



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



MARLON MENEZES MACIEL BINDES

PROCESSAMENTO DO EXTRATO DE CHÁ VERDE (*Camellia sinensis*)
APLICANDO FILTRAÇÃO POR MEMBRANAS

UBERLÂNDIA – MG

2018

MARLON MENEZES MACIEL BINDES

**PROCESSAMENTO DO EXTRATO DE CHÁ VERDE (*Camellia sinensis*)
APLICANDO FILTRAÇÃO POR MEMBRANAS**

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.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Miria Hespanhol Miranda Reis

UBERLÂNDIA - MG

2018

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

B612p
2018 Bindez, Marlon Menezes Maciel, 1988-
Processamento do extrato de chá verde (*Camellia sinensis*) aplicando
filtração por membranas / Marlon Menezes Maciel Bindez. - 2018.
124 f. : il.

Orientadora: Miria Hespanhol Miranda Reis.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.1132>
Inclui bibliografia.

1. Engenharia química - Teses. 2. *Camellia sinensis* - Teses. 3. Chá verde - Teses. 4. Filtração por membranas - Teses. I. Reis, Miria Hespanhol Miranda, . II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. 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 06 DE FEVEREIRO DE 2018.

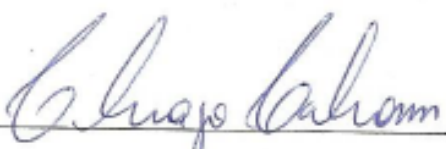
BANCA EXAMINADORA:




Prof. Dr.ª. Miria Hespanhol Miranda Reis
Orientadora (FEQUI/UFU)



Prof. Dr.ª. Vicelma Luiz Cardoso
Professora (FEQUI/UFU)



Prof. Dr. Thiago Taham
Professor (IFTM)



Prof. Dr. Eduardo Basílio de Oliveira
Professor (DTA/UFV)

Dedico essa dissertação aos meus pais Paulo Gilberto Maciel Bindaes (in memorian) e Soraia Menezes Maciel Bindaes, minha eterna gratidão pelo amor incondicional, por tudo que fizeram por mim.

“Fais de ta vie une rêve, et d'un rêve, une réalité”

Antoine de Saint-Exupéry

Agradecimentos

Aos meus amados pais Paulo (*in memorian*) e Soraia faltam-me palavras para agradecer todos os esforços empenhados em minha criação e formação e por terem sempre acreditado em meu potencial.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Miria Hespanhol Miranda Reis e igualmente à Prof^a. Dra. Vicelma Luiz Cardoso por terem me acolhido e direcionado da melhor forma, pela parceria, pela paciência e pelo conhecimento compartilhado.

Ao meu padraсто Avamir por todo amparo e dedicação à nossa família.

À Meg pelo carinho e por estar sempre ao meu lado.

À tia Vina e à minha amiga Mariela Nunes pela torcida e pelo carinho.

À toda minha família, em especial à minha avó Terezinha (*in memorian*) e a minha tia Ana Paula por terem me incentivado e apoiado.

Ao professor Dr. Moilton Ribeiro Franco Júnior pelo seu apoio e pelos importantes conhecimentos e incentivos transmitidos desde a Iniciação Científica.

Ao professores Dr. Eduardo Basílio de Oliveira, Dr. Sidney Fernandes Bandeira e Dr. Thiago Taham por suas contribuições.

Aos meus amigos Edmilson de Oliveira e Gabriel Borges pela amizade e parceria desde a época do CEFET/Araxá.

Ao colegas de laboratório pelo companheirismo e pelas experiências trocadas, em especial ao Grupo de Processos de Separação por Membranas.

Ao Franz Berbet e a Natália Terra por tanto apoio e aprendizado em todas as etapas desse trabalho.

À Larissa Sousa e à Priscila Bernardes pelo auxílio e compartilhamento.

A todos os professores e funcionários da FEQUI/UFU por tudo que contribuíram em minha trajetória desde a graduação, especialmente pela oportunidade a mim concedida de fazer parte de um Programa de Pós-graduação em Engenharia Química de tão alta qualidade.

À UFU, à CAPES, à FAPEMIG e ao CNPq pela estrutura e aporte financeiro.

Aos meus amigos, aos parceiros e a todos aqueles que de alguma forma colaboraram para esta vitória.

Sumário

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE QUADROS	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
CAPÍTULO 1	1
Introdução e objetivos	1
1.1 Introdução	1
1.2 Objetivos	3
CAPITULO 2	5
Revisão Bibliográfica	5
2.1 A planta <i>Camellia sinensis</i>	5
2.2 O Chá verde	5
2.3 Parâmetros de qualidade do chá verde.....	7
2.4 Processos de Extração de Compostos Bioativos	7
2.5 Pré-tratamentos macroscópicos para clarificação do extrato	10
2.6 Processos de filtração por membranas	11
2.6.1 Materiais para a produção de membranas	12
2.6.2 Processo de Separação por membranas que envolvem gradiente de pressão como força motriz.	14
2.6.3 Polarização por concentração e <i>fouling</i>	16
2.6.4 Módulo de membranas	18

2.6.5 Utilização de processo de separação por membranas para produção de bebidas.....	18
CAPÍTULO 3	21
Material e métodos	21
3.1 Matéria Prima	21
3.2 Processamento e caracterização das folhas de chá	22
3.2.1 Moagem, peneiramento e análise granulométrica	22
3.2.2 Umidade	22
3.2.3 Cinzas.....	23
3.3 Preparo do extrato de chá.....	23
3.3.1 Extração Convencional.....	23
3.3.1.1 Efeito da granulometria na extração de polifenóis	25
3.3.1.2 Efeito da razão chá-água na extração de polifenóis	25
3.3.1.3 Efeito do tempo e da temperatura na extração de polifenóis.....	25
3.3.2 Extração ultrassônica	25
3.3.2.1 Planejamento composto central (PCC).....	27
3.3.2.2 Efeito do tempo e temperatura na extração de polifenóis.....	27
3.4 Clarificação do extrato de chá verde	27
3.4.1 Centrifugação (T1).....	28
3.4.2 Quitosana e Centrifugação (T2).....	28
3.4.3 Sementes de <i>Moringa oleífera</i> (SMO) e Centrifugação (T3).....	29
3.5 Processos de filtração por membranas	30
3.5.1 Módulos e membranas utilizados	30
3.5.2 Microfiltração	33
3.5.3 Filtração sequencial.....	33
3.5.4 Permeabilidade hidráulica das membranas de filtração	34

3.5.5 Comportamento do fluxo durante o processo de filtração do chá...	35
3.5.6 Cálculo das resistências	35
3.5.7 Modelagem matemática do fluxo em função do tempo	36
3.5.8 Limpeza das membranas.....	37
3.5.9 Micrografias de MEV e EDS	37
3.6 Análises Físico-Químicas	38
3.6.1 Concentração de polifenóis totais.....	38
3.6.2 Concentração de Flavonóides	39
3.6.3 Turbidez.....	40
3.6.4 Sólidos Totais	40
3.6.5 Análises cromatográficas.....	40
3.6.6 Estabilidade dos chás.....	41
3.6.7 Estimativa da formação do <i>tea cream</i>	41
3.7 Análise estatística dos dados	41
CAPÍTULO 4	44
Resultados e discussão.....	44
4.1 Caracterização das folhas de chá verde	44
4.1.1 Moagem, peneiramento e análise granulométrica	44
4.1.2 Umidade e cinzas	46
4.2 Extração de Polifenóis.....	47
4.2.1 Extração Convencional.....	47
4.2.2 Extração com uso de sonda ultrassônica	54
4.2.2 Efeito do tempo e temperatura	62
4.3 Pré-tratamentos macroscópicos.....	65
4.3.1 Centrifugação (T1).....	65
4.3.2 Adição de quitosana seguida de centrifugação (T2).....	67

4.3.3 Adição de sementes de moringa seguida de centrifugação (T3)	69
4.4 Filtração por membranas.....	71
4.4.1 Microfiltração	71
4.4.2 Filtração sequencial	73
4.5 Análises dos mecanismos responsáveis pelo decaimento do fluxo dos processos de filtração por membranas	75
4.5.1 Comportamento do fluxo em função do tempo de operação	76
4.5.2 Cálculo das resistências	78
4.5.3 Estimativa do mecanismo responsável pelo <i>fouling</i> das membranas	79
4.5.4 Fotomicrografias de MEV e EDS das membrana	84
4.6 Perspectiva de produção do chá verde como bebida comercializável ..	88
4.6.1 Análises de estabilidade	88
4.6.1 Análise de viabilidade do processo.....	92
CAPÍTULO 5.....	95
Conclusões e sugestões	95
5.1 Quanto ao processamento e caracterização das folhas de chá verde:	95
5.2 Quanto à extração de polifenóis das folhas de chá verde:	95
5.3 Quanto à filtração preliminar:.....	95
5.4 Quanto aos pré-tratamentos macroscópicos:	95
5.5 Quanto à filtração por membranas:	96
5.6 Quanto às resistências dos processos de filtração para o chá verde:	96
5.7 Quanto ao mecanismo de <i>fouling</i> para os processos de ultrafiltração do chá verde:	96

5.8 Quanto à perspectiva de produção do chá verde como bebida comercializável.....	97
5.9 Sugestões	97
CAPÍTULO 6.....	99
ANEXOS	99
CAPÍTULO 7	104
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104

Lista de Figuras

Figura 2. 1 – Estrutura molecular da maioria das catequinas presentes no chá verde.	6
Figura 2. 2 – Árvore, vagens e sementes de <i>M. oleífera</i> . (Fonte: Autor).....	11
Figura 2. 3 - Esquema de filtração dead-end e cross-flow. (Baseado em (Strathmann (1981); Habert (2006); Kubota <i>et al.</i> (2008))	12
Figura 2. 4 - Classificação das membranas de acordo com a morfologia. (Baseada em (Scott (1995); Habert <i>et al.</i> (2006); Lalia <i>et al.</i> (2013); Starov (2017))	13
Figura 2. 5 – Materiais usualmente empregados na produção de membranas. (Baseada em (Strathmann (1981); Scott (1995); Habert <i>et al.</i> (2006); Beltsios <i>et al.</i> (2008)).....	13
Figura 2. 6 - Perfil da polarização por concentração e formação da camada gel. Baseada em (Noble e Stern (1995); Mulder (1996); Baker (2004a); Koh <i>et al.</i> (2013)).	16
Figura 2. 7 – Resistências ao transporte de massa através de membranas. Baseado em (Noble e Stern (1995); Nath (2008); Foley (2013); Koh <i>et al.</i> (2013))	17
Figura 2. 8 - Desenho esquemático de um módulo de filtração por membranas. Baseado em (Cheryan (1998); Baker (2004b); Foley (2013))	18
Figura 3. 1 – Esquema das etapas desenvolvidas nesse trabalho.....	21
Figura 3. 2 – Sistema de extração convencional.....	24
Figura 3. 3 - Esquema do processo de extração convencional sequencial	24
Figura 3. 4 – Sistema de extração com sonda ultrassônica	26
Figura 3. 5 - Esquema do processo de extração sequencial com sonda ultrassônica	26
Figura 3. 6 - Procedimentos para clarificação do extrato de chá verde.....	28
Figura 3. 7 – Preparo da solução de quitosana 10 g L ⁻¹	29
Figura 3. 8 – Aparato <i>jar test</i> utilizado nos testes com quitosana.	29
Figura 3. 9 – Preparo da solução de sementes de <i>Moringa oleífera</i> (SMO).....	30
Figura 3. 10 – Sistema utilizado nos processos de filtração do chá verde.	31
Figura 3. 11 – Módulo planar utilizado na microfiltração do chá verde.....	31

Figura 3. 12 – a) Esquema da construção do cartucho para a filtração de chá verde, b) Mecanismo de transporte através da membrana assimétrica de alumina do tipo fibra-oca dentro do cartucho.....	32
Figura 3. 13 - Tubos de ensaio contendo composto fenólico em contato com o reagente Folin-Ciocalteu	39
Figura 3. 14 - Tubos de ensaio contendo flavonóides em contato com os outros reagentes.	39
Figura 4. 1 – Ajuste dos modelos de distribuição granulométrica acumulativa do peneiramento de amostra de chá verde.....	45
Figura 4. 2 - Amostras de chá verdes juntamente com suas respectivas faixas de tamanho de partículas.....	47
Figura 4.3 - Polifenóis totais em função do tamanho das partículas (extrações realizadas a 80°C, 50 g L ⁻¹ , 30 min.). Os valores médios indicados por uma letra diferente, são significativamente diferentes para o teste de Tukey (p≤0,05).....	48
Figura 4. 4 Concentração de Polifenóis em mg _{EAG} g ⁻¹ e em mg _{EAG} L ⁻¹ em função da razão chá-água para extrações realizadas a 80°C por 30 min.....	51
Examinou-se a influência da temperatura e do tempo na extração de polifenóis presentes no chá verde, conforme apresentado na Figura 4. 5.	51
Figura 4. 6 – Perfis de concentração de polifenóis totais em função da temperatura e do tempo de infusão para extrações convencionais realizadas a 50 g L ⁻¹	52
Figura 4. 7 - Gráficos de pareto para polifenóis para a representação das variáveis da extração com sonda ultrassônica, (a) concentração de polifenóis e (b) concentração de flavonóides.	56
Figura 4. 8 - Superfícies de resposta para extração de polifenóis (mg _{EAG} L ⁻¹) : (a) temperatura em função da razão chá-água e (b) temperatura em função da amplitude	57
Figura 4. 9 - Superfícies de resposta para extração de flavonóides (mgR L ⁻¹) : (a) temperatura em função da razão chá-água e (b) temperatura em função da amplitude.	58
Figura 4. 10 - Perfis para valores preditos e desejabilidade para: a) polifenóis e b) flavonoides.	59
Figura 4. 11 - Faixas de desejabilidade para polifenóis e flavonóides em função da temperatura, razão chá-água e amplitude.....	61

Figura 4. 12 - Perfis de concentração de polifenóis totais em função da temperatura e do tempo para extrações com sonda ultrassônica realizadas a 50 g L^{-1} e 70% de amplitude.....63

Figura 4. 13 - Características físico-químicas do sobrenadante após testes com quitosana (150 rpm, 20 min) seguido de centrifugação (8000 rpm, 20 min).....68

Figura 4. 14 - Características físico-químicas do sobrenadante após testes com sementes de *Moringa oleífera* (SMO) (150 rpm, 20 min) seguido de centrifugação (8000 rpm, 20 min).....70

Figura 4. 15 - Perfil do fluxo do chá verde em função do tempo para as filtrações do chá verde com emprego da membrana plana de $0,22 \mu\text{m}$ e da fibra oca sem revestimento polimérico.....78

Figura 4. 16 - Perfil do fluxo do chá verde em função do tempo para a filtração com emprego da fibra oca com revestimento polimérico (S5).78

Figura 4. 17 - Fluxo experimental e calculado para a filtração do extrato de chá verde para as membranas: a) Plana $0,22\mu\text{m}$ (S3), b) Fibra oca de alumina (Al_2O_3) (S4). .82

Figura 4. 18 - Fluxo experimental e calculado para a filtração do extrato de chá verde para as membrana fibra oca de alumina com revestimento polimérico ($\text{PES}/\text{Al}_2\text{O}_3$) (S5).....83

Figura 4. 19 – Fotomicrografias de MEV da membrana plana de $0,22 \mu\text{m}$ a) e b) seção transversal antes e depois da filtração de chá com aumentos de 400 vezes e c) e d) seção plana antes e depois da filtração de chá com aumentos de 1500 vezes respectivamente.85

Figura 4. 20 - Fotomicrografias de MEV da fibra de alumina sem revestimento polimérico a) e b) seção transversal antes e depois da filtração de chá com aumentos de 200 vezes e c) e d) seção plana antes e depois da filtração de chá com aumentos de 1500 vezes respectivamente.86

Figura 4. 21 - a) e b) EDS da membrana plana de $0,22 \mu$ e da fibra oca sem revestimento após a filtração de chá verde respectivamente.87

Figura 4. 22 - Fotomicrografias de MEV da fibra oca de alumina com revestimento polimérico: a) aumento de 81 vezes e b) aumento de 353 vezes.87

Figura 4. 23 - Concentração de polifenóis totais do chá verde ao longo de 30 dias de armazenamento à 5°C para o extrato centrifugado (S2), e os permeados da membrana plana de $0,22 \mu\text{m}$ (S2) e da fibra oca (S4).91

Figura 4. 24 - Turbidez do chá verde ao longo de 30 dias de armazenamento à 5°C para o extrato centrifugado (S2), e os permeados da membrana plana de 0,22 µm (S3) e da fibra oca sem revestimento (S4) e da fibra oca com revestimento (S5).91

Figura 4. 25 - Porcentagem de formação de tea cream no chá verde ao longo de 30 dias de armazenamento à 5°C para o extrato centrifugado (S2), e os permeados da membrana plana de 0,22 µm (S3) e da fibra oca (S4).92

Figura 4. 26 – Percentuais de pureza e de redução dos parâmetros físico-químicos do processo de clarificação e purificação do extrato de chá verde.93

Lista de Tabelas

Tabela 3. 1- Níveis codificados e reais para o planejamento composto central	27
Tabela 3. 2 – Representação dos mecanismos de <i>fouling</i> em membranas.	36
Tabela 4. 1 - Distribuição granulométrica de amostra de folhas de chá verde.....	44
Tabela 4. 2– Teores de umidade e cinzas em amostras de chá verde	46
Tabela 4. 3 - Porcentagem de polifenóis totais após o processo de extração convencional para diferentes trabalhos.	54
Tabela 4. 4 - Resultados do planejamento composto central (PCC) da extração com sonda ultrassônica para polifenóis e flavonóides.	55
Tabela 4. 5 - Porcentagem de polifenóis totais após o processo de extração com ultrassom para diferentes trabalhos.	64
Tabela 4. 6- Análise físico-química do extrato (S1) produzido por extração convencional a 50 g L ⁻¹ , 80 °C por 60 min.....	64
Tabela 4. 7 - Concentração de catequinas, cafeína e ácido gálico (GA) do extrato filtrado (S1) à 50 g L ⁻¹ , 80 °C por 60 min.	65
Tabela 4. 8 - Análise físico-química do extrato centrifugado (S2) em comparação com o extrato inicial (S1).....	66
Tabela 4. 9 - Concentração de catequinas, cafeína e ácido gálico (GA) do extrato centrifugado (S2) em comparação com o extrato inicial (S1).....	66
Tabela 4. 10 - Características físico-químicas dos permeados dos processos de microfiltração do chá verde pela membrana plana de 0,22 µm (S3) e pela fibra oca de alumina (S4) em comparação com o extrato centrifugado alimentado (S2).	72
Tabela 4. 11 - Concentração de catequinas, cafeína e ácido gálico (GA) nos permeados dos processos de microfiltração pela membrana plana de 0,22 (S3) e pela fibra oca de alumina sem revestimento (S4) em comparação com o extrato centrifugado (S2).....	73
Tabela 4. 12 - Características físico-químicas do permeado do processo de filtração pela fibra oca com revestimento (S5) em comparação com a fibra oca sem revestimento polimérico (S4).....	74
Tabela 4. 13 - Concentração de catequinas, cafeína e ácido gálico (GA) no permeado do processo de filtração pela fibra oca com revestimento (S5) em comparação com a fibra oca sem revestimento polimérico (S4).	75

Tabela 4. 14 - Permeabilidade hidráulica das membranas.....	76
Tabela 4. 15 - Resistências da membrana para filtração do chá verde (resistência hidráulica da membrana (R_M), resistência ao bloqueio dos poros (R_P), resistência à formação de torta (R_C) e resistência total (R_T)).	79
Tabela 4. 16 - Desvio da raiz quadrada média (RMSD) entre os dados de fluxo experimentais e calculados para cada mecanismo de <i>fouling</i> para filtração do chá verde.	81

Lista de Quadros

Quadro 2. 1 - Processos de separação com membranas comerciais (adaptado de Habert *et al.* (2006)). 15

Resumo

O consumo de bebidas e alimentos funcionais tem crescido no mundo nos últimos anos principalmente devido ao aumento da preocupação das pessoas com a saúde e o bem estar. As folhas da planta *Camellia sinensis* são tradicionalmente utilizadas para o preparo de infusões e, além disso, devido à alta concentração de compostos bioativos em seus extratos, essa erva tem chamado a atenção de pesquisadores e das indústrias alimentícia e farmacêutica. Os processos de filtração por membranas podem ser utilizados para clarificação, purificação e concentração de diversos produtos. Nessa perspectiva, este trabalho teve como objetivo o processamento do chá verde incluindo a caracterização das folhas, a extração, a clarificação e a purificação dos polifenóis presentes no chá usando água como solvente, pré-tratamentos macroscópicos para a clarificação (centrifugação e adição de agentes coagulantes - quitosana e sementes de *Moringa oleífera*) e, sequencialmente, filtração por membranas para purificação dos extratos. Inicialmente fez-se a moagem, o peneiramento e a classificação granulométrica das folhas de chá verde. A influência da granulometria na extração foi analisada em uma extração aquosa conduzida a 80°C por 30 min a uma razão chá-água de 50 g L⁻¹ utilizando folhas de chá com granulometria na faixa de 0,05-2,83 mm e também folhas de chá não moídas. A melhor granulometria para extração de polifenóis encontrada foi para a faixa de partículas de 0,15-0,74 mm e essa foi utilizada em todos os experimentos de extração convencional e com ultrassom subsequentes. O impacto da razão chá-água foi avaliado variando-a de 10 a 120 g L⁻¹ para extrações a 80°C por 30 min. Para a verificação do melhor tempo e da melhor temperatura na extração convencional, o preparo do chá foi realizado com uma razão chá-água de 50 g L⁻¹, variando-se o tempo de 10 a 120 min e a temperatura de 40 a 90°C. A extração ultrassônica foi feita em duas etapas, na primeira etapa foi feito um planejamento composto central (PCC), com três réplicas no ponto central, com alfa de ortogonalidade igual a 1,3531, a um nível de significância de 95%. Para bateladas de 30 min variou-se a temperatura de 22 a 83°C, a razão chá-água de 12 a 73 g L⁻¹ e a amplitude de 23 a 77%. Na segunda etapa da extração ultrassônica, utilizou-se a razão chá-água de 50 g L⁻¹, a melhor amplitude encontrada na primeira etapa (77%) e, similarmente à extração convencional, avaliou-se o efeito da temperatura em função do tempo variando-se o tempo de 10 a 120 min e a temperatura de 40 a 90°C. A melhor condição de extração encontrada nesse trabalho foi a extração convencional a 80°C, 50 g L⁻¹ por 60 min utilizando partículas de chá na faixa (0,15-0,74 mm). Em seguida, avaliou-se como pré-tratamentos: centrifugação (8000 rpm, 20 min), adição de quitosana (0-2000 mg L⁻¹) e adição de sementes de *Moringa oleífera* (SMO) (0-10.000 mg L⁻¹). As microfiltrações foram feitas a 0,8 bar utilizando como alimentação o extrato centrifugado. Para tal empregou-se uma membrana plana de éster de celulose de 0,22 µm e um cartucho de membranas cerâmicas do tipo fibra-oca sem revestimento polimérico fabricado em laboratório. A microfiltração através das membranas do tipo fibra-oca sem revestimento apresentaram menor retenção de polifenóis (2,33%), maior retenção de sólidos (4,23%), maior redução da turbidez (89,91%) e maior fluxo estabilizado (19,37 L h⁻¹m⁻²) em relação à membrana comercial plana de 0,22 µm. Posteriormente à microfiltração fez-se uma filtração sequencial empregando um cartucho com membranas de alumina do tipo fibra-oca com revestimento polimérico a 1,5 bar. Para esse processo obteve-se um fluxo estabilizado de 3,51 L h⁻¹m⁻², uma redução de

9,17% de polifenóis, 12,89% de sólidos, 80,65% da turbidez e 16,92% de sólidos solúveis (°brix). Os fluxos obtidos nas filtrações foram utilizados para calcular o mecanismo de *fouling* e para calcular as resistências das membranas. O mecanismo de *fouling* predominante (n) e o valor da resistência dos poros (R_P) encontrados para a membrana plana de 0,22 μm , para a fibra oca sem revestimento e para fibra oca com revestimento foram bloqueio interno dos poros ($n=1,5$) e ($R_P = 0,7 \times 10^{-13}$), formação de torta ($n=0$) e ($R_c = 2,80 \times 10^{-13}$) e bloqueio intermediário dos poros ($n=1$) e ($R_P = 7,38 \times 10^{-13}$), respectivamente. Avaliou-se a estabilidade do extrato de alimentação e dos permeados das filtrações, quando armazenados por 30 dias à 5°C, tomando como referência os parâmetros concentração de polifenóis, turbidez e formação de *tea cream*. Observou-se que apenas o permeado obtido através da filtração pela fibra oca revestida (S5) apresentou estabilidade (turbidez menor que 4 NTU) e sem a formação de *tea cream* ao longo dos 30 dias de armazenamento à 5°C. Assim, este trabalho encontrou as melhores condições de extração de polifenóis presentes em folhas de chá verde e evidenciou a utilização de centrifugação para clarificação e a aplicação filtração com membranas de alumina do tipo fibra oca sem e com revestimento polimérico para purificação do extrato de chá de chá verde. O resultado final foi a produção do chá verde como uma bebida mais clarificada e estável.

Palavras chave: *Camellia sinensis*, chá verde, polifenóis, extração, clarificação, filtração por membranas.

Abstract

The consumption of functional beverages and food has increased in the last years mainly due to people concerning about their health and well-being. *Camellia sinensis* leaves are traditionally used for infusion preparations. Furthermore, considering the high bioactive compounds concentration in its extracts, this herb has been catching the attention of researchers as well as of the food and pharmaceutical industries. Membrane filtration processes may be used for clarification, purification, and concentration of several products. From this point of view, this study focused on the green tea processing, including leaves characterization, extraction, clarification, and purification of polyphenols. In this sense, water was used as a solvent for extraction; macroscopic pre-treatments was applied for clarification (centrifugation and addition of coagulants agent, such as chitosan and *Moringa oleifera* seeds) and sequentially, a membrane filtration was employed for purification. Initially, the tea was ground, sifted and classified granulometrically. Then, different parameters were evaluated in order to find the best polyphenol extraction condition from tea leaves. The influence of the tea particle was analysed at 80°C for 30 min for a water-to-tea ratio 50 g L⁻¹ and a tea particle size (0.05-2.83 mm) besides unground leaves. The best tea particle size for polyphenols extraction was 0.15-0.74 mm and it was then used for all further conventional and ultrasound assisted extraction experiments. The optimum ratio was determined by extractions at 80°C for 30 min with a tea-to-water ratio ranging from 10 to 120 g L⁻¹. The impact of time and temperature on the conventional extraction of polyphenols was evaluated at 50 g L⁻¹ tea-to-water ratio by ranging the time and the temperature from 10 to 120 min and from 40 to 90°C respectively. Ultrasound-assisted extraction (UAE) consisted of two steps. In the first step of UAE, an experimental design using Response Surface Methodology (RSM) was performed with three replicates at the central point, orthogonality alpha of 1.3531 and at a significance level of 95%. For extraction time of 30 min, temperature, tea-to-water ratio, and amplitude ranged from 22 to 83°C, 12 to 73 g L⁻¹, 23 to 77% respectively. In the second step of UAE, using the best amplitude determined in step one (77%) and for a water-to-tea ratio 50 g L⁻¹, similarly to conventional extraction, time and temperature varied from 10 to 120 min and from 40 to 90°C respectively. The optimum extraction condition found in this study was 80°C, 50 g L⁻¹ for 60 min and a particle size (0.15-0.74 mm). Sequentially, the pre-treatments were performed: centrifugation (8000 rpm, 20 min), chitosan addition (0-2000 mg L⁻¹) and *Moringa oleifera* seeds addition (0-10.000 mg L⁻¹). Microfiltration processes were carried out at 0.8 bar applying a flat membrane of 0.22 µm and hollow fibres without coating coupled in a home-made cartridge. Microfiltration through hollow fibres without coating presented less polyphenol retention (2.33%), greater solids removal (4.23%), greater turbidity reduction (89.91%) and the greatest steady-state flux (19.37 L h⁻¹m⁻²) comparatively to flat membrane of 0.22 µm. After the microfiltration processes, a sequential filtration was executed at 1.5 bar employing a home-made cartridge using hollow fibres with a polymeric coating. This sequential process achieved a steady-state flux of 3.51 L h⁻¹m⁻² and a reduction of 9.17% of polyphenols, 12.89% de solids, 80.65% of turbidity and 16.92% of soluble solids (°brix). The obtained flux in each filtration process was used to calculate the *fouling* mechanism and the membrane resistance. In this way, *fouling* mechanisms (n) and pore resistance values (R_P) found for flat membrane of 0.22 µm, hollow fibre without coating and for hollow fibre with coating were internal pore blocking (n=1.5) e

($R_P = 0.7 \times 10^{-13}$), cake formation ($n=0$) e ($R_C = 2.80 \times 10^{-13}$) and intermediary pore blocking ($n=1$) e ($R_P = 7.38 \times 10^{-13}$) respectively. Extract and permeates stability, stored at 5°C for 30 days, were evaluated using as reference the parameters polyphenols concentration, turbidity and *tea cream* formation. Only the permeate obtained through filtration by the coated hollow fibre (S5) presented stability (turbidity value less than 4 NTU) and no formation of *tea cream* during the 30 days of storage at 5°C. In conclusion, this study found the best polyphenol extraction conditions and proposed the utilisation of centrifugation for clarification followed by filtration through hollow fibres membranes without and with coating for green tea extract purification.

Keywords: *Camellia sinensis*, green tea, polyphenols, extraction, clarification, purification, membrane filtration.

Capítulo 1

Introdução e objetivos

Nesse capítulo introdutório, é feita uma abordagem primária dos benefícios do consumo do chá verde (*Camellia sinensis*) e o seu papel no contexto da produção das bebidas funcionais. Serão apresentados ainda os objetivos que norteiam o presente estudo de processamento do extrato de chá verde empregando filtração por membranas.

1.1 Introdução

O chá é uma das bebidas não alcoólicas mais consumidas no mundo Rao *et al.* (2011) e, além do aspecto cultural, sua proeminência é justificada por seus diversos benefícios à saúde (Dufresne e Farnworth, 2001; Liang *et al.*, 2007). Considerando a presença dos compostos bioativos (polifenóis, metilxantinas e etc.) (Lin *et al.*, 2015), o chá tem se mostrado benéfico na prevenção de algumas doenças como o câncer, distúrbios cardiovasculares, obesidade e diabetes (Khan e Mukhtar, 2007; Vuong, Golding, *et al.*, 2011; Pasrija e Anandharamakrishnan, 2015).

Com o aumento da preocupação das pessoas pela ingestão de alimentos e bebidas saudáveis, o consumo dos chás provenientes da planta *Camellia sinensis* tem se tornado ainda mais comum. Os chás (*Camellia sinensis*) podem ser classificados em categorias distintas especialmente de acordo com o método de processamento das folhas como os principais: chá branco (não fermentado), chá verde (levemente fermentado), chá oolong (com fermentação mediana) e chá preto (bem fermentado) (Horžić *et al.*, 2009; Muniandy *et al.*, 2016).

Comparando os chás verde, preto e branco, o chá verde apresenta maior teor de polifenóis, incluindo os flavonóides (Komes *et al.*, 2010; Carloni *et al.*, 2013). Por essa razão o chá verde tem chamado mais atenção que os outros e foi, por isso, escolhido para ser abordado no presente estudo. No chá verde, os flavonóides mais importantes são as catequinas (Yamamoto *et al.*, 1997; Komes *et al.*, 2010) e essas, devido às suas propriedades antioxidantes, produzem notáveis efeitos benéficos ao

corpo (Kono *et al.*, 1988; Price e Spitzer, 1993; Chung *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2000; Labbé *et al.*, 2006). As principais catequinas presentes no chá verde são epicatequina (EC), epigalocatequina (EGC), galato de epicatequina (ECG) e galato de epigalocatequina (EGCG) (Banerjee e Chatterjee, 2015). Além das catequinas, outros compostos são responsáveis pelas características sensoriais do chá como a cafeína, os minerais, as proteínas, os lipídeos, os polissacarídeos e os açúcares (Jiang *et al.*, 2015).

Em escala industrial, a extração com solventes é o método mais comumente empregado para a segregação de compostos bioativos contidos no chá. Na extração é importante inicialmente definir as condições operacionais tais como a escolha do solvente (água, solventes orgânicos, misturas), o processo a ser empregado (convencional, ultrassom, micro-ondas, etc.) e os parâmetros a serem fixados e variados (temperatura, tempo, razão chá-água, etc.). Nesse sentido, a produção de extratos naturais, aliada à maximização dos seus compostos bioativos, demandam estudos de otimização de processo (Pinela *et al.*, 2016) os quais serão abordados nesse trabalho.

No tratamento dos chás empregando membranas, sequencialmente ao processo de extração, os pré-tratamentos macroscópicos constituem uma etapa preliminar de clarificação do extrato, de modo a evitar o rápido decaimento do fluxo durante o processo filtração. Nesse trabalho foram utilizados a centrifugação e os agentes coagulantes quitosana e sementes de *Moringa oleífera*. A quitosana (quitina desacetilada), um polissacarídeo catiônico não tóxico e biodegradável, tem sido empregada na clarificação de bebidas conforme mostram trabalhos na literatura ((Jankun *et al.* (1997); Rao *et al.* (2011); Domingues *et al.* (2012)). Já as sementes de *Moringa oleífera*, uma árvore comum na região dos trópicos, contém um potente coagulante natural que foi tradicionalmente utilizado por comunidades indígenas para clarear a água antes do consumo (Ye *et al.*, 2014), essas sementes têm sido utilizadas na redução da turbidez de águas como reportaram (Muyibi e Evison (1995); Ye *et al.* (2014); Santos *et al.* (2016)).

O consumo de chá é recomendado por médicos e nutricionistas, mas uma simples xícara de chá preparada em casa pode não conter a quantidade diária recomendada de compostos bioativos, de modo que precisaríamos ingerir uma grande

quantidade da bebida. Nesse sentido, bebidas e alimentos enriquecidos com ingredientes bioativos tornam-se opções viáveis a serem incorporadas na dieta diária (Dueik e Bouchon, 2016). O consumo dos chás prontos para beber cresceu 71% no Brasil entre os anos de 2016 e 2017 (TRADE NAMES INDEX A2 - Scott, K, 1995). Nessa direção os chás prontos (*Camellia sinensis*) são práticos e boas alternativas de bebidas funcionais. Entretanto, esses chás podem apresentar instabilidade quando armazenados sob refrigeração, que consiste na formação do *tea cream*. O *tea cream* se dá pela complexação entre os polifenóis e os compostos de maior peso molecular como as proteínas. Esse fenômeno causa redução das propriedades nutricionais e sensoriais do chá e é uma grande preocupação que a indústria tem quanto a armazenagem de suas bebidas prontas (Subramanian *et al.*, 2014; Argyle e Bird, 2015). Dessa maneira, é notório o apelo mercadológico para o desenvolvimento de novas tecnologias que favoreçam a produção e a conservação dos *ready-to-drink teas* (chás prontos para beber).

A aplicação da filtração por membranas para purificação, concentração e estabilidade dos chás é uma tecnologia em desenvolvimento que, além de ser empregada atualmente em diversas pesquisas científicas, tem se tornado promissora no setor de alimentos e bebidas. Então, processos sequenciais como extração, clarificação/purificação e concentração por membranas podem ser empregados para produzir extratos mais claros, estáveis e preservando boa parte dos compostos bioativos.

1.2 Objetivos

Esse trabalho tem como objetivo geral extrair, clarificar e concentrar os compostos bioativos presentes no chá verde, empregando água como solvente para extração, pré-tratamentos macroscópicos para a clarificação e membranas para purificação e concentração. E, como objetivos específicos, tem-se:

- Executar o processamento, a caracterização e a análise da qualidade das folhas de chá verde em termos de umidade e cinzas totais.

- Avaliar as melhores condições de granulometria, razão chá-água, tempo e temperatura para a extração dos polifenóis do chá verde;
- Comparar a extração convencional à extração com ultrassom em relação à concentração de polifenóis totais (mg L^{-1});
- Realizar pré-tratamentos como centrifugação e coagulação com quitosana e sementes de *Moringa Oelifera* (MO) para clarificação do extrato de chá verde;
- Aplicar membranas com diferentes configurações geométricas (plana e fibra oca), de diferentes materiais (cerâmicas e poliméricas) para a purificação do extrato de chá verde;
- Avaliar os mecanismos de *fouling* responsáveis pelo decaimento do fluxo do permeado;
- Empregar a técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) na caracterização estrutural das membranas utilizadas nas filtrações de chá verde;
- Empregar EDS na caracterização dos compostos presentes nas membranas após a filtração do chá verde;
- Avaliar se os permeados das filtrações são estáveis e se há formação de *tea cream*;
- Avaliar a viabilidade do processo de clarificação e purificação do extrato de chá verde;
- Caracterizar as amostras de chá em termos de polifenóis, flavonóides e compostos individuais (HPLC).

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

Este capítulo versa sobre a revisão bibliográfica que dá fundamentação a esse trabalho. Nas seções a seguir serão expostas informações detalhadas sobre a planta *Camellia sinensis*, o chá verde, os processos de extração de compostos bioativos, além dos pré-tratamentos macroscópicos e dos processos de filtração por membranas para clarificação e purificação do extrato, respectivamente.

2.1 A planta *Camellia sinensis*

(*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) é uma espécie da família *Theaceae*, popularmente conhecida como chá-da-índia. É uma árvore de até 15 metros de altura nativa das florestas do nordeste da Índia e sul da China. As folhas da planta são largamente comercializadas para a preparação de infusões como bebidas ao redor do mundo (Zheng *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017). A partir da planta pode-se produzir diversos tipos de chá, diferenciados pela forma de fermentação das folhas, tais como: o verde (não fermentado), o branco (levemente fermentado) o *oolong* (parcialmente fermentado) e o preto (fermentado) (Cheng, 2006; Dai *et al.*, 2017). As primeiras plantações de *Camellia sinensis* no Brasil datam do início do século XIX, Sabe-se que um comerciante português chamado Luiz de Abreu ofereceu as sementes do chá a D. João VI após sua chegada ao país. Assim com a criação do Jardim Botânico no Rio de Janeiro em 1808 iniciou-se o cultivo e a comercialização da planta no país. (Costa e Da Silva, 2011)

2.2 O Chá verde

Chá-verde, conforme supracitado, é um tipo de chá feito a partir da infusão das folhas da planta *Camellia sinensis* e é chamado de verde porque as folhas da erva sofrem pouca oxidação durante o processamento. As principais catequinas presentes no chá verde são: galato de epigallocatequina (EGCG), galato de epicatequina (ECG),

epigalocatequina (EGC), epicatequina (EC), galato de galocatequina (GCG), galato de catequina (CG) e catequina (C) (Miura *et al.*, 1994; Lakenbrink *et al.*, 2000). EGCG é a mais ativa e abundante catequina no chá verde (Yang *et al.*, 2002). Estudos epidemiológicos têm mostrado que as catequinas presentes no chá verde possuem propriedades funcionais que podem prevenir doenças como câncer, diabetes, obesidade e etc. (Khan e Mukhtar, 2007). A Figura 2. 1 apresenta a estrutura molecular de catequinas presentes no chá verde.

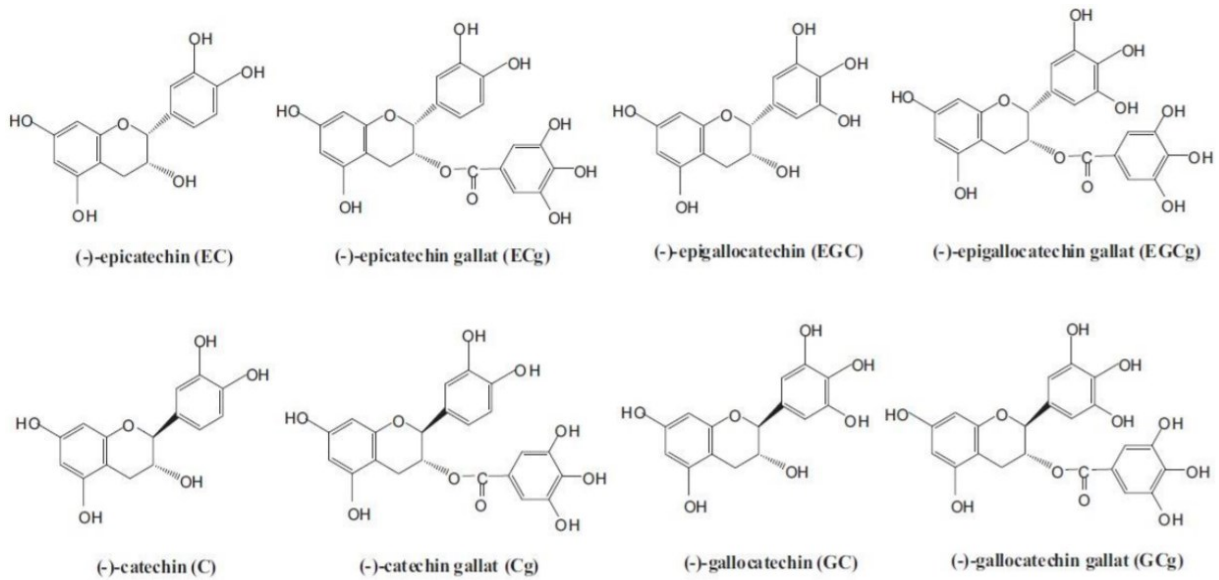


Figura 2. 1 – Estrutura molecular da maioria das catequinas presentes no chá verde.

Fonte: (Ye *et al.*, 2014)

Os efeitos biológicos promovidos pelas catequinas como sua ação antibacteriana, ação inibidora de enzimas e sua atividade antioxidante são dados devido à sua natureza polifenólica que as confere elevado poder redutor e capacidade de neutralizar radicais livres de oxigênio (Jankun *et al.*, 1997). Jankun *et al.* (1997) reportaram ainda 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.

2.3 Parâmetros de qualidade do chá verde

O controle de qualidade e a segurança alimentar são princípios básicos no processamento de produtos alimentícios. A manutenção das propriedades químicas e bioativas das matrizes vegetais durante a colheita até a estocagem do produto final é uma preocupação que concerne à indústria alimentícia. Nessa perspectiva, o teor de umidade e cinzas são parâmetros importantes na avaliação da qualidade das folhas de chá durante a estocagem. Através da determinação do teor de cinzas pode-se quantificar a presença de impurezas inorgânicas não voláteis como terra e areia, por exemplo (Cardoso, 2009). Já a análise do teor de umidade pode indicar se a amostra é um ambiente propício ao crescimento de microrganismos indesejáveis (Nascimento *et al.*, 2005).

2.4 Processos de Extração de Compostos Bioativos

A extração é amplamente empregada nas indústrias de alimentos e bebidas como etapa preliminar na segregação de compostos funcionais a partir de matrizes vegetais para a produção de ingredientes para diversas aplicações (Dai e Mumper, 2010; K.N *et al.*, 2015; Pinela *et al.*, 2016). Tecnologias sustentáveis e de baixo custo têm sido estudadas e implementadas na tentativa de substituírem os métodos tradicionais de extração (Ekezie *et al.*, 2017).

Vários estudos reportaram a influência da otimização das condições operacionais na eficiência do processo de extração (Kalil *et al.*, 2000; Bezerra *et al.*, 2008; Pinela *et al.*, 2016; Roriz *et al.*, 2017). Essa otimização pode ser paramétrica ou concebida através de técnicas de otimização como a metodologia da superfície de resposta, por exemplo. As variáveis que mais influenciam a eficiência de extração são: tipo de solvente, temperatura, pH, razão material solvente, tamanho da partícula, tempo de extração e a técnica de extração (Pasrija e Anandharamakrishnan, 2015). Segundo Both *et al.* (2014), inicialmente a seleção da matriz vegetal com alta concentração de compostos bioativos é uma tarefa preliminar para garantir alta eficiência da etapa de extração.

A solubilidade é o principal parâmetro a ser analisado quando se deseja alcançar certa concentração do composto bioativo no extrato. Os fatores que mais afetam a solubilidade são temperatura, pressão, natureza química e características físico-químicas do soluto e do solvente (Recharla *et al.*, 2017). Dessa maneira, a escolha do solvente é o primeiro passo na avaliação do método de extração (Zimmermann e Gleichenhagen, 2011). Água, solventes orgânicos e a mistura dos dois em diferentes proporções são amplamente utilizados na extração. Nessa perspectiva, é meritório analisar os benefícios e as limitações de cada tipo de solvente.

Industrialmente, os solventes orgânicos são comumente empregados em processos de extração (Todd e Baroutian, 2017). Diversos trabalhos utilizando solventes orgânicos na extração de compostos bioativos são reportados na literatura como (Hu *et al.* (2016); Náthia-Neves *et al.* (2017); Ngo *et al.* (2017)). Entretanto, a água é um solvente de baixo custo e não deixa resíduos tóxicos. Assim, de modo a evitar uma etapa posterior de remoção do solvente e garantir um produto final livre de resíduos orgânicos, a água se justifica como um solvente viável para extrações com aplicações alimentícias e farmacêuticas (Kumar *et al.*, 2012). O aumento na temperatura pode aumentar a solubilidade e a difusão dos compostos bioativos (Şahin e Şamlı, 2013; Khemakhem *et al.*, 2017). Entretanto, altas temperaturas podem causar degradação térmica das biomoléculas (Xia *et al.*, 2006), desse modo a maioria dos estudos presentes na literatura reportam uma temperatura ótima em torno de 80°C para maximizar a difusão dos compostos bioativos (Liang *et al.*, 2007).

Outro importante parâmetro a ser avaliado na extração é a razão material-solvente uma vez que esse fator geralmente influencia a extração de biomoléculas de matrizes vegetais (Stamatopoulos *et al.*, 2013; Jovanović *et al.*, 2017; Rezende *et al.*, 2017). O aumento da razão solvente-material pode aumentar a eficiência de extração; entretanto, baixas concentrações de compostos bioativos podem ser indesejáveis em etapas futuras de concentração. Particularmente, a quantidade de solvente usado deve ser suficiente para garantir a extração de compostos bioativos. O tamanho da partícula é uma variável considerável na extração de biomoléculas. Estudos anteriores relataram o impacto do tamanho de partícula no

rendimento da extração de compostos bioativos (Asep *et al.*, 2008; Sari e Velioglu, 2011; Vuong, Golding, *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2016; Kuhn *et al.*, 2017).

O tempo de extração é também um fator significativo e pode influenciar o rendimento da extração de compostos bioativos (Vuong, Stathopoulos, *et al.*, 2011). Esse parâmetro depende muito do método de extração empregado e irá impactar tanto a eficiência da extração como o consumo de energia (Horžić *et al.*, 2012; Plaza e Rodríguez-Meizoso, 2013; Cheng *et al.*, 2016; Domínguez-Rodríguez *et al.*, 2017).

A técnica de extração de compostos bioativos mais comum é a extração convencional sólido-líquido, enquanto técnicas avançadas como as extrações assistidas por ultrassom ou micro-ondas e as extrações supercríticas e subcríticas tem sido propostas e se mostram promissoras (Joana Gil-Chávez *et al.*, 2013). A maceração, a percolação, a infusão, a decocção e a extração por aquecimento contínuo são as técnicas de extração convencional mais comuns. Apesar da emergência das técnicas alternativas os processos que empregam extração convencional são mais utilizados devido ao menor custo e maior facilidade de instalação e ampliação (*scale-up*) (Druzyńska *et al.*, 2007).

A utilização da extração assistida por ultrassom no setor de alimentos tem crescido nos últimos anos e sua aplicação é uma demanda industrial por processos mais eficientes e sustentáveis (Vilkhu *et al.*, 2008). Em processos assistidos por ultrassom, há o fenômeno da cavitação que consiste na implosão das bolhas de cavitação formadas no meio líquido. Este fenômeno provoca o aumento da temperatura e da pressão do sistema, promovendo o rompimento da parede celular, favorecendo a penetração do solvente e melhorando o transporte do composto bioativo da fase sólida para a líquida (Caldas *et al.*, 2018). Comparada aos métodos clássicos, a extração ultrassônica tem se tornado vantajosa, devido à preservação de compostos termos sensíveis com extrações eficientes a temperaturas mais baixas, menor gasto energético, menor consumo de solvente e menor tempo de operação (Wu *et al.*, 2001; Xia *et al.*, 2006; Jovanović *et al.*, 2017). A extração assistida por micro-ondas tem se despontado como um método vantajoso para captura de vários compostos ativos de fontes vegetais.

As micro-ondas são absorvidas e convertidas em energia térmica enquanto a onda transita pelo meio (Zhang *et al.*, 2011; Joana Gil-Chávez *et al.*, 2013). Esse processo provoca um grande aumento na agitação molecular causando o aumento da temperatura, vaporização da água interior, rompimento da parede celular da matriz vegetal, melhora da permeabilidade do solvente através da biomassa e consequentemente aumento do rendimento da extração dos compostos de interesse (Banerjee e Chatterjee, 2015; Pinela *et al.*, 2016; Vinatoru *et al.*, 2017).

Cada técnica de extração pode ser mais ou menos eficiente a depender da matriz vegetal, do composto de interesse e de todos os outros parâmetros operacionais envolvidos. Dessa forma, um estudo de otimização do processo é de suma importância.

2.5 Pré-tratamentos macroscópicos para clarificação do extrato

Os pré-tratamentos macroscópicos constituem uma etapa de clarificação preliminar do extrato de modo a reduzir a concentração de sólidos e evitar o rápido decaimento do fluxo durante os processos de separação por membranas. A centrifugação e a decantação podem ser usadas com esse propósito. Os efeitos desse fenômeno sobre a ação da gravidade são acelerados pelo efeito das forças centrífugas. Atualmente a aplicação de coagulantes naturais, como a quitosana e as sementes de *Moringa oleífera* (*M. oleífera*), se mostra um processo importante a ser explorado na clarificação de bebidas.

A quitosana é um polissacarídeo catiônico produzido a partir da desacetilação da quitina e, essa, é um polissacarídeo encontrado no exoesqueleto de crustáceos (Dias *et al.*, 2008). A quitosana já tem sido explorada na clarificação de bebidas como mostra a literatura (Rao *et al.*, 2011; Domingues *et al.*, 2012; Sousa, 2016).

A *M. oleífera* é uma árvore nativa do nordeste da Índia e que tem sido cultivada atualmente em países tropicais (Bhatia *et al.*, 2007; Bhuptawat *et al.*, 2007) como o Brasil.

Em termos da sua aplicação no tratamento de águas, as sementes de *M. oleífera* são efetivas na remoção de materiais suspensos conforme reportaram os seguintes trabalhos de (Al Azharia Jahn (1988); Ndabigengesere e Narasiah (1998); Bhuptawat *et al.* (2007)). A ação da *M. oleífera* como coagulante se dá devido à presença de proteínas catiônicas contidas nas sementes. Essas proteínas são solúveis em água e formam cadeias catiônicas polieletrólíticas que têm o poder de interagir com os sólidos presentes na solução e efetuar o processo de coagulação (Bhatia *et al.*, 2007).

A Figura 2. 2 mostra uma, vagens e sementes de *M. oleífera*. A foto foi tirada de uma árvore situada no campus Santa Mônica da Universidade Federal de Uberlândia.

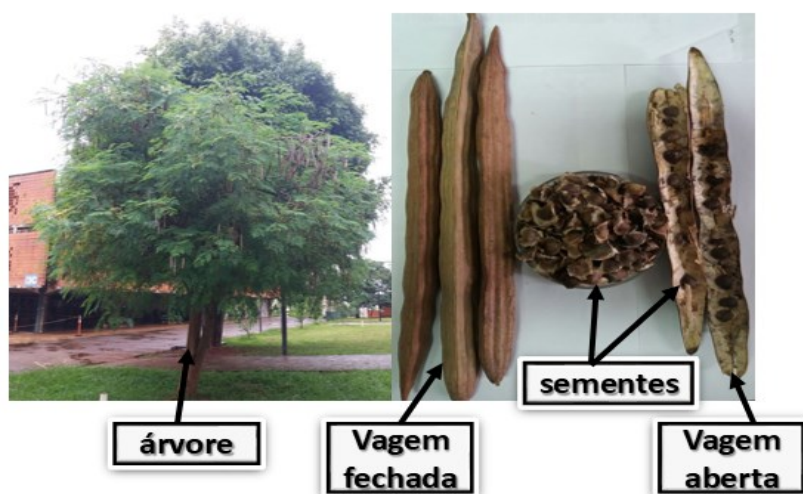


Figura 2. 2 – Árvore, vagens e sementes de *M. oleífera*. (Fonte: Autor)

2.6 Processos de filtração por membranas

A tecnologia das membranas está presente em vários processos industriais. A sua relevância é conhecida na indústria de alimentos, farmacêutica, manufatura e até no tratamento de águas (Nunes e Peinemann, 2006).

A membrana comporta-se como uma barreira seletiva entre duas fases, que, sob a ação de uma força motriz, permite a passagem de uma ou mais espécies selecionadas da fase de alimentação, a qual pode ser uma mistura líquida ou gasosa (Anadão, 2010).

A Figura 2. 3 apresenta um esquema de dois diferentes processos de separação por membranas. Esses processos se diferenciam pela forma em que a alimentação se coloca.

No processo *dead-end* a alimentação é feita perpendicularmente à membrana, já no processo *cross-flow* a alimentação é realizada paralelamente à membrana.

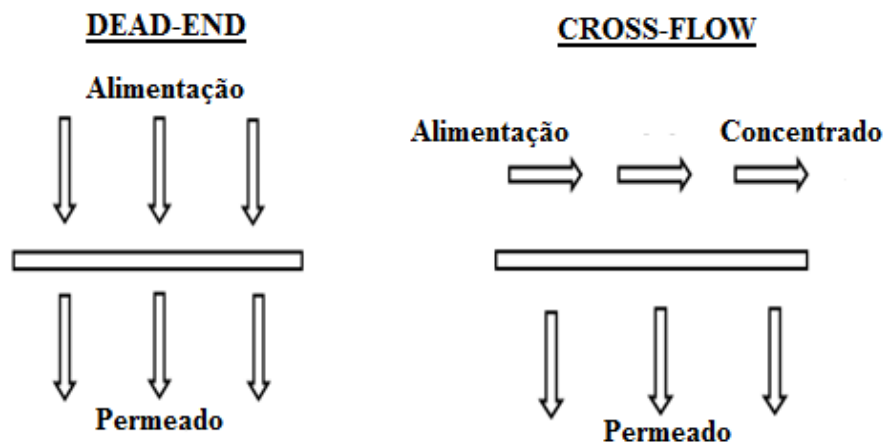


Figura 2. 3 - Esquema de filtração dead-end e cross-flow. (Baseado em (Strathmann (1981); Habert (2006); Kubota *et al.* (2008))

Os processos de separação por membranas apresentam vantagens em relação aos processos de separação tradicionais: são de simples operação, seletivos, geralmente operados à temperatura ambiente e por isso podem ser empregados para separação de compostos termolábeis e, além disso, são considerados econômicos pois são energeticamente favoráveis (Habert *et al.*, 2006).

2.6.1 Materiais para a produção de membranas

As membranas comerciais são produzidas a partir de diferentes tipos de materiais. A aplicação da membrana e sua eficiência durante o processo de filtração estão diretamente relacionadas à constituição da membrana e suas características.

As membranas podem ser classificadas de acordo com sua morfologia como mostrado na Figura 2. 4.

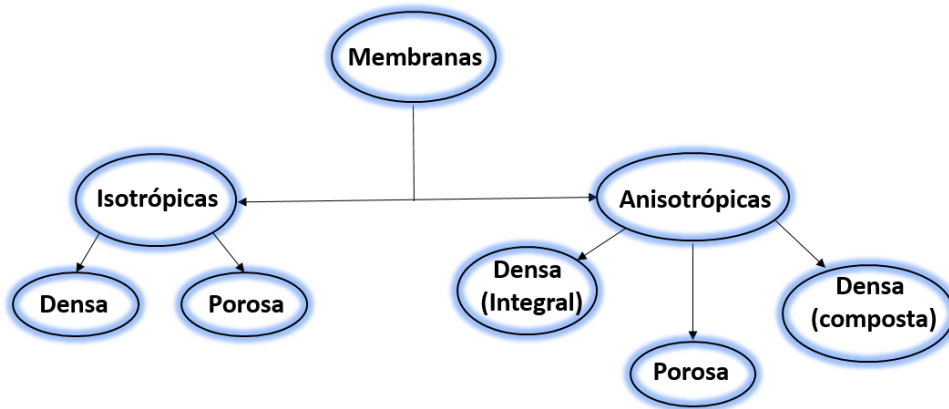


Figura 2. 4 - Classificação das membranas de acordo com a morfologia. (Baseada em (Scott (1995); Habert *et al.* (2006); Lalia *et al.* (2013); Starov (2017))

Na Figura 2. 5 é apresentado um esquema com alguns dos materiais comumente utilizados na produção de membranas sintéticas.

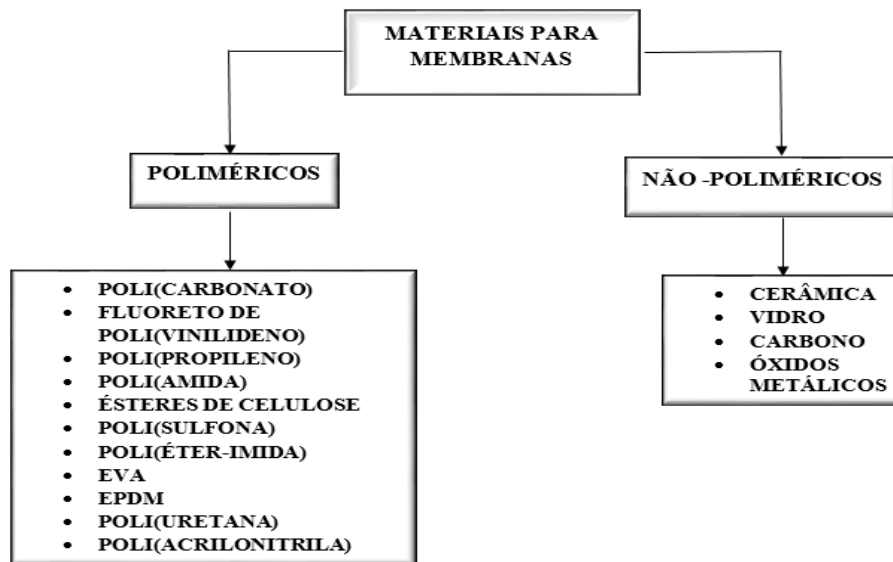


Figura 2. 5 – Materiais usualmente empregados na produção de membranas. (Baseada em (Strathmann (1981); Scott (1995); Habert *et al.* (2006); Beltsios *et al.* (2008))

As membranas podem ser divididas em dois grandes grupos: biológicas e sintéticas. As membranas comerciais, ou mesmo as produzidas em escala de laboratório, são sintéticas e são classificadas pelas constituídas por materiais poliméricos (orgânicos) e por aquelas constituídas por materiais não-poliméricos (inorgânicos) (Mulder, 1996). Todavia, as membranas não-poliméricas são de mais fácil limpeza e apresentam maior durabilidade (Habert *et al.*, 2006).

2.6.2 Processo de Separação por membranas que envolvem gradiente de pressão como força motriz.

Os processos de separação por membranas que usam gradiente de pressão como força motriz apresentam diversas aplicações e serão discriminados a seguir.

A Microfiltração (MF) é uma técnica de separação que utiliza membranas com diâmetro de poro entre 0,1 e 10 μm e é capaz de remover partículas micrométricas. O fluido passa através dos caminhos tortuosos existentes, já as partículas são retidas na superfície do filtro. O gradiente de pressão formado entre os dois lados da membrana gera a força motriz que atua no processo (Anadão, 2010). Como as membranas de MF são relativamente abertas, as pressões empregadas como força motriz para o transporte são pequenas e dificilmente ultrapassam 3 bar (Habert *et al.*, 2006).

A ultrafiltração (UF) é um processo de separação por membranas utilizado frequentemente para purificar e/ou separar soluções que contém partículas com grande massa molecular e também colóides, de massa molar variando de 103 a 106 Dalton. Os poros das membranas de UF variam de 1 a 100 nm de tamanho, logo, são mais fechadas que as membranas de microfiltração. É necessária uma maior força motriz para que haja a separação dos compostos e que o fluxo não seja muito pequeno e seja possível a utilização da UF na indústria, sendo que seus poros são menores que os de membranas de microfiltração. As pressões utilizadas nesse tipo de processo operam numa faixa que varia de 1 a 10 bar (Habert *et al.*, 2006).

A nanofiltração (NF) se caracteriza pela separação de sais e solutos orgânicos de massa molecular maiores que 500 Dalton, sendo um processo movido por gradiente de pressão, bem como a MF e a UF com tamanho de poros, fluxos de

permeados e pressões de operação que se encontram entre a UF e a Osmose Inversa (OI).

Os sistemas de nanofiltração geralmente operam em menores pressões (5-25 bar) e, por isso, esse processo apresenta vantagem econômica sobre a osmose inversa (Schaefer *et al.*, 2005; Habert *et al.*, 2006).

A osmose inversa (OI) é um processo de separação em que um solvente é separado de um soluto por uma membrana permeável ao solvente e impermeável ao soluto. Isso ocorre quando se aplica uma grande pressão sobre este meio aquoso, o que contraria o fluxo natural da osmose. Esses sistemas devem operar com pressões de próximas a 70 bar. (Fell, 1995)

O Quadro 2.1 apresenta algumas aplicações para os principais processos de separação por membranas que usam gradiente de pressão como força motriz.

Quadro 2. 1 - Processos de separação com membranas comerciais (adaptado de Habert *et al.* (2006)).

Processo	Força Motriz	Material Retido	Material que Permeia	Aplicações
Microfiltração (MF)	ΔP (0,5-3 bar)	Material em suspensão, bactérias	Água e sólidos dissolvidos	Esterilização bacteriana; clarificação de vinhos e cervejas; concentração de células; oxigenação de sangue.
Ultrafiltração (UF)	ΔP (1-10 bar)	Colóides, Macromoléculas. Massa molar > 5000 Da.	Água (solvente, sais solúveis de baixa massa molar.	Fracionamento/concentração de proteínas, recuperação de pigmentos/óleos.
Nanofiltração (NF)	ΔP (5-25 bar)	Moléculas de massa molar média (500 <MM> 2000) Da.	Água, sais e moléculas de baixa massa molar.	Purificação de enzimas; biorreatores a membrana.
Osmose Inversa (OI)	ΔP (15-70 bar)	Todo material solúvel ou em suspensão.	Água (solvente)	Dessalinização

2.6.3 Polarização por concentração e *fouling*

A polarização por concentração ocorre porque a membrana tem a característica de transportar alguns solutos e reter outros em sua superfície (Noble e Stern, 1995). O acúmulo de moléculas na superfície da membrana pode aumentar a resistência do processo de separação e diminuir o fluxo do permeado. Quando a formação da torta é considerável, pode haver a formação da camada gel (Mulder, 1996), conforme apresenta a Figura 2. 6.

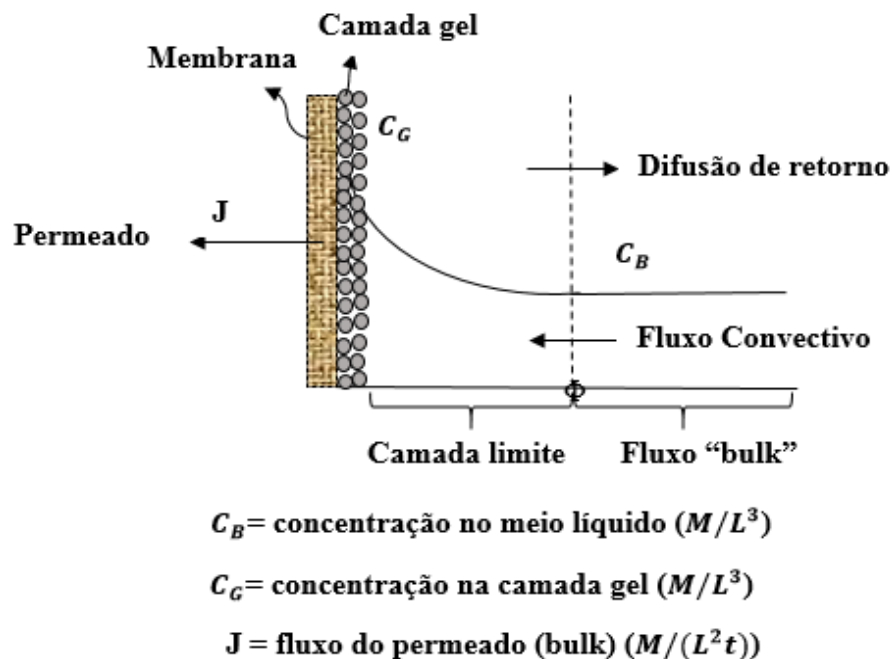


Figura 2. 6 - Perfil da polarização por concentração e formação da camada gel. Baseada em (Noble e Stern (1995); Mulder (1996); Baker (2004a); Koh *et al.* (2013)).

Fouling é o termo usado para descrever a queda do fluxo do permeado causado pela deposição de sólidos na superfície da membrana (Belfort e Altena, 1983).

É preciso distinguir a concentração por polarização de *fouling*. Concentração por polarização é um fenômeno reversível que ocorre quando o processo se inicia e depois atinge um equilíbrio enquanto *fouling* é frequentemente um processo irreversível.

Entretanto, tanto a concentração por polarização quanto o *fouling* causam um aumento na resistência ao transporte do solvente e também do soluto. Então a

equação do fluxo permeado (J) através da membrana assume a seguinte forma (Equação 4.1).

$$J = \frac{\text{Força Motriz}}{\text{viscosidade.resistência total}} \quad (4.1)$$

No caso de microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração e osmose inversa, essa relação se apresenta como se segue (Equação 4.2)

$$J = \frac{\Delta P}{\eta \cdot R_{tot}} \quad \text{onde } R_{tot} = R_m + R_a + R_p + R_c + R_{pc} \quad (4.2)$$

Sendo:

η = Viscosidade aparente do permeado;

R_m = resistência intrínseca da membrana;

R_a = resistência devido a adsorção;

R_p = resistência devido ao bloqueio dos poros;

R_c = resistência devido a formação de torta ou camada gel;

R_{pc} = resistência devido ao fenômeno de polarização por concentração;

A Figura 2. 7 mostra esquematicamente os principais mecanismos de *fouling* responsáveis pelo decaimento do fluxo.

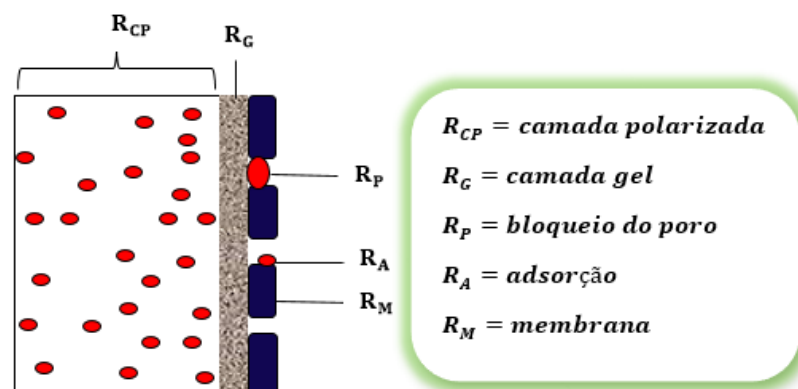


Figura 2. 7 – Resistências ao transporte de massa através de membranas. Baseado em (Noble e Stern (1995); Nath (2008); Foley (2013); Koh *et al.* (2013))

2.6.4 Módulo de membranas

O módulo é definido como a unidade física, que reúne todos os elementos participantes do processo de separação por membranas. Os tipos de módulos mais comuns são: com placas de membrana, tubulares, espirais, com fibras ocas e com discos rotatórios (Anadão, 2010). A Figura 2. 8 apresenta um desenho esquemático de um módulo de filtração por membranas.

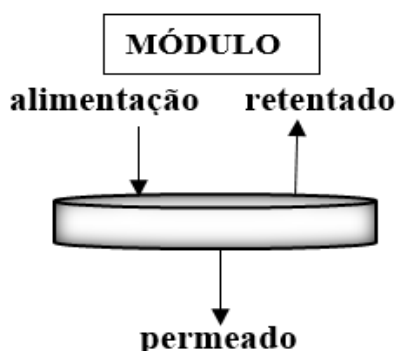


Figura 2. 8 - Desenho esquemático de um módulo de filtração por membranas.

Baseado em (Cheryan (1998); Baker (2004b); Foley (2013))

2.6.5 Utilização de processo de separação por membranas para produção de bebidas

Encontram-se disponíveis na literatura diversos trabalhos que reportam o uso dos processos de separação por membranas na clarificação, concentração e purificação de compostos bioativos presentes em sucos de frutas e em chás, especialmente os chás provenientes da planta *Camellia sinensis*.

Kawakatsu *et al.* (1995) avaliaram o uso da microfiltração e ultrafiltração na clarificação do extrato de chá verde e observaram que a redução do tamanho do poro ocasiona a diminuição da massa seca obtida no permeado. Por ultrafiltração houve rejeição de 30-50% de pectina, 3-11% de catequinas e 7-11% de cafeína. A membrana de 30 kDa foi preferida uma vez que apresentou boa reprodutibilidade para a repetição do processo de clarificação.

No trabalho de Peng Xiang e Shu Ping (2001) os autores avaliaram a capacidade de permeação do extrato de chá verde através de um microfiltro cerâmico sob condições de funcionamento diferentes. Neste trabalho foi estudado o efeito dos parâmetros de funcionamento tais como a pressão e a temperatura de filtração no fluxo. Os resultados mostraram que a clarificação do extrato de chá verde aumentou acentuadamente após um pré-tratamento através da filtração com de membrana cerâmica de 0,05 µm. Como não houve efeitos significativos nos índices físico-químicos por condição de operação, os autores adotaram a maior pressão e temperatura para a filtração de extrato de chá verde.

Todisco *et al.* (2002) estudaram a retenção dos compostos fenólicos na clarificação do chá preto com o uso membranas cerâmicas e avaliando simultaneamente os mecanismos de transferência de massa. Diferentes condições operacionais foram empregadas como vazão, temperatura e pressão e, para tal, uma membrana de 40 kDa foi aplicada.

Tao *et al.* (2004) avaliaram o efeito da filtração por membranas cerâmicas no tratamento de infusões de chá verde. O estudo mostrou que o fluxo de permeação da membrana diminuiu muito na fase inicial e, em seguida, variou suavemente. A análise das taxas de retenção dos principais compostos pela membrana cerâmica de 0,2 µm mostrou que as taxas de retenção de polifenóis, aminoácidos e cafeína eram relativamente baixas, enquanto que as taxas retenção de proteína e pectina eram maiores.

No trabalho de Li *et al.* (2005), os autores avaliaram o uso de resina de adsorção no processo de concentração de compostos fenólicos presentes no chá verde. Após a ultrafiltração foi observado mais de 40% dos fenólicos totais no permeado. Após a adsorção com resina o produto final apresentou mais de 90% dos compostos fenólicos iniciais.

Aragão (2010) estudou a concentração de compostos bioativos empregando o processo de micro, ultra e nanofiltração da polpa de caju utilizando membranas poliméricas. Avaliou a influência do tratamento enzimático sob o fluxo de permeado e retentado, visando concentrar compostos como fenólicos, ácido ascórbico e carotenoides. Nas membranas analisadas houve uma retenção de até 54 % de taninos e 100% de carotenoides.

Rao *et al.* (2011) investigaram o uso da ultrafiltração, sílica em gel e quitosana na clarificação do extrato de chá verde. Enquanto o tratamento com sílica gel e quitosana não reduziu significativamente o teor de proteínas, a ultrafiltração empregando uma membrana de 10 kDa diminuiu o teor de proteínas de 11,36 para 5,86 mg/100 mL. Os autores observaram a estabilização da intensidade da cor e da concentração de compostos fenólicos armazenados sob refrigeração durante 60 dias.

Domingues *et al.* (2014) avaliaram alguns pré-tratamentos (centrifugação, liquefação enzimática e quitosana) e a microfiltração no processo de clarificação do suco de maracujá. Os autores concluíram que a quitosana se mostrou um agente clarificante eficiente promovendo uma maior redução da cor e da turbidez dentre os pré-tratamentos avaliados. Concluíram ainda que a microfiltração utilizando membranas em fibras foi capaz de produzir um suco limpo, reduzindo 95% da turbidez e 74% da cor.

Sousa *et al.* (2016) avaliaram a ultrafiltração assistida por ultrassom na purificação de polifenóis provenientes das folhas de chá verde. Na comparação entre os processos com e sem ultrassom, os autores concluíram que o fluxo em estado estacionário na membrana de 5 kDa foi 4 vezes maior na ultrafiltração assistida por ultrassom do que na não assistida por ultrassom. Já na comparação entre membranas de ultrafiltração de diferentes porosidades os autores concluíram que a membrana de 20 kDa apresentou alta pureza de catequina no permeado (49% de EGCG) e portanto a mesma foi sugerida para a purificação de compostos fenólicos a partir de extrato de chá verde, a fim de garantir grande fluxo de permeado, pureza de compostos fenólicos e estabilidade do extrato.

Capítulo 3

Material e métodos

O presente capítulo faz uma abordagem detalhada sobre o material e os métodos empregados no processamento, caracterização, extração, clarificação e purificação dos polifenóis contidos nas folhas de chá verde. Nesse sentido, a Figura 3. 1 apresenta o fluxograma dos processos desenvolvidos nesse trabalho.

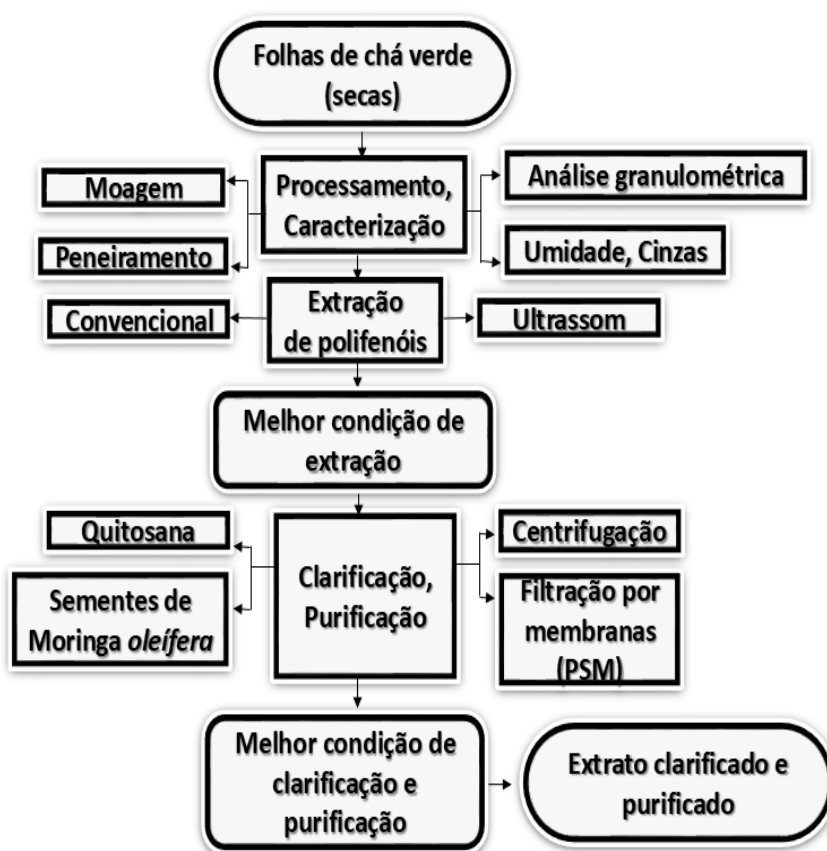


Figura 3. 1 – Esquema das etapas desenvolvidas nesse trabalho.

3.1 Matéria Prima

As folhas de chá verde (*Camellia sinensis*) da marca Yamamotoyama do Brasil foram adquiridas no comércio local (Uberlândia - MG, Brasil). Eram folhas secas, trituradas e vendidas a granel. Em laboratório, foi feita a moagem, o peneiramento e

a classificação granulométrica. O material final foi colocado em um recipiente plástico com tampa e esse foi acondicionado em local seco e livre de luminosidade.

3.2 Processamento e caracterização das folhas de chá

3.2.1 Moagem, peneiramento e análise granulométrica

Bateladas de aproximadamente 242 g de chá verde foram trituradas em um multiprocessador doméstico (Mega Star, 60Hz, 500W) por 5 min. O peneiramento da amostra foi feito em agitador eletromagnético (Bertel Tuv, Brasil) por 15 min empregando um conjunto de peneiras (Granouest inox 8x2') que apresentavam a sequência de mesh: 270, 100, 48, 35, 24, 16, 9 e 7, que corresponde, respectivamente, às faixas 0,05-0,15, 0,15-0,32, 0,32-0,5, 0,5-0,74, 0,74-1,19, 1,19-2,19 e 2,19-2,83 mm. O diâmetro médio de Sauter (d_{ps}) é o diâmetro da partícula cuja relação superfície/volume é a mesma para todas as partículas e foi calculado pela Equação (1).

$$d_{ps} = \frac{1}{\sum \frac{x_i}{d_i}} \quad (1)$$

Sendo x_i a fração a fração mássica retida na peneira de diâmetro d_i .

3.2.2 Umidade

A umidade das folhas de chá verde foi determinada por método gravimétrico da AOAC International conforme descrito por Al-Mentafji (2016). Inicialmente, cápsulas de porcelana foram secas na estufa (Biomatic, Brasil) a 105°C por 1 h. Em seguida, as cápsulas de porcelana secas e de massa conhecida, contendo 5 g de amostra, foram colocadas na estufa a 105°C. Posteriormente, a amostra foi resfriada no dessecador até a temperatura ambiente e pesada na balança analítica (Shimadzu AX 200, Brasil). O procedimento, de aquecimento e resfriamento, foi repetido até que a amostra atingisse massa constante.

O percentual de umidade das amostras, em base seca (b.s.), foi calculado de acordo com a Equação (2).

$$X = \frac{m_0 - m_f}{m_f} \times 100 \quad (2)$$

Sendo que X representa a umidade da amostra e m_0 e m_f são a massa da amostra antes e depois da secagem em estufa, respectivamente.

3.2.3 Cinzas

A análise de cinzas foi feita seguindo a metodologia da AOAC International conforme descrito por Al-Mentafji (2016). Inicialmente, pesou-se 5 g de amostra em uma cápsula de porcelana, de massa conhecida, previamente aquecida em estufa a 105°C. Em seguida, as amostras foram colocadas na mufla a 550°C por 5h. Em sequência, resfriou-se as amostras no dessecador até a temperatura ambiente, para depois serem pesadas para a obtenção da massa de cinzas. A porcentagem de cinzas foi determinada utilizando-se a Equação (3).

$$C = \frac{N}{P} \times 100 \quad (3)$$

Sendo, C o teor de cinzas (g), N a massa de cinzas (g) e P a massa de amostra (g).

3.3 Preparo do extrato de chá

3.3.1 Extração Convencional

Os experimentos de extração convencional de polifenóis totais foram conduzidos em um reator encamisado de 200 mL acoplado a um banho termostaticado (Tecnal TE – 184, Brasil) para controle da temperatura e a uma chapa (IKA C – MAG HS7, Brasil) para agitação magnética (120 rpm) e controle da

temperatura interna da amostra através de um termômetro digital, conforme apresentado na Figura 3. 2. A temperatura experimental considerada era a temperatura do interior amostra com tolerância de $\pm 1^\circ\text{C}$. Além disso, a agitação melhora o transporte difusivo do composto bioativo, uma vez que evita que grande parte das partículas aderissem ao fundo do recipiente.

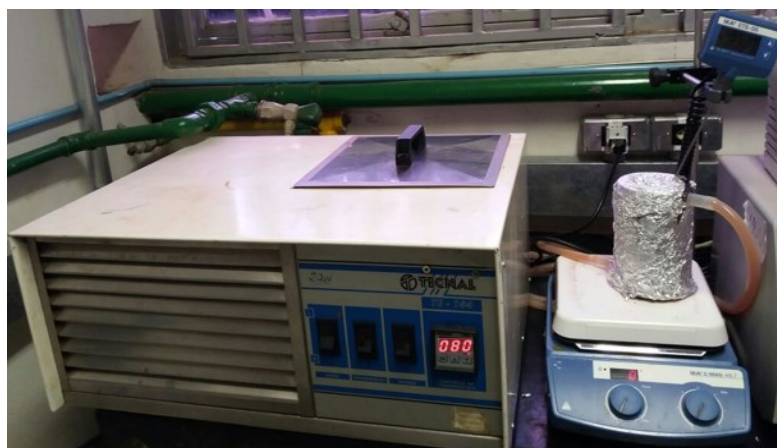


Figura 3. 2 – Sistema de extração convencional

A Figura 3. 3 ilustra as etapas do processo de extração convencional utilizadas neste trabalho. Foram avaliadas as melhores condições de granulometria, razão chá-água, tempo e temperatura para maximizar a extração de polifenóis totais.

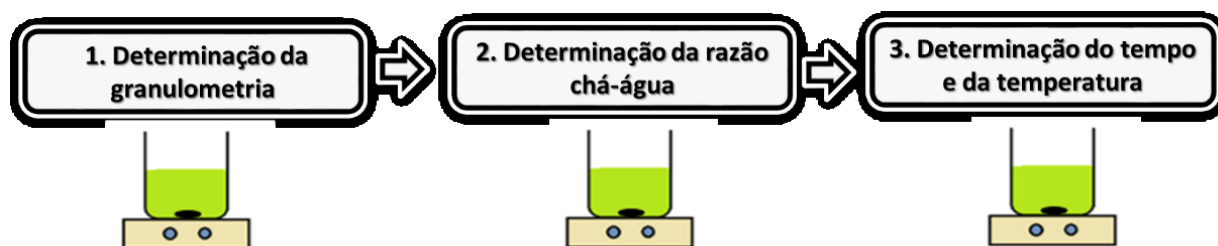


Figura 3. 3 - Esquema do processo de extração convencional sequencial

A escolha da condição inicial do processo de otimização da extração de polifenóis como mostra o esquema sequencial na Figura 3. 3 baseou-se nos valores de 80°C por 30 min e 50 g L^{-1} conforme sugerido por (Vuong, Golding, *et al.*, 2011) e (Kumar *et al.*, 2012) respectivamente. As etapas do processo serão descritas a seguir.

3.3.1.1 Efeito da granulometria na extração de polifenóis

O impacto do tamanho das partículas na extração de polifenóis do chá verde foi avaliado em relação à concentração final de polifenóis totais no extrato para cada faixa de tamanho de partícula. A extração aquosa foi conduzida à 80°C por 30 min em uma razão chá-água de 50 g L⁻¹ utilizando partículas nas seguintes faixas de 0,05-0,15, 0,15-0,32, 0,32-0,5, 0,5-0,74, 0,74-1,19, 1,19-2,19 e 2,19-2,83 mm.

3.3.1.2 Efeito da razão chá-água na extração de polifenóis

A influência da razão chá-água foi analisada variando-a de 10 a 120 g L⁻¹ para extrações à 80°C por 30 min, determinando-se desse modo a razão chá-água que garantisse a melhor eficiência do processo sequencial, ou seja, impactando as etapas de extração, clarificação/purificação e finalmente a concentração de polifenóis através da tecnologia de separação por membranas.

3.3.1.3 Efeito do tempo e da temperatura na extração de polifenóis

Determinou-se o tempo e a temperatura de infusão ideais para extração convencional, ou ainda, os valores de parâmetros capazes de promover a maior extração de tais compostos bioativos evitando a termo degradação. O preparo do chá foi realizado utilizando-se uma razão chá-água de 50 g L⁻¹ e variando-se o tempo de 10 a 120 min e a temperatura de 40 a 90°C.

3.3.2 Extração ultrassônica

A extração ultrassônica foi executada com o auxílio de uma sonda ultrassônica (Cleaner Probe) de 20 KHz e 500 W acoplada a um reator encamisado de 200 mL e a um banho termostaticado (Tecnal TE – 184, Brasil) para controle da temperatura. A temperatura do interior da amostra foi conferida com um termômetro digital ligado à

chapa de agitação (IKA C – MAG HS7, Brasil) (120 rpm) conforme apresentado na Figura 3. 4.



Figura 3. 4 – Sistema de extração com sonda ultrassônica

Adicionalmente, a Figura 3. 5 mostra as etapas do processo de extração sequencial de polifenóis totais com auxílio de sonda ultrassônica efetuadas neste trabalho. Foram avaliadas as melhores condições de razão chá-água, temperatura, amplitude e tempo.

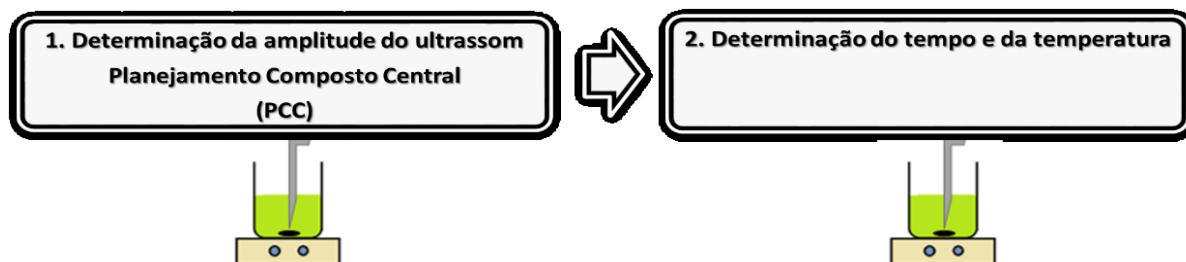


Figura 3. 5 - Esquema do processo de extração sequencial com sonda ultrassônica

Para extração dos compostos bioativos presentes nas folhas de chá verde com sonda ultrassônica, conforme a Figura 3. 5, baseou-se a escolha das condições de extração nos valores apresentados na literatura (Segovia *et al.* (2016); Sharmila *et al.* (2016)). As etapas desse processo sequencial serão discriminadas a seguir.

3.3.2.1 Planejamento composto central (PCC)

Para verificação das variáveis significativas e determinação da melhor amplitude de extração de extração de polifenóis e flavonóides totais, foi feito um planejamento composto central (PCC), com três réplicas no ponto central, com alfa de ortogonalidade ($\alpha = 1,3531$) a um nível de significância de 95%. Conforme a Tabela 3. 1, para bateladas de 30 min variou-se a temperatura de 22 °C a 83 °C, à razão chá-água de 12 a 73 g L⁻¹ e à amplitude de 23 a 77%.

Tabela 3. 1- Níveis codificados e reais para o planejamento composto central

Nível codificado	Temperatura (°C)	Razão chá-água (g L ⁻¹)	Amplitude (%)
-1,3531	22	12	23
-1	30	20	30
0	52,5	42,5	50
1	75	65	70
1,3531	83	73	77

3.3.2.2 Efeito do tempo e temperatura na extração de polifenóis

Similarmente à extração convencional, determinou-se o tempo e a temperatura de infusão ideal para extração com sonda ultrassônica, ou seja, capazes de extrair a maior quantidade de polifenóis evitando a termo degradação. O preparo do chá foi realizado utilizando uma razão chá-água de 50 g L⁻¹, a amplitude de 77% definida no planejamento experimental e variando o tempo de 10 a 120 min e a temperatura de 40 a 90°C.

3.4 Clarificação do extrato de chá verde

Três procedimentos diferentes (T1, T2 e T3) foram realizados com o objetivo de clarificar o extrato de chá verde recém-preparado através da extração convencional

na condição de 50 g L⁻¹, 80 °C por 60 min, conforme mostra o fluxograma na Figura 3. 6.

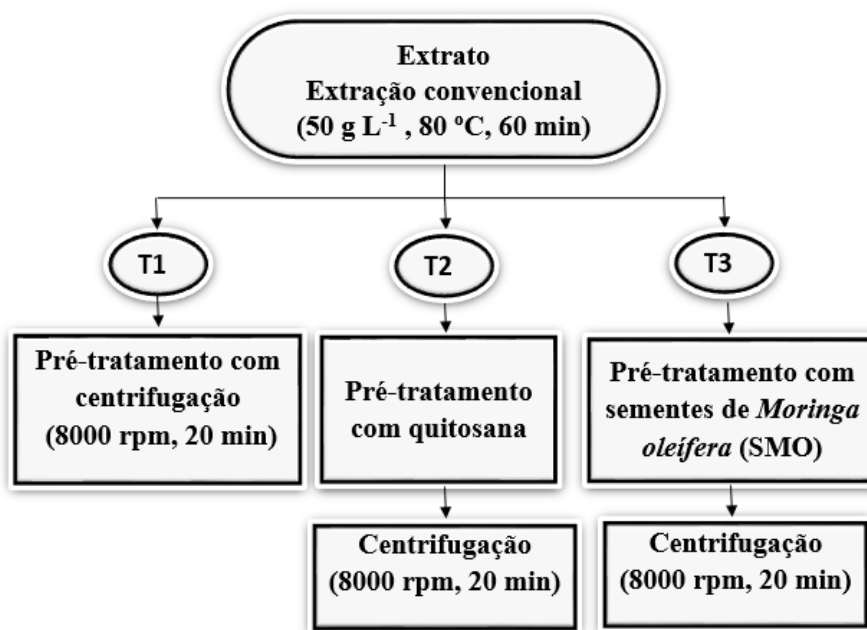


Figura 3. 6 - Procedimentos para clarificação do extrato de chá verde

Os procedimentos apresentados na Figura 3. 6 serão discriminados a seguir.

3.4.1 Centrifugação (T1)

Um volume de extrato de chá verde recém preparado foi centrifugado a 8000 rpm por 20 min conforme sugestão de Rao *et al.* (2011), sendo utilizado o sobrenadante para análise dos parâmetros estudados.

3.4.2 Quitosana e Centrifugação (T2)

Conforme ilustrado na Figura 3. 7, inicialmente uma solução de quitosana 10 g L⁻¹ foi preparada hidrolisando-se a quitosana (Sigma-Aldrich, Brasil) (na figura está quitosana da polyamar VER) em uma solução de ácido acético 5% (v/v) (Exodo Científica) com pureza de 99,7%. Com o auxílio de um agitador magnético a 120 rpm, a hidrólise foi efetuada a temperatura ambiente por 5 h.

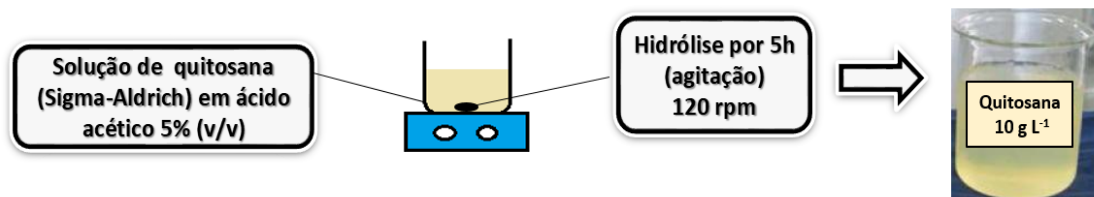


Figura 3. 7 – Preparo da solução de quitosana 10 g L⁻¹

Para os testes com quitosana, foi utilizado um aparato de *jar test* (Milan[®] JT-203, Brasil) mostrado na Figura 3. 8.



Figura 3. 8 – Aparato *jar test* utilizado nos testes com quitosana.

Amostras de 50 mL de chá recém preparadas foram adicionadas a béqueres de 250 ml, para cada béquer foi adicionado um volume diferente da solução de quitosana 10 g L⁻¹, resultando em diferentes concentrações finais de quitosana (25-2000 mg L⁻¹). Os parâmetros de operação do *jar test* (Milan[®] JT-203, Brasil) foram: 50 rpm de velocidade de rotação e 20 min de tempo de rotação conforme sugerido por Domingues *et al.* (2012). Após o término da agitação, os extratos com quitosana foram centrifugados a 8000 rpm e 25°C por 20 min seguindo a recomendação de Rao *et al.* (2011). Ao final, as alíquotas foram retiradas do sobrenadante para análises posteriores.

3.4.3 Sementes de *Moringa oleífera* (SMO) e Centrifugação (T3)

Como ilustra a Figura 3. 9, foi preparada uma solução de sementes de *Moringa oleífera* (SMO) desengorduradas na concentração de 50 g L⁻¹. Inicialmente efetuou-se a retirada do óleo das sementes utilizando-se um aparato de *Soxhlet*. Para retirada

do óleo, as sementes de *Moringa oleifera* (SMO) previamente descascadas e esmagadas foram colocadas em um Soxhlet com solvente n-hexano (Dinâmica, Brasil) com 95% de pureza por um período de 6 h.

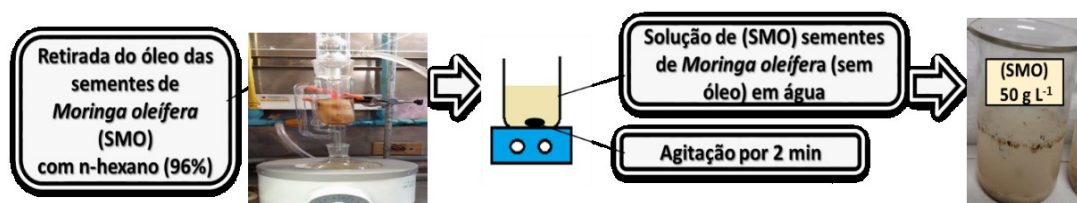


Figura 3. 9 – Preparo da solução de sementes de *Moringa oleifera* (SMO).

Para os testes com SMO, foi utilizado também um equipamento de *jar test*. Amostras de 50 mL de chá recém preparadas foram adicionadas a frascos de erlenmeyer de 250 mL, para cada erlenmeyer foi adicionado um volume diferente da solução de sementes de *Moringa oleifera* (SMO) 50 g L⁻¹, resultando em diferentes concentrações finais de SMO (100-10.000 mg L⁻¹). Os parâmetros de operação do shaker foram determinados em duas etapas de agitação: a primeira de agitação rápida (150 rpm por 5 min) e a segunda de agitação lenta (30 rpm por 30 min) conforme sugerido por (Bhatia *et al.*, 2007). Após o término da agitação, semelhantemente ao tratamento com quitosana, os extratos com SMO foram centrifugados a 8000 rpm e 25 °C por 20 min seguindo a recomendação de Rao *et al.* (2011). Ao final as alíquotas foram retiradas do sobrenadante para análises posteriores.

3.5 Processos de filtração por membranas

3.5.1 Módulos e membranas utilizados

A Figura 3. 10 apresenta o esquema do sistema empregado nos processos de filtração do chá verde. Diferentes módulos de membranas foram acoplados ao sistema apresentado na Figura 3. 10, conforme apresentados a seguir.

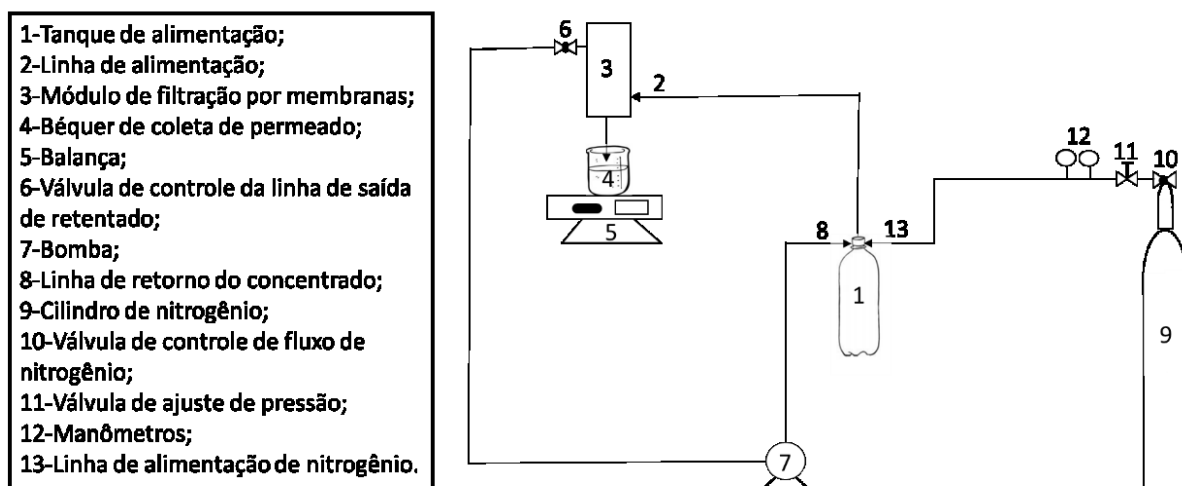


Figura 3. 10 – Sistema utilizado nos processos de filtração do chá verde.

A Figura 3. 11 apresenta o módulo de inox planar que foi utilizado na microfiltração do chá verde através da membrana comercial (Millipore) plana de acetato de celulose de porosidade 0,22 μm em sistema *cross-flow*.

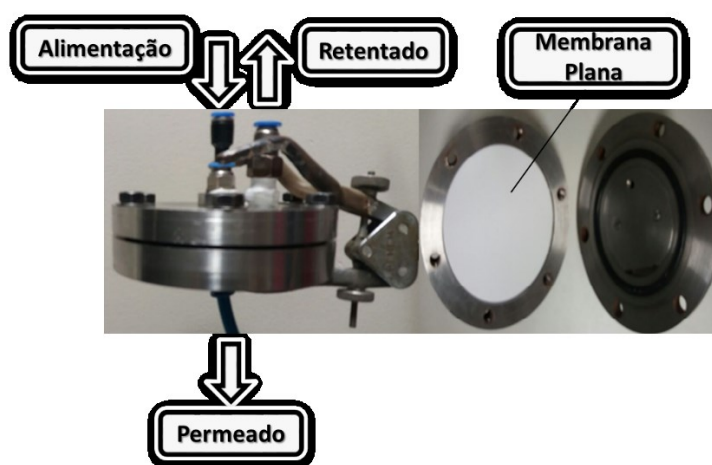
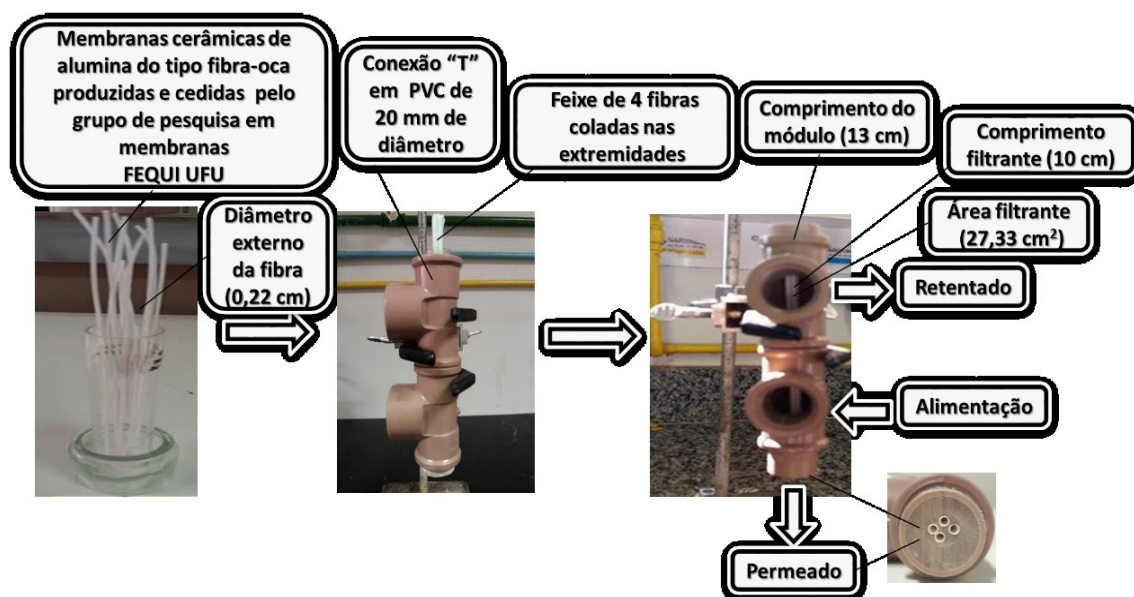
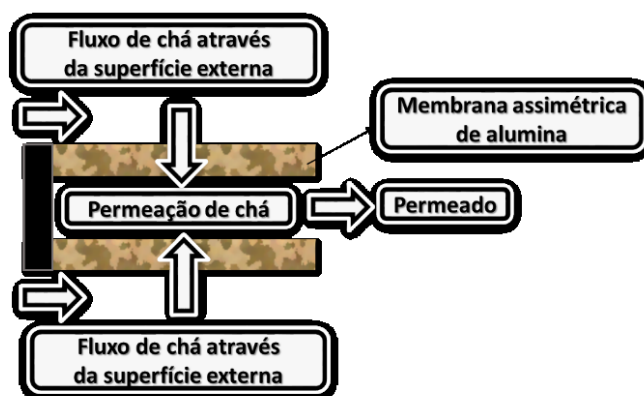


Figura 3. 11 – Módulo planar utilizado na microfiltração do chá verde.

Um módulo de membranas cerâmicas do tipo fibra oca (cartucho) com e sem revestimento polimérico foram também utilizados na filtração do extrato de chá. As fibras ocas de alumina, produzidas e cedidas pelo Grupo de Pesquisa em Membranas da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia, foram acopladas a um cartucho produzido em laboratório conforme mostra a Figura 3. 12.



a)



b)

Figura 3. 12 – a) Esquema da construção do cartucho para a filtração de chá verde, b) Mecanismo de transporte através da membrana assimétrica de alumina do tipo fibra-oca dentro do cartucho.

O cartucho (módulo de membranas de fibra oca) foi construído com um feixe de quatro fibras ocas com um comprimento de 13 cm e um diâmetro externo de aproximadamente 0,22 cm cada uma. As fibras foram coladas em duas conexões "T" de policloreto de vinila (PVC) (Krona de 20 (1/2) NBR 5648, Brasil) usando adesivo plástico para tubos de PVC (Krona, Brasil), resina acrílica (Vipiflash, Brasil) e três junções em PVC (Polyvin de 20 (1/2) NBR 5648, Brasil). Uma extremidade das fibras foi selada com a mesma resina, enquanto a outra foi cortada após colagem de forma

que as fibras permaneceram abertas para coleta do permeado. O comprimento filtrante de cada fibra era de aproximadamente 10 cm e a área total filtrante das 4 fibras era de $2,7 \times 10^{-3} \text{ m}^2$. O cartucho foi conectado ao sistema de filtração, conforme apresentado na Figura 3. 12.

3.5.2 Microfiltração

As microfiltrações foram realizadas com extratos de chá verde recém-preparados utilizando apenas a centrifugação (T1) como etapa de pré-tratamento macroscópico. As microfiltrações, tanto para a membrana plana de $0,22 \text{ }\mu\text{m}$ (S3) quanto para a fibra oca de alumina sem revestimento polimérico (S4) foram executadas a 0,8 bar em sistema *cross-flow* conforme mostra a Figura 3. 10 com valores de $3,6 \times 10^{-3}$ e $2,7 \times 10^{-3} \text{ m}^2$ para área de filtração e $4,79 \text{ cm s}^{-1}$ para a velocidade de *cross-flow* (v_{cf}) para a membrana plana de $0,22 \text{ }\mu\text{m}$ (S3) e para a fibra oca de alumina (S4). Para o experimento, colocou-se um volume de 450 mL de extrato de chá verde dentro do frasco de alimentação e o módulo planar (Figura 3. 11) e o cartucho (Figura 3. 12) foram conectados ao sistema de filtração (Figura 3. 10) para a execução das microfiltrações S3 e S4, respectivamente. Para se interromper os processos de microfiltração foi utilizado um fator de concentração (F_c) igual a 1,5. Esse parâmetro foi definido pela razão entre o volume alimentado (V_a) e o volume alimentado (V_a) menos o volume permeado (V_p), conforme mostra a Equação (4).

$$F_c = \frac{V_a}{V_a - V_p} \quad (4)$$

3.5.3 Filtração sequencial

A alimentação deste processo foi o permeado do processo de microfiltração utilizando a membrana cerâmica do tipo fibra oca (S4). A ultrafiltração foi executada a 1,5 bar, em sistema *cross-flow* com velocidade de *cross-flow* (v_{cf}) igual a $4,79 \text{ cm s}^{-1}$ utilizando um cartucho construído de forma semelhante à descrita pela Figura 3. 12. Para esse processo as membranas de alumina do tipo fibra oca receberam

recobrimento polimérico. Esse recobrimento foi preparado empregando o método de inversão de fase por imersão/precipitação seguindo a metodologia de Halek *et al.* (2015) com adaptações. Inicialmente uma solução polimérica foi preparada utilizando como base Poliéter éter sulfona (PES) $MM=58.000 \text{ g mol}^{-1}$ (Veradel® 3000 P), Dimetil acetato (DMAC) (Merk, Brasil) como solvente e Polivinil pirolidona (PVP) $MM = 25 \text{ g mol}^{-1}$ (Merk, Brasil) como agente formador de poros. A mistura foi colocada em um frasco com tampa e mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente por aproximadamente 4 h para completa dissolução do polímero. As fibras, uma de cada vez, foram imersas instantaneamente na solução preparada contendo PES, DMAC e PVP e, então, retiradas e imersas em aproximadamente 150 mL de água destilada para a inversão de fase do polímero. Após a inversão de fase, todas as fibras foram retiradas e colocadas conjuntamente em outro recipiente contendo aproximadamente 5 L de água destilada e mantidas por um dia para a remoção do solvente residual. Finalmente, as fibras foram condicionadas em estufa à 40°C (SE Fanem Ltda, Brasil) para secagem por um dia. Para estimar a espessura da camada polimérica, utilizou-se uma imagem da fibra com recobrimento fornecida pela análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (SEM, Carl Zeiss, EVO MA10) e o software ImageJ®.

3.5.4 Permeabilidade hidráulica das membranas de filtração

A determinação da permeabilidade de cada membrana utilizada nos processos de filtração foi feita utilizando água miliq. Para a membrana plana de 0,22 μm e para a fibra oca o fluxo foi medido em pressões que variaram de 0,1 a 1 bar. Já para a fibra oca com revestimento polimérico, o fluxo foi medido em pressões que variaram de 0,3 a 3 bar, conforme mostra a Figura B. 3, a Figura B. 4, a Figura B. 5 e a Figura B. 6 no Anexo B.

3.5.5 Comportamento do fluxo durante o processo de filtração do chá

Uma vez iniciado o processo de filtração, amostras foram coletadas durante todo o processo de modo a permitir medição e análise do comportamento do fluxo em função do tempo de filtração. O fluxo foi calculado utilizando a Equação (5).

$$\text{Fluxo (L h}^{-1}\text{m}^{-2}\text{)} = \frac{\text{Volume de permeado}}{\text{Área da membrana} \cdot \text{tempo de coleta}} \quad (5)$$

3.5.6 Cálculo das resistências

As resistências foram calculadas de acordo com o modelo de resistências em série como adaptado de Schaefer *et al.* (2017).

A resistência total de uma membrana pode ser calculada pela Equação (6):

$$R_T = R_M + R_p + R_C \quad (6)$$

Em 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 (7):

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

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

3.5.7 Modelagem matemática do fluxo em função do tempo





As filtrações de chá foram realizadas em operação *cross-flow* e, nesse caso, foi aplicada a modelagem matemática sugerida por Field *et al.* (1995), conforme apresentada pela Equação (8).

$$-\frac{dJ}{dt}J^{n-2} = K(J - J^*) \quad (8)$$

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 Tabela 3. 2.

Tabela 3. 2 – Representação dos mecanismos de *fouling* em membranas.

n	Mecanismo de <i>fouling</i>	Representação	Características
0	Formação de torta		As partículas se agregam e formam uma camada filtrante na superfície da membrana.
1	Bloqueio parcial dos poros		As partículas se unem umas às outras e bloqueiam parcialmente os poros.
1,5	Bloqueio interno dos poros		As partículas são menores que o tamanho do poro da membrana e ficam retidas na superfície interna da mesma.
2	Bloqueio completo dos poros		As partículas são maiores que o tamanho do poro da membrana

Para cada valor de n fez-se o ajuste dos dados experimentais de fluxo em função do tempo de acordo com a Equação (8) de modo a determinar o valor do

parâmetro desta equação. 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} .

3.5.8 Limpeza das membranas

Os seguintes passos foram seguidos no procedimento de limpeza das membranas do tipo fibra-oca contidas no cartucho. Inicialmente uma solução de ácido nítrico 5% foi circulada através do cartucho no sentido contrário ao fluxo de permeado (*retrolavagem*) por 30 min. O cartucho foi então imerso em um béquer de vidro de 600 mL contendo aproximadamente 400 mL de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1% (Impex, Brasil) com 99% de pureza, o conjunto foi inserido em um banho ultrassônico de 40 Hz de frequência (Ultracleaner model 1650A) por 60 min. Então, uma nova *retrolavagem* foi feita com água destilada por 30 min. Finalmente, avaliou-se novamente o fluxo de água pela membrana. Após o reestabelecimento de, no mínimo, 90% do fluxo inicial de água, o cartucho poderia ser reutilizado.

3.5.9 Micrografias de MEV e EDS

As amostras das membranas foram inicialmente metalizadas. As análises morfológicas foram, então, executadas utilizando o Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) (SEM, Carl Zeiss, EVO MA10). Com o auxílio do software ImageJ® pode-se estimar o tamanho médio dos poros das membranas cerâmicas de alumina do tipo fibra-oca como também a espessura da torta e da camada de revestimento polimérico. Já a espectroscopia de energia dispersiva (EDS) (EDS, Oxford, model 51 – ADD0048) foi feita para a microanálise qualitativa das amostras de modo a identificar os elementos químicos presentes após a filtração de chá verde através das membranas.

3.6 Análises Físico-Químicas

3.6.1 Concentração de polifenóis totais

A concentração de polifenóis totais foi avaliada conforme metodologia descrita por Kumar *et al.* (2012) com adaptações. Os autores utilizaram espectroscopia na região do visível através do método de Folin–Ciocalteu para determinação de polifenóis totais em extrato de chá verde. Inicialmente construiu-se a curva de calibração com dez soluções aquosas de ácido gálico (EAG) (Vetec, Brasil) com 99,5% de pureza e com concentrações variando de 0,16 g L⁻¹ a 1,00 g L⁻¹ (Figura A. 1 do Anexo A). Para cada concentração coletou-se um volume de 0,05 mL de amostra. Em seguida, 0,2 mL da solução de Folin-Ciocalteu (Dinâmica, Brasil) foram adicionados. Depois de passados 2 min, 2 mL da solução de Na₂CO₃ a 10% (mv⁻¹) (Dinâmica, Brasil) com 99,5% de pureza 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 absorvância foram medidos a comprimento de onda de 760 nm usando o espectrofotômetro UVmini – 1240 Shimadzu. A concentração de polifenóis totais é dada em miligramas equivalentes de ácido gálico por litro. Para medir a concentração de polifenóis das amostras de chá foi necessário realizar uma diluição. 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 (Dinâmica, Brasil), 2 mL da solução de Na₂CO₃ (Dinâmica, Brasil) com 99,5% de pureza, sendo ao final o volume ajustado para 4 mL com água. A absorvância lida era substituída na equação da curva de calibração e multiplicada pelo fator de diluição.

A Figura 3. 13 apresenta a amostra com a coloração azul correspondendo à solução contendo composto fenólico em contato com o reagente Folin-Ciocalteu.

3.6.2 Concentração de Flavonóides

A concentração de flavonóides no extrato de chá verde foi determinada conforme a metodologia de Karadeniz (2005) com adaptações. Soluções de rutina (R) ($10 - 200 \mu\text{g (mL)}^{-1}$) (Meta Química, Brasil) com pureza de 100% foram utilizadas para construção da curva de calibração (Figura A. 2 do Anexo A). Para cada concentração coletou-se um volume de 0,5 mL de amostra. Em seguida, 0,3 mL de solução de NaNO_2 (5%) (Anidrol, Brasil) com 98% de pureza foram adicionados em cada tubo. Depois de passados 5 min, adicionou-se 0,6 mL de AlCl_3 (10%) (Vetec, Brasil) com 99,5% de pureza e finalmente após 6 min 2 mL da solução de NaOH (1 M) (Impex, Brasil) com 99% de pureza foram adicionados em cada tubo. A solução foi agitada vigorosamente e a absorbância foi lida imediatamente no comprimento de onda de 510 nm usando o espectrofotômetro UVmini – 1240 Shimadzu. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. A Figura 3. 14 apresenta a amostra com a coloração laranja devido ao contato dos reagentes com os flavonóides presentes na solução.

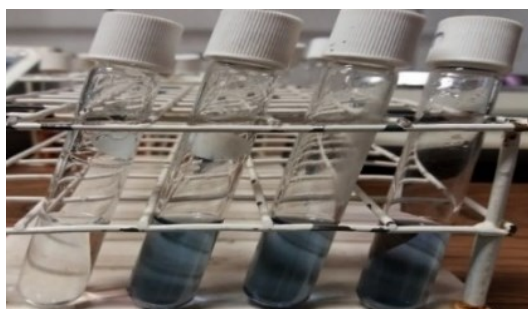


Figura 3. 13 - Tubos de ensaio contendo composto fenólico em contato com o reagente Folin-Ciocalteu



Figura 3. 14 - Tubos de ensaio contendo flavonóides em contato com os outros reagentes.

3.6.3 Turbidez

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

3.6.4 Sólidos Totais

Para determinar 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 105°C. Após 24 h, a massa final de sólidos foi medida em uma balança analítica e a concentração de sólidos foi calculada utilizando a Equação (9) e a Equação (10).

$$\text{Massa de sólidos na amostra (mg)} = \left(\begin{matrix} \text{massa do béquer} \\ \text{com a amostra} \end{matrix} \right) - \left(\begin{matrix} \text{massa do béquer} \\ \text{seco} \end{matrix} \right) \quad (9)$$

$$\text{Concentração de sólidos (mg L}^{-1}\text{)} = \frac{\text{massa de sólidos na amostra (mg)}}{\text{volume da amostra}} \quad (1)$$

3.6.5 Análises cromatográficas

Os padrões utilizados nesta etapa foram: Ácido gálico, Cafeína, Galato de (-) epigallocatequina (EGCG), Catequina (C), (-)-Epicatequina (EC) e (-)-Epigallocatequina (EGC). Todos os padrões e reagentes foram analiticamente puros e foram adquiridos da empresa Sigma. Nas análises no HPLC (marca Shimadzu modelo LC-20A Prominence), foi empregada a metodologia descrita por H.F. Wang (2000). Utilizou-se 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⁻¹, 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.

3.6.6 Estabilidade dos chás

Os chás de *Caméllia sinensis* podem formar complexos entre os polifenóis e outros compostos de maior peso molecular como as proteínas. Nessa perspectiva, garantir a estabilidade do chá enquanto bebida é uma grande preocupação na indústria de bebidas e por isso tem chamado a atenção dos pesquisadores (Subramanian *et al.* (2014). Nesse sentido, determinou-se a estabilidade dos chás e dos permeados dos processos de micro e ultrafiltração através dos parâmetros turbidez e concentração de polifenóis totais. Os dados foram colhidos no dia que a solução foi obtida (dia zero “0”) e, em seguida, os permeados foram colocadas sob refrigeração, por volta de 5°C e os parâmetros foram medidos depois de 7, 14, 21 e 30 dias.

3.6.7 Estimativa da formação do *tea cream*

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) conforme Chandini *et al.* (2012). Após este período, o extrato foi centrifugado por 20 min utilizando uma rotação de 5600 rpm para remover os sólidos insolúveis e obter a quantidade de sólidos solúveis no sobrenadante. A diferença entre a quantidade de sólidos na amostra e no sobrenadante determina o quanto do *tea cream* foi formado no resfriamento. A Equação 11 foi utilizada para este cálculo.

$$Tea\ cream\ (\%) = \frac{(sólidos\ no\ extrato) - (sólidos\ no\ sobrenadante)}{(sólidos\ no\ extrato)} \quad (11)$$

3.7 Análise estatística dos dados

A metodologia da superfície de resposta foi empregada para o tratamento de dados nesse trabalho. Por meio dessa metodologia, a extração ultrassônica de polifenóis e flavonóides pôde ser adequada a uma superfície de resposta baseada em um modelo de 2ª ordem (Marquez, 2007; Domingues, 2011). Essa modelagem permitiu verificar a existência de uma combinação entre as variáveis analisadas que

fornece uma região ótima ou mais favorável à extração. Os níveis das variáveis estudadas foram colocadas na forma codificada conforme a Equação (12).

$$X_n = \frac{X - X_n}{\frac{X_{+1} - X_{-1}}{2}} \quad (12)$$

Sendo:

- X_n é o valor da variável no experimento na forma codificada; X é o valor real da variável a ser calculado;
- X_0 é o valor real da variável no ponto central;
- X_1 é o valor real da variável no nível superior; X é o valor real da variável no nível inferior.

Neste tipo de planejamento, cada variável é estudada em 5 diferentes níveis ($-\alpha, -1, 0, 1$ e $+\alpha$). Foi utilizado o valor de α de ortogonalidade, de modo a se obter um planejamento em que a matriz de variância e covariância seja diagonal, sendo os parâmetros estimados não são correlacionados entre si. A equação do modelo polinomial de segunda ordem obtido pelo método de regressão múltipla é apresentada pela Equação (13) (Box e Hunter, 1978; Domingues, 2011).

$$Y = b_0 + \sum_{j=1}^k b_j x_j + \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^k b_{ji} x_i x_j + \sum_{j=1}^k b_{jj} x_j^2 \quad (13)$$

A partir da equação do modelo, pode-se encontrar o valor de um ponto crítico, denominado ponto estacionário, dado por $x_0 = -(1/2)B^{-1}b$, em que B é a matriz ($k \times k$) na qual a diagonal principal é composta pelos coeficientes dos termos quadráticos da Equação (13) e os termos fora da diagonal são correspondentes aos coeficientes das interações divididos por 2. Seguindo a relação $a_{ij} = a_{ji} = X_i X_j / 2$. A matriz b é a matriz coluna formada pelos coeficientes associados às variáveis isoladas. O sinal das raízes características da matriz B , $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_k$ fornecem a informação sobre a natureza do ponto estacionário x_0 , que pode ser:

- Um ponto de onde a superfície de resposta atinge um valor máximo, caso todas as raízes $\lambda_k < 0$;
- Um ponto de onde a superfície de resposta atinge um valor mínimo, caso todas as raízes $\lambda_k > 0$;
- Um ponto de onde a superfície de resposta não atinge um valor máximo nem mínimo, denominado “ponto de cela”, caso as raízes λ_k tenham sinais diferentes.

As análises estatísticas dos dados foram efetuadas utilizando-se o *software Statistica 7.0* (Statsoft, EUA). A significância das variáveis foi avaliada considerando-se efeitos com nível de significância de 5%.

Para o teste de Tukey foi utilizado o *software Sisvar 5.6* (DEX, UFLA, Brasil) com nível de significância de 5%.

Capítulo 4

Resultados e discussão

4.1 Caracterização das folhas de chá verde

4.1.1 Moagem, peneiramento e análise granulométrica

Após a moagem da amostra de folhas chá fez-se o peneiramento da mesma em conjunto de peneiras que apresentavam a sequência de mesh: 7, 9, 16, 24, 35, 48, 100 e 270. Os dados da distribuição granulométrica obtidos são apresentados na Tabela 4. 1

Tabela 4. 1 - Distribuição granulométrica de amostra de folhas de chá verde

Mesh	d#(mm)	Faixa de partículas	Massa retida(g)	Porcentagem retida (%)
7	>2,83	>2,83	0±0 ^a	0±0 ^a
9	2,19	2,19-2,83	1,31±0 ^b	0,54±0,01 ^b
16	1,19	1,19-2,19	34,80±1,1 ^c	14,37±0,44 ^c
24	0,74	0,74-1,19	36,69±1,3 ^c	15,15±0,55 ^c
35	0,50	0,5-0,74	63,67±1 ^d	26,30±0,39 ^d
48	0,32	0,32-0,5	37,85±1,9 ^c	15,63±0,78 ^c
100	0,15	0,15-0,32	44,91±1,5 ^e	18,55±0,63 ^e
270	0,05	0,05-0,15	16,60±2,3 ^f	6,86±0,94 ^f
Fundo	<0,05	<0,05	6,27±0,3 ^g	2,59±0,14 ^g
Massa total			242,09±0	

Os valores médios indicados por uma letra diferente, são significativamente diferentes para o teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

Pela Tabela 4. 1 observa-se que não houve massa retida no topo do conjunto de peneiras (mesh 7) e a maior massa retida (63,67 g) foi obtida na peneira de mesh 35. O diâmetro médio de Sauter calculado pela Equação (1) é $0,54 \pm 0,02$ mm. O

comportamento de porcentagem retida das amostras de chá de partículas na faixa de 0,15-0,32 e de 0,32-0,5 mm desse trabalho está semelhante ao observado por Hossain e Mori (2013) que estudaram a distribuição do tamanho de partícula em amostras de chá preto.

As curvas de ajuste dos modelos matemáticos de distribuição granulométrica acumulativa do experimento de peneiramento de amostra de chá verde são apresentadas na Figura 4. 1. A distribuição granulométrica acumulativa foi representada pelos seguintes modelos: Gates-Gaudin-Schumann (GGS), Rosin-Rammler-Bennet (RRB) e Sigmoide. Os modelos Rosin-Rammler-Bennet (RRB) e Sigmoide (SIG) se ajustaram muito bem aos dados experimentais com valores de coeficiente de determinação (R^2) de 0,9979 e 0,9952. O ajuste a esses modelos dependeu basicamente do tempo de moagem, da velocidade de moagem e do tempo de peneiramento estabelecidos.

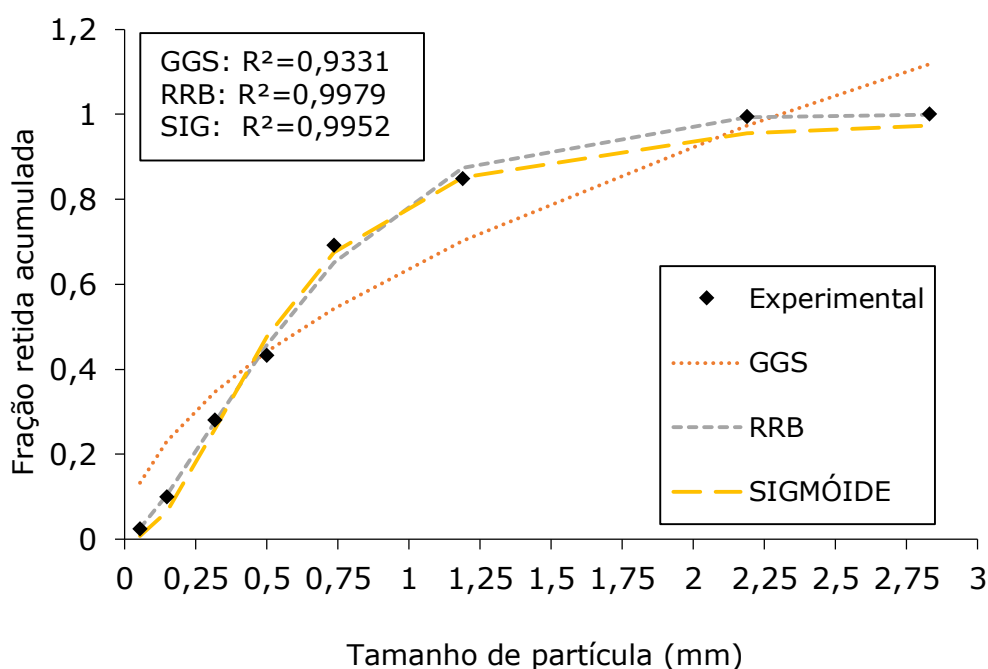


Figura 4. 1 – Ajuste dos modelos de distribuição granulométrica acumulativa do peneiramento de amostra de chá verde.

Murthy e Manohar (2013) efetuaram a modelagem matemática da distribuição de partículas de gengibre moído e observaram que o modelo RRB apresentou o

melhor ajuste para a distribuição granulométrica acumulativa, com o maior valor de coeficiente de determinação (R^2).

4.1.2 Umidade e cinzas

Os valores dos teores de umidade e cinzas nas folhas de chá verde para diferentes faixas de tamanho de partícula são apresentados na Tabela 4. 2.

Tabela 4. 2– Teores de umidade e cinzas em amostras de chá verde

Tamanho de partícula (mm)	Teor de umidade (%)	Teor de cinzas (%)
<0,05	6,12±0,04 ^a	4,93±0,04 ^a
0,05-0,15	6,50±0,06 ^b	4,81±0,01 ^{a, b}
0,15-0,32	6,94±0,03 ^c	4,69±0,00 ^{b, c}
0,32-0,5	7,22±0,03 ^d	4,66±0,03 ^c
0,5-0,74	7,18±0,03 ^d	4,67±0,04 ^c
0,74-1,19	7,42±0,04 ^e	4,70±0,08 ^{b, c}
1,19-2,19	7,36±0,05 ^{d, e}	4,68±0,01 ^{b, c}
2,19-2,83	7,45±0,03 ^e	4,65±0,01 ^c
Chá não moído	7,31±0,05 ^{d, e}	4,69±0,02 ^{b, c}

Os valores médios indicados por uma letra diferente, são significativamente diferentes para o teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) por meio da portaria nº 519/98 (revogada pela RDC 277/05) estabelece que o teor máximo de umidade e de cinzas totais em amostras de chá verde devem ser de 12% e de 8% respectivamente. De acordo com a Tabela 4. 2 os teores de umidade variam de 6,12 a 7,45%; já os teores de cinzas, de 4,65 a 4,93%. Nesse sentido, os valores encontrados nesse trabalho para todos os tamanhos de partícula respeitam os limites preconizados pela legislação. Verifica-se ainda pela **Erro! Fonte de referência não encontrada.** que, apesar da faixa de variação dos percentuais (m/m) de umidade e cinzas ter sido pequena, o teste de Tukey ($p \leq 0,05$) aponta diferenças significativas ($p \leq 0,05$) para esses parâmetros entre a maioria das frações granulométricas estudadas. Isso é

explicado pelo fato de cada faixa de tamanho de partícula apresentar diferentes partes da planta conforme mostra a Figura 4. 2. Em outras palavras, constatou-se que a não homogeneidade nas diferentes frações do material analisado (folhas de chá) impactou significativamente ($p \leq 0,05$) nos teores de cinzas e umidade das mesmas. Conforme reportou Aquino (2007), altos teores de umidade (superiores a 12%) podem causar a contaminação por fungos, a degradação dos compostos ativos presentes na erva, além de representar um risco alimentar ao consumidor. Firmino (2011) verificou a qualidade de diferentes marcas comerciais de chá verde a granel, a autora reportou que os teores de umidade e de cinzas totais variaram de 4,42 a 10,66% (m/m) e de 5,37 a 9,78% (m/m) respectivamente, esses valores estão muito próximos daqueles encontrados nesse trabalho.

4.2 Extração de Polifenóis

4.2.1 Extração Convencional

4.2.1.1 Efeito da granulometria

A Figura 4. 2 apresenta as amostras moídas e peneiradas juntamente com a amostra de chá verde não moído que se refere a amostra comercial não peneirada. As mesmas foram utilizadas nas infusões para a seleção da granulometria que forneceu a maior concentração de polifenóis ($\text{mg}_{\text{EAG}} \text{L}^{-1}$).

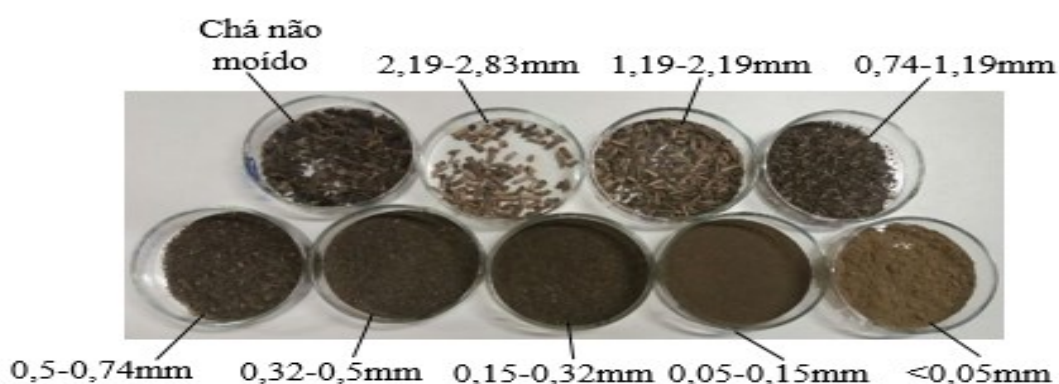


Figura 4. 2 - Amostras de chá verdes juntamente com suas respectivas faixas de tamanho de partículas.

A Figura 4.3 apresenta as concentrações de polifenóis totais medida no filtrado para o chá não moído e para as faixas de tamanho de partícula obtidas no peneiramento.

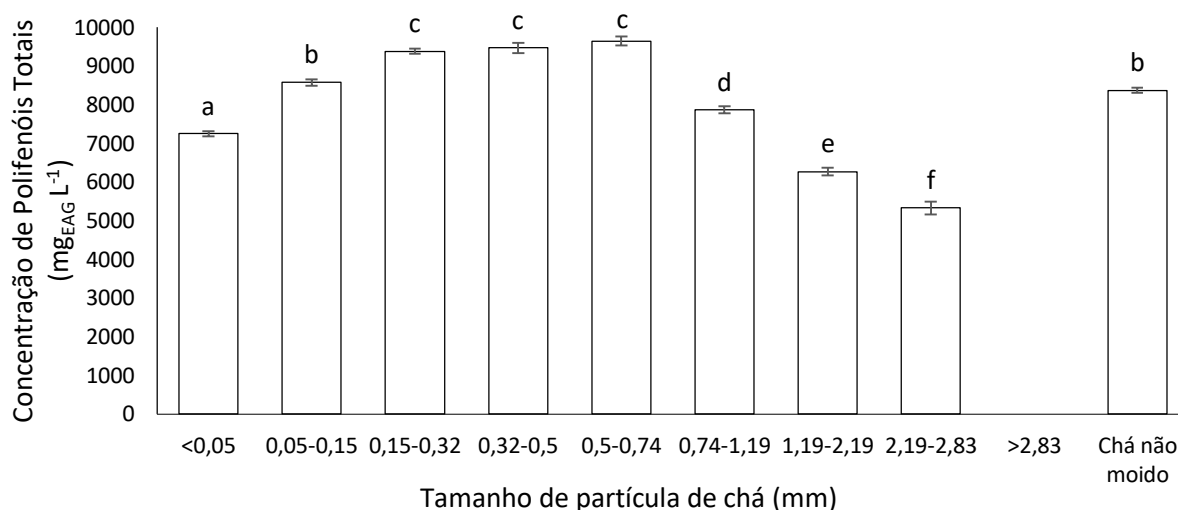


Figura 4.3 - Polifenóis totais em função do tamanho das partículas (extrações realizadas a 80°C, 50 g L⁻¹, 30 min.). Os valores médios indicados por uma letra diferente, são significativamente diferentes para o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

De acordo com a Figura 4.3 observa-se a influência do tamanho da partícula no rendimento da extração de polifenóis totais das folhas de chá verde. Pelos dados e aplicando o teste de Tukey ($p \leq 0,05$) constata-se que não houve diferença significativa para a concentração de polifenóis para a faixa de partículas entre 0,15 e 0,74 mm. Outrossim, essa faixa permitiu a extração de maior concentração de polifenóis, aproximadamente 9000 mgEAG L⁻¹. Partículas mais finas e menores que 0,15 mm e partículas maiores na faixa de 0,74-2,83 mm levaram a extração de menores concentrações de polifenóis (mgEAG L⁻¹). No caso das partículas menores que 0,15 mm isso ocorreu devido a tendência de formação de aglomerados em partículas finas, esses diminuíram a superfície de contato entre a água e o chá. Além disso, os aglomerados, mesmo sob agitação, se depositaram no fundo do recipiente dificultando assim a difusão, dos compostos bioativos da matriz vegetal para o solvente. Essas observações vêm ao encontro de conclusões obtidas por outros trabalhos presentes na literatura. Os autores (Spiro e Jago (1982); Gujar *et al.* (2010);

Hu *et al.* (2016)), por exemplo, notaram que a redução do tamanho da partícula pode melhorar a eficiência de extração até que se constate a diminuição do transporte difusional através do solvente. Já no caso de partículas maiores, na faixa de 0,74 a 2,83 mm, a redução na concentração de polifenóis pode ser explicada pela maior presença de partes mais duras das folhas como as nervuras e o pecíolo. Essas partes das folhas, conforme mostra a Figura 4. 2, foram mais difíceis de serem trituradas durante a moagem e apresentaram menor concentração de polifenóis que em outras regiões mais moles da planta como o limbo foliar. Com efeito, O Faraj *et al.* (2015) observaram que o conteúdo de compostos fenólicos varia para diferentes partes da planta *Camellia sinensis*.

Para esse trabalho selecionou-se uma mistura de folhas de chá moídas e retidas nas peneiras de meshes 35, 48 e 100, ou seja, partículas entre 0,15 e 0,74 mm. Essa faixa de partículas, além de permitir maior extração de polifenóis totais, corresponde a aproximadamente 60,5% da massa total de chá retida durante o peneiramento. Isso indica que esse experimento de análise granulométrica do chá verde mostrou-se efetivo, tanto em termos de encontrar a melhor faixa de tamanho de partículas que garanta a maior extração de polifenóis, quanto em termos de aproveitamento de matéria prima.

No trabalho de Vuong, Golding, *et al.* (2011), os autores estudaram o efeito do tamanho das partículas na extração de tanino do chá verde e observaram que o rendimento da extração foi maior e significativamente diferente de um chá não processado para a faixa granulométrica entre 0,5 e 1 mm, o que está próximo, em termos de tamanho de partícula, do encontrado nesse trabalho. Hu *et al.* (2016) estudaram os mecanismos para a captura eficiente de componentes do chá e verificaram que a extração de catequinas totais e cafeína aumentou significativamente com a redução do tamanho da partícula, especialmente quando etanol foi usado como solvente. Quando os autores utilizaram água como solvente, verificaram que os maiores valores para extração de cafeína e catequinas são obtidos para o mesh 100. Contudo, se o objetivo for uma baixa extração de cafeína, o mesh 8 é mais adequado. Já quando empregaram o mesh 45, obtiveram valores intermediários tanto para extração tanto de cafeína quanto para extração de catequinas totais.

4.2.1.2 Efeito da razão chá-água

A razão entre as quantidades da matriz vegetal e do solvente pode influenciar a eficiência de extração de compostos bioativos (Stamatopoulos et al., 2013, Jovanović et al., 2017). Existem diversos trabalhos na literatura que reportam a concentração de compostos bioativos em relação razão material-solvente, mas existe uma carência de estudos que apresentem as diferenças, em termos práticos e de processo, entre expressar a concentração de compostos bioativos em mg g^{-1} ou em mg L^{-1} . A Figura 4. 4 apresenta os perfis de concentração de polifenóis em $\text{mg}_{\text{EAG}} \text{g}^{-1}$ e em $\text{mg}_{\text{EAG}} \text{L}^{-1}$ em função da razão chá-água. Nota-se que os maiores valores de concentração de polifenóis em $\text{mg}_{\text{EAG}} \text{g}^{-1}$ e $\text{mg}_{\text{EAG}} \text{L}^{-1}$ são encontrados em menores e em maiores valores de razão chá-água, respectivamente. Quando a concentração é expressa em $\text{mg}_{\text{EAG}} \text{g}^{-1}$, para maiores concentrações de polifenóis tem-se a economia de chá, entretanto, nesse caso maiores volumes de solvente são requeridos.

A água é um solvente de relativamente baixo custo; todavia, grandes quantidades de solvente requerem maiores volumes de reator. Industrialmente, aumentar ou diminuir o tamanho dos equipamentos não é uma solução trivial e barata e, ainda, o volume máximo operacional é uma constante normalmente definida no projeto da unidade. Além disso, grandes volumes de solvente demandam alto custo energético no aquecimento e especialmente na remoção desse solvente quando um produto final seco é desejável. Ainda, extratos muito diluídos podem reduzir a eficiência de uma eventual etapa posterior de separação, por membranas por exemplo, para purificação e concentração de polifenóis. Por outro lado, quando a concentração é expressa em $\text{mg}_{\text{EAG}} \text{L}^{-1}$, tem-se uma redução no volume do solvente e conseqüentemente do reator, porém demanda-se um maior gasto de chá para a obtenção de uma maior concentração de polifenóis.

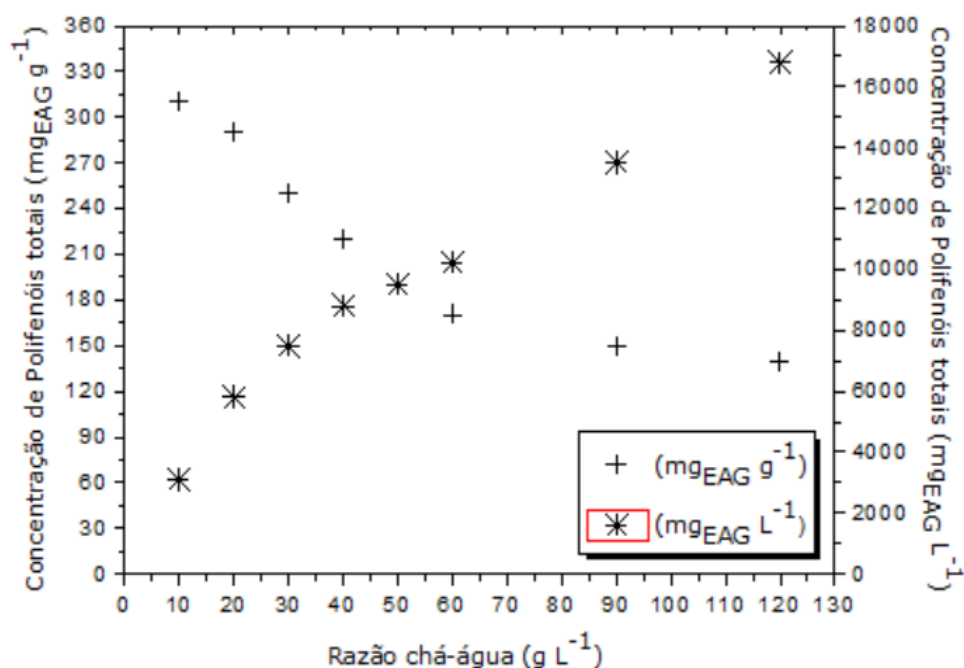


Figura 4. 4 Concentração de Polifenóis em mgEAG g^{-1} e em mgEAG L^{-1} em função da razão chá-água para extrações realizadas a 80°C por 30 min.

Para esse trabalho, após a análise dos perfis de concentração apresentados na Figura 4. 4 e considerando a abordagem feita anteriormente, a razão chá-água intermediária de 50 g L^{-1} equivalente a $20:1 \text{ mL g}^{-1}$ foi escolhida como a melhor condição de modo a favorecer tanto a etapa de extração quanto a etapa subsequente de purificação e concentração de polifenóis através do processo de separação por membranas, visando a um processo sequencial mais eficiente. Resultados encontrados na literatura corroboram o obtido nesse trabalho. Vuong, Stathopoulos, *et al.* (2011) concluíram que a razão chá-água de 50 g L^{-1} foi a melhor para a extração de catequinas das folhas de chá verde. Kumar *et al.* (2012) estudaram quatro diferentes razões chá-água ($100, 67, 50$ e 40 g L^{-1}) e observaram que 50 g L^{-1} foi a melhor razão chá-água para extração de polifenóis do chá verde.

4.2.1.3 Efeito do tempo e temperatura

Examinou-se a influência da temperatura e do tempo na extração de polifenóis presentes no chá verde, conforme apresentado na Figura 4. 5.

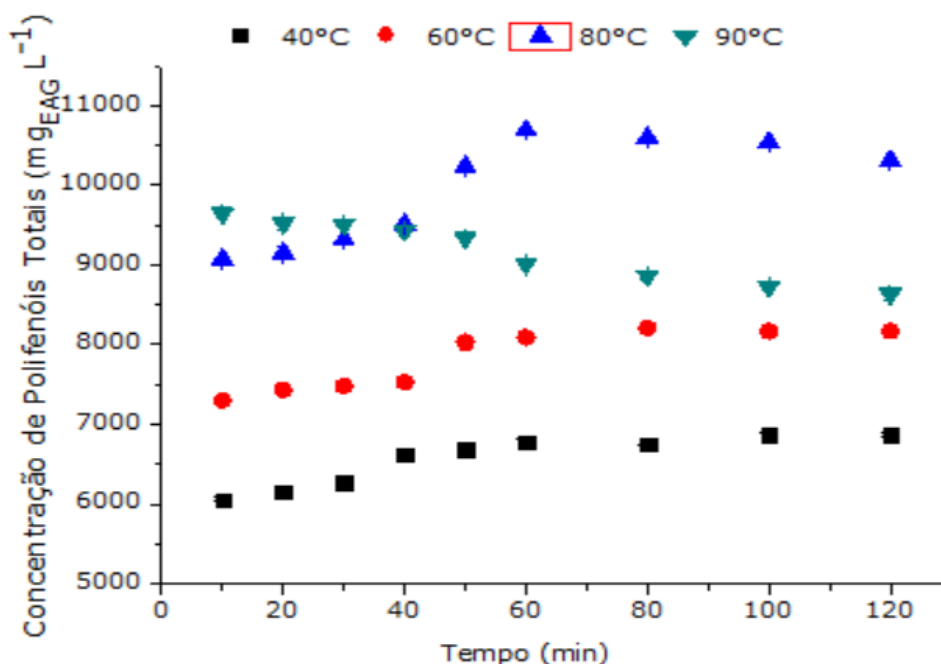


Figura 4. 6 – Perfis de concentração de polifenóis totais em função da temperatura e do tempo de infusão para extrações convencionais realizadas a 50 g L⁻¹.

Nota-se pela Figura 4. 6 que a concentração de polifenóis apresenta uma tendência de aumento com o tempo até cerca de 60 min para as temperaturas de 40°C, 60°C e 80°C, enquanto que a 90°C após 40 min a concentração de polifenóis começa a diminuir. Para o experimento realizado a 90°C por 60 min tem-se uma redução de 15,64% na concentração de polifenóis em relação à temperatura de 80°C. Essa redução pode ser explicada pela degradação térmica dos compostos fenólicos quando expostos à temperaturas elevadas por tempos prolongados. Vuong, Stathopoulos, *et al.* (2011) concluíram que extrações aquosas com temperaturas superiores à 80°C podem levar à epimerização das catequinas presentes nas folhas de chá verde. Ainda por meio da Figura 4. 6 observa-se uma tendência de estabilização dos perfis de concentração de polifenóis totais nas temperaturas analisadas para tempos superiores a 60 min. Para Sousa *et al.* (2016) a estabilização foi observada a partir de 60 min, já para Kumar *et al.* (2012) a constância na concentração na extração de polifenóis totais do chá verde ocorreu por volta dos 50 min. Esses resultados estão muito próximos dos encontrados nesse trabalho conforme apresentado na Figura 4. 6. Dessa forma, de modo a garantir uma extração de polifenóis eficiente com um menor gasto de tempo e energia, para este estudo, a

melhor condição para a temperatura de extração foi 80°C para tempos de 60 min. Para a razão chá-água de 50 g L⁻¹ utilizada neste trabalho, foi obtida uma concentração de polifenóis de 10686 mgAG L⁻¹, representando 21,37% da concentração de folhas iniciais. De acordo com Todisco *et al.* (2002), para o chá verde é esperado encontrar uma concentração de compostos fenólicos de 10 a 25% da concentração de folhas de chá. Uma comparação da porcentagem de polifenóis presentes no extrato de chá verde para diferentes estudos é feita pela Tabela 4. 3.

Segundo a o valor encontrado nesse trabalho está muito próximo da faixa encontrada por Todisco *et al.* (2002) e por outros trabalhos na literatura como Perva-Uzunalić *et al.* (2006) com 19,1%, Angshuman Bharadwaz (2012) com 19,3%, Xia *et al.* (2006) com 22,4%.

Tabela 4. 3 - Porcentagem de polifenóis totais após o processo de extração convencional para diferentes trabalhos.

Autor	Razão água- chá mL g ⁻¹	Temperatura de Infusão (°C)	Tempo de Infusão	Concentração de Fenólicos totais (mg L ⁻¹)	Porcentagem de polifenóis totais (%)
Neste trabalho	20	80	60	10685	21,37
Sousa <i>et al.</i> (2016)	10	75	60	6520	6,52
Kumar <i>et al.</i> (2012)	20	80	100	3750	7,5
Angshuman Bharadwaz (2012)	20	60	-	3860	19,3
Rao <i>et al.</i> (2011)	100	60	20	1090	10,9
Perva- Uzunalić <i>et al.</i> (2006)	40	80	120	4780	19,10
Xia <i>et al.</i> (2006)	33	85	15	7273	22,04

4.2.2 Extração com uso de sonda ultrassônica

4.2.2.1 Planejamento Experimental

A Tabela 4. 4 apresenta o Planejamento Experimental para identificação da significância entre variáveis T=Temperatura (°C), R = razão chá-água (g L⁻¹) e A = Amplitude do ultrassom (%) para as respostas polifenóis totais CP Y₁ (mg_{EAG} L⁻¹) e flavonóides CF Y₂ (mg_R L⁻¹).

Tabela 4. 4 - Resultados do planejamento composto central (PCC) da extração com sonda ultrassônica para polifenóis e flavonóides.

E	Variáveis			Resposta	
	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁	Y ₂
	T (°C)	R (g L ⁻¹)	A (%)	CP*	CF*
1	-1(30)	-1(20)	-1(30)	4109,35±26	923,67±16
2	-1(30)	-1(20)	1(70)	4269,61±36	1055,33±28
3	-1(30)	1(65)	-1(30)	8957,02±52	2524,43±19
4	-1(30)	1(65)	1(70)	9826,96±60	2670,54±10
5	1(75)	-1(20)	-1(30)	5803,46±45	1553,39±16
6	1(75)	-1(20)	1(70)	6455,92±34	1603,89±14
7	1(75)	1(65)	-1(30)	11063,20±50	2904,77±23
8	1(75)	1(65)	1(70)	11938,87±43	3520,55±18
9	-1,35(22)	0(42,5)	0(50)	6324,28±52	1616,08±11
10	1,35(83)	0(42,5)	0(50)	10101,68±42	2779,38±19
11	0(52,5)	-1,35(12)	0(50)	3245,13±34	815,01±16
12	0(52,5)	1,35(73)	0(50)	11566,86±52	3075,43±21
13	0(52,5)	0(42,5)	-1,35(23)	8533,49±62	2522,51±15
14	0(52,5)	0(42,5)	1,35(77)	9626,65±60	2718,43±22
15	0 (52,5)	0(42,5)	0(50)	9019,97±43	2638,32±21
16	0 (52,5)	0(42,5)	0(50)	9014,25±30	2634,84±18
17	0 (52,5)	0(42,5)	0(50)	9025,70±52	2640,06±17

Valores são expressos como média ± desvio padrão. E= Experimento, T = Temperatura (°C), R = chá-água (g L⁻¹), A = Amplitude (%), CP = Concentração de Polifenóis (mg_{EAG} L⁻¹), (%), CF = Concentração de Flavonóides (mg_R L⁻¹) para um tempo de extração de 30 min.

De acordo com a Tabela 4. 4, os maiores valores de concentração de polifenóis e flavonoides foram obtidos para a condição 75°C, 65 g L⁻¹ e amplitude de 70%, fornecendo 11938, 87 mg_{EAG} L⁻¹ para polifenóis e 3520,55 mg_R L⁻¹ para flavonóides.

A partir da análise estatística das respostas da matriz do planejamento experimental (Tabela 4. 4), foram gerados gráficos de pareto (Figura 4. 7) para

verificar a significância da temperatura, razão chá-água e amplitude e suas interações nas respostas concentração de polifenóis ($\text{mg}_{\text{EAG}} \text{L}^{-1}$) e concentração de flavonóides ($\text{mg}_{\text{R}} \text{L}^{-1}$) com sonda ultrassônica.

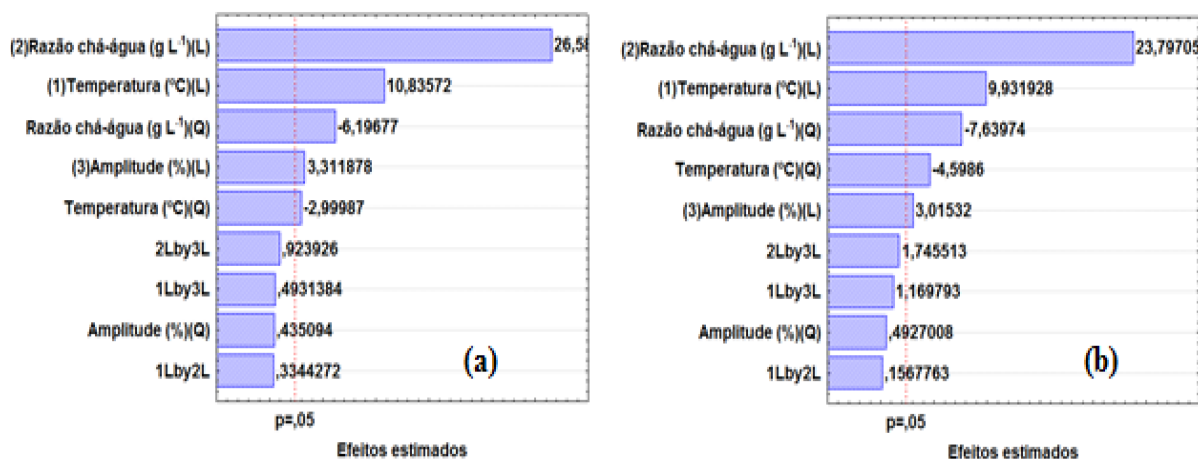


Figura 4. 7 - Gráficos de pareto para polifenóis para a representação das variáveis da extração com sonda ultrassônica, (a) concentração de polifenóis e (b) concentração de flavonóides.

Como pode ser observado na Figura 4. 7, o efeito linear da razão chá-água foi o que mais influenciou na extração tanto de polifenóis quanto na extração de flavonóides e seu efeito foi positivo, seguida da variável temperatura linear com efeito positivo. As Equações 1 e 2 apresentam os modelos estatísticos para a resposta de concentração de polifenóis totais (Y_1) e concentração de flavonoides (Y_2) a um nível de significância (α) de 95 %.

$$Y_1 = 9039,34 + 1132,73X_1 - 413,59X_1^2 + 2778,97X_2 - 854,33X_2^2 + 346,21X_3 \quad (1)$$

$$R^2 = 0,99057$$

$$Y_2 = 2627,59 + 341,52X_1 - 208,54X_1^2 + 818,28X_2 - 346,46X_2^2 + 103,68X_3 \quad (2)$$

$$R^2 = 0,98473$$

Os valores dos coeficientes de determinação R^2 iguais a 0,99057 e 0,98473 mostram que tanto o modelo para polifenóis quanto o modelo para flavonoides foram significativos para representarem as respostas esperadas. Desta forma, superfícies

de resposta baseadas nos modelos foram geradas para representar os dados experimentais da extração de polifenóis (Figura 4. 8) e flavonoides (Figura 4. 9) em função das variáveis independentes significativas (temperatura, razão chá-água e amplitude).

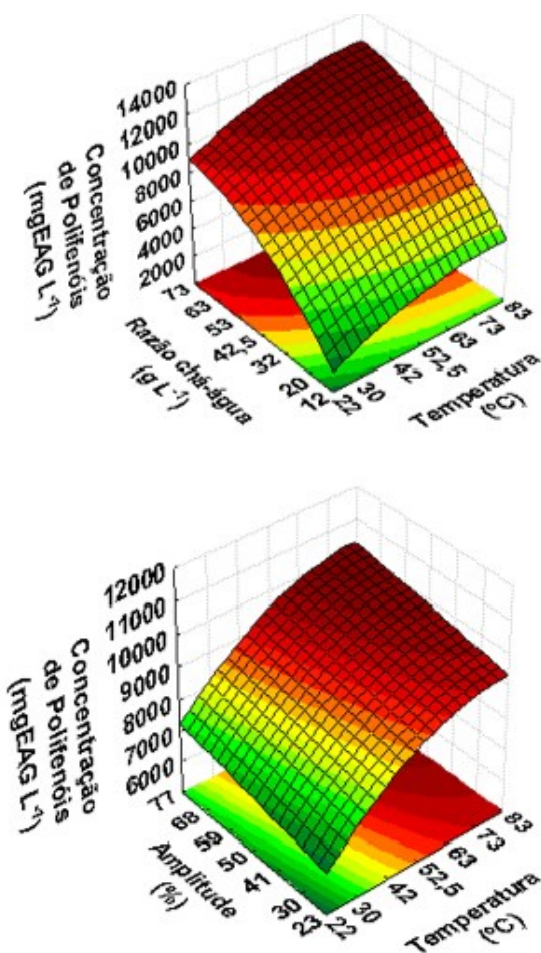


Figura 4. 8 - Superfícies de resposta para extração de polifenóis (mg_{EAG} L⁻¹) : (a) temperatura em função da razão chá-água e (b) temperatura em função da amplitude

De acordo com a Figura 4. 8, o valor mais adequado para concentração de polifenóis foi encontrado na região de razão chá-água no nível +1,35 (73 g L⁻¹), temperatura no nível +1,35(83°C) e amplitude +1,35 (77%).

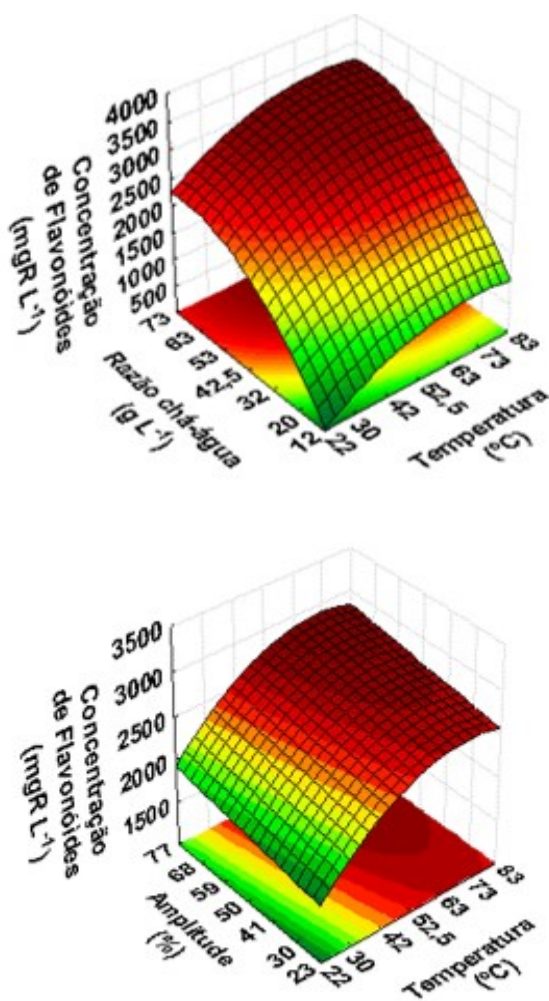


Figura 4. 9 - Superfícies de resposta para extração de flavonóides (mgR L^{-1}) : (a) temperatura em função da razão chá-água e (b) temperatura em função da amplitude.

Através da Figura 4. 9, verifica-se que o comportamento da superfície de resposta para a extração de flavonoides foi similar à de polifenóis, com os melhores valores de flavonoides na região de razão chá-água no nível +1,35 (73 g L^{-1}), temperatura no nível +1,35 (83°C) e amplitude no nível +1,35 (77%).

Como não houve otimização dentro do intervalo experimental recorreu-se à desejabilidade estatística, conforme a Figura 4. 10 a) e (b). Nos eixo horizontal e vertical têm-se a representação dos parâmetros (temperatura, razão chá-água e amplitude) e das respostas respectivamente (polifenóis totais e flavonóides).

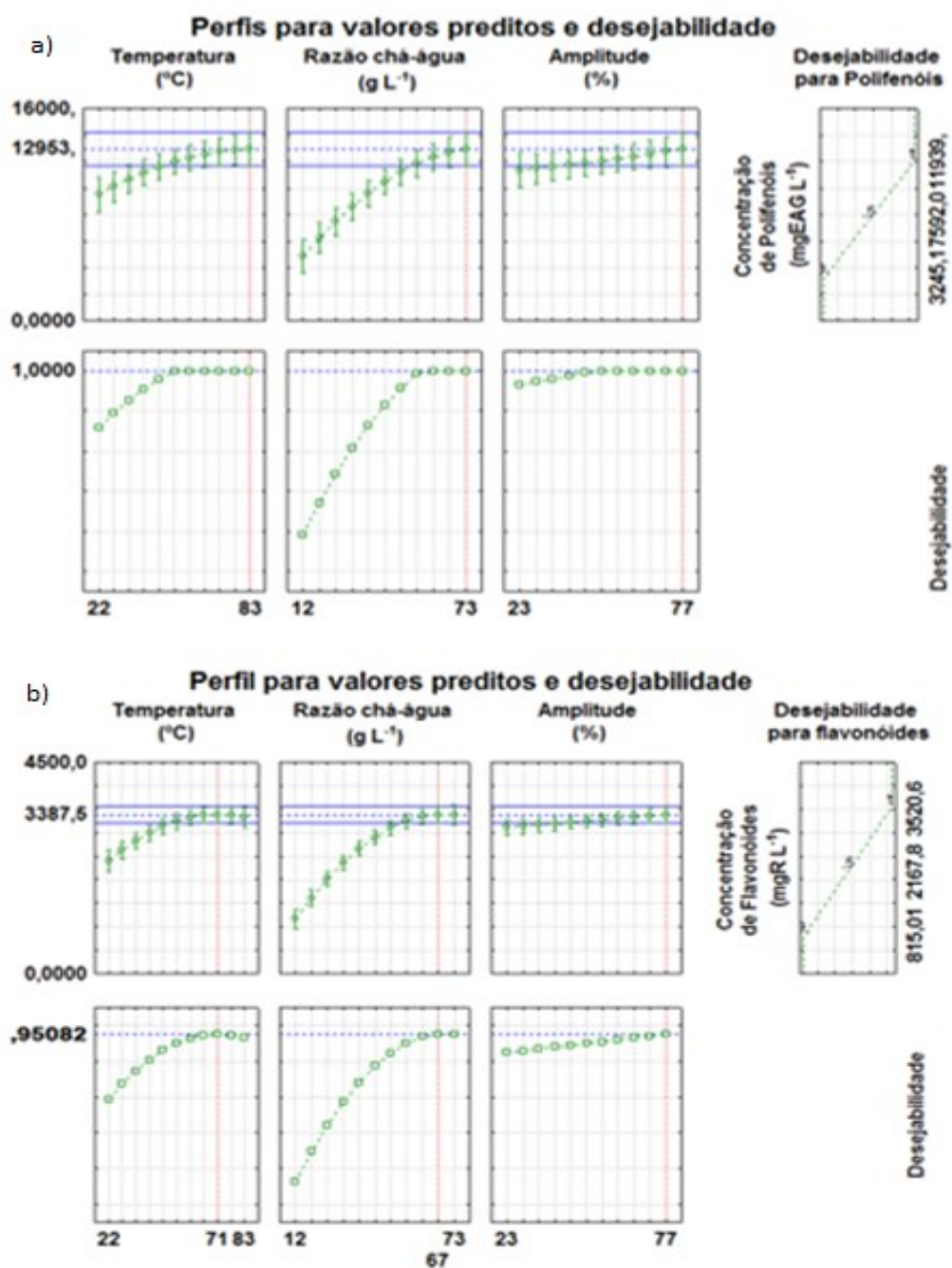


Figura 4. 10 - Perfis para valores preditos e desejabilidade para: a) polifenóis e b) flavonoides.

Na Figura 4. 10 a) II) e Figura 4. 10 b) II), na representação qualitativa das respostas (eixo vertical), os valores mais desejáveis são 1,000 para polifenóis e 0,95082 para flavonóides. Em outras palavras, isso indica que quando a curva (em verde) encontra-se com a linha tracejada (em vermelho) do valor qualitativamente desejável, determina-se a faixa de desejabilidade. Ainda, através das linhas tracejadas (em vermelho) que partem do eixo horizontal e encontram-se com a faixa de desejabilidade, determina-se as melhores condições de temperatura (X_1), razão chá-água (X_2) e amplitude (X_3) para as respostas concentração de polifenóis totais (Y_1) e concentração de flavonóides (Y_2). De acordo com Figura a) (I), a melhor condição para a extração de polifenóis foi 83°C, 73 g L⁻¹ e amplitude de 77% obtendo o valor 12.953 mg_{EAG} L⁻¹. Já através da Figura 4. 10b) (I), a melhor condição para a extração de flavonóides foi 71°C, 67 g L⁻¹ e amplitude de 77% obtendo o valor de 3387,5 mg_R L⁻¹.

Entretanto, a maior utilidade da desejabilidade estatística nesse trabalho é para se encontrar a condição que, conjuntamente, favoreça tanto a extração de polifenóis quanto a extração de flavonóides. A Figura 4. 11 representa a interseção das faixas de desejabilidade da Figura 4. 10. Além disso, são mostrados os melhores valores individuais para cada faixa e os melhores valores de temperatura, razão chá-água e amplitude para a concentração de polifenóis e flavonóides ao mesmo tempo. A melhor condição para extração de polifenóis e flavonóides foi temperatura de 77°C, razão chá-água de 73 g L⁻¹ e amplitude 77%.

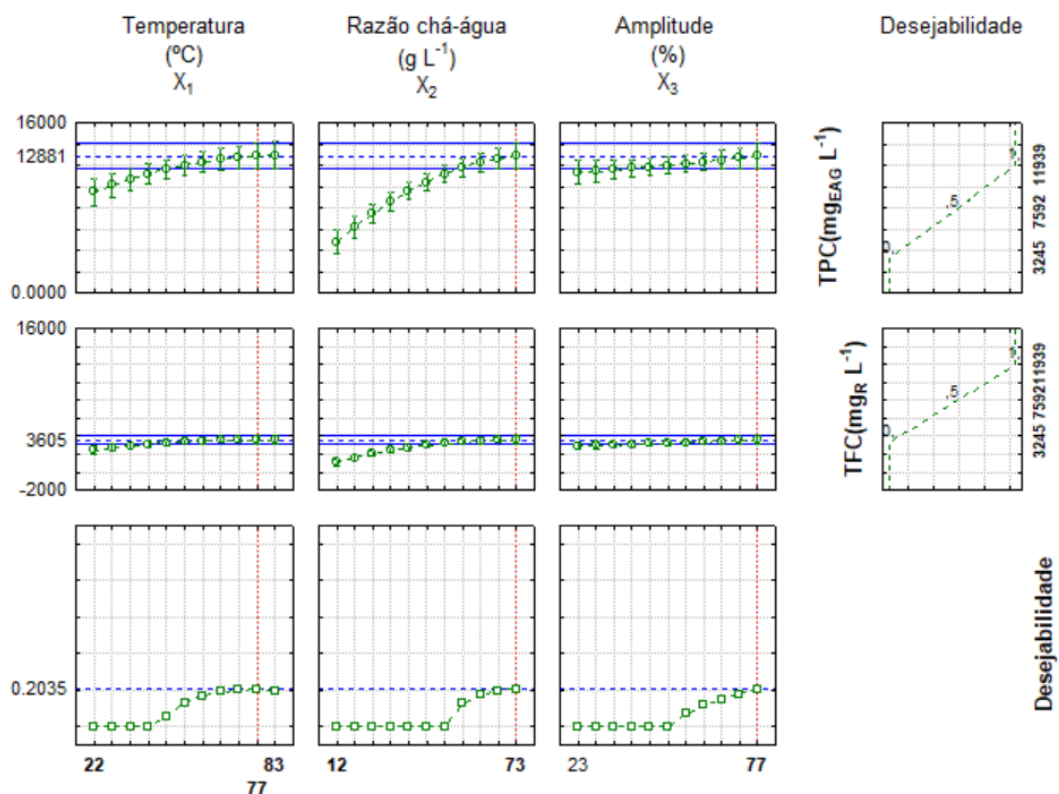


Figura 4. 11 - Faixas de desejabilidade para polifenóis e flavonóides em função da temperatura, razão chá-água e amplitude.

Horžić *et al.* (2012) estudaram a influência da amplitude da sonda ultrassônica na extração de compostos bioativos das folhas de *Camélia sinensis*, medindo a temperatura instantânea, e encontraram que a amplitude de 80% proporcionou o maior rendimento da extração de polifenóis. O resultado encontrado pelos autores é diferente desse trabalho para o chá verde e pode ser explicado devido ao fato do controle temperatura aqui empregado. Como no trabalho de Horžić *et al.* (2012) o aquecimento da solução foi promovido apenas pela sonda ultrassônica, quanto maior era amplitude, naturalmente maior era a temperatura. Portanto o fato de os autores terem encontrado melhores valores de compostos fenólicos à amplitudes maiores pode estar relacionado mais como efeito do aumento da temperatura do que diretamente com o efeito da amplitude. Lianfu e Zelong (2008) reportaram a influência do ultrassom e do ultrassom em conjunto com micro-ondas para extração de licopeno de tomates e no caso do ultrassom encontraram condições ótimas de extração à 86,9 °C e 29,1 min.

A verificação do comportamento das variáveis temperatura, razão chá-água e amplitude através do planejamento experimental foi útil para a compreensão do impacto que esses fatores exercem sobre o rendimento da extração quando analisados conjuntamente. Como pôde ser notado, o tempo não foi incluído no planejamento experimental e, similarmente à extração convencional, perfis da concentração em função do tempo e da temperatura foram traçados. Essa estratégia baseou-se no fato de que, na extração convencional, a temperatura acima de 80 °C favoreceu o rendimento de polifenóis apenas até 40 min de infusão (Figura 4. 6). Nessa perspectiva, a determinação do comportamento cinético da extração de polifenóis fez-se importante, conforme apresenta a Figura 4. 12 .

4.2.2 Efeito do tempo e temperatura

O perfil de concentração de polifenóis em função do tempo e da temperatura é apresentado na Figura 4. 12. A condição que forneceu o maior valor para extração de polifenóis (10.731 mg L⁻¹) a partir de uma razão chá-água de 50 g L⁻¹ foi à 90°C por 10 min (Figura 4. 12). Esse resultado confirma aqueles obtidos através dos gráficos de pareto do planejamento estatístico (Figura 4. 7), que indicam que a temperatura exerce efeito positivo dentro da faixa experimental de 22 a 83 °C para um tempo de extração de até 30 min. Porém, é reportado na literatura que a extração de compostos bioativos à temperaturas mais amenas favorecem o chá como bebida, preservando características sensoriais importantes como aroma, cor e sabor, além do seu conteúdo nutricional (Zhang *et al.*, 1998; Xia *et al.*, 2006). A extração ultrassônica se justifica então como uma alternativa eficaz na produção de extratos de melhor qualidade.

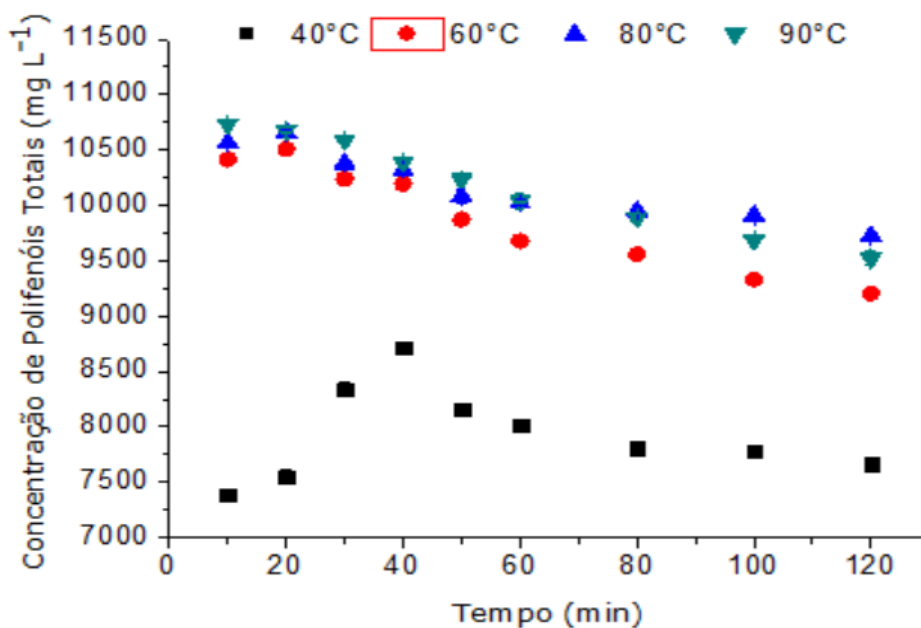


Figura 4. 12 - Perfis de concentração de polifenóis totais em função da temperatura e do tempo para extrações com sonda ultrassônica realizadas a 50 g L⁻¹ e 70% de amplitude.

Ainda de acordo com a Figura 4. 12, a extração com auxílio de sonda ultrassônica na condição de 50 g L⁻¹, 60°C e 20 min, fornecendo 10.508 mg_{EAG} L⁻¹ de polifenóis totais, pode, alternativamente, ser empregada em substituição à extração convencional na condição de 50 g L⁻¹, 80°C e 60 min que fornece 10686 mg_{EAG} L⁻¹ de polifenóis. A Tabela 4. 5 apresenta a comparação desse trabalho com o de Xia *et al.* (2006).

Observa-se pela Tabela 4. 5 que à mesma temperatura de 60°C e com um tempo reduzido em 20 min este trabalho apresenta uma concentração de polifenóis por litro de chá 28,81% maior que Xia *et al.* (2006). Além disso, apresenta uma percentagem de polifenóis totais muito próxima a encontrada pelos autores. Isso mostra a eficácia da sonda ultrassônica na produção de um extrato de chá verde em temperaturas mais amenas (aproximadamente 60 °C) e com bom rendimento de polifenóis totais.

Tabela 4. 5 - Porcentagem de polifenóis totais após o processo de extração com ultrassom para diferentes trabalhos.

Autor	Razão água-chá (g L ⁻¹)	Temperatura de Infusão (°C)	Tempo de Infusão (min)	Concentração de polifenóis totais (mg L ⁻¹)	Porcentagem de polifenóis totais (%)
Neste trabalho	50	60	20	10508	21,02
Xia <i>et al.</i> (2006)	30	60	40	7481	24,93

Apesar da extração com sonda ultrassônica à 60 °C por 20 min ter se justificado e mostrado rendimento semelhante à extração convencional à 80 °C por 60 min, a extração convencional à 80°C por 60 min foi utilizada nas etapas subsequentes, pois se mostrou mais prática operacionalmente, principalmente na produção de maiores volumes de extrato (2 L) (*scale-up*). As características físico-químicas desse extrato filtrado (S1), definido na Figura 4. 12, estão compilados na Tabela 4. 6.

Tabela 4. 6- Análise físico-química do extrato (S1) produzido por extração convencional a 50 g L⁻¹, 80 °C por 60 min.

Amostra	Concentração de polifenóis (mg _{EAG} L ⁻¹)	Concentração de sólidos (mg L ⁻¹)	Turbidez (NTU)	°brix
S1	10.686±46	20.644±97	1197±5	2,4±0,1

Os valores são expressos como média ± desvio padrão.

Na filtração inicial do extrato em um filtro de nylon para a efetuação das análises físico-químicas descritas na Tabela 4. 6, houve uma redução de 12% de polifenóis e 59% de sólidos. Isso mostra que quase 60% do conteúdo de sólidos suspensos presente na infusão foi removido durante esse tratamento preliminar, garantindo um

processo sequencial mais eficiente e evitando o rápido decaimento do fluxo no processo ulterior de filtração por membranas. Em adição, as concentrações de catequinas, cafeína e ácido gálico do extrato filtrado (S1) são apresentadas na Tabela 4. 7.

Tabela 4. 7 - Concentração de catequinas, cafeína e ácido gálico (GA) do extrato filtrado (S1) à 50 g L⁻¹, 80 °C por 60 min.

Amostra	EGCG (mg L ⁻¹)	EC (mg L ⁻¹)	C (mg L ⁻¹)	EGC (mg L ⁻¹)	GA (mg L ⁻¹)	Cafeína (mg L ⁻¹)
S1	1615±5	639±4	106±1	1403±9	75±0	1035±1

Os valores são expressos como média ± desvio padrão.

Conforme a Tabela 4. 7 o extrato de chá verde obtido é composto majoritariamente das catequinas, EGCG e EGC, isso está de acordo com estudos prévios como o de Torschi *et al.* (2000). Torschi *et al.* (2000) observaram ainda que a alta concentração de EGCG e EGC proporciona ao chá verde grande capacidade antioxidante. Ademais, a concentração das catequinas (EGCG, EC), de ácido gálico e cafeína em mg g⁻¹ desse trabalho estão em concordância com o obtido também em extração aquosa pelos autores Hu *et al.* (2016) e Sousa *et al.* (2016).

4.3 Pré-tratamentos macroscópicos

4.3.1 Centrifugação (T1)

A Tabela 4. 8 mostra a concentração de polifenóis totais e sólidos do extrato centrifugado (S2) em relação ao extrato. Durante a centrifugação (S2) observou-se uma redução de aproximadamente 8,6% de polifenóis, 6,5% de sólidos totais, 2,82% dos sólidos solúveis e 90,97% para a turbidez. O tratamento é importante para remover parte dos sólidos em suspensão e evitar o rápido decaimento do fluxo durante o processo sequencial de filtração por membranas.

Tabela 4. 8 - Análise físico-química do extrato centrifugado (S2) em comparação com o extrato inicial (S1)

Amostra	Concentração de polifenóis (mg _{EAG} L ⁻¹)	Concentração de sólidos (mg L ⁻¹)	Turbidez (NTU)	°brix
S1	10.686±46 ^a	20.644±97 ^a	1197±5 ^a	2,4±0,1 ^a
S2	9771±48 ^b	19.306±106 ^b	108±8 ^b	2,3±0,1 ^a

Os valores médios indicados por uma letra diferente ao longo de uma coluna, são significativamente diferentes para o teste de *Tukey* com nível de significância igual a 0,05.

No trabalho de Sousa (2016), a clarificação do extrato de chá verde por centrifugação foi analisada. A autora empregou as mesmas condições de tempo (20 min) e rotação (8000 rpm) mas com uma concentração inicial de sólidos totais (61.080mg L⁻¹) quase três vezes superior à desse trabalho (20.644mg L⁻¹) e observou uma redução de 4,43% de polifenóis e 3,4% de sólidos em suspensão, valores não muito discrepantes dos encontrados nesse trabalho. Ademais, foram verificadas as concentrações de catequinas, cafeína e ácido gálico do extrato centrifugado (S2) conforme mostra a Tabela 4. 9.

Tabela 4. 9 - Concentração de catequinas, cafeína e ácido gálico (GA) do extrato centrifugado (S2) em comparação com o extrato inicial (S1)

Amostra	EGCG (mg L ⁻¹)	EC (mg L ⁻¹)	C (mg L ⁻¹)	EGC (mg L ⁻¹)	GA (mg L ⁻¹)	Cafeína (mg L ⁻¹)
S1	1615±5 ^a	639±4 ^a	106±1 ^a	1403±9 ^a	75±0 ^a	1035±1 ^a
S2	1500±18 ^b	625±1 ^b	101±2 ^b	1332±10 ^b	72±1 ^b	981±8 ^b

Os valores médios indicados por uma letra diferente ao longo de uma coluna, são significativamente diferentes para o teste de *Tukey* com nível de significância igual a 0,05

A partir da verificação dos resultados da Tabela 4. 9 em relação ao extrato inicial S1, constata-se que após a centrifugação as concentrações reduziram 7,12 % para EGCG, 2,19% para EC, 4,71% para C, 5,10% para EGC, 4% para ácido gálico e 5,22% para cafeína.

4.3.2 Adição de quitosana seguida de centrifugação (T2)

A Figura 4. 13 apresenta as características físico-químicas obtidas nos sobrenadantes dos processos de clarificação com quitosana em diferentes concentrações (150 rpm, 20 min) seguida de centrifugação (8000 rpm, 20 min). O experimento conduzido sem a adição de quitosana (0 mg L^{-1}) apresenta apenas o efeito da centrifugação na clarificação do extrato de chá verde.

Verifica-se que para todas as concentrações de quitosana houve redução nos parâmetros examinados em relação aos valores iniciais para concentração de sólidos totais ($19.306 \text{ mg}_{\text{EAG}} \text{ L}^{-1}$), concentração de polifenóis ($9771 \text{ mg}_{\text{EAG}} \text{ L}^{-1}$), concentração de sólidos solúveis (2,4 °brix) e turbidez (1197 NTU) que variaram de 5,98 a 15,51%, de 8,56 a 23,36%, de 2,82 a 12,68% e 90,27 a 94,88%, respectivamente. O percentual de redução de sólidos solúveis (°brix) cresce na faixa de concentração de quitosana de 0 a 500 mg L^{-1} e então reduz-se para concentrações superiores, além disso o percentual de redução da turbidez apresenta comportamento semelhante de crescimento na faixa de concentração de quitosana de 0 a 500 mg L^{-1} e então diminui para concentrações superiores. Esse aumento da turbidez, visualmente identificado na Figura 4. 13, para concentrações superiores a 500 mg L^{-1} de quitosana, pode ser explicado pelo fato da quitosana em excesso, que não coagulou com os sólidos do extrato de chá, ter ficado solubilizada no sobrenadante. Ademais, os experimentos que empregam de 0 a 100 mg L^{-1} de quitosana apresentam percentuais de remoção de sólidos totais próximos variando de 5,98 a 8,51%, esse comportamento se deu devido as concentrações de quitosana serem incapazes de produzir efeitos de coagulação significativos frente ao efeito majoritário da centrifugação, outrossim, a adição de quitosana aumenta inicialmente o volume de sólidos do sistema e caso o mecanismo de adsorção/coagulação não seja efetivo o suficiente, frações dos sólidos presentes no adsorvente permanecem dispersos no sobrenadante.

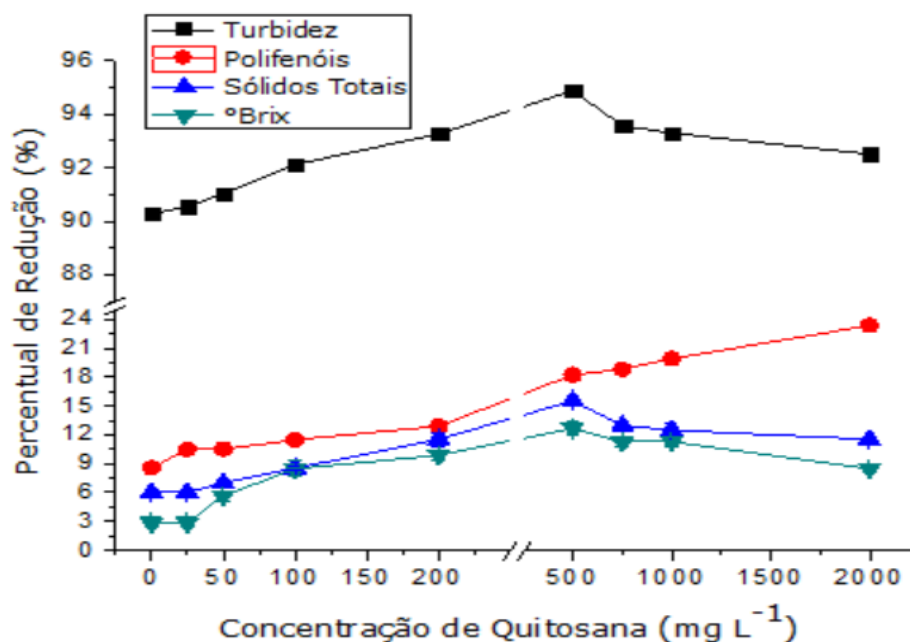


Figura 4. 13 - Características físico-químicas do sobrenadante após testes com quitosana (150 rpm, 20 min) seguido de centrifugação (8000 rpm, 20 min).

Para esse trabalho, a concentração de quitosana de 500 mg L⁻¹ foi a melhor condição para remoção de sólidos totais (15,51%), sólidos solúveis (12,68%) e turbidez (94,88%), entretanto, para concentrações de quitosana iguais ou superior es a 500 mg L⁻¹ o percentual de redução de polifenóis aumenta, indesejavelmente, e ultrapassa os 18%.

Rao *et al.* (2011) investigaram o uso de quitosana e adsorventes na clarificação do extrato de chá verde e verificaram afinidade da quitosana por compostos fenólicos e redução similar na concentração de polifenóis da obtida nesse trabalho. Sousa (2016) analisou o uso de quitosana na clarificação do chá verde nas concentrações de 20 a 100 mg L⁻¹ e constatou redução de sólidos totais e de polifenóis de 17,70 a 56,22% e de 5,02 a 62,7. Esse maior percentual de remoção de sólidos totais e polifenóis de Sousa (2016) se deve porque o extrato inicial da autora tinha uma concentração de sólidos totais (61.080 mg L⁻¹) aproximadamente 66% maior que deste estudo (20.644 mg L⁻¹). Além disso, diferentemente desse trabalho que utilizou centrifugação com etapa posterior ao pré-tratamento com adsorvente, Sousa (2016) utilizou um tempo de decantação de 2 horas que pode ter sido um fator determinante na clarificação de um extrato com relativa carga de sólidos em suspensão.

4.3.3 Adição de sementes de moringa seguida de centrifugação (T3)

A Figura 4. 14 apresenta as características físico-químicas obtidas nos sobrenadantes dos processos de clarificação com sementes de *Moringa oleífera* (SMO) em diferentes concentrações (150 rpm, 20 min) seguido de centrifugação (8000 rpm, 20 min). O experimento executado sem a adição de sementes de *Moringa oleífera* (SMO) (0 mg L^{-1}) apresenta apenas o efeito da centrifugação na clarificação do extrato de chá verde.

Através da Figura 4. 14, observa-se que houve redução nos parâmetros examinados na faixa de concentração de SMO de 0 a 10.000 mg L^{-1} , em relação aos valores iniciais para concentração de sólidos totais (19.306 mg L^{-1}), concentração de polifenóis ($9771 \text{ mg}_{\text{EAG}} \text{ L}^{-1}$) e concentração de sólidos solúveis ($2,4 \text{ °brix}$) que variaram de 5,98 a 15,99%, de 9,29 a 19,76%, de 3 a 14,93% e de 2,99 a 14,93%. A turbidez variou de 90,25 a 95,88% a partir do seu valor inicial 1197 NTU e apesar da crescente redução de 0 a 8000 mg L^{-1} de SMO, verifica-se aumento da turbidez para concentração maior que 8000 mg L^{-1} , isso indica que frações de sementes de *Moringa oleífera* em excesso que não coagularam/decantaram ficaram dispersas no sobrenadante provocando o aumento da turbidez. O mecanismo predominante de coagulação das SMO é a adsorção juntamente com a neutralização das cargas coloidais.

A *Moringa* é composta por cadeias de baixo peso molecular e alta densidade de carga. As proteínas presente nas sementes carregadas positivamente se ligam à superfície das partículas carregadas negativamente levando a formação dos flocos.

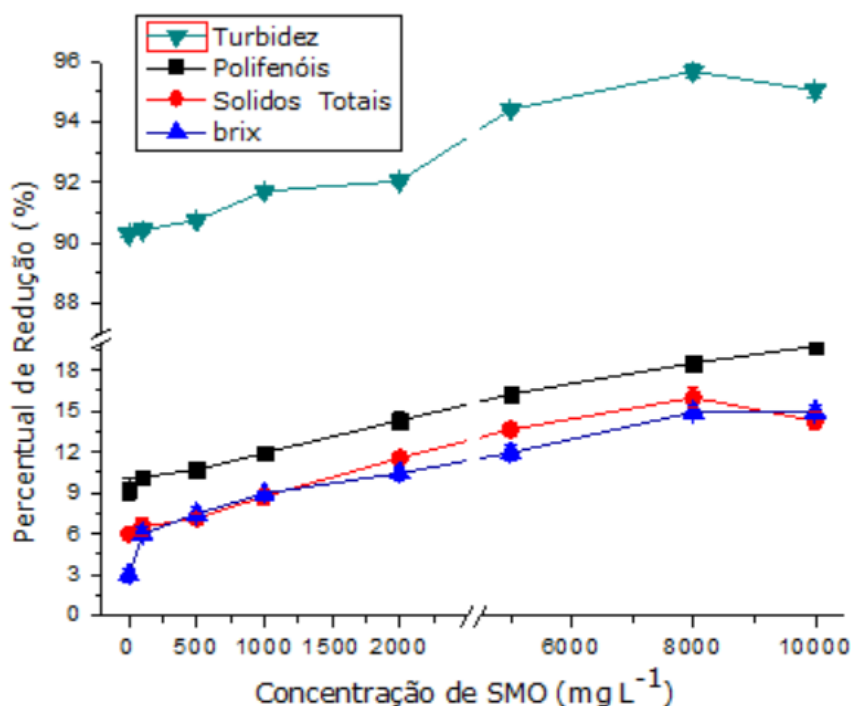


Figura 4. 14 - Características físico-químicas do sobrenadante após testes com sementes de *Moringa oleifera* (SMO) (150 rpm, 20 min) seguido de centrifugação (8000 rpm, 20 min).

Gassenschmidt *et al.* (1995). No trabalho de Bhatia *et al.* (2007) os autores utilizaram sementes de moringa desengorduras (6000 mg L⁻¹) para pré-tratamento do óleo de palma e obtiveram, após um período de decantação de 90 min, um percentual de remoção dos sólidos suspensos de 95%, corroborando com o resultado obtido por esse trabalho. A moringa se mostra como um agente coagulante natural promissor e de baixo custo para o tratamento de bebidas. Conforme as análises, foi observado aumento da redução de sólidos suspensos com a adição de quitosana e sementes *Moringa oleifera* (SMO) em concentrações elevadas adicionalmente à centrifugação. Contudo, devido aos efeitos indesejados da redução de polifenóis com o uso dos adsorventes, apenas a centrifugação (S2) foi escolhida na etapa de pré-tratamento do chá verde.

4.4 Filtração por membranas

4.4.1 Microfiltração

As características físico-químicas do extrato de chá verde centrifugado (S2) utilizado nos processos de microfiltração são aqueles já expostos na Tabela 4. 8. Utilizando o extrato S2 como alimentação fez-se então as microfiltrações a 0,8 bar com fator de concentração igual 1,5 para tempos de 150, 140 e 180 min para S3 (membrana plana), S4 (fibra oca sem revestimento) e S5 (fibra oca com revestimento), respectivamente. Operou-se em sistema *cross-flow* com velocidade de *cross-flow* (v_{cf}) igual a 5 cm s^{-1} conforme a Figura B. 1 no Anexo B. A Tabela 4. 10 apresenta as características físico-químicas dos permeados (S3) e (S4) obtidos.

De acordo com a Tabela 4. 10, os permeados da membrana comercial de $0,22 \mu\text{m}$ (S3) e da membrana de fibra oca de alumina (S4) apresentam uma retenção de polifenóis de 4,78 e 2,23 %, de sólidos de 1,93 e 4,26%, de turbidez de 87,67 e 89,91% e de °brix 5 e 4,76%, respectivamente. Domingues *et al.* (2014) microfiltraram através de membranas de fibra oca de poliéteramida suco de maracujá previamente tratado com quitosana e obtiveram um percentual de redução da turbidez de 95%, porcentagem semelhante ao encontrado desse trabalho. Kawakatsu *et al.* (2002) analisaram a clarificação do chá verde por micro e ultrafiltração e não observaram diferenças significativas nos valores de °brix após o processo de microfiltração, o que está de acordo com o encontrado nesse trabalho. Sousa *et al.* (2016) estudaram a purificação de polifenóis do chá verde por MF e UF e na MF obtiveram para membrana comercial plana de $0,22 \mu\text{m}$ uma redução de 30,5% de polifenóis, 20% de sólidos e 95,41% de turbidez. Essa maior remoção de sólidos e polifenóis obtida por Sousa *et al.* (2016) pode ser atribuída à maior concentração de sólidos ($61.080 \text{ mg}_{\text{EAG}} \text{ L}^{-1}$) no extrato de alimentação da microfiltração das autoras em comparação com esse trabalho ($19.306 \text{ mg}_{\text{EAG}} \text{ L}^{-1}$). Chandini *et al.* (2012) e Sousa *et al.* (2016) observaram maior redução de sólidos e polifenóis para membranas de menor tamanho de poro. Como a fibra oca sem revestimento, por ter menor permeabilidade de água, pode apresentar menor tamanho de poro que a membrana plana. Entretanto, o fato da membrana de fibra oca de alumina reter mais sólidos e menos polifenóis que a

membrana plana comercial de 0,22 μm pode ser explicada pelas características assimétricas da fibra oca.

Tabela 4. 10 - Características físico-químicas dos permeados dos processos de microfiltração do chá verde pela membrana plana de 0,22 μm (S3) e pela fibra oca de alumina (S4) em comparação com o extrato centrifugado alimentado (S2).

Amostra	Concentração de polifenóis ($\text{mg}_{\text{EAG}} \text{L}^{-1}$)	Concentração de sólidos (mg L^{-1})	Turbidez (NTU)	°brix
S2	9771 \pm 48 ^a	19.306 \pm 106 ^a	108 \pm 8 ^a	2,3 \pm 0,1 ^a
S3	9304 \pm 45 ^b	18.933 \pm 104 ^b	13 \pm 1 ^b	2,2 \pm 0,1 ^a
S4	9553 \pm 47 ^c	18.126 \pm 99 ^c	11 \pm 1 ^b	2,2 \pm 0,1 ^a

Os valores médios indicados por uma letra diferente ao longo de uma coluna, são significativamente diferentes para o teste de *Tukey* com nível de significância igual a 0,05.

A concentração de catequinas, cafeína e ácido gálico nos permeados dos processos de microfiltração pela membrana comercial de 0,22 μm (S3) e pela membrana de fibra oca de alumina (S4) estão representados na Tabela 4. 11.

A partir da análise dos dados da Tabela 4. 11, em relação ao extrato centrifugado inicial S2, observa-se que após a microfiltração a concentração de ácido gálico do permeado S3 reduziu 5,6%, mas do permeado S4 permaneceu inalterada. Todas as concentrações dos demais compostos dos permeados S3 e S4 diminuíram em relação ao centrifugado inicial S2.

As concentrações de EGCG, EC, C, EGC e cafeína reduziram 11,33% e 4,9%, 6,4% e 3,04%, 4,95% e 1,98%, 5,2% e 1,94%, respectivamente, para as filtrações com a membrana comercial e com a membrana de fibra oca sem revestimento. Dessa maneira, o permeado S4 através da membrana de fibra oca de alumina apresentou a menor redução dos compostos bioativos analisados individualmente.

Tabela 4. 11 - Concentração de catequinas, cafeína e ácido gálico (GA) nos permeados dos processos de microfiltração pela membrana plana de 0,22 (S3) e pela fibra oca de alumina sem revestimento (S4) em comparação com o extrato centrifugado (S2).

Amostra	EGCG (mg L ⁻¹)	EC (mg L ⁻¹)	C (mg L ⁻¹)	EGC (mg L ⁻¹)	GA (mg L ⁻¹)	Cafeína (mg L ⁻¹)
S2	1500±18 ^a	625±1 ^a	101±2 ^a	1332±10 ^a	72±1 ^a	981±8 ^a
S3	1330±9 ^b	585±3 ^b	96±2 ^b	1269±19 ^b	68±3 ^b	930±4 ^b
S4	1427±12 ^c	606±5 ^c	99±2 ^b	1308±5 ^c	72±0,4 ^a	962±3 ^c

Os valores médios indicados por uma letra diferente ao longo de uma coluna, são significativamente diferentes para teste de *Tukey* com nível de significância igual a 0,05.

O permeado da membrana de fibra oca (S4) está mais límpido conforme os resultados supracitados na Tabela 4. 10 e na Tabela 4. 11. Assim, a membrana de fibra oca apresenta características mais favoráveis à microfiltração do que a membrana comercial plana de 0,22 µm. Nesse sentido, S4 foi escolhido para ser utilizado como alimentação da ultrafiltração, pois forneceu menor redução na concentração de polifenóis (2,23%) e dos compostos individuais, maior valor de fluxo estabilizado (19,37 L h⁻¹m⁻²) e reduziu 4,26% dos sólidos presentes no extrato, enquanto o fluxo estabilizado das membranas plana de 0,22 µm foi de 14,63 L h⁻¹m⁻². O comportamento de fluxo pelas membranas será apresentado no item 4.6.1. Além disso, o cartucho composto de membranas de fibra oca de alumina pode ser reutilizado após limpeza sem o risco de rasgarem como frequentemente ocorre com as membranas comerciais de acetato de celulose durante a abertura do módulo. Isso mostra que a membrana de fibra oca de poros assimétricos de alumina é uma membrana promissora para a clarificação do chá verde.

4.4.2 Filtração sequencial

As características físico-químicas do extrato de chá verde microfiltrado através da fibra oca (S4) utilizado no processo de filtração sequencial através da fibra-oca com revestimento (S5) estão expostas na Tabela 4. 12. Utilizando, pois, o extrato S4 como alimentação fez-se então a ultrafiltração a 1,5 bar, durante 180 min com fator

de concentração igual 1,5. Para tal, operou-se em sistema *cross-flow* com velocidade de *cross-flow* (v_{cf}) igual a 4,79 cm s⁻¹ para a filtração através da fibra oca com revestimento polimérico (S5), esse valor foi calculado através da Figura B. 2 do Anexo B.

A Tabela 4. 12 apresenta as características físico-químicas dos permeado (S5) obtido em comparação com a alimentação (S4). De acordo com a Tabela 4. 12 o permeado da fibra oca com revestimento (S5) apresenta em relação à alimentação (permeado da fibra oca sem revestimento S4), uma retenção de aproximadamente 9,17 % de polifenóis, de 12,89% de sólidos, de 80,65 % de turbidez e 16,92 % de °brix.

Tabela 4. 12 - Características físico-químicas do permeado do processo de filtração pela fibra oca com revestimento (S5) em comparação com a fibra oca sem revestimento polimérico (S4).

Amostra	Concentração de polifenóis (mg _{EAG} L ⁻¹)	Concentração de sólidos (mg L ⁻¹)	Turbidez (NTU)	°brix
S4	9547±69 ^a	18.100±87 ^a	11±1 ^a	2,2±0,1 ^a
S5	8671±52 ^b	15.767±92 ^b	2,4±0 ^b	1,8±0,0 ^b

Os valores médios indicados por uma letra diferente ao longo de uma coluna, são significativamente diferentes para teste de *Tukey* com nível de significância igual a 0,05.

A concentração de catequinas, cafeína e ácido gálico no permeado do processo de filtração sequencial através da comercial fibra oca de alumina com revestimento polimérico (S5) está representado na Tabela 4. 13.

Tabela 4. 13 - Concentração de catequinas, cafeína e ácido gálico (GA) no permeado do processo de filtração pela fibra oca com revestimento (S5) em comparação com a fibra oca sem revestimento polimérico (S4).

Amostra	EGCG (mg L ⁻¹)	EC (mg L ⁻¹)	C (mg L ⁻¹)	EGC (mg L ⁻¹)	GA (mg L ⁻¹)	Cafeína (mg L ⁻¹)
S4	1431±5 ^a	608±6 ^a	98±1 ^a	1312±22 ^a	71±1 ^a	960±6 ^a
S5	1238±15 ^b	532±2 ^b	87±3 ^a	1180±17 ^b	62±4 ^b	819±9 ^b

Os valores médios indicados por uma letra diferente ao longo de uma coluna, são significativamente diferentes para teste de *Tukey* com nível de significância igual a 0,05.

De acordo com a Tabela 4. 13 observa-se que houve redução de todos os compostos individuais após a filtração sequencial através da fibra oca com revestimento polimérico. Nesse sentido, as reduções para as catequinas EGCG, EC, C, EGC e para o ácido gálico e a cafeína foram 13,51%, 12,39%, 11,35%, 10,09%, 12,42% e 14,62% respectivamente.

4.5 Análises dos mecanismos responsáveis pelo decaimento do fluxo dos processos de filtração por membranas

O comportamento do fluxo em função do tempo para a filtração do chá verde foi estudada. Ademais, foi possível calcular as resistências de cada membrana e quais mecanismos de *fouling* foram responsáveis pelo decaimento do fluxo. Os valores das permeabilidades das membranas empregadas nesse trabalho são apresentados na Tabela 4. 14. Os gráficos que foram utilizados para a determinação desses dados juntamente com seus respectivos valores de coeficiente de determinação podem ser consultados nas Figuras B1, B2, B3 e B4 no Anexo B. Verifica-se que a permeabilidade hidráulica da membrana comercial plana de 0,22 µm (19,08 L h⁻¹ m⁻² kPa⁻¹) é aproximadamente 2,1 vezes maior que da fibra oca sem revestimento (9,21 L h⁻¹ m⁻² kPa⁻¹). A adição da camada polimérica diminuiu a permeabilidade hidráulica da fibra oca de 9,21 L h⁻¹ m⁻² kPa⁻¹ para 1,08 L h⁻¹ m⁻² kPa⁻¹.

Tabela 4. 14 - Permeabilidade hidráulica das membranas.

Membrana	Porosidade (μm)	Material	Fabricante	Permeabilidade $\text{L h}^{-1} \text{m}^{-2} \text{kPa}^{-1}$
Plana	0,22	Acetato de Celulose	Millipore™	19,08
Fibra oca sem revestimento	-	Al_2O_3	Grupo de pesquisa FEQUI-UFU	9,21
Fibra oca sem revestimento (Reuso)	-	Al_2O_3	Grupo de pesquisa FEQUI-UFU	8,69
Fibra oca com revestimento	-	$\text{PES}/\text{Al}_2\text{O}_3$	Grupo de pesquisa FEQUI-UFU	1,08
Fibra oca com revestimento (Reuso)	-	$\text{PES}/\text{Al}_2\text{O}_3$	Grupo de pesquisa FEQUI-UFU	1,00

Ainda conforme a Tabela 4. 14, a permeabilidade hidráulica das fibra ocas de Al_2O_3 e $\text{PES}/\text{Al}_2\text{O}_3$ após o processo de limpeza (reuso) foram $8,69 \text{ L h}^{-1} \text{m}^{-2} \text{kPa}^{-1}$ e $1,00 \text{ L h}^{-1} \text{m}^{-2} \text{kPa}^{-1}$, respectivamente. Ademais houve um percentual de recuperação de aproximadamente 94% para o reuso da fibra oca de Al_2O_3 e de 93% para o reuso da fibra oca $\text{PES}/\text{Al}_2\text{O}_3$. Esse percentual de recuperação acima de 90% após indica que o cartucho produzido no laboratório pode ser reutilizado com boa confiabilidade.

4.5.1 Comportamento do fluxo em função do tempo de operação

O comportamento do fluxo para o processo de filtração do chá verde está exposto na Figura 4. 15.

Pode-se observar que o decaimento do fluxo através fibra oca é inicialmente mais rápido do que da membrana plana de 0,22 μm e estabiliza-se após 25 min de microfiltração, tendo um fluxo estabilizado de 19,37 $\text{L h}^{-1} \text{m}^{-2}$. Já o decaimento do fluxo através da membrana plana de 0,22 μm é mais suave e estabiliza-se apenas após 110 min de microfiltração, tendo um fluxo estabilizado de 14,63 $\text{L h}^{-1} \text{m}^{-2}$. Sousa *et al.* (2016) avaliaram a microfiltração do chá verde e obtiveram fluxos estabilizados de 10, 27, 7,44 e 4,01 $\text{L h}^{-1} \text{m}^{-2}$ para as membranas de 0,8, 0,3 e 0,22 μm respectivamente. De Oliveira *et al.* (2012) microfiltraram o suco de maracujá utilizando membranas de fibra oca de poliamida de porosidade 0,3 μm , os autores obtiveram um fluxo estabilizado de 19,15 $\text{L h}^{-1} \text{m}^{-2}$ para a filtração do suco pré-tratado com enzimas e centrifugação. Na clarificação do extrato de chá verde, os autores Kawakatsu *et al.* (1995) obtiveram um fluxo estabilizado de 18 $\text{L h}^{-1} \text{m}^{-2}$ para a membrana plana de triacetato de celulose de porosidade 0,22 μm .

A Figura 4. 16 mostra o comportamento do fluxo para o processo de filtração sequencial do chá verde através da fibra oca com revestimento polimérico. Pela Figura 4. 16 nota-se que o decaimento do fluxo através fibra oca com revestimento é inicialmente mais rápido nos primeiros 20 min de filtração e estabiliza-se após 100 min de filtração, tendo um fluxo estabilizado de 3,51 $\text{L h}^{-1} \text{m}^{-2}$

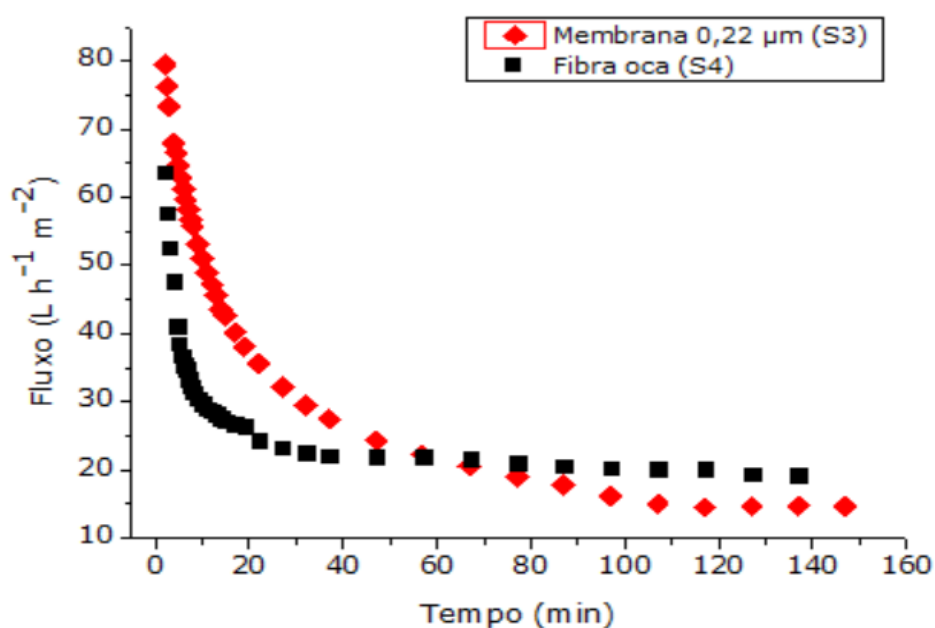


Figura 4. 15 - Perfil do fluxo do chá verde em função do tempo para as filtrações do chá verde com emprego da membrana plana de 0,22 μm e da fibra oca sem revestimento polimérico.

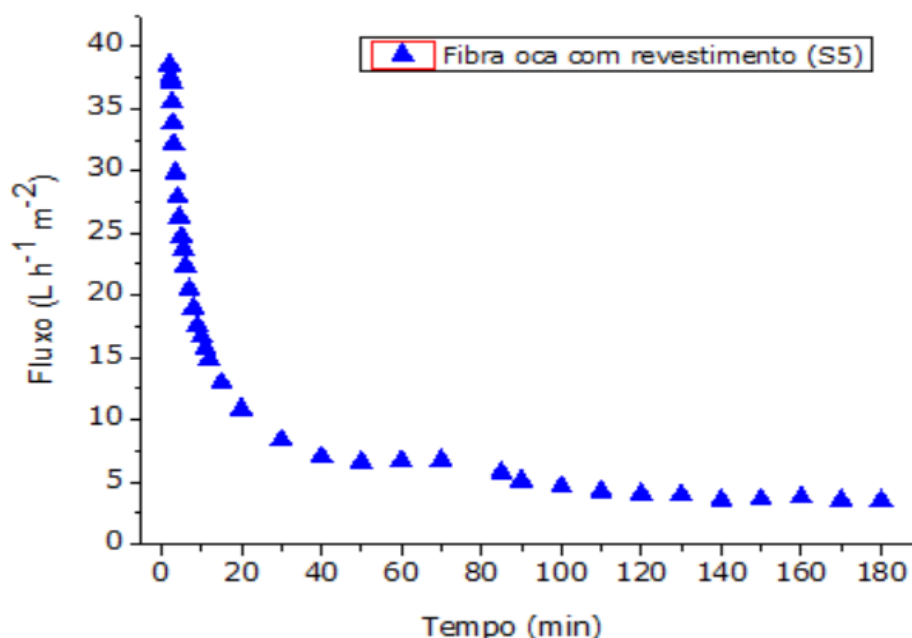


Figura 4. 16 - Perfil do fluxo do chá verde em função do tempo para a filtração com emprego da fibra oca com revestimento polimérico (S5).

4.5.2 Cálculo das resistências

O cálculo das resistências foi feito para os processos de filtração do chá verde. Os resultados obtidos para os experimentos estão expostos na Tabela 4. 15. A Tabela 4. 15 mostra o cálculo das resistências (R_M) para a membrana plana de 0,22 μm ($0,02 \times 10^{13} \text{ m}^{-1}$), para a fibra oca sem revestimento ($0,05 \cdot 10^{13} \text{ m}^{-1}$) e para fibra oca com revestimento ($0,37 \cdot 10^{13} \text{ m}^{-1}$). A resistência devido ao bloqueio dos poros (R_P) e à formação de torta (R_C) em relação à resistência total correspondem aproximadamente a 62,50% e 37,50% para membrana plana de 0,22 μm , 38,62% e 60,61% para a fibra oca sem revestimento e 60,15% e 36,84% para a fibra oca com revestimento respectivamente.

Tabela 4. 15 - Resistências da membrana para filtração do chá verde (resistência hidráulica da membrana (R_M), resistência ao bloqueio dos poros (R_P), resistência à formação de torta (R_C) e resistência total (R_T)).

Experimento	Resistência 10^{13} m^{-1}			
	R_M	R_P	R_C	R_T
Membrana plana de 0,22 μm (S3)	0,02	0,70	0,40	1,12
Fibra oca sem revestimento (S4)	0,05	1,77	2,80	4,62
Fibra oca com revestimento (S5)	0,37	7,38	4,52	12,27

Ushikubo *et al.* (2007) avaliaram o decaimento do fluxo para microfiltração do suco de Umbu e observaram, para a membrana de polipropileno de 0,20 μm , que a resistência devido ao bloqueio dos poros (R_P) foi maior que a resistência devido a formação da torta (R_C). Isso corrobora o encontrado nesse trabalho para o processo de microfiltração do chá verde. Domingues *et al.* (2014) reportaram que o mecanismo predominante de *fouling* varia de acordo com a concentração da alimentação.

4.5.3 Estimativa do mecanismo responsável pelo *fouling* das membranas

Os parâmetros e as curvas calculados para a microfiltração foram obtidos de acordo com o modelo propostos por Field *et al.* (1995). Os valores de n foram determinados para representar cada mecanismo ou modelo de *fouling* predominante. No modelo $n = 0$ para a formação de torta, considera-se o efeito de partículas maiores que o tamanho dos poros e o fato de que essas partículas se aglomeram na superfície da membrana formando uma torta filtrante, constituindo uma resistência adicional ao processo. No modelo $n = 1$ para o bloqueio intermediário dos poros, as partículas são próximas do tamanho dos poros e tendem a se agrupar em regiões específicas do poro, sem o fechar completamente. No modelo $n = 1,5$ para bloqueio interno dos poros, considera que o tamanho de partícula é menor do que a abertura dos poros e

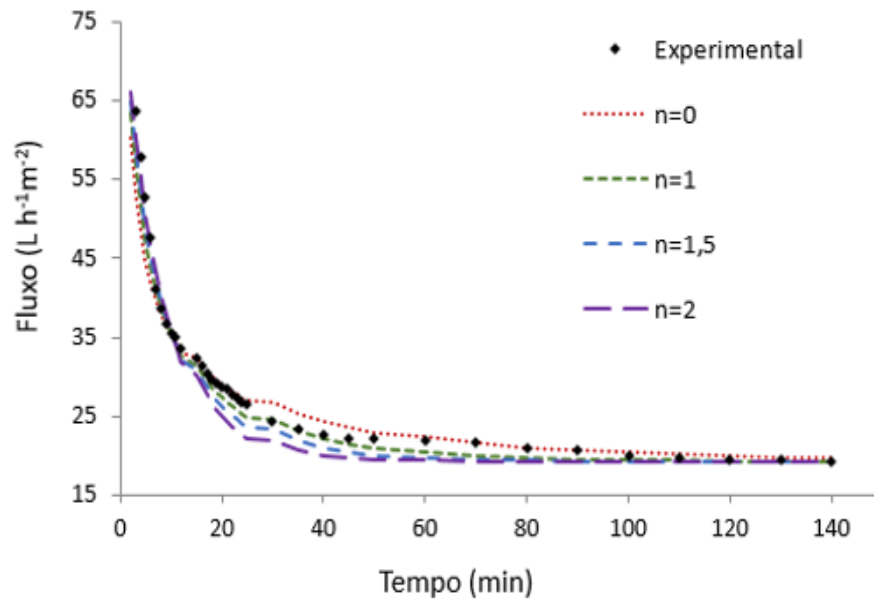
que as partículas tendem a ser mantidas dentro dos poros devido à adsorção nas paredes dos poros ou por deposição nas cavidades internas. Uma vez que o bloqueio ocorre internamente, a redução na abertura do poro por bloqueio torna-se independente das condições do fluxo, ou seja, o fluxo decai para um valor nulo. Já no modelo $n = 2$ para o bloqueio completo dos poros, as partículas são maiores do que a abertura dos poros, uma parte da superfície da membrana coberta pelas partículas é selada e a permeação é evitada por uma redução na área superficial.

A Tabela 4. 16 apresenta os valores de desvio da raiz quadrada média (RMSD) entre os dados de fluxo experimentais e calculados para cada mecanismo de *fouling*, encontrando-se assim os melhores valores de “n” que melhor se ajustam aos dados experimentais. Esses resultados indicam através do parâmetro RMSD o mecanismo de *fouling* predominante nos processos de filtração do chá verde. O mecanismo de *fouling* predominante através da membrana plana 0,22 μm (S3) foi bloqueio interno dos poros ($n=1,5$) com valor de RMSD igual a 1,629. Entretanto, a formação de torta ($n=0$) exerceu importante impacto no decaimento do fluxo em (S3), com valor de RMSD igual a 0,385. O mecanismo de *fouling* mandatório na microfiltração através da fibra oca (S4) foi bloqueio intermediário dos poros ($n=1$) com valor de RMSD igual a 1,271. Contudo, a formação de torta ($n=0$) também teve importante papel no decaimento do fluxo através da fibra oca (S4) com valor de RMSD igual a 1,527. Já na filtração pela fibra oca com revestimento polimérico (S5) o único mecanismo de *fouling* prevalecente foi o bloqueio intermediário dos poros ($n=1$) com valor de RMSD de 0,580.

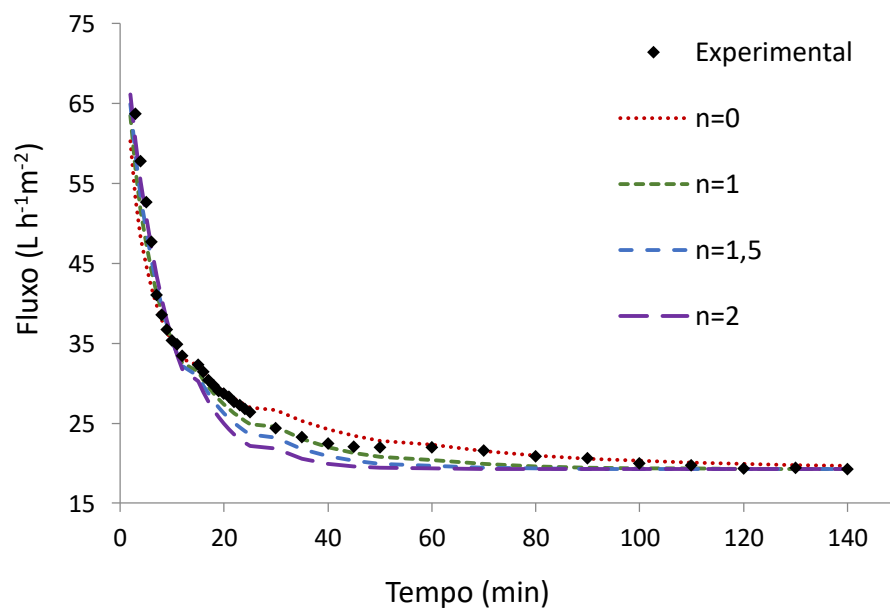
Tabela 4. 16 - Desvio da raiz quadrada média (RMSD) entre os dados de fluxo experimentais e calculados para cada mecanismo de *fouling* para filtração do chá verde.

Experimento	Parâmetro	Mecanismo de <i>fouling</i>			
		Formação de torta (n=0)	Bloqueio intermediário dos poros (n=1)	Bloqueio interno dos poros(n=1,5)	Bloqueio completo dos poros(n=2)
Plana 0,22 µm (S3)	RMSD	4,464	1,789	1,629	2,861
Fibra oca sem revestimento (S4)	RMSD	0,385	1,510	2,334	3,194
Fibra oca com revestimento (S5)	RMSD	1,776	0,580	1,250	2,019

A Figura 4. 17 apresenta graficamente o ajuste dos modelos aos dados experimentais para microfiltração do extrato de chá verde centrifugado (S2) com as membranas plana de 0,22 µm e fibra oca. Confirma-se graficamente, pela Figura 4. 17, os resultados obtidos pela Tabela 4. 16. A priori, observa-se que todos os mecanismos de *fouling* contribuíram para o decaimento do fluxo durante os primeiros 15 min de microfiltração tanto para S3 quanto para S4. Para a membrana plana 0,22 µm (S3) o fluxo em estado estacionário foi melhor descrito conjuntamente pelos 3 modelos de bloqueio de poros (n=1, 1,5 e 2). Já para fibra oca o fluxo em estado estacionário foi melhor descrito conjuntamente por todos os modelos de *fouling* (n= 0, 1, 1,5 e 2).



a)



b)

Figura 4. 17 - Fluxo experimental e calculado para a filtração do extrato de chá verde para as membranas: a) Plana 0,22 μ m (S3), b) Fibra oca de alumina (Al_2O_3) (S4).

A Figura 4. 18 apresenta o fluxo apresenta graficamente o ajuste dos modelos aos dados experimentais para a filtração sequencial através da fibra oca de alumina com revestimento polimérico (S5).

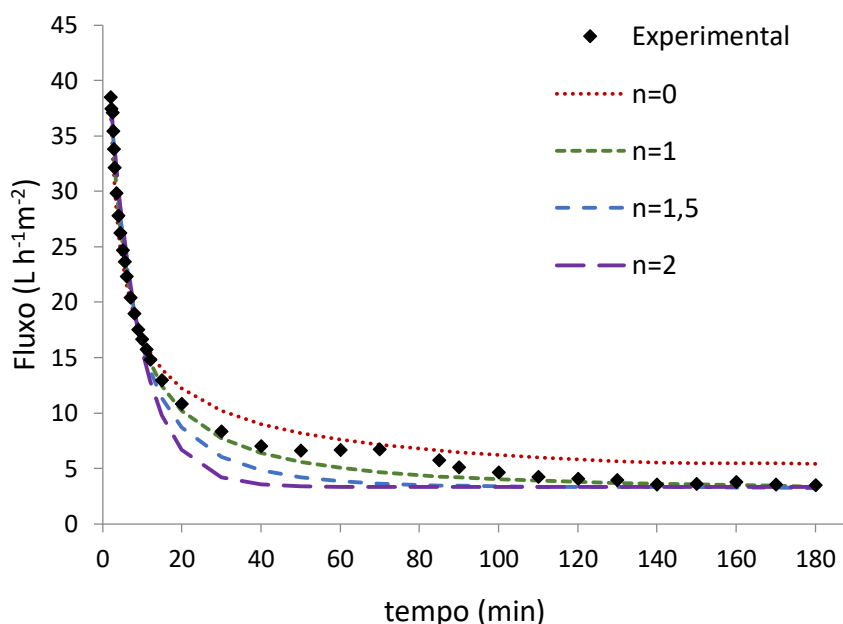


Figura 4. 18 - Fluxo experimental e calculado para a filtração do extrato de chá verde para as membrana fibra oca de alumina com revestimento polimérico (PES/Al₂O₃) (S5).

A Figura 4. 18 corrobora graficamente os resultados obtidos através da Tabela 4. 16. Inicialmente, observa-se que todos os mecanismos de *fouling* contribuíram pelo decaimento do fluxo nos primeiros 15 min de filtração. Para a fibra oca com revestimento (S5), o fluxo em estado estacionário foi melhor descrito conjuntamente pelos 3 modelos de bloqueio de poros (n=1, 1,5 e 2). Entretanto, observa-se que o modelo de formação de torta (n=0) foi intermediariamente responsável pelo decaimento do fluxo por volta dos 70 min de filtração. Gerke *et al.* (2017) estudaram a clarificação do extrato de erva mate (*Ilex paraguariensis*) por micro e ultrafiltração. No caso da microfiltração através de membranas de fibra oca de poliéteramida de tamanho de poro 0,44 μm , os autores observaram que o mecanismo de *fouling* principal era o de formação da torta (n=0). Sousa *et al.* (2016) analisaram o decaimento do fluxo na microfiltração do extrato de chá verde e observaram que o

fluxo no estado estacionário através das membranas de 0,22 e 0,8 μm foi melhor ajustado pelo modelo de bloqueio interno dos poros ($n=1,5$), já através da membrana de 0,3 μm o fluxo no estado estacionário foi melhor descrito conjuntamente pelos modelos de bloqueio intermediários dos poros e bloqueio interno dos poros ($n=1$ e $1,5$). Argyle e Bird (2015) notaram que o modelo de formação de torta ($n=0$) foi o mecanismo de *fouling* que melhor descreveu o processo de clarificação do chá preto (*Camellia sinensis*) usando um sistema de microfiltração com uma membrana de polissulfona (tamanho de poro variando entre 0,5 e 1,55 μm). Argyle e Bird (2015) reportaram ainda que o mecanismo predominante de *fouling* na microfiltração do chá preto é dependente da concentração do extrato alimentado. Domingues *et al.* (2014) compararam diferentes pré-tratamentos na microfiltração do suco de maracujá. Os autores observaram que a amostra do pré-tratamento que removeu maior conteúdo de sólidos, durante a microfiltração, foi melhor representada pelo modelo de bloqueio interno dos poros ($n=1,5$) enquanto amostras de todos os outros pré-tratamentos foram melhor ajustadas pelo modelo de formação de torta ($n=0$).

4.5.4 Fotomicrografias de MEV e EDS das membrana

A Figura 4. 19 apresenta a análise estrutural da membrana plana de 0,22 μm a) e b) seção transversal antes e depois da filtração de chá e c) e d) da seção plana antes e depois da filtração de chá respectivamente. Através da Figura 4. 19 b), empregando aumentos de 400 vezes, observa-se o bloqueio interno dos poros pelas partículas presentes no chá. Essa figura ilustra o comportamento supracitado na Tabela 4. 16 e na Figura 4. 17, que indicou bloqueio interno dos poros ($n=1,5$) como mecanismo predominantemente responsável pelo decaimento do fluxo através da membrana comercial plana de 0,22 μm . Já pela Figura 4. 19 d), com aumentos de 1500 vezes, nota-se visualmente que apesar de ter havido bloqueio dos poros não houve formação de torta filtrante uma vez que existem espaços não preenchidos na estrutura. A Figura 4. 20 mostra a análise estrutural da fibra de alumina sem revestimento polimérico a) e b) seção transversal antes e depois da filtração de chá e c) e d) seção plana antes e depois da filtração de chá respectivamente.

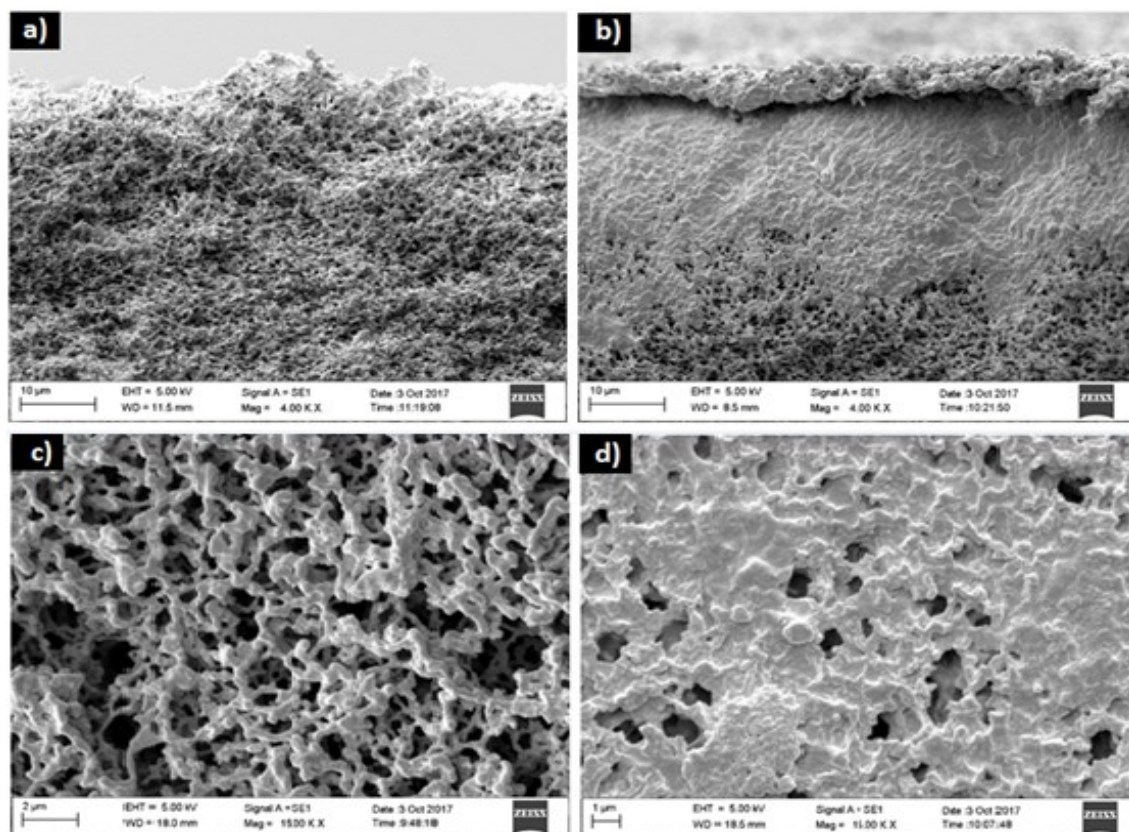


Figura 4. 19 – Fotomicrografias de MEV da membrana plana de 0,22 μm a) e b) seção transversal antes e depois da filtração de chá com aumentos de 400 vezes e c) e d) seção plana antes e depois da filtração de chá com aumentos de 1500 vezes respectivamente.

Na Figura 4. 20 b) observa-se visualmente a preponderância do mecanismo de formação de torta ($n=0$) na superfície da membrana. Ademais, pela Figura 4. 20 d) nota-se, com aumentos de 1500 vezes, que a camada de torta preencheu toda a superfície da fibra oca sem revestimento. Essas constatações ratificam os resultados prévios interpretados a partir da Figura 4. 17 e da Tabela 4. 16.

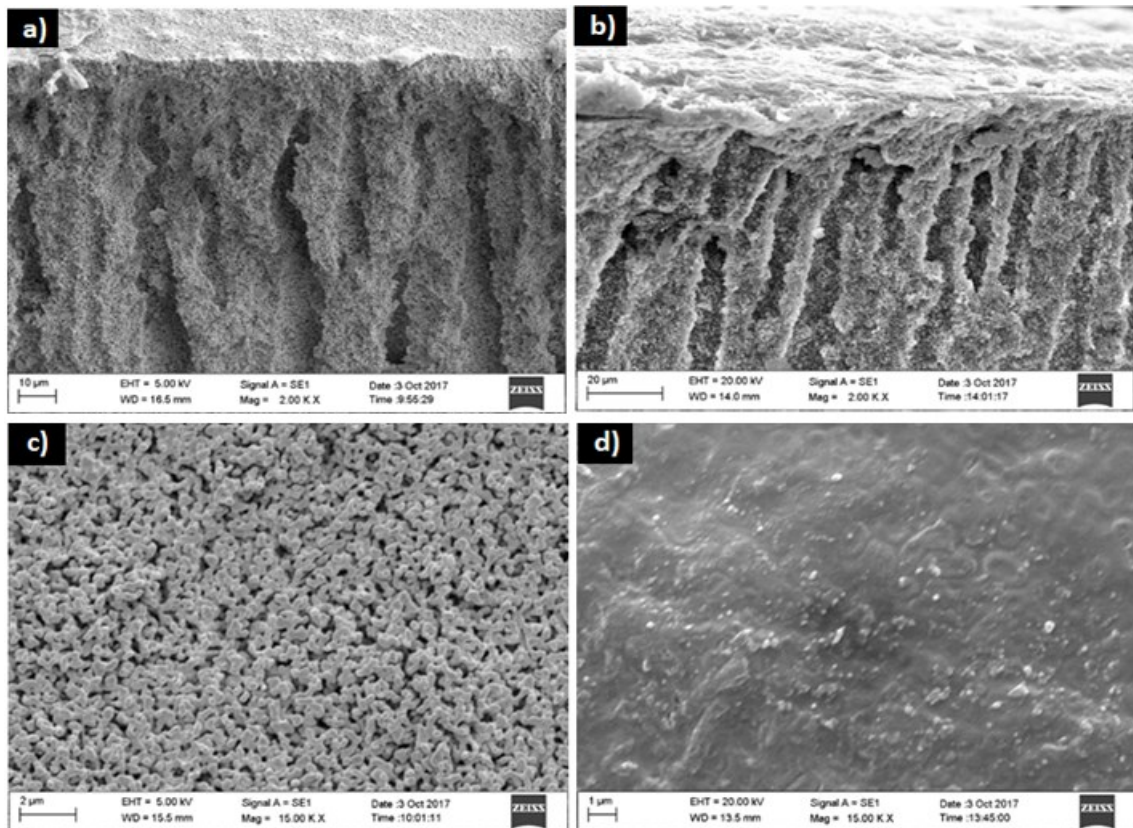


Figura 4. 20 - Fotomicrografias de MEV da fibra de alumina sem revestimento polimérico a) e b) seção transversal antes e depois da filtração de chá com aumentos de 200 vezes e c) e d) seção plana antes e depois da filtração de chá com aumentos de 1500 vezes respectivamente.

A Figura 4. 21 a) e b) representa o EDS da membrana plana de 0,22 μ e da fibra oca sem revestimento após a filtração de chá verde respectivamente. Pela Figura 4. 21 a) observa-se que o elemento químico de maior concentração é o carbono (em vermelho) e, conforme as duas setas, sua concentração é praticamente constante tanto na estrutura da membrana plana de 0,22 μ de acetato de celulose quanto na torta.

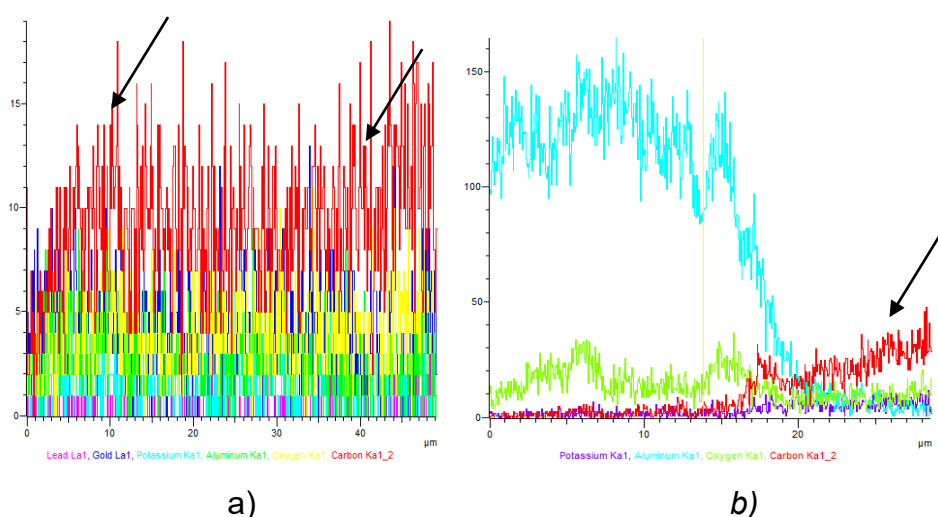


Figura 4. 21 - a) e b) EDS da membrana plana de $0,22\ \mu$ e da fibra oca sem revestimento após a filtração de chá verde respectivamente.

Ainda, pela Figura 4. 21 b) observa-se que a concentração de carbono (em vermelho), conforme a seta, é bem maior na região da torta (à direita) e por outro lado a concentração de alumina em verde piscina é maior na membrana como esperado. A concentração de potássio e oxigênio são praticamente constantes tanto na torta quando no interior da membrana.

A Figura 4. 22 apresenta as fotomicrografias de MEV da fibra oca com revestimento polimérico.

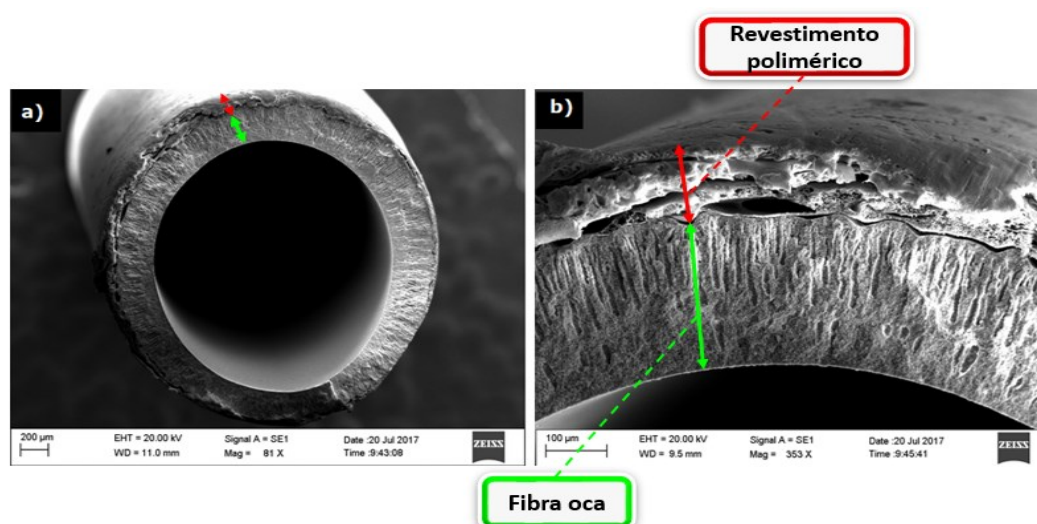


Figura 4. 22 - Fotomicrografias de MEV da fibra oca de alumina com revestimento polimérico: a) aumento de 81 vezes e b) aumento de 353 vezes.

Observando as fotomicrografias de MEV da fibra oca de alumina com revestimento polimérico, através da Figura 4. 22, nota-se que a camada polimérica foi aplicada sobre toda a superfície da fibra. A espessura da fibra oca e do revestimento polimérico foram estimados pelo software *ImageJ* e foram iguais a $258,22 \pm 0,71 \mu\text{m}$ e $149,58 \pm 0,73 \mu\text{m}$.

4.6 Perspectiva de produção do chá verde como bebida comercializável

A produção industrial de bebidas não alcólicas tem crescido no mundo nos últimos anos. Nesse contexto, os consumidores têm priorizado bebidas ricas em compostos bioativos por estarem mais preocupados com a saúde e a boa forma (Makanjuola, 2017). Para atender às expectativas do mercado, as indústrias, com seus centros de pesquisa e desenvolvimento (P&D), e também os pesquisadores universitários, precisam sempre se atualizar, buscando novas tecnologias que façam que o processo produtivo se torne mais eficiente e melhore a qualidade do produto final. Esse trabalho empregou uma inovação tecnológica que consistiu na construção de um cartucho aplicando membranas de alumina do tipo fibra oca com e sem revestimento polimérico para o processamento do extrato de chá verde com o propósito de fornecer uma bebida de maior valor comercial. Abordar-se-á a seguir as análises de estabilidade bem como a viabilidade do processo proposto.

4.6.1 Análises de estabilidade

A estabilidade dos permeados das filtrações do chá verde em relação à concentração de polifenóis totais, turbidez e formação de *tea cream* foi avaliada semanalmente durante 30 dias, sob refrigeração à 5°C, conforme apresentado nas Figuras 4. 23, 4. 24 e 4. 25.

A Figura 4. 23 apresenta o perfil de concentração de polifenóis totais do extrato centrifugado (S2) e dos permeados (S3, S4 e S5) de chá verde ao longo de 30 dias de armazenamento. Nota-se comportamentos diferentes para a concentração de polifenóis totais com os dias de estocagem à 5°C entre o extrato centrifugado alimentado e os permeados.

Observa-se pela Figura 4. 23 que o permeado obtido através da filtração sequencial pela fibra oca com revestimento (S5) apresentou o maior período de constância na concentração de polifenóis (7° ao 30° dia) dentre todas as amostras analisadas. Durante os 30 dias de refrigeração houve redução de polifenóis de 12,18% para o extrato centrifugado (S2) e de 9,03%, 8,74% e 7,39% para os permeados da membrana plana de 0,22 μm (S3), da fibra oca sem revestimento (S4) e da fibra oca com revestimento (S5) respectivamente. Essa diminuição constatada na concentração polifenóis deve-se, muito provavelmente, ao fato que os compostos fenólicos se complexaram a outros compostos de maior peso molecular, como as proteínas, carboidratos, aminoácidos livres e etc., que se encontravam solubilizados no extrato centrifugado e nos permeados. Nesse sentido, o fato do permeado da fibra oca com revestimento (S5) ter apresentado menor percentual de redução de polifenóis (7,39%) nos 30 dias de estocagem pode ser explicado pela purificação sequencial do extrato suportada no aumento da remoção dos compostos de maior peso molecular ao longo das etapas conforme supracitado.

A redução de 12,18% de polifenóis para o extrato centrifugado (S2) encontrada nesse trabalho está de acordo com Monsanto *et al.* (2014), os autores observaram que a formação do *tea cream* causa entre 10 e 25% de remoção dos polifenóis presentes no extrato de chá preto. Sousa *et al.* (2016) avaliaram a estabilidade do chá verde e observaram uma queda de aproximadamente 27% na concentração de polifenóis para o permeado da membrana plana de 0,22 μm após armazenamento por 30 dias à 5°C. O percentual de redução de polifenóis para o permeado da membrana 0,22 μm encontrado nesse trabalho é quase três vezes menor que o de Sousa *et al.* (2016), isso pode ter ocorrido pelo fato do permeado das autoras possuir provavelmente maior conteúdo de compostos complexantes além de uma concentração de sólidos em suspensão (48882 mg L⁻¹) três vezes maior que desse trabalho (18933 mg L⁻¹).

O comportamento da turbidez foi avaliado conforme apresentado na Figura 4. 24. Verifica-se que em 30 dias de armazenamento à 5°C (Figura 4. 24), a turbidez aumentou 173,85% para o extrato centrifugado (S2) e 144,74%, 132,35% e 39,44% para os permeados da membrana plana de 0,22 μm (S3), da fibra oca sem revestimento (S4) e da fibra oca com revestimento (S5) respectivamente. O menor

percentual de aumento da turbidez atingido pelo permeado da fibra oca com revestimento (S5) muito provavelmente se deve ao fato de a turbidez inicial (dia “0”) encontrar-se já abaixo de 5 NTU. Em síntese, constatou-se que o permeado mais clarificado/purificado (S5) possuía menos compostos complexantes provocadores do aumento da turbidez e por essa razão houve menor acréscimo no valor desse parâmetro no período analisado (39,44%).

No trabalho de Sousa *et al.* (2016) a estabilidade do chá verde foi avaliada e as autoras observaram aproximadamente 60% de aumento na turbidez ao final dos 30 dias de armazenamento à 5°C em relação ao dia “0”. Já Chandini *et al.* (2012) avaliaram a estabilidade do chá preto, os autores constataram aproximadamente 87% de aumento da turbidez do permeado da membrana de 0,2 µm ao final dos 30 dias de armazenamento à 5°C em relação ao dia “0”.

A formação do *tea cream* foi avaliada como mostra a Figura 4. 25. Verifica-se para os permeados dos processos S3, S4 e S5 (Figura 4. 25) que o percentual de crescimento da formação de *tea cream* foi maior nos primeiros 14 dias de armazenamento. Houve, pois, aumento na formação de *tea cream* de 34,57%, 24,17% e 16,94% no extrato centrifugado (S2) e nos permeados da membrana plana de 0,22 µm (S3) e da fibra oca sem revestimento (S4). Por outro lado, não foi observada formação de *tea cream* no permeado da fibra oca com revestimento polimérico (S5) em 30 dias de refrigeração à 5°C, sendo essa uma importante constatação em termos da produção do chá verde como uma bebida a ser comercializada.

Liang e Xu (2001) reportaram que o tamanho médio dos compostos que causam a formação do *tea cream* é 0,50 µm, portanto a microfiltração com membranas de porosidade menor que 0,50 µm podem contribuir para a remoção de partículas responsáveis pela complexação com polifenóis, minimizando assim a ocorrência desse fenômeno.

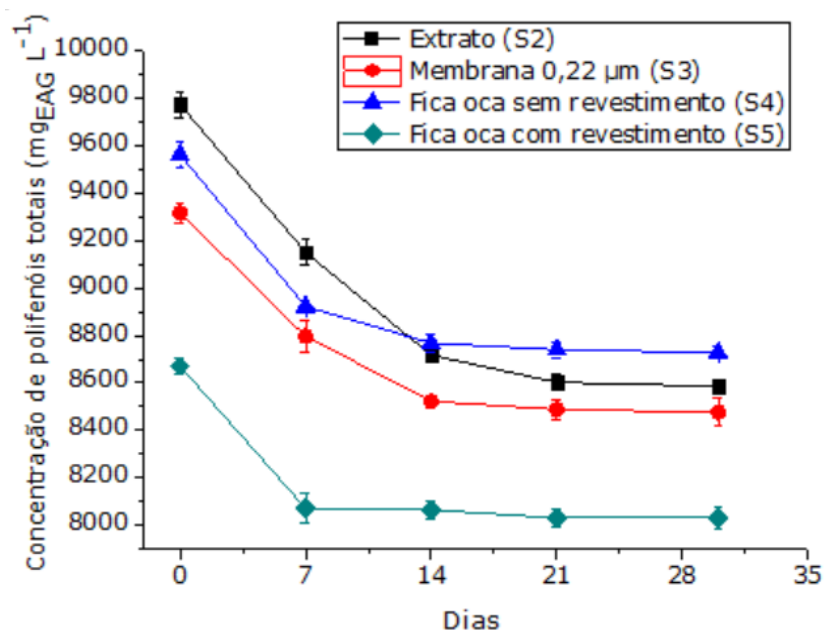


Figura 4. 23 - Concentração de polifenóis totais do chá verde ao longo de 30 dias de armazenamento à 5°C para o extrato centrifugado (S2), e os permeados da membrana plana de 0,22 µm (S3) e da fibra oca (S4).

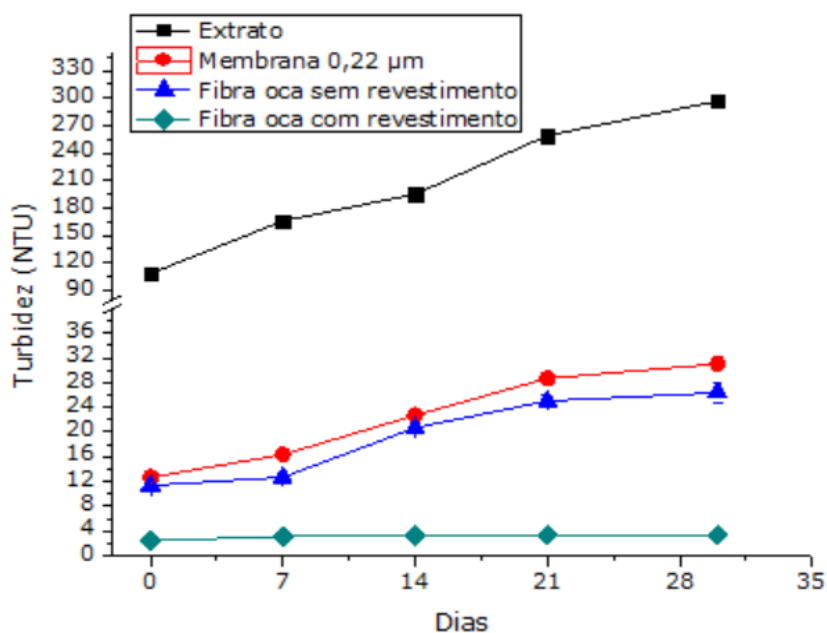


Figura 4. 24 - Turbidez do chá verde ao longo de 30 dias de armazenamento à 5°C para o extrato centrifugado (S2), e os permeados da membrana plana de 0,22 µm (S3) e da fibra oca sem revestimento (S4) e da fibra oca com revestimento (S5).

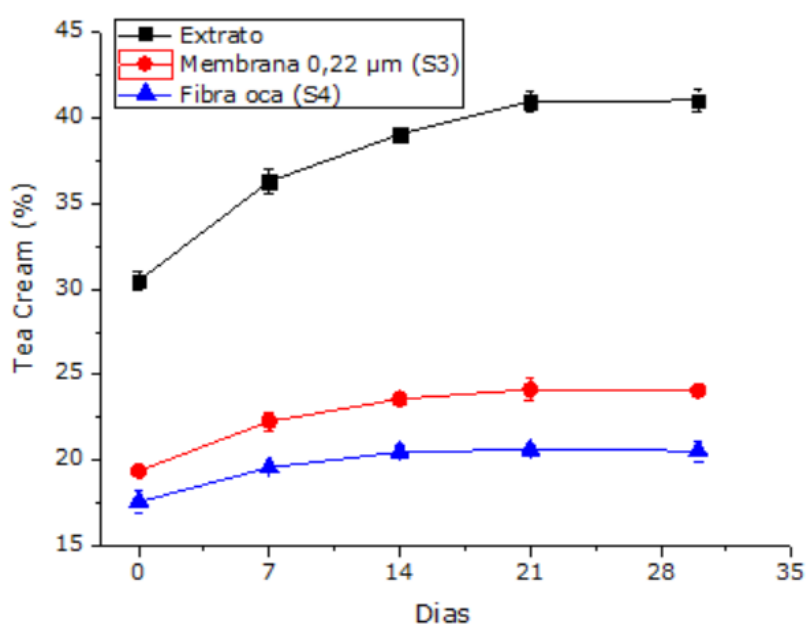


Figura 4. 25 - Porcentagem de formação de tea cream no chá verde ao longo de 30 dias de armazenamento à 5°C para o extrato centrifugado (S2), e os permeados da membrana plana de 0,22 µm (S3) e da fibra oca (S4).

No trabalho de Chandini *et al.* (2012), os autores analisaram a estabilidade dos permeados das microfiltrações para o chá preto para membranas com porosidade 0,2 e 0,45 µm e observaram que estes se mantiveram estáveis quando armazenados sob refrigeração durante 30 dias à 5°C. Chandini *et al.* (2012) consideraram estáveis permeados com o valor de turbidez menor ou igual a 4 NTU. Nesse trabalho, seguindo o mesmo critério adotado por Chandini *et al.* (2012), nota-se que houve estabilidade durante os 30 dias sob refrigeração apenas para o permeado da fibra oca com revestimento (S5) uma vez que os valores de turbidez permaneceram abaixo de 4 NTU e não houve formação de *tea cream*.

4.6.1 Análise de viabilidade do processo

A Figura 4. 26 mostra esquematicamente o processo sequencial de clarificação e purificação do extrato de chá verde com os seus respectivos percentuais de pureza e de redução dos parâmetros físico-químicos. Os percentuais de redução dos parâmetros físico-químicos apresentados a seguir foram discutidos individualmente

ao longo desse trabalho. Entretanto, faz-se necessária uma análise global de viabilidade e aplicabilidade do processo proposto para a produção do chá verde como bebida comercializável.

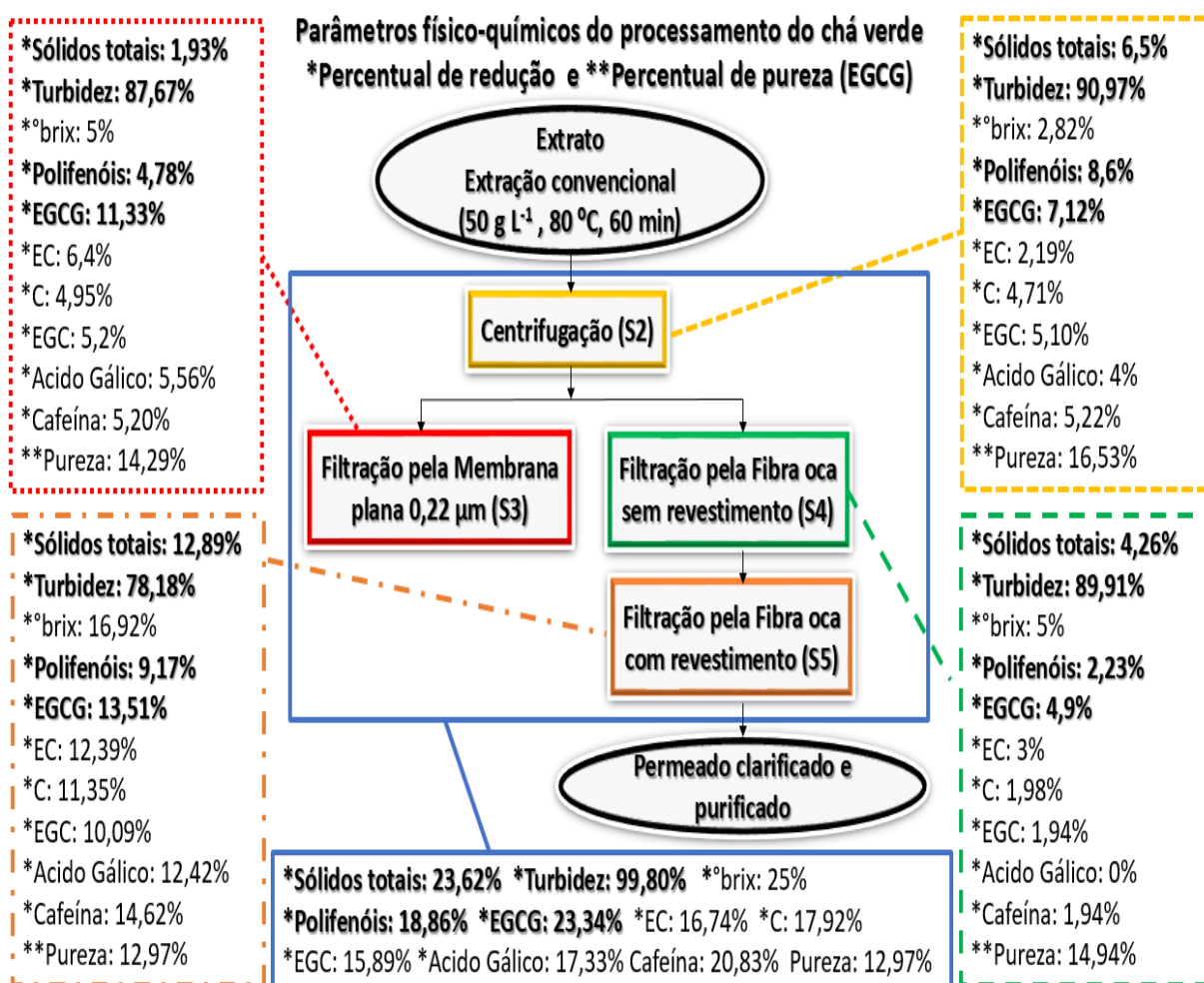


Figura 4. 26 – Percentuais de pureza e de redução dos parâmetros físico-químicos do processo de clarificação e purificação do extrato de chá verde.

Pela Figura 4. 26, confirma-se que houve variação dos parâmetros físico-químicos e da pureza da catequina Galato de (-) epigallocatequina (EGCG) ao longo de cada etapa do processamento do extrato de chá verde. Observa-se que a centrifugação, cumpriu satisfatoriamente o seu papel de etapa preliminar de clarificação do extrato, sendo responsável pela remoção de aproximadamente 90,97% da turbidez (1197 a 108 NTU), apresentando o maior percentual de redução da turbidez dentre todos processos estudados. Sequencialmente, nota-se que o

percentual de remoção da turbidez obtido através da filtração pela fibra oca sem revestimento (S4) foi maior (89,91%) (108 a 11 NTU) que o obtido pela membrana plana de 0,22 μm (S3) (87,67%) (108 a 13 NTU). Já no caso da filtração sequencial através da fibra oca revestida, houve o menor percentual de remoção da turbidez dentre todos os processos 78,18% (11 a 2,4 NTU), isso indica que houve redução apenas da turbidez residual uma vez que grande parte da turbidez foi removida pelas etapas precedentes. Nessa perspectiva, o processo sequencial de filtração por membranas aplicado nesse trabalho se justificou como uma etapa de purificação do extrato de chá verde uma vez que a centrifugação não foi capaz de reduzir a turbidez ao nível esperado. Para esse trabalho o nível esperado de turbidez do produto final foi aquele capaz de prover um extrato com um aspecto clarificado além de evitar a formação de *tea cream*, conservando estabilidade desse quando armazenado sob refrigeração (5 por 30 dias).

Em uma análise global, o processo sequencial proposto mostrou-se viável para o processamento do extrato de chá verde, fornecendo um percentual de remoção da turbidez de 99,80% (1197 a 2,4 NTU) e um percentual de recuperação de Galato de (-) epigallocatequina (EGCG) de aproximadamente 76,66%. Por conseguinte, obteve-se um produto final mais límpido que pode proporcionar ao consumidor a sensação de consumo de uma bebida funcional leve e refrescante. Além disso, segundo as análises de estabilidade, o permeado final (S5) apresentou estabilidade e não houve formação de *tea cream*, isso é muito interessante em termos de armazenamento na comercialização do chá verde *ready-to-drink* (pronto para beber).

Capítulo 5

Conclusões e sugestões

Nesse capítulo são apresentadas as conclusões obtidas nesse estudo além das sugestões dedicadas a trabalhos futuros.

5.1 Quanto ao processamento e caracterização das folhas de chá verde:

A maior massa retida (63,67 g) foi obtida na peneira de mesh 35. O diâmetro médio de Sauter calculado foi $0,54 \pm 0,02$ mm. O modelo RRB foi o que melhor se ajustou aos dados experimentais para a distribuição granulométrica acumulativa.

5.2 Quanto à extração de polifenóis das folhas de chá verde:

A extração convencional à 80 °C, 50 g L⁻¹ por 60 min e utilizando partículas na faixa 0,15-0,75 mm foi a melhor condição para a extração de polifenóis do chá verde encontrada nesse trabalho, aproximadamente 10.685 mg_{EAG} L⁻¹.

5.3 Quanto à filtração preliminar:

No processo de filtração inicial do extrato através de filtro de nylon, para a efetuação das análises físico-químicas houve uma redução de 12% de polifenóis e 59% de sólidos. Isso mostrou que quase 60% do conteúdo de sólidos suspensos presente na infusão foi removido durante o tratamento preliminar, garantindo um processo sequencial mais eficiente e evitando o rápido decaimento do fluxo no processo sequencial de filtração por membranas.

5.4 Quanto aos pré-tratamentos macroscópicos:

O pré-tratamento escolhido foi apenas a centrifugação por apresentar a menor retenção de polifenóis totais (9%).

5.5 Quanto à filtração por membranas:

O processo de microfiltração o cartucho de membranas cerâmicas do tipo fibra-ocas em revestimento apresentou menor retenção de polifenóis (2,33%), maior retenção de sólidos (4,23%), maior redução da turbidez (89,91%) e maior fluxo estabilizado ($19,37 \text{ L h}^{-1}\text{m}^{-2}$) em comparação com a membrana comercial plana de $0,22\mu\text{m}$. Na filtração sequencial empregando um cartucho com membranas cerâmicas do tipo fibra-oca com revestimento polimérico à 1,5 bar, obteve-se um fluxo estabilizado de $3,51 \text{ L h}^{-1}\text{m}^{-2}$, além de uma redução de 9,17 % de polifenóis, 12,89 % de sólidos, 80,65% da turbidez e 16,92% de sólidos solúveis (°brix). A microfiltração juntamente com a filtração sequencial mostraram eficiência na purificação do extrato de chá verde.

5.6 Quanto às resistências dos processos de filtração para o chá verde:

A resistência que apresentou a maior contribuição para o decaimento do fluxo em todos os processos foi a resistência dos poros (R_c), representando cerca de 60% da resistência total.

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

O mecanismo de *fouling* predominante da microfiltração através da membrana plana $0,22 \mu\text{m}$ (S3) foi bloqueio interno dos poros ($n=1,5$) com valor de RMSD igual a 1,629. Entretanto, o bloqueio intermediário dos poros ($n=1$) exerceu importante impacto no decaimento do fluxo em (S3), com valor de RMSD igual a 1,789. Já o mecanismo de *fouling* predominante da microfiltração através da fibra oca (S4) foi bloqueio intermediário dos poros ($n=1$) com valor de RMSD igual a 1,271. Contudo, a

formação de torta (n=0) também teve importante papel no decaimento do fluxo através da fibra oca (S4) com valor de RMSD igual a 1,527.

5.8 Quanto à perspectiva de produção do chá verde como bebida comercializável

Nesse estudo, ficou evidenciado a importância de um processo sequencial em sistema *cross-flow* para o processamento do extrato de chá verde, evitando que uma alta concentração de partículas ocasione um rápido decaimento do fluxo de permeado e diminua a eficiência do processo. Segundo as análises de estabilidade, o permeado final (S5) apresentou estabilidade com uma turbidez de 2,4 NTU e não houve formação de *tea cream*. Em suma, é possível concluir que o processo proposto foi eficaz para produzir o chá verde como uma bebida funcional mais clarificada, estável e com um percentual de recuperação de Galato de (-) epigallocatequina (EGCG) de aproximadamente 76,66%.

5.9 Sugestões

Para trabalhos futuros, sugere-se:

- Empregar a extração com sonda ultrassônica sem fixar a temperatura da amostra, de modo que a leitura da temperatura varie simultaneamente com o tempo. A sonda ultrassônica, por meio da formação das bolhas de cavitação, aumenta a temperatura do sistema, esse aumento pode ser quantificado pela leitura da temperatura instantânea. Essa metodologia pode ser interessante em termos aproveitamento energético, uma vez que não se faz necessário o emprego de um reator encamisado/trocador de calor para aquecer ou resfriar a amostra durante a extração dos compostos bioativos.
- Avaliar o uso dos agentes coagulantes quitosana e sementes de *Moringa oleífera* com um tempo de decantação acima de 90 min em substituição à centrifugação como etapa sequencial;

- Aplicar as fibras ocas de alumina para processos de clarificação de extratos com maiores concentrações de sólidos suspensos, avaliando os mecanismos responsáveis pelo decaimento do fluxo em sistema *cross-flow*;
- Aplicar ultrassom no processo filtração com as fibras ocas de alumina;
- Testar outros polímeros, concentrações e espessuras nas camadas de revestimentos poliméricos nas fibras ocas de alumina;
- Avaliar a filtração através de membranas cerâmicas de fibra oca fabricadas a partir de materiais alternativos e de menor custo.

Capítulo 6

Anexos

Esse capítulo traz os anexos contendo as curvas de calibração e permeabilidade utilizadas nesse trabalho.

Anexo A - Curvas de calibração para polifenóis e flavonóides

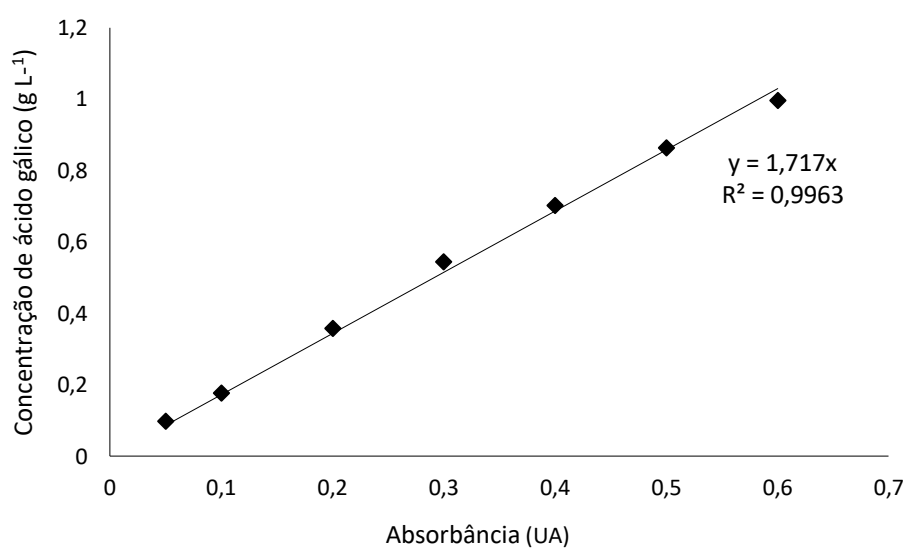


Figura A. 1 - Curva de calibração para a concentração de polifenóis totais

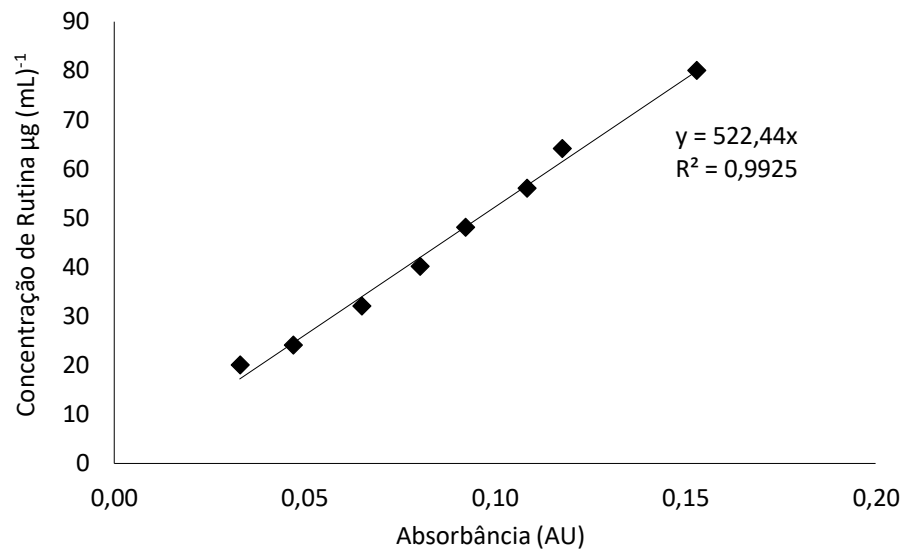


Figura A. 2 - Curva de calibração para a concentração de flavonóides

Anexo B - Permeabilidades hidráulicas das membranas utilizadas nas filtrações de chá verde e curva de vazão de cross-flow

Membrana comercial plana de 0,22 μm

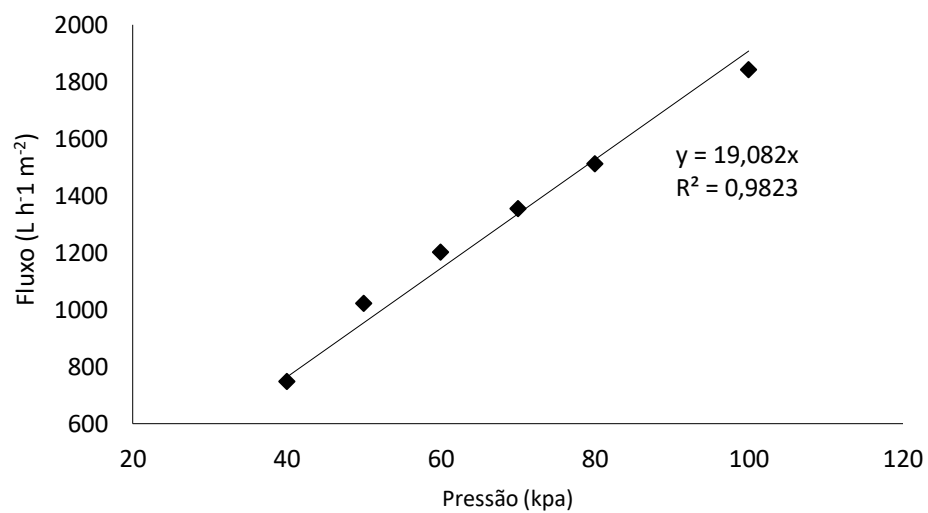


Figura B. 3 - Permeabilidade hidráulica para a membrana plana de 0,22 μm

Fibra oca de alumina sem revestimento polimérico (Al₂O₃)

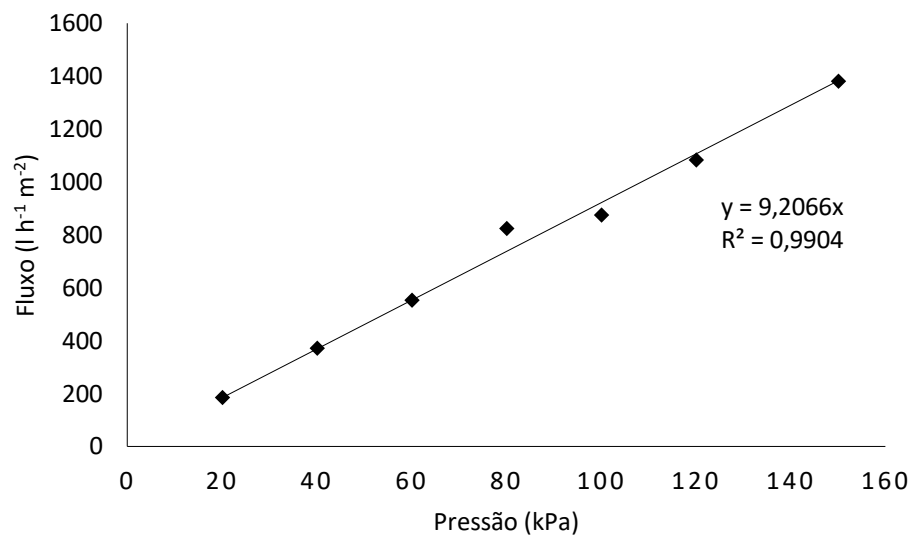


Figura B. 4 - Permeabilidade hidráulica para a fibra oca sem revestimento polimérico

Fibra oca de alumina sem revestimento polimérico (Al₂O₃) (reuso)

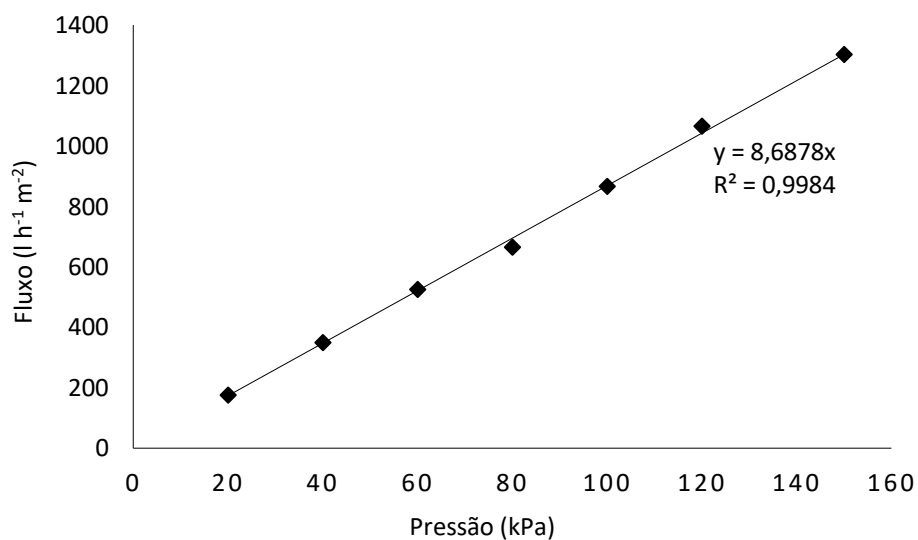


Figura B. 5 - Permeabilidade hidráulica para a fibra oca sem revestimento polimérico usada após limpeza

Fibra oca de alumina com revestimento polimérico (PES/Al₂O₃)

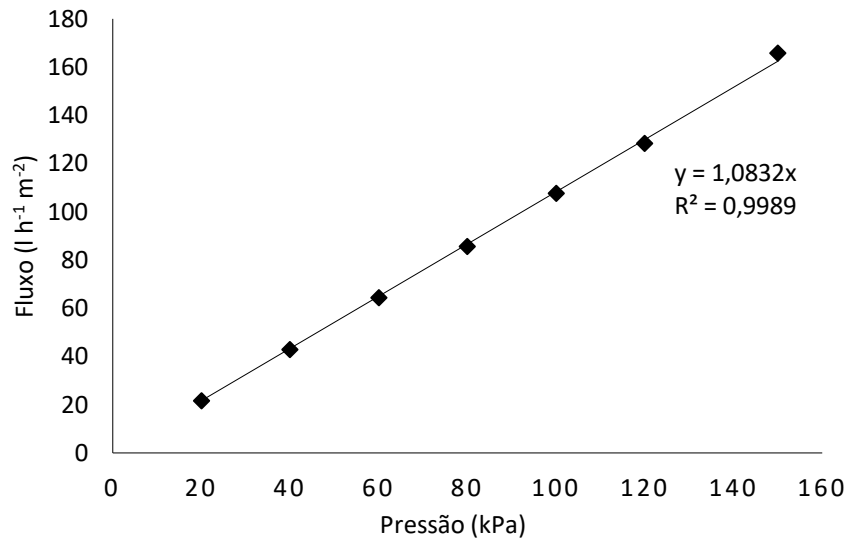
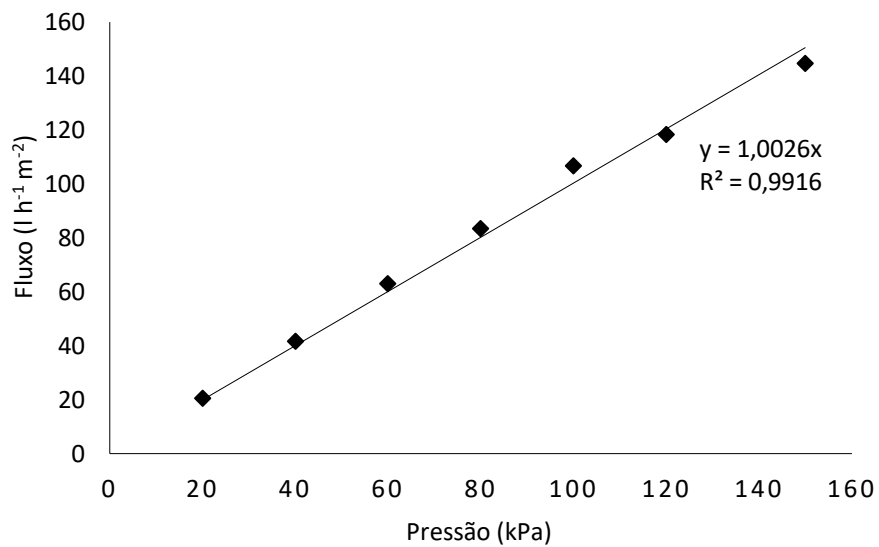


Figura B. 6 - Permeabilidade hidráulica para a fibra oca com revestimento polimérico

Fibra oca de alumina com revestimento polimérico (PES/Al₂O₃) (reuso)



Curva de vazão do sistema de filtração cross-flow

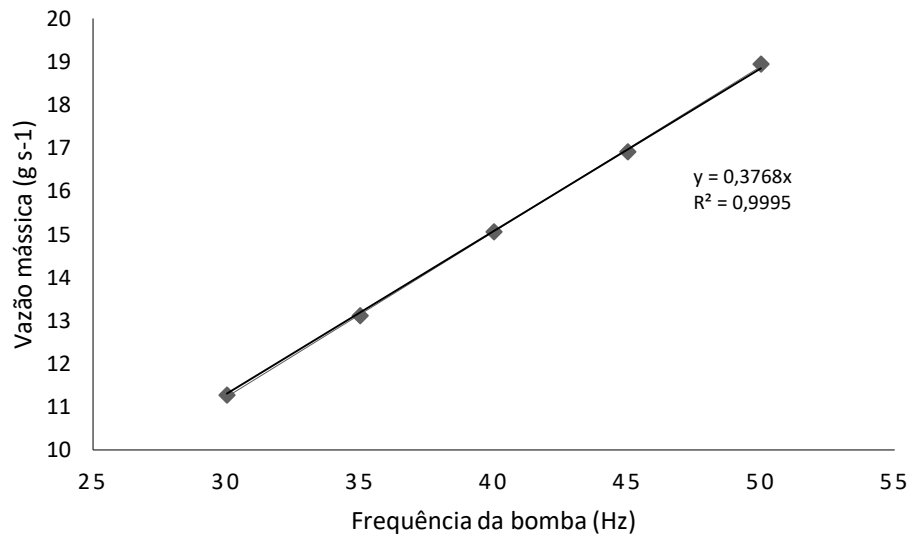


Figura B. 7 – Vazão mássica do sistema de filtração *cross-flow* em função da pressão (kPa)

Capítulo 7

Referências bibliográficas

Nesse último capítulo são discriminadas as referências bibliográficas citadas ao longo desse trabalho.

AL-MENTAFJI, H. N. **A.O.A.C 2005**. 2016.

AL AZHARIA JAHN, S. **Using "Moringa" Seeds as Coagulants in Developing Countries**. 1988. 43-50.

ANADÃO, P. **Ciência e Tecnologia de Membranas**. Artliber, 2010. 199.

ANGSHUMAN BHARADWAZ, C. B. Extraction of Polyphenols from Dried Tea Leaves. **International Journal of Scientific & Engineering Research**, v. 3, n. 5, 2012. ISSN ISSN 2229-5518.

AQUINO, S. **Avaliação da microbiota fúngica e da presença de micotoxinas em amostras de plantas medicinais irradiadas adquiridas no comércio varejista e atacadista**. 2007. 115 Tese de Doutorado em Tecnologia Nuclear Instituto de pesquisas energéticas e nucleares (IPEN), Universidade de São Paulo, São Paulo.
<https://doi.org/10.11606/T.85.2007.tde-18052012-140205>

ARAGÃO, V. C. **Concentração dos compostos bioativos da poupa de caju através da tecnologia de separação por membranas**
2010. (Dissertação de Mestrado). Unicamp
<https://doi.org/10.1080/19443994.2014.953401>

ARGYLE, I. S.; BIRD, M. R. Microfiltration of high concentration black tea streams for haze removal using polymeric membranes. **Desalination and Water Treatment**, v.

53, n. 6, p. 1516-1531, 2015/02/06 2015. ISSN 1944-3994.
<https://doi.org/10.1080/19443994.2014.953401>

ASEP, E. K. et al. The effects of particle size, fermentation and roasting of cocoa nibs on supercritical fluid extraction of cocoa butter. **Journal of Food Engineering**, v. 85, n. 3, p. 450-458, 4// 2008. ISSN 0260-8774. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877407004384> >.

BAKER, R. W. Concentration Polarization. In: (Ed.). **Membrane Technology and Applications**: John Wiley & Sons, Ltd, 2004a. p.161-190. ISBN 9780470020395.

_____. Membrane Transport Theory. In: (Ed.). **Membrane Technology and Applications**: John Wiley & Sons, Ltd, 2004b. p.15-87. ISBN 9780470020395.

BANERJEE, S.; CHATTERJEE, J. Efficient extraction strategies of tea (*Camellia sinensis*) biomolecules. **Journal of Food Science and Technology**, New Delhi, v. 52, n. 6, p. 3158-3168, 08/06
05/27/revised
07/15/accepted 2015. ISSN 0022-1155
0975-8402. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4444893/> >.

BELFORT, G.; ALTENA, F. W. Toward and inductive understanding of membrane fouling. **Desalination**, v. 47, p. 105-127, 1983.

BELTSIOS, K. G. et al. Membrane Science and Applications. In: (Ed.). **Handbook of Porous Solids**: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2008. p.2281-2433. ISBN 9783527618286.

BEZERRA, M. A. et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965-977, 2008/09/15/ 2008.

ISSN 0039-9140. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914008004050> >.

BHATIA, S.; OTHMAN, Z.; AHMAD, A. L. Pretreatment of palm oil mill effluent (POME) using *Moringa oleifera* seeds as natural coagulant. **Journal of Hazardous Materials**, v. 145, n. 1–2, p. 120-126, 6/25/ 2007. ISSN 0304-3894. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389406013409> >.

BHUPTAWAT, H.; FOLKARD, G. K.; CHAUDHARI, S. Innovative physico-chemical treatment of wastewater incorporating *Moringa oleifera* seed coagulant. **Journal of Hazardous Materials**, v. 142, n. 1, p. 477-482, 2007/04/02/ 2007. ISSN 0304-3894. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389406009861> >.

BOTH, S.; CHEMAT, F.; STRUBE, J. Extraction of polyphenols from black tea – Conventional and ultrasound assisted extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, n. 3, p. 1030-1034, 2014/05/01/ 2014. ISSN 1350-4177. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350417713002897> >.

BOX, G. E. P.; HUNTER, T. S. **Statistics for Experimenters**. John Wiley & Sons, 1978.

CALDAS, T. W. et al. Phenolic compounds recovery from grape skin using conventional and non-conventional extraction methods. **Industrial Crops and Products**, v. 111, n. Supplement C, p. 86-91, 2018/01/01/ 2018. ISSN 0926-6690. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092666901730688X> >.

CARDOSO, C. M. V. **Manual de Controle de qualidade de matérias primas vegetais para farmácia magistral**. 2009.

CARLONI, P. et al. Antioxidant activity of white, green and black tea obtained from the same tea cultivar. **Food Research International**, v. 53, n. 2, p. 900-908, 2013/10/01/ 2013. ISSN 0963-9969. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996912003018> >.

CHANDINI, S. K.; RAO, L. J.; SUBRAMANIAN, R. Membrane Clarification of Black Tea Extracts. **Food Bioprocess Technology**, p. 1926-1943, 2012.

CHENG, T. O. All teas are not created equal: The Chinese green tea and cardiovascular health. **International Journal of Cardiology**, v. 108, n. 3, p. 301-308, 2006/04/14/ 2006. ISSN 0167-5273. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167527305007680> >.

CHENG, Z. et al. Extraction optimization, characterization and antioxidant activity of polysaccharide from *Gentiana scabra* bge. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, n. Part A, p. 369-380, 2016/12/01/ 2016. ISSN 0141-8130. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813016313290> >.

CHERYAN, M. **Ultrafiltration and Microfiltration Handbook**. Taylor & Francis, 1998. ISBN 9781566765985. Disponível em: < https://books.google.com.br/books?id=LpiuJVxJS_AC >.

CHUNG, K.-T.; WEI, C.-I.; JOHNSON, M. G. Are tannins a double-edged sword in biology and health? **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, n. 4, p. 168-175, 1998/04/01/ 1998. ISSN 0924-2244. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224498000284> >.

COSTA, P. P.; DA SILVA, C. Uma Xícara (chá) de Química. **RVq (Revista Virtual de Química)**, 2011.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v. 15, n. 10, p. 7313-52, Oct 21 2010. ISSN 1420-3049.

DAI, W. et al. Characterization of white tea metabolome: Comparison against green and black tea by a nontargeted metabolomics approach. **Food Research International**, v. 96, n. Supplement C, p. 40-45, 2017/06/01/ 2017. ISSN 0963-9969. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996917301023> >.

DE OLIVEIRA, R. C.; DOCÊ, R. C.; DE BARROS, S. T. D. Clarification of passion fruit juice by microfiltration: Analyses of operating parameters, study of membrane fouling and juice quality. **Journal of Food Engineering**, v. 111, n. 2, p. 432-439, 2012/07/01/ 2012. ISSN 0260-8774. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877412000416> >.

DIAS, F. S. et al. Um sistema simples para preparação de microesferas de quitosana. **Química Nova**, v. 31, p. 160-163, 2008. ISSN 0100-4042. Disponível em: <
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422008000100028&nrm=iso >.

DOMINGUES, R. C. C. **Clarificação de suco de maracujá por microfiltração: Análise experimental e modelagem matemática**. 2011. Dissertação de Mestrado Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

DOMINGUES, R. C. C. et al. Clarification of passion fruit juice with chitosan: Effects of coagulation process variables and comparison with centrifugation and enzymatic treatments. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 467-471, 3// 2012. ISSN 1359-5113. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511311004387> >.

DOMINGUES, R. C. C. et al. Microfiltration of passion fruit juice using hollow fibre membranes and evaluation of fouling mechanisms. **Journal of Food Engineering**, v. 121, p. 73-79, 1// 2014. ISSN 0260-8774. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877413004032> >.

DOMÍNGUEZ-RODRÍGUEZ, G.; MARINA, M. L.; PLAZA, M. Strategies for the extraction and analysis of non-extractable polyphenols from plants. **Journal of Chromatography A**, v. 1514, n. Supplement C, p. 1-15, 2017/09/08/ 2017. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967317310671> >.

DRUZYŃSKA, B.; STEPNIEWSKA, A.; WOŁOSIAK, R. **The influence of time and type of solvent on efficiency of the extraction of polyphenols from green tea and antioxidant properties obtained extracts**. 2007. 27-36.

DUEIK, V.; BOUCHON, P. Development of polyphenol-enriched vacuum and atmospheric fried matrices: Evaluation of quality parameters and in vitro bioavailability of polyphenols. **Food Research International**, v. 88, n. Part A, p. 166-172, 2016/10/01/ 2016. ISSN 0963-9969. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996916301089> >.

DUFRESNE, C. J.; FARNWORTH, E. R. A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 12, n. 7, p. 404-421, 2001/07/01/ 2001. ISSN 0955-2863. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955286301001553> >.

EKEZIE, F.-G. C.; SUN, D.-W.; CHENG, J.-H. Acceleration of microwave-assisted extraction processes of food components by integrating technologies and applying emerging solvents: A review of latest developments. **Trends in Food Science & Technology**, v. 67, n. Supplement C, p. 160-172, 2017/09/01/ 2017. ISSN 0924-2244. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224417302601> >.

FELL, C. Reverse Osmosis. In: STERN, R. D. N. A. S. A. (Ed.). **Membrane Separations Technology, Principles and applications.**

. Syracuse, USA: Elsevier, 1995. cap. 4, p.113-140.

FIELD, R. W. et al. Critical Flux Concept for Microfiltration Fouling. **Journal of Membrane Science**, v. 100, n. 3, p. 259-272, Apr 28 1995. ISSN 0376-7388.

Disponível em: <<Go to ISI>://A1995QY61800008 >.

FIRMINO, L. **Análise físico-química e de conformidade de rótulos de diferentes marcas de chá-verde** 2011. (Mestrado). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia. , Salvador - Bahia - Brasil.

FOLEY, G. **Membrane Filtration: A Problem Solving Approach with MATLAB.**

Cambridge: Cambridge University Press, 2013. ISBN 9781107028746. Disponível em:

< <https://www.cambridge.org/core/books/membrane-filtration/08217D9ACE5207D38E5507286A4E7033> >.

GASSENSCHMIDT, U. et al. Isolation and characterization of a flocculating protein from *Moringa oleifera* Lam. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1243, n. 3, p. 477-481, 1995/04/13/ 1995. ISSN 0304-4165. Disponível em:

< <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/030441659400176X> >.

GERKE, I. B. B. et al. Clarification of crude extract of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) by membrane processes: Analysis of fouling and loss of bioactive compounds. **Food and Bioproducts Processing**, v. 102, n. Supplement C, p. 204-212, 2017/03/01/ 2017.

ISSN 0960-3085. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960308516301833> >.

GUJAR, J. G. et al. Experimental and modeling studies on extraction of catechin hydrate and epicatechin from Indian green tea leaves. **The Canadian Journal of**

Chemical Engineering, v. 88, n. 2, p. 232-240, 2010. ISSN 1939-019X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/cjce.20271> >. <https://doi.org/10.1002/cjce.20271>

H.F. WANG, K. H., X.Q. YOU. Isocratic elution system for the determination of catechins, caffeine and gallic acid in green tea using HPLC. **Food Chemistry**, v. 68, 2000.

HABERT, A.; BORGES, C.; NOBREGA, R. **Escola Piloto em Engenharia Química: Processo de Separação com Membranas. Programa de Engenharia Química**. Rio de Janeiro: COPPE/UFRJ 2006.

HABERT, A. C. **Processos de Separação por Membranas**. E-papers, 2006. ISBN 9788576500858. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=P-7kje1EincC> >.

HALEK, F. S.; FARAHANI, S. K.; HOSSEINI, S. M. Fabrication of poly(ether sulfone) based mixed matrix membranes modified by TiO₂ nanoparticles for purification of biodiesel produced from waste cooking oils. **Korean Journal of Chemical Engineering**, p. 8, 2015. ISSN 0256-1115.

HORŽIĆ, D. et al. Comparison of Conventional and Ultrasound Assisted Extraction Techniques of Yellow Tea and Bioactive Composition of Obtained Extracts. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 7, p. 2858-2870, 2012. ISSN 1935-5149. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11947-012-0791-z> >.

HORŽIĆ, D. et al. The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 441-448, 2009/07/15/ 2009. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814608014751> >. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0791-z>

HOSSAIN, M.; MORI, S. **Determination of Particle Size Distribution of Used Black Tea Leaves by Scanning Electron Microscope.** 2013.

HU, C.-J. et al. Studies on the mechanism of efficient extraction of tea components by aqueous ethanol. **Food Chemistry**, v. 194, p. 312-318, 2016/03/01/ 2016. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814615012248> >.

JANKUN, J. et al. Why drinking green tea could prevent cancer. **Nature**, v. 387, n. 6633, p. 561, Jun 5 1997. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836.

JIANG, H. et al. Determination of flavonol glycosides in green tea, oolong tea and black tea by UHPLC compared to HPLC. **Food Chemistry**, v. 183, n. Supplement C, p. 30-35, 2015/09/15/ 2015. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814615003751> >.

JOANA GIL-CHÁVEZ, G. et al. Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 1, p. 5-23, 2013. ISSN 1541-4337. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/1541-4337.12005> >. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12005>

JOVANOVIĆ, A. A. et al. Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using maceration, heat- and ultrasound-assisted techniques. **Separation and Purification Technology**, v. 179, p. 369-380, 5/31/ 2017. ISSN 1383-5866. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586616318421> >.

K.N, L.; CHANNARAYAPPA; VENKATARANGANA, M. Exemplified screening standardization of potent antioxidant nutraceuticals by principles of design of experiments. **Journal of Functional Foods**, v. 17, n. Supplement C, p. 260-270,

2015/08/01/ 2015. ISSN 1756-4646. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464615002613> >.

KALIL, S. J.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 6, p. 539-550, 2000/01/01/ 2000. ISSN 1359-5113. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959299001016> >.

KARADENIZ, F. B., HANDE SELEN; KOCA, NURAY; SOYER, YESIM. Antioxidant Activity of Selected Fruits and Vegetables Grown in Turkey. **Turkish Journal of Agriculture & Forestry**, v. 29, n. 4, 2005.

KAWAKATSU, T. et al. Clarification of Green Tea Extract by Microfiltration and Ultrafiltration
Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry v. 59, p. 5, 1995.

_____. Clarification of Green Tea Extract by Microfiltration and Ultrafiltration.
Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry p. 255–262, 2002.

KHAN, N.; MUKHTAR, H. Tea polyphenols for health promotion. **Life Sciences**, v. 81, n. 7, p. 519-533, 2007/07/26/ 2007. ISSN 0024-3205. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320507004717> >.

KHEMAKHEM, I. et al. Kinetic improvement of olive leaves' bioactive compounds extraction by using power ultrasound in a wide temperature range. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, n. Supplement C, p. 466-473, 2017/01/01/ 2017. ISSN 1350-4177. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350417716302073> >.

KOH, L. L. A.; ASHOKKUMAR, M.; KENTISH, S. E. Membrane Fouling, Cleaning and Disinfection. In: (Ed.). **Membrane Processing**: Blackwell Publishing Ltd., 2013. p.73-106. ISBN 9781118457009.

KOMES, D. et al. Green tea preparation and its influence on the content of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 167-176, 2010/01/01/ 2010. ISSN 0963-9969. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996909002877> >.

KONO, S. et al. A Case-Control Study of Gastric Cancer and Diet in Northern Kyushu, Japan. **Japanese Journal of Cancer Research**, v. 79, n. 10, p. 1067-1074, 1988. ISSN 1349-7006. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1349-7006.1988.tb01528.x> >. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.1988.tb01528.x>

KUBOTA, N.; HASHIMOTO, T.; MORI, Y. Microfiltration and Ultrafiltration. In: (Ed.). **Advanced Membrane Technology and Applications**: John Wiley & Sons, Inc., 2008. p.101-129. ISBN 9780470276280. <https://doi.org/10.1002/9780470276280.ch5>

KUHN, M. et al. Time-resolved extraction of caffeine and trigonelline from finely-ground espresso coffee with varying particle sizes and tamping pressures. **Journal of Food Engineering**, v. 206, n. Supplement C, p. 37-47, 2017/08/01/ 2017. ISSN 0260-8774. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877417300833> >.

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 and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 6, p. 2568-2577, 2012. ISSN 1935-5149. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11947-011-0580-0> >. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0580-0>

LABBÉ, D.; TREMBLAY, A.; BAZINET, L. Effect of brewing temperature and duration on green tea catechin solubilization: Basis for production of EGC and EGCG-enriched fractions. **Separation and Purification Technology**, v. 49, n. 1, p. 1-9, 2006/04/01/ 2006. ISSN 1383-5866. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586605002637> >.

LAKENBRINK, C. et al. Flavonoids and other polyphenols in consumer brews of tea and other caffeinated beverages. **J Agric Food Chem**, v. 48, n. 7, p. 2848-52, Jul 2000. ISSN 0021-8561 (Print) 0021-8561.

LALIA, B. S. et al. A review on membrane fabrication: Structure, properties and performance relationship. **Desalination**, v. 326, n. Supplement C, p. 77-95, 2013/10/01/ 2013. ISSN 0011-9164. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011916413003093> >.

LI, P. et al. Separation of tea polyphenol from Green Tea Leaves by a combined CATUFM-adsorption resin process. **Journal of Food Engineering**, v. 67, n. 3, p. 253-260, 4// 2005. ISSN 0260-8774. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877404001670> >.

LIANFU, Z.; ZELONG, L. Optimization and comparison of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 15, n. 5, p. 731-737, 7// 2008. ISSN 1350-4177. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350417707001885> >.

LIANG, H. et al. Tea extraction methods in relation to control of epimerization of tea catechins. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, n. 9, p. 1748-1752, 2007. ISSN 1097-0010. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.2913> >.

LIANG, Y.; XU, Y. Effect of pH on cream particle formation and solids extraction yield of black tea. **Food Chemistry**, v. 74, n. 2, p. 155-160, 2001/08/01/ 2001. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030881460100108X> >.
< <https://doi.org/10.1002/jsfa.2913> >.

LIN, X. et al. Comparative characterisation of green tea and black tea cream: Physicochemical and phytochemical nature. **Food Chemistry**, v. 173, n. Supplement C, p. 432-440, 2015/04/15/ 2015. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814614016100> >.

LIU, F. et al. Transcriptomic analysis of flower development in tea (*Camellia sinensis* (L.)). **Gene**, v. 631, n. Supplement C, p. 39-51, 2017/10/05/ 2017. ISSN 0378-1119. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378111917306625> >.

MAKANJUOLA, S. A. Influence of particle size and extraction solvent on antioxidant properties of extracts of tea, ginger, and tea–ginger blend. **Food Science & Nutrition**, Hoboken, v. 5, n. 6, p. 1179-1185, 08/29 05/27/received 06/27/revised 07/06/accepted 2017. ISSN 2048-7177. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5694873/> >.

MARQUEZ, L. D. S. **Produção de açúcar invertido pelo uso de invertase imobilizada em resinas**. 2007. Dissertação de mestrado Universidade Federal de Uberlândia

MIURA, S. et al. The inhibitory effects of tea polyphenols (flavan-3-ol derivatives) on Cu²⁺ mediated oxidative modification of low density lipoprotein. **Biol Pharm Bull**, v. 17, n. 12, p. 1567-72, Dec 1994. ISSN 0918-6158 (Print) 0918-6158.

MONSANTO, M. et al. Black tea cream effect on polyphenols optimization using statistical analysis. **Computers & Chemical Engineering**, v. 66, n. Supplement C, p. 12-21, 2014/07/04/ 2014. ISSN 0098-1354. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0098135414000489> >.

MULDER, M. **Basic Principals of Membrane Technology**. Dordrech, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1996. 551. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-1766-8>

MUNIANDY, P.; SHORI, A. B.; BABA, A. S. Influence of green, white and black tea addition on the antioxidant activity of probiotic yogurt during refrigerated storage. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 8, n. Supplement C, p. 1-8, 2016/06/01/ 2016. ISSN 2214-2894. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214289416300163> >.

MURTHY, T. P. K.; MANOHAR, B. Grinding Studies of Mango Ginger: Mathematical Modelling of Particle Size Distribution and Energy Consumption. **American Journal of Food Science and Technology**, v. 1, n. 4, p. 70-76, 2013/11/27 2013. Disponível em: < <http://pubs.sciepub.com/ajfst/1/4/2> >. Acesso em: 2013/11/27.

MUYIBI, S. A.; EVISON, L. M. Moringa oleifera seeds for softening hardwater. **Water Research**, v. 29, n. 4, p. 1099-1104, 1995/04/01 1995. ISSN 0043-1354. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/004313549400250B> >.

NASCIMENTO, V. T. et al. **Controle de qualidade de produtos à base de plantas medicinais comercializadas na cidade de Recife-PE: erva-doce (Pimpinellaanisum L.), quebra-pedra (Phyllanthus spp.), espinheira santa (Maytenusilicifolia Mart.) e camomila(Matricariarecutita L.)**. Revista Brasileira de Plantas Medicinais. Botucatu. 7: 56-64 p. 2005.

NATH, K. **MEMBRANE SEPARATION PROCESSES**. PHI Learning, 2008. ISBN 9788120335325. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=7tITmir7h7AC> >.

NÁTHIA-NEVES, G. et al. Extraction of bioactive compounds from genipap (Genipa americana L.) by pressurized ethanol: Iridoids, phenolic content and antioxidant activity. **Food Research International**, 2017/09/19/ 2017. ISSN 0963-9969.

Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996917306075> >.

NDABIGENGESERE, A.; NARASIAH, K. S. Use of Moringa Oleifera Seeds as a Primary Coagulant in Wastewater Treatment. **Environmental Technology**, v. 19, n. 8, p. 789-800, 1998/08/01 1998. ISSN 0959-3330. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1080/09593331908616735>
<https://doi.org/10.1080/09593331908616735> >.

NGO, T. V. et al. Impact of Different Extraction Solvents on Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity from the Root of Salacia chinensis L. **Journal of Food Quality**, v. 2017, p. 8, 2017. Disponível em: < <https://doi.org/10.1155/2017/9305047> >.
<https://doi.org/10.1155/2017/9305047>

NOBLE, R. D.; STERN, S. A. **Membrane Separations Technology Principals and applications**. Elsevier, 1995. 718.

NUNES, S.; PEINEMANN, K.-V. **Membrane Technology in the Chemical Industry**. Second. Weinheim, Germany: British Library, 2006. 340.
<https://doi.org/10.1002/3527608788>

O FARAJ, S. et al. **Extraction and Quantification of Total Polyphenol Content in Different Parts of Selected Tea Cultivars**. 2015. 1581-1586.

PASRIJA, D.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Techniques for Extraction of Green Tea Polyphenols: A Review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 8, n. 5, p. 935-950, 2015. ISSN 1935-5149. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11947-015-1479-y> >.
<https://doi.org/10.1007/s11947-015-1479-y>

PENG XIANG, Y.; SHU PING, X. Study on Clarification of Green Tea Extract Using Ceramic Membrane. **Journal of Tea Science**, 2001.

PERVA-UZUNALIĆ, A. et al. Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): Extraction efficiency of major catechins and caffeine. **Food Chemistry**, v. 96, n. 4, p. 597-605, 6// 2006. ISSN 0308-8146. Disponível em: < [//www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030881460500261X](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030881460500261X) >.

PINELA, J. et al. Microwave-assisted extraction of phenolic acids and flavonoids and production of antioxidant ingredients from tomato: A nutraceutical-oriented optimization study. **Separation and Purification Technology**, v. 164, n. Supplement C, p. 114-124, 2016/05/30/ 2016. ISSN 1383-5866. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586616301356> >.

PLAZA, M.; RODRÍGUEZ-MEIZOSO, I. Advanced Extraction Processes to Obtain Bioactives from Marine Foods. In: (Ed.). **Bioactive Compounds from Marine Foods**: John Wiley & Sons Ltd, 2013. p.343-371. ISBN 9781118412893.

PRICE, W. E.; SPITZER, J. C. Variations in the amounts of individual flavanols in a range of green teas. **Food Chemistry**, v. 47, n. 3, p. 271-276, 1993/01/01/ 1993. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/030881469390160H> >.

RAO, L. et al. Effect of ultrafiltration and fining adsorbents on the clarification of green tea. **Journal of Food Engineering**, v. 102, n. 4, p. 321-326, 2// 2011. ISSN 0260-8774. Disponível em: < [//www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877410004590](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877410004590) >.

RECHARLA, N. et al. Novel technologies to enhance solubility of food-derived bioactive compounds: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 39, p. 63-73, 12// 2017. ISSN 1756-4646. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464617305868> >.

REZENDE, Y. R. R. S.; NOGUEIRA, J. P.; NARAIN, N. Comparison and optimization of conventional and ultrasound assisted extraction for bioactive compounds and

antioxidant activity from agro-industrial acerola (*Malpighia emarginata* DC) residue.

LWT - Food Science and Technology, v. 85, n. Part A, p. 158-169, 2017/11/01/ 2017.

ISSN 0023-6438. Disponível em: <

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643817304991> >.

RORIZ, C. L. et al. Modern extraction techniques optimized to extract betacyanins from *Gomphrena globosa* L. **Industrial Crops and Products**, v. 105, n. Supplement C, p. 29-40, 2017/10/15/ 2017. ISSN 0926-6690. Disponível em: <

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669017303114> >.

<https://doi.org/10.1002/9781118412893.ch16>

ŞAHİN, S.; ŞAMLı, R. Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n. 1, p. 595-602, 2013/01/01/ 2013. ISSN 1350-4177. Disponível em: <

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350417712001757> >.

SANTOS, T. R. et al. Development of a magnetic coagulant based on *Moringa oleifera* seed extract for water treatment. **Environ Sci Pollut Res Int**, v. 23, n. 8, p. 7692-700, Apr 2016. ISSN 0944-1344.

SARI, F.; VELIOGLU, Y. S. Effects of particle size, extraction time and temperature, and derivatization time on determination of theanine in tea. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 8, p. 1130-1135, 12// 2011. ISSN 0889-1575.

Disponível em: <

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889157511001074> >.

SCHAEFER, A.; FANE, A. G.; WAITE, T. **Nanofiltration : Principles and Applications / Ed. de A.I. Schäfer, A.G. Fane, T.D. Waite ; pról. de Robert J. Petersen.** 2017.

SCHAEFER, A.; FANE, A. G.; WAITE, T. D. Nanofiltration – Principles and Applications. In: (Ed.), 2005. p.560.

SCOTT, K. MEMBRANE MATERIALS, PREPARATION AND CHARACTERISATION. In: (Ed.). **Handbook of Industrial Membranes**. Amsterdam: Elsevier Science, 1995. p.187-269. ISBN 978-1-85617-233-2.

SEGOVIA, F. J.; CORRAL-PÉREZ, J. J.; ALMAJANO, M. P. Avocado seed: Modeling extraction of bioactive compounds. **Industrial Crops and Products**, v. 85, n. Supplement C, p. 213-220, 2016/07/01/ 2016. ISSN 0926-6690. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669016301364> >.

SHARMILA, G. et al. Ultrasound assisted extraction of total phenolics from Cassia auriculata leaves and evaluation of its antioxidant activities. **Industrial Crops and Products**, v. 84, n. Supplement C, p. 13-21, 2016/06/01/ 2016. ISSN 0926-6690. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669016300103> >.

SOUSA, L. D. S. **Extração e purificação dos compostos fenólicos presentes nas folhas de Camellia sinensis**
2016. 106 (Mestrado). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

SOUSA, L. D. S. et al. Purification of polyphenols from green tea leaves by ultrasound assisted ultrafiltration process. **Separation and Purification Technology**, v. 168, p. 188-198, 8/10/ 2016. ISSN 1383-5866. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586616305068> >.

SPIRO, M.; JAGO, D. S. Kinetics and equilibria of tea infusion. Part 3.-Rotating-disc experiments interpreted by a steady-state model. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases**, v. 78, n. 1, p. 295-305, 1982. ISSN 0300-9599. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/F19827800295> >. <https://doi.org/10.1039/f19827800295>

STAMATOPOULOS, K.; CHATZILAZAROU, A.; KATSOYANNOS, E. **Optimization of Multistage Extraction of Olive Leaves for Recovery of Phenolic Compounds at Moderated Temperatures and Short Extraction Times.** *Foods*. 2014 Mar;3(1):66-81. doi:10.3390/foods3010066., 2013. ISBN 2304-8158 (Electronic). <https://doi.org/10.3390/foods3010066>

STAROV, V. M. **Desalination**, v. 402, n. Supplement C, p. 173, 2017/01/16/ 2017. ISSN 0011-9164. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011916416314217> >.

STRATHMANN, H. Membrane separation processes. **Journal of Membrane Science**, v. 9, n. 1, p. 121-189, 1981/01/01/ 1981. ISSN 0376-7388. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0376738800851212> >.

SUBRAMANIAN, R.; KUMAR, C. S.; SHARMA, P. Membrane Clarification of Tea Extracts. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 9, p. 1151-1157, 2014/01/01 2014. ISSN 1040-8398. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2011.628424> >.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2011.628424>

TAO, X.; SI-QUAN, S.; XIAO-CHUN ICULTURE, W. Ceramic Membrane Filtration of Tea Infusion. **Journal of Anhui Agricultural University**, 2004.

TODD, R.; BAROUTIAN, S. A techno-economic comparison of subcritical water, supercritical CO₂ and organic solvent extraction of bioactives from grape marc. **Journal of Cleaner Production**, v. 158, n. Supplement C, p. 349-358, 2017/08/01/ 2017. ISSN 0959-6526. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652617309691> >.

TODISCO, S.; TALLARICO, P.; GUPTA, B. B. Mass transfer and polyphenols retention in the clarification of black tea with ceramic membranes. **Innovative Food Science &**

Emerging Technologies, v. 3, n. 3, p. 255-262, 9// 2002. ISSN 1466-8564. Disponível em: < [//www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856402000462](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856402000462) >.

TORSCHI, B.; LENCKER, H.; WEIMIN, G. The protective role of different green tea extracts after oxidative damage is related to their catechin composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3973-3978, 2000. <https://doi.org/10.1021/jf000499g>

TRADE NAMES INDEX A2 - Scott, K. In: (Ed.). **Handbook of Industrial Membranes**. Amsterdam: Elsevier Science, 1995. p.897-899. ISBN 978-1-85617-233-2.

USHIKUBO, F. Y.; WATANABE, A. P.; VIOTTO, L. A. Microfiltration of umbu (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.) juice. **Journal of Membrane Science**, v. 288, n. 1, p. 61-66, 2007/02/01/ 2007. ISSN 0376-7388. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0376738806007381> >.

VILKHU, K. et al. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — A review. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 9, n. 2, p. 161-169, 2008/04/01/ 2008. ISSN 1466-8564. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856407001245> >.

VINATORU, M.; MASON, T. J.; CALINESCU, I. Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 97, n. Supplement C, p. 159-178, 2017/12/01/ 2017. ISSN 0165-9936. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993617302091> >.

VUONG, Q. V. et al. Optimizing conditions for the extraction of catechins from green tea using hot water. **Journal of Separation Science**, v. 34, p. 3099–3106, 2011. <https://doi.org/10.1002/jssc.201000863>

VUONG, Q. V. et al. Optimum conditions for the water extraction of L-theanine from green tea. **Journal of Separation Science**, v. 34, n. 18, p. 2468-2474, 2011. ISSN 1615-9314. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201100401> >.

WANG, H.; PROVAN, G. J.; HELLIWELL, K. Tea flavonoids: their functions, utilisation and analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, n. 4, p. 152-160, 2000/04/05/ 2000. ISSN 0924-2244. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224400000613> >.

WU, J.; LIN, L.; CHAU, F.-T. Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, n. 4, p. 347-352, 10// 2001. ISSN 1350-4177. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350417701000669> >.

XIA, T.; SHI, S.; WAN, X. Impact of ultrasonic-assisted extraction on the chemical and sensory quality of tea infusion. **Journal of Food Engineering**, v. 74, n. 4, p. 557-560, 6// 2006. ISSN 0260-8774. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877405001986> >.

YAMAMOTO, T. et al. **Chemistry and Applications of Green Tea**. New York: Boca Raton, 1997. 176 ISBN 9780849340062.

YANG, C. S.; MALIAKAL, P.; MENG, X. Inhibition of Carcinogenesis by Tea. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 42, n. 1, p. 25-54, 2002. Disponível em: < <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.pharmtox.42.082101.154309> >.

YE, J.-H. et al. Bulk preparation of (-)-epigallocatechin gallate-rich extract from green tea. **Food and Bioproducts Processing**, v. 92, n. 3, p. 275-281, 2014/07/01/ 2014. ISSN 0960-3085. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960308513000849> >.

ZHANG, H.-F.; YANG, X.-H.; WANG, Y. Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: Current status and future directions. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n. 12, p. 672-688, 2011/12/01/ 2011. ISSN 0924-2244. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092422441100149X> >.

ZHANG, W.; YANG, C.; LIN, C. Studies on the effects of cold extraction on the quality of tea beverage. **Food Science**, v. 8, p. 24, 1998.

ZHENG, C. et al. Integrated RNA-Seq and sRNA-Seq Analysis Identifies Chilling and Freezing Responsive Key Molecular Players and Pathways in Tea Plant (*Camellia sinensis*). **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0125031, 2015. ISSN 1932-6203.

ZIMMERMANN, B. F.; GLEICHENHAGEN, M. The effect of ascorbic acid, citric acid and low pH on the extraction of green tea: How to get most out of it. **Food Chemistry**, v. 124, n. 4, p. 1543-1548, 2011/02/15/ 2011. ISSN 0308-8146. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814610009957> >.