiltração de polpas de frutas ricas em pectina (VAILLANT, 2001).

**Tabela 4.1.** Planejamento experimental para análise de viscosidade do suco de romã

Amostras	Análise de viscosidade		
	25 °C	30 °C	35 °C
Suco integral	25 °C	30 °C	35 °C
Suco + 2 mL.kg <sup>-1</sup> de extrato enzimático*	25 °C	30 °C	35 °C
Suco + 4 mL.kg <sup>-1</sup> de extrato enzimático*	25 °C	30 °C	35 °C
Suco + 6 mL.kg <sup>-1</sup> de extrato enzimático*	25 °C	30 °C	35 °C

\*Tratamento com extrato enzimático Rapidase (com atividade enzimática igual a 950,53 UI.mL<sup>-1</sup>) por 30 minutos a 35 °C.

A viscosidade das amostras foi determinada em triplicata, em reômetro Haake Mars (Modular Advanced Rheometer System) com sensor cilíndrico (Cilindro DG41Ti) e taxa de cisalhamento de 0,007 s<sup>-1</sup> a 600 s<sup>-1</sup>. A temperatura foi definida na faixa de operação típica do processo de microfiltração de sucos de frutas que leva em conta as características termolábeis dos compostos antioxidantes.



#### 4.4.1.1 Tratamento matemático dos dados

Os dados de viscosidade aparente em função da temperatura foram ajustados pela equação de Arrhenius (Equação 4.1) usando-se o método de regressão linear. A ordem de grandeza do parâmetro  $E_a$  avalia a sensibilidade da viscosidade em relação à variação da temperatura (FOX & McDONALD, 2001).

$$\mu = \mu_o e^{\frac{-E_a}{RT}} \dots\dots\dots(Eq.4.1)$$

onde:

$\mu$ - viscosidade (cP);

$E_a$  - energia de ativação (J.mol<sup>-1</sup>);

R - constante do gás ideal (8,314472 J.mol<sup>-1</sup>.K<sup>-1</sup>);

T - temperatura absoluta (K).

O comportamento reológico do suco nas condições selecionadas para este trabalho foi analisado pelo modelo de potência (Equação 4.2).

$$\tau = k \left( \frac{dv}{dy} \right)^n \dots\dots\dots(Eq. 4.2)$$

onde:

$\tau$  - tensão de cisalhamento (Pa);

K – índice de consistência (Pa.s<sup>n</sup>);

dv/dy - taxa de deformação (s<sup>-1</sup>);

n – índice de comportamento do fluido (adimensional).

#### 4.4.2 Despolpamento da romã

Os arilos foram manualmente separados dos frutos. Após separação, os mesmos foram processados na despoldadeira horizontal marca Itametal, modelo Bonina 0,25 df, com o objetivo de se separar o suco das sementes (Figura 4.3). O suco obtido foi mantido a -20 °C até sua utilização nos processos estudados.



**Figura 4.3.** Despolpamento da romã

#### 4.4.3 Filtração em malha

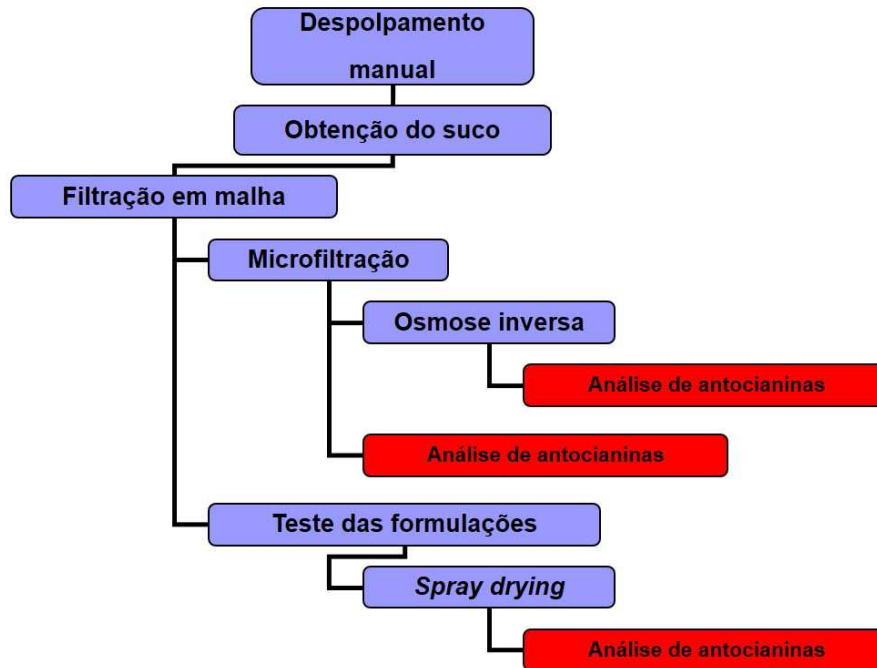
O suco integral de romã foi filtrado em malha com porosidade de 150  $\mu\text{m}$  (Figura 4.4) para sua utilização nos processos de membranas e de microencapsulação por *spray drying*.



**Figura 4.4.** Malha de 150 $\mu\text{m}$  utilizada na etapa de filtração

#### 4.4.4 Processos de microfiltração e concentração em membranas e de secagem por *spray drying*

A partir do suco extraído dos arilos separados manualmente dos frutos da romã, diferentes processos foram conduzidos para a obtenção de produtos com elevados teores de antocianinas, conforme apresentado no fluxograma abaixo (Figura 4.5).



**Figura 4.5.** Fluxograma representativo das etapas dos processos para obtenção de produtos a partir do suco de romã

#### 4.4.4.1 *Microencapsulação por spray drying*

Foi utilizado o *spray dryer* da marca Buchii, modelo B190, com atomizador de bico (Figura 4.6). As temperaturas de entrada do ar de secagem variaram de 160 °C a 170 °C e as temperaturas de saída do ar de secagem variaram de 89 °C a 93 °C. O produto em pó coletado foi acondicionado em embalagens seladas a vácuo, as quais foram mantidas sob refrigeração a 4 °C até o momento da análise de antocianinas.



**Figura 4.6.** *Spray dryer* da marca Buchii, modelo B190

O rendimento (R) do processo de microencapsulação foi calculado pela Equação 4.3, sendo os resultados expressos em porcentagem.

$$R = \frac{M}{ST} \times 100 \dots \dots \dots (Eq.4.3)$$

onde:

M - massa de pó seco (M);

ST - quantidade de sólidos totais da solução alimentadora.

#### *4.4.4.1.1 Avaliação da influência dos agentes encapsulantes*

As formulações contendo os agentes encapsulantes foram preparadas seguindo planejamento de mistura. Os agentes encapsulantes utilizados foram goma arábica instantânea (VETEC), amido modificado (Capsul<sup>®</sup> AKY-0800, National Starch) e maltodextrina DE5 (Globe<sup>®</sup> 1805, Corn Products Brasil) (Tabela 4.2). O percentual total de agente encapsulante utilizado em cada formulação foi igual ao teor de sólidos solúveis do suco de romã.

**Tabela 4.2.** Planejamento de mistura utilizado para preparo do material encapsulante

	<b>Encapsulante*</b>
<b>Amostra 1</b>	Capsul
<b>Amostra 2</b>	maltodextrina
<b>Amostra 3</b>	goma arábica
<b>Amostra 4</b>	Capsul + maltodextrina (1:1)
<b>Amostra 5</b>	goma arábica + Capsul (1:1)
<b>Amostra 6</b>	goma arábica + maltodextrina (1:1)
<b>Amostra 7**</b>	Ponto central: Capsul + maltodextrina + goma arábica (1:1:1)

\* todas as formulações foram preparadas na proporção 1:1 (m/m) suco de romã/encapsulante;

\*\*amostra preparada em triplicata, para a estimativa do erro

O planejamento experimental do tipo simplex centróide foi usado para análise dos resultados obtidos para os diferentes agentes encapsulantes. De acordo com esta metodologia foram conduzidos experimentos com 7 misturas de composições diferentes: 3 experimentos com componentes puros, correspondentes aos experimentos localizados nos vértices do diagrama, 3 experimentos de misturas binárias, correspondente ao ponto médio das arestas e um ponto central, centróide do diagrama. Foram feitas em triplicatas no ponto central, para avaliar o erro associado ao modelo. Os processos de secagem em *spray dryer* foram conduzidos em duplicata para cada formulação estabelecida.

#### 4.4.4.2 Microfiltração (MF)

Para os ensaios de microfiltração, o sistema de MF foi higienizado com água destilada e solução 2,5 % de NaOH. Essa solução foi recirculada pelo sistema por 20 minutos. Após esse tempo, aplicou-se durante 10 minutos uma pressão de 0,5 bar para a limpeza dos poros da membrana. A seguir, retirou-se a solução de limpeza e recirculou-se água filtrada até o permeado atingir pH em torno de 7,0.

A permeabilidade hidráulica do módulo foi determinada plotando-se os dados de fluxo de água versus gradiente de pressão. Este resultado permite avaliar a eficiência da etapa de limpeza da membrana. Para esta etapa foi utilizada água destilada e o fluxo foi determinado nas pressões de 2,0; 3,0; e 4,5 bar.

O processo de MF do suco de romã foi conduzido a  $25 \pm 2$  °C e pressão de 2,5 bar em um sistema de 18 membranas poliméricas (polifluoreto de vinilideno) de 0,15  $\mu\text{m}$  em série com configuração quadros e placas e área filtrante total de 0,324  $\text{m}^2$ . A clarificação do suco foi conduzida em regime de batelada (com reciclo do retido para o tanque de alimentação e coleta contínua do permeado). O volume de permeado foi medido em intervalos de 5 minutos para o cálculo do fluxo de permeado e do fator de redução volumétrica (FRV). A temperatura do processamento foi selecionada a partir dos dados reológicos.

#### 4.4.4.3 *Osmose Inversa (OI)*

Antes de iniciar o processo de OI, realizou-se procedimento de limpeza, igual ao da etapa de MF, sendo em seguida conduzido o teste da permeabilidade hidráulica com água destilada. O fluxo permeado foi medido nas pressões de 30; 40; 50 e 60 bar, a fim de se avaliar a eficiência do procedimento de limpeza da membrana.

A concentração do suco de romã por OI foi conduzida em um sistema de 24 membranas em série com configuração quadros e placas e área filtrante total de 0,432  $\text{m}^2$ . A pressão aplicada à membrana foi igual a 60 bar e temperatura de  $25$  °C  $\pm 2$ . O volume de permeado e a concentração de sólidos solúveis totais (°Brix) foram medidos em intervalos de 30 minutos para o cálculo do fluxo de permeado e do FC (fator de concentração), respectivamente. A temperatura do processamento foi selecionada a partir dos dados reológicos.

## 4.5 **Etapa analítica**

### 4.5.1 *Análise de açúcares por CLAE*

A etapa de extração dos açúcares (frutose, glicose e sacarose) foi feita segundo metodologia descrita por Macrae (1998), utilizando-se 1 g de suco de romã em balão volumétrico de 20 mL com 10 mL de água ultrapurificada, sendo a amostra submetida a banho ultrassom por 20 minutos. Em seguida adicionou-se 5 mL de acetonitrila ao balão volumétrico contendo a amostra e avolumou-se o mesmo com água ultrapurificada. Por último filtrou-se a solução em papel de filtro diretamente para o *vial* de 1,5 mL do injetor automático.

A análise por CLAE foi realizada utilizando-se um cromatógrafo de alta eficiência Waters® Alliance 2695, detector de índice de refração Waters® 2410, coluna amino Zorbax®

Carbohydrate da Agilent (250 mm x 4,6 mm; 5  $\mu$ m), fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, volume de injeção de 20  $\mu$ L e modo de eluição isocrático com solução 75 % acetonitrila em água.

Para o preparo da solução padrão, pesou-se 0,125 g de cada padrão analítico para um mesmo balão volumétrico de 25 mL, avolumando-se este em seguida com água ultrapurificada.

A quantificação dos açúcares foi realizada por padronização externa através da construção de uma curva analítica a partir de diluições da solução padrão preparada.

#### 4.5.2 *Análise de ácido ascórbico por CLAE*

Para a etapa de extração, pesou-se 2,5 g de suco de romã integral em balão volumétrico de 25 mL, adicionou-se 10 mL de ácido sulfúrico 0,05 M, seguindo-se para extração em banho ultrassom por 10 minutos. Posteriormente avolumou-se o balão com ácido sulfúrico 0,05 mol.L<sup>-1</sup> e filtrou-se a solução diretamente para o *vial* de 1,5 mL do injetor automático. Na análise cromatográfica utilizou-se um cromatógrafo de alta eficiência Waters<sup>®</sup> Alliance 2695, detector de arranjo de fotodiodos Waters<sup>®</sup> 2996, coluna de troca iônica Aminex<sup>®</sup> HPX-87H da Bio-Rad, fluxo de 0,7 mL.min<sup>-1</sup>, volume de injeção de 20  $\mu$ L e modo de eluição isocrático com ácido sulfúrico diluído 0,05 M (ROSA, 2005).

Para o preparo da solução padrão, pesou-se 25 mg do padrão analítico para balão volumétrico âmbar de 25 mL, avolumando-se este em seguida com solução de ácido sulfúrico 0,05 M.

A quantificação da ácido ascórbico foi realizada por padronização externa através da construção de uma curva analítica a partir de diluições da solução padrão preparada.

#### 4.5.3 *Análise de punicalagina e ácido elágico por CLAE*

A etapa de extração foi feita segundo metodologia descrita por Kim e Lee (2002). A extração foi realizada a partir de 1 g de suco de romã integral, com uma solução de 80 % metanol em água, sendo a amostra submetida em seguida a etapas de sonificação e centrifugação. Repetiu-se mais três vezes este mesmo procedimento de lavagem da amostra com a solução 80 % metanol em água.

A análise cromatográfica foi conduzida em cromatógrafo líquido de alta eficiência da Waters modelo Alliance<sup>®</sup> 2690/5 com detector de arranjo de fotodiodos (DAD), em coluna Thermo<sup>®</sup> Scientific C<sub>18</sub> (100 mm x 4,6 mm; 2,4  $\mu$ m), com temperatura do forno a 40 °C, volume de injeção de 20  $\mu$ L, fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, fase móvel em modo de eluição gradiente

composta por soluções de acetonitrila (solução A) e de 1 % ácido fórmico em água (solução B) (Tabela 4.3), com determinação da absorvância a 260 nm.

**Tabela 4.3.** Gradiente de eluição utilizado para análise de punicalagina e ácido elágico

<b>Tempo (minutos)</b>	<b>% Solvente A (acetonitrila)</b>	<b>% Solvente B (1% ácido fórmico em água)</b>
0	3	97
5	5	95
10	15	85
16	30	70
18	3	97
25	3	97

#### 4.5.4 Modificação do método cromatográfico para análise de antocianinas

Visando reduzir o tempo da análise das antocianinas sem comprometer a separação dos analitos, foram realizadas modificações no método cromatográfico descrito na literatura por Santiago et al. (2010). O metanol foi substituído por acetonitrila e, para maior preservação do equipamento, a quantidade de ácido utilizado na fase móvel foi reduzida de 10% para 5% (Tabela 4.4). Adicionalmente, a coluna Symmetry<sup>®</sup> C<sub>18</sub> (150 x 4,6 mm; 3,5 μm) normalmente utilizada neste tipo de separação foi substituída pela coluna Thermo<sup>®</sup> Scientific C<sub>18</sub> (100 x 4,6 mm; 2,4 μm) sendo esta, uma coluna com fase estacionária composta por partículas menores.

**Tabela 4.4.** Condições cromatográficas

	<b>Método padronizado*</b>	<b>Método modificado</b>
Coluna	Symmetry <sup>®</sup> C <sub>18</sub> (150 x 4,6mm; 3,5μm)	Thermo Scientific C <sub>18</sub> (100 x 4,6 mm; 2,4 μm)
Temperatura	30°C	40°C
Fase móvel	Solvente A: 10% Ácido fórmico em água; Solvente B: Metanol	Solvente A: 5% Ácido fórmico em água; Solvente B: Acetonitrila
Fluxo	1,0 mL min <sup>-1</sup>	1,0 mL min <sup>-1</sup>

\* Santiago et al. (2010)



O gradiente de eluição utilizado no método modificado está ilustrado na Tabela 4.5.

**Tabela 4.5.** Gradiente de eluição utilizado para análise de antocianinas (método modificado)

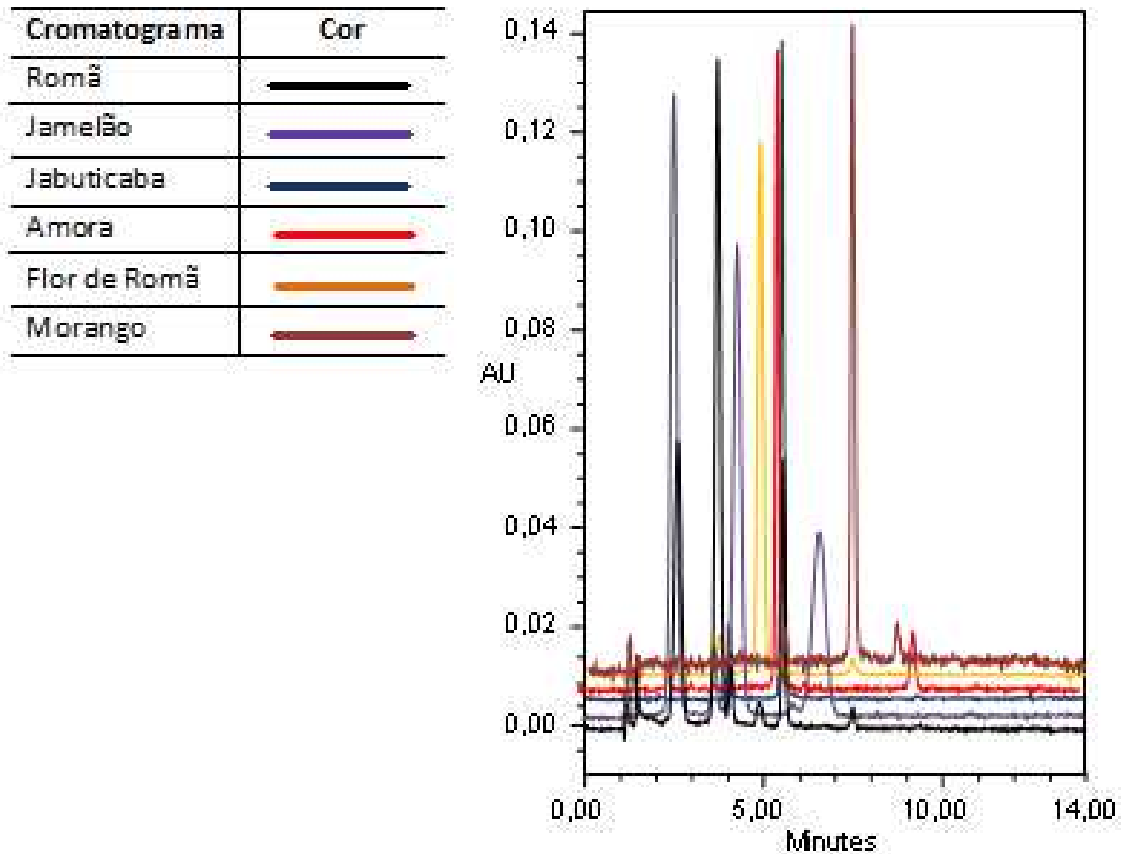
<b>Tempo (minutos)</b>	<b>% Solvente A (acetonitrila)</b>	<b>% Solvente B (5%ácido fórmico em água)</b>
0	5	95
2	7	93
10	10	90
12	5	95
14	5	95

#### 4.5.5 *Caracterização das antocianinas do suco de romã*

Realizou-se a caracterização das antocianinas presentes no suco de romã por comparação do perfil cromatográfico com relatos da literatura, bem como através da comparação dos tempos de retenção e espectros de UV/Visível obtidos para identificação dos mesmos compostos presentes em outros frutos e já caracterizados no laboratório, nas mesmas condições de análise.

#### 4.5.6 *Obtenção dos padrões de antocianinas*

Para o isolamento dos padrões foram escolhidas matrizes vegetais onde as antocianinas da romã também estão presentes (Figura 4.7) (Tabela 4.6).



**Figura 4.7.** Sobreposição dos cromatogramas da análise de antocianinas das matrizes selecionadas como fontes de padrão

**Tabela 4.6.** Matrizes utilizadas como fontes de antocianinas

Antocianina	Matriz selecionada
Delfinidina-3,5-diglicosídeo	Jamelão
Cianidina-3,5-diglicosídeo	Jamelão
Delfinidina-3-glicosídeo	Jabuticaba
Pelargonidina-3,5-diglicosídeo	Flor de romã
Cianidina-3-glicosídeo	Amora-preta
Pelargonidina-3-glicosídeo	Morango

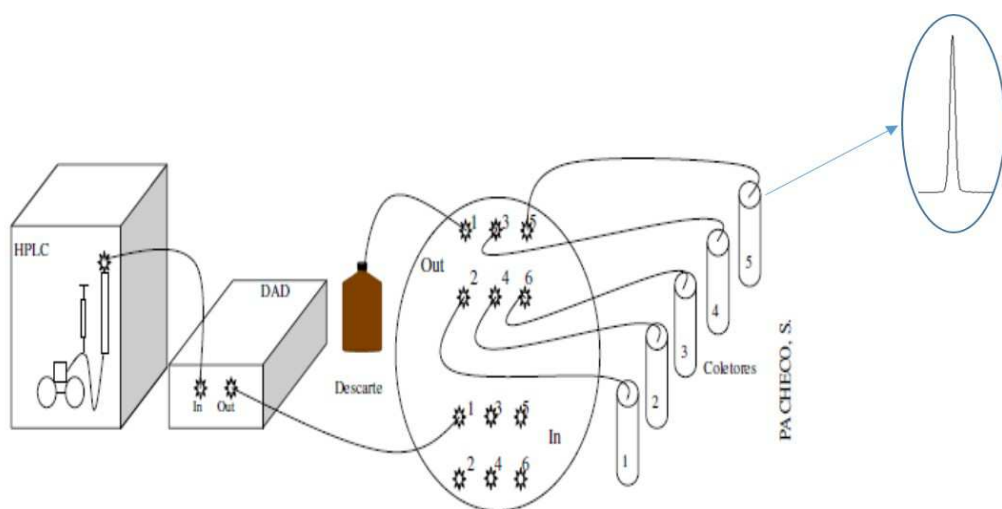
As matrizes utilizadas como fontes de antocianinas foram liofilizadas, em liofilizador Líotop modelo L101 a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas, a fim de se obter um material mais

concentrado. Para a etapa de liofilização utilizou-se as cascas do jamelão e da jabuticaba, as flores íntegras de romã e os sucos extraídos dos frutos inteiros de amora-preta e morango.

Para a extração das antocianinas com solução de metanol e ácido fórmico (10:90, v/v), a partir do material liofilizado, pesou-se 2 g da amostra em quatro tubos de centrífuga com tampa. A extração foi conduzida em banho de ultrassom, com posterior centrifugação (SANTIAGO et al., 2010). Todo o material sobrenadante obtido com a extração foi concentrado utilizando rotaevaporador a 38 °C durante 4 horas. Em seguida, o material restante do balão foi submetido à secagem com circulação de ar comprimido microfiltrado. Após esta etapa, o extrato seco foi diluído com 4 mL da solução de injeção 5% de ácido fórmico em água: metanol (90:10, v/v) e filtrado por membrana hidrofílica Millex<sup>®</sup> (0,45 µm) diretamente para *vial* do injetor automático do cromatógrafo.

#### 4.5.6.1 Isolamento das antocianinas por CLAE

O isolamento das substâncias de interesse foi feito de acordo com a metodologia descrita por Gouvêa et al. (2012), pela técnica de cromatografia líquida acoplada a uma válvula seletora de colunas com seis canais Rheodyne<sup>®</sup>. Esta válvula é adaptada para selecionar canais de saída, ao invés de possíveis colunas, substituindo o papel do tradicional coletor de frações (Figura 4.8). As substâncias de interesse são coletadas ao eluïrem, com a utilização da válvula seletora comandada pelo software Empower<sup>®</sup>. O controle da coleta das frações é realizado por meio do tempo de retenção.



**Figura 4.8.** Esquema de funcionamento da válvula seletora de colunas

Para a coleta das frações de interesse utilizou-se coluna Symmetry<sup>®</sup> C<sub>18</sub> (150 x 4,6 mm; 3,5 µm) à temperatura de 40 °C, fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, volume de injeção de 50 µL e modo de eluição gradiente com acetonitrila e solução 5% ácido fórmico em água (Tabela 4.7).

**Tabela 4.7.** Gradiente de eluição utilizado para coleta das frações de interesse

<b>Tempo (minutos)</b>	<b>% Solvente A (acetonitrila)</b>	<b>% Solvente B (5% ácido fórmico em água)</b>
0	5	95
2	5	95
10	10	90
15	13	87
16,5	20	80
18	5	95
20	5	95

#### 4.5.6.2 *Concentração das antocianinas isoladas*

Para a etapa de concentração foi utilizada a técnica de extração em fase sólida, onde saturou-se um cartucho Sep-Pak<sup>®</sup> C<sub>18</sub> Waters, previamente acondicionado com 10 mL de metanol, com o extrato antociânico isolado. Em seguida lavou-se o cartucho com solução aquosa de HCl 0,01 % para remoção de possíveis compostos mais polares presentes, como açúcares e ácidos fenólicos. Por último, foram eluídos os pigmentos antociânicos retidos no cartucho com metanol.

Os pigmentos antociânicos eluídos foram secos sob fluxo de ar comprimido microfiltrado e ressuspensos com solução 5% ácido fórmico em água: metanol (90:10, v/v) em balão volumétrico âmbar de 5 mL. Cada um dos pigmentos foi então analisado no cromatógrafo líquido a fim de se avaliar a sua pureza através da obtenção do seu percentual de área a 520 nm, comprimento de onda este utilizado na análise de antocianinas. As purezas dos compostos isolados também foram verificadas em 280 e 360 nm, uma vez que nesses comprimentos de onda ocorre a absorção de outros compostos que podem causar interferência, como outros compostos fenólicos (GIUSTI, SAONA e WROSLTAD, 1999).

#### 4.5.6.3 *Confirmação por espectrometria de massas*

As antocianinas isoladas foram identificadas utilizando-se espectrômetro de massa de alta resolução Waters Synapt<sup>®</sup> ESI QToF com injeção direta (Figura 4.9). A fonte MS foi de ionização por electrospray positivo (ESI+) e as condições utilizadas foram: temperatura da

fonte igual a 120 °C, gás de dessolvatação (N<sub>2</sub>) com vazão igual a 12,5 L.min<sup>-1</sup> a 500 °C e energia do capilar fixada em 3,0 kV.



**Figura 4.9.** Espectrômetro de massa de alta resolução Waters Synapt®

#### 4.5.6.4 Cálculo da concentração dos padrões

Para a obtenção das concentrações dos padrões das antocianinas isoladas foram coletadas alíquotas das soluções obtidas após a etapa de concentração, tendo sido as mesmas secas e ressuspensas com solução específica (descrita na tabela 4.8) para cada analito. A concentração da antocianina correspondente nestas soluções foi calculada através da lei de Lambert-Beer, onde foi efetuada a leitura da absorvância no espectrofotômetro UV-1800 Shimadzu e sendo o cálculo da concentração da solução feito conforme a Equação 4.4.

$$\text{Concentração (mg.mL}^{-1}\text{)} = (\text{ABS} \times \text{MM} \times f) / \epsilon \dots \dots \dots (\text{Eq.4.4})$$

onde:

ABS - Absorvância;

MM - Massa molar;

*f* - Fator de diluição

ε - Coeficiente de extinção molar (L.mol.cm<sup>-1</sup>).

O coeficiente de extinção molar (ε) de cada antocianina é apresentado na Tabela 4.8.

**Tabela 4.8.** Absorção máxima ( $\lambda$ ), solução específica e absortividade molar de cada antocianina da romã.

Antocianinas	$\lambda$ (nm)	Solução específica	Absortividade molar
Delfinidina-3,5-diglicosídeo	520	1 % HCl em MeOH	40368*
Cianidina-3,5-diglicosídeo	508.5	1 % HCl em MeOH	35000**
Delfinidina-3-glicosídeo	543	1 % HCl em MeOH	29000**
Pelargonidina-3,5-diglicosídeo	510	1 % HCl em MeOH	32360**
Cianidina-3-glicosídeo	530	1 % HCl em MeOH	34300**
Pelargonidina-3-glicosídeo	496	1 % HCl em H <sub>2</sub> O	31620**

\*Absortividade molar calculada por espectrofotometria com um padrão comercial desta antocianina, da marca Chromadex. \*\* Fonte: GIUSTI, RODRIGUEZ-SAONA e WROLSTAD (1999).

#### 4.5.6.5 *Elaboração das curvas analíticas*

Com o valor da concentração conhecido, foi possível preparar, por diluição, outros pontos para construção da curva de calibração, cada um com volume final de 200  $\mu$ L. As soluções foram injetadas sob as mesmas condições cromatográficas descritas no item 4.5.4, sendo a curva analítica feita a partir dos valores de concentração em função da área dos picos. Para a escolha destes valores, um extrato antociânico obtido a partir de suco de romã foi previamente injetado e observando-se a área obtida, foi possível escolher concentrações do padrão que dariam áreas superiores e inferiores a este valor, englobando assim a concentração da amostra na curva. Cada solução da curva foi injetada em triplicata.

#### 4.5.7 *Análise das antocianinas por CLAE*

Para a análise das antocianinas pesou-se 1 g da amostra para extração com solução ácido fórmico:metanol (10:90, v/v) em banho de ultrassom, com posterior centrifugação até descoloração da solução (SANTIAGO et al., 2010). Em seguida, secou-se uma alíquota do extrato com ar comprimido microfiltrado, sendo a mesma ressuspensa em solução 5% ácido fórmico: metanol (90: 10, v/v) para análise cromatográfica. As análises foram realizadas em triplicata. No desenvolvimento da análise cromatográfica utilizou-se um cromatógrafo de alta eficiência Waters Alliance<sup>®</sup> 2695, detector de arranjo de fotodiodos Waters 2996, coluna Thermo<sup>®</sup> Scientific C<sub>18</sub> (100 mm x 4,6 mm; 2,4  $\mu$ m) e modo de eluição gradiente com

acetonitrila e solução 5 % ácido fórmico em água. A quantificação das antocianinas foi realizada por padronização externa, a partir de curvas de calibração feitas com padrões analíticos isolados e confirmados pelo espectrômetro de massas de alta resolução Waters Synapt® ESI-qTOF segundo metodologia descrita por Gouvêa et al. (2012).

#### 4.6 Avaliação estatística

As avaliações estatísticas realizadas neste trabalho foram feitas através da Análise de Variância (ANOVA one-way) seguida pelo teste de Tukey. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. As avaliações foram realizadas pelo software XLSTAT versão 2014.

#### 4.7 Avaliação da estabilidade dos produtos obtidos

Devido à quantidade insuficiente de matéria-prima para realização do estudo de estabilidade, foram processados frutos de uma outra remessa enviada pela Fazenda Boa Fruta, seguindo as mesmas etapas de caracterização e processamento nas condições já definidas e utilizadas para o primeiro lote.

Avaliou-se a estabilidade das microcápsulas (produto em pó), do suco clarificado e do suco concentrado quanto à concentração de antocianinas, à cor e às condições microbiológicas.

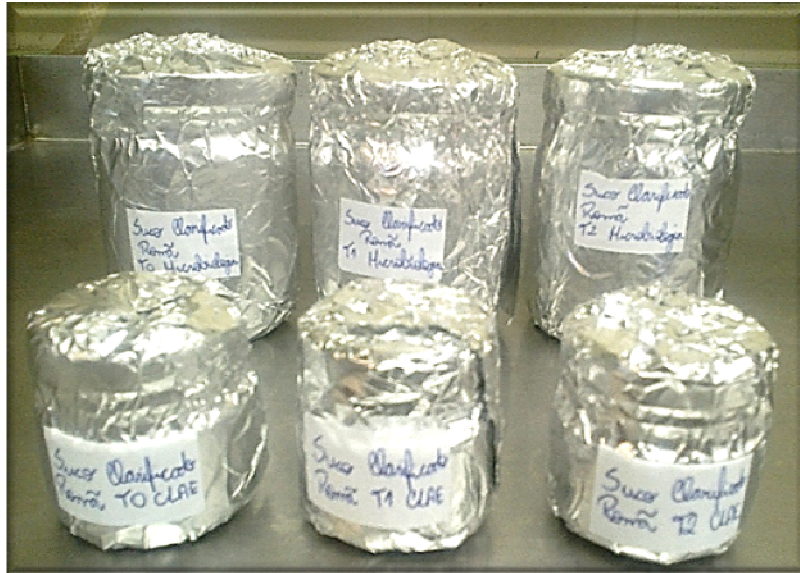
O produto em pó foi acondicionado em embalagem de vidro com tampa, coberta por papel laminado, e armazenado em uma câmara incubadora a 25 °C (Figura 4.10). A estabilidade deste produto foi avaliada em intervalos de 30 dias por um período de 4 meses. Foram separados 5 frascos (tempo 0 ao tempo 4) para cada uma das análises (CLAE, cor e microbiologia).



**Figura 4.10.** Microcápsulas acondicionadas para estudo de estabilidade

Os produtos líquidos também foram acondicionados em embalagem de vidro com tampa, coberta por papel laminado, e mantidos armazenados sob refrigeração a 4°C (Figura

4.11). O estudo de estabilidade destas amostras foi conduzido durante 2 meses. Foram separados 3 frascos (tempo 0 ao tempo 2) para cada uma das análises (CLAE, cor e microbiologia).



**Figura 4.11.** Sucos acondicionados para estudo de estabilidade

#### 4.7.1 Estabilidade das antocianinas

Foram realizadas análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, como descrito anteriormente, para quantificação das antocianinas presentes nas amostras estudadas.

#### 4.7.2 Estabilidade da cor

A análise de cor dos produtos foi realizada de acordo com as recomendações do Commission International de l'Eclairage (1978), sendo as amostras dispostas em cubeta de quartzo de 10 mm. A análise foi realizada no aparelho Color Quest XE, em escala CIELAB e CIELCh, com abertura de 0,375 mm de diâmetro, com iluminante D65/10. Os parâmetros de cor medidos foram:

$L^*$  = luminosidade (0 = preto e 100 = branco);

$a^*$  (-80 até zero = verde, do zero ao +100 = vermelho);

$b^*$  (-100 até zero = azul, do zero ao +70 = amarelo);

$C^*$  chroma =  $(a^*^2 + b^*^2)^{1/2}$  em um sistema de coordenadas polares;

$h^\circ$  ângulo hue =  $\arctan(b^*/a^*)$  em um sistema de coordenadas polares.



#### 4.7.3 Estabilidade microbiológica

Para as análises microbiológicas foram utilizados os parâmetros do Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos da ANVISA (BRASIL, 2001). Para a avaliação dos produtos, foi considerado o Grupo de Alimentos 1 “FRUTAS, PRODUTOS DE FRUTAS E SIMILARES” que determina a análise de coliformes termotolerantes e *Salmonella* spp. Foi também realizada análise de *Staphylococcus* coagulase positiva a fim de se avaliar a manipulação dos produtos. Para a análise de coliformes termotolerantes e *Staphylococcus* coagulase positiva foram empregadas técnicas preconizadas pela American Public Health Association (APHA) Compendium for Microbiological Analysis of Foods (KORNACKI e JOHNSON, 2001; LANCETTE e BENNETT, 2001) e para a análise de *Salmonella* o método ISO 6579:2007. Ainda com o intuito de se avaliar a deterioração dos produtos e não apenas os patógenos, foram realizadas contagens de fungos filamentosos e leveduras, segundo metodologia descrita por Beuchat e Cousin (2001).

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O principal apelo de qualidade no suco de romã são as antocianinas presentes em sua composição, as quais foram identificadas e quantificadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) tanto no suco de romã íntegro como nos produtos obtidos: suco clarificado, suco concentrado e microcápsulas de romã.

Estudos analíticos de modificação de metodologia, de obtenção de padrões de antocianinas e de quantificação dos principais compostos fenólicos presentes no suco de romã foram desenvolvidos com o intuito de identificar e quantificar estes analitos nos produtos obtidos.

Desta forma, o capítulo de resultados e discussão foi escrito na seguinte sequência: caracterização físico-química do fruto da romã, processamento e técnicas analíticas. Esta ordem de apresentação tem como objetivo facilitar o entendimento da evolução do presente trabalho que foi utilizar as técnicas analíticas, com ênfase na análise de antocianinas por CLAE, como ferramenta de avaliação dos produtos obtidos a partir do suco de romã.

### **5.1 Caracterização físico-química**

Na Tabela 5.1 encontram-se os valores dos parâmetros físico-químicos avaliados para os dois lotes de frutos de romã recebidos. Como observado nessa tabela, a análise de fibra e o cálculo de valor calórico foram realizados apenas para o suco do segundo lote de matéria-prima devido a não disponibilidade das mesmas por motivos de terem sido implementadas no Laboratório de Físico-química da Embrapa Agroindústria de Alimentos posteriormente ao período de recebimento dos primeiros frutos.

**Tabela 5.1.** Parâmetros físico-químicos dos frutos de romã

	<b>Frutos - 1º lote</b>	<b>Frutos - 2º lote</b>	<b>Santos et al. (2010)</b>	<b>Al-Maiman e Ahmad (2002)</b>
<b>Sólidos solúveis (°Brix)</b>	14,90 ± 0,20 <sup>a</sup>	14,70 ± 0,06 <sup>b</sup>	12,89 ± 0,0	16,3 ± 0,19
<b>pH</b>	3,44 ± 0,02 <sup>a</sup>	3,42 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,54 ± 0,02	3,48 ± 0,11
<b>Acidez (g.100g<sup>-1</sup>)*</b>	0,88 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,57 ± 0,01 <sup>b</sup>	NR	NR
<b>Umidade (g.100g<sup>-1</sup>)</b>	77,25 ± 0,01 <sup>a</sup>	74,37 ± 0,01 <sup>b</sup>	73,93 ± 0,52	83,79 ± 0,22
<b>Cinzas (g.100g<sup>-1</sup>)</b>	0,85 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,90 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,46 ± 0,01	0,45 ± 0,02
<b>Proteína (g.100g<sup>-1</sup>)</b>	0,69 ± 0,00 <sup>a</sup>	1,26 ± 0,00 <sup>b</sup>	1,48 ± 0,25	1,05 ± 0,09
<b>Extrato etéreo (g.100g<sup>-1</sup>)</b>	1,06 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,90 ± 0,00 <sup>b</sup>	NR	NR
<b>Fibra alimentar (g.100g<sup>-1</sup>)</b>	NR	7,93	2,43 ± 0,07	NR
<b>Carboidrato (g.100g<sup>-1</sup>)</b>	NR	14,64	NR	NR
<b>Valor calórico (kcal.100g<sup>-1</sup>)</b>	NR	71,70	NR	NR

\*Acidez expressa em g de ácido cítrico.100 g<sup>-1</sup> de suco. NR.: Não realizada. Médias com diferentes letras em cada linha indicam diferença significativa (p<0,05).

Embora os valores encontrados para os dois lotes avaliados sejam próximos, com exceção da acidez e proteína, e se encontrem dentro da faixa esperada para este tipo de matéria-prima, todos (exceto pH e cinzas) apresentaram diferença significativa (p<0,05) entre si. As diferenças encontradas são atribuídas ao fato dos frutos serem de diferentes lotes.

A variação da acidez pode ser um indicativo de diferença no estágio de maturação entre os frutos avaliados, já que a acidez decresce em função do avanço da maturação.

Os valores de sólidos solúveis para ambos os lotes recebidos podem ser considerados altos, principalmente quando comparados aos de outros frutos como o da acerola (9,17 °Brix) reportado por Pagani (2010) e o da amora (5,27 °Brix) avaliado por Santiago (2010). Estes resultados indicam que o fruto da romã produzido no semiárido brasileiro é apropriado para processo de secagem por atomização, uma vez que neste tipo de operação o aumento da concentração de sólidos na alimentação favorece a eficiência do processo. Segundo Masters (1979), devido à necessidade de evaporação em um curto espaço de tempo, o *spray dryer*

deve operar com o máximo teor de sólidos possível, possibilitando uma utilização adequada do calor, com menor gasto energético.

Porém os açúcares presentes no suco de romã indicam a necessidade de adição de ingredientes encapsulantes para sua proteção térmica durante a secagem em *spray dryer*.

Santos et al. (2010) e Al-Maiman e Ahmad (2002) reportaram para o fruto de romã valores de alguns parâmetros físico-químicos (sólidos solúveis, pH e umidade) próximos aos encontrados no presente trabalho (tabela 5.1).

Tehranifar et al. (2010) encontraram para diferentes cultivares de romã teor de sólidos solúveis variando de 11,37 a 15,07 °Brix, valores de pH de 3,16 a 4,09 e acidez total entre 0,33 a 2,44 g.100 g<sup>-1</sup>, valores estes que também englobam os resultados do presente trabalho.

As diferenças encontradas não só entre os dois lotes avaliados, mas também em relação aos dados reportados na literatura, são comuns para produtos vegetais, uma vez que a composição destes sofre interferências de vários parâmetros externos, como condições climáticas, solo, técnicas de produção, etc.

## 5.2 Processamento

### 5.2.1 Despolpamento da romã

Na Tabela 5.2, apresenta-se o balanço de massa da etapa de despolpamento do fruto, no qual foi possível estimar um rendimento de 43% em suco, em relação à alimentação. Foi possível observar ainda que os arilos representaram 58% do fruto enquanto a casca 42%. Nos arilos, 75% dos mesmos correspondem ao suco, enquanto os 25% restantes compreendem as sementes.

**Tabela 5.2.** Balanço de massa da etapa de despolpamento da romã

	Alimentação	Casca	Arilos	Suco	Sementes
	(romã fruta)		(suco + semente)		
Massa	109 kg	46 kg	63 kg	47 kg	16 kg

### 5.2.2 Avaliação de pré-tratamento para o suco de romã

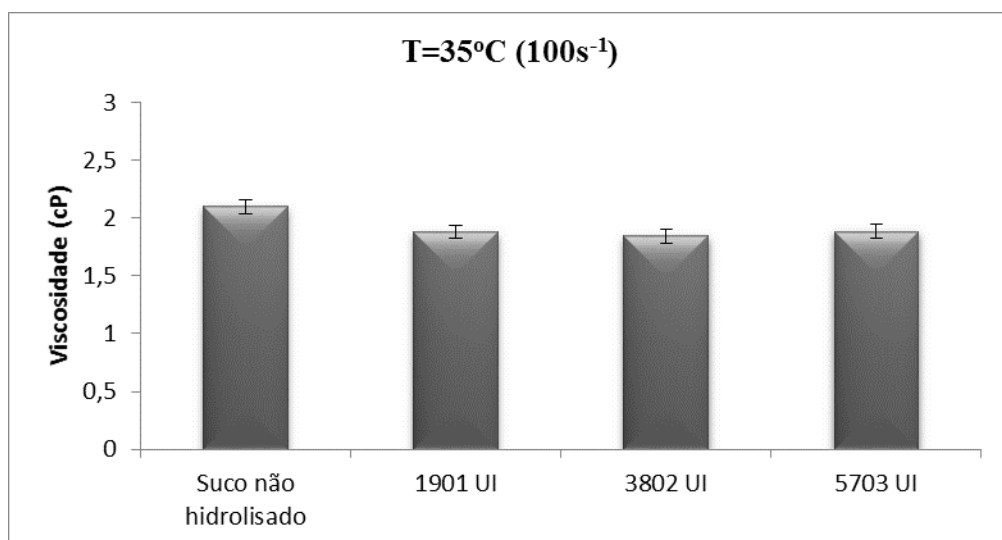
Não foi possível conduzir os testes de microfiltração a partir do suco integral. Neste caso, ocorreu um entupimento no sistema de membranas mostrando a necessidade de

submeter o suco a algum tratamento para viabilizar seu escoamento através da membrana selecionada (Figura 5.1). Para tanto, dois procedimentos foram testados: a utilização de enzimas e a filtração em tela de náilon de 150  $\mu\text{m}$ .



**Figura 5.1.** Entupimento das membranas do sistema de microfiltração ocasionado pela passagem do suco integral de romã

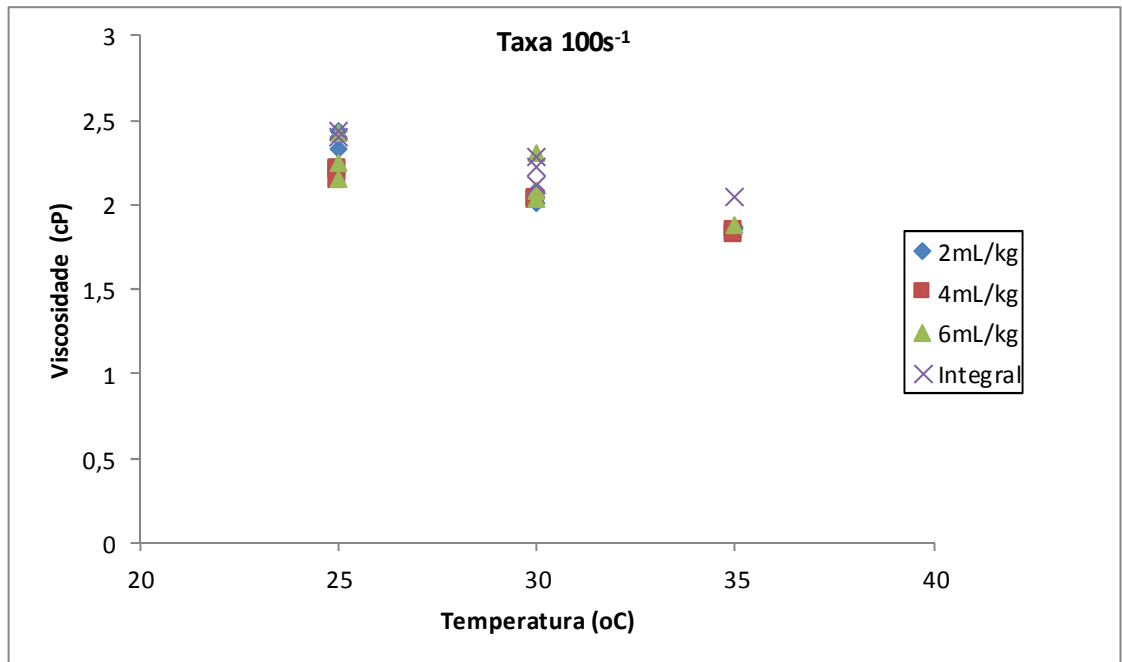
Os resultados da análise de viscosidade, tanto do suco integral quanto dos hidrolisados, não foram repetitivos. Esta dificuldade pode ter ocorrido devido ao atrito ocasionado no sensor do reômetro pelas partículas em suspensão presentes nas amostras, resultando em valores muito heterogêneos. Entretanto, foi observada uma redução média de 11% na viscosidade, ao se comparar os valores obtidos para o suco filtrado não hidrolisado e o suco filtrado submetido à etapa enzimática (Figura 5.2).



**Figura 5.2.** Efeito do tratamento enzimático sobre a viscosidade do suco de romã:  $T = 35\text{ }^{\circ}\text{C}$  e taxa de deformação =  $100\text{ s}^{-1}$

Foi possível observar uma redução não muito acentuada na viscosidade do suco, com o aumento da temperatura nos ensaios realizados (Figura 5.3) para todas as amostras. Esta observação é confirmada a partir dos valores de energia de ativação ( $E_a$ ) estimados pela equação de Arrhenius (Tabela 5.3). Esta equação foi aplicada aos valores de viscosidade aparente em função do inverso da temperatura para taxas de deformação iguais a  $10 \text{ s}^{-1}$ ,  $50 \text{ s}^{-1}$ ,  $100 \text{ s}^{-1}$  e  $600 \text{ s}^{-1}$ . Os valores de coeficiente de determinação ( $R^2$ ) indicam que a equação representa um ajuste satisfatório aos dados experimentais. Os valores baixos de energia de ativação ( $E_a$ ) indicam que a viscosidade do suco de romã filtrado não é muito sensível às mudanças de temperatura. Faraoni et al. (2013) encontraram para suco misto de manga, goiaba e acerola,  $E_a$  igual a  $11,66 \text{ kJ.mol}^{-1}$  para taxa de deformação de  $100 \text{ s}^{-1}$ , tendo sido observada uma tendência geral de diminuição da viscosidade aparente com o aumento da temperatura.

A viscosidade de um fluido depende de forças intermoleculares que impedem o movimento das moléculas e estas forças por sua vez estão relacionadas à extensão dos espaços intermoleculares, sendo influenciadas por mudança de temperatura e pressão (BARBOSA-CÁNOVAS et al., 1993). Diante disto, a baixa influência da temperatura na viscosidade do suco de romã pode estar relacionada ao fato da amostra ter sido previamente filtrada, o que removeu as partículas em suspensão. Isto ocorre, pois pelos princípios fundamentais da física as partículas em suspensão tem um efeito significativo na variação da viscosidade do material.



**Figura 5.3.** Influência da temperatura sobre a viscosidade do suco de romã.  
Taxa de deformação =  $100\text{s}^{-1}$

**Tabela 5.3** – Parâmetros da Equação de Arrhenius para o suco de romã filtrado

Parâmetros de Arrhenius	Taxa de deformação $\text{s}^{-1}$			
	50	100	300	600
$E_a$ ( $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	39,58	39,92	42,11	45,24
$R^2$	0,88	0,99	0,99	0,99

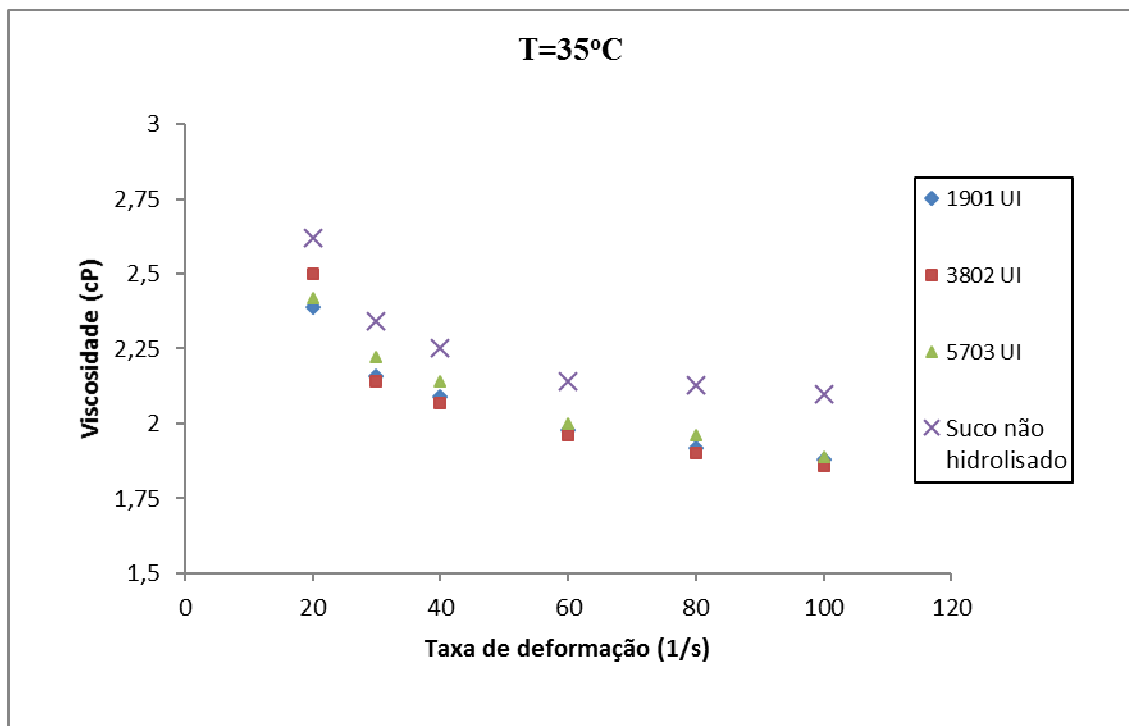
Também foi possível constatar o decréscimo no valor da viscosidade com o aumento da taxa de deformação, comportamento característico de fluido pseudoplástico (Figura 5.4). Esta característica foi confirmada pelo modelo da Lei da Potência (modelo de Ostwald-de-Waele) aplicado para o suco de romã filtrado, nas temperaturas de 25, 30 e 35 °C, a partir de um ajuste linear aplicado aos dados experimentais.

O índice de comportamento ( $n$ ) inferior a 1 (Tabela 5.4) indica um comportamento não-Newtoniano com características pseudoplásticas, o que é um comportamento comumente observado para sucos de fruta (OLIVEIRA, ROSSI e BARROS, 2011). Foi possível observar que este parâmetro não variou consideravelmente com o aumento da temperatura. Segundo Vasques (2003) o valor de  $n$  decresce com o aumento do conteúdo de sólidos insolúveis sendo pouco afetado pela temperatura, o que dá respaldo aos resultados encontrados no presente trabalho, dado que o suco foi previamente filtrado.

O índice de consistência (K) do suco filtrado também não teve variação significativa com o aumento da temperatura, o que corrobora os valores baixos encontrados de energia de ativação pelo modelo de Arrhenius. Os valores baixos encontrados para K também podem ser relacionados ao baixo teor de sólidos insolúveis da amostra. Oliveira, Rossi e Barros (2011) encontraram para polpa de gabioba valores de K para as temperaturas de 25, 30 e 35 °C, iguais a 6,09, 4,66 e 3,31 Pa.s<sup>n</sup>, respectivamente. Para suco de amora-preta tratado com 400 mL.kg<sup>-1</sup> de enzima Rapidase, Santiago (2010) observou valores de índice de consistência iguais a 0,09, 0,08 e 0,09 Pa.s<sup>n</sup>, também para as temperaturas de 25, 30 e 35 °C, respectivamente.

**Tabela 5.4** – Parâmetros do modelo da Lei da Potência em função da temperatura para o suco de romã filtrado

Temperatura	n	K(Pa.s <sup>n</sup> )
25°C	0,82	0,0053
30°C	0,81	0,0050
35°C	0,78	0,0053



**Figura 5.4.** Influência da taxa de deformação sobre a viscosidade do suco de romã filtrado.

De acordo com os resultados obtidos, observa-se que a etapa de filtração foi suficiente para reduzir a viscosidade de forma satisfatória para conduzir o processo de microfiltração por



membranas. A microfiltração do suco de amora-preta hidrolisado foi realizado no mesmo sistema para suspensões com viscosidade da ordem de 4 cP para taxa de deformação de  $100\text{s}^{-1}$  (SANTIAGO, 2010), valor este superior à viscosidade obtida para o suco de romã apenas filtrado em malha de 150  $\mu\text{m}$ . Paula et al. (2002) encontraram para suco de maracujá tratado enzimaticamente viscosidade aparente igual a 6,88 cP, sendo o mesmo submetido ao processo de microfiltração por membranas.

### 5.2.2.1 Filtração em malha

A etapa de filtração em malha de 150  $\mu\text{m}$  removeu os sólidos em suspensão e reduziu a viscosidade dos sucos viabilizando tecnicamente a etapa de clarificação por microfiltração. Mirsaedghazi et al. (2010) também indicaram apenas a filtração do suco de romã como pré-tratamento ao processo de separação por membranas, sendo possível assim a condução da clarificação do mesmo. Como apresentado na tabela 5.5, pode-se observar que a perda em massa na etapa de filtração foi inferior a 2%, que corresponde à massa de bagaço retida na malha (Figura 5.5).

**Tabela 5.5.** Balanço de massa da etapa de filtração em malha do suco

Amostra	Suco integral	Suco filtrado	Torta da filtração
Massa (kg)	13,00	12,87	0,23



**Figura 5.5.** Torta obtida durante etapa de filtração do suco de romã integral.

### 5.2.3 Microencapsulação do suco de romã por spray drying

Para todos os ensaios, foi obtido cerca de 15 g de produto em pó a partir de 100 mL de suco formulado contendo 30 g de sólidos totais, o que indica um rendimento de 50% do processo. Pagani (2010) obteve rendimentos entre 24 e 34% no processo de

microencapsulação de diferentes formulações de suco de acerola, maltodextrina e goma arábica.

Foi possível recuperar o pó das paredes e do coletor do equipamento (Figura 5.6) para todas as formulações testadas, e mais facilmente para as que continham goma em sua composição. Vardin e Yasar (2012) tiveram muitos problemas durante o processo de microencapsulação do suco de romã por atomização utilizando somente maltodextrina como agente carreador, tendo que interromper o processo de secagem em vários momentos devido à dificuldade de se remover o excesso de depósito formado pelo material processado nas paredes do equipamento. Segundo Maisuthisakul e Gordon (2012) o agente de secagem goma arábica é reconhecido por sua alta eficiência de encapsulação, fato também observado nos testes realizados no presente trabalho.



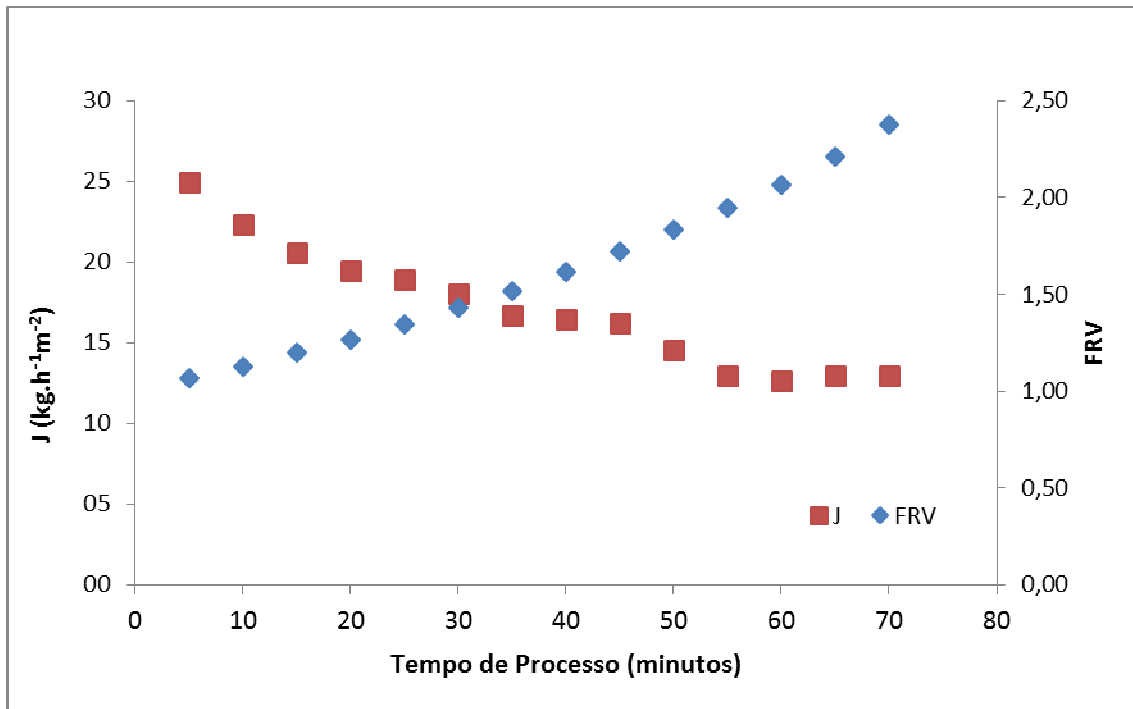
**Figura 5.6.** Produto em pó obtido a partir do processo de microencapsulação do suco de romã em *spray dryer*

#### 5.2.4 Microfiltração (MF)

O fator de redução volumétrica (FRV), que é dado pela relação entre o volume (ou massa) de alimentação e o volume (ou massa) do retido, alcançado após 70 minutos de processamento, em modo de concentração, foi de 2,4 (Tabela 5.6 e Figura 5.7). Pallet et al. (2005) reportaram valores para o FRV entre 2 e 3 para diferentes sucos de frutas brasileiras previamente hidrolisados.

**Tabela 5.6.** Balanço de massa da etapa de microfiltração do suco de romã filtrado em malha de 150  $\mu\text{m}$ 

Corrente	Alimentação (suco de romã)	Permeado	Retido	FRV
Massa (kg)	11,172	6,468	4,701	2,4

**Figura 5.7.** Comportamento do fluxo permeado e evolução do fator de redução volumétrica (FRV) durante o processamento, por microfiltração, do suco de romã, previamente submetido à filtração em malha de 150  $\mu\text{m}$ .

A Figura 5.7 também apresenta o comportamento do fluxo permeado ao longo do processo de microfiltração do suco de romã previamente filtrado em malha de 150  $\mu\text{m}$ . Obteve-se um fluxo médio de 17,1  $\text{kg h}^{-1}\text{m}^{-2}$  e um fluxo máximo de 25,0  $\text{kg h}^{-1}\text{m}^{-2}$ . A redução contínua do fluxo de permeado ao longo do tempo deve-se ao fenômeno denominado *fouling*, o qual inclui processos como adsorção de macromoléculas na superfície da membrana ou dentro dos poros e a formação da camada de torta, sendo muito comum no processamento de sucos (GOMES, 2006).

Como esperado, o fluxo permeado apresentou uma maior redução nos estágios iniciais do processo e permaneceu constante após 55 minutos. Este fenômeno é atribuído ao fato, já comprovado em processos de filtração de suspensões, dos fenômenos de formação de torta e *fouling* atingirem o estado estacionário. A redução do fluxo em 32 %, foi muito inferior aos dados reportados no trabalho de Mirsaedghazi et al. (2010). Neste, o fluxo máximo

alcançado para um sistema também de membranas poliméricas de  $0,22 \mu\text{m}$  foi de  $18 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^2$  e o médio alcançado igual a  $4 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^2$ , o que representa uma redução de 78% do fluxo inicial. O valor elevado de fluxo médio observado no presente trabalho ocorreu muito provavelmente devido à etapa de filtração do suco em malha fina ( $150 \mu\text{m}$ ) antes da etapa de microfiltração, o que reduziu a concentração de fibras no mesmo.

A figura 5.8 ilustra o processo de microfiltração do suco de romã previamente filtrado e as frações obtidas no mesmo.

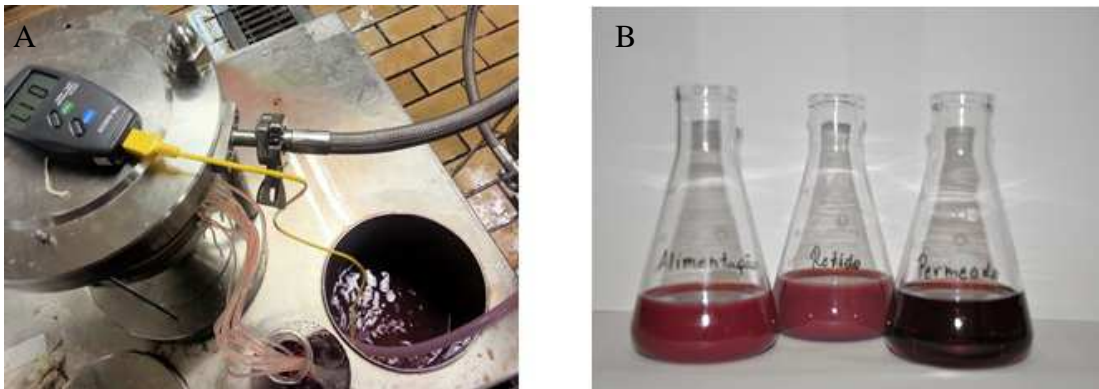


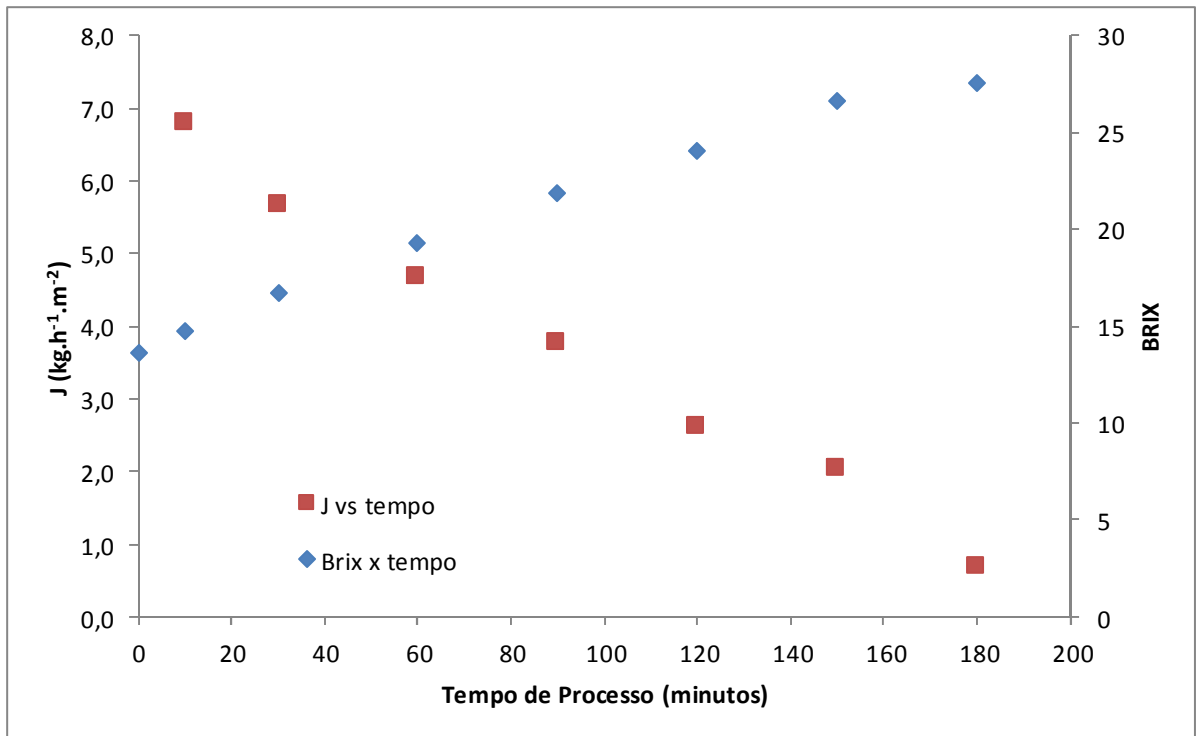
Figura 5.8. A: Processo de microfiltração do suco de romã; B: Frações do processo de microfiltração do suco de romã: alimentação, retido e permeado (suco clarificado)

### 5.2.5 Osmose Inversa (OI)

O fator de concentração (FC) do processo calculado pela razão entre as correntes de retido e de alimentação foi igual a 2,3 (Tabela 5.7 e Figura 5.9). Partiu-se de uma alimentação (permeado da microfiltração) com  $14,0 \text{ }^\circ\text{Brix}$ , chegando-se a um retido com  $27,6 \text{ }^\circ\text{Brix}$ , o que representa um fator de concentração (FC) para sólidos solúveis de aproximadamente 2,0, valor este coerente com o FC calculado na tabela 5.7. Matta *et al.* (2007) realizaram a concentração por osmose inversa do suco de uva, tendo obtido fator de concentração igual a 1,9 e teor de sólidos solúveis de  $28,5 \text{ }^\circ\text{Brix}$ . Durante a concentração de suco de abacaxi, Couto (2008) obteve FC igual a 2,2 e teor de sólidos solúveis igual a  $24,5 \text{ }^\circ\text{Brix}$ .

**Tabela 5.7.** Balanço de massa da etapa de osmose inversa do suco de romã

	Alimentação (suco clarificado)	Permeado	Retido	FC
Processo	6330,1 g	3565,2 g	2764,9 g	2,3



**Figura 5.9.** Evolução do teor de sólidos solúveis e comportamento do fluxo de permeado durante o processamento, por osmose inversa, do suco de romã microfiltrado.

Como pode ser observado na figura 5.9, foi possível obter um fluxo após metade do processo (90 minutos) igual a  $3,3 \text{ kg.h}^{-1}\text{m}^{-2}$ . Sipoli e Barros (2011) alcançaram após 40 minutos do processo de concentração de suco de maracujá, fluxo igual a  $4,3 \text{ kg.h}^{-1}\text{m}^{-2}$ , sob pressão de 40 bar. Este dado indica uma coerência com os valores representados na figura 5.10, onde após 40 minutos do processo de concentração do suco de romã, a 60 bar, o fluxo medido foi de aproximadamente  $5,0 \text{ kg.h}^{-1}\text{m}^{-2}$ .

É possível observar ainda durante o processo de concentração por osmose inversa o decaimento do fluxo, o qual pode ser atribuído ao fenômeno conhecido como polarização da concentração na superfície da membrana. O mesmo comportamento é reportado em trabalhos similares da literatura (MATTA et al., 2007).

Nas figuras 5.10 e 5.11 estão ilustrados o processo de osmose inversa do suco de romã e as frações obtidas nos dois processos de separação por membrana (MF e OI).



**Figura 5.10.** Processo de osmose inversa do suco de romã previamente microfiltrado.



**Figura 5.11.** Frações dos processos de microfiltração e osmose inversa do suco de romã na seguinte ordem: Alimentação MF; Permeado MF; Retido MF; Alimentação OI; Permeado OI; Retido OI.

### 5.3 Técnicas analíticas

#### 5.3.1 Análise de açúcares por CLAE

Os sucos de romã, as correntes de alimentação, retido e permeado da microfiltração, e as correntes de retido e permeado da osmose inversa foram avaliados quanto ao teor de açúcares pela técnica de CLAE (Tabela 5.8).

**Tabela 5.8.** Concentração em  $\text{g.100g}^{-1}$  de açúcares nas correntes dos processos de microfiltração e osmose inversa

	Frutose ( $\text{g.100g}^{-1}$ )	Glicose ( $\text{g.100g}^{-1}$ )	Sacarose ( $\text{g.100g}^{-1}$ )
Alimentação MF*	$7,38 \pm 0,19^a$	$6,91 \pm 0,07^a$	ND
Retido MF	$7,23 \pm 0,21^a$	$6,82 \pm 0,49^a$	ND
Permeado MF**	$6,99 \pm 0,10^a$	$6,39 \pm 0,42^a$	ND
Retido OI	$13,5 \pm 1,21^b$	$11,6 \pm 1,12^b$	ND
Permeado OI	ND	ND	ND

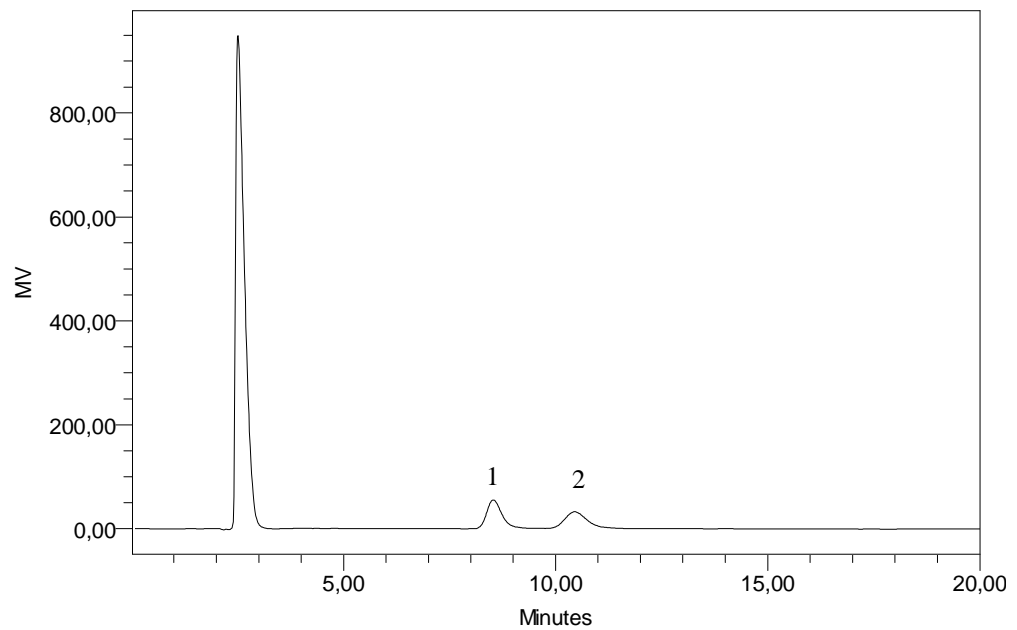
MF.: microfiltração; OI.: osmose inversa; ND.: não detectado. Médias com diferentes letras em cada coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ). \* suco filtrado em malha de  $150 \mu\text{m}$ ; \*\* alimentação da OI

Por se tratar de compostos solúveis em água, a concentração dos açúcares, frutose e glicose, permaneceu igual nas correntes de alimentação, retido e permeado da microfiltração, fato este comprovado estatisticamente (Tukey,  $p < 0,05$ ). Isto significa que para estas substâncias a membrana atuou como um divisor de fluxo.

O suco concentrado por OI apresentou teor de açúcares aproximadamente duas vezes maior que o do suco clarificado, o que já era esperado por ser este um processo que usa membranas densas, permeando somente água e íons. A concentração de açúcares foi proporcional ao fator de concentração volumétrico de 2,3 encontrado para este processo.

Al-Maiman e Ahmad (2002) encontraram  $7,26 \text{ g.100g}^{-1}$  de glicose no suco de romã e não detectaram sacarose no mesmo, o que corrobora os resultados encontrados no presente estudo.

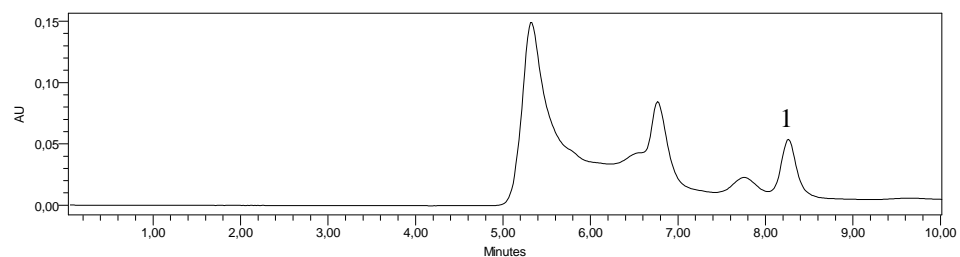
Ressalta-se que todas as frações apresentaram o mesmo perfil cromatográfico, tendo variado apenas a magnitude dos picos, o que é proporcional à concentração dos analitos (Figura 5.12).



**Figura 5.12.** Cromatograma da análise de açúcares do retido do processo de osmose inversa do suco de romã (pico 1: frutose; pico 2: glicose).

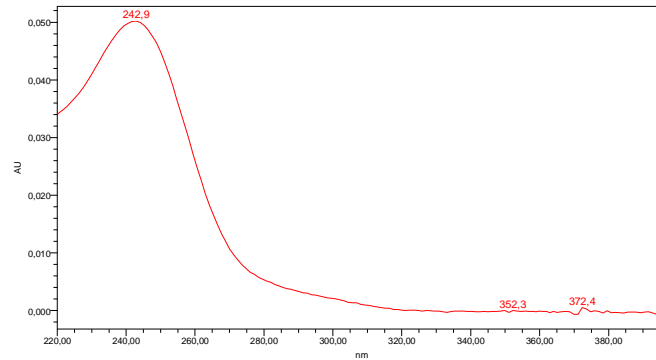
### 5.3.2 Análise de ácido ascórbico por CLAE

No presente estudo detectou-se ácido ascórbico no suco de romã integral por CLAE através de comparação com padrão analítico (Figuras 5.13 a 5.16) na concentração de  $9,33 \pm 0,20 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  para o suco do obtido de frutos do primeiro lote e  $8,57 \pm 0,11 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  para o suco obtido de frutos do segundo lote, sendo estes valores considerados sem diferença significativa (Tukey,  $p < 0,05$ ).

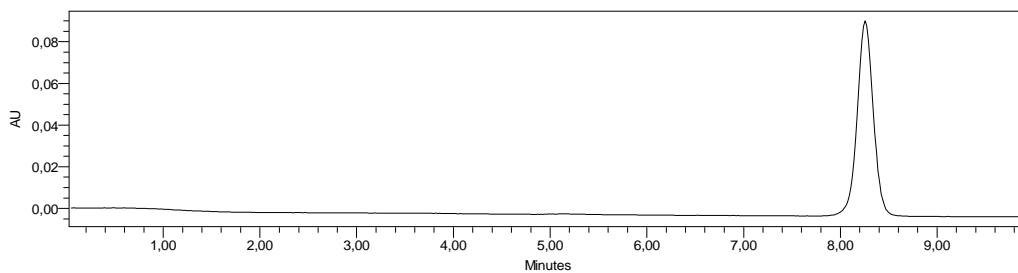


**Figura 5.13.** Cromatograma da análise de ácido ascórbico do suco de romã integral (pico 1: ácido ascórbico).

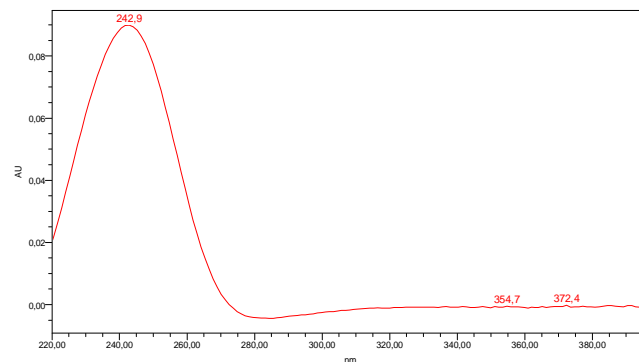




**Figura 5.14.** Espectro de absorção de UV/Vis a 243 nm do pico de ácido ascórbico detectado no suco de romã integral



**Figura 5.15.** Cromatograma do padrão analítico comercial de ácido ascórbico



**Figura 5.16.** Espectro de absorção de UV/Vis a 243 nm do padrão analítico comercial de ácido ascórbico

A análise de ácido ascórbico do suco de romã integral foi realizada como parte da caracterização da matéria-prima, não tendo sido realizada nos outros produtos obtidos (microcápsulas, suco clarificado e suco concentrado).

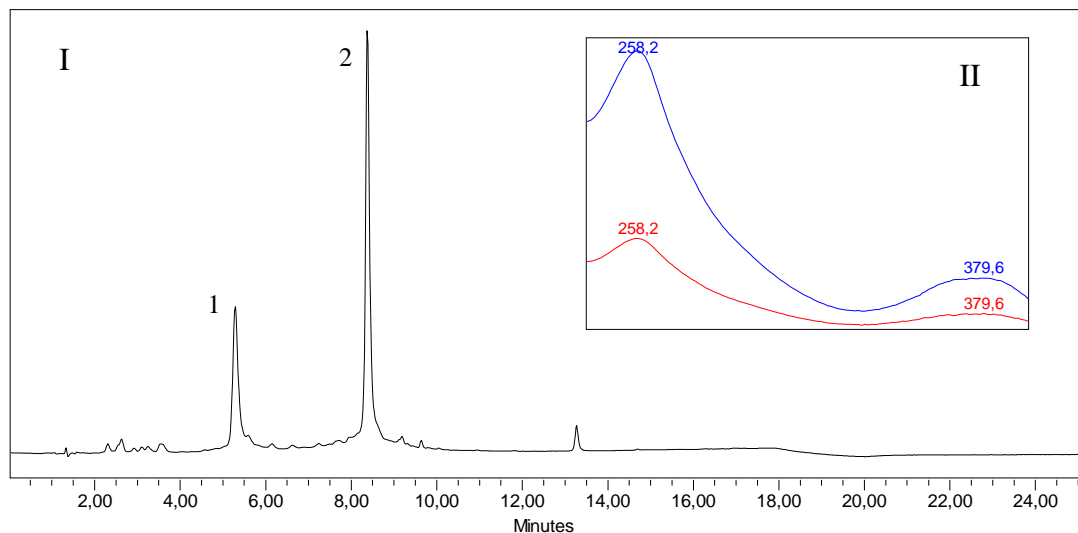
Embora alguns autores relatem a baixa concentração ou ausência deste composto no fruto (MARTÍ, PÉREZ-VICENTE e GARCÍA-VIGUERA, 2001; SANTOS et al., 2010), outros indicam justamente o contrário. Tehranifar et al. (2010) ao avaliarem diferentes cultivares de romã encontraram concentrações de ácido ascórbico próximas às do presente trabalho, variando entre 9,91 a 20,92 mg.100g<sup>-1</sup>. Entretanto, Dumlu e Gurkan (2007), ao

estudarem diferentes cultivares de romã reportaram concentrações deste composto nas amostras na faixa de 312 a 1050 mg.100 g<sup>-1</sup>.

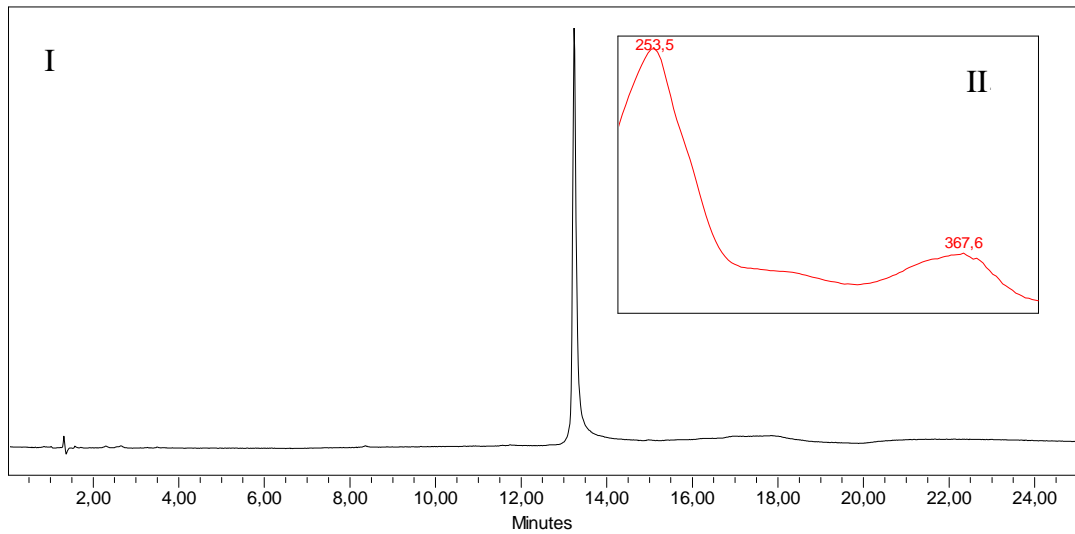
Uma explicação para a divergência de resultados é que a composição da romã é fortemente dependente do cultivar, da região de crescimento, clima, maturidade e práticas de cultura (HOLCROFT, GIL e KADER, 1998; MELGAREJO e ARTES, 2000; HESHI et al., 2001; OZKAN, 2002). Além disso, a precisão da técnica analítica utilizada também influencia diretamente no resultado obtido.

### 5.3.3 Análise de punicalagina e ácido elágico por CLAE

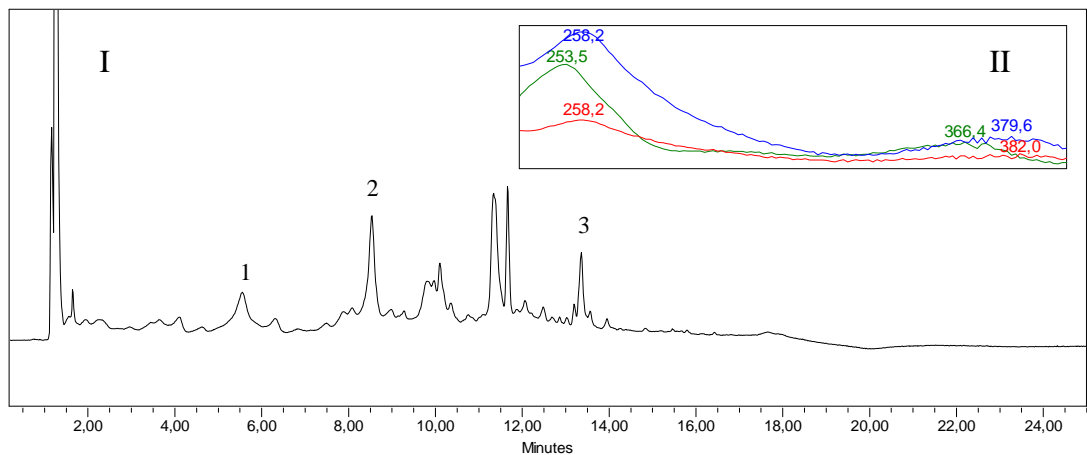
A identificação da punicalagina e do ácido elágico no suco de romã integral foi realizada pela comparação dos tempos de retenção e dos espectros de absorção UV/Visível dos padrões comerciais (Figuras 5.17 a 5.19), além da comparação com dados da literatura como os estudos realizados por Gil *et al.* (2000) e Çam e HiŞil (2010).



**Figura 5.17.** I: Cromatograma obtido do padrão comercial de punicalagina (picos 1 e 2: isômeros da punicalgina). II: Espectro de absorção UV/Visível a 260nm (em vermelho: espectro do pico 1; em azul: espectro do pico 2).



**Figura 5.18.** Cromatograma obtido do padrão comercial de ácido elágico. II: Espectro de absorção UV/Visível a 260nm.



**Figura 5.19.** I: Cromatograma obtido do extrato do suco de romã integral a 260 nm (picos 1 e 2: isômeros da punicalagina; pico 3: ácido elágico livre). II: Espectro de absorção UV/Visível dos isômeros de punicalagina e ácido elágico a 260 nm (em vermelho: espectro do pico 1; em azul: espectro do pico 2; em verde: espectro do pico 3)

Ainda que presentes em maior concentração nas cascas e nas membranas que envolvem os arilos, a punicalagina e o ácido elágico foram encontrados no suco de romã do primeiro lote, como apresentado na tabela 5.9, porém em concentrações muito inferiores às obtidas na casca (Punicalagina pico A:  $3010 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ; Punicalagina pico B:  $7000 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ; Ácido elágico:  $350 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ). Este resultado indica que quando o suco é obtido a partir dos arilos e não do fruto inteiro, é esperado uma baixa concentração destes compostos conforme já reportado por Wasila et al. (2013).

**Tabela 5.9.** Concentração em mg.100g<sup>-1</sup> de isômeros de punicalagina e ácido elágico no suco de romã integral

	Punicalagin a - Pico A (mg.100g <sup>-1</sup> )	Punicalagin a - Pico B (mg.100g <sup>-1</sup> )	Ácido elágico (mg.100g <sup>-1</sup> )
Suco de romã integral	11,81 ± 0,27	22,46 ± 0,30	1,44 ± 0,08

Çam e HiŞil (2010) também encontraram elevada concentração de punicalagina total igual a 11660 mg.100g<sup>-1</sup> (somatório das concentrações dos isômeros) na casca de romã, indicativo da predominância deste composto na casca do fruto.

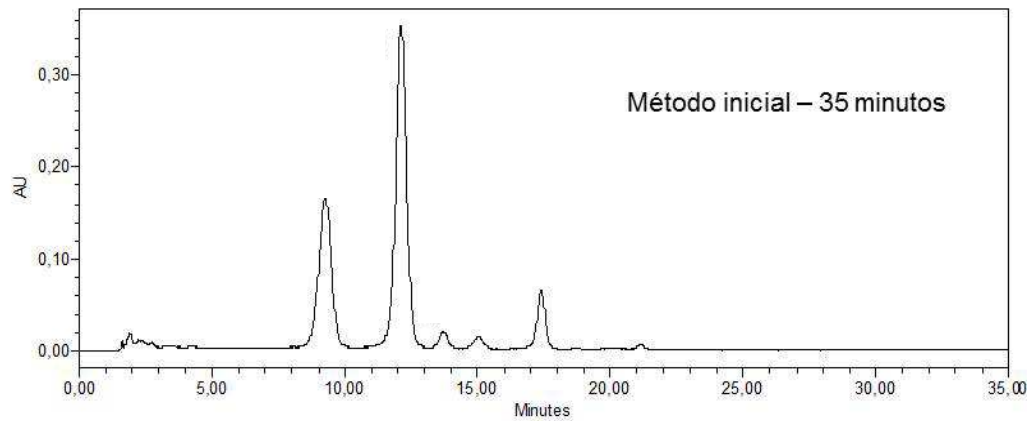
No suco de romã obtido a partir de frutos do 2º lote não foi detectada a presença de punicalagina e ácido elágico. Este fato já era esperado já que houve um maior cuidado na remoção dos arilos, havendo assim uma menor transferência de mesocarpo e consequentemente de punicalagina e ácido elágico para o suco extraído.

Os taninos, como a punicalagina, embora tenham potencial bioativo, interferem nas características sensoriais do suco de romã, deixando-o com sabor amargo e indesejado pelas indústrias de bebidas (VARDIN e FENERCIOĞLU, 2003). Dependendo do interesse de aplicação esta característica poderá ser um fator a ser considerado na elaboração de produtos de romã.

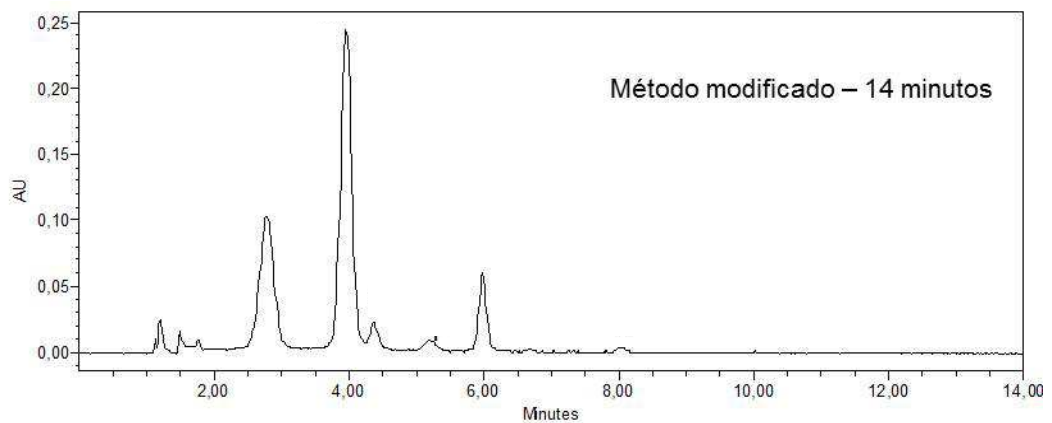
#### 5.3.4 Modificação do método cromatográfico para a análise de antocianinas

O desenvolvimento de novas tecnologias utilizadas para a preparação da fase estacionária com partículas de menor diâmetro (2,4 µm) que as convencionais (3,5 µm) possibilitou a redução do tempo de corrida de 35 para 14 minutos (Figuras 5.20 e 5.21). Ressalta-se que o uso da acetonitrila na fase móvel, em substituição ao metanol, tornou a polaridade desta fase mais próxima à da fase estacionária, deixando a primeira mais competitiva frente à fase estacionária, acelerando assim a eluição dos analitos.

Métodos por CLAE para análise de antocianinas, como o descrito por Brito *et al.* (2007), geralmente utilizam colunas C18 (150 mm x 4,6 mm; 3,5 µm), resultando em uma corrida cromatográfica mais longa. A busca por métodos mais rápidos, mais econômicos e eficientes, que gerem menos resíduos, está aumentando nos últimos tempos.



**Figura 5.20.** Cromatograma da análise de antocianinas do suco de romã, com metodologia convencional



**Figura 5.21.** Cromatograma da análise de antocianinas do suco de romã, com metodologia modificada

Foi possível obter uma resolução de 100% para quatro picos e 96% para o segundo pico em relação ao terceiro. Este resultado é considerado satisfatório para uma boa integração dos picos. Nestas condições, obteve-se picos mais finos, o que reduz as possibilidades de haver coeluição entre eles.

De uma forma geral, as novas condições proporcionaram redução de 60% no tempo de análise, 76% na quantidade de solvente utilizado e, conseqüentemente, do resíduo gerado sendo, portanto esta uma boa prática do ponto de vista técnico e econômico (Tabela 5.10).

**Tabela 5.10**– Comparação dos impactos entre os métodos de análise de antocianinas em romã

	Tempo de análise (min) <sup>*</sup>	Volume de solvente utilizado por análise (mL) <sup>**</sup>	Gasto com solvente por análise (R\$) <sup>***</sup>
Método tradicional	35	4,45	0,08
Método proposto	14	1,05	0,04

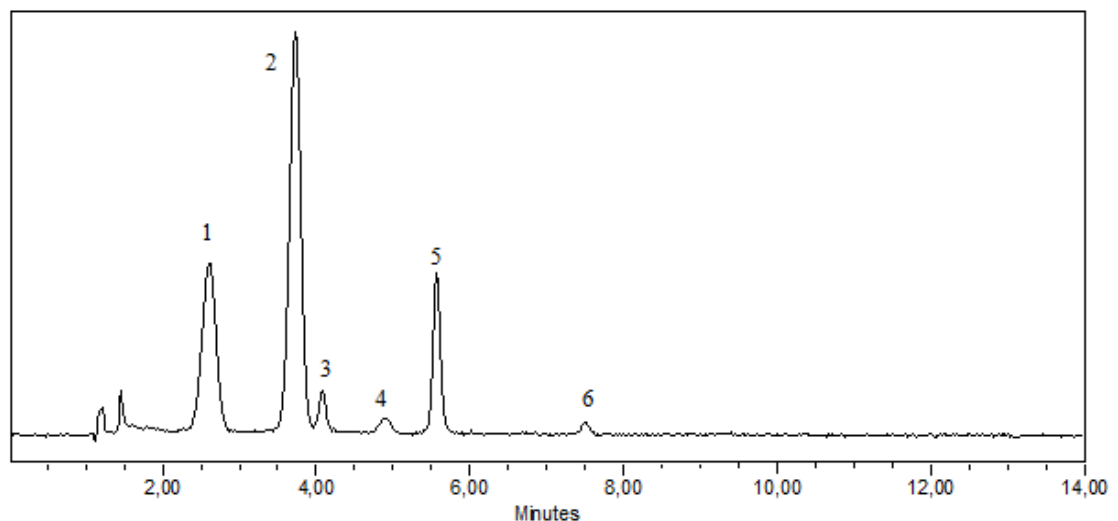
\*Entende-se por análise uma corrida cromatográfica;

\*\*Volumes de metanol (método antigo) e acetonitrila (método novo) calculados com base nos gradientes de eluição e considerando fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>;

\*\*\*Valores considerados para cálculo (cotação TEDIA): Metanol (4 L) - R\$70,00; acetonitrila (4 L) – R\$160,00.

### 5.3.5 Identificação das antocianinas da romã

Foi possível identificar seis antocianinas (delfinidina-3,5-diglicosídeo; cianidina-3,5-diglicosídeo; delfinidina-3-glicosídeo; pelargonidin-3,5-diglicosídeo; cianidina-3-glicosídeo; pelargonidin-3-glicosídeo) a partir da análise cromatográfica do suco de romã (Figura 5.22), sendo estes compostos típicos deste fruto e que proporcionam uma cor vermelha específica para o suco.



**Figura 5.22.** Cromatograma da análise de antocianinas do suco de romã (pico 1: delfinidina 3,5 – diglicosídeo; pico 2: cianidina 3,5 – diglicosídeo; pico 3: delfinidina 3 – glicosídeo; pico 4: pelargonidina 3,5 – diglicosídeo; pico 5: cianidina 3 – glicosídeo; pico 6: pelargonidina 3 – glicosídeo).

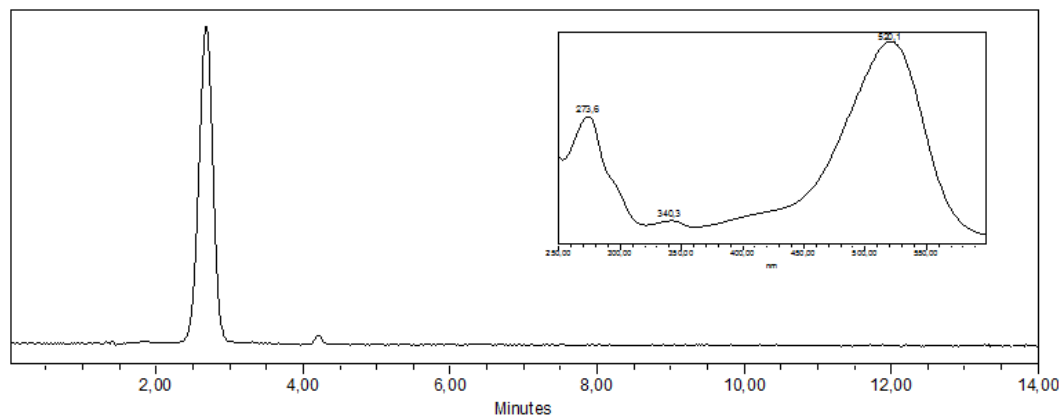
Volp et al. (2008) associaram as agliconas delfinidina, cianidina e pelargonidina, das quais são derivadas as antocianinas encontradas na romã, aos pigmentos básicos violeta para a primeira e vermelho para as duas últimas. Desta forma, apesar da coloração do suco ser proveniente da contribuição de todas as antocianinas, como observado no perfil mostrado na

figura 5.22, a antocianina majoritária é a cianidina-3,5-diglicosídeo havendo, portanto a predominância do pigmento vermelho na coloração do suco de romã avaliado. O mesmo perfil antociânico foi também reportado por outros autores (GIL et al., 2000; JAISWAL et al., 2010).

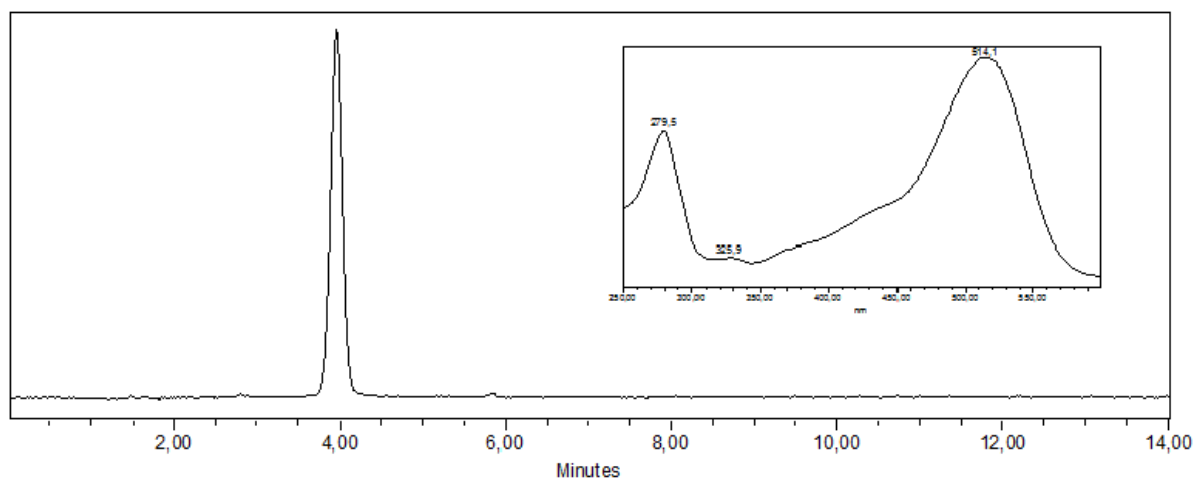
### 5.3.6 Obtenção dos padrões de antocianinas

#### 5.3.6.1 Isolamento das antocianinas por CLAE

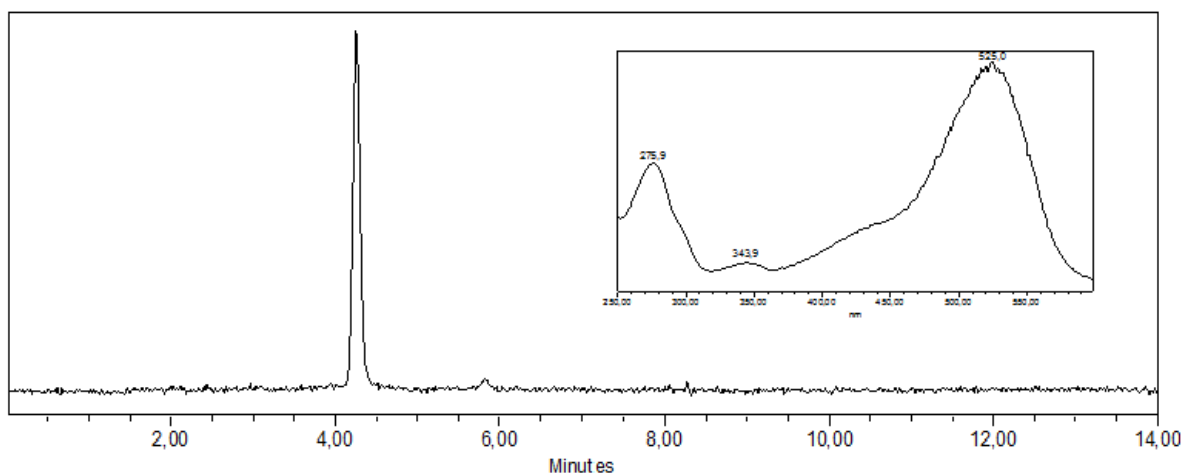
A partir das matrizes escolhidas como fonte das seis antocianinas presentes no suco de romã foi possível separar por CLAE estes compostos com elevado grau de pureza a 520 nm (Figuras 5.23 a 5.28), sendo este o mesmo comprimento de onda no qual as antocianinas são detectadas e quantificadas no método analítico proposto. A pureza dos padrões isolados a 520 nm, determinada pelo percentual de área dos picos, variou de 98 a 99%.



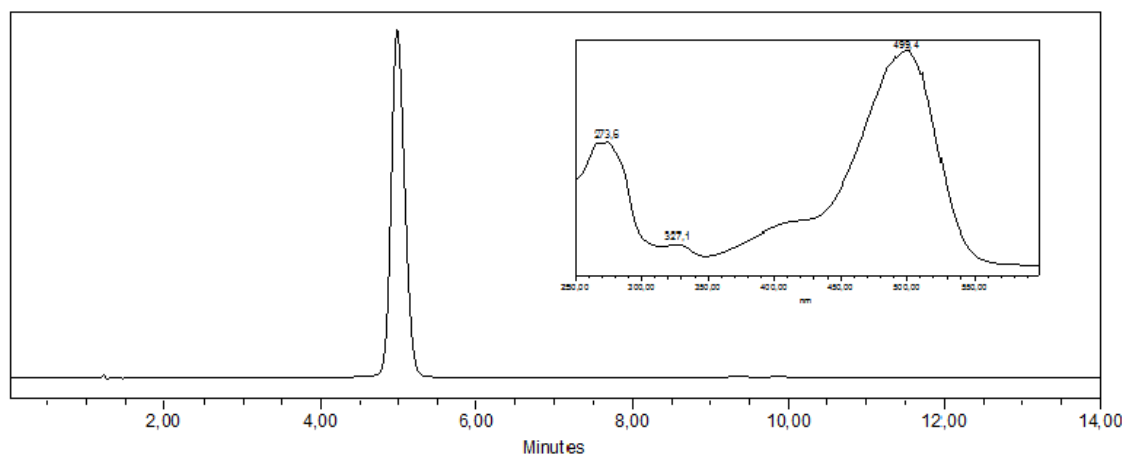
**Figura 5.23.** Cromatograma e espectro UV/Vis a 520 nm da delphinidina-3,5-diglicosídeo isolada do fruto de jambolão (Pureza = 98%)



**Figura 5.24.** Cromatograma e espectro UV/Vis a 520 nm da cianidina-3,5-diglicosídeo isolada do fruto de jambolão (Pureza = 99,2%)

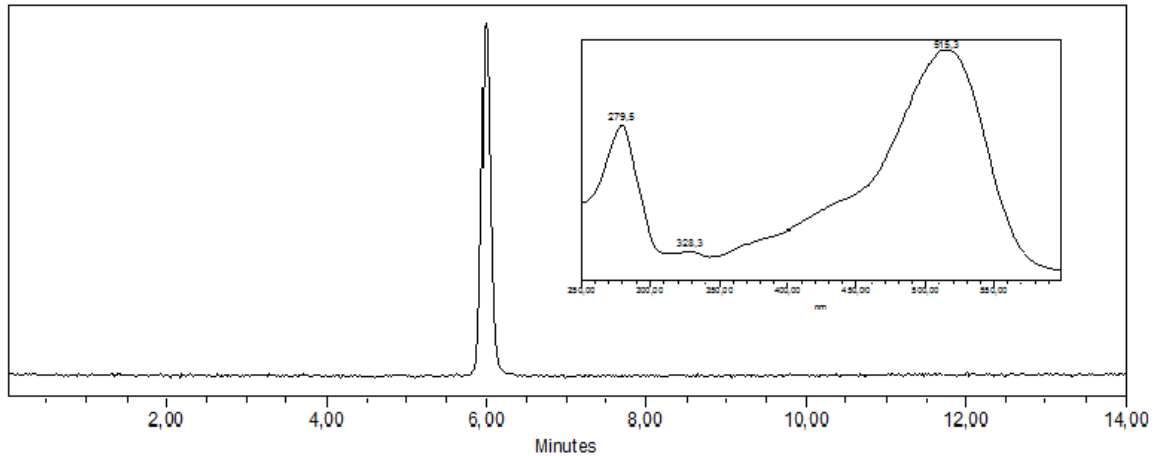


**Figura 5.25.** Cromatograma e espectro UV/Vis a 520 nm da delphinidina-3-glicosídeo isolada do fruto de jaboticaba (Pureza = 98%)

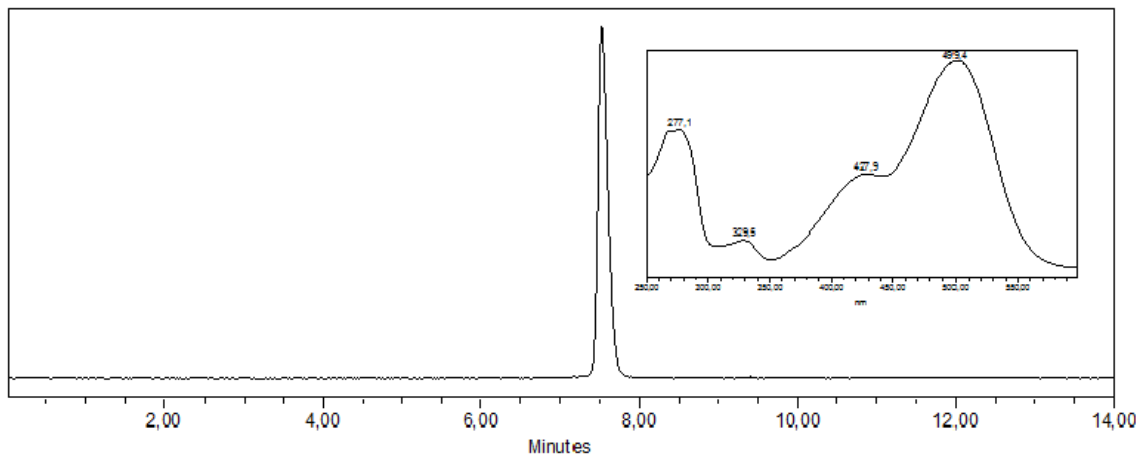


**Figura 5.26.** Cromatograma e espectro UV/Vis a 520 nm da pelargonidina-3,5-diglicosídeo isolada da flor de romã (Pureza = 99,1%)





**Figura 5.27.** Cromatograma e espectro UV/Vis a 520 nm da cianidina-3-glicosídeo isolada do fruto de amora-preta (Pureza = 99,6%)



**Figura 5.28.** Cromatograma e espectro UV/Vis a 520 nm da pelargonidina-3-glicosídeo isolada do fruto de morango (Pureza = 99,9%)

Os valores elevados de pureza obtido nos comprimentos de onda de 280 e 360 nm para todos os compostos foram acima de 90%, assegurando que não houve interferentes que possam ter causado efeitos batocrômico (aumento da absorção) ou hipsocrômico (redução na absorção) no espectro de ultravioleta/ visível de absorção, o que interferiria no cálculo das concentrações dos compostos isolados.

#### 5.3.6.2 *Confirmação por espectrometria de massas*

A técnica de espectrometria de massas de alta resolução permitiu a identificação e confirmação das antocianinas isoladas. A identificação foi possível a partir dos dados da relação  $m/z$  de cada íon molecular e de suas fragmentações (Tabela 5.11). A comparação

entre as relações m/z calculadas e observadas, com erro mínimo entre as mesmas, confirma a exatidão do equipamento utilizado.

**Tabela 5.11.** Identificação das antocianinas isoladas por espectrometria de massa.

Pico	$t_R$ (min)	$[M]^+$ (m/z)		EM/EM		Antocianina
		calculado	observado	(m/z)	(m/z)	
				calculado	observado	
1	1,8	627,1561	627,1068	465,1033/ 303,0505	465,0720/ 303,0270	Delfinidina- 3,5- diglicosídeo
2	2,6	611,1561	611,1563	449,1084/ 287,0556	449,1129/ 287,0511	Cianidina-3,5- diglicosídeo
3	2,9	465,1033	465,0720	303,0508	303,0270	Delfinidina-3- glicosídeo
4	3,6	595,1662	595,1049	433,1134/ 271,0606	433,0876/ 271,0589	Pelargonidina- 3,5- diglicosídeo
5	4,0	449,1084	449,1129	287,0556	287,0511	Cianidina-3- glicosídeo
6	5,4	433,1134	433,0876	271,0606	271,0589	Pelargonidina- 3-glicosídeo

$t_R$  - tempo de retenção;  $[M]^+$  (m/z) - razão massa/ carga do íon molecular; EM/EM (m/z) - razão massa/ carga das transições.

### 5.3.6.3 Cálculo da concentração dos padrões

Na tabela 5.12 estão apresentadas as concentrações de cada um dos padrões isolados em solução 5% ácido fórmico: metanol (90:10, v/v), calculadas por espectrofotometria de UV/Vis, conforme item 4.5.6.4 de Material e Métodos.

**Tabela 5.12.** Concentração dos padrões isolados

Antocianina	Concentração (mg.5 mL <sup>-1</sup> )
Delfinidina-3,5-diglicosídeo	0,51
Cianidina-3,5-diglicosídeo	0,52
Delfinidina-3-glicosídeo	0,07
Pelargonidina-3,5-diglicosídeo	0,02
Cianidina-3-glicosídeo	0,57
Pelargonidina-3-glicosídeo	0,03

#### 5.3.6.4 *Elaboração das curvas analíticas*

Curvas analíticas foram construídas a partir de cada antocianina isolada, obtendo-se alta correlação (Tabela 5.13).

**Tabela 5.13.** Dados das curvas analíticas

Antocianina	Dados da curva de calibração		Faixa de concentração (µg.mL <sup>-1</sup> )
	Equação	(R <sup>2</sup> )	
Delfinidina-3,5-diglicosídeo	Y=9,89*10 <sup>6</sup> X + 3,45*10 <sup>4</sup>	0,999	3,20 – 102,3
Cianidina-3,5-diglicosídeo	Y=8,23*10 <sup>6</sup> X + 3,00*10 <sup>5</sup>	0,989	25,75 – 103,0
Delfinidina-3-glicosídeo	Y=1,09*10 <sup>7</sup> X + 3,35*10 <sup>4</sup>	0,995	3,25 – 13,0
Pelargonidina-3,5-diglicosídeo	Y=4,59*10 <sup>7</sup> X + 4,61*10 <sup>3</sup>	0,992	0,27 – 3,58
Cianidina-3-glicosídeo	Y=9,55*10 <sup>6</sup> X + 2,65*10 <sup>4</sup>	0,998	1,21 – 21,21
Pelargonidina-3-glicosídeo	Y=4,59*10 <sup>7</sup> X + 4,61*10 <sup>3</sup>	0,998	0,27 – 2,16

Com os resultados obtidos pode-se observar que todas as seis antocianinas isoladas podem ser utilizadas como padrões analíticos, uma vez que além dos graus de pureza elevados, todas tiveram a identidade confirmada por uma técnica sensível, tal como a espectrometria de massa de alta resolução.

Como descrito por Müller, Schantz e Richling (2012) a utilização de padrões de antocianinas individuais isolados reflete melhor o conteúdo absoluto destes compostos em

solução do que a utilização de apenas uma antocianina para calcular a concentração por equivalência. Os mesmos autores encontraram maiores teores de antocianinas nos frutos de mirtilo (*Vaccinium myrtillus* L.) usando na etapa de quantificação dos padrões individuais isolados do que quando usaram somente o padrão de cianidina-3-glicosídeo por equivalência.

Desta forma, o método proposto para obtenção de padrões de antocianinas é uma ferramenta importante para o controle de qualidade da bebida e outros produtos de romã. Essa possibilidade de avaliação é importante não só para os consumidores, mas para a indústria como um todo, uma vez que passa a ser uma forma de compreender e otimizar alguns parâmetros operacionais que poderiam influenciar na estabilidade de antocianinas.

### 5.3.7 Análise das antocianinas do suco de romã por CLAE

A partir da análise de antocianinas (principal classe de compostos avaliada no presente estudo) foi possível avaliar o perfil das mesmas em todas as correntes dos processos, sendo possível obter uma resposta em relação à qualidade dos produtos obtidos.

Na tabela 5.14 encontram-se os valores detectados de antocianinas totais nos sucos integrais de romã do primeiro e segundo lotes.

**Tabela 5.14.** Concentração em  $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$  de antocianinas totais nos sucos integrais de romã

	Antocianinas totais ( $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ )
Suco integral – 1º lote	$28,3 \pm 0,03^a$
Suco integral – 2º lote	$5,45 \pm 0,01^b$

Valores referentes à média de triplicatas. Médias com diferentes letras indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Foi observada uma diferença significativa entre a concentração de antocianinas dos dois lotes utilizados no presente trabalho. Isto ocorreu provavelmente devido às diferenças identificadas no estágio de maturação dos frutos. Entretanto, estes valores estão na faixa reportada por Tehranifar et al. (2010) para as concentrações de antocianinas totais em diferentes cultivares de romã (5,56 a  $30,1 \text{ mg}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ).

Durante o período de cultivo das romãzeiras do segundo lote, a região do semiárido onde se encontra a fazenda fornecedora dos frutos, enfrentou uma seca acima dos padrões usuais para a região afetando o adequado desenvolvimento e maturação dos mesmos. Sabe-se ainda que o conteúdo de antocianinas no fruto pode variar de acordo com a espécie, variedade, maturidade, condições climáticas e cultivar (MAZZA, 1995). Altas temperaturas

como foi o caso registrado na região, influenciam negativamente na síntese de antocianinas por parte da planta (SPAYD et al., 2002).

A principal diferença entre os frutos, conforme pode ser observada na Figura 5.29, é a coloração dos arilos, que está diretamente relacionada à concentração de antocianinas presentes nos mesmos.



**Figura 5.29.** Esquerda: arilos de frutos de romã do segundo lote com baixa concentração de antocianinas ( $5,45 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ). Direita: arilos dos frutos do primeiro lote com maior concentração de antocianinas ( $28,31 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ).

#### 5.3.8 Perfil de antocianinas nas correntes do processo de filtração em malha

Conforme ilustrado na tabela 5.15, a concentração de antocianinas totais na torta da filtração equivalente a  $28,22 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ . Considerando que a massa de torta obtida foi igual a 230 g (Tabela 5.5), estima-se um valor de 0,07 g de antocianinas na mesma, o que equivale a apenas 2% das antocianinas totais presentes no suco integral de romã. Gil (2008) observou uma perda de antocianinas elevada na etapa de centrifugação conduzida como pré-tratamento para o processo de microfiltração do açaí, provavelmente devido à elevada quantidade de fibras presente na matriz processada o que gerou uma maior quantidade de torta (precipitado da centrifugação), tendo encontrado no suco de açaí centrifugado apenas 48% das antocianinas totais presentes no suco integral.

**Tabela 5.15.** Concentração em mg.100<sup>-1</sup>g de antocianinas na torta da filtração

	Delfinidina-3,5-diglicosídeo (mg.100g <sup>-1</sup> )	Cianidina-3,5-diglicosídeo (mg.100g <sup>-1</sup> )	Delfinidina-3-glicosídeo (mg.100g <sup>-1</sup> )	Pelargonidina-3,5-diglicosídeo (mg.100g <sup>-1</sup> )	Cianidina-3-glicosídeo (mg.100g <sup>-1</sup> )	Pelargonidina-3-glicosídeo (mg.100g <sup>-1</sup> )
Torta filtração	10,32±0,08	0,33±0,01	ND	ND	17,57±0,88	ND

ND.: não detectado.

### 5.3.9 Perfil de antocianinas nas correntes dos processos de separação em membrana

Os resultados da concentração de antocianinas totais das correntes dos processos de microfiltração (MF) e osmose inversa (OI) por CLAE são apresentados na Tabela 5.16.

**Tabela 5.16.** Concentração em mg.100g<sup>-1</sup> de antocianinas totais nas frações dos processos de MF e OI

	Antocianinas totais (mg.100 g <sup>-1</sup> )
Alimentação MF	24,36 ± 0,56 <sup>a</sup>
Retido MF	22,16 ± 0,49 <sup>b</sup>
Permeado MF	18,83 ± 0,64 <sup>c</sup>
Retido OI	43,23 ± 0,10 <sup>d</sup>
Permeado OI	ND

ND: não detectado. Médias com diferentes letras indicam diferença significativa (p<0,05).

Retido MF – suco clarificado

Retido OI – suco concentrado

A partir dos resultados da Tabela 5.16, foi possível observar que o suco clarificado (corrente de permeado da microfiltração) continha uma elevada concentração de antocianinas se comparado à corrente de alimentação, o que agrega um maior valor ao produto obtido. A fração retida também apresentou elevada concentração destes compostos, podendo ser utilizada na elaboração de outros produtos como pigmentos naturais utilizados na formulação de alimentos ou cosméticos.

Ainda de acordo com a tabela 5.16 foi possível observar que houve na OI concentração das antocianinas e que o processo foi eficiente na retenção das mesmas, já que não foram encontrados tais compostos na fração de permeado. O fator de concentração (FC) igual a 2,3 para as antocianinas indica que não houve degradação destes compostos, já que o fator de concentração obtido para o processo foi o mesmo valor.

A partir do balanço de massa (quantidade de antocianinas presentes em cada corrente) apresentado na tabela 5.17, considerando apenas o processo de MF, observa-se uma degradação de 18% de antocianinas totais durante o mesmo, já que 38% das antocianinas presentes na alimentação permaneceram na corrente de retido, enquanto 44% migraram para a corrente de permeado (suco clarificado), sendo este o produto final de interesse deste processo.

Fischer *et al.* (2011) compararam o teor de antocianinas totais entre suco de romã não clarificado e suco de romã microfiltrado, e observaram que o segundo apresentou uma redução de 41 % de antocianinas em relação ao primeiro. Comparando-se a influência de dois processos de clarificação de suco de romã (microfiltração e ultrafiltração) em alguns compostos de interesse, Mirsaedghazi et al. (2012) também concluíram que a microfiltração pode promover menor perda dos componentes nutricionais e farmacêuticos do que o processo de ultrafiltração.

Em relação ao processo de osmose inversa, fazendo-se a mesma comparação a partir do balanço de massa (Tabela 5.18) entre as correntes de retido e alimentação (permeado MF) deste processo separadamente, observou-se a retenção do conteúdo total de antocianinas presentes. Palacio (2008) observou uma perda de 51% em antocianinas durante o processo de concentração por OI do suco de açaí previamente clarificado por MF. Nesse caso, os valores para o fator de concentração foram de 9,7 para o teor de sólidos solúveis, 8,3 para os compostos fenólicos totais e 4,7 para as antocianinas. A maior perda observada de antocianinas foi atribuída pelo autor às condições operacionais desfavoráveis, como o baixo volume do tanque de alimentação, o qual pode ter contribuído para a entrada de ar e consequente degradação das antocianinas.

Comparando-se os dois processos, MF e OI, de uma forma integrada, foi possível observar que o produto final, neste caso a corrente de retido (suco concentrado), apresentou, aproximadamente, 56% de redução das antocianinas presentes na corrente de alimentação da MF.

**Tabela 5.17.** Massa total de antocianina (g) nas diferentes correntes dos processos de separação em membrana - Balanço de massa

	Antocianinas totais (g)
Alimentação MF	2,72
Retido MF	1,04
Permeado MF	1,21
Retido OI	1,20
Permeado OI	ND

ND.: não detectado.

### 5.3.10 Perfil de antocianinas das microcápsulas

A formulação que promoveu um produto em pó com maior retenção de antocianinas totais foi a combinação de goma arábica e Capsul<sup>®</sup> (1:1), se diferenciando significativamente de todas as outras (Tabela 5.18). Esta formulação promoveu percentuais de retenção para as antocianinas delphinidina-3,5-diglicosídeo, cianidina-3,5-diglicosídeo, delphinidina-3-glicosídeo, pelargonidina-3,5-diglicosídeo, cianidina-3- glicosídeo e pelargonidina-3-glicosídeo, de 53%, 87%, 99%, 65%, 61% e 53%, respectivamente.



**Tabela 5.18.** Concentração em  $\text{mg.100g}^{-1}$  de antocianinas no suco integral e nos produtos em pó obtidos por *spray drying* nas formulações testadas (base seca)

	Delfinidina-3,5- diglicosídeo ( $\text{mg.100g}^{-1}$ )	Cianidina-3,5- diglicosídeo ( $\text{mg.100g}^{-1}$ )	Delfinidina-3- glicosídeo ( $\text{mg.100g}^{-1}$ )	Pelargonidina-3,5- diglicosídeo ( $\text{mg.100g}^{-1}$ )	Cianidina-3- glicosídeo ( $\text{mg.100g}^{-1}$ )	Pelargonidina-3- glicosídeo ( $\text{mg.100g}^{-1}$ )	Totais ( $\text{mg.100g}^{-1}$ )
Suco integral (base seca)	$50,78 \pm 2,75^a$	$65,75 \pm 2,46^a$	$3,25 \pm 0,01^a$	$2,99 \pm 0,09^a$	$33,53 \pm 1,10^a$	$2,82 \pm 0,02^a$	$159,12^a$
Pó (Suco + capsul)	$20,73 \pm 1,00^c$	$36,95 \pm 0,41^c$	$2,47 \pm 0,01^{b,c}$	$1,24 \pm 0,12^c$	$13,29 \pm 2,23^{c,d}$	$1,10 \pm 0,01^{b,c,d}$	$75,78^{c,d}$
Pó (Suco + maltodextrina)	$14,61 \pm 2,09^d$	$27,09 \pm 4,65^d$	$1,73 \pm 0,18^e$	$0,93 \pm 0,02^{c,d}$	$11,30 \pm 1,52^e$	$0,74 \pm 0,05^e$	$56,40^e$
Pó (Suco + goma)	$19,06 \pm 0,22^d$	$51,51 \pm 2,52^b$	$2,45 \pm 0,19^{c,d}$	$1,92 \pm 0,07^b$	$18,37 \pm 1,57^{b,c}$	$1,45 \pm 0,07^{b,c}$	$94,76^c$
Pó (Suco + capsul + maltodextrina)	$18,76 \pm 0,61^d$	$33,90 \pm 1,88^{c,d}$	$2,27 \pm 0,12^{d,e}$	$1,33 \pm 0,24^{c,d}$	$13,25 \pm 1,00^{d,e}$	$0,87 \pm 0,04^{d,e}$	$70,38^{d,e}$
Pó (Suco + goma + capsul)*	$27,00 \pm 0,74^b$	$57,42 \pm 1,17^{a,b}$	$3,23 \pm 0,03^{a,b}$	$1,93 \pm 0,18^b$	$20,43 \pm 0,56^b$	$1,49 \pm 0,12^b$	$111,60^b$
Pó (Suco + goma + maltodextrina)	$20,72 \pm 0,19^c$	$41,83 \pm 0,14^c$	$2,74 \pm 0,12^{a,b,c}$	$1,43 \pm 0,08^c$	$16,59 \pm 0,09^c$	$1,18 \pm 0,07^{b,c,d,e}$	$84,49^{c,d}$
Pó (Ponto central)	$15,80 \pm 1,42^d$	$30,56 \pm 3,46^d$	$1,94 \pm 0,24^{d,e}$	$1,11 \pm 0,11^d$	$12,47 \pm 1,31^{d,e}$	$0,93 \pm 0,17^{d,e}$	$62,81^e$

\*Melhor formulação. Médias com diferentes letras em cada coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Antocianinas totais suco (base seca):  $159,12 \text{ mg.100g}^{-1}$

Antocianinas totais (melhor formulação):  $111,60 \text{ mg.100g}^{-1}$

Tem sido observado que a goma arábica em combinação com maltodextrina ou amido modificado permite uma melhor estabilidade e eficiência do processo de revestimento do que quando os mesmos são utilizados separadamente (KANAKDANDE, BHOSALE e SINGHAL, 2007).

A utilização de produtos em pó obtidos de sucos de fruta como um ingrediente a ser adicionado em formulações de outros produtos com elevado teor de lipídeos, o uso de Capsul<sup>®</sup> no processo de secagem por *spray drying* poderá ser de mais interesse operacional, uma vez que este agente é um amido quimicamente modificado com a incorporação de grupos lipofílicos, facilitando a solubilidade do pó.

Yousefi, Djoumeh e Mousavi (2011) observaram que a goma arábica em combinação com a maltodextrina possibilitam melhores propriedades físicas na retenção das antocianinas em processos de microencapsulação de suco de romã. Salienta-se que no estudo citado não foi avaliada a ação do agente Capsul<sup>®</sup>.

De acordo com King, Trubiano e Perry (1976) os amidos modificados têm a capacidade de formar misturas com baixa consistência evitando a formação de aglomerações e de filme antes do processo de secagem por atomização. Esta pode ser uma explicação para a maior retenção das antocianinas obtida com o uso de Capsul<sup>®</sup>, uma vez que as moléculas reativas ficariam menos próximas umas das outras, reduzindo, assim, por exemplo, a possibilidade de polimerização entre as antocianinas, que interferiria negativamente na concentração das mesmas.

Wang *et al.* (2011) através de estudos *in vitro* demonstraram que o amido modificado associado aos compostos bioativos contribuiu para retardar a liberação dos mesmos em formulações de microcápsulas. Analogamente no organismo humano, pode-se inferir que esta associação aumentaria o tempo de trânsito gastrointestinal, por atuar como um carreador, aumentando a possibilidade de absorção intestinal. Estes experimentos corroboram com aos resultados obtidos no presente trabalho, mostrando que deste agente (Capsul<sup>®</sup>) poderia atuar como um potencial carreador de compostos potencialmente benéficos à saúde, sendo ainda necessários mais estudos a respeito.

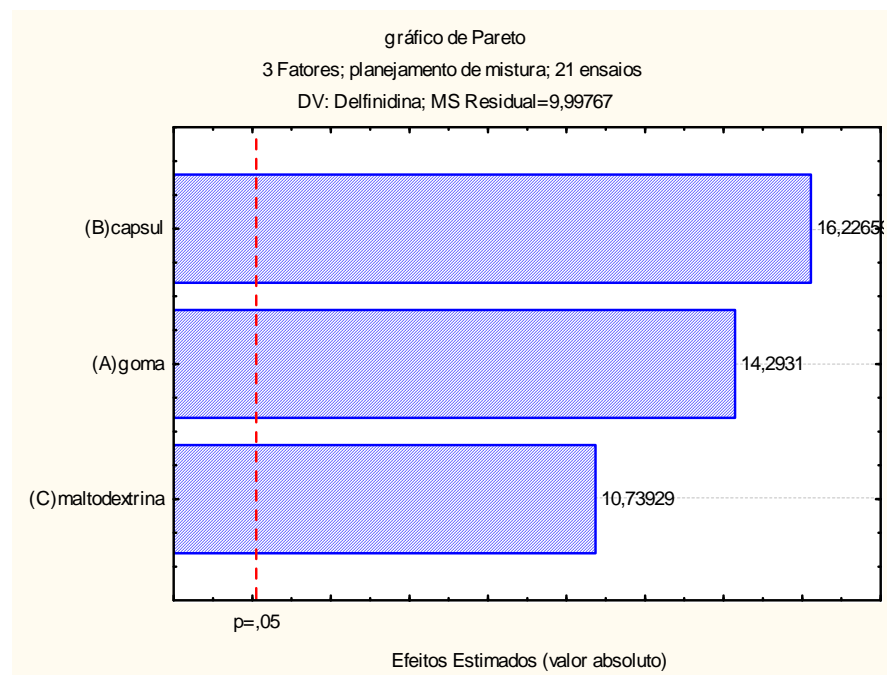
A segunda melhor retenção das antocianinas foi obtida usando apenas goma como agente encapsulante. Esta formulação não apresentou diferença estatística significativa para a combinação de goma arábica e maltodextrina DE5 (1:1), a qual promoveu a terceira melhor retenção de antocianinas.

A retenção de alguns compostos presentes no alimento varia de acordo com o DE da maltodextrina usada durante o processo de secagem por atomização (RODRIGUEZ - HERNANDEZ et al., 2005). Ersus e Yurdagel (2007 ) estudaram a microencapsulação de antocianinas extraídas de cenoura preta (*Daucus carota* L.) e submetidas ao processo de *spray drying* usando diferentes temperaturas de secagem e maltodextrinas de diferentes DE, e observaram a menor retenção de antocianinas com a maltodextrina de maior DE, a qual também promoveu microcápsulas com maior umidade.

Com a formulação com goma e amido modificado, houve uma perda de 30% das antocianinas totais durante o processo. Como observado por Tonon, Brabet e Hubinger (2009), a elevada temperatura do processo de secagem em *spray dryer* ocasiona perdas de antocianinas, o que se deve à alta sensibilidade deste pigmento a temperaturas muito elevadas. Ainda segundo estes autores, embora haja perda destes compostos termolábeis durante o processo em *spray dryer*, quando comparada a de outros processos térmicos, a mesma pode ser considerada reduzida, já que o produto é exposto por pouco tempo a uma alta temperatura.

A análise individual das antocianinas indicou que a delphinidina-3,5-diglicosídeo foi a que apresentou menor retenção, tendo ocorrido uma perda de aproximadamente 53% da mesma. Uma das possíveis explicações para este resultado é a elevada reatividade desta antocianina causada pelo elevado número de grupos hidroxilas no anel B da sua estrutura. Esta característica pode contribuir para a polimerização deste composto, e, conseqüentemente, a redução da sua concentração original. Outra explicação possível é a perda de uma molécula de glicose e transformação desta antocianina diglicosídica na forma monoglicosídica, o que também pode ocorrer com as demais antocianinas diglicosiladas presentes no material processado.

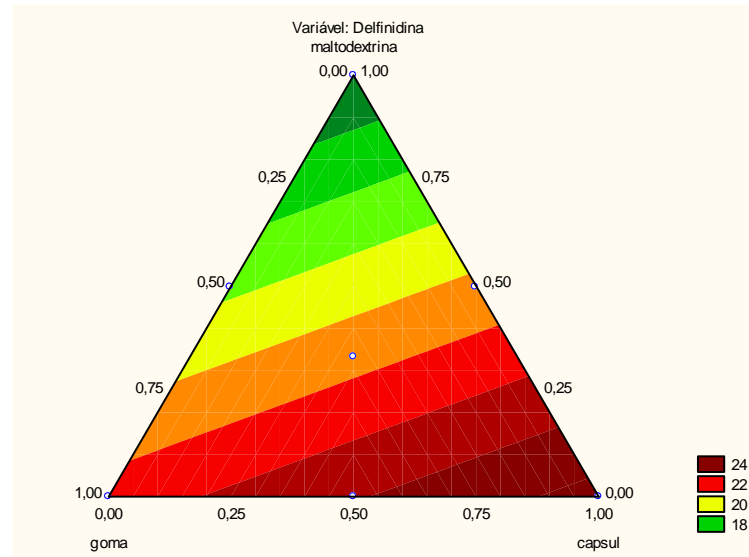
A Figura 5.30 ilustra no gráfico de Pareto que o agente Capsul exerce maior influência na retenção da antocianina delphinidina-3,5-diglicosídeo no processo microencapsulação por *spray drying*.



**Figura 5.30.** Gráfico de Pareto mostrando a influência dos agentes encapsulantes na retenção da antocianina delfinidina-3,5-diglicosídeo.

O diagrama de mistura ternária apresentado na Figura 5.31, estabelece a relação entre os três ingredientes utilizados de forma isolada ou em misturas, na formulação para a microencapsulação das antocianinas do suco de romã. Observando este diagrama tem-se uma região estabelecida com as possíveis condições que propiciem maior retenção da antocianina delfinidina-3,5-diglicosídeo. Formulações de misturas ternárias que considerem a adição acima de 50% de goma arábica, até 25% de maltodextrina e 100% Capsul<sup>®</sup> estão na região de maior retenção desta antocianina. A elaboração de microcápsulas utilizando misturas de ingredientes é interessante do ponto de vista das futuras aplicações podendo ser utilizadas em alimentos de bases hidrofílicas ou de bases lipofílicas. Além disso, permitirá uma maior flexibilidade considerando o sistema de produção agroindustrial onde o fator de custos e facilidade de aquisição de insumos são fatores importantes a serem considerados em estudos de viabilidade técnico-econômica.

Partindo desta informação e avaliando as informações da Tabela 5.18, pode-se observar que a formulação contendo amido modificado (Capsul<sup>®</sup>) e goma arábica alcançou melhor resultado na retenção desta antocianina.



**Figura 5.31.** Diagrama de mistura ternária mostrando a influência dos agentes encapsulantes na retenção da antocianina delfinidina-3,5-diglicosídeo.

## 5.4 Avaliação da estabilidade dos produtos obtidos

O estudo de estabilidade foi realizado com os produtos (microcápsulas, suco clarificado e concentrado) obtidos a partir de frutos do segundo lote adquirido do mesmo produtor.

### 5.4.1 Estabilidade das antocianinas

Durante o armazenamento de produtos que contenham antocianinas, podem ocorrer mudanças no aroma, cor e sabor devido à redução na concentração de antocianinas monoméricas e a formação de pigmentos poliméricos. As reações responsáveis por essas transformações incluem, frequentemente, a condensação direta entre antocianinas e outros compostos fenólicos e a polimerização das próprias antocianinas (FRANCIA-ARICHA et al., 1997).

Os pigmentos poliméricos formados podem manter parte das propriedades funcionais das antocianinas monoméricas, mas devido ao tamanho das suas estruturas, há muitos questionamentos em relação à bioacessibilidade dos mesmos *in vivo*, o que diminui as chances destes compostos proporcionarem benefícios à saúde humana (HARGER, 2007).

#### 5.4.1.1 Microcápsulas

A estabilidade das antocianinas presentes nas microcápsulas obtidas por *spray drying*, utilizando-se a formulação amido modificado Capsul: goma arábica (1:1), foi conduzida pelo

período de 4 meses, tendo ocorrido um problema na vedação do frasco referente ao segundo mês de avaliação, sendo então este ponto desconsiderado (Tabela 5.19 e Figura 5.32). Foi possível observar que não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o primeiro e o terceiro meses.

**Tabela 5.19.** Variação da concentração de antocianinas totais ( $\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ) das microcápsulas de romã em função do tempo de armazenamento

Tempo	Antocianinas totais ( $\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ )
Logo após processo	$13,4 \pm 0,13^a$
1º mês	$12,1 \pm 0,56^b$
3º mês	$12,0 \pm 0,07^b$
4º mês	$8,08 \pm 0,38^c$

Valores referentes à média de triplicatas. Médias com diferentes letras em cada coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

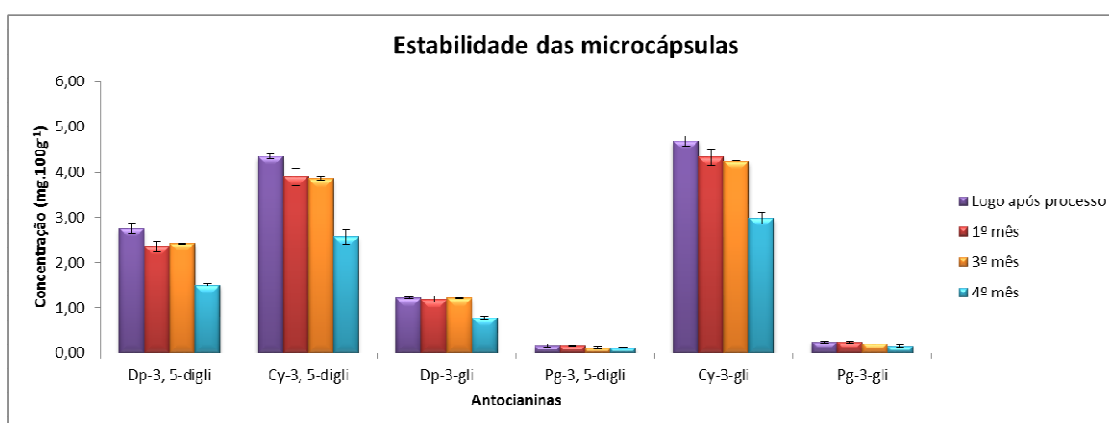


Figura 5.32. Estabilidade das microcápsulas de romã por 4 meses

A redução no teor das antocianinas monoméricas totais obtida após 3 meses de armazenamento foi equivalente à 10%, enquanto que ao fim do estudo (após 4 meses de armazenamento) foi igual a 40%. Levando-se em conta que o produto não continha nenhum aditivo que impedisse sua deterioração, a estabilidade das antocianinas durante 3 meses pode ser considerada satisfatória uma vez que 90% das mesmas foram preservadas.

Tonon et al. (2010) atribuíram a degradação dos pigmentos antociânicos em açaí em pó à porosidade e à heterogeneidade da estrutura do material seco, o que possibilitou a difusão do oxigênio e com isso a degradação dos pigmentos antociânicos presentes no mesmo. Este fato pode explicar a ocorrência de reações químicas mesmo em materiais com baixa atividade de água. No presente trabalho, a não disponibilidade de um mecanismo de vedação eficiente

pode ter favorecido a entrada de oxigênio nos frascos onde as microcápsulas foram armazenadas, favorecendo o fenômeno acima relatado.

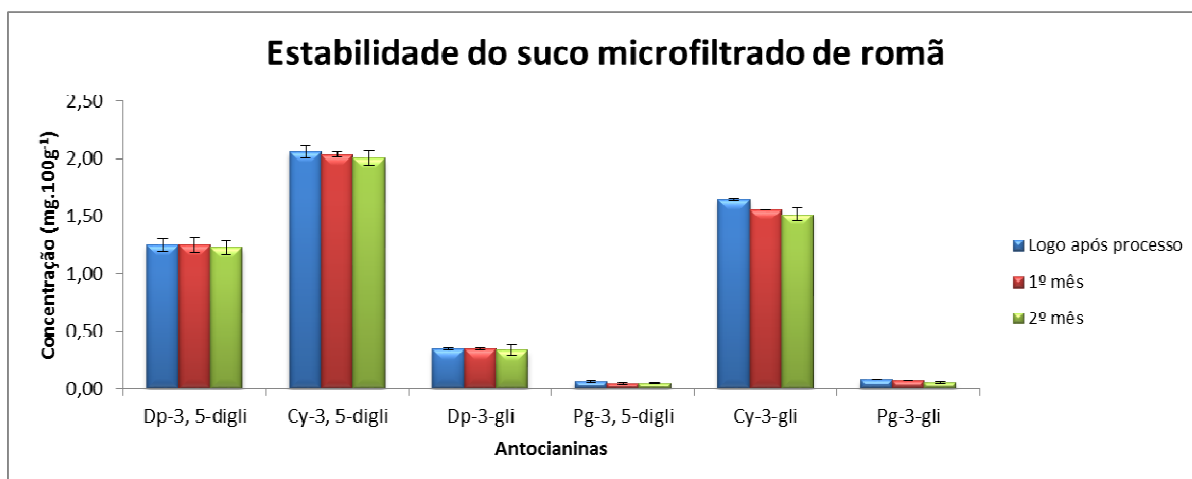
#### 5.4.1.2 Suco clarificado (microfiltrado)

A avaliação da estabilidade do suco de romã clarificado mostrou que não houve uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) do conteúdo total de antocianinas durante o período de 2 meses de armazenamento (Tabela 5.20 e Figura 5.33). Os resultados obtidos indicaram uma elevada retenção das antocianinas monoméricas totais ao final dos dois meses de avaliação.

**Tabela 5.20.** Variação da concentração de antocianinas totais ( $\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ) do suco clarificado de romã ao longo do estudo de estabilidade

Tempo	Antocianinas totais ( $\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ )
Logo após processo	$5,45 \pm 0,01^a$
1º mês	$5,31 \pm 0,07^a$
2º mês	$5,24 \pm 0,07^a$

Valores referentes à média de triplicatas. Médias com diferentes letras em cada coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).



**Figura 5.33.** Estudo de estabilidade do suco de romã clarificado por microfiltração conduzido por 2 meses.

Sabe-se que a integridade das antocianinas é afetada não somente por fatores como luz, oxigênio e temperatura, mas também por constituintes da matriz dos alimentos (SADILOVA et al., 2009). Alguns desses constituintes como compostos fenólicos incluindo outras moléculas de antocianinas, podem participar na formação de complexos que é um

importante mecanismo de copigmentação e que pode contribuir para aumentar a estabilidade das estruturas formadas (ASEN, STEWART e NORRIS, 1972).

A copigmentação contribui para o aumento da estabilidade das antocianinas, mas na forma dos pigmentos poliméricos originados, reduzindo assim a concentração de antocianinas monoméricas no meio.

Comparando a estabilidade do suco de romã clarificado com o suco de romã integral, ambos submetidos a tratamento térmico, Fischer et al. (2013) observaram uma maior perda de antocianinas monoméricas no suco integral, o que foi atribuído à maior presença de macromoléculas no mesmo.

O fato do suco de romã utilizado no presente trabalho ter sido extraído apenas dos arilos e não do fruto todo também contribuiu para uma menor perda das antocianinas nos produtos obtidos, uma vez que a maior parte dos taninos não foi carregada para o suco processado. Turfan et al. (2011) submeteram ao processo de clarificação dois sucos de romã, um extraído do fruto inteiro e o outro somente dos arilos, e observou perda de antocianinas de 19% para o primeiro e de apenas 4% para o segundo, tendo também atribuído os valores observados à maior presença de taninos e conseqüentemente maior formação de pigmentos poliméricos no suco do fruto inteiro.

#### 5.4.1.3 Suco concentrado

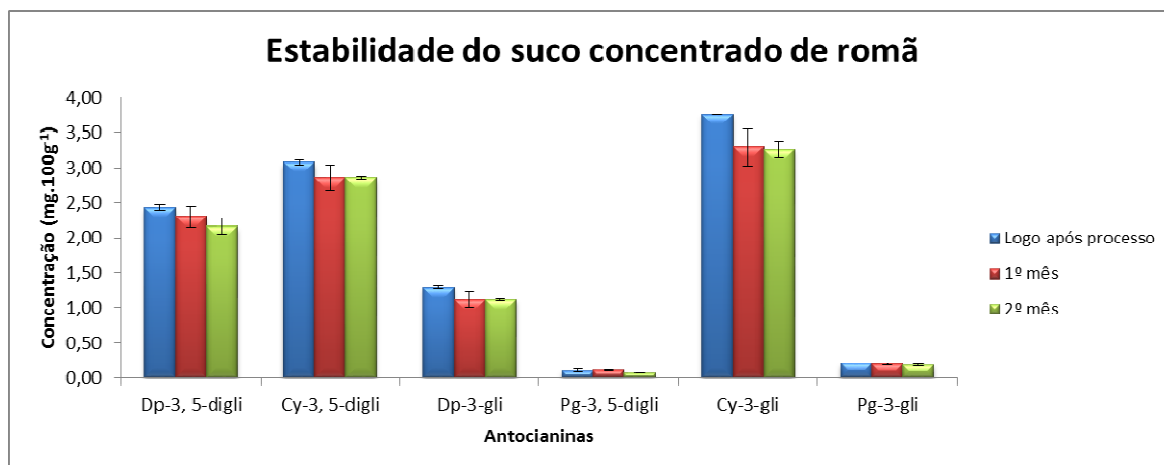
A avaliação da estabilidade o suco de romã concentrado por osmose inversa indicou uma redução de 11% do conteúdo total de antocianinas monoméricas ao final do período de 2 meses de armazenamento, não tendo sido observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os dois últimos tempos (Tabela 5.21 e Figura 5.34).

**Tabela 5.21.** Variação da concentração de antocianinas totais ( $\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ) do suco concentrado de romã ao longo do estudo de estabilidade

Tempo	Antocianinas totais ( $\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ )
Logo após processo	$10,89 \pm 0,05^a$
1º mês	$9,88 \pm 0,51^b$
2º mês	$9,66 \pm 0,20^b$

Valores referentes à média de triplicatas. Médias com diferentes letras em cada coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).





**Figura 5.34.** Estabilidade do suco de romã concentrado por osmose inversa conduzido por 2 meses.

No suco concentrado 89% do conteúdo original de antocianinas monoméricas foi preservado nas condições de armazenamento estabelecidas (embalagem de vidro com tampa, coberta por papel laminado, e mantidos armazenados sob refrigeração a 4°C).

Embora o suco concentrado tenha sido elaborado a partir do suco clarificado e por isso com menor quantidade de macromoléculas, a maior proximidade das moléculas no meio pode ter contribuído para a ocorrência do processo de polimerização e consequente perda das antocianinas monoméricas.

Wang & Xu (2007) estudaram a estabilidade das antocianinas em suco de amora e, assim como no presente trabalho, concluíram que o suco concentrado por osmose inversa é mais suscetível à redução do teor de antocianinas do que o suco integral, devido à proximidade entre moléculas reativas (como oxigênio), acelerando a velocidade de ocorrência das reações de degradação.

#### 5.4.2 Estabilidade da cor

A Tabela 5.22 apresenta a variação dos parâmetros de cor instrumental ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$  e  $h^\circ$ ) durante a avaliação de estabilidade da cor para as microcápsulas, os sucos clarificado e concentrado de romã.

A amostra referente ao 4º mês de estudo das microcápsulas foi descartada devido ao fato da mesma ter formado um aglomerado provavelmente devido à absorção de água, o que impossibilitou a retirada da amostra da embalagem e consequentemente a avaliação da mesma.

**Tabela 5.22.** Parâmetros de cor (média  $\pm$  desvio padrão) observados durante o armazenamento sob diferentes condições das microcápsulas, sucos clarificado e concentrado de romã.

Amostras	Índice de cor CIELAB			Intensidade de cor, C*	h°
	L*	a*	b*		
Microcápsulas T0	79,20 $\pm$ 0,95 <sup>b</sup>	11,81 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup>	2,13 $\pm$ 0,14 <sup>d</sup>	12,00 $\pm$ 0,34 <sup>a</sup>	10,19 $\pm$ 0,44 <sup>b</sup>
Microcápsulas T1	80,69 $\pm$ 0,30 <sup>a,b</sup>	11,46 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>	2,52 $\pm$ 0,18 <sup>c</sup>	11,73 $\pm$ 0,27 <sup>a</sup>	12,38 $\pm$ 0,71 <sup>b</sup>
Microcápsulas T2	77,87 $\pm$ 0,35 <sup>c</sup>	11,71 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>	2,90 $\pm$ 0,22 <sup>b</sup>	12,07 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>	13,89 $\pm$ 0,81 <sup>b</sup>
Microcápsulas T3	81,30 $\pm$ 0,61 <sup>a</sup>	9,04 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	4,10 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	9,93 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	24,39 $\pm$ 0,41 <sup>c</sup>
Microcápsulas T4	X	X	X	X	X
Suco microfiltrado T0	27,12 $\pm$ 1,04 <sup>d</sup>	6,91 $\pm$ 0,31 <sup>c</sup>	-0,30 $\pm$ 0,11 <sup>e</sup>	27,12 $\pm$ 1,04 <sup>c</sup>	356,27 $\pm$ 2,62 <sup>a</sup>
Suco microfiltrado T1	27,20 $\pm$ 0,61 <sup>d</sup>	4,92 $\pm$ 0,52 <sup>d</sup>	-0,16 $\pm$ 0,18 <sup>e</sup>	27,20 $\pm$ 0,61 <sup>d</sup>	355,08 $\pm$ 1,77 <sup>a</sup>
Suco microfiltrado T2	27,15 $\pm$ 0,19 <sup>d</sup>	5,38 $\pm$ 0,77 <sup>d</sup>	-0,19 $\pm$ 0,08 <sup>e</sup>	27,15 $\pm$ 0,19 <sup>d</sup>	357,83 $\pm$ 1,01 <sup>a</sup>
Suco concentrado T0	26,97 $\pm$ 0,08 <sup>d</sup>	3,56 $\pm$ 0,12 <sup>e</sup>	-0,44 $\pm$ 0,09 <sup>e,f</sup>	3,59 $\pm$ 0,11 <sup>e</sup>	352,93 $\pm$ 1,67 <sup>a</sup>
Suco concentrado T1	26,25 $\pm$ 0,04 <sup>d</sup>	2,92 $\pm$ 0,05 <sup>e,f</sup>	-0,66 $\pm$ 0,04 <sup>f</sup>	2,99 $\pm$ 0,05 <sup>e,f</sup>	347,31 $\pm$ 0,68 <sup>a</sup>
Suco concentrado T2	26,43 $\pm$ 0,25 <sup>d</sup>	2,41 $\pm$ 0,10 <sup>f</sup>	-0,73 $\pm$ 0,13 <sup>f</sup>	2,52 $\pm$ 0,11 <sup>e</sup>	343,24 $\pm$ 2,64 <sup>a</sup>

Valores referentes à média de quadruplicatas. Médias com diferentes letras em cada coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ). <sup>1</sup>L = luminosidade (0 = preto e 100 = branco); <sup>2</sup>a = intensidade de verde/vermelho (-80 até zero = verde, do zero ao +100 = vermelho); <sup>3</sup>b = intensidade de azul/amarelo (-100 até zero = azul, do zero ao +70 = amarelo); C\*: cromia; h°: ângulo de matiz. T0: logo após processo; T1: 1° mês; T2: 2° mês; T3: 3° mês; T4: 4° mês.

O espaço de cor CIELAB é organizado em coordenadas polares cartesianas. O eixo L\* vai do topo à base sendo o seu valor máximo representado por 100 (indicativo da cor branca) enquanto o mínimo equivale a 0 (indicativo da cor preta). O eixo a\* indica variação de intensidade de cor verde/vermelha (-80 até zero = verde, do zero ao +100 = vermelho), enquanto o parâmetro b\* indica a variação de intensidade de cor azul/amarelo ((-100 até zero = azul, do zero ao +70 = amarelo) (HUNTERLAB, 1996; LAWLESS e HEYMANN, 1999).

O parâmetro L\* (luminosidade) foi maior para o material desidratado, visto que a adição dos agentes encapsulantes tornou o produto mais claro. Foi observado por Augusta (2011) durante a avaliação da cor de microcápsulas de jambo também obtidas por *spray dryer*

que a maior concentração de maltodextrina promoveu um aumento da luminosidade das amostras. Os valores observados para o parâmetro luminosidade não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no período de avaliação da estabilidade de todos os produtos líquidos, tendo variado para as amostras de microcápsulas, provavelmente devido à heterogeneidade relacionada aos agentes encapsulantes.

Tanto os sucos quanto as microcápsulas apresentaram valores de  $a^*$  dentro da escala do vermelho, tendo sido estes valores menores para os sucos uma vez que nestes a concentração de pigmentos antociânicos responsáveis pela coloração vermelha da bebida é menor. Dentro de cada grupo de produto, os valores de  $a^*$  só apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) do 2º para o 3º mês na avaliação das microcápsulas, e do 1º para o 2º mês do suco clarificado, sugerindo a redução da intensidade da cor vermelha.

Os sucos apresentaram tonalidades bem escuras, o que justifica os valores de  $b^*$  abaixo de zero encontrados para os mesmos. Por meio de avaliação estatística e teste de médias (teste de Tukey) foi possível observar maior variação deste parâmetro para as microcápsulas, provavelmente pelo mesmo motivo da variação do parâmetro  $a^*$  (heterogeneidade de agentes encapsulantes).

Os parâmetros  $C^*$  e  $h^\circ$  pertencem ao sistema de cor CIELCH que utiliza coordenadas cilíndricas em vez de coordenadas cartesianas. Neste sistema,  $C^*$  (chroma ou índice de saturação ou brilho) equivale à quantidade pela qual uma cor se desvia do cinza neutro, enquanto  $h^\circ$  (ângulo de matiz) é o que se refere diretamente à cor do objeto. Para o parâmetro  $h^\circ$ , quanto mais próximo seu valor for de  $360^\circ$ , mais próximo de vermelho é a coloração observada (MINOLTA, 1991; LAWLESS e HEYMANN, 1999).

Avaliando-se o parâmetro  $h^\circ$  para todos os produtos, é possível observar a predominância da cor vermelha para os sucos (valores próximos a  $360^\circ$ ) ao longo de todo o estudo e de uma cor bem mais clara para as microcápsulas (valores abaixo de  $30^\circ$ ), o que vai de encontro à composição das mesmas (adição de agentes brancos). Este parâmetro não apresentou diferença significativa em todos os tempos de avaliação para os sucos e até o segundo mês de avaliação das microcápsulas, sugerindo a não variação da cor avaliada instrumentalmente.

Embora a cor vermelha de um considerável número de frutos seja decorrente da presença de antocianinas, há controvérsias quanto à existência de correlação entre o teor destes compostos e medidas instrumentais da cor ( $h^\circ$ ). Em quatro cultivares de framboesa, Ancos, Gonzales e Cano (1999) relataram que embora a cultivar “Ceva” tenha apresentado o

mais elevado teor antocianinas, sem, contudo ter havido diferença significativa do parâmetro  $h^\circ$ , a cultivar “Rubi” foi considerada a mais vermelha em decorrência do maior valor de  $a^*$ . Isto corrobora o fato de que no presente trabalho as microcápsulas tenham apresentado maior valor de  $a^*$  do que os sucos, devido à maior concentração de pigmentos antociânicos nas mesmas e, ao mesmo tempo, menor valor de  $h^\circ$ , uma vez que provavelmente a presença dos agentes encapsulantes influenciou muito mais na cor de fato observada pelos olhos dos analistas.

Em relação ao  $C^*$ , é possível observar que o produto que mais se afastou do cinza neutro foi o suco clarificado, provavelmente devido ao processo ao qual foi submetido com a remoção de partículas pela microfiltração favorecendo assim a saturação (maior brilho). A seguir, encontram-se as microcápsulas que com a adição dos agentes de coloração branca favoreceram o desvio de sua cor do cinza neutro contribuindo para o aumento do seu brilho. Por último, com menor valor de chroma, o suco concentrado devido provavelmente à maior presença de açúcares que podem ter contribuído para a ocorrência de reações de escurecimento químico, como já foi dito acima, diminuindo assim o brilho. Este parâmetro, assim como  $a^*$ , só diferiu significativamente ( $p < 0,05$ ) do segundo para o terceiro mês na avaliação das microcápsulas, e do primeiro para o segundo mês do suco clarificado. Para o suco clarificado, embora tenha sido observada diferença significativa entre o primeiro e o segundo meses, vale ressaltar que ainda assim os valores encontrados foram bem próximos.

O sistema de vedação das embalagens, bem como a amostragem dos produtos, podem também ter influenciado os resultados encontrados. De uma forma geral, os parâmetros que refletem a intensidade de cor vermelha dos produtos ( $a^*$  e  $h^\circ$ ) não sofreram grandes alterações, o que sugere adequada estabilidade das amostras ao longo do estudo.

O fato do suco de romã utilizado para obtenção dos produtos avaliados ter sido previamente filtrado diminuiu a probabilidade de escurecimento dos sucos clarificado e concentrado devido à remoção considerável de pectina que poderia causar turvação dos mesmos. Esta afirmação é corroborada por Turfan et al. (2011) que observou que a remoção prévia de partículas que poderiam causar o escurecimento suco de romã, promoveu uma maior estabilidade da cor da bebida ao longo do armazenamento.

A reação entre taninos e proteínas também é conhecida como um fator causador de escurecimento de bebidas naturais, como os sucos de fruta, produzindo turvação e precipitação ao longo do armazenamento (CALDERON, VAN BUREN, ROBINSON, 1968).

Desta forma, a reduzida concentração de taninos no suco de romã utilizado para processamento no presente trabalho, pode também ter contribuído para a observação de poucas alterações dos parâmetros de cor ao longo do estudo de estabilidade.

#### 5.4.3 Estabilidade microbiológica

A partir dos dados apresentados na tabela 5.23 é possível observar que ao longo de todo o estudo de estabilidade, os três produtos obtidos (microcápsulas, sucos clarificado e concentrado) encontraram-se isentos de contaminação por *Salmonella* spp. e dentro do limite estabelecido pela metodologia utilizada para *Staphylococcus aureus*. Estes resultados indicam a predominância da presença de boas condições higiênico-sanitárias e cuidados por parte dos manipuladores.

Todos os outros produtos também se mostraram isentos de contaminação por coliformes termotolerantes, com exceção da amostra referente ao último mês de avaliação (T3) do suco concentrado. Segundo Franco e Landgraf (2005), estes microrganismos, quando presentes em um alimento, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação, sobre a provável presença de patógenos ou sobre a deterioração potencial de um alimento, além de poder indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento. A contaminação observada ocorreu provavelmente devido a algum problema no envase do produto, como a assepsia não adequada do frasco utilizado para armazenamento.

Apesar da segurança dos produtos apresentados quanto à contaminação bacteriana até os dois primeiros meses de armazenamento, um outro problema de contaminação detectado foi a presença de fungos filamentosos e leveduras, observada a partir do terceiro mês de estudo para as microcápsulas, do segundo mês para suco clarificado, e já a partir do primeiro mês para o suco concentrado. Este é um problema passível de ocorrer em produtos não tratados termicamente e com valores de pH mais baixos (TOURNAS, HEERES e BURGESS, 2006). Além disso, estes microrganismos podem crescer sob refrigeração, favorecendo a deterioração das amostras de suco aumente durante o armazenamento (VEGARA et al., 2013).

Mesmo que os produtos obtidos fossem oriundos de um suco previamente pasteurizado, ainda assim haveria a possibilidade de contaminação por fungos termoresistentes. Uma vez que algumas espécies, como *Byssochlamys fulva*, produzem esporos chamados ascósporos que são resistentes ao calor. Os esporos destes fungos podem

permanecer em estado de latência inclusive após o processamento térmico de frutas e derivados (TOURNAS e TRAXLER, 1994; FERREIRA et al., 2011).

Os alimentos mais susceptíveis à deterioração por fungos termorresistentes são as frutas e seus derivados, como sucos, polpas, concentrados e frutas enlatadas (KOTZEKIDOU, 1997, FERREIRA et al., 2011). A principal fonte de contaminação das frutas é o solo, onde esses fungos estão presentes (PIECKOVÁ, BERNÁT e JESENSKÁ, 1994; PITT e HOCKING, 2009).

A contaminação por fungos pode ser atribuída à matéria-prima utilizada, decorrente de infecções quiescentes, as quais ocorrem com o fruto ainda ligado à planta-mãe e só se manifestam no período pós-colheita (CAVALCANTI, 2005), ou ainda por contaminação pós-processo sendo esta atribuída à falha na assepsia do procedimento de envase.

O processo de microfiltração ao qual os dois sucos avaliados foram submetidos pode ser utilizado para a remoção de microrganismos, resultando em um produto esterilizado. Porém, o sistema de recolhimento de permeado utilizado neste trabalho não foi um sistema de envase asséptico, o que possivelmente possibilitou uma contaminação cruzada do produto após o processo de separação por membranas (SILVA et al., 2005), uma vez que a malha da membrana utilizada (0,15  $\mu\text{m}$ ) apresenta uma malha eficiente, inclusive para a retenção para esporos de bactérias que são bem menores que os de fungos.

Vegara et al. (2013) também observaram um maior crescimento de fungos em 7 dias de armazenamento a 25 °C para o suco de romã microfiltrado, do que para o suco de romã microfiltrado e pasteurizado armazenado sob as mesmas condições que o primeiro, indicando a provável ocorrência de contaminação após o processo de membrana. Este fato corrobora a necessidade de maior controle na assepsia na etapa de recolhimento do produto clarificado.

**Tabela 5.23.** Avaliação microbiológica durante estudo de estabilidade das microcápsulas, dos sucos clarificado e concentrado de romã

Amostras	Análises microbiológicas			
	Contagem de Fungos Filamentosos e Leveduras* (UFC.g <sup>-1</sup> )	<i>Salmonella</i> sp. (ausência em 25 g)	Coliformes a 45°C** (NMP.g <sup>-1</sup> )	<i>Staphylococcus</i> Coagulase Positiva*** (UFC.g <sup>-1</sup> )
Microcápsulas T0	<1,0 x 10 <sup>1</sup>	Ausência	<3	<1,0 x 10 <sup>1</sup>
Microcápsulas T1	<1,0 x 10 <sup>1</sup>	Ausência	<3	<1,0 x 10 <sup>1</sup>
Microcápsulas T2	3,4 x 10 <sup>4</sup>	Ausência	<3	<1,0 x 10 <sup>1</sup>
Microcápsulas T3	2,5 x 10 <sup>2</sup>	Ausência	<3	<1,0 x 10 <sup>1</sup>
Microcápsulas T4	1,5 x 10 <sup>2</sup>	Ausência	<3	<1,0 x 10 <sup>1</sup>
Suco microfiltrado T0	<1,0 x 10 <sup>1</sup>	Ausência	<3	<1,0 x 10 <sup>1</sup>
Suco microfiltrado T1	<1,0 x 10 <sup>1</sup>	Ausência	<3	<1,0 x 10 <sup>1</sup>
Suco microfiltrado T2	1,5 x 10 <sup>4</sup>	Ausência	<3	<1,0 x 10 <sup>1</sup>
Suco concentrado T0	1,5 x 10 <sup>6</sup>	Ausência	<3	<1,0 x 10 <sup>1</sup>
Suco concentrado T1	3,4 x 10 <sup>4</sup>	Ausência	<3	<1,0 x 10 <sup>1</sup>
Suco concentrado T2	1,3 x 10 <sup>5</sup>	Ausência	>1100	<1,0 x 10 <sup>1</sup>

Valores estimados referem-se a contagens abaixo ou acima dos limites estabelecidos pela metodologia. Os limites estabelecidos são: \*entre 15 e 150 UFC.g<sup>-1</sup>, \*\*\*entre 25 e 250 UFC.g<sup>-1</sup>. \*\*Limite máximo estabelecido pela RDC nº12/2001:100 NMP/g ou 10<sup>2</sup>NMP/g. T0 (logo após processo); T1 (1º mês de armazenamento); T2 (2º mês de armazenamento); T3 (3º mês de armazenamento); T4 (4º mês de armazenamento).

## 6 CONCLUSÃO

No presente trabalho, o pré-tratamento selecionado (filtração em malha) para realização da etapa de processamento permitiu alcançar fluxo compatível com processos de separação por membrana.

O processo de secagem por *spray drying* alcançou rendimento de 50% em relação à quantidade de pó obtida para todas as formulações avaliadas.

Foi possível realizar o isolamento de padrões de antocianinas pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com pureza superior a 98%, o que possibilitou uma quantificação mais precisa do teor das mesmas no suco de romã e nos seus produtos derivados.

As antocianinas delphinidina-3,5-diglicosídeo, cianidina-3,5-diglicosídeo, delphinidina-3-glicosídeo, pelargonidina-3,5-diglicosídeo, cianidina-3-glicosídeo e pelargonidina-3-glicosídeo foram identificadas como os principais compostos fenólicos presentes no suco de romã extraído somente dos arilos.

Foram avaliados os processos de microfiltração, osmose inversa e microencapsulação por *spray drying* do suco de romã em relação à preservação de antocianinas, tendo sido observadas retenção de 70% das mesmas durante o processo de microencapsulação, 82% durante a microfiltração e 100% durante o processo de osmose inversa, valores considerados elevados.

Para a condução do processo de microencapsulação por *spray drying* foram avaliadas diferentes combinações de agentes de secagem, tendo sido identificada a formulação contendo amido modificado (Capsul<sup>®</sup>): goma arábica (1:1) como a que melhor reteve as antocianinas.

O perfil de antocianinas se manteve igual em todos os processos avaliados, bem como durante o estudo de estabilidade, tendo variado apenas a magnitude dos picos, o que é proporcional à concentração dos analitos.

Foram observadas elevadas retenções na concentração de antocianinas para os sucos e microcápsulas durante os meses de avaliação da estabilidade.

Observou-se que de uma forma geral, os parâmetros que refletem a intensidade de cor vermelha dos produtos ( $a^*$  e  $h^\circ$ ) não sofreram grandes alterações, o que sugere a estabilidade da cor durante o período de avaliação. Desta forma, conclui-se que os produtos estudados



apresentam potencial para uso como corantes naturais, sendo ainda necessária a realização de mais avaliações.

Os três produtos avaliados se apresentaram isentos de contaminação bacteriana, mas a presença de fungos nos mesmos sugere a necessidade de aprimoramento do sistema de envase dos materiais.

Pode-se concluir, portanto, que os três processos avaliados promoveram a obtenção de produtos estáveis em relação a sua coloração, e com poucas alterações nas suas potenciais propriedades funcionais no que diz respeito à concentração de antocianinas presente nos mesmos.

## 7 REFERÊNCIAS

- ABDELNUR, Patrícia Verardi. **A espectrometria de massas e as bio-moléculas: relação estrutura/reatividade de peptídeos por reações íon/ molécula e mobilidade de íons e busca de novos biomarcadores em clínica médica por imageamentoquímio-seletivo de tecidos.** 2010. 188 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 2010.
- ABURTO, L. C.; TAVARES, D. Q.; MARTUCCI, E. T. Microencapsulação de óleo essencial de laranja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.1, p.45-48, 1998.
- AFAQ, F.; SALEEM, M.; BRANS, R.; MUKHTAR, H. Novel agents and targets for skin câncer chemoprevention: studies with pomegranate fruit extract. **Journal of Investigative Dermatology**, v.121, n.1, p.140, 2003.
- AJAIKUMAR, K.B.; ASHEEF, M.; BABU, B.H.; PADIKKALA, J. The inhibition of gastric mucosal injury by *Punica granatum*, L. (pomegranate) methanolic extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n.1-2, p. 171-176, 2005.
- ALIGHOURCHI, H.; BARZEGAR, M. Some physicochemical characteristics and degradation kinetic of anthocyanin of reconstituted pomegranate juice during storage. **Journal of Food Engineering**, v.90, p.179–185, 2009.
- AL-MAIMAN S. A.; AHMAD, D. Changes in physical and chemical properties during pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit maturation. **Food Chemistry**, 76, p.437 – 441, 2002.
- ANCOS, B.; GONZALES, E.; CANO, M. P. Differentiation of raspberry varieties according to anthocyanin composition. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A**, v. 208, n. 1, p. 33-38, 1999.
- ANDERSEN O.M.; CABRITA L.; FOSSEN T., Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region. **Food Chemistry**, v.63, n.4, p. 435-440, 1998.
- ANESINI, C.; PEREZ, C. Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.39, p.119-28, 1993.
- ANTUNES, L. E.C. Amora-preta: nova opção de cultivo no Brasil, **Ciência Rural**, v.32, n.1, p.151-158, 2002.
- ANTUNES, L.E.C.; DUARTE FILHO, J.; SOUZA, C.M. Conservação pós-colheita de frutos de amoreira-preta. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 3, p. 413-419, 2003.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists, 18 ed., 3<sup>a</sup> rev, 2010.

ARAUJO, M. C. P.; GOUVÊA, A. C. M. S.; ROSA, J. S.; PACHECO, S.; OIANO-  
NETO, J.; GODOY, R. L. O. Adaptação de um método por Cromatografia Líquida de  
Alta Eficiência para determinação de antocianinas em suco de açaí (*Euterpe oleraceae*  
Mart.). In: XII Congresso Latino Americano de Cromatografia e Técnicas Afins (2008).  
**Anais eletrônicos...** Florianópolis, 2008.

ARAUJO, M.C.P.; GOUVÊA, A.C.M.S.; COUTO, D.S.; CABRAL, L.M.C.; GODOY,  
R.L.O.; FREITAS, S.P. Effect of enzymatic treatment on the viscosity of raw juice and  
anthocyanins content in the microfiltrated blackberry juice. **Desalination and Water  
Treatment**, v.2, p.37–41, 2011.

ASEN, S.; STEWART, R.N.; NORRIS, K.H. Co-pigmentation of anthocyanins in plant  
tissues and its effect on color. **Phytochemistry**, v.11, p.1139–1144, 1972.

AUGUSTA, Ivanilda Maria A. **Extração e secagem da casca de jambo vermelho  
(*Syzygium malaccensis*, (L) Merryl et Perry) para obtenção de corante**. 2011. Tese  
(Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Escola de Química,  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

AVALTRONI, F., BOUQUERAND, P.E.; NORMAND, V. Maltodextrin molecular  
weight distribution influence on the glass transition temperature and viscosity in aqueous  
solutions. **Carbohydrate Polymer**, v.58, p.323–324, 2004.

AVIRAM, M.; DORNFELD, L. Pomegranate juice consumption inhibits serum  
angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure.  
**Atherosclerosis**, v.158, n.1, p.195-198, 2001.

AVIRAN, M.; DORNFELD, L.; ROSENBLAT, M.; VOLKOVA, N.; KAPLAN, M.;  
COLEMAN, R.; HAYEK, T.; PRESSER, D.; FUHRMAN, B. Pomegranate juice  
consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet  
aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E- deficient mice.  
**American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n.5, p. 1062- 1076, 2000.

BALISCHI L.; PEREIRA, N. C.; LIMA, O. C. M.; BARROS, S. T. D.; DAMASCENO,  
J. W. e MENDES, E. S. Influência do tratamento enzimático sobre as características  
reológicas e microscópicas da polpa de acerola. **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 6, p. 1649-  
1658, 2002.

BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; IRBAZ, A.; PELEG, M. Propriedades reológicas de  
alimentos fluidos: Revision. **Alimentaria**, v.241, p.36-89, 1993.

- BARRABIN, J. S. **Desenvolvimento, Validação e Acreditação de Ensaio Analítico de Determinação de Aflatoxinas em Amendoim por CLAE-EM/EM**. Dissertação (Mestrado) – Universidade federal Rural do rio de Janeiro, Seropédica, 2012.
- BEATTIE, J.; CROZIER, A.; DUTHIE, G.G. Potential health benefits of berries. **Current Nutrition and Food Science**, v. 1, p. 71-86, 2005.
- BELITZ, H.-D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food Chemistry**. 3. ed. Garching: Springer, 2004.
- BEUCHAT, L.R.; COUSIN, M.A. **Yeasts and molds**. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. (eds) Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4.ed. Washington, D.C.: APHA, cap. 20. p.209-215, 2001.
- BHANDARI, B. R.; DATTA, N.; HOWES, T. Problems associated with spray drying of sugar-rich foods. **Drying Technology**, v. 15, p. 671-684, 1997.
- BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v.18, p. 355- 383, 2000.
- BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do Processamento de Alimentos**. 2<sup>a</sup>. ed. São Paulo: Varela, p.111, 1995.
- BOROCHOV-NEORI, H.; JUDEINSTEIN, S.; TRIPLER, E.; HARARI, M.; GREENBERG, A.; SHOMER, I.; HOLLAND, D. Seasonal and cultivar variations in antioxidant and sensory quality of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.22, p.189–195, 2009.
- BRANCO, I. G. 1995. **Suco de laranja concentrado – comportamento reológico a baixas temperaturas**. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade estadual de Campinas, 1995.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 jan. 2001.
- BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. **Nutrition Reviews**, v.56, n.11, p.317-333, 1998.
- BRITO, E. S.; ARAUJO, M. C. P.; ALVES, R. E.; CARKEET, C., CLEVIDENCE, B. A.; NOVOTY, J. A. Anthocyanins Present in Selected Tropical Fruits: acerola, jambolão, jussara and guajiru. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.55, p. 9389-9394, 2007.

BROUILLARD, R. Chemical structure of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. (Ed.) **Anthocyanins as Food Colors**. New York: Academic Press, p. 1-40, 1982.

BROWNMILLER, C.; HOWARD, L. R.; PRIOR, R. L. Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blueberry products. **Journal of Food Science**, v.73, p.72–79, 2008.

CALDERON, P.; VAN BUREN, J.; ROBINSON, W. B. Factors influencing the formation of precipitates and hazes by gelatin and condensed and hydrolysable tannins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 16, 3, 479-482, 1968.

ÇAM, M.; HISIL, Y. Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels. **Food Chemistry**, v.123, p.878–885, 2010.

CAMPOS, D. D. P. **Extração, purificação e isolamento de antocianinas de jambolão e avaliação dos seus efeitos biológicos (*Syzygium cuminii*)**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, SP, 2006.

CANAL CIÊNCIA. **Antocianinas: corantes naturais para alimentos, cosméticos, tintas e experiências para ensinar e aprender Química**. Texto de divulgação científica publicado em 14 de outubro de 2011. Disponível em: <<http://www.canalciencia.ibict.br/pesquisa/0244-Antocianinas-quimica-corantes-naturais.html>>. Acesso em: março 2012.

CARNEIRO, L.; SA, I.S.; GOMES, F. S.; MATTA, V. M. & CABRAL, L.M. C. Cold sterilization and clarification of pineapple juice by tangencial microfiltration. **Desalination**, v. 148, p. 93-98, 2002.

CATÃO, R. M. R. Atividade antimicrobiana “in vitro” do extrato etanólico de *Punica granatum* linn. (romã) sobre isolados dos ambulatoriais de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 38, n.2, p111-114, 2006.

CAVALCANTE, P. B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. 5. ed. Belém: CEJUP, 1991. 279 p. (Coleção Adolpho Ducke).

CAVALCANTI, L. S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005, 263 p.

CEINFO – Centro de Informações Tecnológicas e Comerciais para Fruticultura Tropical. **Perguntas e respostas caju**: perguntas e respostas, clima, solos, adubação e nutrição mineral do caju. 2009. Disponível em:<<http://www.ceinfo.cnpat.embrapa.br/artigo.php?op=2&i=1&si=34&ar=92>>. Acesso em: 08 mar. 2013.

CHANDRA, A.; RANA, J.; LI, Y. Separation, identification, quantification, and method validation of anthocyanins in supplement raw materials by HPLC and HPLC-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, 3515, 2001.

CHARVE, J.; REINECCIUS, G.A. Encapsulation performance of proteins and traditional materials for spray dried flavors. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.57, 2486-2492, 2009.

CHAVES, M. C. V.; GOUVEIA, J. P. G.; ALMEIDA, F. A. C.; SILVA, F. L. H. **Carcaterização físico-química do suco de acerola**. Revista de Biologia e Ciências da Terra, v.4, n.2, 2004.

CHERYAN, M. **Ultrafiltration Handbook**. Lancaster, Technomic Publishing Company, 1986.

CIANCI, F. C.; SILVA, L. F. M., CABRAL; L.M.C.; MATTA, V. M. Clarificação e concentração de suco de caju por processos com membranas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, p. 579-583, 2005.

CLIFFORD, M. N.; SCALBERT, A. Ellagitannins, occurrence in food, bioavailability and cancer prevention. **Journal of Food Science and Agriculture**, v.80, p.1118-1125, 2000.

COHEN, K. O.; ALVES, S. DE M., Açaí. In: **Sistemas de Produção**. Embrapa Amazônia Oriental, v.4, 2006. Disponível em: <[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Acai/SistemaProducaoAcai\\_2ed/index.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Acai/SistemaProducaoAcai_2ed/index.htm)>. Acesso em: 18 nov. 2009.

COMMISSION INTERNATIONAL DE L'ECLAIRAGE (CIE): "**Recommendations on Uniform Color Spaces, Color Difference Equations, Psychometric Color Terms**," Supplement No. 2 to CIE Publication No. 15, Colorimetry, Bureau Central de la CIE, Paris, 1978.

COSTELL, E.; DURÁN, L. Reologia y fisico-química de los zumos y purés de frutas. **Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, v.22, n.1, p.81-94, 1982.

COUTO, D. S. **Avaliação da qualidade de suco de abacaxi (*Ananas comosus* L. merr cv. Smooth Cayenne) concentrado por osmose inversa**. 60 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

CRUZ, A. P. G. **Avaliação do efeito da extração e da microfiltração do açaí sobre sua composição e atividade antioxidante.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

DANIEL, E.M.; KRUPNICK, A.S.; HEUR, Y.H.; BLINZLER, J.A.; NIMS, R.W.; STONER, G.D. Extraction, stability and quantitation of ellagic acid in various fruits and nuts. **Journal of food composition and analysis**, v.2, p. 338-349, 1989.

DEGÁSPARI C.H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v.5, n.1, p.33-40, 2004.

DESAI, K.G.H.; PARK, H. J. Recent development in microencapsulation of foods ingredients. **Drying Technology**, v.23, p.1361–1394, 2005.

DOMINIQUE PALLET et al. Applications des technologies membranaires aux traitements de jus de fruits brésiliens. **Cahiers d'études et de recherches francophones/Agricultures**, v. 14, n.1, p.159-163, 2005.

DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Colouring our foods in the last and next millennium. **International Journal of Food Science Technology**, v.35, n.1, p.5-22, 2000.

DUMLU, M. U., & GURKAN, E. Elemental and nutritional analysis of *Punica granatum* from Turkey. **Journal of Medicinal Food**, v.10, n.2, p.392–395, 2007.

DURST, R. W.; WROLSTAD. R. E. Unit F1.2: Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. In R.E. Wrolstad (Ed.), **Handbook of Analytical Food Chemistry**, p. 33-45. New York: John Wiley & Sons, 2005.

ERSUS, S.; YURDAGEL, U. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucuscarota* L.) by spray dryer. **Journal of Food Engineering**, v.80, p.805-812, 2007.

ESPÍN, J. C.; SOLER-RIVAS, C.; WICHERS, H. J.; GARCÍA-VIGUERA, C. Anthocyanin-Based Natural Colorants: A New Source of Antiradical Activity for Foodstuff. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, n.5, p. 1588-1592, 2000.

ETTRE, L.S. Chromatography: the separation technique of the 20<sup>th</sup> century. **Chromatographia**, v.51, p. 7-17, 2000.

FARAONI, A. S; RAMOS, A. F.; GUEDES, B. D., MOACIR, M. R.; PINTO, R. Propriedades reológicas de sucos mistos de manga, goiaba e acerola adicionados de fitoquímicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.16, n.1, 2013.

- FAVARO, M. M. A. **Extração, estabilidade e quantificação de antocianinas de frutas típicas brasileiras para aplicação industrial como corantes**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.
- FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p.103-112, 2008.
- FERNANDES, L.M. **Clarificação do suco de acerola por processos com membranas**. 1999. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 1999.
- FERREIRA, D. S. 2008. **Compostos bioativos em amora-preta e encapsulação do seu extrato antocianico por gelificação térmica com curdiana**. Dissertação (Mestrado) - Universidade estadual de Campinas, 2008.
- FERREIRA, E. H. R.; MASSON, L. M. P.; ROSENTHAL, A.; SOUZA, M. L.; TASHIMA, L.; MASSAGUER, P. R. Termorresistência de fungos filamentosos isolados de néctares de frutas envasados assepticamente. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.14, n.3, p.164-171, 2011.
- FERREIRA, G.; QUEIROZ, A. J. M.; CONCEIÇÃO, R. S.; GASPARETTO, C. A. Efeito da temperatura no comportamento reológico das polpas de caju e goiaba. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v.4, n.2, jul./dez. 2002.
- FETT, R. Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v.24, n.4, p.691-693, 2004.
- FINOTELLI, Priscilla Vanessa. **Microencapsulação de vitamina antioxidante**. 2002. Dissertação (Mestrado em de Ciência de Alimentos) - Instituto de Química, Universidade federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2002.
- FISCHER, U. A.; CARLE, R.; KAMMERER, D. R. Thermal stability of anthocyanins and colourless phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) juices and model solutions. **Food Chemistry**, v.138, p.1800–1809, 2013.
- FISCHER, U. A.; DETTMANN, J. S.; CARLE, R.; KAMMERER, D. R. Impact of processing and storage on the phenolic profiles and contents of pomegranate (*Punica granatum* L.) juices. **European Food Research Technology**, v.233, p.797–816, 2011.
- FOX, R. W.; MCDONALD, A. T. **Introdução à mecânica dos fluidos**. 5. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001.
- FRANCIA-ARICHA, F.M.; GUERRA, M.T.; RIVAS-GONZALO, I.C.; SANTOS-BUELGA, C. New anthocyanin pigments formed after condensation with flavonols. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 45, p. 2262-2266, 1997.



FRANCIS, F. Analysis of anthocyanins. In Markakis, P. (Ed.), **Anthocyanins as Food Colors**. New York: Academic press, 1982.

FRANCIS, F.J., Food Colorants: anthocyanins, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.28, n.4, p.273-314, 1989.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005. 182p.

FURUTA, T. HAYASHY, H.e OHASHI, T. Some criteria of spray dryer design for food liquid. **Drying technology**, v.12, n.162, p. 151-177, 1994.

GALLORI, S.; BERGONIZI, M.; BARBOSA, W.; VINCIERI, F. Polyphenolic constituents of fruit pulp of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí palm). **Chromatographia**, v. 59, p. 739-743, 2004.

GALVANO, F.; LA FAUCI, L.; LAZZARINO, G.; FOGLIANO, V.; RITIENI, A.; CIAPPELLANO, S.; BATTISTINI, N. C.; TAVAZZI, B.; GALVANO, G. Cyanidins: metabolism and biological properties. **Journal of Nutrition Biochemistry**, v.15, p.2-11, 2004.

GHARSALLAOUI, A., ROUDAUT, G., CHAMBIN, O., VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of foods ingredients: an overview. **Food Research International**, 40, p.1107–1121, 2007.

GIL, M. I.; TOMAS-BARBERAN, F. A.; HESS-PIERSE, B.; HOLCROFT, D. M.; KADER, A. A. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48,4581–4589, 2000.

GIUSTI, M. M.; RODRIGUEZ-SAONA, L. E.; WROLSTAD, R. E. Molar Absorptivity and Color Characteristics of Acylated and Non-Acylated Pelargonidin-Based Anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, no. 11, p. 4631-4637, nov. 1999.

GLÄSSGEN, W. E., SEITZ, H. U.; METZGER, J. W. **Biological Mass Spectrometry**, v.21, p.271-277, 1992.

GOMES, M. S. **Estudo da pasteurização do suco de laranja utilizando ultrafiltração**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

GOMES, P. **Fruticultura Brasileira**. 13ed. São Paulo: Nobel, 2007, 446p.

GONÇALVES, A.E.S.S. **Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonoides e vitamina C.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

GONZÁLEZ-MOLINA, E.; MORENO, D. A.; GARCÍA-VIGUERA, C. A. A new drink rich in healthy bioactives combining lemon and pomegranate juices. **Food Chemistry**, v115, p.1364-1372, 2009.

GONZALO, J. C. R.; ALONSO, M. G. Flavonoids em alimentos vegetales: estrutura y atividade antioxidante. **Alimentación, nutrición y salud**, v.9, n.2, p.31-38, 2002.

GOUVÊA, A. C. M. S.; ARAUJO, M. C. P.; PACHECO, S.; GODOY, R. L. O.; OIANO-NETO, J.; ROSA, J. S.; CABRAL, L. M. C. Anthocyanins standards (cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside) isolation from freeze-dried açai (Euterpe oleraceae mart.) by HPLC. In: III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (2009). **Anais eletrônicos...Córdoba**, 2009.

GOUVÊA, A. C. M. S.; ARAUJO, M. C. P.; SHULZ, D. F.; PACHECO, S.; GODOY, R. L. DE O., CABRAL, L. M. C. Anthocyanins standards (cyanidin-3-O-glucoside and cyanidin-3-O-rutinoside) isolation from freeze-dried açai (Euterpe oleraceae Mart.) by HPLC. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.1, p.1-4, 2012.

GOUVÊA; A. C. M. S. **Quantificação das antocianinas majoritárias do açai por cromatografia líquida de alta eficiência.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.Seropédica, 2010.

GRANADA, G. L.; VENDRUSCOLO, J. L.; TREPTOW, R.O. Caracterização química e sensorial de sucos clarificados de amora-preta (*Rubus* spp. L.) **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 7, n. 2, p. 143-147, 2001.

HABERT, A. C.; BORGES, C. P.; NÓBREGA, R. **Processos de Separação com Membranas.** Rio de Janeiro: Escola Piloto em Engenharia Química/COPPE/ UFRJ, p.9-21, 2006.

HAGER, T.J. **Processing effects on the antioxidant capacity, phenolic content, absorption and metabolism of apache blackberries.** Arkansas: ProQuest, 2007, 159p.

HAKE, S.; QUINN, J. Anthocyanin colorants from fruits and vegetables. **ACS symposium series**, v.983, p. 69-81, 2008.

HAMINUK, C. H.I.; SIERAKOWSKI, M. R.; IZIDORO, D. R.; MACIEL, G. M.; SCHEER, A. P.; MASSON, M. L. **Comportamento reológico de sistemas pécticos de polpas de frutas vermelhas.** **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, p. 225-231, 2009.

HAMINUK, C. H.I.; SIERAKOWSKI, M. R.; IZIDORO, D. R.; MACIEL, G. M.; SCHEER, A. P.; MASSON, M. L. Effect of Heat Treatment on Pectic Fractions and Apparent Viscosity of Whole Blackberry (*Rubus spp.*) Pulp. **International Journal of Food Engineering**, v.4, n.4, article 13, 2008.

HAMINUK, C. H.I.; SIERAKOWSKI, M. R.; IZIDORO, D. R.; MASSON, M. L. Rheological Characterization of Blackberry Pulp. **Journal of Food Technology**, v.9, n.4, p. 291-296, out./dez. 2006.

HARBONE, J. B. The chromatographic identification of anthocyanin pigments. **Journal of Chromatography**, v.1, p. 473-488, 1958.

HARBORNE, J. B. **The flavonoids - advances in research since 1986**. London: Chapman & Hall, 1993, p. 3-6.

HASSIMOTTO, N.M.A.; GOMEZ, M.L.P.A.; MOTA, R.V.; CORDENUNSI, B.R.; LAJOLO, F.M. Compostos antioxidantes da amora-preta (*Rubus sp.*). In: XIX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos: estratégia para o desenvolvimento. Recife: **Anais (cd-rom) XIX CBCTA**, n. 424, 2004.

HEREDIA, F. J.; F., FRANCIA-ARICHA, E., RIVAS-GONZALO, J., VICARIO, I., SANTOS-BUELGA, C. Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes, pH effect. **Food Chemistry**, v. 63, n. 4, p. 491-498, 1998.

HESHI, A.B.; GARANDE, V.K.; WAGH, A.N.; KATORE, H.S. Effect of pre-harvest sprays of chemicals on the quality of pomegranate fruit (*Punica granatum L.*) cv. G-137. **Agricultural Science Digest**, v.21, n.1, p.25-27, 2001.

HOLCROFT, D.M.; GIL, M.I.; KADER, A.A. Effect of carbon dioxide on anthocyanins, phenylalanine ammonia lyase and glucosyltransferase in the arils of stored pomegranates. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, v.123, n.1, p.136-140, 1998.

HONG, V.; WROLSTAD, R. E. Use of HPLC separation / photodiode array detection for characterization of anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.38, p.708-715, 1990.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.1841-1856, 2005.

HUNTERLAB. **CIE L\* a\* b\* color scale**. In Applications note, Virginia, 1996; p.1-4. IBARZ, A.; GONZALS, C.; ESPLUGAS, S. Rheology of clarified passion fruit juice. **Fruit Processing**, v.6, n.8, p.330-333, 1996.

ISO 6579:2002/Amd.1:2007. **Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal Method for detection of Salmonella spp.** AMENDMENT 1: Annex D: Detection of Salmonella spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage. Geneva: International Standart Organization. 15/07/2007. 9p.

JACKMAN, R.L.; YADA, R.Y.; TUNG, M. A.; SPEERS, R.A., Anthocyanins as food colorants. - A Review. **Journal of Food Biochemistry**. v.11, p.201-247, 1987.

JAFARI, S.M.; ASSADPOOR, E.; HE, Y.; BHANDARI, B. Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying, **Drying Technology**, v.26, p.816-835, 2008.

JAISWAL, V.; DERMARDEROSIAN, A.; PORTER, J. R. Anthocyanins and polyphenol oxidase from dried arils of pomegranate (*Punica granatum* L.). **Food Chemistry**, v.118, p.11–16, 2010.

JARDINI, F. A.; MANCINI FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos da polpa e sementes da romã (*Punica granatum*, L.). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 1, p.137-147, 2007.

JAYA, S.; DAS, H. Accelerated storage, shelf life and color of mango powder. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.29, p.45–62, 2005.

KANAKDANDE, D.; BHOSALE, R.; SINGHAL, R. S. Stability of cumin oleoresin microencapsulated in diferent combination of gum arabic, maltodextrin and modified starch. **Carbohydrate Polymers**, v.67, p.536–541, 2007.

KASHYAP, D.R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Aplications of pectinases in the commercial sector: a review. **Biorsource Technology**, v.77, p. 215-227, 2001.

KAYA, A.; SÖZER, N. Rheological behavior of sour pomegranate juice concentrates (*Punica granatum* L.). **International Journal of Food Science and Technology**, v. 40, p. 223-227, 2005.

KENYON, M. M. Modified Starch, Maltodextrin, and Corn Syrup solids as wall materials for Food Encapsulation. In: ACS SYMPOSIUM SERIES, n. 590, 1995. **Encapsulation and Controlled Release of food Ingredients**. Washington: American Chemical Society, 1995. 214 p.

KIM, D.O.; LEE, C.Y. Extraction and Isolation of polyphenolics. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. R.E. Wrolstad. New York, Wiley: 11.2.1-11.2.12, 2002.

KIMURA, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. A scheme for obtaining standards and HPLC quantification of leafy vegetable carotenoids. **Food Chemistry**, v.78, p.389-398, 2002.

KING, W.; TRUBIANO, P.; PERRY, P. Modified Starch encapsulating agent offer superior emulsification, film forming, and low surface oil. **Food Product Development**, v. 10, n. 10, p.54-57, 1976.

KORNACKI, J.L.; JOHNSON, J.L. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: APHA - American Public Health Association, 2001. Cap.8.

KOTZEKIDOU, P. Heat resistance of *Byssochlamys nivea*, *Byssochlamys fulva* and *Neosartorya fischeri* isolated from canned tomato paste. **Journal of Food Science**, v. 62, n. 2, p. 410-412, 1997.

KOYAMA, S.; COBB, L.J.; MEHTA, H.H.; SEERAM, N.P.; HEBER, D.; PANTUCK, A.J.; COHEN, P. Pomegranate extract induces apoptosis in human prostate cancer cells by modulation of the IGF-IGFBP axis. **Growth Hormone and IGF Research**, v.20, p.55–62, 2010.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; MORALES, M. T. e FETT, R. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, v. 36, n. 4, p. 1283-1287, 2006.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A. G.;GARCIA-PARILLA, M. C.; TRONCOSO, A. M.; FETT, R. Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 691-693, 2004.

LANCETTE, G.A.; BENNETT, R.W. Staphylococcus aureus and staphylococcal enterotoxins. In: Downes, F.P.; K. ITO (ed.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4 ed. American Public Health Association, Washington, D.C. 2001. cap. 39, p. 387-403.

LARROSA, M.; TOMAS-BARBERAN, F. A.; ESPIN, J. C. The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway. **The Journal of Nutrition Biochemistry**, v.17, n.9, p.611-625, 2006.

LAWLESS, H.T.; HEYMANN, H. **Sensory evaluation of food**. Aspen Publishers: Maryland, 1999.

LEE, H.S.; HONG, V. Chromatografic analysis of anthocyanins. **Chromatografia**, v.624, p.221-234; 1992.

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

LIMA, V.L.A.G.; PINHEIRO, I.O.; NASCIMENTO, M.S.; GOMES, P.B.; GUERRA, N.B. Identificação de antocianidinas em acerolas do banco ativo de germoplasma da Universidade Federal Rural de Pernambuco. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.4, p.927-935, 2006.

LOPES, F. L. G.; SEVERO, J. B.; SANTANA, J. C. C.; SOUZA, R. R.; TAMBOURGI, E. B. Avaliação de fenômenos redutores do fluxo de permeado em microfiltrações do suco do abacaxi (*Ananias comosus* L. Merrill). **Exacta**, v.5, n.2, p. 329-334, 2007.

LÓPEZ O.P.; JIMÉNEZ A.R.; VARGAS F.D.. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains – characteristics, biosynthesis, processing, and stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.40, n.3, p.173-289, 2000.

LORENZI, H.; SOUZA, H.M. **Plantas ornamentais no Brasil – arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. 3.ed. Nova Odessa: Plantarum, 2001, 1088p.

LUKANIN, O. S.; GUNKO, S. M.; BRYK, M. T.; NIGMATULLIN, R. R. The effect of content of apple juice biopolymers on the concentration by membrane distillation. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 60, n. 3, p. 275-280, 2003.

MACHEIX, J.-J.; FLEURIET, A.; BILLOT, J. **Fruit Phenolics**, CRC Press: Boca Raton, 1990.

MACRAE, R. **Food Science and Technology – A series of monographs: HPLC in food analysis**. Academic Press, 2<sup>a</sup> ed. 1998, p.77.

MAISUTHISAKUL, P.; GORDON, M. H. Influence of polysaccharides and storage during processing on the properties of mango seed kernel extract (microencapsulation). **Food Chemistry**, v. 134, p.1453–1460, 2012.

MALACRIDA, C.R.; MOTTA, S. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.4, p.659-664, 2005.

MALDANER, L., JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v.32, n.1, 2009.

MARTÍ, N.; PÉREZ-VICENTE, A.; GARCÍA-VIGUERA, C. Influence of storage temperature and ascorbic acid addition on pomegranate juice. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.82, n.2, 2001.

MARTÍNEZ-FLÓREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J.M.; TUÑÓN, M.J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutritional Hospital**, v.17, n.6, p-271-278, 2002.

MASTERS, K. **Spray drying handbook**. 3. ed. New York: John Wiley & Sons Inc, 1979, 687p.

MATEUS, M.; SANTOS, J. A. L.; CABRAL, J. M. S. Membrane Separation processes. In: KENNEDY, J. F.; CABRAL, J. M. S. **Recovery processes for biological materials**. New York: John Wiley & Sons Ltd, 1993.

MATTA, V. M.; CABRAL, L. M. C. e SILVA, L. F.M. Suco de acerola microfiltrado: avaliação da vida-de-prateleira, **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v.24, n.2, Campinas, Abr./Jun.,2004.

MATTA, V. M.; MORETI, R. H. e CABRAL, L. M. C. Microfiltration and reverse osmosis for clarification and concentration of acerola juice. **Journal of Food Engineering**, v. 61, p. 477-482, 2004.

MATTA, V.; CABRAL, L.; GURAK, P.; ROCHA LEÃO, M. H.. Avaliação físico-química do suco de uva concentrado por osmose inversa. **VI Congresso Ibero-Americano em Ciências e Tecnologia de Membrana**, 2007.

MAZZA, G. Anthocyanins in grapes and grape products. **Critical Review of Food Science and Nutrition**, v. 35, p. 341-371, 1995.

MELGAREJO, P., ARTES, F. Organic acids and sugar composition of pomegranate juice. **European Food Research Technology**, v.4, p.30–31, 2000.

MELLO, K. S.; FIGUEIRÊDO, R. M. F.; QUEIROZ, A. J. M. Comportamento reológico da polpa de buriti com leite. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.8, n.2, 2008.

MENEZES, E.M.S. **Efeito da alta pressão hidrostática em polpa de açaí pré-congelada (*Euterpe oleracea*, Mart.)**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2005.

MINOLTA. Chroma Meter CR-300/CR310/CR-321/CR-331/CR-331C **Instruction manual**. Osaka (Japan) 1991.

MIRSAEEDGHAZI, H.; EMAM-DJOMEH, Z.; MOUSAVI, S.M.; AROUJALIAN, A.; NAVIDBAKSH, M. Clarification of pomegranate juice by microfiltration with PVDF membranes. **Desalination**, v.264, p.243–248, 2010.

MIRSAEEDGHAZI, H.; MOUSAVI, S. M.; EMAM-DJOMEH, Z.; REZAEI, K.; AROUJALIAN, A.; NAVIDBAKSH, M. Comparison between ultrafiltration and microfiltration in the clarification of pomegranate juice. **Journal of Food Process Engineering**, v.35, p.424-436, 2012.

MONTEIRO, Flávia Silva. **Obtenção de suco de amora-preta (*Rubus spp.*) concentrado em antocianinas utilizando processos de separação por membranas.** 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2011.

MORENO-ALVAREZ, M. J.; MATOS, A. V.; LÓPEZ, E.; BELÉN, D. Estabilidade de antocianinas em jugos pasteurizados de mora (*Rubus glaucus* Benth). **ALAN**, Caracas, v.52, n.2, 2002.

MOTA, R. V. Características Químicas e Aceitabilidade de Geléias de Amora-preta de Baixo Teor de Sólidos Solúveis. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.10, n.2, p. 116-121, abr./jun. 2007.

MULDER, M. **Basic principles of membrane technology.** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991.

MÜLLER, D.; SCHANTZ, M.; RICHLING, E. High Performance Liquid Chromatography analysis of anthocyanins in bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.), blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.), and corresponding juices. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 4, p. 340-345, 2012.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extractions and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v.1054, n.1-2, p.95- 111, 2004.

NIJVELDT, R.J.; NOOD, E.; HOORN, D.E.; BOELEN, P.G.; NORREN, K.; LEEUWEN, P. A. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.74, n.4, p. 418-25, 2001.

NOBLE, R. D.; WAY, J. D. Description of facilitate transport and enviromental applications: membrane processes in separation and purification. **Nato ASI Series**, 272. London: Kluwer Academic Publishers, 1993.

NOGUEIRA, A.; SANTOS, L.D.; WIECHETECK, F.V.B.; GUYOT, S.; WOSIACKI, G. Efeito do processamento no teor de compostos fenólicos em suco de maçã. **Ciências Exatas da Terra**, n. 9, v. 3, p.7-14, 2003.

NOGUEIRA, O. L.; CARVALHO, C. J. R.; MULLER, C. H.; GALVÃO, E. U. P.; SILVA, H. M. E.; RODRIGUES, J. E L. F.; OLIVEIRA, M. S. P.; CARVALHO, J. E. U.; ROCHA NETO, O. G.; NASCIMENTO, W. M.O.; CALZAVARA, B. B. G. **A cultura do açaí.** Brasília: Embrapa, 49 p., 1995.

NOGUEIRA, Regina Isabel. **Processo de obtenção de inulina de chicória (*Cichorium intybus*) em pó.** 2002. 104p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola)- Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2002.



NONHENBEL, G.; MOSS, A. A. H. **Drying of solids in the chemical industry**. London: Butterworth & Co., 1971. 299p.

OKUMURA, F.; SOARES, M.H.F.B.; CAVALHEIRO, E.T.G. Identificação de pigmentos naturais de espécies vegetais utilizando-se cromatografia em papel. **Química Nova**, v.25, p.680-683; 2002.

OLIVEIRA, R. C.; ROSSI, R. M.; BARROS, S. T. D. Estudo do efeito da temperatura sobre o comportamento reológico das polpas de gabioba e goiaba. **Acta Scientiarum Technology**, v. 33, n. 1, p. 31-37, 2011.

OLIVEIRA, R. P.; NINO, A. F. P.; FERREIRA, L. V. Potencial de multiplicação in vitro de cultivares de amoreira-preta. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, n.3, p. 585-589, 2008.

OLIVEIRA, R.P.; NINO, A.F.P.; SILVA, F.O.X. **Produção de mudas de amora-preta por meio de cultura de tecidos**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 23p, 2004.

OZKAN, M. Degradation of anthocyanins in sour cherry and pomegranate juices by hydrogen peroxide in the presence of added ascorbic acid. **Food Chemistry**, v.78, n.4, p.499–504, 2002.

PACHECO, S. GODOY; R. L. O.; PEIXOTO, F. M.; GOUVÊA, A. C. M. S.; SANTIAGO, M. C. P. de A.; BORGUINI, R. G.; FELBERG, I. G. Preparation of high purity analytical using High Performance Liquid Chromatography in analytical scale. **Analytical Chemistry: An Indian Journal**, v.12, n.5, p.194-197, 2013.

PACHECO, S. **Validação da metodologia de determinação de carotenóides por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Ciência e tecnologia de Alimentos, Rio de Janeiro, 2009.

PAGANI, Mônica Marques. **Obtenção de suco de acerola (*Malpighia emarginata* D. C.) concentrado e pós estáveis através da integração dos processos de separação por membranas e microencapsulação por atomização**. 2010. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

PALACIO, D. N. M. **Concentração de suco clarificado de açaí por osmose inversa**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

PALLET, D.; CABRAL, L.; MATTA, V.; PEZOA-GARCÍA, N.H.; MENEZES, H.C.; ABREU, F.A.P.; DORNIER, M.; REYNES, M. Aplicação da tecnologia de membranas

no processamento de sucos de frutas brasileiras. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 22, n. 2, p. 427-437, 2005.

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 in Food Science and Technology**, v.21, p. 3–11, 2010.

PAULA, B. de; GOMES, F. S.; SILVA, L. F. M.; MATTA, V. M.; CABRAL, L. M. C. Association of the enzymatic hydrolysis to the microfiltration process of the passion - fruit juice. **Revista Universidade Rural, Série Ciências Exatas e da Terra**, v.21, n.2, p. 45-48, 2002.

PETERSON, J.; DWYER J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, v.18, n.12, p.1995-2018, 1998.

PETRI, G.; KRAWCZYK, U.; KÉRY, À. Spectrophotometric and chromatographic investigation of bilberry anthocyanins for quantification purposes. **Microchemistry Journal**, v.55, 12, 1997.

PIECKOVÁ, E.; BERNÁT, D.; JESENSKÁ, Z. Heat resistant fungi isolated from soil. **International Journal of Food Microbiology**, v.22, n.4, p. 297-299, 1994.

PIETA, PG. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v.63, p.1035-1042, 2000.

PIMENTEL, B. M. V.; FRANCKI, M.; GOLLUCKE, B. P. **Alimentos funcionais: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos**. São Paulo: Editora Varela, 2005.

PINTO, M. S. **Compostos bioativos de cultivares brasileiras de morango (Fragaria x ananassa Duch.): caracterização e estudo da biodisponibilidade dos derivados de ácido elágico**. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2008.

PITT, J.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. 2 ed. Gaithersburg: Aspen Publishers, 1997. 593 p.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. 2009. **Fungi and Food Spoilage**. 3 ed. New York/ USA: Springer New York, 2009, 540p.

PORTER, M. C. Microfiltration In: PORTER, M. C (Ed) **Handbook of industrial membrane technology**. New Jersey, Noyes Publications, p. 62 – 135, 1990.

PREVENTING Membrane fouling. **Filtration & Separation**, p. 20-21, jan/feb 2001.

PROENÇA DA CUNHA, A., SILVA, A. P., ROQUE, O. R. **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia**. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 2003.

PRUDENCIO, I. D. **Propriedades físicas de queijo petit suisse elaborado com retentado de soro de queijo e estabilidade de antocianinas e betalaínas adicionadas**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

QU, W.; BRESKA, A. P.; PAN, Z.; MA, H. Quantitative determination of major polyphenol constituents in pomegranate products. **Food Chemistry**, v.132, p.1585–1591, 2012.

RÉ, M. I. Microencapsulation by spray drying. **Drying Technology**, v.16, n. 6, p. 1195-1136, 1998.

REINECCIUS, G.A. Carbohydrates for flavor encapsulation. **Food Technology**, v. 45, p. 144-146, 1991.

RODHES, M. J. C. Physiologically-active compounds in plant foods: an overview. In: **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 55, p. 371-397, 1996.

RODRIGUEZ-HERNANDEZ, G.R., GONZALES-GARCIA, R., GRAJALES-LAGUNES, A.; RUIZ-CABRERA, M. Spray-drying of cactus pear juice: effect on the physicochemical properties of powder and reconstituted product. **Drying Technology**, v.23, p.955–973, 2005.

ROGEZ, H. **Açaí: Preparo, Composição e Melhoramento da Conservação**. Ed. Universidade Federal do Pará – EDUPA, Belém, Pará. 360pp, 2000.

ROSA, E. D.; TSUKADA, M.; FREITAS, L. A. P. Secagem por atomização na indústria alimentícia: fundamentos e aplicações. In: JORNADA CIENTÍFICA DA FAZU/FACULDADES ASSOCIADAS DE UBERABA, v.5, 2006, Uberaba, **Anais...** Uberaba: FAZU, 2006.

ROSA, J. S. **Desenvolvimento de um método rápido para análise de vitamina C por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência utilizando coluna de troca iônica**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Ciência e tecnologia de Alimentos, Rio de Janeiro, 2005.

ROSS, R.G.; SELVASUBRAMANIAN, S.; JAYASUNDAR, S. Immunomodulatory activity of Punica granatum in rabbits – a preliminary study. **Journal of Ethnopharmacology**, v.78, n.1, p. 85-87, 2001.

RUAN, H.; CHEN, Q.-H.; FU, M.-L.; XU, Q.; HE, G.-Q. Preparation and properties of octenyl succinic anhydride modified potato starch. **Food Chemistry**, v.114, n1, p.81-86, 2009.

SÁ, I. S.; MATTA, V.M.; CABRAL, L.M.C. Concentração de suco de abacaxi através dos processos com membranas. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, p. 53-62, 2003.

SADILOVA, E., STINTZING, F.C.; KAMMERER, D.R.; CARLE, R. Matrix dependent impact of sugar and ascorbic acid addition on color and anthocyanin stability of black carrot, elderberry and strawberry single strength and from concentrate juices upon thermal treatment. **Food Research International**, v.42, p.1023–1033, 2009.

SÁNCHEZ, A. C.; BARRACHINA, A. A. C. **A fruta romã cultivada em Espanha: punicalagina antioxidante do sumo de romã e o extrato de romã, na alimentação funcional do futuro.** Disponível em: <<http://granatumplus.pt/afrutaroma/>>. Acesso em: 25 set. 2013.

SANTIAGO, M. C. P. A.; GOUVÊA, A.C.M.S. ; GODOY, R. L. O. ; OIANO-NETO, J. ; PACHECO, S. ; ROSA, J. S. **Adaptação de um método por cromatografia líquida de alta eficiência para análise de antocianinas em suco de açaí (Euterpe oleraceae Mart.).** Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2010 (Comunicado técnico, 162. Biblioteca: CTAA (FL CTE 0162 UMT)).

SANTIAGO, Manuela Cristina Pessanha de Araujo. **Avaliação via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência do efeito da microfiltração do suco da amora-preta (*Rubus spp.*) sobre a composição de suas antocianinas majoritárias.** 2010. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

SANTOS, A.M.; RASEIRA, M.C.B.; MADAIL, J.C.M. **Amora-preta.** 2.ed. Brasília: Embrapa-SPI; Pelotas: Embrapa-CPACT, 61p., 1997.

SANTOS, H. B.; BATISTA, F. P. R.; PEREIRA, L. M.; CAMPOS, L. M. A.; CASTRO, M. S.; AZEVEDO, L. C. Composição físico-química dos frutos da romã (*Punica granatum L.*). In: V Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação (CONNEPI), 2010, Maceió.

SARTIPPOUR, M. R.; SEERAM, N. P.; RAO, J. Y.; MORO, A.; HARRIS, D. M.; HENNING, S. M.; HEBER, D. Ellagitannin-rich pomegranate extract inhibits angiogenesis in prostate cancer in vitro and in vivo. **International Journal of Oncology**, v.32, p.475–80, 2008.

SCHUBERT, S.Y.; LANSKI, E.P.; NEEMAN, I. Antioxidant and eicosanoid anzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. **Journal of Ethnopharmacology**, v.66, n.1, p.11-17, 1999.

SEERAM, N. P.; LEE, R.; HEBER, D. Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum* L.) juice. **Clinica Chimica Acta**, v.348, n.1-2, p.63-68, 2004.

SEERAM, N.P.; AVIRAM, M.; ZHANG, Y.; HENNING, S. M.; FENG, L.; DREHER, M.; HEBER, D. Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-Rich Beverages in the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, n.4, p.1415-22, 2008.

SHEU, T-Y; ROSENBERG, M. Microstructure of Microcapsules of Whey Proteins and Carbohydrates. **Journal of Food Science**, v.63, n.3, p.491-494, 1998.

SILVA, O. F.; LOPES, D.; SILVA, A. J. R. Polifenóis da polpa de açaí (*Euterpe oleracea*). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA. [Resumos...]. São Paulo, 2006.

SILVA, T. T.; MODESTA, R. C. D.; PENHA, E. M.; MATTA, V. M.; CABRAL, L. M. CSuco de maracujá orgânico processado por microfiltração. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 4, p.419-422, 2005.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, 2001, 1104p.

SINGH, R. P., CHIDAMBARA MURTHY, K. N.; JAYAPRAKASHA, G.K. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.50, n.1, p.81-6, 2002.

SIPOLI, C.C.; BARROS, S.T.D. Concentração do suco de maracujá por osmose inversa. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.13, n.2, p.187-195, 2011.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Principles of instrumental analysis**. 5. ed. Fort Worth: Saunders College Publishing, 849p, 1997.

SKREDE, G.; WROLSTAD, R. E. Chapter 3: Flavonoids from berries and grapes. In Shi, J., Mazza, G., & Maguer, M. L. (Ed.), **Functional Foods: biochemical and processing aspects**, p. 71-133, 2002.

SOMERS, T. C.; EVANS, M. E. Wine quality: Correlations with colour density and anthocyanin equilibria in a group of young red wines. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.25, p.1369-1379, 1974.

SOUTO, R.N.M. **Uso da radiação  $\gamma$ , combinada à refrigeração, na conservação de polpa de açaí (*Euterpe oleracea*, Mart.)**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2001.

SPAYD, S.E.; TARARA, J.M.; MEE, D.L.; FERGUSON, J.C. Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot berries. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.53, n.3, p.171-182, 2002.

STRACK, D.; WRAY, V. In **Methods in Plant Biochemistry** (Ed. J. B. Harborne), v. 1, Academic Press, London, p. 325-356, 1989.

SUMNER, M. D.; ELLIOTT-ELLER, M.; WEIDNER, G.; DAUBENMIER, J. J.; CHEW, M. H.; MARLIN, R. Effects of pomegranate juice consumption on myocardial perfusion in patients with coronary heart disease. **Journal of Cardiology**, v.96, p.810-814, 2005.

TAKEOKA, G.; DAO, L. Anthocyanins. In Hurst, W. J. (Ed.), **Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals**, p. 219-241, 2002.

TAUFNER, C.F.; FERRAÇO, E.B.; RIBEIRO, L.F. Uso de plantas medicinais como alternativa fitoterápica nas unidades de saúde pública de Santa Teresa e Marilândia, ES. **Natureza on line**, v. 4, n. 1, p.30-39, 2006.

TEHRANIFARA, A.; ZAREIA, M.; NEMATIA, Z.; ESFANDIYARIA, B.; VAZIFESHENASB, M.R. Investigation of physico-chemical properties and antioxidant activity of twenty Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. **Scientia Horticulturae**, v.126 p.180-185, 2010.

TERCI, D. B. L.; ROSSI, A. V. Indicadores naturais de pH: usar papel ou solução? **Química Nova**, v.25, p.684-688, 2002.

TERCI, D.B.L. **Aspectos analíticos e didáticos de antocianinas extraídas de frutas**, 2004. Tese de Doutorado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, 2004.

TONON, R. V.; BRABET, C.; HUBINGER, M. D. Influência da temperatura do ar de secagem e da concentração de agente carreador sobre as propriedades físico-químicas do suco de açaí em pó. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n.2, p. 444-450, abr.-jun. 2009.

TONON, R.V.; BRABET, C.; HUBINGER, M.D. Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray dried açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. **Food Research International**, v. 43, p. 907-914, 2010.

TONON, Renata Valeriano. **Secagem por atomização do suco de açaí: Influência das variáveis de processo, qualidade e estabilidade do produto**. 2010. Tese (Doutorado em

Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2010.

TOURNAS, V. H.; HEERES, J.; BURGESS, L. Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices. **Food Microbiology**, v.23, p.684-688, 2006.

TOURNAS, V.; TRAXLER, R. W. Heat resistance of a *Neosartorya fischeri* strain isolated from pineapple juice frozen concentrate. **Journal of Food Protection**, v. 57, n. 9, p. 814-816, 1994.

TURFAN, O.; TURKYILMAZ, M.; YEMIS, O.; OZKAN, M. Anthocyanin and colour changes during processing of pomegranate (*Punicagranatum* L., cv. Hicaznar) juice from sacs and whole fruit. **Food Chemistry**, v.129, p.1644-1651, 2011.

TYAGI, S.; SINGH, A.; BHARDWAJ, P.; SAHU, S.; YADAV, A. P.; KORI, M. L. Punicalagins - A Large Polyphenol Compounds Found in Pomegranates: A Therapeutic Review. **Academic Journal of Plant Sciences**, v.5, n.2, p.45-49, 2012.

ULLUM, T. U. **Recent Developments in Spray Drying**. Test & Development Manager, GEA Process Engineering A/S, Denmark. Disponível em: <http://www.ids2014.fr/en/pages/ids-2014-thorvald-u-ullum>. Acesso em: 02 mar. 2014.

VAILLANT, F.; MILLAN, A.; DORNIER, M.; DECLoux, M.; REYNES, M. Strategy for economical optimisation of the clarification of pulpy fruit juices using crossflow microfiltration. **Journal of Food Engineering**, v.48, p.83-90, 2001.

VAILLANT, F.; MILLAN, P.; O'BRIEN, G.; DORNIER, M.; DECLoux, M.; REYNES, M. Cross flow microfiltration of passion fruit juice partial enzymatic liquefaction. **Journal of Food Engineering**, n.42, p.215- 224, 1999.

VARDIN, H.; FENERCIOGLU, H. Study on the development of pomegranate juice processing technology: clarification of pomegranate juice. **Nahrung**, v.42, p.300-303, 2003.

VARDIN, H.; YASAR, M. Optimisation of pomegranate (*Punica granatum* L.) juice spray-drying as affected by temperature and maltodextrin content. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, p.167-176, 2012.

VASCONCELOS, L.C.; SAMPAIO, M.C.; SAMPAIO, F.C.; HIGINO, J.S. Use of *Punica granatum* as an antifungal agent against candidosis associated with denture stomatitis. **Mycoses**, v.46, n.5-6, p.192-196, 2003.

VASQUES, C. T. **Reologia do suco de goiaba: efeito da diluição e do tamanho de partícula**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pelotas, Florianópolis, 2003.

VEGARA, S.; MARTÍ, N.; MENA, P.; SAURA, D.; VALERO, M. Effect of pasteurization process and storage on color and shelf-life of pomegranate juices. **Food Science and Technology**, v.54, p.592-596, 2013.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; BARRA, K.; STRINGUETA, P. C. Flavonóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v.23, n. 2, p. 141-149, 2008.

WALLE, T. Serial review: flavonoids and isoflavones (phytoestrogens): absorption, metabolism, and bioactivity. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 36, n.7, 829-837, 2004.

WANG, X.; LI, X.; CHEN, L.; XIE, F.; YU, L.; LI, B. Preparation and Characterization of Octenyl Succinate Starch as A Delivery Carrier for Bioactive Food Components. **Food Chemistry**, v.126, n.3, 1218-1225, 2011.

WANG, X. D.; XU, S. Y. Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate. **Journal of Food Engineering**, v.82, p.271-275, 2007.

WASILA, H.; LI, X.; LIU, L.; AHMADA, I.; AHMAD, S. Peel effects on phenolic composition, antioxidant activity, and making of pomegranate juice and wine. **Journal of Food Science**, v.78, n.8, p.1166-72, 2013.

WENDEL, S; ÇELIK, M. An overview of Spray Drying technology. **Pharmaceutical Technology**, p.31-45, 1998.

WROLSTAD, R. E.; CULBERTSON, J. D.; CORNWELL, C. J.; MATTICK, L. R. Detection of adulteration in blackberry juice concentrates and wines. **Journal Association of Official Analytical Chemists**, v.65, 1417, 1982.

XAVIER, M. F. **Estudo da extração de antocianinas em colunas recheadas**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química, Florianópolis, 2004.

YILMAZ, Y.; TOLEDO, R. T. Health aspects of functional grape seed constituents. **Trends in Food Science and Technology**, v. 15, n. 9, p. 422-433, 2004.

YOUSEFI, S.; EMAM-DJOMEH, Z.; MOUSAVI, S. M. Effect of carrier type and spray drying on the physicochemical properties of powdered and reconstituted pomegranate juice (*Punica Granatum* L.). **Food Science and Technology**, v.48, n.6, p.677-684, 2011.



## ANEXO 1 – TRABALHOS PUBLICADOS

**SANTIAGO, M. C. P. A.**; Gouvêa, A.C.M.S.; GODOY, R. L. O.; BORGUINI, R. G.; PACHECO, S.; NOGUEIRA, R. I. ; NASCIMENTO, L. S. M. ; FREITAS, S. P. Analytical standards production for the analysis of pomegranate anthocyanins by HPLC. Brazilian Journal of Food Technology (Online), v. 17, p. 51-57, 2014.

**SANTIAGO, M. C. P. A.**; GODOY, R. L. O.; Borguini, R. G.; Paim, D. R. S.; Santos, L. F. C.; WILBERG, V. C.; NOGUEIRA, R. I.; FREITAS, S. P. Método cromatográfico para determinação de punicalagina em romã (*Punica granatum* L.). Comunicado Técnico - Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos, 2014 – Aceito para publicação (ISSN: 0103-5231).

**SANTIAGO, M. C. P. A.**; Silva, L. F. M.; GOUVEA, A. C. M. S.; GODOY, R. L. O.; CABRAL, L. M.; NOGUEIRA, R. I.; FREITAS, S. P. Influence of microfiltration process on the anthocyanin pomegranate juice content. In: International Nonthermal Food Processing Workshop: Research and innovation Towards Competitiveness, 2013, Florianópolis. International Nonthermal Food Processing Workshop: Research and innovation Towards Competitiveness, 2013.

**SANTIAGO, M. C. P. A.**; NOGUEIRA, R. I.; PONTES, S. M.; Gouvêa, A.C.M.S.; GODOY, R. L. O.; FREITAS, S. P. Influence of Encapsulating Agents on Anthocyanin Content of Pomegranate Juice Dehydrated by Spray Drying. In: 2013 IFT Annual Meeting & Food Expo, 2013, Chicago. 2013 IFT Annual Meeting & Food Expo, 2013.

**SANTIAGO, M. C. P. A.**; Godoy, Ronoel Luiz de Oliveira; NOGUEIRA, R. I. Gouvêa, A.C.M.S.; FREITAS, S. P. HPLC method for anthocyanins determination in pomegranate (*Punica granatum* L.) juice. In: VII Encontro Nacional de Cromatografia, 2012, Porto. VII Encontro Nacional de Cromatografia, 2012.

**SANTIAGO, M. C. P. A.**; GODOY, R. L. O.; NOGUEIRA, R. I.; Gouvêa, A.C.M.S.; FREITAS, S. P. Caracterização e avaliação do teor de antocianinas do suco de romã (*Punica granatum* L.). In: III Simpósio Brasileiro de Pós-Colheita de Frutas, Hortaliças e Flores, 2011, Nova Friburgo. III Simpósio Brasileiro de Pós-Colheita de Frutas, Hortaliças e Flores, 2011.