



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
Programa de Pós Graduação em Engenharia Química



**EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS
FENÓLICOS PRESENTES NAS FOLHAS DE *Camellia*
*sinensis***

LARISSA DOS SANTOS SOUSA

UBERLÂNDIA

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
Programa de Pós Graduação em Engenharia Química



**EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS
PRESENTES NAS FOLHAS DE *Camellia sinensis***

Nome do autor: Larissa dos Santos Sousa

Orientadoras: Dra. Vicelma Luiz Cardoso (UFU)

Dra. Miria Hespanhol Miranda Reis (UFU)

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

UBERLÂNDIA - MG

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S725e Sousa, Larissa dos Santos, 1987-
2016 Extração e purificação dos compostos fenólicos presentes nas folhas
de *Camellia sinensis* / Larissa dos Santos Sousa. - 2016.
124 f. : il.

Orientadoras: Vicelma Luiz Cardoso e Miria Hespagnol Miranda Reis.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.
Inclui bibliografia.

1. Engenharia química - Teses. 2. Chá - Teses. 3. Fenóis - Teses. 4. Ultrafiltração - Teses. I. Cardoso, Vicelma Luiz. II. Reis, Miria Hespagnol Miranda. III. Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

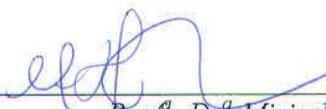
CDU: 66.0

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA, EM 15 DE FEVEREIRO DE 2016.

BANCA EXAMINADORA:



Prof.^a. Dr.^a. Vicelma Luiz Cardoso
(Orientadora - PPG-EQ/UFU)



Prof.^a. Dr.^a. Miria Hespanhol Miranda Reis.
(Co-Orientadora PPG-EQ/UFU)



Prof.^a. Dr.^a. Juliana de Souza Ferreira
(FEQ/UFU)



Prof.^a. Dr.^a. Grasielle Scaramal Madrona
(DAL/UEM)



Prof. Dr. Leonardo Luiz Borges
(PUC - GO)

Dedico essa dissertação aos meus pais Virgílio e Leise e à minha irmã Carolina, pelo amor incondicional e acolhimento nos bons e nos maus momentos.

AGRADECIMENTOS

Para a realização deste trabalho houve pessoas que colaboraram direta e indiretamente, às quais gostaria de agradecer com o meu sentimento de carinho e o meu sincero obrigado:

As professoras Vicelma Luiz Cardoso e Miria Hespanhol Miranda Reis, orientadoras desta dissertação, pelo conhecimento compartilhado, pela determinação e pela paciência.

A todos os professores e funcionários da FEQUI/UFU, pela contribuição no meu crescimento acadêmico, profissional e pessoal.

Aos membros da banca examinadora pelas contribuições.

Aos meus pais Virgílio e Leise, minhas maiores inspirações

À minha irmã Carolina, pelo companheirismo.

A todos os meus amigos que de alguma forma colaboram para este vitória.

A CAPES, FAPEMIG e CNPq pela oportunidade a mim concedida de fazer parte do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química e pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELA	iv
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Aspectos históricos do chá verde.....	5
2.2 Descrição da planta <i>Camellia sinesis</i>	5
2.3 Chá verde	6
2.4 Compostos bioativos.....	8
2.5 Tratamento e prevenção de doenças utilizando chá verde.....	9
2.6 Métodos de extração dos compostos fenólicos.....	10
2.7 Processo de separação por membranas	11
2.8 Materiais para as membranas.....	13
2.9 Polarização por concentração e <i>fouling</i>	15
2.10 Configuração da membrana.....	18
2.11 Utilização de processos de separação por membranas para produção de chá.....	18
2.13 O uso de ultrassom e campo eletromagnético nos processo de filtração.....	20
CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 Matéria-prima	22
3.2 Preparo do extrato de chá	22
3.2.1 Temperatura de infusão.....	22
3.3 Clarificação do extrato de chá verde.....	23
3.3.1 Quitosana	23
3.3.2 Centrifugação	24
3.4 Processos de filtração com membranas	24
3.4.1 Microfiltração.....	24
3.4.2 Ultrafiltração	26
.....	28
3.4.2.1 Ultrafiltração aplicando ultrassom no módulo contendo a membrana	28
3.4.2.2 Ultrafiltração aplicando campo eletromagnético no módulo contendo a membrana	29

3.4.3 Permeabilidade hidráulica das membranas de filtração.....	29
3.4.4 Comportamento do fluxo durante o processo de filtração do chá.....	30
3.4.5 Cálculo das resistências.....	30
3.4.6 Modelagem Matemática do Fluxo em Função do Tempo	31
3.4.7 Limpeza das membranas.....	33
3.5 Análises Físico-Químicas	33
3.5.1 Concentração de fenólicos.....	33
3.5.2 Turbidez.....	34
3.5.3 Sólidos totais	34
3.5.4 Intensidade da cor.....	35
3.5.5 Concentração de proteína.....	35
3.5.6 Análise cromatográfica.....	35
3.5.7 Estabilidades dos chás.....	36
3.5.8 Estimativa da formação do <i>tea cream</i>	37
3.5.9 Análise dos dados.....	37
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES	38
4.1 Extração dos compostos fenólicos	38
4.2 Pré tratamentos: adição de quitosana e centrifugação	40
4.2.1 Clarificação com quitosana	41
4.2.2 Centrifugação	42
4.3 Processos de filtração com membrana	43
4.3.1 Microfiltração	43
4.3.2 Ultrafiltração	44
4.4 Análises da estabilidade.....	60
4.5 Comparação entre o chá verde, o chá preto e o chá branco.....	66
4.5.1 Análises do fluxo	70
4.5.2 Cálculo das resistências.....	73
4.5.3 Estimativa do mecanismo responsável pelo <i>fouling</i> das membranas	74
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	79
Sugestões	82
CAPÍTULO 6 – ANEXOS	84
Curva de calibração para a metodologia 1 para concentração de fenólicos	87
Procedimento para construção da curva de calibração para cálculo da concentração de proteína.....	88

Curvas de calibração dos padrões utilizados para leitura no HPLC	90
Anexo E.....	94
Anexo F.....	96
REFERÊNCIAS.....	101

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Árvore da <i>Camellia sinensis</i> . Fonte: http://migre.me/qHIwj	6
Figura 2.2 – Etapas do processamento das folhas de <i>Camellia sinensis</i> para obtenção de quatro tipos de chás diferentes (FIRMINO, 2011).....	7
Figura 2.3 – Estrutura molecular da maioria das catequinas presentes no chá verde. Fonte: (YE et al., 2014).	8
Figura 2.4 – Esquema de filtração <i>dead-end</i> e <i>cross-flow</i> (NEVES, 2014).....	12
Figura 2.5 – Principais materiais utilizados no preparo de membranas (HABERT, 2006).....	13
Figura 2.6 - Morfologia da secção transversal dos diferentes tipos de membrana (HABERT, 2006)	14
Figura 2.7 – Membranas utilizadas em processos comerciais, com suas respectivas características e aplicações (adaptado de HABERT et al. (2006)).....	15
Figura 2.8 – Esquema da polarização por concentração, mostrando o acúmulo da camada gel polarizada (DACANAL, 2006).	16
Figura 2.9 – Principais resistências ao transporte de massa através de membranas (NOBLE e STERN, 1995).....	17
Figura 3.1 - Aparato de <i>jar test</i> utilizado nos testes com quitosana (DOMINGUES 2011, modificada).....	24
Figura 3.2 – Esquema do processo batelada utilizado para a microfiltração.	25
Figura 3.3 - Membranas de ultrafiltração da marca Microdyn Nadir (Fonte: NADIR 2007).....	26
Figura 3.4 –Convergence Inspector Minos.	27
Figura 3.5 – Esquema do processo de ultrafiltração convencional.	28
Figura 3.6 - Esquema do processo de ultrafiltração utilizando o ultrassom.....	28
Figura 3.7 – Equipamento responsável por gerar o campo eletromagnético (Fonte: TERRA, 2014).....	29
Figura 3.8. Representação dos mecanismos de <i>fouling</i> em membranas: (a) bloqueio completo de poros (n=2), (b) para o bloqueio intermediário (n=1), (c) formação de torta (n=0), e d) para o bloqueio interno (n=1,5) (adaptada de BARROS et al. 2003).....	32
Figura 3.9 – Turbidímetro de bancada Tecnopon TB-1000.	34
Figura 3.10 - HPLC Shimatzu utilizado para análises.	36

Figura 4.1 – Comportamento da concentração de fenólicos em função da temperatura e do tempo de infusão.....	38
Figura 4.2 - Resultado do teste com concentração de quitosana de 20, 40 e 100 PPM respectivamente.	42
Figura 4.3 - Comparação da porcentagem de rejeição dos parâmetros físico-químicos avaliados nos permeados dos processos de ultrafiltração convencional, com ultrassom e com campo magnético com membranas de diferentes pesos moleculares de corte.	47
Figura 4.4- Comparação da porcentagem de rejeição do galato de (-) – epigalo catequina, cafeína e epicatequina avaliados nos permeados dos processos de ultrafiltração convencional, com ultrassom e com campo magnético com membranas de diferentes pesos moleculares de corte.	51
Figura 4.5- Comparação da porcentagem de rejeição da catequina, (-) – epigalo catequina e do ácido gálico avaliados nos permeados dos processos de ultrafiltração convencional, com ultrassom e com campo magnético com membranas de diferentes pesos moleculares de corte.	53
Figura 4.6 - Comparação da porcentagem de redução dos parâmetros físico-químicos avaliados nos concentrados dos processos de ultrafiltração convencional, com ultrassom e com campo magnético com membranas de diferentes pesos moleculares de corte. ...	57
Figura 4.7 - Comparação das porcentagens de aumento da turbidez avaliadas nos concentrados dos processos de ultrafiltração convencional, com ultrassom e com campo magnético com membranas de diferentes pesos moleculares de corte.....	59
Figura 4.8 - Estabilidade dos permeados das microfiltrações com as membranas de 0,8, 0,3 e 0,22 μm (M08, M03 e M022, respectivamente) com relação a (a) concentração de fenólicos, (b) intensidade de cor, (c) turbidez e (d) formação de <i>tea cream</i>	61
Figura 4.9 - Estabilidade dos permeados das ultrafiltrações convencional com as membranas de 30, 20, 10 e 5 kDa (U30, U20, U10 e U5, respectivamente) com relação a (a) concentração de fenólicos, (b) intensidade de cor e (c) turbidez.	63
Figura 4.10 - Estabilidade dos permeados das ultrafiltrações convencional, com ultrassom e com campo magnético com a membranas de 20 kDa (U20, UU20 e UC20, respectivamente) com relação a (a) concentração de fenólicos, (b) intensidade de cor e (c) turbidez.....	65
Figura 4.11 – Amostras de chá verde, branco e preto respectivamente.	67

Figura 4.12 – Comportamento do fluxo de chá verde em função do tempo para: a) microfiltração, b) ultrafiltração convencional, c) ultrafiltração utilizando o ultrassom e d) ultrafiltração utilizando campo eletromagnético.	71
Figura 4.13 – Fluxo experimental e calculado para a microfiltração do extrato de chá verde para membranas com porosidade: a) 0,8 , b) 0,3 e c) 0,22 μm	75
Figura 4.14 - Fluxo experimental e calculado para a ultrafiltração de chá verde para membranas com peso molecular de corte igual 30 kDa para a) convencional, b) com ultrassom e c) com campo eletromagnético.	76
Figura 4.15 - Fluxo experimental e calculado para a ultrafiltração de chá verde para membranas com peso molecular de corte igual 20 kDa para a) convencional, b) com ultrassom e c) com campo eletromagnético.	77
Figura 4.16 - Fluxo experimental e calculado para a ultrafiltração de chá verde para membranas com peso molecular de corte igual 10 kDa para a) convencional, b) com ultrassom e c) com campo eletromagnético.	77
Figura 4.17 - Fluxo experimental e calculado para a ultrafiltração de chá verde para membranas com peso molecular de corte igual 5 kDa para a) convencional, b) com ultrassom e c) com campo eletromagnético.	78
Figura A.1 – Como iniciar o programa inspector minus.	84
Figura A.2 – Escolha do usuário.	84
Figura A.3 – Como escolher um programa e coloca-lo em funcionamento.....	85
Figura A.4 – Como criar um novo programa.	86
Figura B.1 – Curva de calibração obtida para a metodologia 1 de concentração de fenólicos totais.	87
Figura C.1 – Curva de calibração para concentração de proteína.	89
Figura D.1 – Curva de calibração para o padrão Galato de (-) – epigalocatequina (EGCG).....	90
Figura D.2 – Curva de calibração para o padrão Cafeína.....	90
Figura D.3 – Curva de calibração para o padrão Epicatequina (EC).	91
Figura D.4 – Curva de calibração para o padrão Catequina (C).	91
Figura D.5 – Curva de calibração para o padrão Epigalocatequina (EGC).....	92
Figura D.6 – Curva de calibração para o padrão Ácido Gálico.....	92
Figura D.7 –Gráfico característico para as catequina, ácido gálico e cafeína obtido no HPLC para o extrato de chá verde.	93
Figura F.1 – Permeabilidade hidráulica para a membrana de 0,8 μm	96

Figura F.2 – Permeabilidade hidráulica para a membrana de 0,3 μm	96
Figura F.3 – Permeabilidade hidráulica para a membrana de 0,22 μm	97
Figura F.4 – Permeabilidade hidráulica para a membrana de 30 kDa.....	97
Figura F.5 – Permeabilidade hidráulica para a membrana de 20 kDa.....	98
Figura F.6 – Permeabilidade hidráulica para a membrana de 10 kDa.....	98
Figura F.7 – Permeabilidade hidráulica para a membrana de 5 kDa.....	99

LISTA DE TABELA

Tabela 2.1 - Configurações de módulos típicos de membranas e algumas características (PUCCA, 2010).....	18
Tabela 4. 1 - Porcentagem de fenólicos totais após o processo de infusão para diferentes trabalhos.....	40
Tabela 4.2 - Características físico-químicas do extrato de chá verde recém preparado.....	41
Tabela 4.3 - Características físico-químicas para o sobrenadante após testes com a quitosana.	41
Tabela4. 4 – Características físico-químicas do sobrenadante após centrifugação do chá verde a 8000 rpm.....	43
Tabela4. 5 – Características físico-químicas dos permeados de cada processo de microfiltração para membranas com porosidades diferentes.....	43
Tabela 4.6 – Características físico-químicas dos permeados dos processos de ultrafiltração convencional do chá verde utilizando membranas de diferentes pesos moleculares de corte.....	45
Tabela 4.7 – Características físico-químicas dos permeados dos processos de ultrafiltração utilizando ultrassom do chá verde utilizando membranas de diferentes pesos moleculares de corte.....	45
Tabela 4.8 – Características físico-químicas dos permeados dos processos de ultrafiltração utilizando campo eletromagnético do chá verde utilizando membranas de diferentes pesos moleculares de corte.....	45
Tabela 4.9 - Concentração de catequinas, cafeína e ácido gálico nos permeados dos processos de ultrafiltração convencional para o chá verde.....	49
Tabela 4.10 - Concentração de cada catequina cafeína e ácido gálico nos permeados dos processos de ultrafiltração utilizando ultrassom para o chá verde.....	49
Tabela 4.11 - Concentração de cada catequina cafeína e ácido gálico nos permeados dos processos de ultrafiltração utilizando campo eletromagnético para o chá verde.....	50
Tabela 4.12 – Características físico-químicas dos concentrados dos processos de ultrafiltração convencional do chá verde utilizando membranas de diferentes pesos moleculares de corte.....	55

Tabela 4.13 – Características físico-químicas dos concentrados dos processos de ultrafiltração utilizando ultrassom do chá verde utilizando membranas de diferentes pesos moleculares de corte.....	55
Tabela 4.15 – Concentração das catequinas e de fenólicos totais para as amostras de chá verde, preto e branco.....	66
Tabela 4.16 – Características físico-químicas das amostras de chá verde, preto e branco.....	66
Tabela 4.17 - Concentração das catequinas, cafeína e ácido gálico nos permeados dos processos de ultrafiltração utilizando membrana de 30 kDa para o chá preto e o chá branco.....	68
Tabela 4.18 – Análise de estabilidade para os permeados de ultrafiltração com ultrassom para a membrana de 30 kDa dos chás preto e branco.....	69
Tabela 4.19 – Resistências obtidas para os processos de ultrafiltração convencional, utilizando ultrassom e utilizando campo eletromagnético.....	73
Tabela C.1. Construção da Curva Padrão de Proteínas.....	89
Tabela E.1 - Estabilidade dos permeados do processo de microfiltração.....	94
Tabela E.2 - Estabilidade dos permeados do processo de ultrafiltração convencional.....	94
Tabela E.3 - Estabilidade dos permeados do processo de ultrafiltração com ultrassom.....	95
Tabela E.4 - Estabilidade dos permeados do processo de ultrafiltração com campo magnético.....	95

RESUMO

Os chás provenientes da planta *Camellia sinensis* são tradicionalmente utilizados de forma medicinal devido ao fato de conterem bioprodutos com grande poder antioxidante. Os bioprodutos responsáveis pelos benefícios na saúde humana são as catequinas, classe de polifenóis de baixo peso molecular. A tecnologia de separação por membranas pode ser utilizada para clarificação, purificação ou concentração de diversos produtos e bioprodutos. Assim, este trabalho tem como objetivo extrair e purificar os compostos fenólicos presentes no chá verde, preto e branco, usando água como solvente para extração e membranas para purificação. Assim, as folhas da *Camellia sinensis* foram submetidas à infusão em água na concentração de 100 g de folhas para 1 L de água, primeiramente analisou-se a extração dos compostos fenólicos em temperaturas que variaram de 30 a 80°C em diferentes tempos (0 a 120 min), sendo que o extrato obtido foi filtrado em filtro de pano. Posteriormente analisou-se como pré-tratamento a coagulação com quitosana (20 a 100 ppm), a centrifugação (20 min a 80000 rpm) e a microfiltração (membranas de éster de celulose com porosidade de 0,22, 0,3 e 0,8 µm a 0,7 bar). Os processos de ultrafiltração foram realizados a 6 bar e tinham como alimentação o permeado da microfiltração com membrana de 0,8 µm de porosidade. Na ultrafiltração utilizou-se membranas NADIR de poliétersulfona com peso molecular de corte de 5, 10, 20 e 30 kDa, em um processo com reciclo. Os ensaios de ultrafiltração foram conduzidos também com aplicação de ultrassom e campo eletromagnético. Os fluxos obtidos na micro e na ultrafiltração foram utilizados para calcular o mecanismo de *fouling* (aplicando modelagem matemática, para definir o mecanismo responsável pelo decaimento do fluxo) e para calcular as resistências das membranas. Todos estes procedimentos foram realizados primeiramente com o chá verde e o processo que apresentou melhor resultado foi utilizado para o chá preto e o chá branco. As amostras obtidas em cada processo foram analisadas quanto a concentração de fenólicos totais (*Folin-Ciocalteu*), turbidez, intensidade de cor, concentração de sólidos, proteínas e análise cromatográfica (HPLC). Analisou-se ainda a formação de *tea cream* frente aos processos de micro e ultrafiltração, sendo que para isso as amostras foram armazenadas sob refrigeração (5°C) durante 16 h. Observou-se que em relação aos resultados dos pré-tratamentos a quitosana foi a que obteve uma maior redução dos sólidos presentes no extrato (56,22%), porém a microfiltração com a membrana de 0,8 µm de porosidade foi utilizada como pré-tratamento da ultrafiltração pois além de reduzir a concentração de sólidos, apresentou baixa redução dos compostos fenólicos e apresentou maior valor de fluxo estabilizado (10,27 kg/m²h). Dentre os processos de ultrafiltração, aquele que se destacou com os melhores resultados foi a filtração com membrana de 20 kDa, ou seja, apresentou um permeado estável, sem formação de *tea cream*, maior teor de compostos fenólicos e menores valores de resistências. Entre as diferentes condições aplicadas na ultrafiltração, o ultrassom apresentou menor resistência, aumento no fluxo (12,24%) estabilizado, diminuição da rejeição dos compostos fenólicos (25,64%) e ainda o permeado permaneceu estável após 30 dias armazenado sob refrigeração. Para os permeados de chá verde analisados o EGCG, foi o que se obteve em maior quantidade (39,55%) para a membrana de 30 kDa no processo convencional. Para o processo utilizando ultrassom este valor passou para 41,60. Assim, conclui-se que os processos de micro e ultrafiltração podem ser aplicados sendo que os permeados obtidos nas ultrafiltrações são mais estáveis que os da microfiltração e apresentam compostos fenólicos purificados.

Palavras chave: *Camellia sinensis*, chá, compostos fenólicos, membrana, microfiltração, ultrafiltração.

ABSTRACT

The teas from *Camellia sinensis* plant are traditionally used medicinal form due to the fact they contain bioproducts with antioxidant power and are able to prevent and even cure some diseases like cancer. The products responsible for the benefits in human health are the catechins, polyphenols low molecular weight class. Membrane separation technology can be used for clarification, purification, or concentration for different products. Thus, this paper aims to extract and purify the phenolic compounds present in green, black and white tea, using water as a solvent for extraction and membranes for purification. The leaves of *Camellia sinensis* were subjected to infusion at the concentration of 100 g of leaves into 1 L of water, at first was analyzed the extraction of phenolic compounds at temperatures ranging from 30 to 80 ° C for different times (0 to 120 min), and the extract was filtered through filter cloth. Subsequently analyzed as pre-treatment with chitosan (20 to 100 ppm), centrifugation (20 min at 80000 rpm) and microfiltration (cellulose ester membranes with porosity of 0,22, 0,3 and 0,8 µm to 0,7 bar). The ultrafiltration process was performed at 6 bar and the feed was the permeate from the microfiltration membrane with a 0.8 µm pore size. The ultrafiltration membranes used was from NADIR polyethersulfone with molecular weight cutoff of 5, 10, 20 and 30 kDa, in a process with recycle. The ultrafiltration tests were also conducted with application of ultrasound and electromagnetic field. The flows obtained from the micro and ultrafiltration was used to calculate the fouling mechanism (applying mathematical model, to define the mechanism responsible for the decay of flow) and to calculate the resistance of the membranes. All these procedures were first performed with green tea and the process that best results were used for black tea and white tea. Samples obtained in each case were analyzed for the concentration of phenolics (Folin-Ciocalteu reagent), turbidity, color intensity, the concentration of solids, proteins and chromatographic analysis (HPLC). It was also analyzed the formation of tea cream front of the micro and ultrafiltration processes, and for this the samples were stored under refrigeration (5 °C) for 16 h. It was observed that compared to the results of pre-treatments that chitosan was obtained a better reduction of solids contained in the extract (56,22%), but microfiltration membrane with porosity of 0,8 µm was used as pre ultrafiltration-treatment as well as reducing the concentration of solids, showed low reduction of phenolic compounds and showed higher stabilized flow value (10,27 kgm⁻²h⁻¹). Among the different conditions applied in the ultrafiltration, ultrasound has lower resistance, increase in flux (12,24%) stabilized, reduction of rejection of phenolic compounds (25,64%) and the permeate was stable even after 30 days storage under refrigeration. For green tea permeated analyzed EGCG, which was obtained in larger amount (39,55%) for the 20 kDa membrane in the conventional process. . For the process using ultrasound this value increased to 41,60%. Thus, it is concluded that micro and ultrafiltration processes can be applied and the permeate obtained in the ultrafiltration are more stable than the microfiltration and had purified phenolic compounds.

Keywords: *Camellia sinensis*, tea, phenolic compounds, membrane, microfiltration, ultrafiltration.

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

1.1 Introdução

O chá é a segunda bebida mais consumida em todo o mundo, perde apenas para a água (KUMAR et al. 2012). Sua ingestão está relacionada a compostos bioativos que são capazes de prevenir e tratar algumas doenças incluindo câncer e doenças do coração (BAZINET et al. 2007; JANKUN et al.1997). O aumento do consumo deste tipo de bebida está diretamente relacionado à busca de estilos de vida mais saudáveis e a tentativa de diminuir a quantidade de fármacos para tratar certas doenças.

Dentre os chás tem-se destaque os provenientes da *Camellia sinensis*. Dentre eles os mais consumidos e mais conhecidos são o chá verde, o chá preto e o chá branco. Desses três tipos de chás, o chá verde é o que possui maior quantidade de compostos funcionais (CHENG, 2006). A grande diferença entre eles é como as folhas são processadas. Para o preparo do chá preto, as folhas devem ser fermentadas. Para o chá verde, as folhas são apenas escaldadas e fervidas para garantir que haja a preservação da cor, e para o chá branco as folhas passam por um processo mais brando, e é por causa disso que o aroma dele é mais suave que do chá preto (NISHIYAMA et al., 2010).

Os compostos funcionais que estão presentes na *Camellia sinensis* são as catequinas, dentre elas pode-se citar as principais : (-)-epigallocatechin gallate (EGCG), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epicatechin gallate (ECG), and (-)-epicatechin (EC). Dentre elas, a EGCG está em maior quantidade e é a principal catequina utilizada para tratamento de doenças como o câncer. Sabe-se que este fenólico inibe a enzima responsável pelo crescimento do tumor (BAZINET et al. 2007; JANKUN et al., 1997).

Além das catequinas, existem outros compostos fundamentais que são responsáveis pelas características sensoriais do chá, como as proteínas, aminoácidos, açúcares, polissacarídeos, lipídios, cafeína e minerais (JIANG et al., 2015).

A extração com solventes é o método mais aplicado para a separação dos compostos bioativos presentes no chá (MANNA et al., 2014). Porém, esta técnica pode não ser seletiva e ainda o extrato obtido contém solventes que podem ser prejudiciais a saúde.

Além da necessidade de extração dos compostos bioativos presentes no chá, tem-se a problemática relacionada a baixa estabilidade do produto pronto para beber.

Industrialmente, o chá gelado que é vendido em latas e garrafas é produzido pelo uso do extrato do chá com adição de açúcar, suco de limão, ácido e corantes, para modificar seu aroma, sabor e cor. Além disso, vários aditivos são usados como agentes estabilizantes. Porém, tal tipo de bebida não atende a demanda dos consumidores que estão procurando produto livre de aditivos. Um dos principais problemas encontrados na produção do chá frio pronto para beber, livre de aditivo, é a sua instabilidade devido à formação do “*tea cream*”. O processo de formação do “*tea cream*” faz com que o chá apresente uma aparência cremosa, quando deixado sobre refrigeração. Além de afetar o visual, o sabor do chá também é alterado. Isso acontece pois os fenólicos presentes no chá sofrem oxidação quando interagem com proteínas e pectinas formando complexos maiores que eventualmente precipitam (CHANDINI et al., 2013). É interessante que os compostos que causam esses complexos, como as proteínas, sejam removidos para proporcionar ao chá gelado estabilidade.

Assim, o processo de filtração por membranas apresenta-se como uma alternativa para purificação, concentração e estabilização de chá.

O processo de filtração por membrana já vem sendo utilizado com sucesso para clarificação de vários tipos de frutas e de alguns tipos de vinhos (DOMINGUES 2011; ULBRICHT et al. 2009). Processos que utilizam membrana são atrativos, devido à preservação das características nutricionais e sensoriais do produto. O permeado tem valor extremamente baixo de turbidez, desprovido de microorganismos e de alta qualidade. Estes processos são efetuados em temperatura ambiente, o que se mostra bastante interessante já que existem compostos termo sensíveis no produto. A microfiltração e a ultrafiltração são geralmente utilizadas para clarificação e concentração de sucos de frutas (RAI et al., 2010).

Alguns autores como KAWAKTSU et al. (1996), LI et al. (2005) e KUMAR et al. (2012) ultrafiltraram o chá verde em diferentes membranas e obtiveram permeado clarificados e com concentração de compostos fenólicos maiores que 40%. Contudo, é necessário ainda investigar a influência de membranas de diferentes porosidades para clarificação e estabilização do extrato de chá, bem como para a purificação e concentração dos compostos bioativos presentes no chá. Tem-se também a necessidade de uma efetiva comparação das características dos permeados dos chás verde, branco e preto.

Além disso, uma das maiores dificuldades relacionadas à aplicação do processo de filtração por membranas refere-se ao baixo fluxo de permeado. A aplicação de ultrassom no módulo de filtração por membranas apresenta-se como uma alternativa para o aumento do fluxo de permeado.

AGHDAM et al. (2015) aplicaram ultrassom durante a clarificação do suco de romã e observaram um aumento do fluxo de permeado devido à diminuição da formação de torta sobre a membrana.

Uma outra alternativa inovadora para modificação do fluxo pela membrana é a aplicação de campo eletromagnético. LIU et al. (2012) observaram um aumento no fluxo do permeado em um bioreator com membrana devido a aplicação de um campo elétrico.

Ainda, o estudo matemático dos fenômenos de *fouling* e de resistências durante o processo de filtração por membranas deverá elucidar maneiras de aumentar o fluxo pela membrana.

1.2 Objetivos

Este trabalho tem como objetivo geral extrair e purificar os compostos fenólicos presentes no chá verde, preto e branco, usando água como solvente para extração e membranas para purificação. E como objetivos específicos têm-se:

- Realizar a extração dos compostos fenólicos presentes nos chá utilizando água como solvente;
- Avaliar a melhor temperatura e tempo de extração dos compostos fenólicos presentes no chá verde;
- Realizar pré-tratamentos como centrifugação e coagulação com quitosana para diminuir a quantidade de sólidos suspensos presentes no extrato de chá verde;
- Aplicar membranas de microfiltração de diferentes porosidades para clarificação do chá verde;
- Aplicar membranas de ultrafiltração de diferentes pesos moleculares de cortes para purificação e concentração dos compostos fenólicos do chá verde, preto e branco;

- Avaliar se a ultrafiltração se mostra eficiente para a purificação dos compostos fenólicos;
- Verificar a influência da aplicação de ultrassom e de campo eletromagnético nas características do permeado de chá verde;
- Avaliar as resistências durante os processos de ultrafiltração do chá verde;
- Avaliar os mecanismos de *fouling* responsáveis pelo decaimento do fluxo do permeado;
- Avaliar se os permeados das filtrações são estáveis e se formam *tea cream*.

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O chá é a segunda bebida mais consumida no mundo, ficando atrás somente da água. Ele é considerado por muitos, uma bebida funcional capaz de prevenir e até mesmo curar algumas doenças (JANKUN et al. 1997).

Pode-se considerar uma definição para chá como: produto constituído de uma ou mais partes de espécie(s) vegetal(is) inteira(s), fragmentada(s) ou moída(s), com ou sem fermentação, tostada(s) ou não. O produto pode ser adicionado de aroma e ou especiaria para conferir aroma e ou sabor (ANVISA, 2005).

2.1 Aspectos históricos do chá verde

Os primeiros arbustos de *Camellia sinensis* chegaram ao Brasil no início do século XIX por meio de um comerciante chamado Luiz de Abreu. Nesta época, os arbustos foram plantados em terras coloniais, a mando de D. João VI e a partir disso suas propriedades começaram a ser notadas e difundida por todo o país (PAGANI-COSTA e CARVALHODA-SILVA 2011).

A planta *Camellia sinensis* logo espalhou-se por outros estados como Minas Gerais, São Paulo e Paraná. Atualmente o Vale da Ribeira em São Paulo (SP) é a região que se realiza o plantio desta planta (FIRMINO, 2011).

2.2 Descrição da planta *Camellia sinensis*

A *Camellia sinensis* é uma árvore de estatura pequena seu habitat natural é na China, incluindo Tailândia e Vietnã. Seu tamanho pode chegar a 6 metros de altura quando adulta. A planta apresenta com margem serreada. As flores são pequenas e brancas, o fruto é uma capsula com dois ou três centímetros de diâmetro, como pode ser observado na Figura 2.1 (SAITO 2007; FIRMINO 2011; AS et al. 2000).



Figura 2.1 – Árvore da *Camellia sinensis*. Fonte: <http://migre.me/qHIwj>.

2.3 Chá verde

O chá verde é uma bebida preparada através da infusão das folhas da *Camellia sinensis*. Para isso, as folhas desta planta devem passar por etapas específicas de preparo, como pode ser observado na Figura 2, já que as folhas desta mesma planta originam chás diferentes (BELTRAN et al., 2014; NAGAO et al. 2007).

Atualmente existem diversos tipos de chá provenientes da planta *Camellia sinensis*, porém os mais consumidos são: o preto, o verde, o branco e o vermelho. A Figura 2.2 mostra um esquema de como as folhas devem ser preparadas para obter cada chá específico (GUPTA, 2010).



Figura 2.2 – Etapas do processamento das folhas de *Camellia sinensis* para obtenção de quatro tipos de chás diferentes (FIRMINO, 2011).

Para o processo de manufatura do chá verde, é necessário que as folhas recém colhidas passem por aquecimento a fim de promover a desnaturação da enzima polifenol oxidase. Esta etapa é de extrema importância para prevenir a oxidação dos

bioativos do chá, obtendo um produto seco e estável de melhor qualidade (FIRMINO, 2011).

2.4 Compostos bioativos

Os benefícios do chá verde associados a saúde do homem, tem sido atribuídos a altas concentrações de antioxidantes e de compostos fenólicos. Graças a isso, o chá verde passou a fazer parte do grupo de bebidas que possuem propriedades funcionais (KUMAR et al., 2011; FIRMINO 2011).

Os fenólicos são os responsáveis por proporcionar este efeito antioxidante do chá verde, mas além delas existem muitos tipos de compostos solúveis indispensáveis para o aroma e sabor do chá, incluindo flavonóis, proteínas aminoácidos, açúcares, polissacáridos, lipídios, cafeína, minerais, dentre outros (JIANG et al. 2015). Os fenólicos totais representam de 10 a 20% do peso seco do chá, dentre elas se destacam: galato de epigalocatequina (EGCG) de 1,2 a 18,8%, epigalocatequina (EGC) de 0,1 a 5,5% , epicatequina (EC) de 0,9 a 2% e traços (<0,08%) de catequina (SAITO, 2007). A estrutura dessas e outras catequinas podem ser vistas na Figura 2.3.

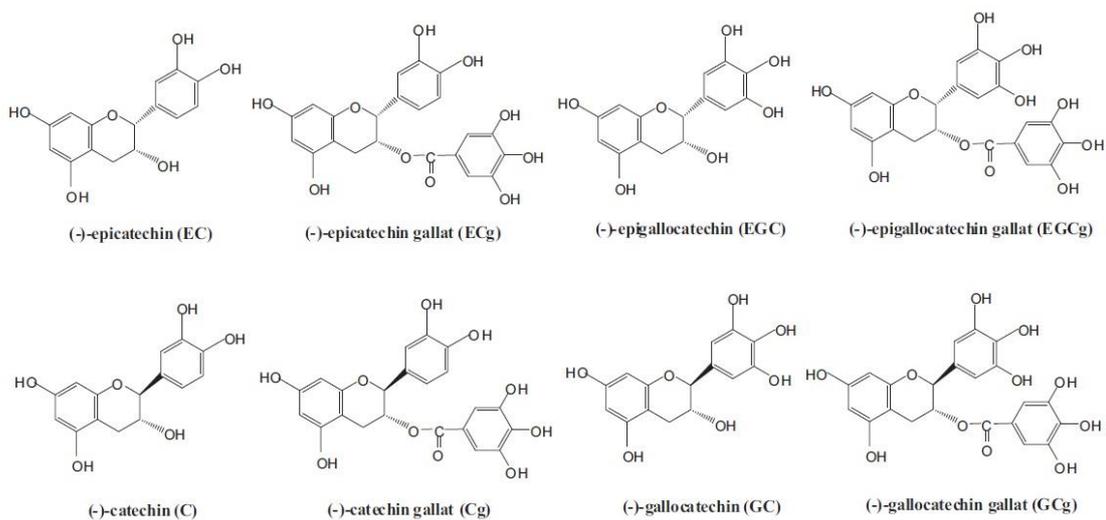


Figura 2.3 – Estrutura molecular da maioria das catequinas presentes no chá verde.

Fonte: (YE et al., 2014).

Os compostos fenólicos da *Camellia sinensis* são conhecidos como catequinas, as quais são compostos que resultam do metabolismo das plantas. Elas são responsáveis pela coloração e maturação dos frutos, a nível nutricional, influenciam cor e sabor de certos alimentos (PORTO, 2002).

A natureza polifenólica das catequinas confere à maioria dos polifenóis propriedades como: elevado poder redutor e capacidade de neutralizar radicais livres de oxigênio. Estas propriedades, são responsáveis pelos efeitos biológicos que são encontrados na literatura como, sua ação antibacteriana, inibidora de enzimas e sua atividade antioxidante (PORTO, 2002; JANKUN, SELMAN e SWIERCZ 1997).

O envelhecimento da pele está relacionado a oxidação dos radicais livres presentes na pele. Para testar a eficácia antioxidante do chá verde, voluntários consumiram quantidades moderadas do chá, ou seja, de 1-6 copos/dia e foi observado aumento da capacidade antioxidante do sangue (CAVALCANTI et al. 2007).

2.5 Tratamento e prevenção de doenças utilizando chá verde

Os bioativos encontrados na planta *Camellia sinensis* são muito estudados pois vários trabalhos já reportaram os benefícios que eles trazem para saúde humana prevenindo e até curando certas doenças (CHENG, 2006).

De acordo WALTNER-LAW et al. (2002) a epigalocatequina regula os genes que codificam enzimas glicogênicas e proteínas-tirosina-fosforilação através da modulação do estado redox da célula. Assim ela pode ser um agente antidiabético.

No trabalho apresentado por JANKUN et al. (1997), verificaram que o galato de epigalocatequina (EGCG) é capaz de inibir a enzima urokinase (uPA), que é uma das enzimas que invadem as células e causam as metástases. A maioria dos inibidores de uPA sintéticos, não são muito utilizados pois seu poder inibidor é baixo e é bastante tóxico.

A interação da cafeína com o galato de epigalocatequina proporciona maior efeito termogênico. Além disso, melhora o condicionamento dos atletas, retardando a fadiga muscular (DULLOO et al. 1999; SAIGG e SILVA 2009).

Segundo GUO et al. (2005), os compostos fenólicos presentes no chá verde apresentam efeitos que protegem as células contra a neurotoxina proparkinsoniana precursora do mal de Parkinson.

A cárie dental é uma doença infecciosa de origem bacteriana. Alguns estudos mostraram que produtos naturais como o chá verde possuem propriedade antimicrobiana (CASTILHO et al. 2007).

Existem outras finalidades que os chá verde pode ser usado, porém seu consumo em excesso pode causar alteração no sistema nervoso central, irritabilidade e alterações no sistema cardio vascular (VIERO et al. 2005; SMITH 2002).

Estudos recentes mostraram que a ingestão de 375 mg/dia de catequinas, auxilia na diminuição na circunferência abdominal e que a ingestão de compostos fenólicos não deve ser superior a 690 mg/dia (NAGAO et al. 2007).

2.6 Métodos de extração dos compostos fenólicos

De acordo com OLIVEIRA (2014) apud AZMIR et al. (2013) o sucesso de uma técnica de extração está diretamente relacionada como o solvente utilizado e a aplicação de calor e/ou maceração. De forma geral, a extração de compostos fenólicos se baseia na difusão dos compostos de uma matriz sólida (amostras do alimento) utilizando uma matriz líquida (solvente). O processo pode ser dividido em duas etapas:

1)Primeira etapa: é realizada a moagem da planta, pois quanto maior a área superficial maior contato terá com o solvente e mais eficiente será a extração. Em seguida este material é colocado com o solvente escolhido;

2) Segunda etapa: nesta etapa ocorre a difusão. Esta pode ser dividida em duas fases: a primeira ocorre dentro da fase sólida e a segunda etapa ocorre nas camadas externa das partículas;

Para a escolha do solvente, devem ser considerados alguns fatores como: afinidade molecular entre solvente e soluto, transferência de massa, segurança ambiental, toxicidade para humanos e viabilidade financeiratambém. Metanol e misturas de metanol/água são os solventes mais utilizados para extração de substâncias fenólicas (OLIVEIRA 2014 apud TSAO 2010).

Depois da escolha do solvente, outros fatores devem ser considerados para que se obtenha ótimos resultados no processo de extração, são eles:

- Temperatura: na maioria dos casos, quanto maior a temperatura melhor a eficiência de extração, porém elas devem ser estudadas com cautela, pois os compostos fenólicos em temperaturas extremas se degradam. Elevadas temperaturas aumentam a eficiência da extração de forma que o calor torna as paredes celulares permeáveis, aumentando os coeficientes de solubilidade e a difusão dos compostos a serem extraídos e diminuindo a viscosidade dos solventes, facilitando dessa forma, a passagem do solvente através da massa do substrato sólido e o processo subsequente de separação (filtração ou sedimentação);

- Tempo: é um fator de extrema importância uma vez que longos tempos de extração podem oxidar os compostos fenólicos da amostra. Entretanto, curtos períodos de extração podem não ser suficientes para a completa transferência dos solutos para a fase orgânica;

-Tamanho das partículas das amostras: quanto menor a partícula, maior a área disponível para a transferência de massa;

-Proporção amostra-solvente: para que ocorra uma alta transferência de massa, é necessário que a proporção amostra-solvente seja pequena (OLIVEIRA, 2014 apud XU E CHANG, 2007).

2.7 Processo de separação por membranas

Os processos de filtração utilizando membranas são utilizados em diversos setores, como: na indústria alimentícia, farmacêutica, combustíveis, dentre outros (NUORTILA-JOKINEN e NYTROM 1996).

A membrana atua como barreira seletiva quando submetida à algum tipo de força externa. É um filme fino e sólido, e dependendo do tamanho do poro, pode suportar altas pressões. O interessante em se trabalhar com estes sistemas é que não ocorre transformação química ou biológica dos componentes durante a filtração. (SCHNEIDER e TSUTIYA, 2001). A Figura 2. 4 apresenta um esquema básico de dois processos distintos separação por membranas. A principal diferença entre eles está na alimentação. Uma é realizada perpendicularmente a membrana (*dead – end*) e a outra tangencialmente (*cross – flow*) (HABERT 2006).

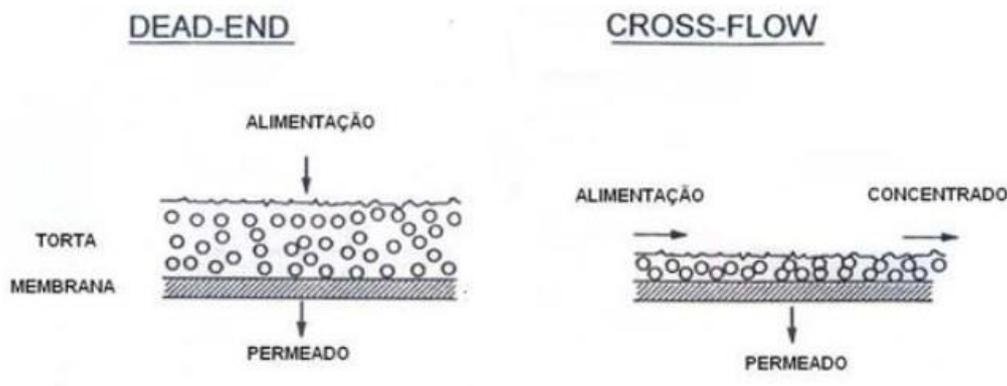


Figura 2.4 – Esquema de filtração *dead-end* e *cross-flow* (NEVES, 2014).

Nos últimos cinquenta anos o conceito de membrana associada ao processo de separação evoluiu muito no sentido das mesmas constituírem barreiras altamente seletivas, em que não só o tipo de material que as compõe, mas também as estruturas microscópicas que apresentam podem determinar diferentes interações entre membrana/solvente/soluto e a ocorrência de transporte preferencial de certos componentes de uma mistura solvente/soluto (STREIT, 2011).

De acordo com HABERT (2006) os processos de filtração com membrana, apresentam as seguintes vantagens:

- Economia de energia: na maioria dos casos os processos de separação ocorrem sem mudança de fase, dessa forma, os processos são considerados energeticamente favoráveis;
- Seletividade: conhecendo a porosidade da membrana, é possível determinar quais produtos ficarão retidos e quais serão permeados;
- Separação de compostos termolábeis: tendo em vista que os processos de separação por membrana são operados a temperatura ambiente, eles podem ser usados na separação de produtos termo sensíveis;
- Simplicidade de operação: são sistemas simples de serem operados e não requer grande mão de obra.

2.8 Materiais para as membranas

As membranas comerciais são produzidas a partir de duas classes de materiais: os orgânicos (maioria polímeros), e os inorgânicos (metais e cerâmicos). Normalmente as membranas orgânicas apresentam menor custo de operação que as inorgânicas. No entanto as inorgânicas apresentam uma maior vida útil e permite limpezas mais eficientes (HABERT, 2006). Na Figura 2.5 são apresentados alguns dos materiais mais empregados no preparo de membranas comerciais.

<u>POLIMÉRICOS</u>	
<ul style="list-style-type: none"> • ACETATO DE CELULOSE • POLI(SULFONA) • POLI(ÉTER SULFONA) • POLI(ACRILONITRILA) • POLI(ÉTER IMIDA) • POLI(CARBONATO) 	<p>Polímeros para pele densa de membranas compostas</p> <ul style="list-style-type: none"> • POLI(ALCOOL VINÍLICO) • POLI(DIMETIL SILOXANO) • POLI(URETANA) • EPDM • EVA
<u>NÃO POLIMÉRICOS</u>	
<ul style="list-style-type: none"> • CERÂMICAS • CARBONO • ÓXIDOS METÁLICOS • METAIS 	

Figura 2.5 – Principais materiais utilizados no preparo de membranas (HABERT, 2006).

A morfologia da membrana assim como sua constituição está diretamente relacionada com a aplicação desta membrana e a sua eficiência durante o processo de filtração. Quanto a sua morfologia, podem ser isotrópicas (porosas ou densas) ou anisotrópicas. As membranas anisotrópicas apresentam uma camada superior mais fechada e fina com presença ou não de poros em sua estrutura. Elas podem ser ainda classificadas como integrais e compostas, de acordo com o material com a qual são constituídas as suas duas regiões como mostrado na Figura 2.6 (DOMINGUES, 2011).

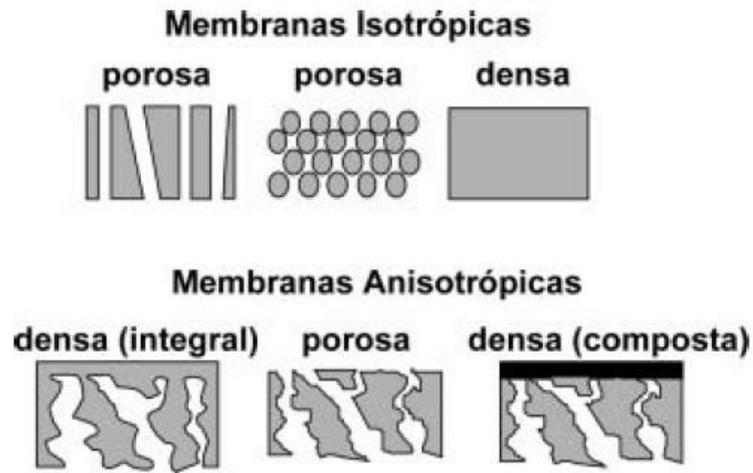


Figura 2.6 - Morfologia da secção transversal dos diferentes tipos de membrana
(HABERT, 2006)

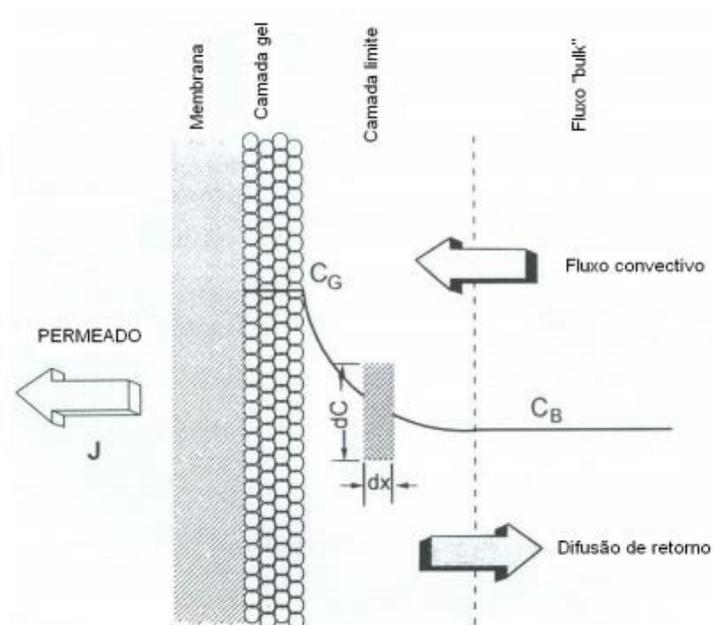
Os processos de separação utilizando membranas podem ser aplicados em diferentes situações. Na Figura 2.7 estão apresentados alguns destes processos.

Processo	Força Motriz	Material Retido	Material que Permeia	Aplicações
Microfiltração (MF)	ΔP (0,5 – 2 atm)	Material em suspensão, bactérias. Massa molar > 500k Da (0,01 μ m).	Água e sólidos dissolvidos.	Esterilização bacteriana; clarificação vinhos e cervejas; concentração de células; oxigenação de sangue.
Ultrafiltração (UF)	ΔP (1 – 7 atm)	Colóides, Macromoléculas. Massa molar > 5.000 Da.	Água (solvente), sais solúveis de baixa massa molar.	Fracionamento/concentração de proteínas, recuperação de pigmentos/óleos.
Nanofiltração (NF)	ΔP (5 – 25 atm)	Moléculas de massa molar. Média 500 < MM < 2.000 Da.	Água, sais e moléculas de baixa massa molar.	Purificação de enzimas; biorreatores a membrana.
Osmose Inversa (OI)	ΔP (15 – 80 atm)	Todo material solúvel ou em suspensão.	Água (solvente).	Dessalinização de águas; concentração de suco de frutas; desmineralização de águas.
Diálise (D)	ΔC	Moléculas de massa molar > 5.000 Da.	Íons e orgânicos de baixa massa molar.	Hemodiálise; rim artificial; recuperação de NaOH.
Eletrodialise (ED)	ΔE	Macromoléculas e compostos não iônicos.	Íons.	Concentração soluções salinas; purificação de águas.

Figura 2.7 – Membranas utilizadas em processos comerciais, com suas respectivas características e aplicações (adaptado de HABERT et al. (2006))

2.9 Polarização por concentração e *fouling*

A polarização por concentração se caracteriza pela formação de torta (acúmulo de soluto) na superfície da membrana (VASAN e FIELD, 2006). Este acúmulo tem como consequência o aumento na resistência no processo de separação causando assim redução no fluxo do permeado. Quando a formação da torta muito alta, pode-se formar uma camada gel na superfície da membrana (Figura 2.8) (MULDER, 1996; GHIGGI 2011).



J = fluxo do permeado ($M/(L^2t)$)

C_G = concentração na camada gel (M/L^3)

C_B = concentração no meio líquido (*bulk*)

do soluto rejeitado (M/L^3)

Figura 2.8 – Esquema da polarização por concentração, mostrando o acúmulo da camada gel polarizada (DACANAL, 2006).

De acordo com GHIGGI (2006) o *fouling* é caracterizado pelo acúmulo de sólidos na superfície ou na matriz da membrana, causando diminuição do fluxo do permeado. O *fouling* pode permanecer quando o processo de filtração é interrompido, podendo ser reversível ou irreversível. Se ele permanecer mesmo após a lavagem química da membrana, ele é dito irreversível.

A Figura 2.9 mostra os principais mecanismos de *fouling* responsáveis pelo decaimento do fluxo.

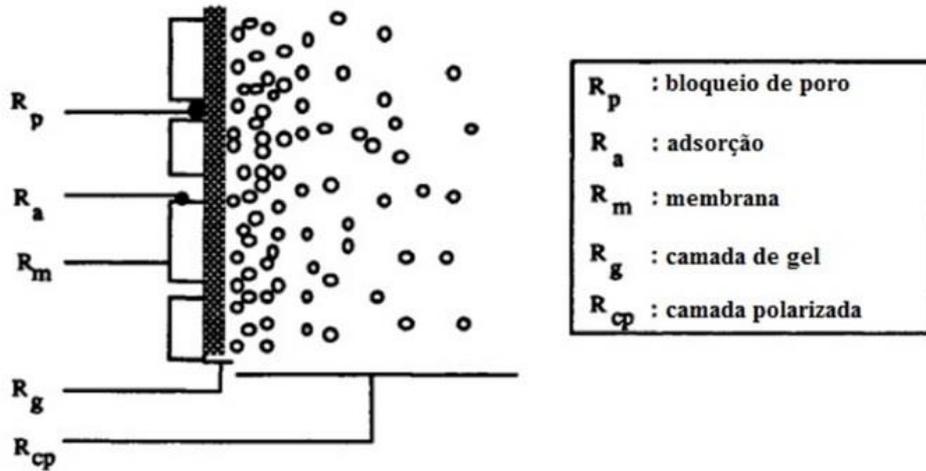


Figura 2.9 – Principais resistências ao transporte de massa através de membranas (NOBLE e STERN, 1995).

De acordo com HUDGSON et al. (1993) o decaimento do fluxo pode ser causado por quatro mecanismos diferentes, podendo eles atuar conjuntamente ou separadamente. Esses mecanismos são:

- Bloqueio completo: assim que o processo de filtração se inicia, cada partícula que entra em contato com a membrana, causa o bloqueio completo de um poro. Neste caso, assume-se que não há sobreposição de partículas;
- Bloqueio interno: a deposição contínua de partículas ao longo do comprimento do poro faz com que haja um aumento na resistência da membrana;
- Bloqueio aleatório: as partículas que entram em contato com a membrana, podem ser depositadas em qualquer parte da membrana, neste caso é permitido o acúmulo de partícula;
- Bloqueio de torta: a formação da torta é a responsável pela resistência do processo de filtração. Assume-se que o fluxo decresce com o aumento da espessura da torta e esta aumenta proporcionalmente ao volume obtido de filtrado.

Para que se reduza a formação do *fouling* na membrana, alguns procedimentos para reduzir a quantidade de sólidos solúveis são utilizados, como: o pré-tratamento da solução de alimentação, escolha apropriada da membrana, escolha apropriada do módulo e condições de processo (MULDER, 1996).

2.10 Configuração da membrana

A geometria da membrana é de extrema importância para poder avaliar seu desempenho. Existem cinco configurações de membrana: fibra oca, espiral, tubulares, planas e capilares (NEVES, 2014).

Para fazer a escolha da membrana, vários fatores devem ser analisados como: tipo de aplicação, densidade de empacotamento, aspectos de escoamento, facilidade de limpeza, dentre outros (PUCCA, 2010). Alguns aspectos são mostrados na Tabela 2.1:

Tabela 2.1 - Configurações de módulos típicos de membranas e algumas características (PUCCA, 2010).

<i>Características</i>	<i>Placas Planas</i>	<i>Enrolada em espiral</i>	<i>Tubular</i>	<i>Fibra Oca</i>
Fator de empacotamento (m ² /m ³)	200 - 400	300 – 900	150 – 300	>1000
Diâmetro do canal de alimentação	5	1 - 3	13	0,1 – 1,0
Método de substituição	Placas	Elementos	Tubos	Módulo inteiro
Facilidade de limpeza	Fácil	Média	Fácil	Média

2.11 Utilização de processos de separação por membranas para produção de chá

Diversos trabalhos são reportados na literatura sobre a aplicação do processo de separação por membranas para tratamento dos chás oriundos da *Camellia sinensis*, dentre eles se pode citar:

KAWAKATSU et al. (1996) estudaram a clarificação do chá verde utilizando microfiltração e ultrafiltração. Em ambos, a vazão foi a variável controlada sendo

mantida em 5 L/min. O volume inicial da alimentação foi de 9 L e o processo foi interrompido até que se obtivesse um total de 7 L no permeado. As membranas de microfiltração eram de triacetato de celulose e a porosidade delas variava de 0,22 - 5µm e as membranas de ultrafiltração eram de poliestersulfona, polisulfona e polietersulfona, sendo do peso molecular de corte variando de 30 a 100 kDa. KAWAKATSU et al. (1996) concluíram que para a microfiltração, quanto menor o tamanho do poro, menor a massa seca obtida no permeado. E para a ultrafiltração, foi obtido uma rejeição de 3 – 11% das catequinas e a membrana de 30 kDa, foi escolhida para repetir o processo de clarificação e mostrou reprodutibilidade na performance obtida.

No trabalho de TODISCO et al. (2002) os autores avaliaram a transferência de massa e a retenção dos compostos fenólicos na clarificação do chá preto utilizando membranas cerâmicas. Para isso uma membrana de 40 kDa foi utilizada sob diferentes condições operacionais, sendo elas, temperatura, pressão e vazão. Para cada experimento, observou-se que a concentração dos compostos fenólicos e a intensidade da cor no permeado se mantiveram constantes durante 60 dias sob refrigeração.

LI et al. (2005) avaliaram o processo de separação dos compostos fenólicos do chá verde por meio de resina de adsorção. Foi observado que após a ultrafiltração obteve-se mais que 40% dos fenólicos totais no permeado. Após a adsorção da resina e eluição com mistura dos solventes, o produto obtido apresentou mais de 90% de compostos fenólicos iniciais.

RAO et al. (2011) avaliaram a ultrafiltração e a aplicação de clarificadores no chá verde. A sílica gel e a quitosana foram utilizadas para clarificação da infusão do chá verde. Os resultados mostraram que a ultrafiltração reduziu a concentração de proteínas, polifenóis e a intensidade de cor. A sílica gel e a quitosana se mostraram eficientes para a clarificação da infusão do chá verde, porém após a coagulação por quitosana a concentração de proteínas não diminuiu significativamente, enquanto para a ultrafiltração houve uma redução significativa de 11,36 para 5,85 mg/100 ml com membrana de 10 kDa.

KUMAR et al. (2012) avaliaram o processo de ultrafiltração do chá verde para uma membrana de 30 kDa realizando duas etapas no processo de infusão. O permeado da ultrafiltração foi liofilizado, e a porcentagem de EGCG encontrada no permeado foi de 80%.

CHANDINI et al. (2013) estudaram a clarificação do chá preto. Os autores conduziram os experimentos com membranas de microfiltração, as quais os poros variavam de 200 a 450 nm, e membranas de ultrafiltração com porosidade variável 25 a 500 kDa, a pressão de operação foi de 1 bar para a microfiltração e 5 bar para a ultrafiltração. Para as membranas de microfiltração houve um percentual de rejeição de: 21,43 a 25,89 % para os sólidos solúveis; 35,90 a 39,95 % para os compostos fenólicos e 39,70 a 40,80 % para as proteínas. Para a ultrafiltração, houve um percentual de rejeição de: 42,79 a 77,41% dos sólidos solúveis; 56,65 a 83,40% para os compostos fenólicos e 42,98 a 80,50 % para as proteínas. Cada permeado foi estocado sob refrigeração por 30 dias, a cada 7 dias a turbidez foi medida e foi constatado que as bebidas se mantiveram estáveis em todos os ensaios.

YE et al. (2014) utilizaram uma coluna de sílica para purificação para produzir um extrato rico em EGCG proveniente do chá verde. Neste experimento foi obtida uma recuperação de EGCG de 26,1% com rendimento.

2.13 O uso de ultrassom e campo eletromagnético nos processo de filtração

Para os processos que utilizam ultrassom e campo elétrico, pode-se observar um aumento na temperatura onde eles são aplicados. Sabe-se que o fluxo através da membrana é fortemente influenciado pela temperatura uma vez que ele é função da viscosidade dinâmica, e esta por sua vez, é função da temperatura (HABER 2006; DIEL 2010).

AGHDAM et al. (2015) avaliaram o efeito do ultrassom nos diferentes mecanismos de fouling durante o processo de clarificação por membrana do suco de romã. Além de analisar o comportamento do fluxo do permeado eles analisaram o efeito da temperatura neste processo e concluíram que o aumento do fluxo no permeado está em parte associado ao aumento da temperatura. AGHDAM et al. (2015), observaram que a formação de torta é o mecanismo responsável pela formação do *fouling* da membrana com ou sem aplicação do ultrassom. Porém o tamanho da torta formada no processo sem o ultrassom é muito maior do que o processo utilizando ele, chegando a ser quatro vezes maior. Esses valores foram obtidos através de imagens fornecidas pelo MEV.

DARESTANI et al. (2014) avaliaram as mudanças estruturais de diversas membranas após aplicação de um intenso campo elétrico. As membranas de microfiltração possuíam porosidade de 0,2 e 0,03 μm . Os autores observaram que o fluxo do permeado para membranas de poliestersulfona que foram submetidas a um campo elétrico diminuiu em relação ao fluxo de permeado da membrana sem nenhum tratamento. De acordo com os autores, este resultado sugere que um intenso campo elétrico diminuiu a permeabilidade hidráulica da membrana e aumenta o poder de rejeição da mesma.

De acordo com XU et al. (2013) avaliaram os mecanismos de *fouling* aplicando ultrassom para membranas de um biorreator anaeróbio. Os autores concluíram que o ultrassom afetou de maneira significativa a formação de torta na membrana, diminuindo a adsorção de substâncias orgânicas e de partículas inorgânicas na superfície da membrana.

CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Matéria-prima

As folhas de chá da planta *Camellia sinensis* da marca Yamamotoyama do Brasil foram adquiridas no comércio local (Uberlândia - MG, Brasil). Eram folhas secas, trituradas e vendidas a granel. Conforme necessidade, foram adquiridos 4 kg das folhas de chá verde e 1 kg de chá preto e de chá branco e as mesmas estocadas em lugar seco e arejado.

3.2 Preparo do extrato de chá

Para o preparo dos chás verde, preto e branco, foi utilizada uma proporção mássica de 1:10. Essa mistura foi colocada em banho térmico, em um processo de infusão, em intervalos de 10 min amostras foram coletadas para medir a concentração de fenólicos totais. Quando estes passaram a ser constantes, a infusão foi encerrada. Ao final da infusão, as folhas foram removidas da solução com o auxílio de uma peneira..

3.2.1 Temperatura de infusão

Para encontrar a temperatura de infusão ideal, ou seja, capaz de extrair a maior quantidade de fenólicos sem degradá-los, o preparo do chá foi realizado em diferentes temperaturas, estas variando de 30 a 80°C. Como as folhas do chá verde, preto e branco são oriundas da mesma espécie, este procedimento foi realizado apenas para as folhas do chá verde, e o melhor resultado aplicado para a extração dos compostos fenólicos dos outros chás.

3.3 Clarificação do extrato de chá verde

Dois procedimentos diferentes foram realizados com o objetivo de clarificar o extrato de chá verde, estes procedimentos serão descritos a seguir.

3.3.1 Quitosana

Uma solução 10 g/L foi preparada hidrolisando-se a quitosana (Polymar) em uma solução de ácido acético 5% (v/v). Com o auxílio de um agitador magnético, a hidrólise foi efetuada a temperatura ambiente por 5 h.

Para os testes com quitosana, foi utilizado um aparato de *jar test* mostrado na Figura 3.1. Amostras de 200 mL de chá recém preparadas foram adicionadas a um béquer de 600 ml, para cada béquer foi adicionado um volume diferente da solução de quitosana, resultando em diferentes concentrações. Os parâmetros de operação do *jar test* foram: 50 rpm de velocidade de rotação e 20 min de tempo de rotação conforme sugerido por DOMINGUES (2011). Após o término da agitação, os béqueres foram mantidos em repouso por 2 h, sendo as alíquotas então retiradas do sobrenadante para posteriores análises.



Figura 3.1 - Aparato de *jar test* utilizado nos testes com quitosana (DOMINGUES 2011, modificada).

3.3.2 Centrifugação

Um volume de extrato de chá verde recém preparado foi centrifugado a 8000 rpm por 20 min, sendo utilizado o sobrenadante para analisar os parâmetros estudados.

3.4 Processos de filtração com membranas

3.4.1 Microfiltração

As microfiltrações foram realizadas com extratos de chá recém-preparados sem nenhum pré-tratamento em um módulo tipo batelada (Figura 3.2) com $8,1 \times 10^{-3} \text{ m}^2$ de área superficial, a pressão de operação foi definida em 0,7 bar.

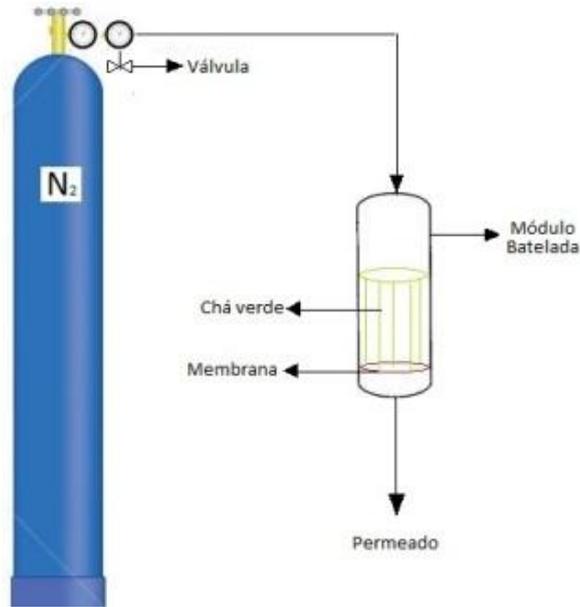


Figura 3.2 – Esquema do processo batelada utilizado para a microfiltração.

Para o experimento, uma membrana plana foi colocada na base do módulo e, logo em seguida 300 ml de extrato de chá verde foram colocados dentro do módulo, em seguida este foi fechado e conectado ao cilindro de nitrogênio. Com o auxílio de uma válvula a pressão foi ajustada em 0,7 bar e o procedimento foi iniciado.

As membranas utilizadas neste experimento apresentaram, as seguintes porosidades: 0,22, 0,3 e 0,8 μm , sendo todas planas e de éster de celulose da Marca Milipore.

Para se interromper os processos de filtração, utilizou-se o fator de concentração como parâmetro, que é definido como a razão entre o volume inicial e o volume retido, sendo, portanto, maior que 1. Para a microfiltração este valor foi de 10 e ele foi calculado utilizando a Equação 1.

$$\text{Fator de concentração} = \frac{\text{volume inicial (ml)}}{\text{volume do retido (ml)}} \quad (1)$$

3.4.2 Ultrafiltração

A alimentação deste processo foi o permeado do processo de microfiltração utilizando a membrana de porosidade igual a 0,8 μm . As membranas de ultrafiltração utilizadas foram de poliétersulfona da Marca Nadir. Essas membranas foram adquiridas no formato de folhas A4 (Figura 3.3) e para utilizar no processo de filtração elas foram cortadas no formato desejado. Para esse trabalho, foi utilizado um molde circular com 7 cm de diâmetro.

Foram utilizadas quatro membranas de peso molecular de corte diferente, sendo eles: 30, 20, 10 e 5 kDa.



Figura 3.3 - Membranas de ultrafiltração da marca Microdyn Nadir (Fonte: NADIR 2007).

O processo de ultrafiltração foi realizado de forma contínua, com operação do tipo *cross flow* utilizando o equipamento Convergence Inspector Minos. O equipamento utilizado pode ser observado na Figura 3.4.



Figura 3.4 –Convergence Inspector Minos.

De acordo com o fabricante, o Convergence Inspector Minos é um sistema padrão mundial para realizar estudos com membranas para sistemas operacionais de bancada. O equipamento possui medidores de pressão que garantem a precisão e a reprodutibilidade do experimento. Ele pode ser utilizado tanto para operação do tipo *cross-flow* quanto do tipo *dead-end*. Uma descrição de como se utiliza o equipamento pode ser observada no Anexo A.

As vantagens de se utilizar este equipamento são: adaptação a qualquer módulo ou célula (que suporte a membrana), controle de pressão e de vazão de operação, fácil interface do programa, altamente automatizado com geração de arquivos em pdf no final de cada programa e equipamento compacto.

Para os testes de ultrafiltração a pressão utilizada foi de 6 bar. A válvula da corrente de retido foi mantida completamente aberta e esta corrente retornou para o tanque de alimentação (Figura 3.5). O fator de concentração utilizado para os processos com as membranas de 5, 10, 20 e 30 kDa foram: 1,25, 1,54, 2,0 e 2,0 respectivamente.

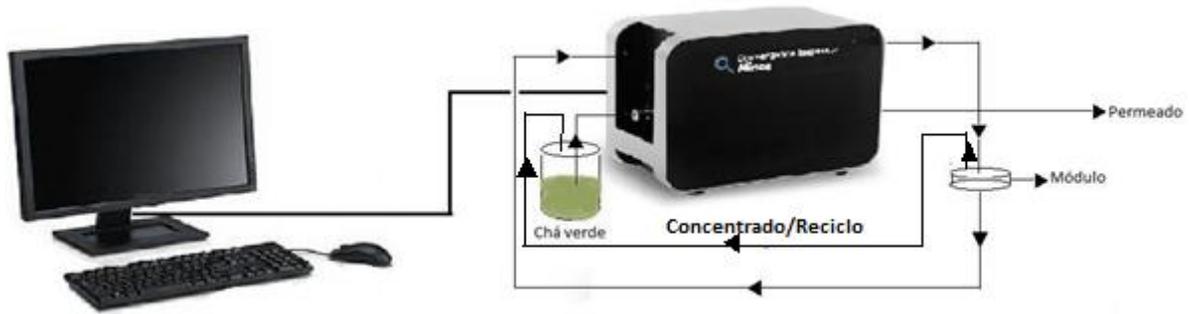


Figura 3.5 – Esquema do processo de ultrafiltração convencional.

3.4.2.1 Ultrafiltração aplicando ultrassom no módulo contendo a membrana

Para este experimento foi utilizado do ultrassom *Ultracleaner 1650A* da Unique, a frequência fornecida pelo equipamento é de 40 KHz (Fonte: <http://www.unique.ind.br/usc1600.html>).

A forma como o processo de filtração acontece é o mesmo descrito na sessão 3.4.2, a única diferença é que o módulo contendo a membrana foi inserido no banho ultrassônico. O esquema deste processo de filtração pode ser observado na Figura 3.6.

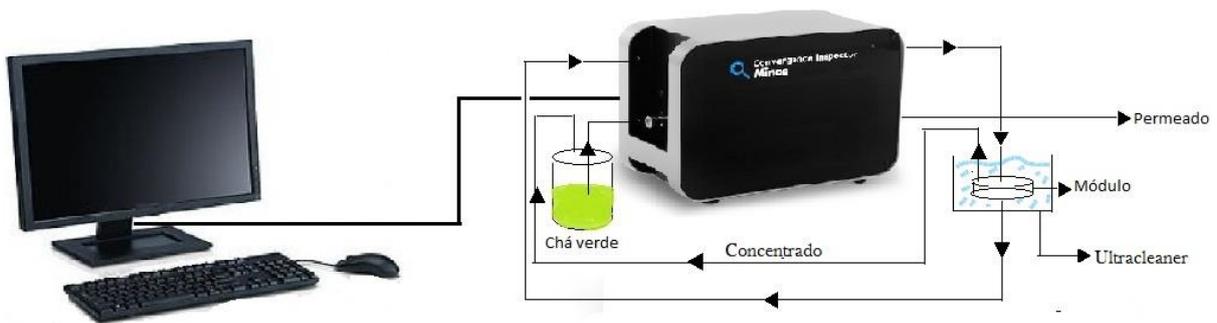


Figura 3.6 - Esquema do processo de ultrafiltração utilizando o ultrassom.

3.4.2.2 Ultrafiltração aplicando campo eletromagnético no módulo contendo a membrana

Os tratamentos com campo eletromagnético foram conduzidos utilizando-se um equipamento gerador do campo magnético pulsado que consiste de uma bobina ligada a um controlador de frequência conforme esquema da Figura 3.7. O sinal do campo magnético gerado era do tipo onda quadrada. A bobina era refrigerada por água proveniente de um refrigerador. A água passava em uma serpentina sobre fiação de uma bobina. O equipamento foi construído pelo professor Dr. Ernane José Xavier Costa – Professor da USP de Pirassununga-SP.

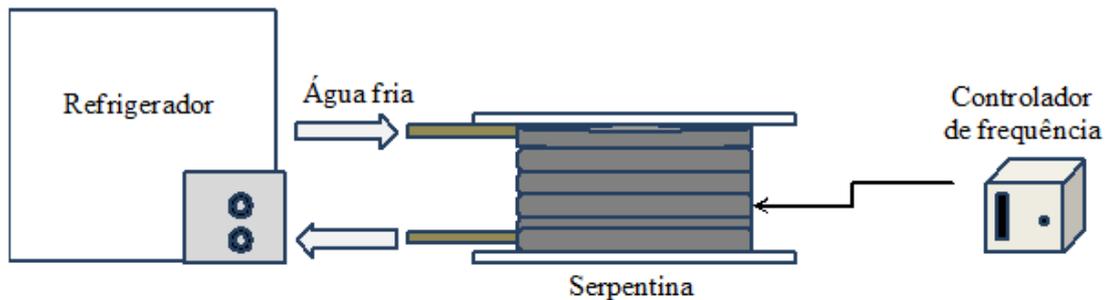


Figura 3.7 – Equipamento responsável por gerar o campo eletromagnético
(Fonte: TERRA, 2014)

No centro da base do condutor foi colocado o módulo de filtração que continha a membrana. A frequência utilizada neste trabalho foi de 20 Hz. O processo de filtração se estendeu por aproximadamente 3 h, porém a cada meia hora o equipamento responsável por gerar o campo eletromagnético foi desligado, uma vez que a bobina esquentava muito e havia risco de danificar o equipamento.

3.4.3 Permeabilidade hidráulica das membranas de filtração

Para cada processo de filtração (microfiltração e ultrafiltração) a permeabilidade de cada membrana foi inicialmente medida utilizando água miliq. Para as membranas de microfiltração o fluxo foi medido em pressões diferentes que variaram de 0,1 a 1 bar.

Para os processos de ultrafiltração, os fluxos foram medidos em pressões diferentes que variaram de 1 a 7 bar.

3.4.4 Comportamento do fluxo durante o processo de filtração do chá

Após iniciado o processo de filtração, amostras foram coletadas durante todo o processo para medir o comportamento do fluxo em função do tempo de filtração.

O fluxo foi calculado utilizando a Equação 2.

$$\text{Fluxo} \left(\frac{\text{kg}}{\text{m}^2\text{s}} \right) = \frac{\text{Massa de permeado}}{\text{Área da membrana} \cdot \text{tempo de coleta}} \quad (2)$$

Onde a massa do permeado é dada pela Equação 3.

$$\text{Massa de permeado} = \left(\begin{array}{l} \text{massa do béquer com volume} \\ \text{de permeado coletado} \end{array} \right) - (\text{massa do béquer}) \quad (3)$$

3.4.5 Cálculo das resistências

As resistências foram calculadas de acordo com o modelo de resistências em série como adaptado de SCHAFER et al. (2005) apud DOMINGUES (2011).

A resistência total de uma membrana foi calculada pela Equação 4.

$$R_T = R_M + R_P + R_C \quad (4)$$

Sendo que R_M é a resistência hidráulica da membrana, R_P é a resistência devido ao entupimento dos poros e R_C é a resistência devido à formação de torta.

A resistência hidráulica da membrana, R_M , foi determinada por meio da filtração de água miliq em membranas limpas. Considerando que as outras resistências (R_P , R_C) são nulas neste estágio, R_M foi calculada de acordo com a Equação 5.

$$R_M = \frac{\Delta P}{\eta J_i} \quad (5)$$

em que ΔP é a pressão, η é a viscosidade aparente do fluido e J_i é o fluxo de água destilada filtrada em membranas limpas.

As resistências devido ao entupimento de poros e formação de torta, R_p e R_c respectivamente, foram calculadas concorrentemente, depois da filtração do chá. Água destilada foi filtrada na membrana suja até a estabilização do fluxo. Os termos R_p e R_c foram calculados conforme Equação 6.

$$R_p + R_c = \frac{\Delta P}{\eta J_f} - R_M \quad (6)$$

em que J_f denota o fluxo estabilizado de água destilada obtido com a membrana suja.

Em seguida fez-se o procedimento de limpeza física das membranas. Para isso, utilizou-se uma esponja macia para retirar o excesso da torta e fez-se o enxágue com água destilada. Desta forma, removeu-se a camada de torta formada na superfície da membrana e apenas os contaminantes que entupiram os poros permaneceram.

A este fluxo foi associado o termo R_p , que foi calculado conforme apresentado na Equação 7.

$$R_p = \frac{\Delta P}{\eta J_{f1}} - R_M \quad (7)$$

em que J_{f1} denota o fluxo permeado de água destilada após a limpeza física da membrana.

3.4.6 Modelagem Matemática do Fluxo em Função do Tempo

As microfiltrações de chá foram realizadas em operação *dead-end* e, portanto, o fluxo obtido em função do tempo de filtração foi ajustado ao modelo proposto por HERMIA (1992), conforme apresentado na Equação (8). Já as ultrafiltrações foram realizadas em operação *cross-flow* e, neste caso, o modelo apresentado por FIELD et al. (1996) foi aplicado para modelagem, conforme apresentado na Equação (9).

$$-\frac{dJ}{dt} = kJ^{3-n} \quad (8)$$

Sendo J o fluxo mássico ($\text{kg h}^{-1} \text{ m}^{-2}$), t o tempo de filtração (min), k a constante da equação e n o índice que indica o mecanismo de *fouling*.

$$-\frac{dJ}{dt}J^{n-2} = K(J - J^*) \quad (9)$$

Sendo K a constante da equação e J^* o fluxo obtido em estado estacionário, ou seja, após a estabilização do fluxo.

Os valores de n são fixados conforme o mecanismo de *fouling* que ocorre durante o processo de filtração por membranas, conforme apresentado na Figura 3.8. Assim, para a formação de torta $n=0$, para bloqueio completo de poros $n=2$, para o bloqueio intermediário $n=1$ e para o bloqueio interno $n=1,5$.

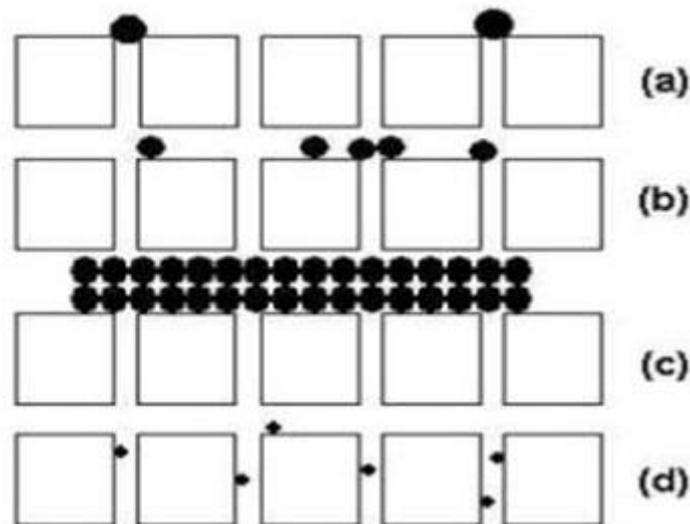


Figura 3.8. Representação dos mecanismos de *fouling* em membranas: (a) bloqueio completo de poros ($n=2$), (b) para o bloqueio intermediário ($n=1$), (c) formação de torta ($n=0$), e d) para o bloqueio interno ($n=1,5$) (adaptada de BARROS et al. 2003).

Para cada valor de n fez-se o ajuste dos dados experimentais de fluxo em função do tempo para as micro e ultrafiltrações de acordo com as Equações (7) e (8), respectivamente, de forma a obter o valor do parâmetro destas equações.

O mecanismo de *fouling* predominante durante o processo de filtração foi então determinado pelo melhor ajuste dos dados experimentais com uma das quatro equações características de cada mecanismo de *fouling*.

Para a resolução das equações diferenciais aplicou-se o método de otimização de Marquardt em um programa elaborado em linguagem Fortran cujo passo foi de 10^{-3} e uma precisão de 10^{-8} .

3.4.7 Limpeza das membranas

As membranas no final de cada processo de ultrafiltração foram submetidas a uma limpeza física utilizando o ultrassom. Essa limpeza foi feita colocando a membrana no banho ultrassônico por 20 min. Após este procedimento, avaliou-se se o fluxo inicial de água pela membrana era restabelecido e, assim, se a mesma poderia ser reutilizada.

3.5 Análises Físico-Químicas

3.5.1 Concentração de fenólicos

A concentração total de fenólicos foi avaliada conforme metodologia descrita por KUMAR et al. (2012) que utilizaram espectroscopia na região do visível utilizando o método de *Folin-Ciocalteu* para determinação de fenólicos totais em extrato de chá verde.

Inicialmente construiu-se a curva de calibração com dez soluções aquosas de ácido gálico com concentrações variando de $0,16 \text{ gL}^{-1}$ a $1,00 \text{ gL}^{-1}$ (Figura B.1 do Anexo B). Para cada concentração coletou-se um volume de 0,05 mL de amostra. Em seguida, 0,2 mL da solução de *Folin-Ciocalteu* foram adicionados. Depois de passados 2 min, 2 mL da solução de Na_2CO_3 a 10%(w/v) foram adicionados. A adição desta solução, foi considerada o tempo zero. O volume total da solução foi ajustado para 4 mL usando água destilada. Após 1h, os valores de absorbância foram medidos a comprimento de onda de 760 nm usando o espectrofotômetro UVmini – 1240 Shimadzu. A concentração de fenólicos totais é dada em miligramas equivalentes de ácido gálico por litro.

Para medir a concentração de compostos fenólicos das amostras de chá foi necessário realizar uma diluição. Para o extrato e os permeados foram realizadas

diluições diferentes de acordo com a necessidade. Com a amostra diluída realizou-se o mesmo procedimento descrito acima, ou seja, para um volume de amostra de 0,05 mL adicionou-se 0,2 mL da solução de *Folin-Ciocalteu*, 2 mL da solução de Na_2CO_3 , sendo ao final o volume ajustado para 4 mL com água. A absorbância lida era substituída na equação da curva de calibração e multiplicada pela diluição.

Todos os solventes e reagentes que foram usados foram analiticamente puros. O reagente *Folin-Ciocalteu* foi adquirido da Merck, o ácido gálico, e o carbonato de sódio (Na_2CO_3) da Vetec.

3.5.2 Turbidez

A turbidez foi medida com o auxílio de um turbidímetro Tecnoon TB-1000 (Figura 3.9) em unidades nefelométricas de turbidez (NTU).



Figura 3.9 – Turbidímetro de bancada Tecnoon TB-1000.

3.5.3 Sólidos totais

Para encontrar a concentração de sólidos em cada solução, uma amostra de chá foi coletada e a mesma foi levada para uma estufa onde ficou por 24 h a 100°C . Passadas as 24 h, a massa final de sólidos foi aferida com o auxílio de uma balança analítica e a concentração de sólidos foi calculada utilizando a Equação 10:

$$\text{Massa de sólidos na amostra (mg)} = \left(\begin{matrix} \text{massa do béquer} \\ \text{com a amostra} \end{matrix} \right) - \left(\begin{matrix} \text{massa do} \\ \text{béquer seco} \end{matrix} \right) \quad (10)$$

$$\text{Concentração de sólidos (mg/L)} = \frac{\text{massa de sólidos na amostra (mg)}}{\text{volume da amostra}} \quad (11)$$

3.5.4 Intensidade da cor

A intensidade da cor dos chás foi medida por absorvância através do espectrofotômetro UVmini – 1240 Shimadzu. Para definir o comprimento de onda foi feito o processo de varredura da amostra. A escolha do comprimento de onda foi determinado de acordo com o maior pico apresentado no gráfico de absorvância *versus* comprimento de onda (BASQUES, 2010).

O comprimento de onda encontrado foi de 400 nm. Este comprimento de onda faz parte do espectro eletromagnético visível e corresponde a cor violeta (NADIR e MACHADO, 2002).

3.5.5 Concentração de proteína

Para a dosagem de proteína foi utilizado o método de LOWRY (1951). A descrição do teste realizado e a curva de calibração podem ser verificadas no Anexo C.

3.5.6 Análise cromatográfica

Os padrões utilizados nesta etapa foram: Ácido gálico, Cafeína, (-) – Epigallocatechin gallate (EGCg), Catechin (C), (-) – Epicatechin (EC) e (-) – Epigallocatechin (EGC). Todos os padrões e reagentes foram analiticamente puros e foram adquiridos da Sigma.

Para análise no HPLC (marca *Shimadzu* modelo LC-20A Prominence, Figura 3.10), a metodologia utilizada foi a descrita por WANG et al. (2000). Foi utilizada a coluna Discovery HS C18, 5 µm de dimensão 25 cm por 4,6 mm adquirida da Supelco. Aplicou-se uma vazão da fase móvel de 1,0 ml/min, temperatura de 30°C, comprimento de onda de 270 nm e foi injetado um volume de 20 µl de amostra. A fase móvel utilizada foi: metanol/água/ácido ortofosfórico na proporção de 20/79,9/0,1 em volume respectivamente. As curvas de calibração para cada padrão encontram-se no Anexo D.



Figura 3.10 - HPLC Shimadzu utilizado para análises.

Na Figura D.7 pode-se observar um gráfico característico para as catequina, ácido gálico e cafeína obtido no HLPC para o extrato de chá verde.

3.5.7 Estabilidades dos chás

Mediu-se a estabilidade dos chás e dos permeados através de três parâmetros já citados anteriormente, sendo eles: turbidez, intensidade de cor e concentração de fenólicos totais (CHANDINI et al 2013; TODISCO et al. 2002).

Os parâmetros foram medidos no dia “0” (zero), ou seja, assim que a solução foi obtida. A partir daí, os permeados foram colocadas sobre refrigeração, por volta de 5°C e os parâmetros foram medidos depois de 7, 14 e 30 dias.

3.5.8 Estimativa da formação do *tea cream*

De acordo com CHANDINI et al. (2013) os sólidos do *tea cream* (partículas insolúveis na água a baixas temperaturas) foram determinados após o extrato ficar 16 h sob refrigeração (aproximadamente a 5°C). Após este tempo, o extrato foi centrifugado por 20 min utilizando uma rotação de 5600 rpm para remover os sólidos insolúveis e determinar a quantidade de sólidos solúveis no sobrenadante. A diferença entre a quantidade de sólidos na amostra e no sobrenadante indica o quanto do *tea cream* foi formado no resfriamento. A Equação 12 foi utilizada para este cálculo.

$$Tea\ cream\ (\%) = \frac{\left(\begin{array}{c} \text{sólidos} \\ \text{no extrato} \end{array} \right) - \left(\begin{array}{c} \text{sólidos no} \\ \text{sobrenadante} \end{array} \right)}{\left(\begin{array}{c} \text{sólidos no extrato} \end{array} \right)} \quad (12)$$

3.5.9 Análise dos dados

Foi utilizado o sistema de análise estatística Sisvar, o qual é amplamente utilizado pela comunidade científica para obter conclusões sobre os resultados experimentais obtidos. Com muitas opções de análises, o Sisvar é capaz de realizar comparações entre múltiplas variáveis (FERREIRA 2014). Neste trabalho foi utilizado o teste de Tukey com nível de significância igual a 5%.

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Extração dos compostos fenólicos

Avaliou-se inicialmente a influência da temperatura e do tempo para extração dos compostos fenólicos presentes no chá verde, conforme apresentado na Figura 4.1.

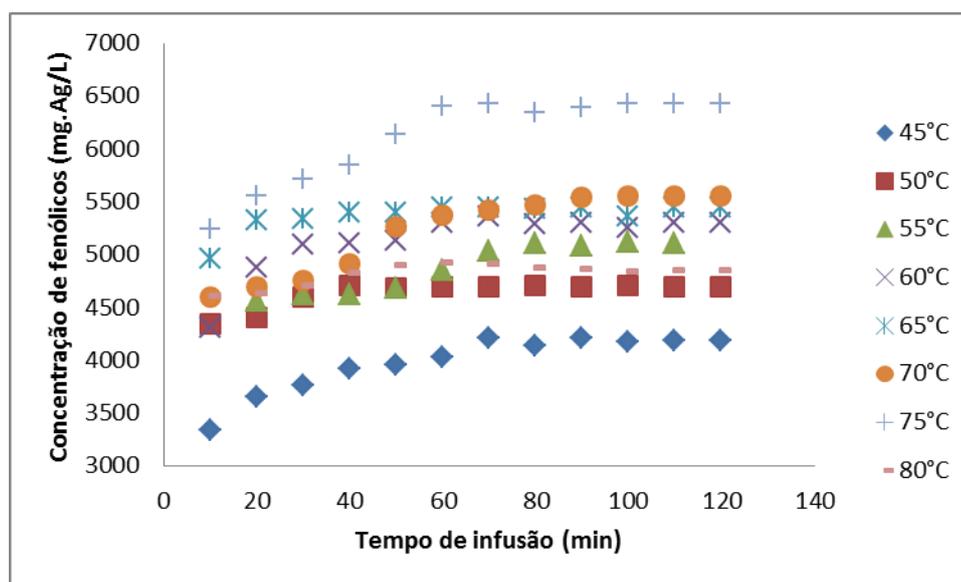


Figura 4.1 – Comportamento da concentração de fenólicos em função da temperatura e do tempo de infusão.

De acordo com a Figura 4.1, observa-se um aumento na concentração de fenólicos com o aumento da temperatura. Porém para o experimento realizado a 80°C, tem-se uma diminuição da concentração dos compostos fenólicos de 24,47% em relação à temperatura de 75°C. Para temperaturas menores que 45°C foram observados valores nulos de absorvância.

No trabalho de TEREFE et al. (2015) os autores estudaram o comportamento dos compostos fenólicos presentes no *blueberry* para diferentes condições de pressão e temperatura e observaram que a concentração dos compostos fenólicos diminuiu para temperaturas superiores a 80°C. PERVA-UZUNALIC et al. (2006) estudaram a extração dos compostos fenólicos presentes no chá verde e para temperaturas maiores que 80°C observaram uma diminuição de 16,71% na concentração de fenólicos. Ambos os trabalhos

afirmaram que essa diminuição da concentração está relacionada com a decomposição dos compostos fenólicos.

Para todas as temperaturas observa-se uma constância na concentração dos fenólicos a partir de aproximadamente 60 min, dessa forma para as próximas etapas este foi o tempo utilizado para o processo de extração. Para KUMAR et al. (2012) a estabilização da concentração dos compostos fenólicos do chá verde ocorreu por volta dos 50 min, resultado muito próximo daquele encontrado na Figura 4.1.

Desta forma, a melhor temperatura de extração dos compostos fenólicos das folhas de chá verde para este trabalho foi de 75°C para tempos de extração de no mínimo 60 min.

Para a concentração de folhas de 100 g/L utilizadas neste trabalho, foi obtida uma concentração de compostos fenólicos de 6.519,12 mg_{AG}L⁻¹ representando 6,52% da concentração de folhas iniciais. Para o chá verde é esperado encontrar uma concentração de compostos fenólicos de 10 a 25% da concentração de folhas de chá (TODISCO et al. 2002). Este valor está um pouco distante do esperado, porém está próximo ao valor reportado por KUMAR et al. (2012) que obtiveram 7,5% de fenólicos totais em relação à concentração de folhas de chá verde utilizadas para extração realizada a 80°C e por 100 min. Vale ressaltar que KUMAR et al. (2012) utilizaram a mesma metodologia para análise de fenólicos totais, ou seja, o método de *Folin–Ciocalteu*.

A Tabela 4.1 apresenta uma comparação da porcentagem de extração de compostos fenólicos presentes em chá verde reportada por diferentes autores.

Tabela 4. 1 - Porcentagem de fenólicos totais após o processo de infusão para diferentes trabalhos.

<i>Autor</i>	<i>Concentração de folhas (gL⁻¹)</i>	<i>Temperatura de infusão (°C)</i>	<i>Tempo de infusão (min)</i>	<i>Concentração de fenólicos totais (gL⁻¹)</i>	<i>Porcentagem de fenólicos totais (%)</i>
Neste trabalho	100	75	60	6,52	6,52
RAO et al. (2011)	10	60	20	1,09	10,90
PERVA- UZUNALIC et al. (2006)	25	80	120	4,78	19,10
KUMAR et al. (2012)	50	80	100	3,75	7,50

RAO et al. (2011) obtiveram um valor superior de concentração. Contudo, RAO et al. (2011) analisaram a concentração dos compostos fenólicos por meio de uma equação que relaciona absorvância, volume de extrato, volume de amostra e massa de folhas, metodologia esta que difere do método de *Follin-Ciocalteu*.

No trabalho de PERVA-UZUNALIC et al. (2006) a concentração dos compostos fenólicos presentes no extrato de chá verde foi analisada por método cromatográfico (HPLC). O uso do HPLC neste trabalho foi feito apenas para analisar a concentração de algumas catequinas estudadas.

4.2 Pré tratamentos: adição de quitosana e centrifugação

O mesmo extrato de chá verde recém preparado foi utilizado para os pré tratamentos, e os parâmetros do extrato, estão descritos na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Características físico-químicas do extrato de chá verde recém preparado.

<i>Amostra</i>	<i>Turbidez (NTU)</i>	<i>Concentração de sólidos (mgL⁻¹)</i>	<i>Intensidade da cor (ABS)</i>	<i>Concentração de fenólicos (mg_{AG}L⁻¹)</i>
Chá verde	458±0,5	61.080±85	0,647±0,02	6.402±81

4.2.1 Clarificação com quitosana

As características físico-químicas obtidas nos sobrenadantes dos processos de clarificação com quitosana em diferentes concentrações estão expostos na Tabela 4.3. O tempo de coagulação foi fixado em 20 min e o tempo de sedimentação em 2 h.

Tabela 4.3 - Características físico-químicas para o sobrenadante após testes com a quitosana.

<i>Concentração de quitosana (PPM)</i>	<i>Características do sobrenadante</i>			
	<i>Turbidez (NTU)</i>	<i>Concentração de sólidos (mgL⁻¹)</i>	<i>Intensidade da cor (ABS)</i>	<i>Fenólicos (mg_{AG}L⁻¹)</i>
20	129 _a ±1	50.268 _a ±72	0,413 _a ±0,015	6.081 _a ±39
30	134 _b ±0,5	48.218 _b ±91	0,454 _b ±0,027	5.052 _b ±41
40	207 _c ±0	35.749 _c ±69	0,471 _c ±0,018	4.229 _c ±27
50	215 _c ±0,5	30.026 _d ±102	0,613 _d ±0,076	3.749 _d ±33
100	270 _d ±0,5	26.741 _e ±74	0,757 _d ±0,088	2.383 _e ±29

Os valores médios indicados por uma letra com número diferente ao longo de uma coluna, são significativamente diferentes para teste de *Tukey* com nível de significância igual 5%.

Analisando a Tabela 4.3, observa-se que para todas as concentrações de quitosana houve uma redução na turbidez em relação ao valor inicial (458 NTU) que variaram de 41,05 a 71,83%. Contudo, aumentando a concentração de quitosana há um aumento na turbidez do sobrenadante. Isto aconteceu pois a quitosana que não coagulou com os sólidos do chá ficou solubilizada no sobrenadante, como pode ser visto na Figura 4.2. O mesmo comportamento pode ser observado para os resultados de intensidade de cor.



Figura 4.2 - Resultado do teste com concentração de quitosana de 20, 40 e 100 PPM respectivamente.

A concentração de sólidos reduziu para todas as concentrações de quitosana variando de 17,70 a 56,22%. Quanto maior a concentração de quitosana maior foi a redução na concentração de sólidos. Além disso, o aumento da concentração de quitosana fez com que mais compostos fenólicos coagulassem e sedimentassem, apresentando reduções que variaram de 5,02% para 20 ppm de quitosana a 62,77% para 100 ppm. Estes resultados evidenciam que a quitosana é um agente clarificante eficiente.

No trabalho de RAO et al. (2011) os autores aplicaram quitosana no extrato do chá verde e observaram redução similar na concentração dos sólidos e na concentração dos compostos fenólicos devido afinidade da quitosana por compostos fenólicos. RAO et al. (2011) avaliaram também diferentes tempos de rotação para a mesma concentração e concluíram que o tempo de tratamento não influencia no processo de coagulação, sendo 20 min suficiente.

4.2.2 Centrifugação

Após os 20 min de centrifugação, o sobrenadante foi analisado e os resultados estão apresentados na Tabela 4.4.

Tabela4. 4 – Características físico-químicas do sobrenadante após centrifugação do chá verde a 8000 rpm.

<i>Turbidez (NTU)</i>	<i>Concentração de sólidos (mgL⁻¹)</i>	<i>Intensidade da cor (ABS)</i>	<i>Concentração de fenólicos (mg_{AG}L⁻¹)</i>
422±0,5	59.002±87	0,632±0,0015	6.118±36

Para o teste utilizando a centrifugação observa-se as seguintes reduções: 7,86% para a turbidez, 3,4% para a concentração de sólidos, 2,32% para a intensidade da cor e 4,43% para a concentração de fenólicos. Vale ressaltar que nenhum sedimento foi observado. Assim, tem-se que o tratamento com centrifugação na rotação utilizada não é eficiente para clarificação do extrato de chá verde.

4.3 Processos de filtração com membrana

4.3.1 Microfiltração

As características do extrato de chá verde utilizado nos processos de microfiltração são aqueles já expostos na Tabela 4.2. Após o processo de microfiltração durante 60 min com membranas de diferentes porosidades analisou-se as características físico-químicas dos permeados obtido, conforme apresentado na Tabela 4.5.

Tabela4. 5 – Características físico-químicas dos permeados de cada processo de microfiltração para membranas com porosidades diferentes.

<i>Porosidade da membrana (µm)</i>	<i>Características do permeado</i>			
	<i>Turbidez (NTU)</i>	<i>Concentração de sólidos (mgL⁻¹)</i>	<i>Intensidade da cor (ABS)</i>	<i>Concentração de fenólicos (mg_{AG}L⁻¹)</i>
0,8	29 _a ±0,5	56.440 _a ±74	0,621 _a ±0,013	6.160 _a ±33
0,3	25 _b ±0,5	50.736 _b ±69	0,522 _b ±0,018	5.059 _b ±48
0,22	21 _c ±1	48.882 _c ±62	0,495 _b ±0,012	4.451 _c ±37

Os valores médios, indicados por uma letra com número diferente ao longo de uma coluna, são significativamente diferentes para teste de *Tukey* com nível de significância igual 5%.

Analisando a Tabela 4.5 pode-se observar que com o aumento do tamanho do poro da membrana, há um aumento na concentração de sólidos e de fenólicos no permeado. Foi obtida uma redução na turbidez que variou de 93,67 a 95,42%, para a concentração de sólidos a redução variou de 7,60 a 19,97, para a intensidade de cor foi de 4,02% a 23,39% e para a concentração de fenólicos de 3,78 a 30,48%.

No trabalho de CHANDINI et al. (2013) os autores microfiltraram o chá preto em uma membrana de porosidade igual a 0,2 μm e obtiveram os seguintes valores de redução: 25,89% para os sólidos e 39,95% para os fenólicos. Os resultados são próximos aos apresentados na Tabela 4.5 porém os chás utilizados são diferentes.

O permeado da membrana de porosidade igual a 0,8 μm foi escolhido para ser utilizado como alimentação da ultrafiltração, pois ele apresentou menor redução na concentração de fenólicos no permeado (3,78%), maior valor de fluxo estabilizado (10,27 $\text{kg}/\text{m}^2\text{h}$) e reduziu quase 10% dos sólidos presentes no extrato. O fluxo estabilizado das membranas de 0,3 e 0,22 μm são 7,44 e 4,01 $\text{kg m}^{-2} \text{h}^{-1}$ respectivamente.

A análise estatística dos resultados de porcentagem de rejeição mostrou que não há diferença significativa entre os valores de intensidade de cor no permeado das membranas de 0,3 e 0,22 μm de porosidade

4.3.2 Ultrafiltração

4.3.2.1 Análise físico-química do permeado

As características físico-químicas dos permeados dos processos de ultrafiltração convencional, com ultrassom e com campo eletromagnético podem ser observados nas Tabelas de 4.6 a 4.8 respectivamente.

Tabela 4.6 – Características físico-químicas dos permeados dos processos de ultrafiltração convencional do chá verde utilizando membranas de diferentes pesos moleculares de corte.

<i>Peso molecular de corte</i> (kDa)	<i>Turbidez</i> (NTU)	<i>Concentração de fenólicos totais</i> (mg _{AG} L ⁻¹)	<i>Concentração de sólidos totais</i> (mg L ⁻¹)	<i>Concentração de proteína</i> (mg BSA L ⁻¹)
Alimentação	27 _a ±0,500	6.152,22 _a ±35	56.845 _a ±204	2.043,00 _a ±38
30	2,76 _b ±0,025	2.596,67 _b ±111,36	17.462 _b ±39	387,97 _b ±0,48
20	2,39 _c ±0,00	2.133,89 _c ±38,25	15.825 _b ±39	364,88 _c ±6,14
10	1,71 _d ±0,010	628,31 _d ±45,94	5.718 _c ±6	181,01 _d ±6,22
5	0,68 _e ±0,030	239,93 _e ±27,90	3.950 _c ±28,5	105,01 _e ±2,43

Os valores médios indicados por uma letra com número diferente ao longo de uma coluna, são significativamente diferentes para teste de Tukey com nível de significância igual 5%.

Tabela 4.7 – Características físico-químicas dos permeados dos processos de ultrafiltração utilizando ultrassom do chá verde utilizando membranas de diferentes pesos moleculares de corte.

<i>Peso molecular de corte</i> (kDa)	<i>Turbidez</i> (NTU)	<i>Concentração de fenólicos totais</i> (mg _{AG} L ⁻¹)	<i>Concentração de sólidos totais</i> (mg L ⁻¹)	<i>Concentração de proteína</i> (mg BSA L ⁻¹)
Alimentação	29 _a ±0	6.156,67 _a ±41	57.128 _a ±201	2.067,00 _a ±33
30	3,9 _b ±0,15	3.511,11 _b ±36,10	15.070 _b ±1034	406,78 _b ±38,03
20	3,01 _c ±0,01	2.967,78 _c ±33,31	11.848 _b ±1080	373,09 _b ±1,58
10	2,88 _d ±0	942,74 _d ±15,91	3.404 _c ±95	188,71 _c ±33,99
5	1,99 _e ±0	311,17 _e ±19,72	2.639 _d ±102	176,52 _c ±25,28

Os valores médios indicados por uma letra com número diferente ao longo de uma coluna, são significativamente diferentes para teste de Tukey com nível de significância igual 5%.

Tabela 4.8 – Características físico-químicas dos permeados dos processos de ultrafiltração utilizando campo eletromagnético do chá verde utilizando membranas de diferentes pesos moleculares de corte.

<i>Peso molecular de corte</i> (kDa)	<i>Turbidez</i> (NTU)	<i>Concentração de fenólicos totais</i> (mg _{AG} L ⁻¹)	<i>Concentração de sólidos totais</i> (mg L ⁻¹)	<i>Concentração de proteína</i> (mg BSA L ⁻¹)
Alimentação	27 _a ±0,5	6.147,79 _a ±35	57.249 _a ±100	2.042,00 _a ±45
30	3,15 _b ±0	2.815,56 _b ±38,56	18.279 _b ±109	404,92 _b ±47,21
20	2,12 _c ±0,0005	2.482,78 _c ±20,90	16.630 _b ±129	330,40 _c ±38,86
10	1,62 _d ±0,01	585,00 _d ±16,47	6.629 _c ±159	211,35 _d ±36,47
5	1,24 _e ±0,01	253,89 _e ±34,65	4.018 _d ±173	100,46 _e ±36,06

Os valores médios indicados por uma letra com número diferente ao longo de uma coluna, são significativamente diferentes para teste de Tukey com nível de significância igual 5%.

Os resultados apresentados nas Tabelas 4.6 a 4.8 mostram que todos os parâmetros físico-químicos do permeado aumentaram com o aumento do peso molecular de corte da membrana para os três processos (convencional, com ultrassom e com campo eletromagnético). De acordo com a análise estatística que comparou os resultados para as diferentes membranas, tem-se que há diferença significativa para a maioria das membranas avaliadas. As diferenças não são significativas apenas para as concentrações de sólidos nos permeados das membranas de 30 e 20 kDa para os todos os processos e para as membranas de 5 e 10 kDa na ultrafiltração convencional. Assim, é fundamental a escolha da membrana de porosidade adequada a fim de purificar os compostos de interesse.

Analisando o processo convencional (Tabela 4.6) observa-se uma permeação de 42,21 % dos fenólicos totais presentes na alimentação para a membrana de 30 kDa. KUMAR et al. (2012) obtiveram 40% dos fenólicos totais iniciais no permeado de chá verde da ultrafiltração com uma membrana de mesmo peso molecular de corte (30 kDa). Este resultado encontrado por KUMAR et al. (2012) é muito próximo daquele encontrado neste trabalho.

É possível notar pelas Tabelas de 4.6 a 4.8 que ao se comparar a membrana de 20 kDa com a membrana de 10 kDa, há uma redução de mais de 36% para todos os parâmetros analisados, exceto para a turbidez. No trabalho de RAO et al. (2011) o chá verde foi permeado em membranas de diferentes pesos moleculares de corte sendo elas: 100, 50, 30 e 10 kDa, e ao analisarem a concentração de proteínas, notaram que a concentração reduzia mais do que pela metade quando ia da membrana de 30 kDa para a de 10 kDa. RAO et al. (2011) associaram esse resultado à formação do complexo proteína-fenólicos e afirma que a formação deste complexo é a principal causa da formação da torta e do declínio do fluxo.

A rejeição dos compostos do chá verde aumenta com a diminuição do peso molecular de corte da membrana e essa diminuição fica mais evidenciada para as membranas de 10 e 5 kDa. No trabalho de CHANDINI et al. (2013) o chá preto foi clarificado utilizando diversas membranas de micro e ultrafiltração, e os autores concluíram que a rejeição não é apenas controlada pelo tamanho do poro ou peso molecular de corte. É um fenômeno natural em alimentações que contém substâncias como proteínas e pectinas, pois estas formam uma camada secundária de torta na superfície da membrana. Uma observação similar foi reportada por BARHATE et al. (2003) durante o processo de filtração de mel utilizando membranas.

Para uma comparação efetiva dos processos propostos, a Figura 4.3 apresenta as porcentagens de redução dos parâmetros físico-químicos avaliados no permeado para os processos de ultrafiltração convencional, com ultrassom e com campo magnético.

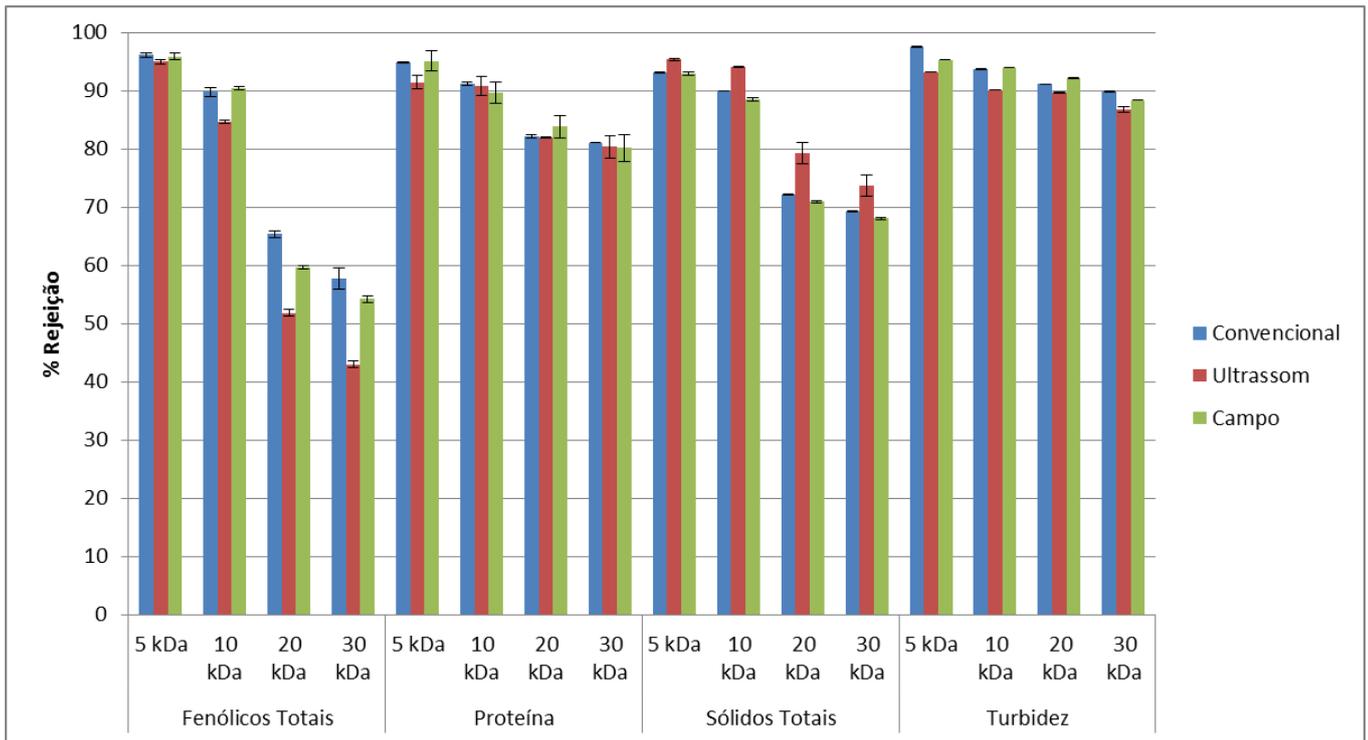


Figura 4.3 - Comparação da porcentagem de rejeição dos parâmetros físico-químicos avaliados nos permeados dos processos de ultrafiltração convencional, com ultrassom e com campo magnético com membranas de diferentes pesos moleculares de corte.

A Figura 4.3 mostra que todos os parâmetros analisados apresentaram rejeição próximo ou superior a 85% para as membranas de 5 e 10 kDa nos três processos (convencional, com ultrassom e com campo eletromagnético) estudados.

No processo convencional para a membrana de 30 kDa observa-se as seguintes porcentagens de rejeição: 57,79% para os compostos fenólicos, 81,01% para as proteínas, 69,28% para os sólidos totais e 89,90% para a turbidez. No trabalho de CHANDINI et al. (2013) o chá preto foi clarificado utilizando diversas membranas de micro e ultrafiltração. Para a membrana de peso molecular de corte igual a 25 kDa CHANDINI et al. (2013) obtiveram 77,41% de rejeição para os sólidos, 83,40% para os fenólicos totais e 80,50% para as proteínas.

A análise estatística dos resultados de porcentagem de rejeição apresentados na Figura 4.3 mostrou que, de acordo com o teste de *Tukey* com nível de significância igual 0,05, não há diferença estatística entre os três processos avaliados para a concentração de fenólicos apenas para a membrana de 5 kDa. Para as demais membranas há diferença significativa entre

os valores obtidos. O processo com ultrassom apresentou menor porcentagem de rejeição dos compostos fenólicos. Esta diferença é mais pronunciada para as membranas mais abertas. De fato a aplicação do ultrassom deve facilitar a permeação dos componentes devido a menor formação de torta. No processo com campo eletromagnético, a permeação dos compostos fenólicos foi maior que no processo convencional, mas inferior a do processo com ultrassom. Assim, comparado ao processo convencional, o processo com campo magnético possibilita uma maior recuperação dos compostos fenólicos no permeado.

A rejeição das proteínas pouco foi influenciada pelos processos utilizando ultrassom e campo eletromagnético. A análise estatística dos resultados de porcentagem de rejeição de proteína mostrou que há diferença significativa entre os três processos (convencional, com ultrassom e com campo magnético) somente para a membrana de 5kDa.

A maior redução na rejeição de proteína foi observada para a membrana de 5 kDa, sendo de 3,58% para o processo utilizando ultrassom. Assim, embora a aplicação de ultrassom tenha aumentado significativamente a permeação dos compostos fenólicos, este mesmo comportamento não é observado para permeação de proteína, provavelmente devido ao maior peso molecular das mesmas. Este é um resultado desejado, visto que a presença de proteína deve causar instabilidade no permeado.

O processo com ultrassom possibilitou também uma maior porcentagem de rejeição de sólidos em comparação com o processo convencional sendo que o maior aumento foi observado para a membrana de 20 kDa correspondendo a 9,84%. Para as membranas de 10, 20 e 30 kDa o campo eletromagnético diminuiu a rejeição dos sólidos em 1,69%, 1,68% e 1,75% respectivamente. Para a membrana de 5 kDa o campo eletromagnético manteve a porcentagem de rejeição equivalente a do processo convencional. A análise estatística dos resultados de porcentagem de rejeição mostrou que não há diferença significativa entre os dois processos (convencional e com campo magnético) para as porcentagens de rejeição de sólidos totais para todas as membranas. Para os demais casos há diferenças significativas entre os resultados obtidos.

Analisando os valores de turbidez, apenas para a membrana de 20 kDa nota-se que a aplicação do campo eletromagnético aumentou a porcentagem de turbidez em relação aos processos convencional e com ultrassom. O aumento observado foi de 1,68% em relação ao processo convencional. O uso do ultrassom fez com que a porcentagem de rejeição de turbidez diminuísse em relação ao processo convencional para todas as membranas. Os resultados de turbidez estão associados a permeação de sólidos, ou seja, quanto maior a

permeação dos componentes maior será a turbidez. A análise estatística dos resultados de porcentagem de rejeição mostrou que não há diferença significativa entre os dois processos (convencional e com campo magnético) para as porcentagens de rejeição de turbidez nas membranas de 10 e 20 kDa. Para os demais casos há diferenças significativas entre os resultados obtidos.

Para os permeados de chá verde dos processos de ultrafiltração (convencional, com ultrassom e com campo eletromagnético) tem-se as Tabelas de 4.9 a 4.11 com relação às concentrações de cada catequina, cafeína e ácido gálico analisadas por metodologia do HPLC.

Tabela 4.9 - Concentração de catequinas, cafeína e ácido gálico nos permeados dos processos de ultrafiltração convencional para o chá verde.

<i>Peso molecular de corte (kDa)</i>	<i>Galato de (-) – epigalo catequina (mgL⁻¹)</i>	<i>Cafeína (mgL⁻¹)</i>	<i>Epicatequina (mgL⁻¹)</i>	<i>Catequina (mgL⁻¹)</i>	<i>(-) – Epigalo catequina (mgL⁻¹)</i>	<i>Ácido Gálico (mgL⁻¹)</i>
Alimentação	2.458,77 _a ±51	1.523,82 _a ±45	1.096,5 _a ±44	211,62 _a ±13	211,62 _a ±16	119,04 _a ±8
30	1.205,48 _b ±32,08	713,98 _b ±24,96	845,41 _b ±33,32	111,77 _b ±30,01	109,77 _{a,b} ±4,7	61,75 _b ±6,97
20	1.115,18 _b ±36,15	642,71 _b ±46,95	647,22 _c ±44,91	100,54 _b ±12	100,15 _b ±29,87	59,64 _b ±7,78
10	442,36 _c ±46,81	307,18 _c ±49,04	200,74 _d ±35,03	48,21 _c ±5,96	55,79 _c ±9,49	25,66 _c ±6,02
5	121,37 _d ±8,85	98,44 _d ±7,9	94,17 _e ±8,55	21,92 _d ±1,75	23,89 _d ±2,06	10,91 _d ±1,57

Os valores médios indicados por uma letra com número diferente ao longo de uma coluna, são significativamente diferentes para teste de Tukey com nível de significância igual 5%.

Tabela 4.10 - Concentração de cada catequina cafeína e ácido gálico nos permeados dos processos de ultrafiltração utilizando ultrassom para o chá verde.

<i>Peso molecular de corte (kDa)</i>	<i>Galato de (-) – epigalo catequina (mgL⁻¹)</i>	<i>Cafeína (mgL⁻¹)</i>	<i>Epicatequina (mgL⁻¹)</i>	<i>Catequina (mgL⁻¹)</i>	<i>(-) – Epigalo catequina (mgL⁻¹)</i>	<i>Ácido Gálico (mgL⁻¹)</i>
Alimentação	2.395,12 _a ±44,13	1.621,87 _a ±49,07	1.240,54 _a ±36,18	201,28 _a ±6,21	204,15 _a ±25,04	122,94 _a ±2,31
30	1.509,87 _b ±52,44	904,17 _b ±41,13	904,55 _b ±50,58	112,06 _b ±13,35	123,83 _b ±21,95	86,72 _b ±10,70
20	1.348,19 _b ±88,32	802,10 _c ±48,04	804,13 _c ±37,84	98,92 _c ±14,44	112,45 _{b,c} ±32,87	77,81 _{b,c} ±3,65
10	554,98 _c ±22,32	409,81 _d ±30,34	309,41 _d ±42,67	56,18 _d ±11,71	102,74 _c ±29,8	64,17 _c ±4,54
5	223,91 _d ±15,21	112,17 _e ±4,08	193,04 _e ±32,7	31,13 _c ±2,07	31,76 _d ±8,45	18,72 _d ±2,97

Os valores médios indicados por uma letra com número diferente ao longo de uma coluna, são significativamente diferentes para teste de Tukey com nível de significância igual 5%.

Tabela 4.11 - Concentração de cada catequina cafeína e ácido gálico nos permeados dos processos de ultrafiltração utilizando campo eletromagnético para o chá verde.

<i>Peso molecular de corte (kDa)</i>	<i>Galato de (-) – epigalo catequina (mgL⁻¹)</i>	<i>Cafeína (mgL⁻¹)</i>	<i>Epicatequina (mgL⁻¹)</i>	<i>Catequina (mgL⁻¹)</i>	<i>(-) – Epigalo catequina (mgL⁻¹)</i>	<i>Ácido Gálico (mgL⁻¹)</i>
Alimentação	2.403,43 _a ±37,11	1.224,79 ±37,09	1.231,46 _a ±31,61	211,19 _a ±7,03	215,92 _a ±5,32	113,98 _a ±13,45
30	1.419,77 _b ±30,44	713,98 _b ±30,54	602,92 _b ±39,09	91,99 _b ±11,01	110,71 _b ±29,50	58,02 _b ±20,62
20	1.002,73 _c ±34,73	602,01 _c ±41,78	506,56 _c ±35,22	83,11 _b ±1,81	104,52 _b ±20,61	56,74 _b ±7,41
10	439,82 _d ±31,23	287,74 _d ±35,43	294,12 _c ±26,6	33,14 _c ±5,77	51,98 _c ±7,20	29,12 _c ±6,49
5	101,91 _d ±22,67	78,29 _c ±6,82	81,05 _c ±31,69	19,06 _d ±3,59	24,52 _d ±2,47	11,08 _d ±3,25

Os valores médios indicados por uma letra com número diferente ao longo de uma coluna, são significativamente diferentes para teste de Tukey com nível de significância igual 5%.

O comportamento observado para a concentração de cada catequina é o mesmo observado para a concentração de fenólicos totais, ou seja, há uma maior concentração de catequinas no permeado para a membrana com maior peso molecular de corte. A análise estatística dos resultados de concentração de catequinas mostrou que há diferença significativa entre a maioria das membranas avaliadas nos três processos propostos.

O uso de membranas de ultrafiltração para o chá verde também foi reportado por KUMAR et al. (2012) e para o permeado da membrana de 30 kDa os autores analisaram apenas dois padrões, sendo eles: galato de (-) – epigalocatequina (EGCG) e (-) – epigalo catequina (EGC). KUMAR et al. (2012) afirmaram que obtiveram 80% de EGCG no permeado da ultrafiltração. Se o mesmo cálculo for feito para a Tabela 4.9, no permeado da ultrafiltração convencional deste trabalho terá 91,65% de EGCG. Porém neste trabalho experimental foram analisados 6 padrões, sendo assim a porcentagem de EGCG no permeado será de 39,55%.

Para o processo utilizando ultrassom, nota-se que a concentração de todas as catequinas, cafeína e ácido gálico aumentaram no permeado, esse aumento foi superior a 25% para o EGCG e para ácido gálico.

Para uma comparação efetiva dos processos, as Figuras 4.4 e 4.5 apresentam as porcentagens de rejeição das catequinas, cafeína e ácido gálico avaliados para os processos de ultrafiltração convencional, com ultrassom e com campo magnético.

A Figura 4.4 apresenta a comparação da porcentagem de rejeição do galato de (-) – epigalo catequina, cafeína e epicatequina avaliados nos permeados dos processos de ultrafiltração convencional, com ultrassom e com campo magnético com membranas de diferentes pesos moleculares de corte.

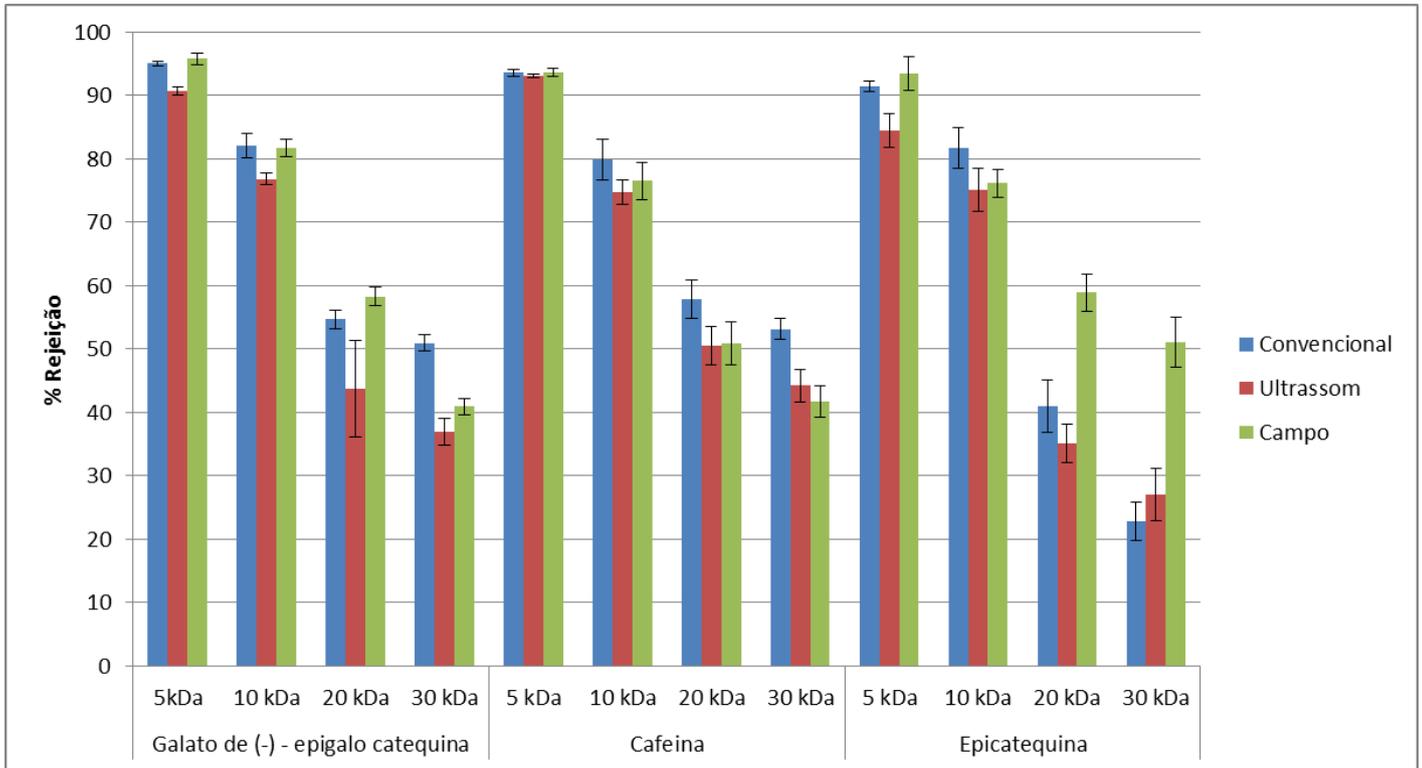


Figura 4.4- Comparação da porcentagem de rejeição do galato de (-) – epigalo catequina, cafeína e epicatequina avaliados nos permeados dos processos de ultrafiltração convencional, com ultrassom e com campo magnético com membranas de diferentes pesos moleculares de corte.

Analisando a Figura 4.4 conclui-se que a porcentagem de rejeição do galato de (-) – epigalo catequina para os processos aplicando ultrassom diminuiu para todas as membranas estudadas. Já para o processo aplicando campo eletromagnético houve aumento na rejeição para as membranas de 5 e 20 kDa, sendo que para esta o aumento foi maior, chegando a 6,65%. Para as membranas de 20 e 30 kDa aplicando ultrassom foram observadas as maiores reduções nas porcentagens de rejeições deste bioproduto em relação ao processo convencional sendo elas 20,01% e 27,49%, respectivamente. Essa redução foi mais pronunciada nestas membranas pois elas são mais abertas. A análise estatística dos resultados de porcentagem de rejeição mostrou de acordo com teste de *Tukey* com nível de significância igual 0,05 que há

diferença significativa entre os três processos (convencional, com ultrassom e com campo magnético) para o galato de (-) – epigalo catequina em todas as membranas.

Pode-se observar que a porcentagem de rejeição de cafeína é maior para o processo convencional em todas as membranas e diminuiu para os processos aplicando ultrassom e campo eletromagnético para as membranas de 30, 20 e 10 kDa. Na membrana de 5 kDa, as rejeições para os três processos ficaram na mesma ordem de grandeza, por volta de 93%. Para a membrana de 5 kDa a análise estatística dos resultados mostrou que não há diferença significativa entre as porcentagens de rejeições de cafeína para os três processos analisados (convencional, com ultrassom e com campo magnético).

Para a epicatequina o uso de ultrassom resultou em uma diminuição na rejeição deste composto em relação ao processo convencional para a maioria das membranas estudadas (variando de 7,63 a 14,14%) exceto para a membrana de 30 kDa que teve um aumento na porcentagem de rejeição de 18,26%. Assim, embora a aplicação de ultrassom tenha aumentado a permeação de fenólicos totais, a análise individual destes fenólicos mostrou que a aplicação de ultrassom diminui a permeação de epicatequina quando a membrana de 30 kDa é utilizada. A aplicação do campo eletromagnético provocou aumento dos percentuais de rejeições para as membranas de 5, 20 e 30 kDa de 2,20, 43,66 e 122,89% respectivamente. Para a membrana de 10 kDa foi observada uma redução de 6,83% na rejeição da epicatequina com a aplicação do campo eletromagnético. A análise estatística dos resultados de porcentagem de rejeição mostrou que há diferença significativa entre os três processos (convencional, com ultrassom e com campo magnético) para a porcentagem de rejeição de epicatequina em todas as membranas.

A Figura 4.5 apresenta a comparação da porcentagem de rejeição do catequina, (-) – epigalo catequina e do ácido gálico avaliados nos permeados dos processos de ultrafiltração convencional, com ultrassom e com campo magnético com membranas de diferentes pesos moleculares de corte.

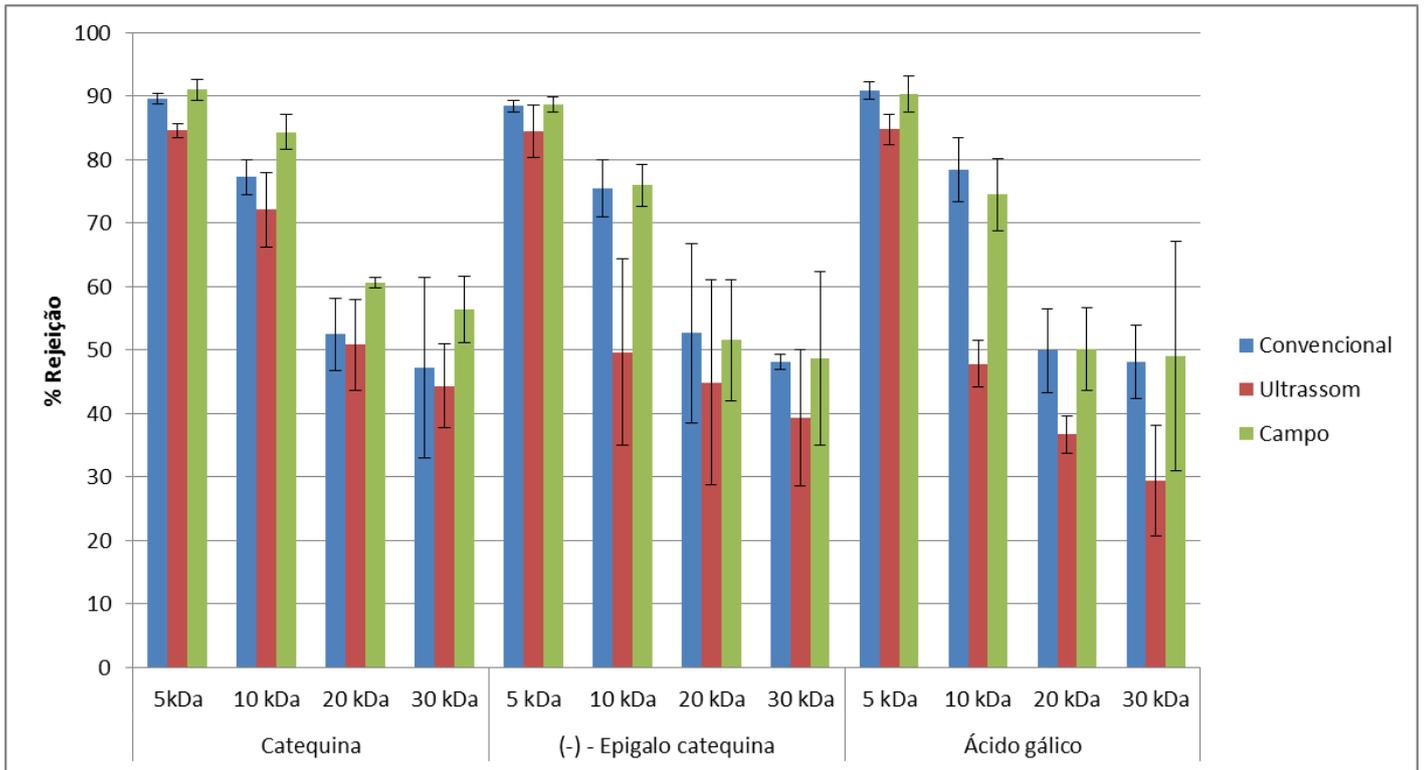


Figura 4.5- Comparação da porcentagem de rejeição da catequina, (-) – epigalo catequina e do ácido gálico avaliados nos permeados dos processos de ultrafiltração convencional, com ultrassom e com campo magnético com membranas de diferentes pesos moleculares de corte.

Pela Figura 4.5 a porcentagem de rejeição da catequina aumenta com a diminuição do peso molecular de corte da membrana para todos os processos. Comparando os processos utilizando ultrassom com o processo convencional para este bioprotudo foi observada uma diminuição nas porcentagens de rejeições para todas as membranas estudadas. Para a membrana de 10 kDa foi observada a maior redução (6,64%). Para o processo utilizando campo eletromagnético observa-se um aumento na porcentagem de rejeição para todas as membranas, sendo que para a membrana de 30 kDa foi observado o maior aumento (19,62%). A análise estatística dos resultados de porcentagem de rejeição mostrou que há diferença significativa entre os três processos (convencional, com ultrassom e com campo magnético) para a catequina em todas as membranas.

A rejeição da (-) epigalo catequina aumenta com a diminuição do peso molecular de corte da membrana para todos os processos. Comparando os processos utilizando ultrassom e o processo convencional para este bioprotudo foi observada uma diminuição nas porcentagens de rejeição para todas as membranas estudadas, para a membrana de 10 kDa foi observada a

maior redução (34,15%). Para o processo utilizando campo eletromagnético observa-se uma pequena diminuição na porcentagem de rejeição para todas as membranas, sendo que para a membrana de 30 kDa foi observada a maior diminuição (1,24%). Para a membrana de 20 kDa, o processo com campo eletromagnético foi observado um aumento de 2,05% na porcentagem de rejeição. A análise estatística dos resultados de porcentagem de rejeição mostrou que não há diferença significativa entre os processos convencional e com campo magnético para a (-) – epigalocatequina em todas as membranas, e que há diferença significativa entre os processos convencional e com ultrassom em todas as membranas.

Comparando os processos utilizando ultrassom com o processo convencional para o ácido gálico tem-se que foi observada uma diminuição nas porcentagens de rejeição para todas as membranas estudadas, para a membrana de 10 kDa foi observada a maior redução (39,06%). Para o processo utilizando campo eletromagnético observa-se uma pequena diminuição na porcentagem de rejeição para as membranas de 20 e 30 kDa, sendo que para a membrana de 30 kDa foi observado a maior redução (2,01%). Para as membranas de 5 e 10 kDa, para o processo com campo eletromagnético foi observado um aumento de 0,61% e 5,09% na porcentagem de rejeição respectivamente. A análise estatística dos resultados de porcentagem de rejeição mostrou que não há diferença significativa entre os processos convencional e com campo eletromagnético para a (-) – epigalocatequina em todas as membranas. A análise estatística dos resultados de porcentagem de rejeição mostrou que há diferença significativa entre os processos convencional e com ultrassom para o ácido gálico em todas as membranas, e não há diferença significativa entre os processos convencional e com ultrassom para as membranas de 5 e 20 kDa.

4.3.2.2 Análise físico-química do concentrado

As características físico-químicas dos concentrados dos processos de ultrafiltração convencional, com ultrassom e com campo eletromagnético podem ser observados nas Tabelas de 4.12 a 4.14 respectivamente.

Tabela 4.12 – Características físico-químicas dos concentrados dos processos de ultrafiltração convencional do chá verde utilizando membranas de diferentes pesos moleculares de corte.

<i>Peso molecular de corte (kDa)</i>	<i>Turbidez (NTU)</i>	<i>Concentração de fenólicos totais (mg_{AG}L⁻¹)</i>	<i>Concentração de sólidos totais (mgL⁻¹)</i>	<i>Concentração de proteína (mg BSAL⁻¹)</i>
Alimentação	27 _a ±0,500	6.152,22 _a ±35	56.845 _a ±204	2.043,00 _a ±38
30	42 _b ±2,00	3.340 _b ±38,00	38.796 _b ±152,00	1.549,00 _b ±9,80
20	42 _b ±1,00	3.526 _b ±33,00	39.020 _b ±125,00	1.598,00 _b ±37,00
10	44 _c ±0,00	5.151 _c ±37,00	48.127 _c ±146,00	1.635,00 _c ±23,00
5	46 _d ±0,00	5.627 _c ±15,00	50.895 _c ±136,00	1.782,00 _c ±33,00

Os valores médios indicados por uma letra com número diferente ao longo de uma coluna, são significativamente diferentes para teste de Tukey com nível de significância igual 5%.

Tabela 4.13 – Características físico-químicas dos concentrados dos processos de ultrafiltração utilizando ultrassom do chá verde utilizando membranas de diferentes pesos moleculares de corte.

<i>Peso molecular de corte (kDa)</i>	<i>Turbidez (NTU)</i>	<i>Concentração de fenólicos totais (mg_{AG}L⁻¹)</i>	<i>Concentração de sólidos totais (mgL⁻¹)</i>	<i>Concentração de proteína (mg BSAL⁻¹)</i>
Alimentação	29 _a ±0	6.156,67 _a ±41	57.128 _a ±201	2.067,00 _a ±33
30	35 _b ±1,00	2.478 _b ±147,00	40.058 _b ±121,00	1.499 _b ±39,00
20	36 _b ±0,00	2.911 _b ±122,00	43.280 _c ±168,00	1.503 _b ±41,00
10	38 _c ±1,00	4.991 _c ±49,00	49.724 _d ±107,00	1.582 _c ±34,00
5	39 _d ±2,00	5.039 _c ±37,00	52.489 _e ±108,00	1.638 _c ±43,00

Os valores médios indicados por uma letra com número diferente ao longo de uma coluna, são significativamente diferentes para teste de Tukey com nível de significância igual 5%.

Tabela 4.14 – Características físico-químicas dos concentrados dos processos de ultrafiltração utilizando campo eletromagnético do chá verde utilizando membranas de diferentes pesos moleculares de corte.

<i>Peso molecular de corte (kDa)</i>	<i>Turbidez (NTU)</i>	<i>Concentração de fenólicos totais (mg_{AG}L⁻¹)</i>	<i>Concentração de sólidos totais (mgL⁻¹)</i>	<i>Concentração de proteína (mg BSAL⁻¹)</i>
Alimentação	27 _a ±0,5	6.147,79 _a ±35	57.249 _a ±100	2.042,00 _a ±45
30	44 _b ±0,00	3.221 _b ±37,85	36.970 _b ±156,00	1.523 _{a,b} ±38,00
20	44 _b ±3,00	3.442 _b ±33,69	40.119 _c ±129,00	1.602 _{b,c} ±47,00
10	46 _c ±1,00	5.007 _c ±34,12	49.120 _d ±139,00	1.691 _{a,b,c} ±24,00
5	47 _d ±0,00	5.616 _c ±28,04	50.231 _d ±136,00	1.763 _{a,c} ±42,00

Os valores médios indicados por uma letra com número diferente ao longo de uma coluna, são significativamente diferentes para teste de Tukey com nível de significância igual 5%.

A análise estatística dos resultados de concentração de sólidos totais apresentados mostrou de acordo com teste de *Tukey* com nível de significância igual 0,05 que não há diferença significativa para as concentrações de sólidos nos permeados das membranas de 30 e 20 kDa no processo convencional. Para as membranas de 10 e 5 kDa este comportamento também é observado.

As maiores concentrações de fenólicos presentes no concentrado foram obtidas para as membranas mais fechadas, ou seja, para as membranas de 5 kDa independente do processo. A análise estatística mostrou que não há diferença significativa entre as concentrações de fenólicos entre as membranas de 30 e 20 kDa e entre as membranas de 10 e 5 kDa para os três processos (convencional, com ultrassom e com campo eletromagnético) estudados. A concentração de proteínas para esses pares de membranas se comportam da mesma forma que a concentração de fenólicos.

A análise estatística para o concentrado do processo com campo eletromagnético mostra que a concentração de fenólicos para as membranas de 30 e 20 kDa não apresenta diferenças significativas. Para as membranas de 10 e 5 kDa este comportamento também foi observado. A concentração de sólidos foi significativamente igual para as membranas de 10 e 5 kDa e a concentração de proteína foi igual para o concentrado das 4 membranas utilizadas.

Embora a turbidez do concentrado seja maior que a da alimentação, não foi observado nenhum aumento da concentração dos parâmetros analisados no concentrado em relação à alimentação. Isto deve estar relacionado ao fato de que o fator de concentração utilizado para o permeado das ultrafiltrações foi baixo, sendo eles 1,25 para a membrana de 5 kDa, 1,54 para a de 10 kDa e 2,0 para as membranas de 20 e 30 kDa. Caso os processos de ultrafiltração se estendessem por mais tempo, possivelmente seria observado um valor maior no concentrado quando comparado com a alimentação.

Para uma comparação efetiva dos processos, a Figura 4.6 apresenta as porcentagens de redução dos parâmetros físico-químicos avaliados no concentrado para os processos de ultrafiltração convencional, com ultrassom e com campo magnético. A análise de turbidez não será apresentada na Figura 4.7, uma vez que para este parâmetro não foi observado redução dos valores no concentrado e sim um aumento de até 74,07%.

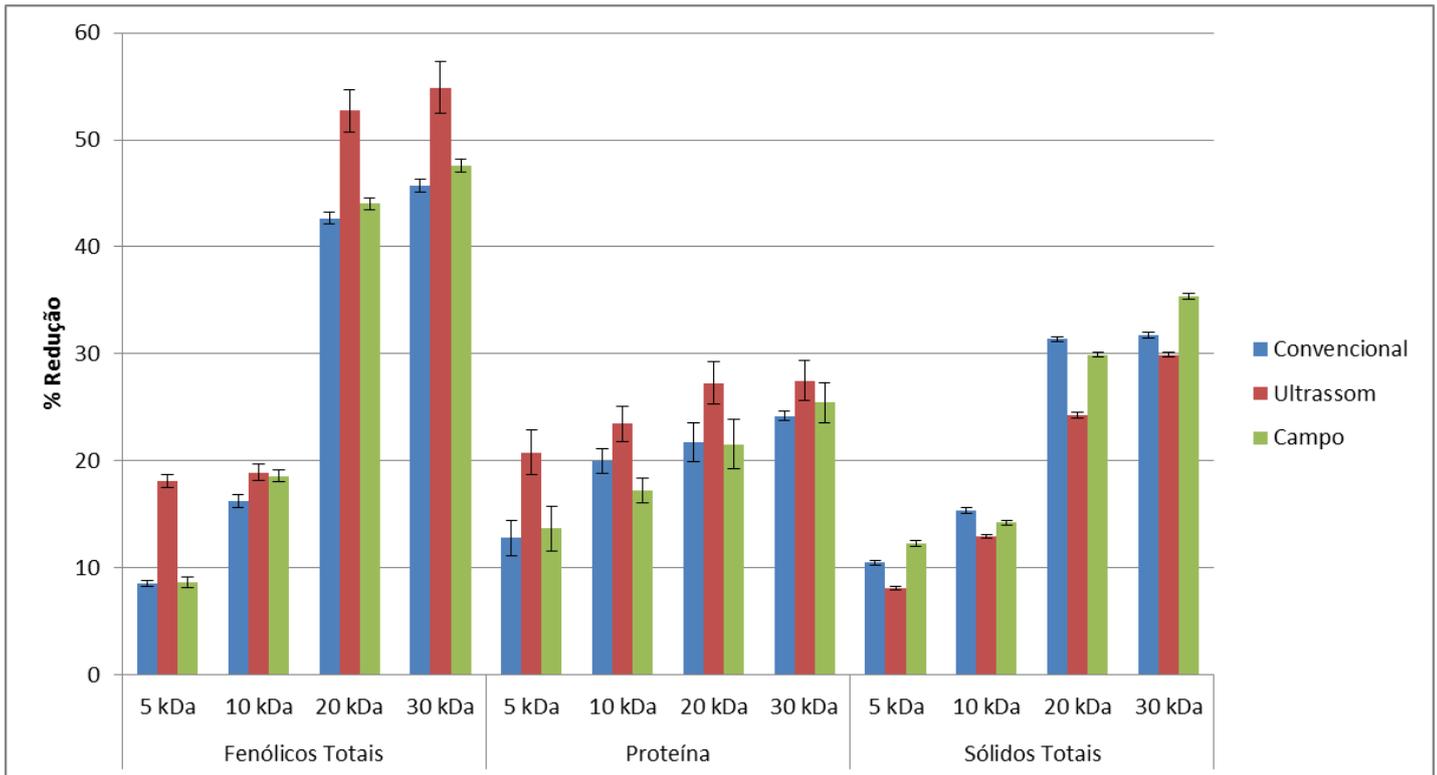


Figura 4.6 - Comparação da porcentagem de redução dos parâmetros físico-químicos avaliados nos concentrados dos processos de ultrafiltração convencional, com ultrassom e com campo magnético com membranas de diferentes pesos moleculares de corte.

Pela Figura 4.6 nota-se que quanto maior o peso molecular de corte maior a porcentagem de redução de cada parâmetro para cada um dos três processos (convencional, com ultrassom e com campo eletromagnético). Comparando a porcentagem de rejeição dos compostos fenólicos do processo utilizando o ultrassom com o processo convencional pode-se concluir que o ultrassom aumentou a porcentagem de redução para todas as membranas, apresentando aumento superior a 100% para a membrana de 5 kDa (112,65%). Para a aplicação do campo eletromagnético um aumento na rejeição também foi observado, porém com menor intensidade. Este comportamento está certamente associado a maior permeação dos compostos fenólicos nos processos com ultrassom e com campo magnético, em comparação com o processo convencional. A membrana de 10 kDa foi a que obteve o maior aumento da porcentagem de rejeição com a aplicação do campo eletromagnético, chegando a 14,10%. A análise estatística dos resultados de porcentagem de rejeição mostrou que há diferença significativa entre os processos convencional e com ultrassom para os fenólicos

totais em todas as membranas, e não há diferença significativa entre os processos convencional e com ultrassom para as membranas de 5 e 20 kDa.

Analisando as porcentagens de rejeição das proteínas é observado o mesmo comportamento já descrito para a rejeição de fenólicos quando se compara os processos convencional e com ultrassom. Porém, neste caso nota-se um aumento da rejeição das proteínas de 62,46% para a membrana de 5kDa. Comparando os processos convencional e com campo eletromagnético para as proteínas, nota-se pequenas variações nas porcentagens de rejeição, sendo que as membranas de 10 e 20 kDa tiveram um aumento na porcentagem de rejeição de 13,93 e 1,08% respectivamente, e as membranas de 5 e 30 kDa apresentaram reduções na porcentagem de rejeição de 6,95 e 5,11% respectivamente. A análise estatística dos resultados de porcentagem de rejeição mostrou que: há diferença significativa entre os processos convencional e com ultrassom para as proteínas em todas as membranas, e não há diferença significativa entre os processos convencional e com campo eletromagnético para todas as membranas.

Analisando as porcentagens de rejeição para os sólidos totais nota-se que a aplicação do ultrassom reduziu as porcentagens de rejeição para todas as membranas. Para a membrana de 20 kDa foi observada uma redução de 22,70%. A aplicação do campo aumentou a rejeição para as membranas de 5 e 30 kDa em 17,11 e 11,56% respectivamente. E para as membranas de 10 e 20 kDa o campo reduziu a porcentagem de rejeição em 7,41 e 4,58% respectivamente. A análise estatística dos resultados de porcentagem de rejeição mostrou que há diferença significativa entre os três processos (convencional, com ultrassom e com campo magnético) para os sólidos totais para todas as membranas.

Foi visto nas Tabelas de 4.12 a 4.14 que todos os parâmetros analisados para o concentrado diminuíram seus valores em relação à alimentação, exceto a turbidez que para a membrana de 5kDa no processo utilizando campo eletromagnético apresentou um aumento de 74,07%. Desta forma, a Figura 4.7 apresenta as porcentagens de aumento da turbidez avaliadas no concentrado para os processos de ultrafiltração convencional, com ultrassom e com campo magnético.

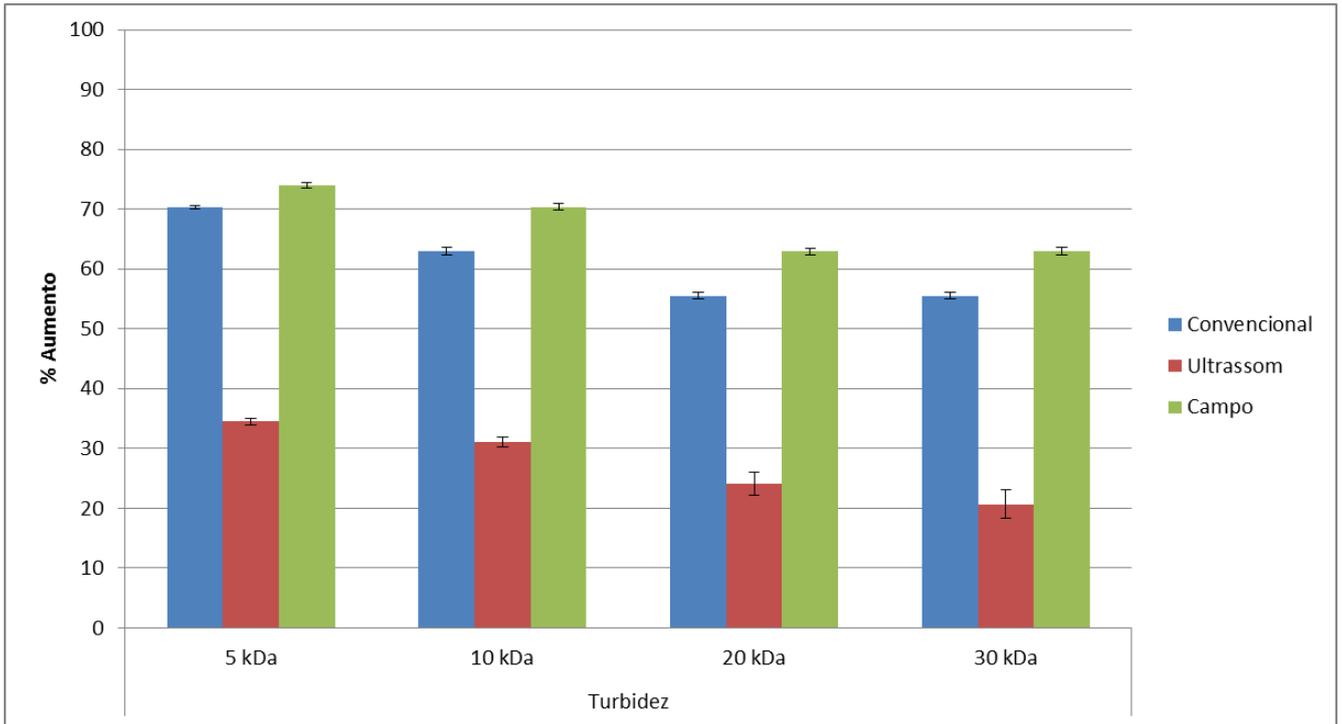


Figura 4.7 - Comparação das porcentagens de aumento da turbidez avaliadas nos concentrados dos processos de ultrafiltração convencional, com ultrassom e com campo magnético com membranas de diferentes pesos moleculares de corte.

Analisando a Figura 4.7 nota-se que com o aumento do peso molecular de corte da membrana menor é a porcentagem de aumento em cada processo (convencional, com ultrassom e com campo magnético) analisado. Isto ocorre devido ao fato de que quanto maior o peso molecular de corte da membrana menos moléculas ficaram retidas no concentrado. Para as membranas de 20 e 30 kDa, em todos os processos, a porcentagem de aumento ficou próxima, sendo que para os processos convencional e utilizando campo eletromagnético elas são iguais.

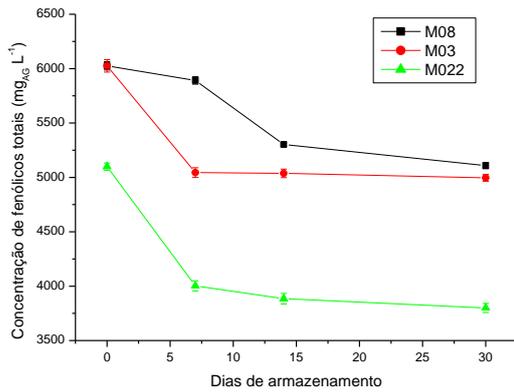
A aplicação do ultrassom apresentou porcentagem de aumento nos valores de turbidez inferiores aos obtidos nos processos convencionais. Para a membrana de 30 kDa foi observada a maior diminuição na porcentagem de aumento de turbidez, sendo equivalente a 16,67%. O uso do campo eletromagnético aumentou a porcentagem de aumentos dos valores de turbidez, o maior aumento foi para a membrana de 30 kDa correspondendo a 25,71%.

A análise estatística dos resultados de porcentagem de aumento mostrou que há diferença significativa entre os três processos (convencional, com ultrassom e com campo magnético) para a turbidez em todas as membranas.

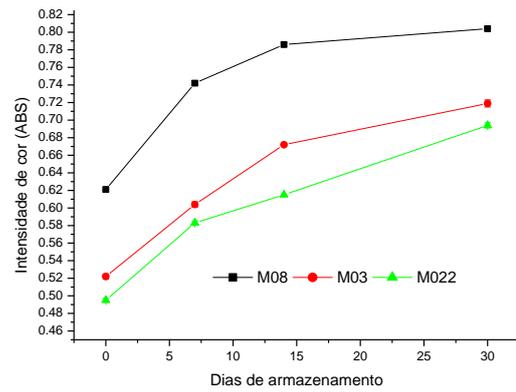
4.4 Análises da estabilidade

A estabilidade dos permeados de chá verde em relação à turbidez, concentração de fenólicos totais, intensidade de cor e formação de *tea cream* foi avaliada durante 30 dias em intervalos de 7 dias. As amostras foram mantidas sob refrigeração a 5°C durante os 30 dias.

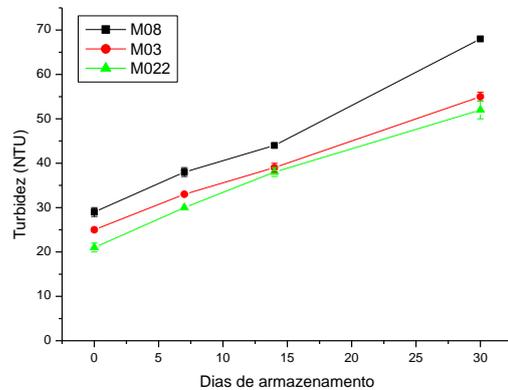
A Figura 4.8 apresenta o comportamento da concentração de fenólicos, turbidez, cor e formação de *tea cream* para os permeados das microfiltrações durante os 30 dias de armazenamento.



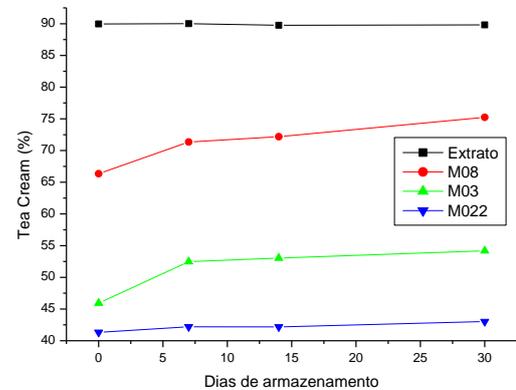
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 4.8 - Estabilidade dos permeados das microfiltrações com as membranas de 0,8, 0,3 e 0,22 μm (M08, M03 e M022, respectivamente) com relação a (a) concentração de fenólicos, (b) intensidade de cor, (c) turbidez e (d) formação de *tea cream*.

Os valores apresentados na Figura 4.8 mostram que os permeados das microfiltrações não apresentaram estabilidade, uma vez que todos os parâmetros analisados variaram no decorrer dos dias. Para todas as membranas de microfiltração avaliadas, tem-se que a turbidez e a intensidade de cor aumentaram com o decorrer dos dias, enquanto que a concentração de fenólicos diminuiu. A diminuição na concentração de fenólicos deve-se, provavelmente, ao fato que os compostos fenólicos se complexaram a outros compostos, como as proteínas, que se encontravam solubilizados. A diminuição na concentração de fenólicos e o aumento na cor e na turbidez foram equivalentes para as três membranas avaliadas. Em média para as três membranas avaliadas, do dia 0 ao dia 30 observou-se uma redução nos compostos fenólicos

de 19% e aumento na cor e na turbidez de 35 e 134%, respectivamente. Contudo, a Figura 4.8 (c) mostra que a formação de *tea cream* é maior no permeado das membranas mais abertas. Em comparação com o extrato, teve-se uma menor formação de *tea cream* nos permeados. Nota-se ainda que o aumento da turbidez manteve-se ao longo dos 30 dias de armazenamento, ao passo que os demais parâmetros mantiveram-se estáveis após o sétimo dia de armazenamento.

CHANDINI et al. (2013) avaliaram a estabilidade dos permeados das microfiltrações para o chá preto para membranas com porosidade 0,2 e 0,45 μm e concluíram que estes se mantiveram estáveis quando armazenados sob refrigeração durante 30 dias, embora o valor de turbidez tenha aumentado de 0,6 até 4,04 NTU durante 30 dias. O parâmetro que CHANDINI et al. (2013) utilizaram para garantir a estabilidade do permeado foi o valor de turbidez ser menor ou igual a 4 NTU. De fato, a turbidez inicial dos permeados da microfiltração já estavam maiores que 4 NTU (Figura 4.8 (c)). Esta alta turbidez inicial pode ter contribuído para a perda de estabilidade do chá armazenado. Para CHANDINI et al. (2013), ao se trabalhar com o chá preto não foi observado a formação do *tea cream* nem para os permeados das membranas de microfiltração e nem para as de ultrafiltração.

A Figura 4.9 apresenta os parâmetros avaliados para verificar a estabilidade dos permeados das ultrafiltrações convencional com membranas de diferentes pesos moleculares de corte.

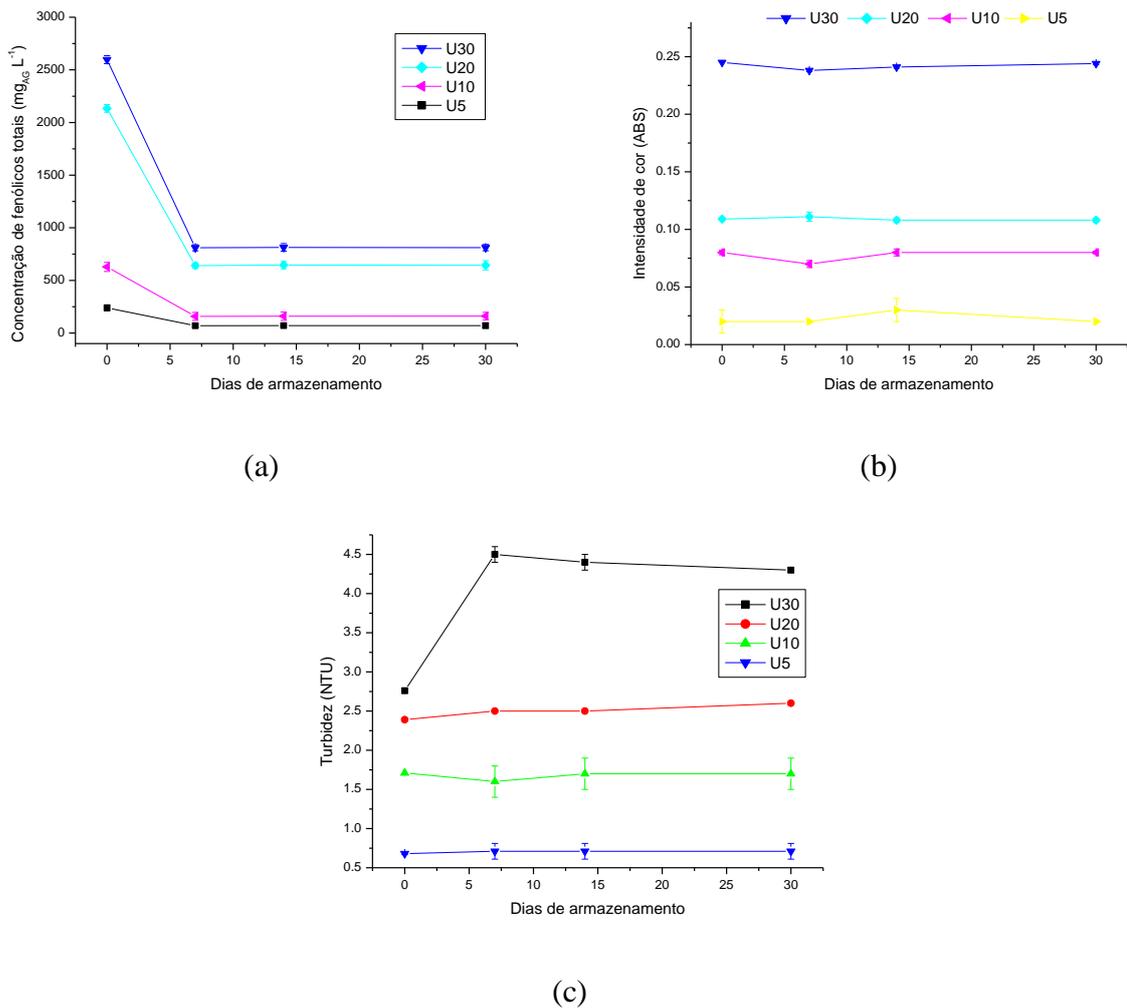


Figura 4.9 - Estabilidade dos permeados das ultrafiltrações convencionais com as membranas de 30, 20, 10 e 5 kDa (U30, U20, U10 e U5, respectivamente) com relação a (a) concentração de fenólicos, (b) intensidade de cor e (c) turbidez.

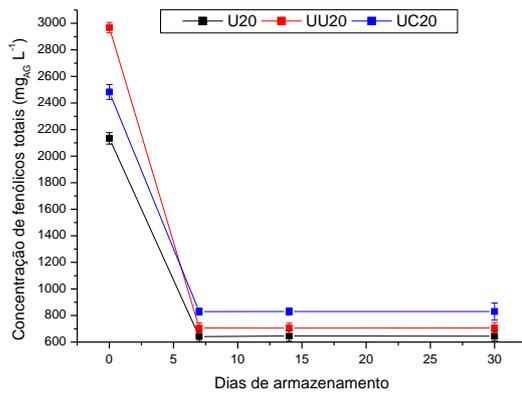
Para os permeados das ultrafiltrações, pode-se observar que houve uma variação na concentração de fenólicos ao passar do Dia 0 para o Dia 7. Porém, do Dia 7 até o Dia 30 não houve variação significativa destes parâmetros. A intensidade de cor manteve-se praticamente constante ao longo dos 30 dias. Observa-se uma variação significativa na turbidez do permeado da membrana de 30 kDa ao passar do dia 0 para o dia 7 e a turbidez desta amostra atingiu valores ligeiramente superiores a 4 NTU durante os 30 dias de armazenamento.

TODISCO et al. (2002) analisaram a estabilidade do permeado do chá preto através de análise colorimétrica e de concentração de fenólicos totais e concluíram que após 60 dias sobre refrigeração o permeado obtido da ultrafiltração, utilizando uma membrana de 40 kDa, permaneceu estável, ou seja, não foi observado alterações significativas nos valores de

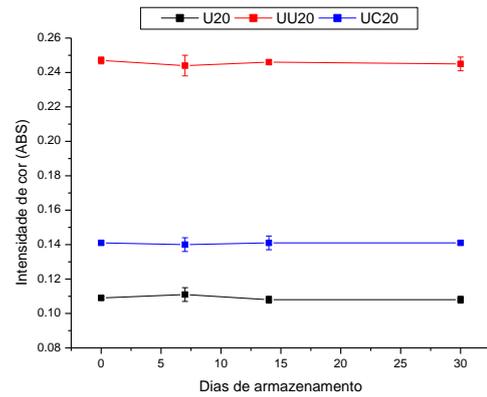
concentração total de fenólicos e de coloração. VRADIS & FLOROS (1993) estudaram o processo de separação por membranas utilizando vinho e concluíram que membranas com peso molecular de corte inferior ou igual a 40 kDa, são apropriadas para reter as moléculas de proteínas e garantem a permeação dos compostos fenólicos, já que estes possuem peso molecular entre 0,290 e 0,458 kDa. CHANDINI et al. (2013) analisaram o permeado das ultrafiltrações utilizando membranas de 25, 50, 100 e 150 kDa para o chá preto e concluíram que os permeados se mantiveram estáveis por 30 dias sob refrigeração pois a turbidez se manteve menor que 4 NTU e a concentração de fenólicos não variou.

Neste trabalho, a formação de *tea cream* não foi observada nos permeados das ultrafiltrações. Contudo, para garantir que os permeados tenham as características desejadas para o consumo, principalmente no que se refere à turbidez da amostra, sugere-se utilizar membranas de peso molecular de corte de 20 kDa para extrato de chá verde.

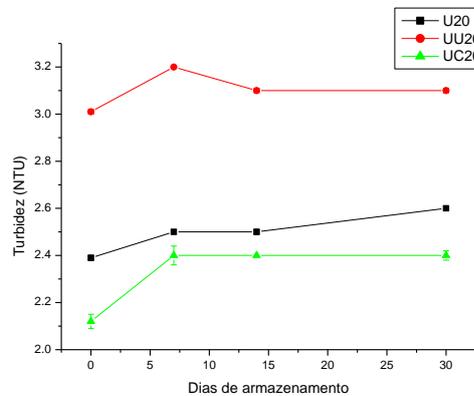
O comportamento da estabilidade dos permeados das ultrafiltrações convencional, com ultrassom e com campo magnético são similares, conforme pode ser observado na Figura 4.10 para a membrana de 20 kDa. Os resultados para as demais membranas podem ser visto nas Tabelas E.1 a E.4 do Anexo E.



(a)



(b)



(c)

Figura 4.10 - Estabilidade dos permeados das ultrafiltrações convencional, com ultrassom e com campo magnético com a membranas de 20 kDa (U20, UU20 e UC20, respectivamente) com relação a (a) concentração de fenólicos, (b) intensidade de cor e (c) turbidez.

A Figura 4.10 mostra que, embora os perfis ao longo dos 30 dias de armazenamento sejam equivalentes para os três processos, a turbidez e a cor dos permeados das ultrafiltrações com ultrassom e com campo magnético são superiores em relação à ultrafiltração convencional, visto que a concentração de fenólicos também é superior. Contudo, uma maior permeação de compostos fenólicos é desejável.

4.5 Comparação entre o chá verde, o chá preto e o chá branco

As características físico-químicas dos chás verde, preto e branco encontram-se nas Tabelas 4.15 e 4.16.

Tabela 4.15 – Concentração das catequinas e de fenólicos totais para as amostras de chá verde, preto e branco.

Chá	Galato de (-) – epigalo catequina (mgL ⁻¹)	Cafeína (mgL ⁻¹)	Epicatequina (mgL ⁻¹)	Catequina (mgL ⁻¹)	(-) – Epigalo catequina (mgL ⁻¹)	Ácido Gálico (mgL ⁻¹)	Fenólicos (mg _{AG} L ⁻¹)
Verde	2.458,77 _a ±45	1.523,82 _a ±39	1.609,65 _a ±55	211,62 _a ±12,31	211,62 _a ±10,01	119,04 _a ±9,84	6.184,12 _a ±38
Preto	1,74 _b ±0,53	1.140,01 _b ±17	27,02 _b ±1,63	203,86 _a ±10,42	399,32 _b ±9,88	994,07 _b ±13,47	1.930,50 _b ±25
Branco	73,85 _c ±1,38	0,93 _c ±0,21	3,34 _c ±0,94	95,5 _b ±3,19	202,77 _a ±19,13	127,25 _a ±13,44	1.717,89 _c ±33

Os valores médios, indicados por uma letra com número diferente ao longo de uma coluna, são significativamente diferentes para teste de *Tukey* com nível de significância igual 5%.

Tabela 4.16 – Características físico-químicas das amostras de chá verde, preto e branco.

Chá	Turbidez (NTU)	Intensidade da cor (ABS)	Sólidos (mgL ⁻¹)
Verde	563 _a ±3	0,763 _a ±0,010	61.080 _a ±124
Preto	656 _b ±2	0,902 _b ±0,015	80.000 _b ±149
Branco	117 _c ±5	0,264 _c ±0,011	58.400 _c ±132

Os valores médios, indicados por uma letra com número diferente ao longo de uma coluna, são significativamente diferentes para teste de *Tukey* com nível de significância igual 5%.

Analisando a concentração das catequinas da Tabela 4.15 pode-se observar que o galato de (-) – epigalo catequina esta em maior quantidade no chá verde, para este chá ele chega a ser mais que 30 vezes maior que nos outros chás. Este mesmo resultado foi constatado por CHENG (2006).

Para a cafeína, o chá verde e o chá preto apresentaram a mesma ordem de grandeza, só o chá branco que possui uma quantidade menor.

Para a catequina, o chá verde e o chá preto apresentaram a mesma ordem de grandeza, só o chá branco que possui uma quantidade menor. A (-) – epigalo catequina e o ácido gálico apresentam maior quantidade no chá preto.

A análise estatística dos resultados de concentração de catequinas, cafeína e ácido gálico mostrou que não há diferença significativa entre a concentração de catequina do chá verde e do chá preto. Para os chás verde e branco não há diferença significativa para a concentração de (-) – epigalo catequina e para a concentração de ácido gálico.

Pela Figura 4.11 pode-se observar que o nome de cada um dos chás está diretamente relacionado com a coloração das folhas já processadas.



Figura 4.11 – Amostras de chá verde, branco e preto respectivamente.

Devido as folhas do chá preto serem mais escuras que os demais, é intuitivo pensar que o extrato desse chá também apresentará uma coloração mais escura. Este fato pode ser confirmado através dos valores de turbidez e intensidade de cor apresentados na Tabela 4.16. Os valores destes parâmetros são mais acentuados para este chá, seguindo o chá verde e o chá branco.

Através dos resultados experimentais, o chá preto foi aquele que apresentou a maior quantidade de concentração de sólidos. Pode-se associar este resultado ao fato de que a granulometria deste chá é bastante inferior aos demais, podendo ser comparada a granulometria de areia. Dessa forma, as folhas de chá não conseguem ser retidas de maneira eficiente no filtro de pano utilizado para separar as folhas do chá. Os chás branco e verde por possuírem granulometria próximas, apresentam concentrações próximas de sólidos totais, sendo elas, 58.400 e 61.080 mgL^{-1} respectivamente.

Os chás preto e branco foram ultrafiltrados em uma membrana de 30 kDa aplicando ultrassom. As concentrações das catequinas, cafeína e ácido gálico nos permeados desses dois chás podem ser observadas na Tabela 4.17.

Tabela 4.17 - Concentração das catequinas, cafeína e ácido gálico nos permeados dos processos de ultrafiltração utilizando membrana de 30 kDa para o chá preto e o chá branco.

Permeado	Galato de (-) – epigalo catequina (mgL ⁻¹)	Cafeína (mgL ⁻¹)	Epicatequina (mgL ⁻¹)	Catequina (mgL ⁻¹)	(-) – Epigalo catequina (mgL ⁻¹)	Ácido Gálico (mgL ⁻¹)
Preto	0,12 _a ±0,01	556,15 _a ±21,47	17,84 _a ±1,82	112,08 _a ±12,99	126,61 _a ±13,04	748,14 _a ±20,82
Branco	54,92 _b ±2,93	0,45 _b ±0,09	0,99 _b ±0,8	77,82 _b ±6,13	98,13 _b ±6,54	94,15 _b ±3,63

Os valores médios, indicados por uma letra com número diferente ao longo de uma coluna, são significativamente diferentes para teste de *Tukey* com nível de significância igual 5%.

O comportamento dos permeados dos chás preto e branco se difere daquele encontrado para o chá verde. Já foi visto que todos os bioprodutos no permeado do chá verde no processo de ultrafiltração utilizando ultrassom para a membrana de 30 kDa apresentaram uma redução de aproximadamente 50% da concentração inicial. Já para o chá preto, não há um comportamento similar entre os componentes, sendo que para o galato de (-) – epigalocatequina houve uma redução de 87,75% e para a (-) – epigalo catequina houve uma redução de 67,49%. Os demais compostos apresentaram reduções inferiores a 50%. O bioproduto que apresentou a menor redução foi o ácido gálico (24,04%), por isso a purificação do chá preto pode ser utilizada quando se deseja obter ácido gálico em maior quantidade. Segundo SERRA et al. (2014) o ácido gálico tem várias aplicações na indústria química e farmacêutica, sendo utilizado na revelação de fotografias e impressão a tinta. Pode ser aplicado como verificador de estabilidade de corantes naturais e como substância antioxidante nos alimentos.

CHANDINI et al. (2013) ultrafiltraram o chá preto em uma membrana de peso molecular de corte igual a 25 kDa e obtiveram uma redução da galato de (-) – epigalocatequina de 70,81% e para a (-) – epigalo catequina de 67,98%. Para CHANDINI et al. (2013) o auto índice de rejeição desses compostos não está associado ao tamanho do poro, e sim a formação de torta na superfície da membrana causada por moléculas maiores, como as proteínas.

Para o chá branco, os compostos que apresentaram menor redução foram: a catequina com 18,51% e o ácido gálico com 26,01%. Este chá dentre os três foi o que apresentou menor concentração de todos os bioprodutos analisados.

A análise estatística dos resultados de concentração de catequinas, cafeína e ácido gálico mostrou que há diferença significativa entre as concentrações de catequina, cafeína e ácido gálico dos dois chás.

Na Tabela 4.18 estão apresentados os resultados obtidos para a análise de estabilidade dos permeados de ultrafiltração utilizando ultrassom com membrana de 30 kDa para os chás preto e branco.

Tabela 4.18 – Análise de estabilidade para os permeados de ultrafiltração com ultrassom para a membrana de 30 kDa dos chás preto e branco.

Chá	Fenólicos ($mg_{AG}L^{-1}$)				Turbidez (NTU)				Intensidade de cor (ABS)			
	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 30	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 30	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 30
Preto	313,52 _a ±12,45	310,59 _a ±14,09	312,73 _a ± 11,43	312,9 _a ± 13,49	4,8 _a ±1,6	4,6 _a ±1,0	4,8 _a ±1,2	4,8 _a ±1,2	0,415 _a ±0,005	0,412 _a ±0,02	0,411 _a ±0,003	0,412 _a ±0,007
Branco	184,72 _b ±9, 87	183,16 _b ± 9,15	183,99 _b ± 9,88	183,15 _b ±9,96	1,4 _b ±0,4	1,3 _b ±0,5	1,3 _b ±0,8	1,3 _b ±0,9	0,104 _b ±0,001	0,101 _b ±0,001	0,103 _b ±0,001	0,103 _b ±0,02

Os valores médios, indicados por uma letra com número diferente ao longo de uma coluna, são significativamente diferentes para teste de Tukey com nível de significância igual 5%.

Pode-se observar pela Tabela 4.18 que os permeados dos chás preto e branco são estáveis, ou seja, a turbidez, a concentração de fenólicos e a intensidade de cor pouco variaram entre uma análise e outra. CHANDINI et al (2013) para o permeado de chá preto para uma membrana com peso molecular de corte de 25 kDa obtiveram um valor de turbidez de 0,12 NTU no primeiro dia de análise e 0,83 NTU após 30 dias. Apesar dos resultados de turbidez deste trabalho serem 40 vezes maior que os encontrados por CHANDINI et al (2013) eles ainda estão dentro da faixa de estabilidade que é 4 NTU. CHANDINI et al (2013) assim como neste trabalho não observaram a formação de *tea cream* para os permeados de ultrafiltração de chá preto. Neste trabalho, o chá branco também não apresentou formação de *tea cream* mesmo após 30 dias sob refrigeração.

A análise estatística dos resultados de estabilidade mostrou que há diferença significativa entre os parâmetros analisados para o chá preto e branco

4.5 Análises do fluxo

Através dos valores de fluxo, foi possível observar o comportamento do fluxo em função do tempo para cada processo de filtração estudado. Além disso, foi possível calcular as resistências de cada membrana e quais mecanismos de *fouling* foram responsáveis pelo decaimento do fluxo.

As permeabilidades das membranas de microfiltração de porosidade 0,8, 0,3 e 0,22 μm são 6.525,9 , 4.147,9 e 2.188,66 $\text{kg m}^{-2} \text{h}^{-1} \text{bar}^{-1}$ respectivamente. Para as membranas de ultrafiltração de 30, 20, 10 e 5 kDa, as permeabilidades são 74,82, 48,64, 46,60 e 40,47 $\text{kg m}^{-2} \text{h}^{-1} \text{bar}^{-1}$ respectivamente. Os gráficos que foram utilizados para o cálculo desses valores podem ser visto nas Figuras F.1 a F.7 no Anexo F.

4.5.1 Comportamento do fluxo em função do tempo de operação

O comportamento do fluxo de chá verde para os processos de micro e ultrafiltração então expostos na Figura 4.12.

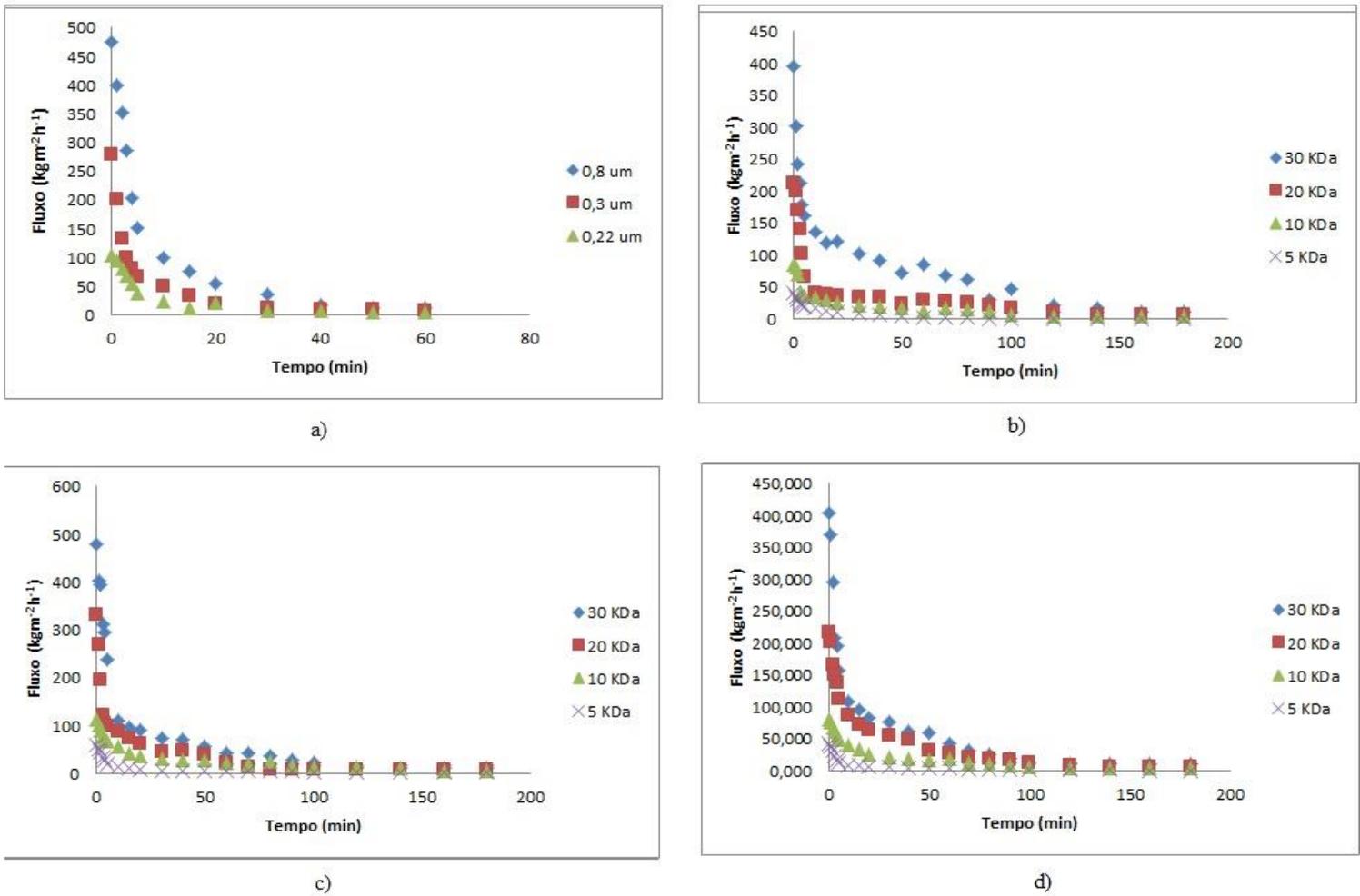


Figura 4.12 – Comportamento do fluxo de chá verde em função do tempo para: a) microfiltração, b) ultrafiltração convencional, c) ultrafiltração utilizando o ultrassom e d) ultrafiltração utilizando campo eletromagnético.

Pela Figura 4.12 nota-se que para as membranas de 10 e 5 kDa o fluxo diminui suavemente, diferentemente das membranas mais abertas que é possível notar uma queda brusca do fluxo nos primeiros 40 min. Isso ocorre, pois o peso molecular de alguns componentes do chá verde são maiores que 10 kDa, por isso a torta forma-se quase que instantaneamente, o que resultou em um baixo fluxo inicial destas membranas, comparadas com as demais (RAO et al. 2011).

CAI et al. (2014) estudaram mecanismos para a melhoria da ultrafiltração e para a limpeza de membranas. O material das membranas estudadas foi de poliétersulfona com peso molecular de corte de 30 kDa. Por essa membrana, foi permeado uma solução de *dextran* em uma concentração de 3 gL⁻¹. CAI et al. (2014) observaram um aumento no fluxo de 9 a 12%

utilizando o ultrassom. Esse aumento no fluxo foi observado para frequências de 28 e 45 KHz. Para a frequência de 100 KHz não foi observado nenhum efeito no fluxo. No trabalho de CAI et al. (2014) os resultados experimentais mostraram que para a frequência de 28 KHz o fluxo foi maior que para a frequência de 45 KHz a pressões baixas, particularmente a 1,2 bar. De acordo CAI et al. (2014) o aumento no fluxo está associado ao fato de o ultrassom ter diminuído a resistência total da membrana.

O valor do fluxo estabilizado de chá verde no processo convencional para este trabalho foi de $9,89 \text{ kg m}^{-2} \text{ h}^{-1}$. RAO et al. (2011) encontraram um valor de fluxo estabilizado para o chá verde em uma membrana de 30 kDa de aproximadamente $12,5 \text{ kg m}^{-2} \text{ h}^{-1}$.

Neste trabalho, de acordo com a Figura 4.12, utilizando ultrassom com frequência de 40 Hz, houve um aumento no fluxo de 12,24%. Resultado similar daquele encontrado no trabalho de CAI et al. (2014). Foi observado durante o processo aplicando o ultrassom que a temperatura do banho ultrassônico aumentou, indo de 28 a 38°C. O comportamento da temperatura do banho em função do tempo de filtração pode ser visto na Figura G.1 no Anexo G.

No trabalho de AGHDAM et al. (2015) os autores estudaram o efeito do ultrassom em diferentes mecanismos de *fouling* durante a clarificação por membranas do suco de romã e além de analisarem o comportamento do fluxo do permeado utilizando o ultrassom, eles avaliaram o efeito do aumento da temperatura causado pelo banho ultrassônico sobre o fluxo e concluíram que o aumento do fluxo no permeado esta em parte associado ao aumento da temperatura.

Neste trabalho, foi feito uma ultrafiltração convencional utilizando uma membrana de 30 kDa de peso molecular de corte na temperatura de 38°C (temperatura na qual o banho ultrassônico alcança durante as 3 h de processo). O valor de fluxo estabilizado para este processo foi de $10,45 \text{ kgm}^{-2} \text{ h}^{-1}$, enquanto que para o processo convencional foi de $9,89 \text{ kgm}^{-2} \text{ h}^{-1}$, ou seja, a temperatura causou um aumento no fluxo de 5,69%. Como já foi dito, o uso do ultrassom aumentou em 12,24% o valor do fluxo estabilizado, dessa forma, pode-se concluir que a temperatura também influencia no aumento do fluxo, porém o ultrassom é responsável pela maior parcela de contribuição.

O fluxo estabilizado para o processo de ultrafiltração aplicando campo eletromagnético apresentou uma redução de 1,67%. Neste trabalho, o campo eletromagnético foi utilizado de maneira intermitente, por causa disso é muito provável que não se tenha observado mudanças mais significativas uma vez que DARESTANI et al. (2014) ao submeter

membranas de diferentes composições e porosidades a um campo elétrico antes do processo de ultrafiltração observaram que o fluxo do permeado para membranas de poliétersulfona diminui em relação ao fluxo de permeado da membrana sem nenhum tratamento. De acordo com DARESTANI et al. (2014) este resultado sugere que um intenso campo elétrico diminui a permeabilidade hidráulica da membrana e aumenta o poder de rejeição da mesma.

4.5.2 Cálculo das resistências

O cálculo das resistências foi feito apenas para os processos de ultrafiltração, uma vez que, ao abrir o módulo de batelada para fazer a limpeza física das membranas de microfiltração elas rasgavam. Os resultados obtidos para os experimentos estão expostos na Tabela 4.19.

Tabela 4.19 – Resistências obtidas para os processos de ultrafiltração convencional, utilizando ultrassom e utilizando campo eletromagnético.

<i>Experimento</i>	<i>Convencional</i>				<i>Ultrassom</i>				<i>Campo eletromagnético</i>			
	Resistências (10^{13} m^{-1})											
Peso molecular de corte (kDa)	R_M	R_C	R_P	R_T	R_M	R_C	R_P	R_T	R_M	R_C	R_P	R_T
30	0,58	6,13	1,47	8,18	0,58	4,93	0,76	6,27	0,58	4,92	2,22	7,72
20	0,99	13,58	3,20	17,78	0,99	7,16	2,05	10,20	0,99	10,83	4,74	16,56
10	2,46	21,30	5,32	29,10	2,46	10,35	3,23	16,04	2,46	14,27	6,73	23,46
5	3,64	30,91	7,94	42,49	3,64	22,74	5,88	32,26	3,64	26,43	10,84	40,91

Sendo que R_M é a resistência hidráulica; R_C é a resistência devido à formação de torta; R_P é a resistência devido ao entupimento dos poros e R_T é a resistência total.

Analisando a Tabela 4.19 observa-se que quanto menor o peso molecular de corte da membrana, maior a sua resistência (R_M , R_C , R_P e R_T).

A resistência hidráulica para todos os processos é a mesma, pois este valor está diretamente relacionado com a permeabilidade hidráulica da membrana. A permeabilidade hidráulica é uma característica inerente à membrana, por isso ela se mantém a mesma para todos os processos (HABERT, 2006; DIEL 2010).

Nota-se pela Tabela 4.19 que a resistência que possui a maior contribuição é a resistência da torta (R_C) representando cerca de 70% em relação à resistência total (R_T).

Comparando o processo aplicando ultrassom com o processo convencional, observa-se uma redução nas resistências R_C (de 19,57 a 51,41%), R_P (de 25,94 a 48,30%) e R_T (de 23,35 a 44,89%). Para a R_C foi observada a maior redução, chegando a 51,41%, isso mostra que a aplicação do ultrassom diminuiu a resistência provocada pela formação de torta.

No trabalho de AGHDAM et al. (2015) os autores estudaram o efeito do ultrassom em diferentes mecanismos de *fouling* durante a clarificação por membranas do suco de romã e puderam perceber, por análise microscópica, que a torta formada na ultrafiltração sem o uso do ultrassom era cerca de 4 vezes maior do que aquela utilizando o ultrassom.

Comparando o processo aplicando campo eletromagnético com o processo convencional, observa-se uma redução nas resistências R_C (14,49 a 33,00%) e na R_T (3,72 a 19,38%). Para a R_P foi observado um aumento em relação ao R_P do processo convencional que variou de 20,95 a 33,78%.

DARESTANI et al. (2014) submetem membranas de diferentes composições (incluindo membranas de poliétersulfona) e porosidades a um campo elétrico antes do processo de ultrafiltração. DARESTANI et al. (2014) analisaram microscopicamente as membranas após serem submetidas ao campo elétrico e perceberam a redução do tamanho do poro, aumentando o poder de rejeição da membrana. De acordo com DARESTANI et al. (2014) aumentando o poder de rejeição, é esperado que a resistência total após o processo de filtração aumente, uma vez que uma quantidade maior de moléculas ficará retida na membrana.

4.5.3 Estimativa do mecanismo responsável pelo *fouling* das membranas

As Figuras 4.13 a 4.17 apresentam os dados de fluxos experimentais e calculados de acordo com o tempo de filtração para micro e ultrafiltração de extrato de chá verde com

membranas de diferentes tamanhos de poros e peso molecular de corte. As curvas calculadas foram obtidas de acordo com os modelos propostos por HERMIA (1982) e FIELD et al. (1996) para micro e ultrafiltração, respectivamente. Os valores de n foram fixados para representar cada mecanismo de *fouling* sendo: $n = 0$ para a formação de torta, $n = 1$ para o bloqueio intermediário dos poros, $n = 1,5$ para bloqueio interno dos poros e $n = 2$ para o bloqueio completo dos poros.

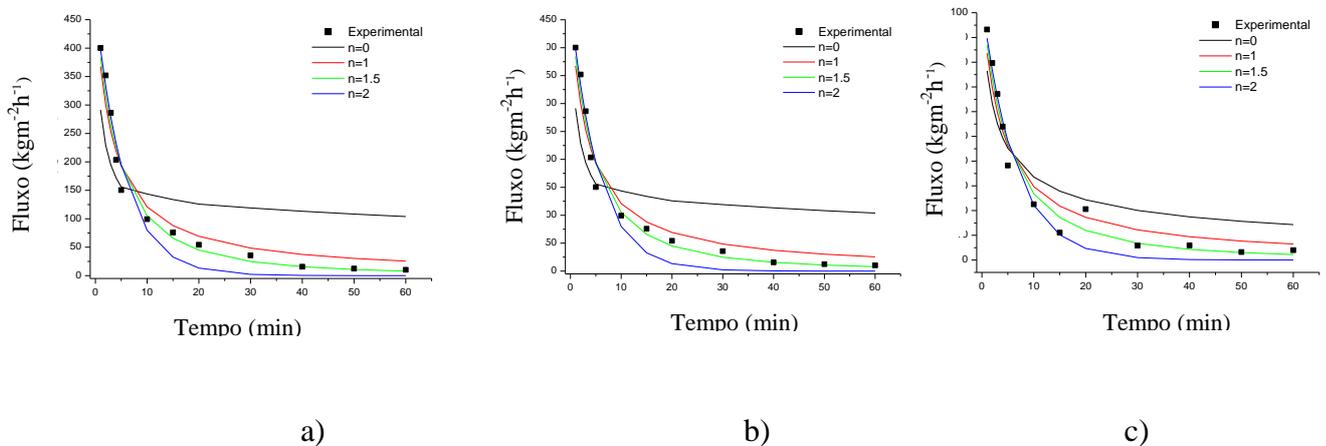


Figura 4.13 – Fluxo experimental e calculado para a microfiltração do extrato de chá verde para membranas com porosidade: a) 0,8 , b) 0,3 e c) 0,22 μm .

A Figura 4.13 apresenta os dados de fluxo da microfiltração para um processo tipo *dead-end*. O modelo de formação de torta ($n = 0$) não ajustou satisfatoriamente o fluxo dos dados experimentais para as membranas mais abertas (0,8 e 0,3 μm , as Figuras 4.13 (a) e 4.13 (b), respectivamente). Para estas duas membranas, o declínio do fluxo inicial foi descrito por todos os outros mecanismos de *fouling* e o fluxo estabilizado foi melhor ajustado pelo modelo de bloqueio interno dos poro ($n = 1,5$). O mecanismo de *fouling* da membrana de 0,22 μm (Figura 4.13 (c)) apresentou um comportamento semelhante, exceto pelo fato de que a diminuição do fluxo inicial foi também ajustada pelo modelo de formação de torta. Os tamanhos das moléculas que compõe o extrato de chá verde são menores do que o tamanho dos poros dessas membranas e, assim, o comportamento do fluxo foi melhor descrito pelos modelos de bloqueio dos poros do que pela formação de torta. Uma vez que o tamanho dos poros da membrana diminuem (de 0,8 para 0,22 μm) a formação de torta torna-se mais pronunciada.

As Figuras 4.14 a 4.17 mostram que a diminuição do fluxo inicial foi descrito por todos os mecanismos de *fouling* para a ultrafiltração convencional (Figuras 4.14 a 4.17 (a)), ultrafiltração com ultrassom (Figuras 4.14 a 4.17 (b)) e ultrafiltração com campo eletromagnético (Figuras 4.14 a 4.17 (c)). Para todos os processos de ultrafiltração, o fluxo estabilizado não foi descrito apenas pelo modelo de formação de torta ($n = 0$). No entanto, o modelo de formação de torta foi o único mecanismo que descreveu a mudança na diminuição do fluxo para o comportamento do fluxo estabilizado. A extensão dessa mudança foi menor ou excluída, dependendo do peso molecular de corte da membrana, nos experimentos com ultrassom e de campo eletromagnético.

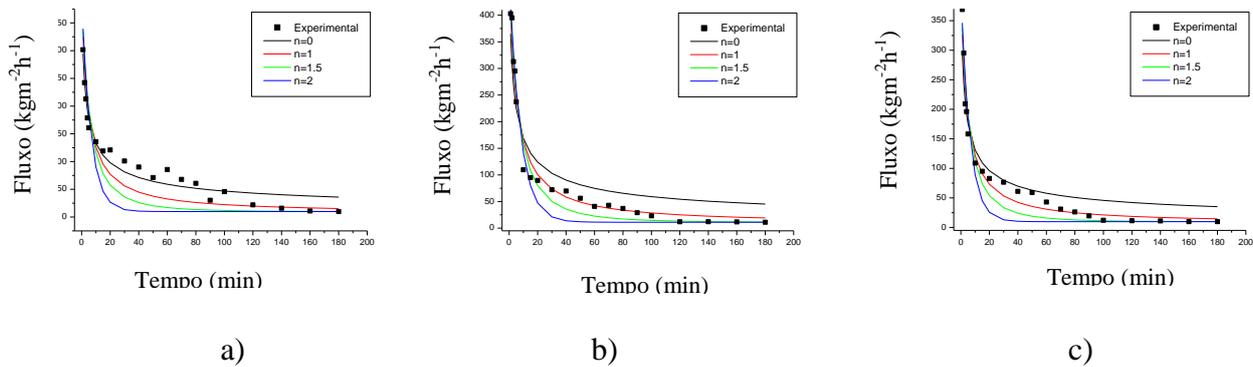


Figura 4.14 - Fluxo experimental e calculado para a ultrafiltração de chá verde para membranas com peso molecular de corte igual 30 kDa para a) convencional, b) com ultrassom e c) com campo eletromagnético.

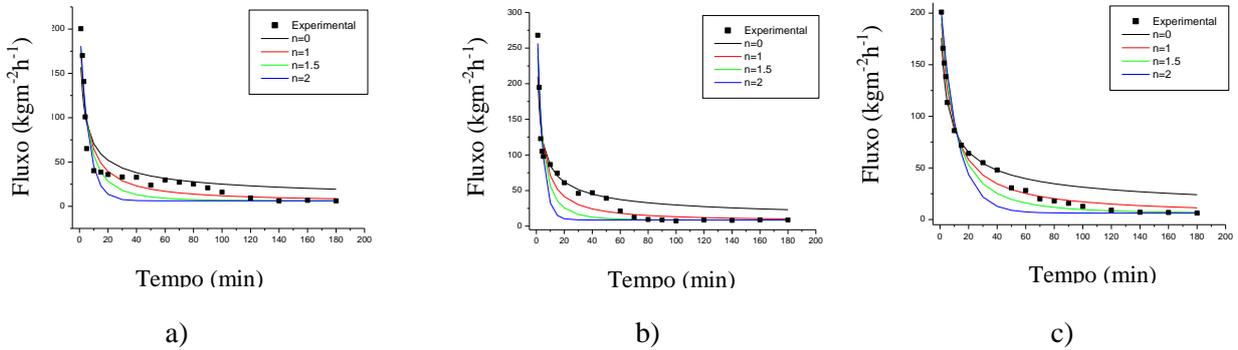


Figura 4.15 - Fluxo experimental e calculado para a ultrafiltração de chá verde para membranas com peso molecular de corte igual 20 kDa para a) convencional, b) com ultrassom e c) com campo eletromagnético.

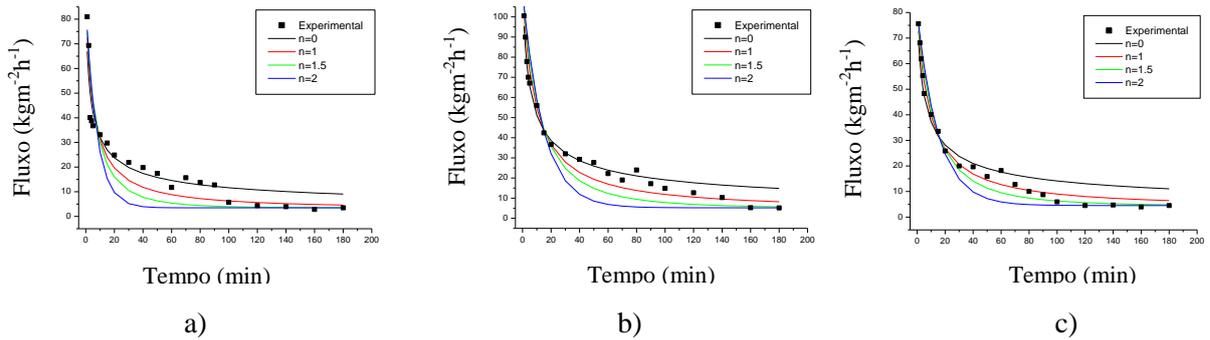


Figura 4.16 - Fluxo experimental e calculado para a ultrafiltração de chá verde para membranas com peso molecular de corte igual 10 kDa para a) convencional, b) com ultrassom e c) com campo eletromagnético.

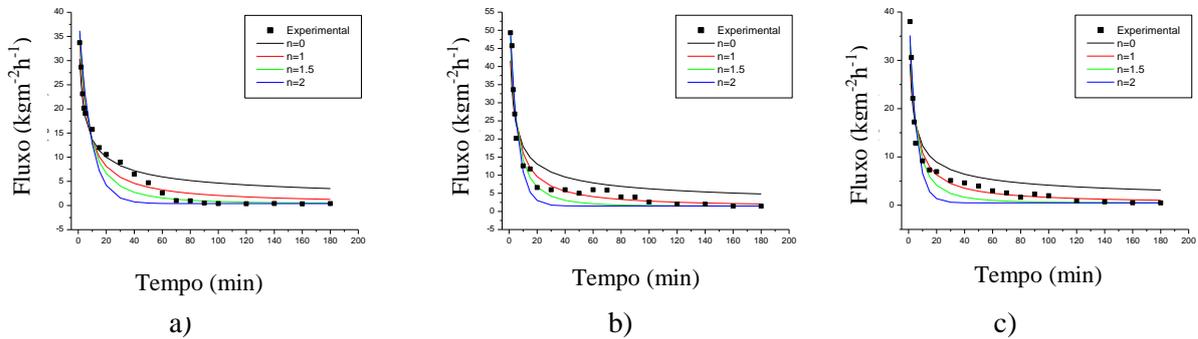


Figura 4.17 - Fluxo experimental e calculado para a ultrafiltração de chá verde para membranas com peso molecular de corte igual 5 kDa para a) convencional, b) com ultrassom e c) com campo eletromagnético.

No trabalho de AGHDAM et al. (2015) os autores estudaram o efeito do ultrassom em diferentes mecanismos de *fouling* durante a clarificação por membranas do suco de romã. AGHDAM et al. (2015) desenvolveram modelos que indicaram que na ausência de ultrassom o mecanismo de formação de torta não se altera até o fim do processo de filtração. No entanto AGHDAM et al. (2015) afirmaram que na presença de ultrassom a formação de torta é o principal mecanismo de incrustação nas fases iniciais do processo de filtração, e é alterada para outros mecanismos como, bloqueio dos poros, nos últimos estágios do processo.

CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES

A partir dos ensaios realizados durante o decorrer deste trabalho foi possível concluir que:

Quanto à temperatura e tempo de extração do chá verde:

A melhor temperatura de extração para os compostos fenólicos foi de 75 °C, visto que, temperaturas superiores podem decompor estes compostos, e temperaturas muito brandas como 30°C não extraem os mesmos;

Para a temperatura de 75°C é necessário manter o chá sob processo de infusão por pelo menos 60 min, pois foi neste tempo que a concentração de compostos fenólicos passou a ser constate.

Quanto aos pré-tratamentos para o chá verde:

O melhor pré-tratamento foi a coagulação com quitosana uma vez que utilizando concentração de quitosana igual a 100 ppm houve uma redução de 56,22% na concentração de sólidos, porém não concentrou os fenólicos, não sendo utilizado posteriormente.

Quanto à aplicação de membranas de microfiltração para clarificação do chá verde:

O processo de microfiltração utilizando membranas se mostrou eficiente para a clarificação do chá verde uma vez que para a membrana de 0,22 µm foi observada uma redução de 95,42% da turbidez e de 19,97% na concentração de sólidos.

A membrana utilizada como pré-tratamento para a ultrafiltração foi a membrana de 0,8 µm de porosidade, pois além de reduzir a turbidez e a concentração de sólidos foi a membrana que apresentou menor redução da concentração dos compostos fenólicos (3,78%) e apresentou maior valor de fluxo estabilizado (10,27 kg/m²h).

Quanto à aplicação de membranas de ultrafiltração para o processo de purificação do chá verde:

A membrana de 30 kDa foi a que apresentou maior permeação dos compostos fenólicos, este valor foi de 42,21% em relação à alimentação. Os resultados do concentrado mostraram que 90% das proteínas e que 68,25% dos sólidos da alimentação ficaram retidos no concentrado. Dessa forma, o processo de ultrafiltração foi capaz de produzir um permeado clarificado e purificado. Em relação às catequinas, a porcentagem de EGCG no permeado foi de 39,55% em relação a alimentação.

Quanto à aplicação de ultrassom e campo eletromagnético no processo de ultrafiltração do chá verde:

O uso do ultrassom no processo de ultrafiltração aumentou o valor do fluxo estabilizado, aumentou a concentração de fenólicos totais em 35,11% e diminuiu a concentração de sólidos no permeado em 14,13%. Além disso, a concentração de todas as catequinas aumentaram no permeado, esse aumento foi superior a 25% para o galato de (-) – epigalo catequina e para ácido gálico.

O uso do campo eletromagnético no processo de ultrafiltração diminuiu o valor do fluxo estabilizado e aumentou a concentração de fenólicos totais em 8,48%, porém aumentou a concentração de sólidos no permeado em 3,94%.

Quanto à estabilidade e formação de *tea cream* dos permeados de chá verde:

Os permeados obtidos nos processos de microfiltração não formaram soluções estáveis, uma vez que quando armazenados sob refrigeração (30 dias) apresentam valores de turbidez superior a 4 NTU. Além disso os valores de concentração de fenólicos foram diminuindo com o passar dos dias. Para todos os permeados foi observada a formação de *tea cream* principalmente para o permeado da membrana mais aberta, com porosidade igual a 0,8 μm , que chegou a 75,24%.

Os processos de ultrafiltração utilizando membranas de peso molecular de corte de 30, 20, 10 e 5 kDa, obtiveram permeados estáveis, com valores de turbidez próximo de 4 NTU e a concentração de fenólicos permaneceu constante após 30 dias sob refrigeração. Para todos os permeados não foi observada a formação de *tea cream*.

Quanto à comparação entre os chás verde, preto e branco:

O chá verde foi o que apresentou maior concentração para a maioria das catequinas, principalmente para o galato de (-) – epigalo catequina chegando a ser 30 vezes maior que para os demais chás. Além disso, o somatório das catequinas analisadas para o chá verde chegou a ser duas vezes maior que para os demais chás.

O chá preto foi o que apresentou maior concentração de sólidos totais e este resultado pode estar relacionada ao fato de a sua granulometria ser mais fina que os demais chás.

Para o processo de ultrafiltração com membrana de 30 kDa aplicando ultrassom para os chás preto e branco, houve uma redução de aproximadamente 50% para todos os bio produtos do chá preto.

Para o chá branco, os compostos que apresentaram menor redução foram: a catequina com 18,51% e o ácido gálico com 26,01%. Este chá dentre os três foi o que apresentou menor concentração de todos os bioprodutos analisados.

Os permeados de chá preto e chá branco permaneceram estáveis sob refrigeração durante 30 dias e não foi observada a formação de *tea cream*.

Quanto às resistências dos processos de ultrafiltração para o chá verde:

A resistência que apresentou a maior contribuição para o decaimento do fluxo em todos os processos foi a resistência da torta (R_C) representando cerca de 70% em relação à resistência total (R_T).

Comparando o processo aplicando ultrassom com o processo convencional, observou-se uma redução para todas as resistências. Para a R_C foi observada a maior redução, chegando a 51,41%, isso mostra que a aplicação do ultrassom é um processo eficiente para redução da formação de torta.

Comparando o processo aplicando campo eletromagnético com o processo convencional, observa-se uma redução nas resistências R_C na R_T . Para a resistências dos poros (R_P) foi observado um aumento em relação ao R_P do processo convencional de até 33,78%.

Quanto ao mecanismo de *fouling* para os processos de ultrafiltração do chá verde:

Para as membranas de microfiltração de 0,8 e 0,3 μm de porosidade, o declínio do fluxo inicial foi descrito por todos mecanismos de *fouling* exceto pelo modelo de formação de torta ($n = 0$) e o fluxo estabilizado foi melhor ajustado pelo modelo de bloqueio interno dos poro ($n = 1,5$).

Para todos os processos de ultrafiltração, o fluxo estabilizado não foi descrito apenas pelo modelo de formação de torta ($n = 0$). No entanto, o modelo de formação de torta foi o único mecanismo que descreveu a mudança na diminuição do fluxo para o comportamento do fluxo estabilizado. A extensão dessa mudança foi menor ou excluída, dependendo do peso molecular de corte da membrana, nos experimentos com ultrassom e de campo eletromagnético.

Por fim, conclui-se que o processo de microfiltração deve ser utilizado como pré-tratamento para redução da concentração de sólidos totais e em seguida utilizar o permeado microfiltrado como alimentação no processo de ultrafiltração. O processo de ultrafiltração com ultrassom foi efetivo para o aumento do fluxo estabilizado e concentração, sendo que para a membrana de 20 kDa o permeado apresentou maior estabilidade frente a formação de *tea cream*, maior fluxo estabilizado e concentração de fenólico.

Sugestões

Para trabalhos futuros pode-se deixar como sugestões:

- utilizar como solvente no processo de extração álcool de cereais, visto que este é um composto orgânico, que como os demais álcoois deve possuir afinidade por compostos fenólicos e não compromete o extrato final, pois mesmo que apresentar alguns resquício deste, ele não é tóxico quando ingerido;
- utilizar o ultrassom durante o processo de extração. A agitação e o aumento da temperatura fornecidas pelo ultrassom pode auxiliar na extração dos compostos fenólicos;
- aplicar o ultrassom no processo de ultrafiltração controlando a temperatura do banho ultrassônico;

- aplicar campo eletromagnético de forma contínua;
- aplicar campo magnético.

Anexo A

Procedimento utilizar para operar o Convergence Inspector Minos.

- 1° - Ligar o computador e o Inspector Minos. A senha de usuário é: osmo.
- 2° - Na tela principal (Figura A.1) clicar duas vezes no ícone em destaque.

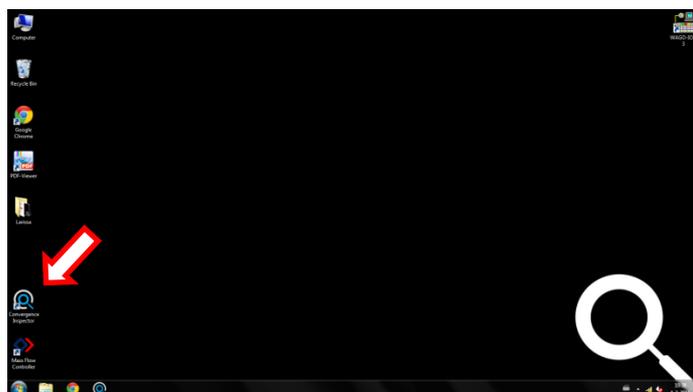


Figura A.1 – Como iniciar o programa inspector minos.

- 3° - Fazer login na opção guest user Figura A.2.

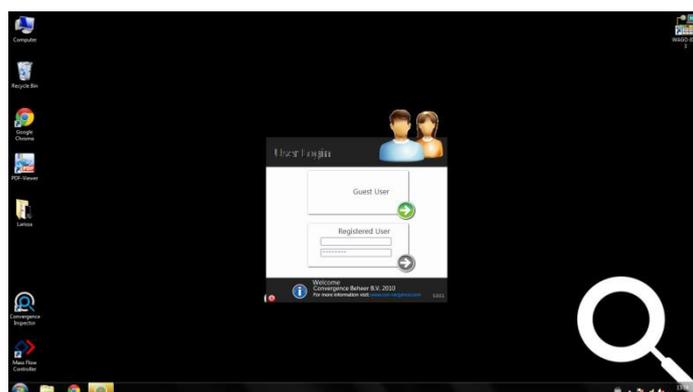
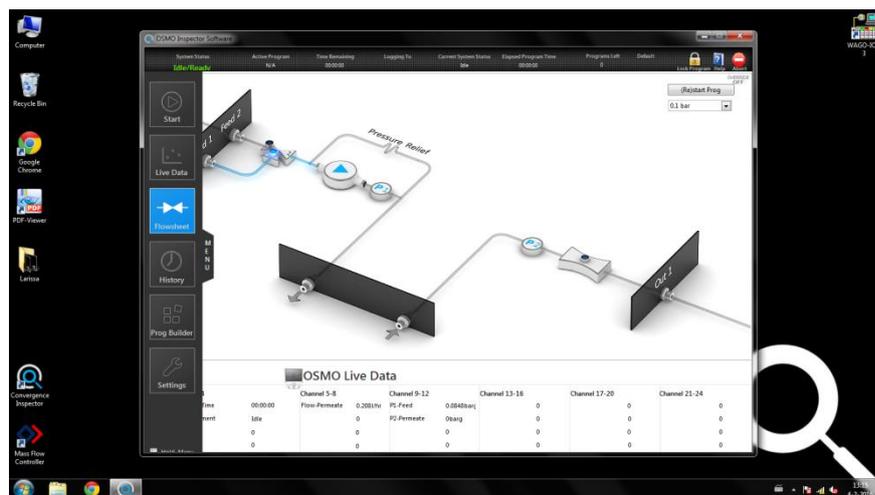
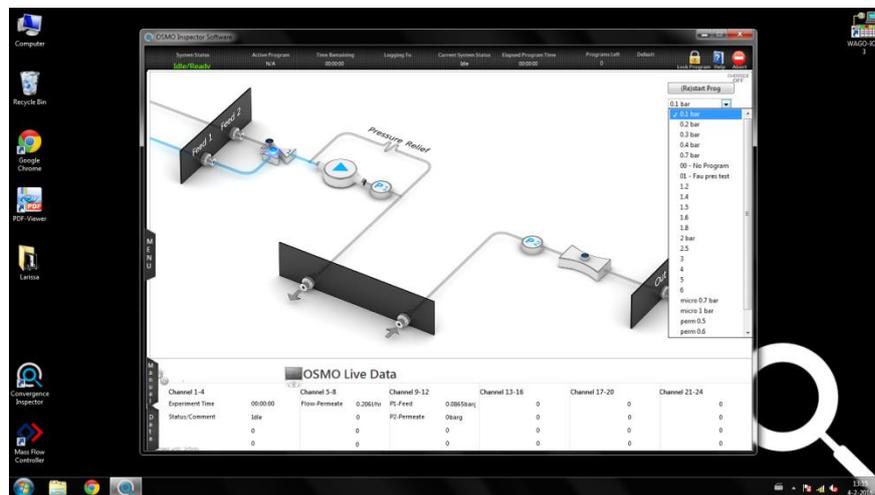


Figura A.2 – Escolha do usuário.

4º - Para iniciar um programa basta ir em menu, em seguida selecionar *flow sheet* (em azul) e no canto superior direito estarão varias opções de programas, basta escolher um deles (Figura A.3 a e b). Para realizar alterações no programa como pressão e tempo de operação, basta selecionar menu, em seguida *prog builder*, abrir qualquer programa em open Osmo program e alterar os valores das linhas destacadas (Figura A.4). A primeira linha em vermelho altera os valores das pressões (bar) de operação e a segunda linha em azul altera o tempo (s) de operação.



a)



b)

Figura A.3 – Como escolher um programa e coloca-lo em funcionamento.

Anexo B

Curva de calibração para a metodologia 1 para concentração de fenólicos

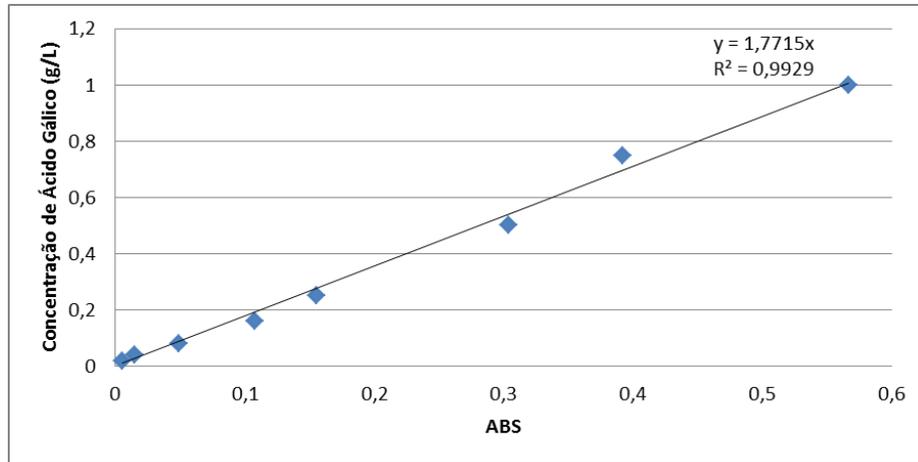


Figura B.1 – Curva de calibração obtida para a metodologia 1 de concentração de fenólicos totais.

Anexo C

Procedimento para construção da curva de calibração para cálculo da concentração de proteína.

Reativos:

a) Reativo A: 2 g de Carbonato de Sódio (Na_2CO_3) seco e 0,02 g de Tartarato Duplo de Sódio e Potássio em 100 mL de solução de Hidróxido de Sódio (NaOH) 0,1N (padronizada);

b) Reativo B: 0,5 g Sulfato de Cobre (CuSO_4) + 2 gotas de Ácido Sulfúrico (H_2SO_4) concentrado em 100mL de água destilada;

c) Solução AB: 50 mL A + 1 mL B. Preparar imediatamente antes da dosagem.

d) Reativo de Folin: Solução 1N, conservar ao abrigo da luz;

e) Solução Padrão de Soro Albumina Bovina (BSA) 100 mg.L⁻¹: 100 mg BSA (0,1 g) em 1000 mL de água destilada, adicionar cuidadosamente água no balão volumétrico para evitar a formação de bolhas. Conservar sob refrigeração.

Procedimento experimental

Curva padrão

- Preparar uma série de amostras a partir da solução padrão de BSA, contendo a concentração de proteínas indicadas na Tabela C.1.
- De cada tubo de ensaio (1 a 11) pipetar, em triplicata 1 mL da solução de proteína a dosar.
- Adicionar 3 mL da solução AB. Tampar os tubos, agitar e esperar 10 min (precisos) ao abrigo da luz.
- Adicionar 0,3 mL do reativo de Folin 1N. Tampar os tubos, agitar e deixar 30 min em repouso ao abrigo da luz.
- Efetuar a leitura em espectrofotômetro a 760nm.

Tabela C.1. Construção da Curva Padrão de Proteínas

<i>Tubo</i>	<i>Concentração da solução BSA (mg.L⁻¹)</i>	<i>Volume da solução BSA (ml)</i>	<i>Volume de água (ml)</i>
1	0	0,0	1,0
2	10	0,1	0,9
3	20	0,2	0,8
4	30	0,3	0,7
5	40	0,4	0,6
6	50	0,5	0,5
7	60	0,6	0,4
8	70	0,7	0,3
9	80	0,8	0,2
10	90	0,9	0,1
11	100	1,0	0,0

A curva de calibração para o teste de proteína é a mostrada na Figura C.1

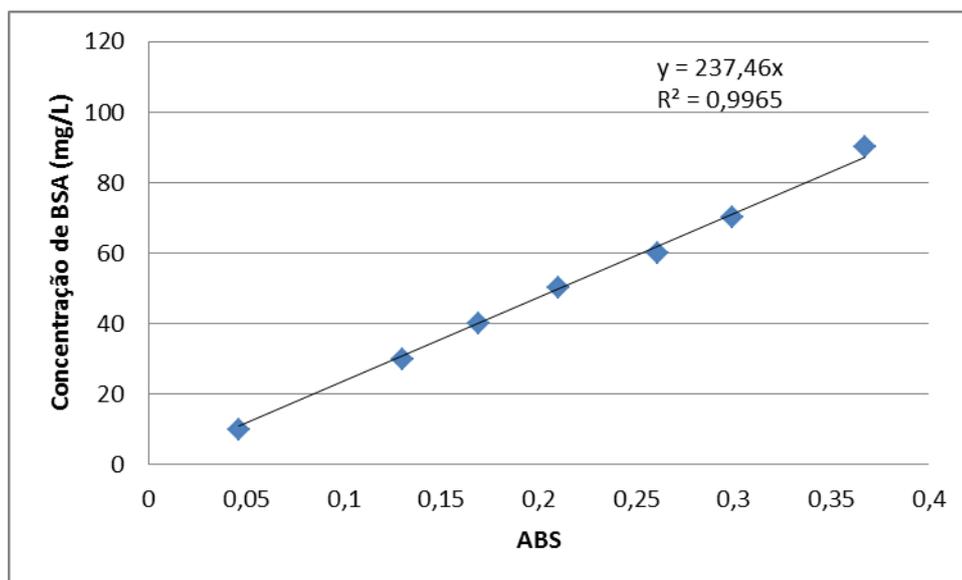


Figura C.1 – Curva de calibração para concentração de proteína.

Anexo D

Curvas de calibração dos padrões utilizados para leitura no HPLC

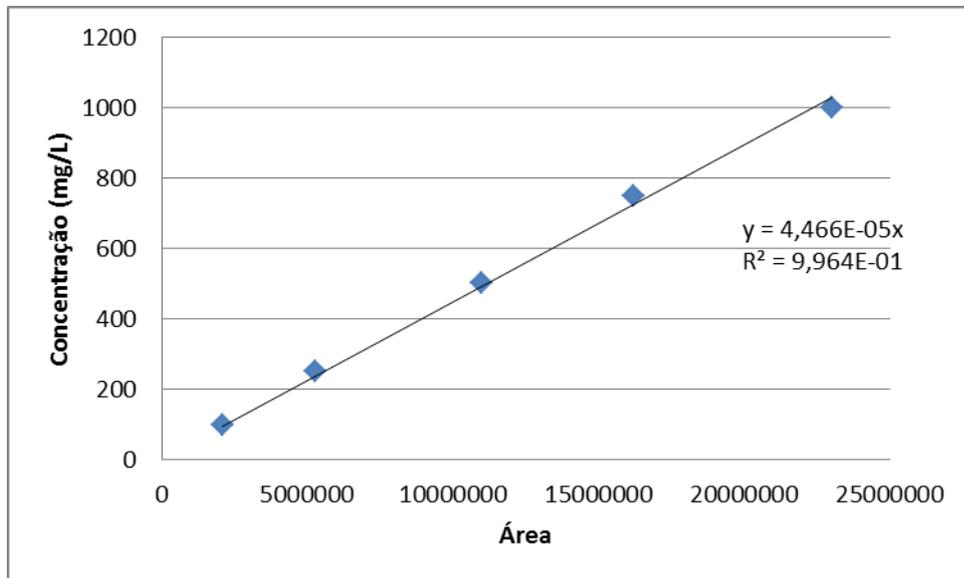


Figura D.1 – Curva de calibração para o padrão Galato de (-) – epigallocatequina (EGCG).

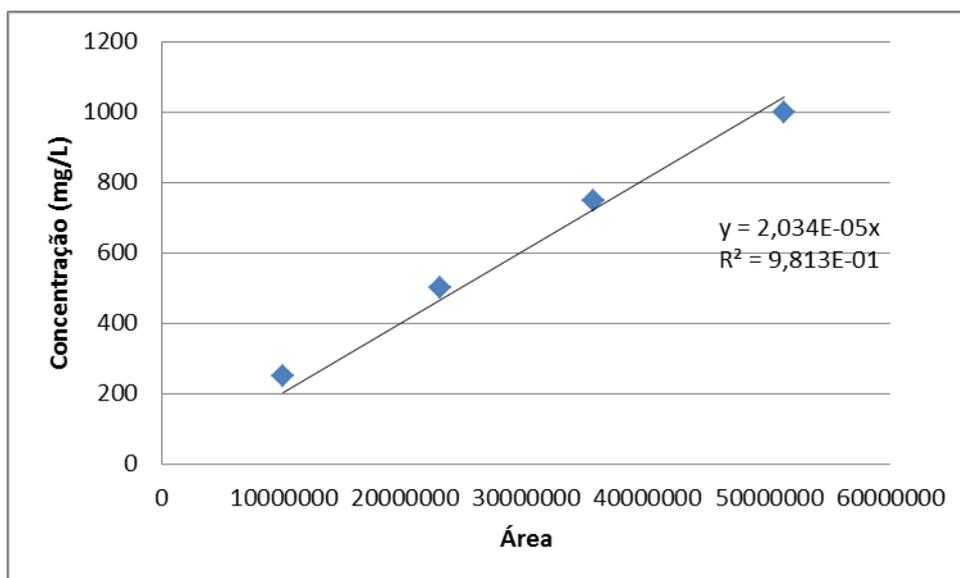


Figura D.2 – Curva de calibração para o padrão Cafeína.

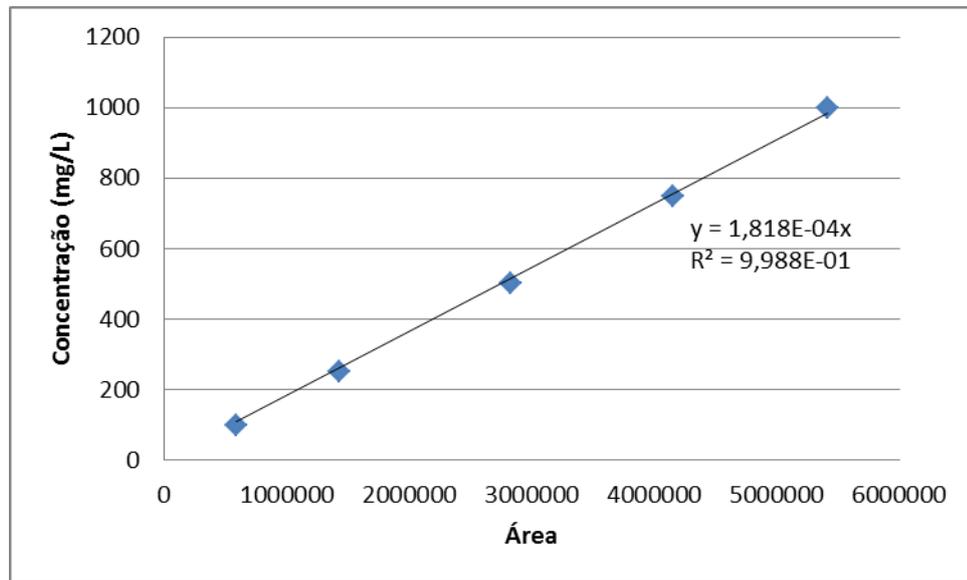


Figura D.3 – Curva de calibração para o padrão Epicatequina (EC).

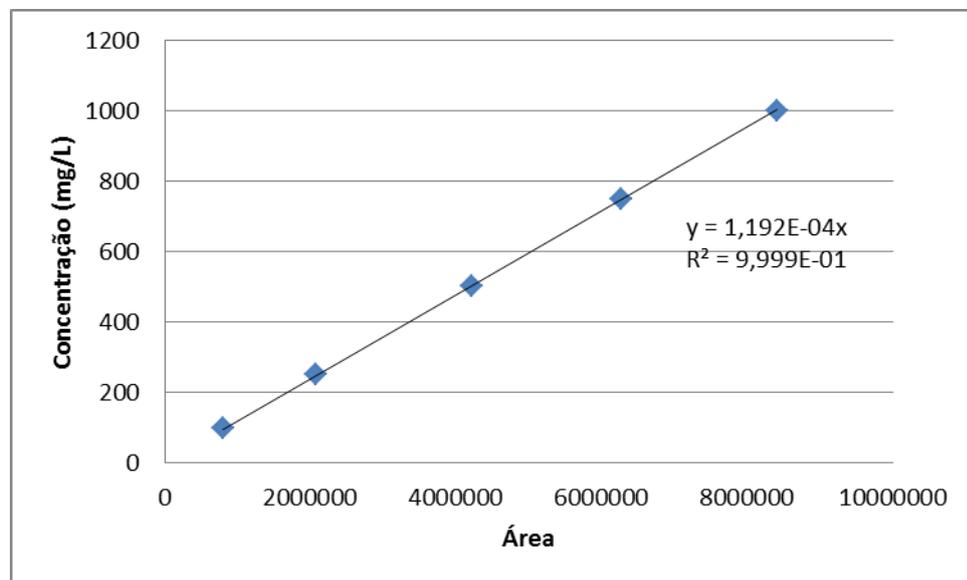


Figura D.4 – Curva de calibração para o padrão Catequina (C).

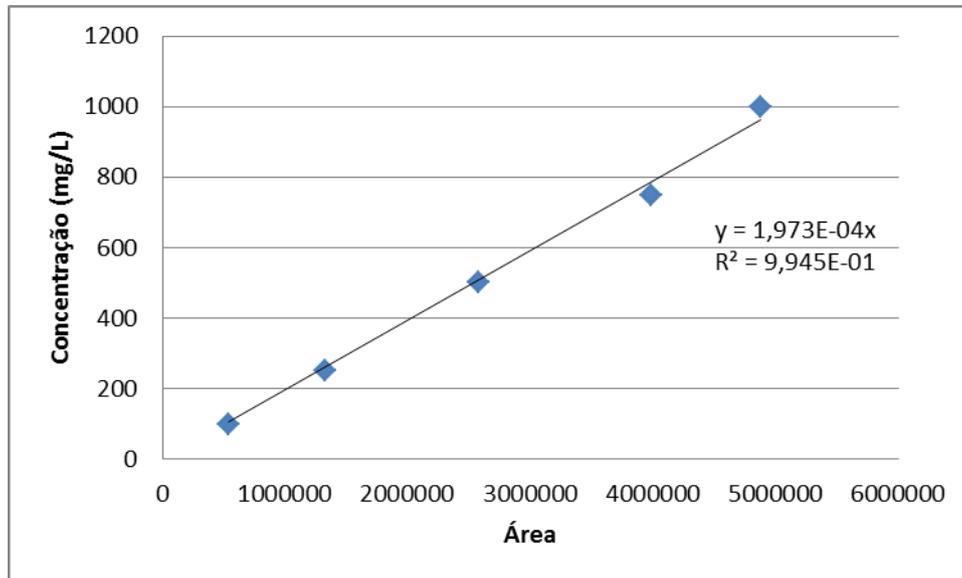


Figura D.5 – Curva de calibração para o padrão Epigalocatequina (EGC).

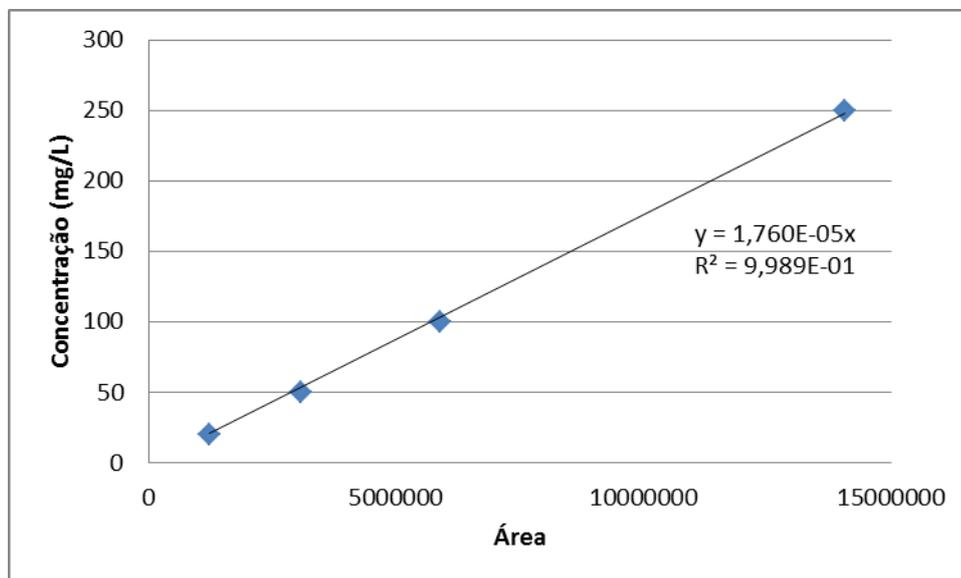


Figura D.6 – Curva de calibração para o padrão Ácido Gálico.

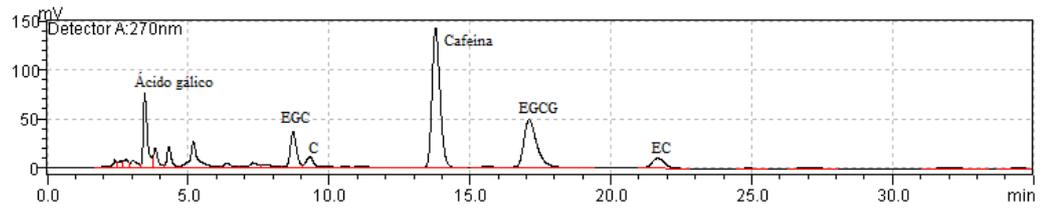


Figura D.7 –Gráfico característico para as catequina, ácido gálico e cafeína obtido no HLPC para o extrato de chá verde.

Anexo E

As Tabelas E.1 a E.4 apresentam os parâmetros avaliados para a estabilidade dos permeados da microfiltração e das ultrafiltrações convencional, com ultrassom e com campo magnético, respectivamente.

Tabela E.1 - Estabilidade dos permeados do processo de microfiltração.

Membrana (μm)	Fenólicos ($\text{mg}_{\text{AG}}\text{L}^{-1}$)				Turbidez (NTU)				Intensidade de cor (ABS)			
	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 30	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 30	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 30
0,8	6.025 _a ±35	5.891 _a ±33	5.302 _a ±31	5.108 _a ±31	29 _a ±0,5	38 _a ±0	44 _a ±0	68 _a ±0,5	0,621 _a ±0,001	0,742 _a ±0,01	0,786 _a ±0,01	0,804 _a ±0,002
0,3	5.098 _b ±41	5.044 _b ±31	5.037 _b ±43	4.996 _b ±43	25 _b ±0,5	33 _b ±0,5	39 _b ±0	55 _b ±0	0,522 _b ±0,002	0,604 _b ±0,002	0,672 _b ±0,002	0,719 _b ±0,003
0,22	4.446 _c ±32	4.003 _c ±43	3.884 _c ±32	3.800 _c ±39	21 _c ±1,0	30 _c ±0,5	38 _c ±0	52 _c ±0	0,495 _c ±0,001	0,583 _c ±0,001	0,615 _c ±0,001	0,694 _c ±0,009

Os valores médios, indicados por uma letra com número diferente ao longo de uma coluna, são significativamente diferentes para teste de Tukey com nível de significância igual 5%.

Tabela E.2 - Estabilidade dos permeados do processo de ultrafiltração convencional.

Membrana (kDa)	Fenólicos ($\text{mg}_{\text{AG}}\text{L}^{-1}$)				Turbidez (NTU)				Intensidade de cor (ABS)			
	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 30	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 30	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 30
30	2.596 _a ±33	810 _a ±35	813 _a ±21	811 _a ±43	2,76 _a ±0,5	4,5 _a ±0	4,4 _a ±0,2	4,3 _a ±0,7	0,245 _a ±0	0,238 _a ±0,001	0,241 _a ±0,001	0,244 _a ±0,006
20	2.133 _b ±41	641 _b ±40	645 _b ±30	644 _b ±30	2,39 _b ±0	2,5 _b ±0,5	2,5 _b ±0,5	2,6 _b ±0,3	0,109 _b ±0,002	0,111 _b ±0	0,108 _b ±0,01	0,108 _b ±0,01
10	628 _c ±38	158 _c ±36	160 _c ±23	160 _c ±15	1,71 _c ±0,01	1,6 _c ±0,5	1,7 _c ±0	1,7 _c ±0,1	0,08 _c ±0,02	0,07 _c ±0,02	0,08 _c ±0,02	0,08 _c ±0,006
5	239 _d ±22	70,11 _d ±24	70 _d ±9	70 _d ±11	0,68 _d ±0,005	1,5 _d ±0	1,4 _d ±0,1	1,5 _d ±0,1	0,02 _d ±0	0,02 _d ±0,025	0,03 _d ±0,01	0,02 _d ±0,002

Os valores médios, indicados por uma letra com número diferente ao longo de uma coluna, são significativamente diferentes para teste de Tukey com nível de significância igual 5%.

Tabela E.3 - Estabilidade dos permeados do processo de ultrafiltração com ultrassom.

Membrana (kDa)	Fenólicos (mg _{AGL} L ⁻¹)				Turbidez (NTU)				Intensidade de cor (ABS)			
	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 30	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 30	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 30
30	3.511 _a ±32	1.045 _a ±31	1035 _a ±39	1034 _a ±21	3,9 _a ±0,05	4,8 _a ±0,2	4,6 _a ±0,4	4,8 _a ±0	0,312 _a ±0,002	0,284 _a ±0,001	0,301 _a ±0,015	0,310 _a ±0,007
20	2.967 _b ±37	706 _b ±29	705 _b ±12	705 _b ±19	3,01 _b ±0,00	3,2 _b ±0,1	3,1 _b ±0,2	3,1 _b ±0	0,247 _b ±0,00	0,244 _b ±0,017	0,246 _b ±0,001	0,245 _b ±0,001
10	942 _c ±34	249 _c ±38	247 _c ±31	244 _c ±19	2,88 _c ±0	2,3 _c ±0	2,4 _c ±0	2,4 _c ±0	0,121 _c ±0	0,120 _c ±0,01	0,121 _c ±0,007	0,120 _c ±0,008
5	311 _d ±31	121 _d ±13	121 _d ±7	122 _d ±9	1,99 _d ±0	1,9 _d ±0,3	1,8 _d ±0	1,8 _d ±0	0,08 _d ±0,01	0,08 _d ±0,02	0,07 _d ±0,03	0,08 _d ±0,03

Os valores médios, indicados por uma letra com número diferente ao longo de uma coluna, são significativamente diferentes para teste de Tukey com nível de significância igual 5%.

Tabela E.4 - Estabilidade dos permeados do processo de ultrafiltração com campo magnético.

Membrana (kDa)	Fenólicos (mg _{AGL} L ⁻¹)				Turbidez (NTU)				Intensidade de cor (ABS)			
	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 30	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 30	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 30
30	2.815 _a ±39	1115 _a ±35	1128 _a ±41	1128 _a ±28	3,15 _a ±0	4,1 _a ±0	4,2 _a ±0	4,1 _a ±0,1	0,332 _a ±0,04	0,330 _a ±0,01	0,330 _a ±0,01	0,331 _a ±0,001
20	2.482 _b ±32	829 _b ±31	830 _b ±39	831 _b ±22	2,12 _b ±0,01	2,7 _b ±0,1	2,5 _b ±0,1	2,7 _b ±0	0,141 _b ±0,025	0,140 _b ±0,015	0,141 _b ±0,03	0,141 _b ±0,001
10	585 _c ±33	375 _c ±22	381 _c ±23	376 _c ±34	1,62 _c ±0,02	1,4 _c ±0	1,3 _c ±0,3	1,3 _c ±0,2	0,109 _c ±0,01	0,109 _c ±0,03	0,108 _c ±0	0,108 _c ±0,001
5	253 _d ±41	158 _d ±39	161 _d ±25	162 _d ±21	1,24 _d ±0,01	1,0 _d ±0,2	1,0 _d ±0,14	1,1 _d ±0,1	0,09 _d ±0,02	0,09 _d ±0,01	0,08 _d ±0,01	0,08 _d ±0,001

Os valores médios, indicados por uma letra com número diferente ao longo de uma coluna, são significativamente diferentes para teste de Tukey com nível de significância igual 5%.

Anexo F

Permeabilidades hidráulicas para as membranas de micro e ultrafiltração

Membranas de microfiltração

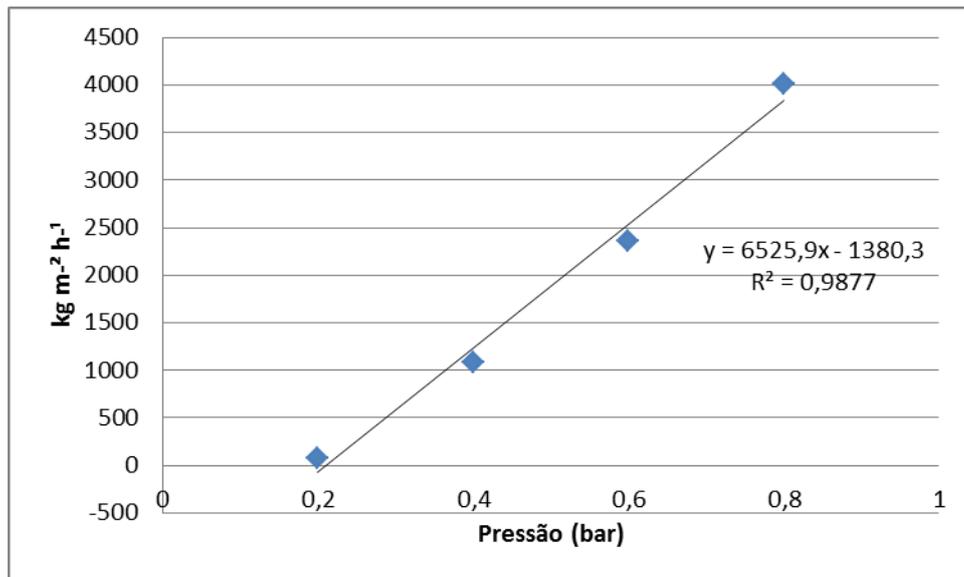


Figura F.1 – Permeabilidade hidráulica para a membrana de 0,8 µm.

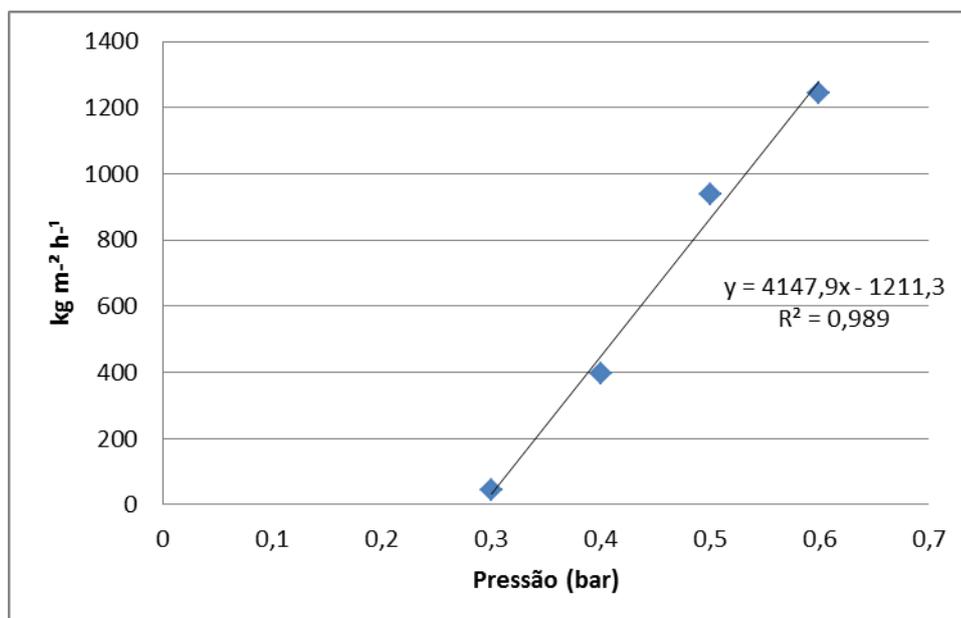


Figura F.2 – Permeabilidade hidráulica para a membrana de 0,3 µm.

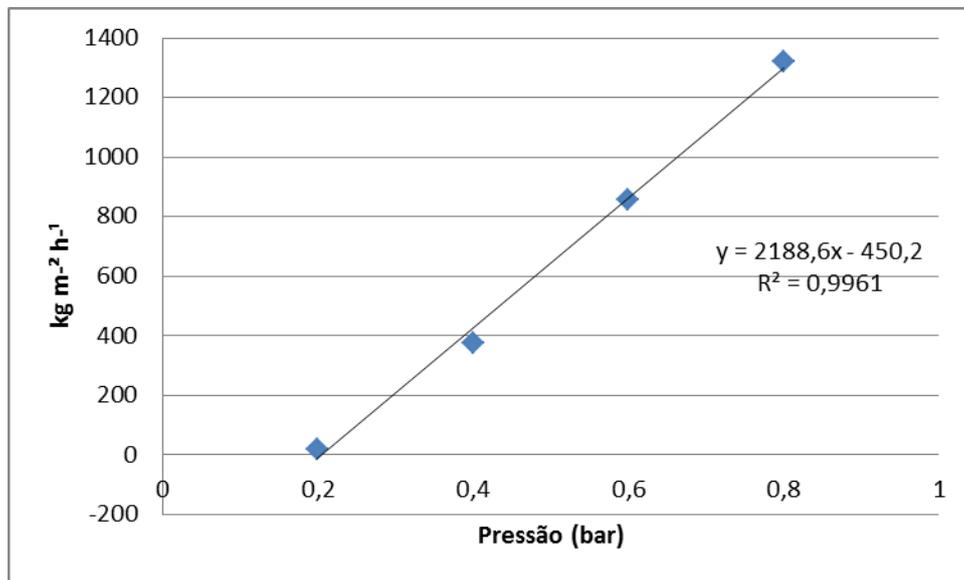


Figura F.3 – Permeabilidade hidráulica para a membrana de 0,22 μm.

Membranas de ultrafiltração

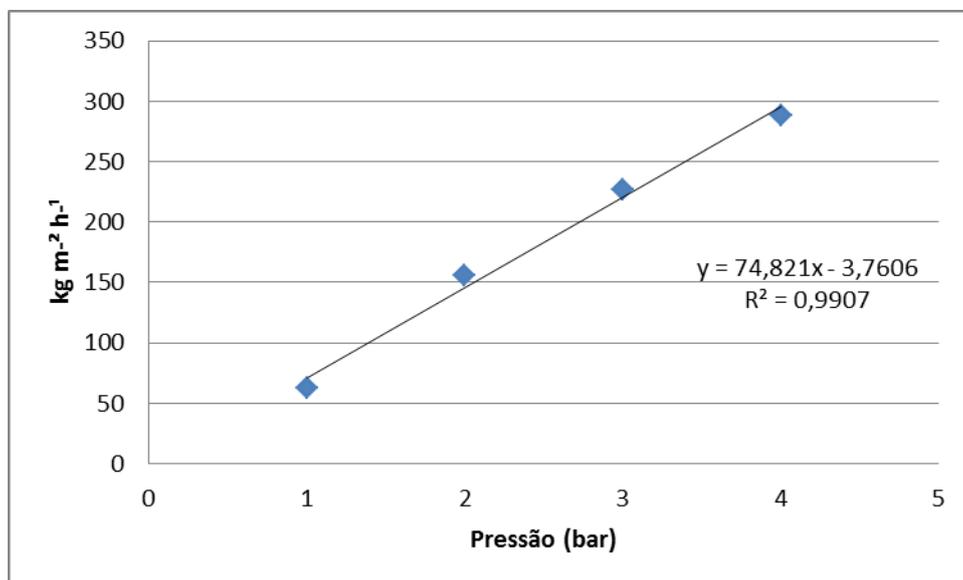


Figura F.4 – Permeabilidade hidráulica para a membrana de 30 kDa.

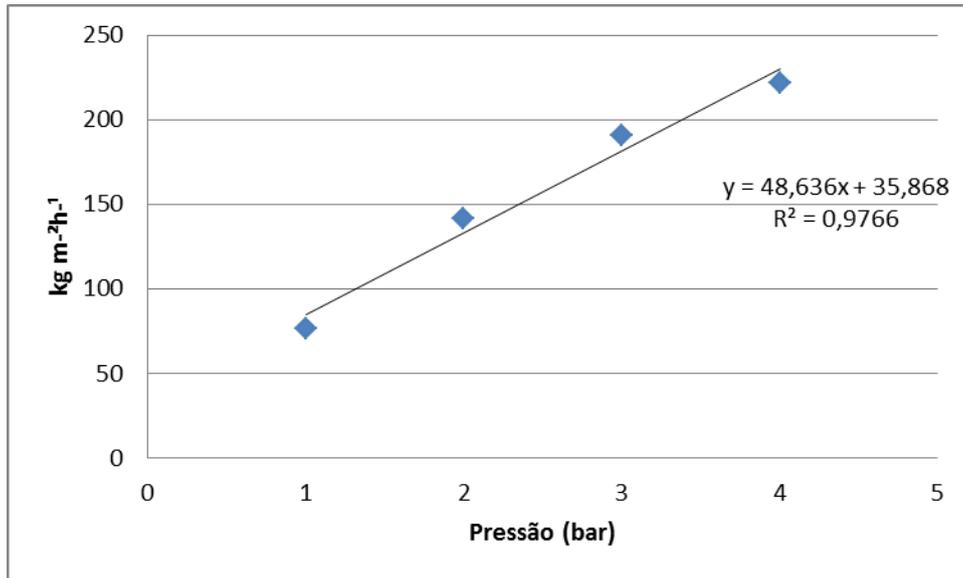


Figura F.5 – Permeabilidade hidráulica para a membrana de 20 kDa.

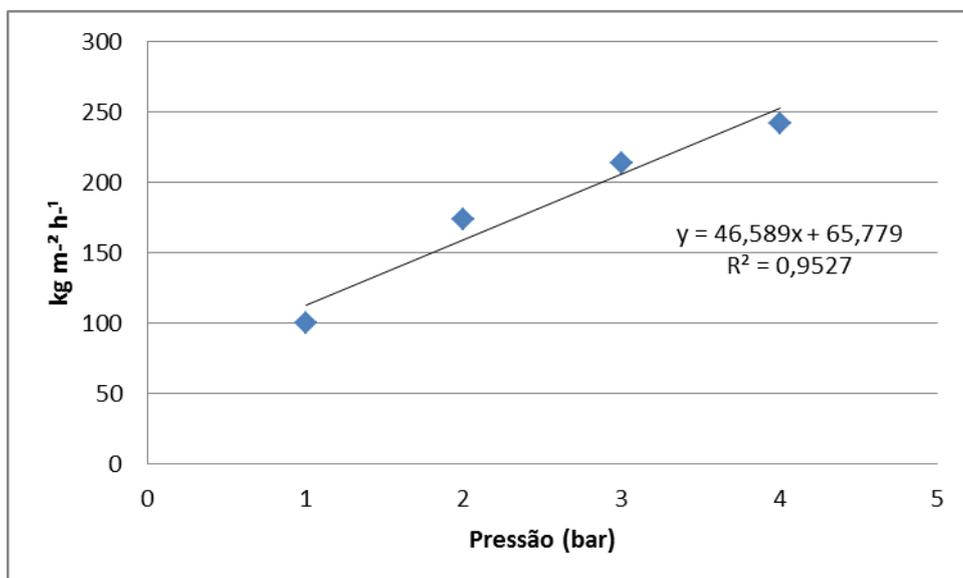


Figura F.6 – Permeabilidade hidráulica para a membrana de 10 kDa.

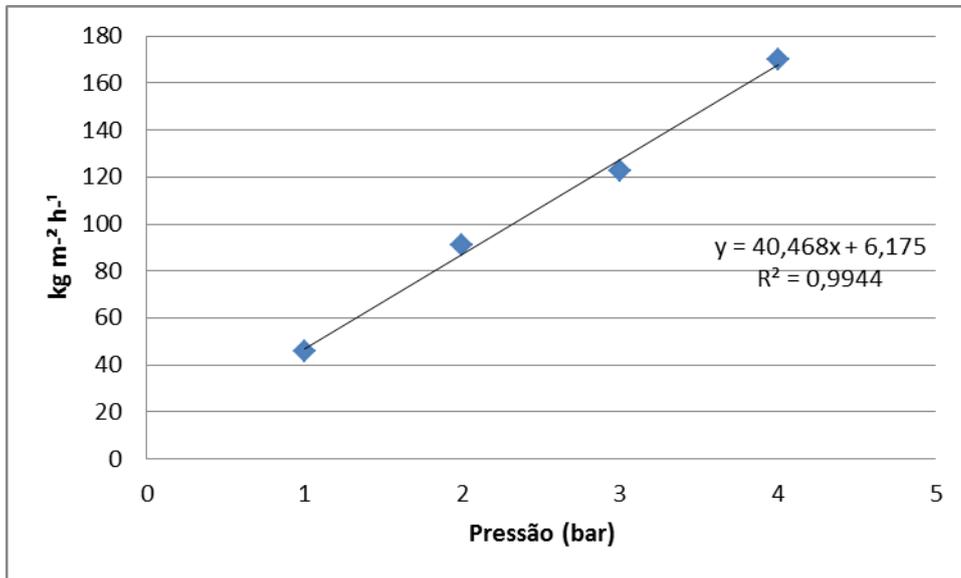


Figura F.7 – Permeabilidade hidráulica para a membrana de 5 kDa

Anexo G

Comportamento da temperatura do banho ultrassônico em função do tempo de ultrafiltração do chá verde.

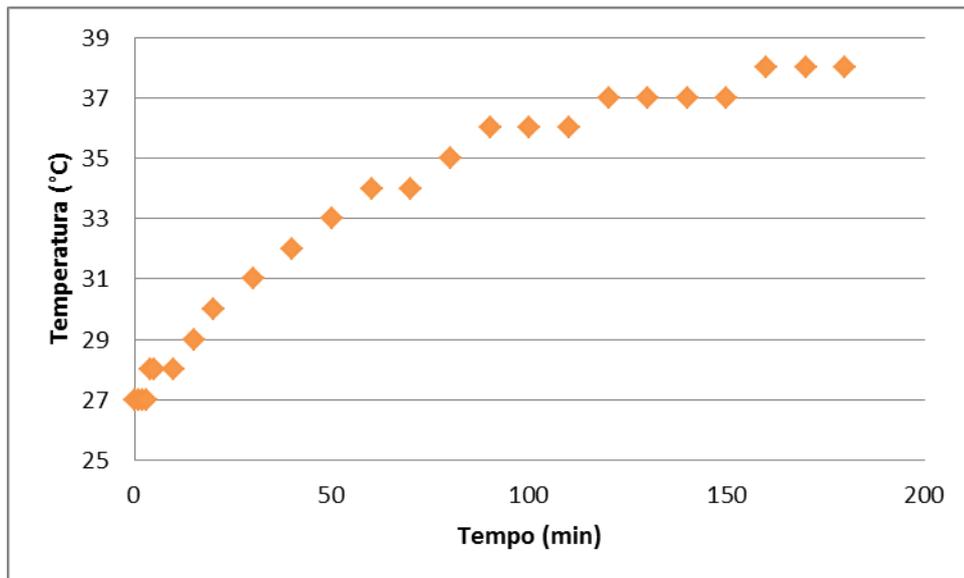


Figura G.1 - Comportamento da temperatura do banho ultrassônico em função do tempo de ultrafiltração do chá verde.

REFERÊNCIAS

- AGHDAM, M. A., MIRSAEEDGHAZI, H., ABOONAJIMI, M., KIANMEHR, M. H. Effect of ultrasound on different mechanisms of fouling during membrane clarification of pomegranate juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 30, p. 127 – 131, 2015.
- ANVISA. Regulamento técnico para café, cevada, chá, erva-mate e produtos solúveis. Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 267 de 22 de setembro de 2005, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
- AZMIR, J. ; ZAIDUL, I. S. M. ; RAHMAN, M. M. ; SHARIF, K. M. ; MOHAMED, A. ; SAHENA, F. ; JAHURUL, M. A. ; GHAFOR, K. ; NORULAINI, N. A. N. ; OMAR, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *JOURNAL OF FOOD ENGINEERING*, v. 117, p.426 – 36, 2013.
- BARHATE, S., SUBRAMANIAN, R., NANDINI, K. E., HEBBAR, U. H. Processing of honey using polymeric microfiltration and ultrafiltration membranes. *Journal of Food Engineering*, v. 60, p. 49 – 54, 2003).
- BARROS, S. T. D., ANDRADE, C. M. G., MENDES, E. S., PERES, L. Study of fouling mechanism in pineapple juice clarification by ultrafiltration. *JOURNAL OF MEMBRANE SCIENCE*, v. 215, p. 213 – 224, 2003.
- BAZINET, L., LABBÉ, D., TREMBLAY, A. Production of Green Tea EGC- and EGCG-Enriched Fractions by a Two-Step Extraction Procedure. *SEPARATION AND PURIFICATION TECHNOLOGY*, v.56, p.53 – 56, 2007.
- BENTRA, C. C.; SILVA, N. A.; GRIGNOLI, L. C.E.; SIMIONATO, M. I. V.; GRIGNOLI, C. R. E. Os benefícios do chá verde no metabolismo da gordura corporal. *REVISTA CIENTÍFICA DA FHO*, v.2, p. 41 – 49, 2014.

- CAI, M., ZHAO, S., LIANG, H. Mechanisms for the enhancement of ultrafiltration and membrane cleaning by different ultrasonic frequencies. *DESALINATION*, v. 263, p. 133 – 138, 2010.
- CASTILHO, A. R., MURATA, R. M., PARDI, V. Produtos naturais em odontologia. *Revista Saúde.com*, São Paulo, v. 1, p. 11-19, 2007.
- CAVALCANTI, A. S. S.; ROSA, J. A. B; SILVA, A. G. *O uso do chá verde, Camellia sinensis L. (Theaceae) em produtos tópicos – uma revisão*. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia da UVV. Vila Velha – ES, 2007.
- CHANDINI, S. K., RAO, L. J., SUBRAMANIA, R. Membrane Clarification of Black Tea Extracts. *FOOD BIOPROCESS TECHNOL*, v.6, p. 1926 – 1943, 2013.
- CHAO, Y. C., CHIANG, B. H. The roles of catechins and caffeine in cream formation in a semifermented tea. *JOURNAL OF THE SCIENCE OF FOOD AND AGRICULTURE*, v.79, p.1687–1690, 1999.
- DARESTANI, M. T., CHILCOTT, T. C., COSTER, H. G. L. Changing the microstructure of membranes using an intense electric field: Filtration performance, v. 449, p. 158 – 168, 2014.
- DE BARROS, S.T.D., ANDRADE, C.M.G., MENDESA, E.S., PERES, L. Study of fouling mechanism in pineapple juice clarification by ultrafiltration. *JOURNAL OF MEMBRANE SCIENCE*, v. 215, 213–224, 2003.
- DIEL, J. L. Caracterização funcional de membranas cerâmicas de micro e ultrafiltração. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Escola de Engenharia. Porto Alegre, 2010.

- DOMINGUES, R. C. C. *Clarificação de suco de maracujá por microfiltração: Análise experimental e modelagem matemática*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Uberlândia. Faculdade de Engenharia Química. Uberlândia, 2011.
- DULLO, A. G. et al. Efficacy of a green tea extract rich in polyphenols and caffeine in increasing 24h energy expenditure and fat oxidation in humans. *AMERICAN JOURNAL OF CLINICAL NUTRITION*, v. 70, n. 6, p. 252-258, 1999.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *CIÊNCIA E AGROTECNOLOGIA*, v. 38, n. 2 p. 109-112, 2014,
- FIRMINO, L. A. *Avaliação da qualidade de diferentes marcas de chá verde (camelliasinensis) comercializadas em Salvador-Bahia*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Farmácia. Salvador, 2011.
- GHIGGI, F. F. *Tratamento de águas para consumo doméstico com membranas de ultrafiltração*. Trabalho de conclusão de curso em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Departamento de Engenharia Química. Porto Alegre, 2011.
- GUO, S. et al. Protective effect of green tea polyphenols on the SH-SY5Y cells against 6-OHDA induced apoptosis through ROS–NO pathway. *FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE*, v. 39, p. 682-695, 2005.
- GUPTA, A. *Extraction, purification, identification and estimation of catechins from Camellia sinensis*. Dissertação de mestrado. Institute Of Himalayan BioresourceAnd Technology. Palampur (2010)
- HABERT, A. C.; BORGES, C. P.; NOBREGA, R. Escola Piloto em Engenharia Química: Processos de Separação com Membranas. Programa de Engenharia Química, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2006.

- INNOCENTINI, M. D. M., ROMANO, R. C. O., SCHREUS, H., RODRIGUES, V. P. COURY, J. R., PILEGGI, R. G. Otimização da permeabilidade de filtros de aerossóis para altas temperaturas preparados a partir da técnica de adição de espuma aquosa em suspensão cerâmica. *CERÂMICA* 55, p. 67 – 77, 2009.
- JANKUN, J., SELMAN, S. H., SWIERCZ, R. Why drinking green tea could prevent câncer. *NATURE*. 387, p. 561 , 1997.
- JIANG, H., ENGELHARDT, U. H., THRÄNE, C., MAIWALD, B., STARK, J. Determination of Flavonol Glycosides in Green Tea, Oolong Tea And Black Tea by UHPLC Compared to HPLC. *FOOD CHEMISTRY*, v.183, p.30 - 35, 2015.
- KAWAKATSU, T., KOBAYASHI, T., SANO, Y., NAKAJIMA, M. Clarification of green tea Extract by Microfiltration and Ultrafiltration. *BIOSCIENCE, BIOTECHNOLOGY, and BIOCHEMISTRY*, v. 59 (6), p. 1016-1020, 1995.
- KUMAR, A., THAKUR, B. K., DE, S., Selective Extraction of (-)Epigallocatechin Gallate from Green Tea Leaves Using Two-Stage Infusion Coupled with Membrane Separation. *FOOD BIOPROCESS TECHNOL*, v.5, p.2568-2577, 2012.
- LI, P., WANG, Y., MA, R., ZHANG, X. Separation of tea polyphenol from Green Tea Leaves by a combined CATUFM-adsorption resin process. *JOURNAL OF FOOD ENGINEERING* 67, p. 253 – 260, 2005.
- LIMA, T. A. Chá e simpatia: Uma estratégia de gênero no Rio de Janeiro oitocentista *Anais do museu paulista*.5, p.93 – 127, 1997.
- MATSUBARA, S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Teores de catequinas e teafloavinas em chás comercializados no Brasil. *Ciênc. Tecnol. Aliment*.26, p. 401-407, 2006.
- MULDER, M. Basic principles of membranes technology 2nd edition. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996.

- NARDY, A.J.R.; MACHADO, F.B. Mineralogia Óptica - Óptica Cristalina. Rio Claro, São Paulo, 120pp, 2002.
- NAGAO, T.; HASE, T.; TOKIMITSU, I. A Green tea extract high in catechins reduces body fat and cardiovascular risks in humans. *OBESITY*. 15, p. 1473-1483, 2007.
- NEVES, L. C. *Aplicação de microfiltração e ultrafiltração como pós tratamento de efluente de lodo ativado em uma indústria de papel e celulose*. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual do Centro-Oeste. Paraná, 2014.
- OLIVEIRA, D. S. *Nova metodologia para extração de compostos fenólicos de vinho tinto e avaliação da estabilidade dos extratos obtidos*. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais. 2014.
- PAGANINI-COSTA, P.; CARVALHODA-SILVA, D. Uma xícara (chá) de química *REV. VIRTUAL QUIM.* 3, p. 27-36, 2011.
- PAN, X., NIU, G., LIU, G. Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. *Chemical Engineering and Processing* 42, p. 129 – 133, 2003.
- PERVA-UZUNALIC, A., SKERGET, M., KNEZ, Z., WEINREICH, B., OTTO, F., GRUNER, S. Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): Extraction efficiency of major catechins and caffeine. *FOOD CHEMISTRY* 96, p. 597 – 605, 2006.
- PORTO, P. A. L. S. *Estudo da atividade antioxidante de catequinas e prociadinas oligoméricas*. Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Departamento de Química. 2002.
- PUCCA, P. T. P.; *Produção e caracterização de membranas de microfiltração e ultrafiltração pelo método de inversão de fases, utilizando polisulfona como*

- matéria-prima*. Dissertação de Mestrado em Hidráulica e Sanitária USP, São Paulo, 2010.
- RAO, L., HAYAT, K., LV, Y., KARANGWA, E., XIA, S., JIA, C., ZHONG, F., ZHANG, X. Effect of ultrafiltration and fining adsorbents on the clarification of green tea. *JOURNAL OF FOOD ENGINEERING* 102, p. 321 – 326, 2011.
- SAIGG, N. L., SILVA, M. C. Efeitos da utilização do chá verde na saúde humana. *Universitas: Ciências da Saúde*, v.7, n.1, p. 69 – 89, 2009.
- SAITO, S. T. *Estudo químico e avaliação da atividade antioxidante de chá verde brasileiro (Camelliasinensisvar.assamica) Cultivar IAC – 259*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Farmácia. Porto Alegre, 2007.
- SERRA, R. L., FAHEINA JR, G. S., PINTO, G. A. S., FREITAS, A. C. Produção de ácido gálico por fermentação Submersa utilizando fermentador instrumentado. XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2014.
- SCHAFER, A. I.; FANE, A. G.; WAITE, T. D. *Nanofiltration Principles and Applications*, New York: Elsevier Advanced Technology, 2005.
- SILVA, S. R. S., OLIVEIRA, T. T., NAGEM, T. J. Uso do chá preto (*Camellia sinensis*) no controle do diabetes mellitus. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicadas*, , 31, p. 133 – 142, 2010.
- SCHNEIDER, R. P.; TSUTTIYA, M. T. *Membranas filtrantes para o tratamento de água, esgoto e água de reuso*. 1ed, São Paulo: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 234p. 2001.
- SHAHIDI, F., ARACHCHI, J. K. V., JEON, Y. J. Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science & Technology* 10, p. 37 – 51, 1999.

- SILVEIRA, M. A.; LASSEN, M. F. M.; BEUTER, S. B. Utilização das plantas medicinais e fitoterápicas o conhecimento popular em uma revisão bibliográfica histórica. *SALÃO DO CONHECIMENTO* Unijuí 2013.
- SMITH, A. Effects of caffeine on human behaviour. *FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY*, v. 40, n. 9, p. 1243-1255, 2002
- STREIT, K. F. *Estudo da aplicação de processos de separação com membrana no tratamento de efluentes de curtume: nanofiltração e eletrodialise*. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Escola de Engenharia. Porto Alegre, 2011.
- TEREFE, N. S., DELON, A., BUCKOW, R., VERSTEEG C. Blueberry Polyphenol Oxidase: Characterization and the Kinetics of Thermal and High Pressure Activation and Inactivation. *Food Chemistry*, v.188, p.193-200, 2015.
- TODISCO, S., TALLARICO, P., GUPTA, B. B., Mass transfer and polyphenols retention in the clarification of black tea with ceramic membranes. *INNOVATIVE FOOD SCIENCE AND EMERGING TECHNOLOGIES* 3, p. 255 – 262, 2002.
- ULBRICHT, M., ANSORGE, W., DANIELZIK, I., KONIG, M., SCHUSTER, O. Fouling in microfiltration of wine: The influence of the membrane polymer on adsorption of polyphenols and polysaccharides. *SEPARATION AND PURIFICATION TECHNOLOGY*, v. 68, p. 335 – 342, 2009.
- VASAN, S. S., FIELD, R. W. On maintaining consistency between the film model and the profile of the concentration polarisation layer. *JOURNAL OF MEMBRANE SCIENCE* 279, p. 434 – 438, 2006.
- VIEIRO, T., FERRA, A., RATES, S. M. K., POSER, G. L. V. Efeitos benéficos e adversos decorrentes do consumo do chá preparado com folhas de Camellia

Sinensis. *BOLETIM DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS*, v. 37, p. 40 – 45, 2003.

VRADIS, I., & FLOROS, J. D. Membrane separation processes for wine dealcoholisation and quality improvement. In: G. Charalambous. Food flavors, ingredients and composition, p. 501–520, 1993.

XU, M., WEN, X., HUANG, X., YU, Z., ZHU, M. Mechanisms of membrane fouling controlled by online ultrasound in an anaerobic membrane bioreactor for digestion of waste activated sludge. *Journal of Membrane Science*, 445, p. 119 – 126, 2013.

YE, J. H., LI, N. N., LU, J. L., ZHENG, X. Q., LIANG, Y. R. Bulk preparation of (-)-epigallocatechin gallate – rich extract from green tea. *FOOD AND BIOPRODUCTS PROCESSING*.92, p. 275 – 281, 2014.

YOSHIDA, Y., KISO, M., GOTO, T. Efficiency of the extraction of catechins from green tea. *FOOD CHEMISTRY* 67, p. 429 – 433, 1999.

WALTNER-LAW, M. E., WANG, X. L., LAW, B. K., HALL, R. K., NAWANO, M., GRANNER, D. K. Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, represses hepatic glucose production. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, v. 277, p. 349333 – 34940, 2002.

WANG, H., HELLIWELL, K., YOU, X. Isocratic elution system for the determination of catechins, caffeine and gallic acid in green tea using HPLC. *FOOD CHEMISTRY* 68, p. 115 – 121, 2000.