



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) PI 0715018-0 B1**



**(22) Data do Depósito:** 19/09/2007

**(45) Data de Concessão:** 07/12/2021

---

**(54) Título:** PROCESSO DE PRODUÇÃO DE UM EXTRATO DERIVADO DE CANA DE AÇÚCAR QUE POSSUI CARACTERÍSTICAS DE REDUÇÃO DE ÍNDICE GLICÊMICO

**(51) Int.Cl.:** C13B 20/16.

**(30) Prioridade Unionista:** 19/09/2006 AU 2006905179.

**(73) Titular(es):** THE PRODUCT MAKERS (AUSTRALIA) PTY LTD.

**(72) Inventor(es):** DAVID KANNAR; BARRY JAMES KITCHEN.

**(86) Pedido PCT:** PCT AU2007001382 de 19/09/2007

**(87) Publicação PCT:** WO 2008/034180 de 27/03/2008

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 18/03/2009

**(57) Resumo:** EXTRATO DERIVADO DE CANA DE AÇÚCAR, PRODUTO ALIMENTÍCIO, PREPARAÇÃO PARA USO COMO PRODUTO FARMACÊUTICO, NUTRACÊUTICO OU COSMÉTICO, PROCESSO DE PRODUÇÃO DE EXTRATOS DERIVADOS DE CANA DE AÇÚCAR E MÉTODO DE REFINO DE UM EXTRATO FITOQUÍMICO. Um extrato derivado de cana de açúcar que possui características de redução de GI ou velocidade de queima, em que o extrato compreende uma mistura de um ou mais polifenóis, um ou mais carboidratos, um ou mais minerais e um ou mais ácidos orgânicos.

PROCESSO DE PRODUÇÃO DE UM EXTRATO DERIVADO DE CANA DE AÇÚCAR QUE POSSUI CARACTERÍSTICAS DE REDUÇÃO DE ÍNDICE GLICÊMICO

Campo da Invenção

[001] A presente invenção refere-se a extratos derivados de cana de açúcar que compreendem uma mistura de um ou mais polifenóis, um ou mais carboidratos, um ou mais minerais e um ou mais ácidos orgânicos. Adicionalmente, a presente invenção refere-se a um processo de refino de extratos derivados de cana de açúcar, bem como outros extratos fitoquímicos.

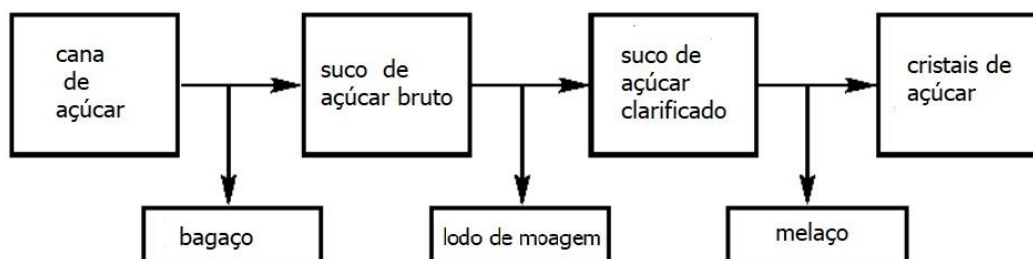
Antecedentes da Invenção

[002] No presente relatório descritivo, ao indicar-se ou discutir-se um documento, ato ou item de conhecimento, essa referência ou discussão não é uma admissão de que o documento, ato ou item de conhecimento, ou qualquer de suas combinações, era, na data de prioridade, disponível ao público, conhecido do público, parte de conhecimento geral *comum*; ou conhecidamente relevante para uma tentativa de solução de qualquer problema a que se refira o presente relatório descritivo.

Refino de cana de açúcar

[003] Após ser colhida mecanicamente, a cana de açúcar é transportada para um moinho e moída entre rolos serrados. A cana de açúcar picada é prensada em seguida para extração do suco de açúcar bruto, enquanto o bagaço (material fibroso remanescente) é utilizado para combustível. O suco bruto é aquecido até o seu ponto de ebulição para extrair todas as impurezas, adiciona-se cal e agentes branqueadores e o lodo da moagem é removido. O suco bruto é aquecido adicionalmente à vácuo para concentração e aumento do valor Brix. O xarope

concentrado é semeado para produção de cristais de açúcar brutos e um xarope espesso conhecido como melado. Os dois são separados por meio de uma centrífuga e o fluxo residual de melado é recolhido para uso como ração animal de baixo grau. Um fluxograma deste processo é incluído abaixo.



[004]O processo de refino de açúcar gera, portanto, uma grande quantidade de produtos, que incluem suco bruto, bagaço, lodo de moagem, suco clarificado etc.

[005]Os cristais de açúcar brutos do processo acima são adicionalmente refinados para elaborar muitos produtos de açúcar disponíveis comercialmente. O refino adicional pode incluir, por exemplo, mistura dos cristais de açúcar brutos com um xarope concentrado quente para amolecer o revestimento externo sobre os cristais. Os cristais são recuperados em seguida por meio de uma centrífuga e subsequentemente dissolvidos em água quente, uma etapa que às vezes é denominada afinação. Este xarope de açúcar é purificado adicionalmente em seguida por meio de carbonação ou fosflotação, filtragem, descoloramento e, em seguida, semeado com cristais de açúcar finos. Após o crescimento dos cristais até o tamanho necessário, eles são separados do xarope por meio de uma centrífuga, secos, classificados e embalados em seguida. Pode haver várias repetições de recuperação de cristais de açúcar do xarope de açúcar. O xarope de açúcar escuro que resta após

a recuperação de todos os cristais de açúcar também é denominado melado.

[006] Quase todo o açúcar fabricado comercialmente é branco e granulado. O açúcar refinado branco contém 99,5% de sacarose e é composto de cristais de 0,6 mm em média. Açúcar para calda possui tamanho médio de cristal de 0,3 mm. O açúcar para sorvete é produzido moendo-se açúcar branco em um moinho especial para produzir um pó fino.

[007] Existe também uma série de produtos de açúcar não brancos que incluem os seguintes:

(a) açúcar de café é um cristal saboroso marrom em grãos grandes que é produzido utilizando o xarope remanescente após a extração dos cristais de açúcar branco;

(b) açúcar bruto é um açúcar granulado com cor de palha produzido a partir de xaropes de sacarose que contêm alguma cor e sabor residual da planta de cana de açúcar - ele é especialmente selecionado e manipulado para garantir um produto higiênico;

(c) açúcar demerara é um açúcar bruto de alta qualidade produzido a partir de xaropes selecionados que fornece um rico sabor de caramelo ao alimento; e

(d) açúcar mascavo é um cristal úmido, com grânulos finos e saboroso produzido por meio de cristalização adicional dos xaropes de sacarose com coloração escura extraídos e produzidos nas etapas de separação do processo de refino.

[008] O xarope remanescente após a remoção do açúcar é utilizado para fabricar xarope dourado e melaço. Esses xaropes são fabricados de uma forma similar, com a diferença de que o xarope dourado é descolorido, enquanto o melaço não o é.



### Composição da cana de açúcar

[009] A composição de produtos e fluxos residuais de cana de açúcar é complexa e bastante variável; em que a composição química é determinada principalmente pela fonte geográfica da cana de açúcar e pelo método de processamento. A Figura 1, por exemplo, estabelece os elementos de composição básicos para açúcar bruto e mascavo a partir das vinte fontes comerciais a seguir:

- 1 a 4: açúcar bruto comercial marca 1;
- 5 a 8: açúcar mascavo comercial marca 1;
- 9: cristais de açúcar de café marca 1;
- 10 e 11: açúcar mascavo escuro marca 1;
- 12 a 15: açúcar bruto comercial marca 2;
- 17: açúcar bruto comercial marca 3;
- 18: açúcar bruto moído primário, amostra 1;
- 19: açúcar bruto moído primário, amostra 2;
- 20: açúcar bruto moído primário, amostra 3.

### [0010] Refino de produtos de açúcar:

Melados e outros produtos do processo de refino de açúcar, especialmente sucos e xaropes espessos, são misturas de substâncias complexas. Tipicamente, elas são de difícil refino adicional e existem frequentemente substâncias nas composições que envenenam materiais separadores padrão. Melados e os demais sucos e xaropes espessos compreendem tipicamente polifenóis, polissacarídeos, peptídeos e proteínas, minerais, ácidos orgânicos e mono e dissacarídeos.

Melado, xarope dourado e melaço vêm sendo utilizados como alimento saudável desde o início do Século XX e tem havido reivindicações de que eles são boas terapias ou curas para uma ampla variedade de distúrbios. O sabor forte, entretanto,

torna-os não palatáveis para muitas pessoas e a alta viscosidade de melado e melaço dificulta a sua manipulação e incorporação a outros alimentos. Açúcares escuros, tais como açúcar mascavo e mascavo claro, podem ser produzidos por meio de pulverização de melaço sobre açúcar refinado branco. Devido ao teor de açúcares redutores, corantes e umidade, estes produtos terminados aglomerados na armazenagem são higroscópicos, o que limita o uso comercial e industrial e descoloram muitos alimentos. Seria desejável um açúcar com altas quantidades de melado e produtos de fluxo residual de moagem de açúcar para promover a saúde com reduzidas propriedades higroscópicas, fluxo aprimorado e coloração mais clara.

[0011] Os demais produtos de refino de cana de açúcar, tais como bagaço e lodo de moagem, conhecidamente incluem substâncias potencialmente úteis, mas a sua natureza até aqui intratável significou que eles normalmente são descartados na forma de resíduo. Seria desejável ter um método de incorporação desses extratos de fluxo residual valiosos em produtos terminados que incluem, mas sem limitar-se a açúcar.

[0012] O Pedido de Patente Internacional anterior dos inventores nº WO 2005/117608 ensina um método de extração de extratos úteis dos produtos de fluxo residual e em processamento de fabricação de açúcar. Os métodos descritos naquele pedido produzem um extrato que contém alto teor de polifenóis e que é útil para uso em métodos tais como o descrito no Pedido de Patente Internacional nº PCT/AU2006/000769. Este extrato, entretanto, nem sempre reflete a complexidade do conteúdo da matéria prima.

[0013] Lista de abreviações

BDL	Abaixo do limite detectável
CE	Equivalentes de catequina
DW	Peso seco
GAE	Equivalentes de ácido
GI	Índice glicêmico
IC ou ICUMSA	Comissão Internacional de
Métodos Uniformes de	Análise de Açúcar
MF	Microfiltração
N/D	Não detectado
N/T	Não testado
XAD	Separação de troca de íons.

[0014] Embora o relatório descritivo refira-se ao uso da marca de resinas XAD, a presente invenção não é limitada a esta marca de resina e é possível utilizar qualquer marca de resina que possa ser empregada em separações de troca de íons.

#### Descrição Resumida da Invenção

[0015] A presente invenção fornece extratos derivados de cana de açúcar e um processo de sua produção.

[0016] Segundo um primeiro aspecto da presente invenção, é fornecido um extrato derivado de cana de açúcar que possui características de redução de GI ou velocidade de queima, em que o extrato compreende uma mistura de um ou mais polifenóis, um ou mais carboidratos, um ou mais minerais e um ou mais ácidos orgânicos.

[0017] O nível atual de polifenóis no extrato de cana de açúcar dependerá do método preciso utilizado para a sua fabricação e da batelada de cana de açúcar utilizada como matéria prima. Um extrato produzido utilizando XAD após o fracionamento por peso molecular, por exemplo, conteria de 15 a 30% de polifenóis em peso. Por outro lado, um extrato

produzido utilizando ultrafiltração e microfiltração (sem nenhum XAD) conteria de 1 a 3% em peso de polifenóis.

[0018] Em uma realização preferida, os polifenóis no extrato de cana de açúcar são selecionados a partir do grupo que consiste de ácido p-coumárico, ácido ferúlico, ácido siríngico, ácido cafeico, ácido clorogênico, (-)epicatequina, apigenina, (+)catequina, quercetina, diosmina, rutina e suas misturas.

[0019] O extrato de cana de açúcar compreende alguns carboidratos que aprimoram o seu sabor, mantendo ao mesmo tempo as suas características de redução de GI. Tipicamente, o extrato compreende carboidratos tais como monossacarídeos, dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos solúveis e insolúveis. o extrato pode também conter mono, di, tri e oligossacarídeos derivados de xilano, tais como xilobiose, xilotriose e xilose. O extrato pode incluir carboidratos que possuem características de aumento de GI, tais como sacarose e glicose. Entretanto, a quantidade de carboidratos que aumentam GI no extrato não é suficiente para prejudicar significativamente as características redutoras de GI do extrato como um todo. Além disso, o extrato pode compreender alguns carboidratos e manter a sua utilidade para aplicações tais como redistribuição da composição do corpo, conforme descrito no Pedido de Patente Internacional nº PCT/AU 2006/000769.

[0020] O extrato de cana de açúcar compreende minerais que incluem complexos minerais. Tipicamente, os minerais são selecionados a partir de magnésio, potássio, cálcio e suas misturas. Outros minerais que podem estar presentes incluem ânions tais como fosfato, sulfato e cloreto.

[0021] O extrato de cana de açúcar compreende ácidos orgânicos. Tipicamente, os ácidos orgânicos são selecionados a partir do grupo que consiste de ácido c-aconítico, ácido cítrico, ácido fosfórico, ácido glucônico, ácido málico, ácido t-aconítico, ácido succínico, ácido láctico e suas misturas.

[0022] Em uma realização preferida, é fornecido um extrato derivado de cana de açúcar que possui características de redução de GI ou velocidade de queima, em que o extrato é um pó que compreende de 1, 5 a 2, 5% em peso de um ou mais polifenóis, 50 a 80% em peso de um ou mais carboidratos, 1 a 3% em peso de um ou mais minerais e 1 a 3% em peso de um ou mais ácidos orgânicos.

[0023] Em uma outra realização preferida, é fornecido um extrato derivado de cana de açúcar que possui características de redução de GI ou velocidade de queima, em que o extrato é um xarope que compreende de 3,5 a 6 g de CE/1 de um ou mais polifenóis, 80 a 220 g/1 de um ou mais carboidratos, 3 a 5,5 g/1 de um ou mais minerais e 3 a 6 g de t-aconítico/1 de um ou mais ácidos orgânicos.

[0024] Tipicamente, o extrato de acordo com a presente invenção compreende ainda componentes adicionais tais como policosanóis, fitoesteróis, lipídios, fosfolipídios, proteínas, antioxidantes, fitoesteróis tais como 1-octacosanol, campesterol, estigmasterol,  $\beta$ -sitoesterol, oligossacarídeos tais como rafinose, 1-cestose, teanderose, 6-cestose, panose, neocestose e nistose, álcoois alifáticos, vitaminas, gomas e lipídios polares e neutros, flavonoides (oito subgrupos: Flavonóis (tais como quercetina, caempferol, miricetina e isorramnetina); Flavonas (tais como luteolina,

tricina e apigenina); Flavanonas (tais como hesperetina, naringenina e anderiodictiol); Flavan-3-óis (tais como catequina, galocatequina, epicatequina, epigalocatequina, 3-galato de epicatequina, 3-galato de epigalocatequina e teaflavina); Antocianidinas (tais como cianidina, delphinidina, malvidina, pelargonidina, peonidina e petunidina); Antocianosídeos; Curcuminoides; e Proantocianinas) e seus derivados, que incluem, mas sem limitar-se a conjugados naturais e sintéticos tais como glicosídeos, glucosídeos, galactosídeos, galacturonídeos, éteres, ésteres, arabinosídeos, sulfatos e fosfatos; aldopentoses (xilose, arabinose), aldo-hexoses (manose), cetopentoses, ceto-hexoses (frutose), cestosos, gomas solúveis, álcoois alifáticos (e complexos), ceras (e complexos), polissacarídeos e fibras (solúveis e insolúveis), oligossacarídeos, compostos não nitrogenosos, complexos minerais (ferro orgânico e outros minerais), complexos fitoquímicos (que incluem, mas sem limitar-se a glucosídeos, glicosídeos, glicosilatos, ésteres, glucopiranosídeos etc.), clorofila, fitoesteróis (e complexos), fitoestanóis (e complexos), celuloses hidrolisadas e fosfolipídios. O termo "policosanóis", dentro do escopo da presente invenção, designa a família de álcoois alifáticos e seus derivados, complexos ou análogos que são encontrados naturalmente na cana de açúcar. Exemplos incluem álcoois graxos de cadeia longa tais como octacosanol, triacontanol, dotriacontanol, tetracosanol, hexacosanol, tetratriacontanol, hexatriacontanol e docosanol.

[0025] Em uma realização preferida, o extrato é um xarope derivado de melado e o extrato possui a composição a seguir:

Componente	Faixa	Preferido
Polifenóis (g CE/l)	3,5 - 6,0	4 - 5
Antioxidante (g GAE/l)	1,2 - 2,4	1,5 - 1,8
Ácidos orgânicos (g/l) (ácido t-aconítico)	3 - 6	4 - 5
Total de minerais (g/l)	3 - 5,5	4 - 5
Carboidratos (g/l)	80 - 220	120 - 170
Cor (absorção a 420 nm)	5 - 10	6 - 8
Brix (graus)	15 - 27	20 - 24

[0026] A tabela acima refere-se a um extrato preferido que existe no equipamento de fabricação. Este extrato pode ser modificado antes da sua inclusão em produtos comerciais. Os níveis serão alterados, por exemplo, à medida que o extrato é concentrado para formar um xarope com Brix mais alto ou um pó. Todos esses extratos concentrados são incluídos no escopo da presente invenção.

[0027] O extrato pode ser derivado de qualquer produto deriva do de cana de açúcar que inclui o processo de moagem de cana de açúcar, o processo de refino de cana de açúcar para fabricação de açúcar e outros processos que utiliza m produtos de cana de açúcar tais como a fabricação de etanol a partir de melados como parte da fabricação de rum. O extrato pode ser derivado da matéria prima, produtos intermediários do processo, subprodutos, produtos finais e fluxos de resíduos. O produto derivado de cana de açúcar pode ser, por exemplo, o fluxo de alimentação de suco de cana de açúcar bruto, suco clarificado e xarope de suco concentrado, melaço, melado (obtido de uma refinaria ou moinho primário), xarope dourado, açúcar mascavo, bagaço, BioDunder® (vinhaça), lixo de campo, extremidades em crescimento, polpa, resíduos de cana, medula

e lodo de moagem. Preferencialmente, o extrato é derivado de melado.

[0028] Em uma outra realização, o extrato pode ser uma combinação de extratos de produtos de cana de açúcar diferentes. O perfil fitoquímico desejado pode ser obtido, por exemplo, por meio BioDunder® (vinhaça). Todos esses extratos combinados encontram-se dentro do escopo da presente invenção.

[0029] As características físicas dos extratos de acordo com a presente invenção dependerão da sua composição química geral. Dependendo dos métodos de processamento aplicados, os extratos podem ser concentrados por meio de evaporação, gerando um xarope ou, alternativamente, o extrato poderá ser totalmente seco para produzir um pó. Esta capacidade de preparação de extratos que possuem propriedades físicas diferentes aumenta a utilidade comercial dos extratos. Dependendo das suas características físicas e composição química, os extratos serão apropriados para várias utilizações.

[0030] Método de preparação dos extratos de acordo com a presente invenção

[0031] Em uma realização preferida, o extrato é produzido utilizando um método que compreende, como uma das suas etapas, um fracionamento por tamanho e peso molecular.

[0032] O fracionamento por peso molecular mantém no extrato final a mistura natural de fitoquímicos que existe na própria cana de açúcar. Métodos anteriores utilizaram processos de separação que removeram a maior parte dos carboidratos, minerais e ácidos orgânicos e o extrato resultante não foi representativo do equilíbrio natural que existiu na cana de açúcar.



[0033] Os extratos de acordo com a presente invenção são derivados do produto de cana de açúcar, preferencialmente melado dos processos de refino de cana de açúcar. O extrato pode ser obtido do produto de cana de açúcar por meio de vários métodos ou combinações de métodos, tais como:

- extração com solvente e contracorrente, utilizando solventes aquosos ou não aquosos;

- separação de componentes que se enquadram em uma faixa de pesos moleculares específicos por meio de métodos de processamento de exclusão de tamanhos, tais como cromatografia de permeação de gel ou ultrafiltração; ou

- separação dos componentes com baixo e alto peso molecular, utilizando métodos cromatográficos ou combinações de métodos tais como cromatografia de troca de íons, cromatografia hidrofóbica e cromatografia de troca de íons utilizando eluição fracional por meio de aumento escalonado do pH ou com solventes tais como etanol.

[0034] Os extratos podem ser adicionalmente processados por meio de métodos padrão, tais como microfiltração, osmose reversa, permeação de gel, evaporação a vácuo e secagem por congelamento, secagem por pulverização e secagem por túnel.

#### Método de filtração

[0035] Em uma realização preferida da presente invenção, o extrato é preparado por meio de um método que compreende as etapas de:

- a. aquecimento de uma solução do produto derivado de cana de açúcar;

- b. ajuste do pH da solução em  $>7$ ;

- c. precipitação de sais da solução ou matriz;
- d. separação do precipitado da solução ou matriz;

e

e. fracionamento da solução ou matriz por meio de ultrafiltração ou processo similar para isolar extratos desejados.

#### Método de permeação de gel

[0036] Em uma realização preferida da presente invenção, o extrato é preparado por meio de um método de permeação de gel que compreende as etapas de:

a. aquecimento de uma solução do produto derivado de cana de açúcar;

b. ajuste do pH da solução em  $>7$ ;

c. precipitação de sais da solução ou matriz;

d. separação do precipitado da solução ou matriz;

e

e. passagem da solução ou matriz por uma coluna cromatográfica e coleta de frações eluídas.

[0037] As condições preferidas para as etapas (a) a (d) são essencialmente as mesmas descritas com relação ao método de filtração. Tipicamente, a etapa (e) seria conduzida sob uma temperatura de 15 a 25°C, preferencialmente 20 a 25°C.

#### Usos do extrato

[0038] Os extratos de acordo com a presente invenção representam produtos novos que são economicamente úteis e podem ser utilizados em uma ampla variedade de aplicações. Os extratos descritos no presente podem ser utilizados em uma capacidade terapêutica, a fim de tratar e/ou prevenir as muitas condições que são consideradas reações a antioxidantes, incluindo, mas sem limitar-se a doenças cardiovasculares,

arteriosclerose, hipertensão, trombose, diabetes do tipo II, obesidade, demência, câncer, HIV AIDS, condições degenerativas associadas ao envelhecimento, doenças causadas por lesões oxidativas e alteração da composição do corpo conforme descrito no Pedido de Patente Internacional nº PCT/AU 2006/000769. Espera-se que esses extratos naturais sejam melhor absorvidos e possam exibir eficácia aprimorada em comparação com fontes convencionais dos componentes. Em populações que são consideradas "de alto risco" para CVD ou quaisquer dos distúrbios relativos à oxidação, contempla-se que as composições e os alimentos aos quais os extratos são adicionados poderão ser utilizados em programas de tratamento primários, secundários e terciários.

[0039] As doses dos extratos variarão, dependendo, entre outros fatores, do modo de fornecimento (ou seja, como e em qual alimento, bebida, nutracêutico, cosmético ou farmacêutico são por fim incorporados), o tamanho e a condição dos pacientes, o resultado a ser atingido, bem como outros fatores conhecidos dos técnicos no assunto de aditivos alimentícios e agentes medicinais. Também se reconhecerá que o fornecimento de doses diárias muito maiores dos derivados não é prejudicial ao hospedeiro animal, pois o excesso simplesmente passará através de canais de excreção normais.

[0040] A dose pode depender, por exemplo, da redução desejada de GI. Para reduzir GI em açúcar, por exemplo, o teor total de polifenóis necessita variar de 25 a 30 mg/100 g de açúcar. O extrato de acordo com a presente invenção pode ser utilizado para preparar os produtos com baixo teor de GI descritos no Pedido de Patente Internacional nº WO 2005/117608, que incluem aqueles em que o extrato é utilizado em conjunto

com outros compostos redutores de GI tais como galactose, arabinose, cectose, oligofrutose ou celulose.

[0041] Os extratos de acordo com a presente invenção podem ser incorporados diretamente e sem modificações adicionais a um alimento, nutracêutico, cosmético ou bebida por meio de métodos tais como mistura, infusão, injeção, combinação, dispersão, emulsificação, mistura com concha, extrusão, imersão, pulverização, revestimento e amassamento. O extrato pode ser utilizado para impregnar ingredientes alimentícios comumente utilizados tais como fibras (chicória, bagaço de cana de açúcar e outras fibras de grau alimentício) e farinhas preparadas a partir de uma série de fontes de cereais. Alternativamente, estes extratos podem ser aplicados diretamente sobre um alimento ou em uma bebida pelo consumidor antes da ingestão. Estes são modos de fornecimento simples e econômicos.

[0042] Os extratos de acordo com a presente invenção podem também ser incorporados em produtos alimentícios, utilizando os sistemas de fornecimento descritos no Pedido de Patente Internacional nº PCT/AU 2006/000761.

#### Formas de dosagem cosméticas e farmacêuticas

[0043] Contempla-se dentro do escopo da presente invenção que os extratos de acordo com a presente invenção podem ser incorporados em várias preparações e formas de dosagem farmacêuticas e cosméticas convencionais tais como tabletes (planos e revestidos) para uso oral, bucal ou sublingual, cápsulas (duras e moles, gelatina, com ou sem revestimentos adicionais), pós, grânulos (incluindo grânulos efervescentes), pelotas, micropartículas, soluções (tais como micelas, xaropes, elixires e gotas), pastilhas expectorantes,

pastilhas, ampolas, emulsões, microemulsões, ungüentos, cremes, supositórios, géis e emplastos transdérmicos, outros métodos de fornecimento transdérmico que envolvem transporte ativo e passivo, preparações de deposição, soluções enterais, preparações parenterais, soluções intravenosas, formas de dosagem de liberação modificadas junto com excipientes costumeiros e/ou diluentes e estabilizantes.

[0044] Os extratos podem também ser impregnados, misturados, emulsificados, pulverizados ou revestidos sobre veículos tais como celulose, metilcelulose, dextrose, ciclodextrose, ciclodextrina, maltitol, fibra e fibra que contém bioativos para aprimorar o fornecimento. O fornecimento pode também ser aprimorado com uma série de tensoativos, lipídios, complexos, solventes e sistemas de fornecimento farmacêutico co-solventes conhecidos na técnica farmacêutica para aumentar a biodisponibilidade, absorção e eficácia.

#### Alimentos/bebidas/nutracêuticos

[0045] Da forma utilizada no presente, o termo "alimento" ou "produto alimentício" inclui qualquer produto comestível, tal como, mas sem limitar-se a confeitos, suplementos, lanches (doces e saborosos), alimentos que contêm cacau, aromatizantes, bebidas, suplementos alimentícios e formulações que incluem suplementos utilizados em saúde e nutrição animal. Ingredientes adicionais desejados no produto alimentício resultante podem ser adicionados em qualquer ponto do processo. Em uma realização da presente invenção, os extratos encontram-se na forma de xaropes que podem ser utilizados como substitutos para xaropes de milho com alto teor de frutose e glicose regular de trigo, milho, agave, stevia etc., como uma opção com Índice Glicêmico (GI) mais

baixo.

[0046] Os extratos de acordo com a presente invenção podem ser incorporados em alimentos, bebidas e nutracêuticos, que incluem, manteiga, sem limitações, os seguintes:

- produtos alimentícios: tais leite e outras bebidas lácteas, como queijos, espalhantes e misturas lácteas, sorvete e iogurte;

- produtos com base em gordura: tais como margarinas, espalhantes, maionese, coberturas, óleos de cozimento e de fritura e molhos;

- produtos com base em cereais: que compreendem grãos (tais como pão e massas), sejam esses produtos cozidos, assados ou processados de outra forma;

- confeitos: tais como chocolate, doces, goma de mascar, sobremesas, coberturas não lácteas, sorvetes, gelos e outras coberturas;

- produtos de nutrição esportiva, que incluem pós, misturas prévias, sucos, barras energéticas, bebidas isotônicas e gelatina, geleias de pectina ou com base em amido;

- bebidas: quentes ou frias (bebidas com base em extratos de café, chá, cacau, cereal, chicória e outras plantas), alcoólicas ou não alcoólicas, incluindo colas e outros refrigerantes, sucos, suplementos alimentares, misturas prévias instantâneas e bebidas de substituição de refeições;

- produtos diversos: incluindo ovos e produtos de ovos, alimentos processados tais como sopas e massas previamente preparadas.

[0047] De forma similar, ingredientes com grau alimentício tais como fibra solúvel (tais como

oligofrutossacarídeo), fibra insolúvel (tal como fibra de cana de açúcar, farelo de aveia), farinha, amido, amido modificado, gelatina ou outros alimentos, ingredientes farmacêuticos ou cosméticos impregnados com o extrato de acordo com a presente invenção ou que o contêm podem produzir um ingrediente alimentício único com níveis mais altos de polifenóis, policosanóis, fitoesteróis e outros fitoquímicos derivados de cana de açúcar. O fornecimento pode também ser aprimorado com uma série de tensoativos, lipídios, emulsificantes, complexos, solventes e sistemas de fornecimento de alimentos e cosméticos co-solventes conhecidos na técnica para aumentar a dispersão, absorção e eficácia.

[0048] O extrato de acordo com a presente invenção é particularmente útil para aumentar o teor fitoquímico ativo de produtos de café sem aumento do amargor. A torração de grãos de café causa o desenvolvimento da grande série de sabores de café desejados. A torração também causa o sabor amargo do café, que é relacionado ao aumento do nível de antioxidantes lactonas de ácido clorogênico e fenilindanos. Quanto mais grãos de café são torrados, mais lactonas clorogênicas e fenilindanos são produzidos. O extrato de acordo com a presente invenção pode ser utilizado para aumentar o nível de fitoquímicos ativos (tais como polifenóis) em produtos de café que elaboram os produtos de café úteis para aplicações tais como as descritas no Pedido de Patente Internacional n° PCT/AU 2006/00076.

[0049] A presente invenção inclui produtos alimentícios que compreendem um extrato de acordo com a presente invenção isoladamente como o ingrediente ativo ou em combinação com outros ingredientes ativos.

## Produtos com baixo GI

[0050] Em uma aplicação particularmente preferida, os extratos de acordo com a presente invenção podem ser utilizados em uma estratégia de formulação dirigida à redução de GI. O extrato de acordo com a presente invenção pode ser utilizado para preparar produtos com baixo GI, tais como os descritos no Pedido de Patente Internacional n° WO 2005/117608, mas que contêm um teor de antioxidante mais alto e melhor sabor que os extratos exemplificados naquele relatório descritivo. Os extratos de acordo com a presente invenção na forma de um extrato líquido podem ser pulverizados sobre açúcar padrão (seja derivado de cana de açúcar ou de beterraba) para produzir um açúcar com baixo GI. Os extratos de acordo com a presente invenção na forma de um extrato líquido podem também ser pulverizados sobre outros veículos, tais como farinha, amido ou fibra, de forma a aumentar os níveis de bioativos nesses ingredientes alimentícios. O extrato utilizado para esta aplicação contém preferencialmente teor de sacarose suficiente para assistir a adesão do extrato aos cristais de açúcar padrão e para minimizar a obstrução do sabor do açúcar.

[0051] Para um produto com baixo GI, é preferível ter baixos níveis de glicose. O teor de glicose do melado ou outros produtos gerados no fluxo de processamento de açúcar pode ser reduzido utilizando enzimas tais como glicose oxidase (GO) que digerem glicose. Os técnicos no assunto saberão que uma combinação de glicose oxidase e catalase é tipicamente utilizada para garantir a remoção de todo o peróxido de hidrogênio e a utilização pela GO do oxigênio para reduzir os níveis de glicose. O método de acordo com a presente invenção pode também incorporar qualquer outro método de redução de



glicose no melado e outros produtos gerados no fluxo de processamento que é reincorporado em seguida no processo de fabricação para reduzir o GI do produto de açúcar ou utilizado isoladamente como um alimento, suplemento alimentício ou produto farmacêutico. Este pode incluir, mas sem limitar-se a fermentação ou incentivo da digestão de glicose por meio de outras reações químicas e/ou térmicas antes, durante ou depois dos processos de ultrafiltração e troca de íons. Xarope de afinação e outros processos de refino de açúcar ou fluxos de resíduos que contêm pequenas quantidades de açúcares redutores são fontes particularmente úteis como estoques de alimentação para a elaboração de produtos com baixo GI. Os subprodutos de fermentação e destilação também são estoques de alimentação úteis.

[0052] O método de acordo com a presente invenção pode também ser utilizado para preparar métodos e produtos descritos no presente produtos Pedido invenção pode para uso nos de Patente Internacional nº WO 2005/117608 ou no Pedido de Patente Internacional nº PCT/AU 2006/00076.

#### Processo de refino

[0053] Conforme um segundo aspecto da presente invenção, é fornecido um processo de produção de um extrato de cana de açúcar, que compreende as etapas de:

- a. aquecimento e diluição de um produto derivado de cana de açúcar até que a viscosidade da solução ou matriz resultante seja menor ou igual a cerca de 0,1 Pa·s (100 centipoise) sob uma temperatura na faixa de 40 a 60°C;
- b. (i) centrifugação do produto da etapa (a);  
ou, alternativamente,
- b. (ii) ajuste do pH do produto da etapa (a) com

uma base;

c. aquecimento do produto da etapa (b) até uma temperatura na faixa de 70 a 80° C e, em seguida, sua manutenção àquela faixa de temperatura por um período de tempo até a formação de um precipitado de sais de cálcio e magnésio insolúveis;

d. remoção do precipitado e material particulado grande do produto da etapa (c); e

e. tratamento do produto da etapa (d) com um fracionamento por peso molecular e tamanho para isolar extratos desejados.

[0054] Preferencialmente, a temperatura utilizada na etapa é de cerca de 50°C. Preferencialmente, a viscosidade atingida encontra-se na faixa de 0,05 a 0,1 Pa s (50 a 100 centipoise). Típicamente, utiliza-se água para a diluição na etapa (a). Quando o produto derivado de cana de açúcar for melado, é tipicamente utilizada uma razão de 1:0,8 a 1,2 entre melado e água para fornecer a razão desejada. A viscosidade preferida pode também ser ajustada por meio de medição de Brix, em que a faixa é preferencialmente de 30 a 50 Brix e, de maior preferência, de 35 a 45 Brix.

[0055] Preferencialmente, ao ajustar-se o pH como na etapa (b) (i), o pH final encontra-se na faixa de 7, 2 a 9, 5. O ajuste do pH pode ser realizado utilizando qualquer base apropriada, tal como hidróxido de sódio, carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), carbonato de potássio ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ), borbulhamento com dióxido de carbono gasoso ( $\text{CO}_2$ ) ou uma combinação de todos os acima. Preferencialmente, o ajuste do pH ocorre utilizando uma solução de hidróxido de sódio.

[0056] Preferencialmente, ao centrifugar-se o

diluyente, este é conduzido utilizando uma centrífuga de desobstrução contínua, em que o sobrenadante é processado diretamente através de uma membrana cerâmica ou de aço inoxidável (tipicamente, 0,10 micron a 1,5 micron, preferencialmente 0,1 a 0,5 micron) utilizando uma pressão de cerca de 4 Bar (0,4 MPa), velocidade de fluxo de cerca de 30 a 100 l/hora e sob temperatura de 30 a 60°C, preferencialmente 35 a 50°C.

[0057] Preferencialmente, a temperatura da etapa (c) é de cerca de 75°C. Preferencialmente, o período de tempo encontra-se na faixa de dez a trinta minutos, de maior preferência cerca de vinte minutos.

[0058] Quando necessário para o equipamento utilizado na etapa (d), a mistura da etapa (c) é resfriada antes da etapa (d).

[0059] A etapa (d) pode ser atingida utilizando qualquer método conhecido dos técnicos no assunto para remoção de um precipitado. Tipicamente, ela é conduzida utilizando uma centrífuga de desalojamento ou outros métodos de filtração que incluem terra diatomácea, musselina fina ou material similar. A mistura pode passar, por exemplo, através de uma membrana cerâmica ou de aço inoxidável (0, 10 micron a 1, 5 micron, preferencialmente 0,1 a 0,5 micron) utilizando uma pressão de 4 Bar (0,4 MPa), velocidade de fluxo de 30 a 100 l/hora e temperatura de 30 a 60°C, preferencialmente 35 a 50°C. O retido (tipicamente, o precipitado da etapa (d) e material particulado grande) é descartado (tipicamente após lavagem com água que possui pH na faixa de 7,2 a 7,5) e permeado é recolhido. Em algumas aplicações, o retido não é lavado, mas é completamente descartado. Alternativamente, centrifugação contínua sob alta

velocidade poderá ser utilizada para remover o precipitado e material particulado grande.

[0060] Em uma realização preferida, a etapa (e) é realizada utilizando um ou mais filtros de fracionamento ou membranas selecionadas a partir do grupo que consiste de ultrafiltração, nanofiltração e suas misturas, para isolar extratos desejados. Os filtros ou membranas de fracionamento são conhecidos dos técnicos no assunto de processamento de alimentos. O produto da etapa (d), por exemplo, pode ser tratado por meio de sua passagem através de uma combinação de membranas de ultrafiltração (UF) enroladas em espiral com uma exclusão de tamanho na faixa de 100kDa a 1kDa, preferencialmente de 30kDa a 50kDa e/ou 1kDa. Fracionamento adicional pode ser atingido em seguida com uma membrana de nanofiltração de 0,5kDa. Os técnicos no assunto saberão que a seleção de membrana utilizada dependerá do produto final desejado, velocidade de fluxo, pH, pressão, temperatura e eficiência ao longo de uma série de condições.

[0061] Tipicamente, a etapa (e) incluirá diafiltração e tanto o retido quanto o permeado serão recolhidos. Tipicamente, a etapa (e) ocorrerá sob uma temperatura na faixa de 30 a 60°C, mais tipicamente 35 a 50°C.

[0062] Em uma outra realização da presente invenção, a etapa (e) é realizada utilizando permeação de gel.

[0063] Em uma realização da presente invenção, a etapa (e) é seguida por etapas de refino adicionais que podem incluir troca de íons, cromatografia hidrofóbica com ultrafiltração ou nanofiltração adicionais, permeação de gel ou osmose reversa.

[0064] O produto derivado de cana de açúcar

utilizado como material inicial para este processo pode ser qualquer produto derivado de cana de açúcar, incluindo produtos do processo de moagem de cana de açúcar, processo de refino de cana de açúcar para a fabricação de açúcar e outros processos que utilizam produtos de cana de açúcar tais como a fabricação de etanol a partir de melados como parte da fabricação de rum. O produto derivado de cana de açúcar pode ser matéria prima, produtos intermediários do processo, subprodutos, produtos finais e fluxos de resíduos. O produto derivado de cana de açúcar inclui, por exemplo, o fluxo de alimentação de suco de cana de açúcar bruto, xarope clarificado e xarope concentrado, melaço, melado (moagem primária e refinaria), xarope dourado, açúcar mascavo, bagaço, Vinhaça, lixo de campo, cortes de cana, medula, extremidades em crescimento, polpa e lodo de moagem. Preferencialmente, o produto derivado de cana de açúcar é melado.

[0065] O uso de xarope de afinação, melado ou outros produtos residuais do processo e refino como material de partida fornece um retido após o uso de uma membrana de 30 kDa que contém polifenóis grandes, polissacarídeos, peptídeos e proteínas e o permeado conterá polifenóis menores, minerais, ácidos orgânicos e mono, di e polissacarídeos. O processo de acordo com a presente invenção permite a produção de um extrato de melado que contém até cerca de 90% dos antioxidantes contidos do melado original. O permeado pode ser adicionalmente tratado em seguida utilizando troca de íons, resina hidrofóbica ou ultrafiltração adicional para produzir um extrato que contém o perfil desejado de polifenóis, minerais, ácidos orgânicos e carboidratos. Utilizando o processo de acordo com a presente invenção, é possível minimizar qualquer efeito prejudicial da

resina, pois as substâncias que envenenariam a resina foram substancialmente reduzidas.

[0066] Os filtros ou membranas de fracionamento são capazes de separar o material recolhido na etapa (e) em uma série de xaropes de açúcar funcionais que contêm uma série de polifenóis conforme especificado anteriormente e diferentes razões de sacarose, glicose e frutose em combinação com uma mistura de minerais (tais como magnésio e potássio) em razões similares às de suco de cana de açúcar natural, dependendo do estoque de alimentação inicial.

[0067] Os xaropes recolhidos utilizando o método de acordo com a presente invenção podem ser empregados como adoçantes funcionais em bebidas, sorvetes e confeitados congelados e em produtos de confeitaria que incluem, mas sem limitar-se a fondants, núcleos de creme fondant para produtos de chocolate, trufas, caramelos, doces, gelatina, gomas e geleias com base em amido e pectina e doces e caramelos com alta ebulição. Esses xaropes podem também ser utilizados em qualquer aplicação alimentícia em que são utilizados xaropes de glicose com base em trigo ou milho ou xaropes de glicose com alto teor de maltose. O processo de fracionamento pode ser manipulado de forma que a razão entre monossacarídeos e sacarose seja suficiente para inibir a cristalização de sacarose nessas aplicações. Os xaropes, embora funcionem como adoçantes e inibidores da cristalização, podem também fornecer propriedades antioxidantes e minerais naturais adicionais aos produtos.

[0068] Em uma realização da presente invenção, após a recuperação das frações do método de acordo com a presente invenção, elas podem ser adicionalmente concentradas

por meio de uma combinação de nanofiltração que preferencialmente remove ânions monovalentes, osmose reversa e/ou processos tradicionais de evaporação em alto vácuo. o teor final de sólidos dos xaropes pode variar de 65% a 80% p/v com atividades em água na faixa de 0,2 a 0,3. Esta concentração adicional pode resultar em xaropes que possuem uma vida útil de até seis meses quando armazenados sob condições apropriadas, tais como de 5 a 25°C.

[0069] O método de acordo com a presente invenção pode também ser utilizado para a preparação de produtos para uso nos métodos e produtos descritos no Pedido de Patente Internacional nº WO 2005/117608 ou no Pedido de Patente Internacional nº PCT/AU 2006/00076. o Pedido de Patente Internacional nº WO 2005/117608 descreve um método de preparação de um produto com baixo GI que utiliza ultrafiltração com uma membrana de 300 kDa e extração de solvente, mas este processo extrai somente cerca de 50% dos antioxidantes presentes no produto de cana de açúcar. O método de acordo com o segundo aspecto da presente invenção recupera um percentual mais alto dos antioxidantes presentes no produto de cana de açúcar.

[0070] O método de acordo com a presente invenção pode ser utilizado para refinar extratos fitoquímicos obtidos de outras fontes.

[0071] Segundo um terceiro aspecto da presente invenção, é fornecido um método de refino de um extrato fitoquímico que compreende as etapas de:

(a) aquecimento e diluição de um fitoquímico que contém extrato até que a viscosidade da solução ou matriz resultante seja menor ou igual a cerca de 0,1 Pa s (100

centipoise) em uma temperatura na faixa de 40 a 60°C;

(b) (i) centrifugação do produto da etapa(a);

ou, alternativamente;

(b) (ii) ajuste do pH do produto da etapa (a) com uma base;

(c) aquecimento do produto da etapa (b) até uma temperatura na faixa de 70 a 80°C e, em seguida, manutenção àquela faixa de temperatura por um período de tempo até a formação de um precipitado de sais de cálcio e magnésio insolúveis;

(d) remoção do precipitado e material particulado grande do produto da etapa (c); e

(e) tratamento do produto da etapa (d) com um fracionamento por peso molecular e tamanho para isolar extratos desejados.

[0072] O extrato fitoquímico pode ter como fonte uma série de fontes vegetais das quais sabe-se que podem ser extraídos fitoquímicos tais como polifenóis. Fontes típicas incluem, mas sem limitar-se a grãos de cacau, resíduos de chá, cascas de vagens, grãos de café, resíduos de café, bagaço de uva, cereais (tais como cevada, trigo sarraceno, milho, milho branco, aveia, arroz, centeio, sorgo, trigo), legumes (tais como feijões e oleaginosas), nozes (tais como amêndoas, nozes de areca, castanhas de caju, avelãs, amendoins, pecãs, nozes), oleaginosas (tais como colza, canola, soja, borragem, semente de algodão, primavera noturna, semente de linho, sementes de gergelim, girassol, óleo de oliva, óleo de palma, óleo de farelo de arroz), frutas (tais como bagas, drupas, pomos, frutas tropicais), legumes (tais como cenouras, cebolas, pastinaca, batatas, beterraba, batata doce, aspargo, aipo,



endívia, alface, espinafre, abacate, tomate, pimenta), bebidas (tais como chá, café, cacau, cerveja, vinho, cidra) e produtos herbáceos (tais como equináceas, ginseng, ginkgo biloba, erva de São João, valeriana, kava kava, palmito da Flórida, cimífuga, garra do diabo, hidraste, crataegos, gengibre, alcaçuz, cardo mariano).

[0073] Estes extratos ricos bioativos podem ser utilizados para aumentar o nível de bioativos em uma série de produtos alimentícios tais como sucos de frutas e frutas secas e processadas. Um exemplo de sistema de fornecimento que pode ser utilizado com estes extratos é descrito no Pedido de Patente Internacional nº PCT/AU 2006/000761.

#### Breve Descrição das Figuras

[0074] A Figura 1 exibe a composição de vinte açúcares brutos e mascavos comerciais.

[0075] A Figura 2 exibe a análise do extrato obtido após a filtração por membrana de melado, Grupo 1 do Exemplo 4.

[0076] A Figura 3 exibe a análise do extrato obtido após a filtração por membrana de melado, Grupo 1 do Exemplo 4.

[0077] A Figura 4 exibe a análise do extrato obtido após a filtração por membrana de melado, Grupo 2 do Exemplo 4.

[0078] A Figura 5 exibe a análise do extrato obtido após a filtração por membrana de melado, Grupo 2 do Exemplo 4.

[0079] A Figura 6 exibe a filtração de gel de melado sobre Bio-Gel P-2 que exibe A420 e a atividade antioxidante para a Condução 3 do Exemplo 6.

[0080] A Figura 7 exibe a filtragem de gel de melado sobre Bio-Gel P-2 que exibe A420 e o total de fenólicos para a Condução 3 do Exemplo 6.

[0081] A Figura 8 exibe a filtragem de gel de melado sobre Bio-Gel P-2 que exibe A420 e sacarose para a Condução 3 do Exemplo 6.

[0082] A Figura 9 exibe a filtragem de gel de melado sobre Bio-Gel P-2 que exibe A420 e glicose + frutose para a Condução 3 do Exemplo 6.

[0083] A Figura 10 é uma fotografia do fracionamento de melado obtido sobre Bio-Gel P-2 (Conjuntos 1 a 5 do Exemplo 6).

[0084] A Figura 11 exibe a filtragem de gel de melado sobre Bio-Gel P-2 que exibe perfis A420 utilizando tampão de formato e acetonitrila com pH 5,0 e tampão Tris HCl com pH 7,5 do Exemplo 6.

[0085] A Figura 12 exibe a comparação dos traços de UV dos extratos da extração com acetato de etila (fração ácida) (traço preto) e a extração com SPE (60% MeOH (traço vermelho) da amostra unida por XAD a 280 nm (a), 320 nm (b) e 370 nm (c) do Exemplo 7.

[0086] A Figura 13 exibe as concentrações de compostos selecionados nas três amostras pesquisadas conforme determinado por meio de RP-HPLC com detecção de UV. Os resultados foram obtidos por meio de expressão contra uma curva de calibragem externa de ácido *p*-coumárico. Fatores de resposta individuais não foram calculados a partir do Exemplo 7.

[0087] A Figura 14 é um resumo das informações produzidas pelos experimentos de LC-MS para compostos selecionados a partir do Exemplo 7.

[0088] A Figura 15 exhibe os cromatogramas de íons MS/MS específicos de produto e SRM que exibem tricina e compostos que contêm tricina detectados no extrato de XAD-ácido do Exemplo 7.

[0089] A Figura 16 exhibe o cromatograma de íons MS/MS específico de produtos (parental m/z 299) que exhibe vários compostos que contêm diosmetina no extrato de XAD-ácido do Exemplo 7.

[0090] A Figura 17 exhibe a composição de fluxos de processamento de açúcar da Batelada 1 do Exemplo 9.

[0091] A Figura 18 exhibe a composição de fluxos de processamento de açúcar da Batelada 2 do Exemplo 9. A Figura 19 exhibe a composição de fluxos de tanque de tampão em diferentes bateladas do Exemplo 9.

[0092] A Figura 20 exhibe a composição de fluxos de lodo de moagem em diferentes bateladas do Exemplo 9.

[0093] A Figura 21 exhibe a composição de filtrados de lodo de moagem em diferentes bateladas do Exemplo 9.

[0094] A Figura 22 exhibe a composição de extratos de lodo de moagem em diferentes bateladas do Exemplo 9.

[0095] A Figura 23 exhibe a composição de fluxos de melado em diferentes bateladas do Exemplo 9.

[0096] A Figura 24 exhibe a composição de açúcares brutos em diferentes bateladas do Exemplo 9.

[0097] A Figura 25 exhibe a composição de frações de melado por meio de ultrafiltração de membranas do Exemplo 9.

[0098] A Figura 26 exhibe a composição de extratos de lodo de moagem em diferentes bateladas do Exemplo 13.

### Exemplos

[0099] Várias realizações e aspectos da presente invenção serão agora descritos com referência aos exemplos não limitadores a seguir.

#### Exemplo 1

[00100] Neste exemplo, melado foi tratado utilizando o método de acordo com o segundo aspecto da presente invenção.

#### Método

[00101] Etapa 1: melado foi diluído com água em uma razão 1:1, teve o seu pH ajustado em 7,2 com solução de 5% NaOH e foi aquecido a 75°C. A mistura foi mantida em repouso por trinta minutos a 75°C até a formação de um precipitado de sais de Ca e Mg.

[00102] Etapa 2: a mistura da etapa (1) passou através de uma membrana cerâmica ou de aço inoxidável com um tamanho de poros de 0,1 a 0,5 micron sob uma temperatura de 35 a 50°C e o retido de sais de Ca e Mg insolúveis e material particulado grande do melado foi descartado.

[00103] Etapa 3: o permeado da etapa (2) passou através de uma membrana de ultrafiltração de 30 kDa sob uma temperatura de 35 a 50°C, o retido foi diafiltrado e o retido (R1) e o permeado (P1) foram recolhidos. O retido (R1) continha polifenóis grandes, polissacarídeos, peptídeos, proteínas etc. e o permeado (P1) continha polifenóis menores, minerais, ácidos orgânicos, mono e dissacarídeos. O retido (R1) foi colocado de lado para trabalho adicional posterior.

[00104] Etapa 4: o permeado P1 passou através de uma resina hidrofóbica e todo o material desunido foi retirado por meio de lavagem com água. O eluente (E1) foi recolhido e

concluiu-se que ele contém açúcares, ácidos orgânicos, polifenóis e minerais.

[00105] Etapa 5: o material unido (hidrofóbico) sofreu dessorção com etanol (70% v/v). Concluiu-se que o eluente dessorvido recuperado (E2) contém polifenóis, alguns minerais, componentes menores etc. O etanol foi removido por meio de destilação e condensação e o concentrado aquoso restante foi seco por congelamento para produzir um pó de polifenol (PP1).

[00106] Etapa 6: em uma realização adicional, o eluente E2 passou em seguida através de uma membrana de ultrafiltração de 0,5 kDa e o retido (R2) foi diafiltrado. O produto recuperado continha polifenóis e foi concentrado por meio de secagem por congelamento para gerar um pó (PP2).

[00107] Etapa 7: o eluente E1 passou através de uma membrana de ultrafiltração de 0,5 kDa, foi diafiltrado e o retido R3 foi recolhido. O retido R3 foi concentrado em seguida por meio de evaporação, gerando um PL1 líquido rico em polifenóis (que poderá ser utilizado para pulverização sobre açúcar para enriquecer o teor de antioxidantes e fabricar um açúcacrom baixo GI, de acordo com WO 2005/117608) ou, alternativamente, totalmente seco para produzir um pó enriquecido com polifenóis PP2. O permeado de 0,5 kDa P2 foi recolhido e concentrado para recuperar um xarope de açúcar SY1 enriquecido em polifenóis, antioxidantes e minerais.

[00108] Etapa 8: em uma outra realização, o material que passa através da membrana inicial cerâmica ou de aço inoxidável foi tratado sobre uma membrana de 0,5 kDa, produzindo um retido que foi diafiltrado para produzir R3. Descobriu-se que este retido contém de 80 a 90% dos polifenóis

originais e antioxidante do melado e 60 a 90% da sacarose, mas tem significativamente esgotados frutose, glicose e cátions monovalentes. Este retido foi concentrado por meio de evaporação e poderá também ser utilizado para pulverização sobre açúcar para enriquecer o teor de antioxidantes e fabricar um açúcar com baixo GI de acordo com WO 2005/117608 ou, alternativamente, totalmente seco para produzir um pó enriquecido em polifenóis PP2. O permeado deste processo possuía uma composição muito similar à exibida para SY1.

#### Resultados Tabela 1

Composição de Xarope de Permeado de Membrana de 30 kDa (Pl)

Componente	Concentração
Sacarose	420 - 480 g/litro
Glicose	100 - 140 g/litro
Frutose	100 - 140 g/litro
Polifenóis	12 - 16 g/CE/litro

Antioxidantes	4 - 5,5 g/GAE/litro
Cálcio	2864 mg/l
Magnésio	1510 mg/l
Potássio	12895 mg/l
Sódio	194 mg/l

[00109] Tipicamente, os monossacarídeos, glicose e frutose constituem de 25 a 35% do total de açúcares das frações recuperadas de 30 kDa e existem em uma razão de 68: 16: 16 (média) para sacarose, glicose e frutose. Esta razão é similar à que ocorre nos melados originais, mas possui coloração significativamente reduzida (cerca de 27 a 30%). Os níveis de cálcio e magnésio também são significativamente reduzidos com relação aos do melado original. Apenas 40 a 50% dos polifenóis de melado original são recuperados nesse xarope, mas encontram-se em uma faixa e perfil diferentes (que são menores) que os encontrados no melado original.

Tabela 2

Composição de Xarope a Partir de Retido de 0,5 kDa (PL1)

Componente	Concentração
Sacarose	480- 520 g/litro
Glicose	80 -120 g/litro
Frutose	800- 120 g/litro
Polifenóis	16- 25 g/CE/litro
Antioxidantes	5 9 g/GAE/litro
Cálcio	2003 mg/1
Magnésio	1118 mg/1
Potássio	8002 mg/1
Sódio	114 mg/1

[00110] Os monossacarídeos, glicose e frutose representam de 20 a 30% do total de açúcares do retido de 0,5 kDa PL1.

Tabela 3

Composição de Xarope a Partir de Permeado de 0,5 kDa (SY1)

Componente	Concentração
Sacarose	80 - 120 g/litro
Glicose	280 - 320 g/litro
Frutose	280 320 g/litro
Polifenóis	12 - 15 g/CE/litro
Antioxidantes	3,5 - 7 g/GAE/litro
Cálcio	560 mg/1
Magnésio	333 mg/1
Potássio	6226 mg/1
Sódio	98 mg/1

[00111] Os monossacarídeos, glicose e frutose representam de 80 a 88% do total de açúcares em SY. É evidente a partir destes resultados que pode ser extraído do melado um xarope de açúcar com alto teor de glicose e frutose. O método de acordo com a presente invenção permite, portanto, a produção de um xarope de açúcar valioso que pode ser utilizado em produtos alimentícios e obtém importância adicional de um produto de resíduo.

[00112] Em um processo alternativo, as etapas 4 e 5 foram omitidas e o permeado com 30 kDa (P1) foi tratado de acordo com a etapa 6 acima.

#### Conclusão

[00113] Este exemplo demonstra claramente que um estoque de alimentação difícil, tal como melado, pode ser fracionado por meio de filtração de membrana e cromatografia de troca de íons, a fim de produzir frações que são ricas em polifenóis e antioxidantes em associação com níveis variáveis de mono e dissacarídeos e cátions mono e divalentes.

[00114] Por meio da combinação de filtração de membranas utilizando membranas de 30 kDa e 0,5 kDa, melado bruto de cana ou beterraba pode ser fracionado em xaropes de açúcar que diferem na composição de sacarose, glicose, frutose, minerais, ânions e cátions mono e divalentes tais como Cl, SO<sub>4</sub>, PO<sub>4</sub>, ácidos orgânicos (tais como ácidos cis e trans aconítico, cítrico e málico) e polifenóis (ácidos fenólicos, flavonóides, antocianinas, antocianidinas etc.).

[00115] Estes xaropes podem ser utilizados individualmente ou combinados para produzir uma série de adoçantes funcionais ricos em minerais e polifenóis (atividade antioxidante) para uso em uma ampla variedade de sistemas



alimentícios. Utilizando a filtração por membrana de melado, produtos com teor reduzido de minerais livres de material particulado grande podem ser utilizados como estoque de alimentação para fracionamento adicional sobre resinas tipicamente utilizadas para troca de íons e cromatografia hidrofóbica. Esse estoque de alimentação melhora o desempenho (menos envenenamento e vida útil mais longa) dessas resinas. Desta forma, podem ser produzidos xaropes adoçantes diferenciados e refinados adicionais e pós com alto teor de polifenóis que possuem ampla aplicação em sistemas alimentícios e para uso como nutracêuticos.

#### Exemplo 2

[00116] Como exemplo da forma em que os xaropes podem ser misturados para produzir um xarope adoçante funcional diferente (mono e dissacarídeos, cátions mono e divalentes), quatro partes do permeado da filtração de 30 kDa e uma parte do permeado de filtração de 0,5 kDa do Exemplo 1 foram misturadas para produzir um adoçante com uma razão de sacarose, glicose e frutose de 5:2:2 em comparação com o permeado de 30 kDa original (razão de 68:16:16) e permeado de 0,5 kDa original 1:3:3. Essas misturas também produzirão diferentes níveis de polifenóis, antioxidantes e minerais cuja intensidade de coloração variará conforme medido pela absorção a 420 nm.

#### Exemplo 3

[00117] O retido de 0,5 kDa do Exemplo 1 continha de 80 a 90% dos polifenóis originais e atividade antioxidante encontrada no estoque de alimentação de melado. Após a concentração desse retido até um teor de polifenóis de 20 a 50 g de CE (equivalentes de catequina) por litro, ele foi pulverizado sobre a superfície de cristais de açúcar para

produzir um açúcar com baixo GI.

#### Exemplo 4

[00118] O processo de acordo com o segundo aspecto da presente invenção foi aplicado a melado para ilustrar as capacidades de fracionamento de diferentes membranas.

#### Métodos

[00119] A instalação de filtragem com membrana (dimensões aproximadas de 1200 mm x 1200 mm x 1600 mm de altura) foi fornecida pela GEA Liquid Technologies Australia. A unidade foi equipada com uma membrana de aço inoxidável (tamanho de poro de 0,1 µm) e um abrigo para acomodar membranas enroladas em espiral (970 mm x 98 mm de diâmetro). As membranas enroladas em espiral (Syndner 3838) possuíam tamanhos de poros de 0,5, 1,0 e 30 kDa. Também foi utilizada uma membrana de osmose reversa enrolada em espiral (Dow-Filmtech 3838).

[00120] Fornecimento de água deionizada: água deionizada foi fornecida por um sistema de troca de íons alugado da IBC Water e transportado de Brisbane. O sistema com três leitos consistiu de um filtro prévio e três cilindros de troca de íons conectados em série: trocadores de cátions, ânions e misturados de cátions e ânions. Os cilindros foram conectados à rede pública de água e água deionizada fluíu diretamente para a instalação de MF.

[00121] Melado: melado quente (70-80 °C) foi obtido diretamente de um tanque de produção e misturado com um volume igual de água deionizada. Este melado diluído (80 l) teve o seu pH ajustado para 7,5 com 5 M NaOH (900 ml) e foi aquecido a 80°C por vinte minutos em latas de alumínio. A instalação de MF foi previamente aquecida a 80°C com água, que incluiu um volume adicional de cerca de quinze litros e um volume de

manutenção de cerca de 25 litros. O melado com pH ajustado circulou em seguida através da instalação a 75-80°C antes da filtração prévia através de uma membrana de aço inoxidável de 0,1 µm. Com base em uma densidade estimada de 1,3 g/ml para melado quente e quarenta litros de água na instalação, a concentração estimada de melado aplicada ao filtro prévio foi de cerca de 43% (p/v).

#### Testes do Grupo 1

[00122] Filtro prévio de 0,1 µm: melado diluído (cerca de 43% (p/v)) foi previamente filtrado através de uma membrana de aço inoxidável de 0,1 µm a 70°C utilizando uma pressão de alimentação de 1 Bar (0,1 MPa) e pressão de recirculação de 3 Bar (0,3 MPa).

[00123] Nanofiltração a 0,5 kDa: o permeado do filtro prévio de 0,1 µm foi aplicado a uma membrana enrolada em espiral com tamanho de poro de 0,5 kDa. A filtração foi conduzida a 40°C utilizando uma pressão de alimentação de 20 Bar (2 MPa) e pressão de recirculação de 21 Bar (2,1 MPa). O retido desta condução foi diafiltrado com sessenta litros de água deionizada e armazenado congelado para possível uso no revestimento de açúcar bruto.

[00124] Osmose reversa: o permeado de nanofiltração passou através de uma membrana de RO a 40 °C utilizando uma pressão de alimentação de 25 Bar (2,5 MPa) e pressão de recirculação de 25,5 Bar (2,55 MPa). O retido foi armazenado congelado para uso em testes de confeitaria.

#### Testes do Grupo 2

[00125] Os testes do Grupo 1 foram repetidos com uma etapa de membrana adicional utilizando uma membrana de 30 kDa após filtração prévia com a membrana de aço inoxidável de

0,1 µm. A condução com a membrana de 30 kDa foi conduzida a 45 °C utilizando uma pressão de alimentação de 4 Bar (0,4 MPa) e uma pressão de recirculação de 5,5 Bar (0,55 MPa). Etapas subsequentes foram realizadas como para o Grupo 1. Amostras de laboratório (100 ml) foram recolhidas do estoque de alimentação, permeados (final e composto) e retidos. Amostras a granel adicionais foram as seguintes:

Relação de Amostras a Granel

Grupo	Amostra a granel	Volume de amostra (l)
1	Permeado de 0,5 kDa (P2)	4
1	Retido diafiltrado de 0,5 kDa	1,20
1	Retido de RO	10
2	Permeado de 30 kDa (P2)	4
2	Retido diafiltrado de 0,5 kDa	1,15
2	Retido de RO	1,15

[00126] As amostras codificadas como P1 e R1 representaram amostras de permeado e de retido tomadas ao final de cada condução. O código P2 representou permeado de composto antes da diafiltragem; PW foi o permeado de composto recolhido após diafiltragem e PWC foi a combinação de P2 e PW (Figuras 2 a 5).

[00127] Nas figuras:

- O número antes de / é o corte de membrana (kDa); /O é o estoque de alimentação para aquele tamanho de membrana.
- P = permeado; R = retido; W = após lavagem com água; PWC = composto de permeado total e permeado de diafiltragem.
- Para membrana de aço inoxidável com 0,1 kDa, volume adicional (+) inclui cerca de quinze litros de água adicionada para aquecimento prévio e cerca de 25 litros de volume de

manutenção na instalação.

- Para membranas de aço inoxidável não com 0,1 kDa, volume adicional (+) é de cerca de 25 litros de volume de manutenção na instalação.

- Análises: as amostras foram analisadas para determinar os componentes a seguir: total de fenólicos, perfis de HPLC de fase reversa, antioxidantes, mono e dissacarídeos, ácidos *cis* e *trans*-aconíticos, cátions/ânions, total de sólidos, cinzas, condutividade, pH, coloração (A<sub>420</sub>) e °Brix. Seis amostras foram analisadas para determinar os polissacarídeos.

#### Componentes Analisados e Método de Análise

Componente	Método
Total de fenólicos	Procedimento colorimétrico de Folin-Ciocalteu. Resultados expressos como gramas de equivalentes de catequina por litro.
Perfil de polifenóis	HPLC RP, coluna C18 (Luna 3 µm, Phenomenex) a 30 °C, gradiente linear de 3 a 21% de acetonitrila por doze minutos, 21 a 60% por um minuto e 21 a 60% por três minutos. Detecção a 214 nm.
Atividade antioxidante	Substrato de ABTS. Resultados expressos como gramas de equivalentes de ácido gálico por litro.
Mono e dissacarídeos	HPLC RP, coluna de NH <sub>2</sub> a 40 °C, eluição isocrática com 88% de acetonitrila a 1 ml/min por vinte minutos. Detecção de RI.
Ácidos <i>cis</i> e <i>trans</i> -aconíticos	HPLC de partição moderada por íons, coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad). Eluição isocrática com 0,004 M de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> a 0,6 ml/min por quarenta minutos a 30 °C. Detecção de UV.
Total de sólidos	Forno a vácuo a 70 °C por dezesseis horas.
Cinza	Secagem em forno a 100 °C e fornalha a 550 °C por dezesseis horas.
Condutividade	Medidor de condutividade TFS (modelo 2102A) equipado com uma célula de pipeta. Resultados expressos como NaCl molar.
Coloração (A <sub>420</sub> )	Absorção a 420 nm sobre amostras diluídas em água deionizada.
°Brix	Refratômetro ABBE a 20 °C.
Polissacarídeos	Medição de polissacarídeos solúveis. Precipitação de polissacarídeos com etanol a 100%, lavagem com etanol a 80%, digestão de precipitado em ácido sulfúrico a 1% e medição do total de açúcares redutores por ácido fenolsulfúrico a 485 nm com glicose como referência. Resultados expressos como gramas de polissacarídeo por litro.
Na, K, Ca, Mg, PO <sub>4</sub> , SO <sub>4</sub>	Plasma acoplado indutivamente - espectroscopia de emissão ótica (ICP-OES) em instrumento Varian Vista Pro em UQ.
Cl	Analísador colorimétrico automático (Seal AQ2), Método EPA (EPA-124-A).

[00128] Parâmetros de filtragem: velocidades de

fluxo, temperaturas e pressões foram registradas para cada membrana. Os coeficientes de rejeição ( $r$ ) para cada analisado foram calculados conforme segue:

$$r = 1 - C_p/C_R$$

em que  $C_p$  = concentração de analisado em permeado;  
 $C_R$  = concentração de analisado em retido ao final de cada condução.

[00129] Os dados percentuais de permeação são calculados como  $C_p$ /concentração de estoque de alimentação inicial.

#### Resultados

##### Grupo 1

[00130] Operação da instalação: a velocidade de fluxo para a membrana de aço inoxidável foi muito baixa (máximo de 21 l/h), muito embora a temperatura de operação fosse de 70°C. Descobriu-se ao final do Grupo 1 que as pressões medidas foram lidas como cerca de 0,5 Bar (0,05 MPa) baixas demais, o que resulta em velocidades de fluxo mais baixas que poderiam haver sido atingidas no primeiro grupo. Os níveis de pressão foram ajustados no Grupo 2. Para a membrana de 0,5 kDa, as velocidades de fluxo foram razoavelmente altas (>40 l/h) para os primeiros quinze minutos, mas caíram para 20 a 30 l/h para o restante da condução. Altas velocidades de fluxo (>230 l/h) foram atingidas com a membrana de osmose reversa.

[00131] Composição: os resultados analíticos para fluxos de filtração de membranas do Grupo 1 são exibidos nas Figuras 2 e 3. Não foi retirada amostra do melado diluído original (50% (v/v)). Com base em dados anteriores (tais como fenólicos, total de sólidos), o melado recirculado, antes da filtração prévia com membrana de 0,1 µm, possui uma

concentração estimada de cerca de 43%. Houve pouca alteração na maior parte dos analisados no permeado de filtração prévia. A coloração (A420), entretanto, foi reduzida em 13%, com uma redução similar da atividade antioxidante. Esta redução da atividade antioxidante foi alta em comparação com o Grupo 2 a 5 !!,,0 • O total de fenólicos caiu em 2% no permeado, ácido transaconítico em 8% e polissacarídeos em 53%.

[00132] Para nanofiltração, as permeações de sacarose (7%) e íons divalentes foram baixas, mas os monossacarídeos foram altos a 60-80%. A permeação de fitoquímicos foi de 15 a 17%, mas os ácidos aconíticos foram de menos de 2%. O retido diafiltrado (0,5 RW), que poderá ser utilizado para o revestimento de açúcar bruto, apresentou Brix de 25° e necessitaria ser concentrado pelo menos duas vezes para ter teor de sólidos adequado para secagem por pulverização. A coloração deste retido era preta e visualmente comparável com melado. O tratamento de osmose reversa do permeado de 0,5 kDa (0,5/PWC) aumentou a concentração da maior parte dos analisados em duas a três vezes.

[00133] Os coeficientes de rejeição calculados para Pl e Rl para cada membrana são exibidos na Tabela 4. Um alto coeficiente (próximo de um) representa baixa permeação ou alta rejeição pela membrana, enquanto um baixo coeficiente (próximo de zero) representa alta permeação ou baixa rejeição pela membrana. Os resultados da Tabela 4 geralmente refletem observações anteriores referentes à composição dos fluxos de filtração de membranas.

#### Tabela 4

[00134] Coeficientes de Rejeição para Membranas Utilizadas na Filtração de Melado (Grupo 1)

Componente	Membrana	
	0,1 $\mu$ m aço inoxidável	0,5 kDa espiral
Total de fenólicos	0,14	0,90
Antioxidantes	0,15	0,86
Frutose	-0,12	0,57
Glicose	0,10	0,47
Sacarose	0,02	0,95

Total de açúcares	0,01	0,82
Ácido cis- aconítico	0,05	0,99
Ácido trans- aconítico	0,15	0,99
Coloração (A420)	0,35	0,99
Brix	0,08	0,79
Sódio (Na)	0,02	0,07
Potássio (K)	0,03	0,10
Cálcio (Ca)	0,22	0,80
Magnésio (Mg)	0,13	0,76
Ferro (Fe)	0,32	0,99
Cloreto (Cl)	0,20	-0,51
Fosfato (PO <sub>4</sub> )	0,56	0,96
Sulfato (SO <sub>4</sub> )	0,03	0,89

[00135] Perfis de HPLC RP: foram medidos os perfis de HPLC RP dos fluxos de filtração de membrana para o Grupo 1.

[00136] Filtração prévia através de 0,1 $\mu$ m não apresentou efeito sobre o perfil de polifenol do permeado. Para a membrana de 0,5 kDa, entretanto, não houve permeação de polifenóis na extremidade hidrofóbica do perfil (>8 min). Osmose reversa forneceu uma concentração dos componentes observados no perfil do permeado de 0,5 kDa.

#### Grupo 2

[00137] Operação da instalação: o melado inicial para o Grupo 2 foi amostrado de material a granel que havia estado em repouso ao longo do fim de semana quando o processamento foi desligado. A composição desse melado pode



ser levemente diferente do Grupo 1. Velocidades médias de fluxo (após uma hora e meia) para a membrana de aço inoxidável de 0,1 µm foram cerca de 65% mais altas que as do Grupo 1, mas ainda baixas demais a 15 l/h para processamento eficiente. As partículas finas de sais de cálcio e magnésio insolúveis produzidos por meio de aquecimento sob pH 7,5 podem haver contribuído para alguma falha da membrana. Altas velocidades de fluxo (> 120 l/h) foram atingidas para a membrana de 30 kDa, para a membrana de 0,5 kDa (360 l/h após cinco minutos) e para a membrana de RO (350 l/h).

[00138] Houve uma queda no pH nos fluxos de 30 kDa de pH 7,85 para material filtrado previamente para pH 5,04 no estoque de alimentação de 30 kDa recirculado. Como não se utilizou detergente ácido no enxágue prévio da membrana de 30 kDa, considera-se que houve um problema com o fornecimento de água deionizada e que o estoque de alimentação foi recirculado inicialmente com água sob baixo pH. Infelizmente, o medidor de pH apresentou mau funcionamento no Grupo 2, de forma que o teste de pH do fornecimento de água não foi conduzido. É possível que o leito de troca de ânions possa haver se exaurido e deixado de neutralizar a água com baixo pH do trocador de cátions, no qual íons de H unidos por resina são substituídos por cátions de dureza tais como cálcio e magnésio.

[00139] Composição: os dados de composição para o Grupo 2 são exibidos nas Figuras 4 e 5. Da mesma forma que para o Grupo 1, a maior parte dos analisados permeou a membrana de 0,1 µm, exceto por polissacarídeos (34% de permeação). A permeação através da membrana de 30 kDa foi de 60% para polifenóis e antioxidantes, 90% para ácidos aconíticos e mais de 72% para açúcares individuais.

[00140] A membrana de 0,5 kDa apresentou desempenho um pouco melhor que o Grupo 1, com apenas  $10 \pm 2\%$  de polifenóis e antioxidantes. A permeação de monossacarídeos, entretanto, foi surpreendentemente baixa a 11-12% em comparação com 59 a 80% para o Grupo 1. Isso pode haver ocorrido devido a efeitos osmóticos ou ao uso de estoque de alimentação com baixo pH (pH 5, 3). Sacarose exibiu 1% de permeação pela membrana e ácidos aconíticos, menos de 3% de permeação. Cátions monovalentes (Na, K) também exibiram menos permeação que no Grupo 1. Conforme esperado, íons divalentes foram em grande parte rejeitados pela membrana de 0,5 kDa. Um resumo de coeficientes de rejeição para o Grupo 2 é exibido na Tabela 5. A incidência de alguns coeficientes negativos deve-se a resultados anômalos para permeados ou retidos.

(a) Perfis de HPLC RP

[00141] Foram medidos os perfis de HPLC RP dos fluxos de filtração de membrana para o Grupo 2. O permeado de 30 kDa exibiu uma redução notável dos níveis de dois picos na extremidade hidrofóbica do perfil ( $> 11$  min). Quanto ao Grupo 1, o permeado de 0,5 kDa exibiu uma perda de picos da região hidrofóbica do perfil (após oito minutos). Em seguida a este estudo, uma pesquisa de uma membrana de 100 kDa em escala de laboratório exibiu uma redução geral das alturas de pico para o permeado, mas menos redução na extremidade hidrofóbica que para a membrana de 30 kDa. A permeação de atividade antioxidante pelo permeado de 100 kDa (68%) foi levemente mais alta que para o permeado de 30 kDa (60%) produzido.

Tabela 5

Coeficientes de Rejeição para Membranas Utilizadas em Filtração de Melado (Grupo 2)

Componente	Membrana			
	1 μM inoxidável	0, aço	E 30	E spiral 0,5 kDa
Total de fenólicos	16	0,	0	0
Antioxidantes	17	0,	0	0
Frutose	20	0,	0	0
Glicose	0,15	-	0	0
Sacarose	03	0,	-	1
Total de açúcares	04	0,	0	0
Ácido cis- aconítico	06	0,	0	0

Ácido trans- aconítico	11	0,	0	0
Coloração (A420)	36	0,	0	0
Brix	06	0,	0	0
Sódio (Na)	0,14	-	0	0
Potássio (K)	0,15	-	0	0
Cálcio (Ca)	06	0,	0	0
Magnésio (Mg)	06	0,	0	0
Ferro (Fe)	39	0,	0	0
Cloreto (Cl)	16	0,	0	-
Fosfato (PO <sub>4</sub> )	45	0,	0	0
Sulfato (SO <sub>4</sub> )	0,09	-	0	0

### Conclusões

[00142] A filtração prévia de uma mistura de melado a 43% (p/v) utilizando uma membrana de aço inoxidável de 0,1 μm foi eficaz, mas lenta, gerando velocidades de fluxo estabilizadas de 15 l/h. A maior parte dos componentes permeou facilmente a membrana de 0,1 μm, exceto por polissacarídeos.

[00143] Nanofiltração (0,5 kDa) rejeitou

adequadamente os fenólicos, atividade antioxidante, sacarose, ácidos aconíticos e íons divalentes ao utilizar estoque de alimentação de membranas de 0,1 µm e 30 kDa. A permeação de monossacarídeos por 0,5 kDa, entretanto, foi consideravelmente mais alta quando utilizados após a membrana de 0,1 µm que após a membrana de 30 kDa.

[00144] Ultrafiltração (30 kDa) utilizando estoque de alimentação da membrana de 0,1 µm exibiu níveis de permeação satisfatórios para a maior parte dos analisados, com a rejeição mais alta para coloração a 420 nm ( $r = 0,86$ ) e ferro ( $r = 0,84$ ). A inclusão de uma membrana de 30 kDa antes de uma membrana de 0,5 kDa possui as vantagens de velocidades de fluxo mais altas para nanofiltração subsequente e redução da coloração em retidos de 0,5 kDa. A principal desvantagem é a perda de fitoquímicos (40%) no retido de 30 kDa.

[00145] Tratamento com osmose reversa dos permeados de 0,5 kDa aumentou a concentração da maior parte dos analisados duas a três vezes no retido.

[00146] Este exemplo demonstra que pode ser utilizada uma série de membranas e métodos para produzir extratos de acordo com o primeiro aspecto da presente invenção que possuem uma série de características.

#### Exemplo 5

[00147] A filtração de melado por membranas necessita que o estoque de alimentação seja diluído para 40-60% (p/v) com água quente e filtrado previamente ou centrifugado para remover a carga de 1 a 2% (v/v) de sedimento. Antes de prosseguir para nanofiltração sobre uma membrana de 0,5 kDa, prefere-se uma etapa de ultrafiltração intermediária, a fim de manter velocidades de fluxo satisfatórias sobre a

membrana de nanofiltração e remover componentes poliméricos tais como polímeros Maillard e polissacarídeos. Testes conduzidos utilizando uma membrana enrolada em espiral de 30 kDa após a filtração prévia com uma membrana de aço inoxidável de 0,1 µm demonstraram altas velocidades de fluxo de 120 a 150 l/h pela membrana de 30 kDa.

[00148] O exemplo atual investiga se uma membrana de 100 kDa ofereceu quaisquer vantagens no fracionamento de componentes em comparação com uma membrana de 30 kDa. Especificamente, uma membrana de 100 kDa em escala de laboratório (VivaFlow 50) foi testada para determinar as suas capacidades de fracionamento utilizando melado a 40% (p/v) a 50 °C.

#### Métodos

[00149] Melado diluído (40% p/v) foi centrifugado a 6000 g por uma hora a 10 °C e filtrado através de um filtro de fibra de vidro de 1,6 µm (Whatman GF/A). O melado diluído (40% p/v) mantido a 50 °C foi filtrado através de uma membrana de polietersulfona de 100 kDa (107 mm x 84 mm x 25 mm, Vivaflow 50, Sartorius) a 1 Bar (0,1 MPa) e 2,5 Bar (0,25 MPa) em experimentos separados utilizando novos conjuntos. Foi realizada uma condução adicional (Condução 2) sobre uma membrana regenerada a 2 Bar (0,2 MPa) após a primeira tentativa a 1 Bar (0,1 MPa).

[00150] Análises: foram conduzidos os testes a seguir sobre o estoque de alimentação, permeados e retidos para cada condução: total de fenólicos, atividade antioxidante, ácidos aconíticos, polissacarídeos, coloração (A420) pH, condutividade e perfis de HPLC.

#### Resultados

[00151] A Tabela 6 exibe as alterações de coloração e composição após filtragem através de membrana de fluxo cruzado Vivaflow 50 (100 kDa MWCO). A condução 1 foi realizada sob pressão de 1 Bar (0,1 MPa) e a condução 3 a 2,5 bar (0,3 a 0,25 MPa), utilizando novas membranas para cada condução. A pressão mais baixa na Condução 1 serviu para compensar vazamentos em conexões de tubulação. A Condução 2 utilizou uma membrana regenerada após a Condução 1, mas o fornecedor informou que não era recomendada a reutilização da membrana.

Tabela 6

Composição de Melado Após a Filtragem de Membranas Sobre um Conjunto de Fluxo Cruzado Sartorius Vivaflow 50 com Corte de Peso Molecular a 100 kDa

Cond	Amost	A420	Total de fenol (g/l)	Ativ. de A/Ox (g/l)	Cis-Aconít (g/l)	Trans-Aconít (g/l)	Polis (g/l)	pH	Cond. (NaCl, M)
1	Alim.	34,4	8,33	2,65	1,80	6,80	10,17	5,58	0,19

2	Perm.	17,8	5,89	1,88	1,68	6,46	1,12	5,56	0,21
	Retid o	37,1	8,42	2,59	1,83	6,89	10,64	5,57	0,20
	Alim.	34,7	8,13	2,61	1,78	6,68	10,35	5,58	0,20
	Perm.	10,0	4,91	1,59	1,58	6,04	0,72	5,57	0,21
	Retid o	37,4	8,14	2,71	1,80	6,73	11,04	5,58	0,19
	Alim.	30,3	7,19	2,29	1,53	6,03	9,25	5,64	0,19
3	Perm.	11,1	4,90	1,46	1,41	5,68	0,83	5,62	0,20
	Retid o	35,5	7,89	2,38	1,58	6,17	11,43	5,63	0,19

[00152] Para as Conduções 1 e 3, houve uma perda significativa de coloração nos permeados (48% e 63%, respectivamente) A permeação de fenólicos e antioxidantes para a Condução 1 foi de 71%. Para a Condução 3, que possuía uma contrapressão levemente mais alta, a permeação de fenólicos e antioxidantes foi de 68% e 64%, respectivamente. A permeação

de ácidos eis e transaconíticos para as Conduções 1 e 3 foi alta a 92-95%, enquanto os polissacarídeos foram baixos a 9-11%. Os perfis de HPLC de. fase reversa das amostras foram medidos para cada condução. Embora as alturas de pico fossem reduzidas nos permeados correspondentes, não houve perda de nenhum pico individual nessas amostras.

[00153] A Tabela 7 exhibe dados recolhidos de testes de filtração de membrana utilizando estoque de alimentação de cerca de 43% de melado. Houve pouca redução dos fitoquímicos ou ácidos aconíticos após filtração de 0,1 µm. O estoque de alimentação para a membrana enrolada em espiral de 30 kDa foi consideravelmente diluída pelo volume inicial da instalação de filtração. A diluição estimada (dos níveis de componentes reduzidos no estoque de alimentação de 30 kDa) foi de 1,57 vezes. Isso fornece um nível estimado de polissacarídeos no estoque de alimentação de 30 kDa de 2, 2 g/l. A perda de coloração no permeado foi mais alta que para a membrana de 100 kDa. A permeação de fitoquímicos através da membrana de 30 kDa foi de 60% para fitoquímicos, 89% para ácidos aconíticos e 95 para polissacarídeos. Nestes testes, a queda notável do pH para 5, 0· no estoque de alimentação de 30 kDa possivelmente deveu-se a uma falha do cartucho de troca de ânions.

Tabela 7

Composição de Melado Após Filtração com Membrana Através de uma Membrana de Aço Inoxidável (SS) de 0,1 µm e uma Membrana Enrolada em Espiral de 30 kDa

Amostra	A420	Total de fenólicos (g/l)	Ativ. de A/Ox (g/l)	Cis-Aconítico (g/l)	Trans-Aconítico (g/l)	Polissac. (g/l)	pH	Condut (NaCl, M)
Antes da membrana de SS de 0,1 µm	51,4	6,88	2,42	1,59	7,02	10,3	8,1	0,21
Permeado da membrana de SS de 0,1 µm	40,9	6,84	2,31	1,70	6,73	3,5	7,7	0,22
Estoque de alim. para 30 kDa	20,2	4,6	1,46	1,03	4,24	N/T (est. 2,2)	5,0	0,19
Permeado de 30 kDa	4,8	2,76	0,88	0,93	3,76	0,20	5,3	0,19

### Conclusões

[00154] Este exemplo demonstrou que a permeação do total de fenólicos e antioxidantes utilizando uma membrana de 100 kDa (64 a 71%) foi levemente mais alta que a de uma membrana de 30 kDa (60%). A permeação de ácidos aconíticos (89 a 95%) e polissacarídeos (9 a 11%) foi similar para as duas membranas, ou seja, a membrana de 100 kDa gerou permeação levemente mais alta de fitoquímicos (fenólicos e antioxidantes), mas permeação similar de ácidos aconíticos e polissacarídeos. A redução da coloração foi maior com a membrana de 30 kDa.

[00155] Consequentemente, é recomendada uma membrana de 100 kDa para maior permeação de fitoquímicos, mas ela não oferece vantagem sobre uma membrana de 30 kDa para remoção de polissacarídeos e coloração.

### Exemplo 6

[00156] Este exemplo pesquisa o uso de permeação de gel para produzir extratos de acordo com o primeiro aspecto da presente invenção.



## Métodos

[00157] Filtragem de gel preparativa sobre uma coluna Bio-Gel P-2 foi utilizada para fracionar melado diluído (50% p/v) na faixa de peso molecular de 100 a 1800 daltons (Da). Cinco frações de peso molecular de cinco conduções de cromatografia foram reunidas e secas por congelamento. As frações foram analisadas para determinar a atividade antioxidante, total de fenólicos, perfil de HPLC e açúcares.

[00158] O melado foi diluído até 50% (p/v) em tampão de filtragem de gel (20 mM de formato de amônio, pH 5,0, contendo 10% de acetonitrila) e centrifugado a 6000 g por uma hora a 10°C. O sobrenadante foi filtrado através de um filtro GF/A de 1,6 µm (Whatman) e congelado em parcelas de 30 µl a -80°C para uso em cromatografia de filtragem de gel.

## Filtragem de gel

[00159] Uma coluna de vidro (26 mm x 1000 mm) foi cheia com Bio-Gel P-2 (BioRad, U. S. A.) até uma altura de leito de 910 mm sob velocidade de fluxo de 60 ml/h. o leito foi equilibrado a 30 µl/h à temperatura ambiente em tampão de 20 mM formato de amônio, pH 5,0, contendo 10% de acetonitrila. Aplicou-se melado diluído (20 µl de 50% p/v) à coluna e foram recolhidas frações de 5 µl. Seis conduções de filtragem de gel foram realizadas sobre um total de 120 µl de melado diluído. Frações das três primeiras conduções foram analisadas para determinar a coloração (A420), total de fenólicos e atividade antioxidante. Para as três últimas conduções, os testes com antioxidantes foram omitidos. Frações de volume foram determinadas gravimetricamente por meio de pesagem de cerca de vinte tubos por condução e determinação do volume de fração médio utilizando uma densidade de 1 g/ml.

[00160] A coluna de filtração de gel foi calibrada com três padrões: sacarose (360 kDa), NADH (663 kDa) e vitamina B12 (1355 kDa). O coeficiente de distribuição (kDa) para cada padrão foi calculado como  $kDa = V_e - V_o / V_T - V_o$ . O volume vazio foi determinado com albumina de soro bovino. A faixa de fracionamento de Bio-Gel P-2 é de 100 a 1800 Da (BioRad).

[00161] Frações a granel liofilizadas: para cada condução de filtração de gel, frações individuais foram reunidas em cinco frações principais de acordo com os perfis de coloração ( $A_{420}$ ), total de fenólicos e antioxidantes. As frações reunidas para cada condução são exibidas na Tabela 15.

Tabela 8

Relação de Frações Reunidas para cada Condução

Cond. nº	Volume de fração (ml)	Frações reunidas				
		Conj. 1	Conj. 2	Conj. 3	Conj. 4	Conj. 5
1	4,88	34-50	51-66	67-82	83-100	101-120
2	4,74	35-54	55-72	73-83	84-104	105-120
3	4,95	35-52	53-68	69-79	80-100	101-120
4	4,69	35-53	54-71	72-81	82-100	101-120
5	4,52	37-56	57-76	77-87	88-103	104-120
6	4,71	35-51	52-71	72-81	82-99	100-120
Vol. Total (ml)		447	435	270	452	470

[00162] Após seis conduções de filtração com gel, as seis amostras em cada conjunto (Conjuntos 1 a 5) foram combinadas. Uma amostra de 10 ml foi retirada de cada conjunto final e o restante foi seco por congelamento.

[00163] Coloração ( $A_{420}$ ): frações de filtração com gel foram diluídas com água ultrapura (Arium Modelo 611, Sartorius) e a absorção foi lida a 420 nm sobre um espectrofotômetro Helios À. (Unicam).

[00164] Total de fenólicos: o total de fenólicos foi determinado por meio de um procedimento colorimétrico Folin- Ciocalteu (Kim et al, 2003). A 50 µl de amostra diluída em um tubo de ensaio de 75 mm, adicionou-se 650 µl de água deionizada. Reagente Folin-Ciocalteu não diluído (50 µl) foi adicionado a cada tubo. A solução foi misturada e mantida em repouso por cinco minutos à temperatura ambiente. Por fim, 500 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 7% foram misturados com a solução de reação e a absorção a 750 nm foi lida após noventa minutos à temperatura ambiente. O teor total de fenólicos foi expresso em µg de equivalentes de catequina por ml de amostra não diluída. Os padrões de catequina foram preparados na faixa de 0 a 250 µg/ml.

[00165] Atividade antioxidante: inicialmente, um substrato que contém volumes iguais de 14 mM de ABTS (sal de diamônio de ácido (2,2'-azinobis)3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico e 4,9 mM de persulfato de potássio foi preparado e armazenado por uma noite no escuro à temperatura ambiente. Antes do teste, esta solução foi diluída por cerca de sessenta vezes com água ultrapura e ajustada para gerar uma absorção a 734 nm de 0,99 a 1,01. Substrato de ABTS (1 ml) foi previamente incubado em tubos de ensaio de 75 mm a 26 °C por cinco minutos em um banho de água e adicionou-se 50 µl de amostra ou padrão. A solução foi misturada e mantida a 26 °C por 45 minutos quando a absorção foi medida a 734 nm. A atividade antioxidante foi expressa em µg de equivalentes de ácido gálico por ml de amostra não diluída. Os padrões de ácido gálico foram preparados na faixa de 0 a 25 µg/ml.

[00166] Perfis de HPLC RP: impressões digitais qualitativas de extratos de melado foram obtidas em um sistema

Shimadzu equipado com um controlador de sistema (Modelo SCL-10AVP), bombas duplas (Modelo LC10-AD), detector de conjuntos de fotodiodos (PDA) (Modelo SPD-M10AVP) e software Class Vp versão 6.14 para obtenção e análise de dados. Amostras (10 µl) foram eluídas a 30°C sobre uma coluna C18 (2) de 3 µm Luna de 30 x 4,6 mm (Phenomenex). A velocidade de fluxo foi de 1,5 ml/min. As fases móveis foram: fase A, 0,1% (v/v ácido trifluoroacético (TFA) em água e fase B, 60% acetonitrila em 0,085% TFA. O perfil de gradiente foi de 5 a 35% B por doze minutos; 35 a 100% B por um minuto e 100% B por três minutos, 100 a 5% B por 0,3 min e re-equilíbrio a 5% B por 4,7 min. Os picos eluídos foram detectados por um detector de PDA que mede o espectro de absorção de 200 a 400 nm em etapas de comprimento de onda de 4 nm e canais individuais a 214, 254, 280, 340 e 400 nm, com o cromatograma de 214 nm relatado rotineiramente. Amostras de filtração de gel foram preparadas a partir de cinco conjuntos liofilizados e continham concentrações iguais de fenólicos totais (1 de equivalentes de catequina por ml). A amostra de melado utilizada para filtração de gel continha 2 mg de CE/ml.

[00167] Análise de açúcar: mono e dissacarídeos foram analisados por meio de HPLC de fase reversa utilizando um sistema Shimadzu equipado com um controlador de sistema (Modelo SCL-10AVP), bomba (Modelo LC-10ADVP), detector de índice de refração (Modelo RID-10A) e software Class Vp 6.12. Amostras (10 µl) foram injetadas em uma coluna Supelcosil LC-NH2 de 5 µm (250 mm x 4,6 mm, Phenomenex) em operação a 40°C. A fase móvel foi acetonitrila a 85% e a velocidade de fluxo foi de 1 ml/min. Amostras foram eluídas isocraticamente por vinte minutos e analisadas em duplicata. Foram preparadas

curvas padrão para glicose, frutose e sacarose na faixa de 0,3 a 1,2 mg/ml, utilizando quatro soluções padrão que contêm as mesmas concentrações gravimétricas dos açúcares correspondentes. Injeções triplicadas foram realizadas para cada solução padrão.

[00168] SDS-PAGE: eletroforese por meio de SDS-PAGE foi realizada sobre géis de acrilamida a 12% utilizando o sistema mini-Protean II slab-gel (BioRad). Amostras liofilizadas de filtragem de gel foram dissolvidas em água (200 mg/ml) e 30 µl foram digeridos em um volume igual de tampão de carregamento. Um volume de 15 µl (1,5 mg de sólidos) foi carregado sobre o gel. A eletroforese foi suspensa quando a tintura azul de bromofenol atingiu o fundo do gel. O gel foi manchado em azul de Coomassie a 0,25% e varrido em um scanner de mesa (Scanjet 5400C, Hewlett Packard).

#### Resultados

[00169] Calibragem de Bio-Gel P-2: foi preparada uma curva de calibragem para determinar os pesos moleculares sobre a coluna de Bio-Gel P-2.

#### Perfis de filtragem de gel

[00170] Os perfis de filtragem de gel para coloração ( $A_{420}$ ), antioxidantes e total de fenólicos de melado (Condução 3) são exibidos nas Figuras 6 e 7. O perfil de coloração de  $A_{420}$  exibiu um pico perto do volume vazio da coluna e um pico agudo na fração 62 (MW 832 Da). A absorção foi gradualmente reduzida em seguida até a linha base. Os perfis de antioxidantes e total de fenólicos coincidiram de perto entre si. Os dois primeiros picos de antioxidantes/fenólicos coeluíram com os picos de  $A_{420}$ . Um pico de antioxidante/fenólico amplo na fração 80 (MW 352), entretanto, não correspondeu a um

pico de coloração. Este pico, que compreende as frações 69 a 100, possui uma faixa de peso molecular de 135 a 599 Da e pode ser uma mistura de flavonoides com baixa coloração e ácidos polifenólicos.

[00171] Os perfis de sacarose e monossacarídeos (glicose + frutose) são exibidos nas Figuras 8 e 9, respectivamente. A coluna foi capaz de resolver parcialmente sacarose e monossacarídeos. Sacarose foi eluída sobre a extremidade frontal do pico de antioxidante (fração prévia 80) e monossacarídeos sobre a extremidade final (fração posterior 80). Desta forma, o pico de antioxidante com baixa coloração contém todos os açúcares simples de melado.

[00172] Para aplicações de filtração de membrana, nas quais é necessário um produto antioxidante com baixa coloração, seria necessário dirigir a região do peso molecular abaixo de 600 Da. A separação dos antioxidantes dos açúcares deverá ser possível por meio de cromatografia de exclusão de íons.

#### Conjuntos de filtração de gel a granel

[00173] Os cinco conjuntos para cada uma das seis conduções de filtração de gel foram descongelados e combinados antes da secagem por congelamento. A Figura 10 exibe as cores dos conjuntos combinados (Conjuntos 1 a 5) antes da secagem por congelamento. Os Conjuntos 1 e 2 foram ambos muito escuros; o Conjunto 1 foi levemente turvo e o Conjunto 2 era translúcido. Os Conjuntos 3 a 5 exibiram coloração decrescente de marrom claro para amarelo claro.

[00174] A Tabela 9 exibe a composição dos conjuntos combinados antes da secagem por congelamento e a faixa de peso molecular médio para cada conjunto. A partir dos

cálculos de massa, o pico de antioxidante com baixa coloração e fenólico (Figuras 6 e 7) continha 49% da atividade antioxidante e 50% dos fenólicos, respectivamente. O pico com coloração escura em eluição no volume vazio (Conjunto 1) continha 14% da atividade antioxidante e o pico agudo com coloração escura (Conjunto 2) continha 28%. A recuperação da atividade antioxidante da coluna foi de 70%.

Tabela 9

Composição de Conjuntos Combinados a Partir de Filtragem de Gel Sobre Bio-Gel P-2 Antes da Secagem por Congelamento

Componente	Conj. 1	Conj. 2	Conj. 3	Conj. 4	Conj. 5
Volume (ml)	437	425	260	442	460
Total de sólidos (g/100 ml)	0,56	1,36	7,3	3,24	0,15
Total de fenólicos (µg CE/ml)	324	555	761	550	141
Atividade antioxidante (µg)	92	183	229	173	49

GAE/ml)					
Frutose (mg/ml)	BDL	BDL	4,0	5,1	BDL
Glicose (mg/ml)	BDL	BDL	5,1	4,2	BDL
Sacarose (mg/ml)	BDL	0,70	50	12	BDL
Total de sólidos (g)	2,45	5,78	18,98	14,32	0,69
Total de fenólicos (mg CE)	142	236	198	243	65
Antioxidantes (mg GAE)	40	78	60	76	23
Faixa de peso molecular médio	>1800-1444	1377-636	604-373	356-156	150-65

Composição de melado de carga: total de sólidos = 35,6 g/100 ml; A<sub>420</sub> = 43,7.

Total de fenólicos: 10340 µg/rnl; atividade antioxidante = 3390 µg/ml.

Volume total de melado por seis conduções = 120 ml.

[00175] A Tabela 10 exibe a composição de conjuntos combinados após secagem por congelamento. Com relação a propriedades físicas, o Conjunto 1 era um produto fofo e

diferiu consideravelmente do Conjunto 2, que possuía uma textura crocante dura. Os Conjuntos 3 e 4 eram crocantes, higroscópicos e continham 71% e 64% de açúcares, respectivamente. O Conjunto 5 era escuro, pegajoso e de difícil remoção da bandeja de secagem, o que resulta em perda significativa de produto. Com base em sólidos (mg GAE/g de sólidos), houve uma perda significativa da atividade antioxidante sobre a secagem por congelamento do Conjunto 2 (26%) e Conjunto 5 (34%).

Tabela 10

Composição de Conjuntos Combinados de Filtragem de Gel Sobre Bio-Gel P-2 Após Secagem por Congelamento

Componente	Conj. 1	Conj. 2	Conj. 3	Conj. 4	Conj. 5
Peso de produto seco (g)	2,62	5,23	18,17	13,74	0,5
Total de fenólicos (g/100 g)	5,60	4,1	0,99	1,70	5,42
Atividade antioxidante (g/100 g)	1,6	0,99	0,29	0,55	2,1
Frutose (g/100 g)	BDL	BDL	5,0	16	BDL

Glicose (g/100 g)	BDL	BDL	7,1	14	BDL
Sacarose (g/100 g)	BDL	6,7	59	34	BDL
Total de fenólicos (mg CE)	147	214	180	234	27
Antioxidantes (mg GAE)	42	52	53	76	11
Textura	Fofo	Crocante	Crocante	Crocante	Pegaj.
Coloração	Preto	Preto	Marrom claro	Marrom claro	Preto

Composição de melado de carga: total de sólidos = 35,6 g/100 ml; A420 = 43,7.

Total de fenólicos = 10340 µg/ml; atividade antioxidante = 3390 µg/ml.

Volume total de melado por seis conduções = 120 ml.

[00176] Perfis de HPLC RP: foram examinados perfis



de HPLC de fase reversa de conjuntos de filtração de gel liofilizados (perfis b-f). Houve diferenças notáveis entre todos os perfis que puderam ser utilizadas para caracterizar os conjuntos. O Conjunto 1 exibiu um perfil de elevação gradual com apenas um pico menor. Presumivelmente, esta amostra contém material polimérico heterogêneo que não poderá ser resolvido em picos individuais pela coluna de HPLC. O Conjunto 2 representa a faixa de peso molecular de 636 a 1377 Da e inclui o pico agudo de material marrom escuro. Este conjunto exibiu o material mais hidrofílico em eluição por menos de um minuto e um número de picos bem resolvidos sobre o gradiente. Os Conjuntos 3 e 4 representam o pico de antioxidante com baixa coloração e exibiram diferenças consideráveis entre os seus perfis correspondentes. O Conjunto 5 exibiu uma série de picos que poderão representar ácidos fenólicos com baixo peso molecular e um composto com peso molecular mais alto que tenha sido unido fracamente à coluna e não foram eluídos de acordo com os seus pesos moleculares. A proporção de material hidrofílico neste conjunto era baixa, o que resulta em alturas de pico maiores na região hidrofóbica do perfil. A amostra de carga de melado permite a coincidência entre alguns picos e certas faixas de pesos moleculares nos conjuntos, também exibindo quais picos de melados são unidos fracamente ao gel e eluídos no Conjunto 5. Todas as amostras exibiram um pico significativo após 14, 5 min, o que não é relevante para a cromatografia, e representa um fluxo de acetonitrila para remover todo o material unido da coluna ao final da condução. De forma interessante, este pico que representa os compostos mais hidrofóbicos em melado é reduzido com o peso molecular dos conjuntos.

[00177] SDS-PAGE: a desnaturação de eletroforese dos conjuntos liofilizados foi utilizada para detectar o material de proteína nos extratos. Nenhuma faixa de proteína era aparente acima de 14 kDa nos extratos. No Conjunto 1 (Linha 2), foram observadas manchas leves perto da frente de tingimento, mas é incerto se esta é proteína manchada ou Azul de Coomassie residual de uma frente de tintura irregular. A detecção de polipeptídeos com baixo peso molecular (< 10 kDa) necessitaria de um gel a 16% com um tampão de Tris-Tricina.

#### Conclusão

[00178] Os perfis de filtragem de gel demonstraram que corantes de melado escuros medidos a 420 nm foram eluídos no volume vazio da coluna (> 1800 Da) e a 832 Da. A atividade antioxidante e o total de fenólicos coeluíram-se com estes dois picos de coloração. Um pico de fenólico e antioxidante amplo foi eluído entre 135 e 599 kDa, mas não foi associado a um pico de coloração. Este pico de antioxidante continha toda a sacarose e monossacarídeos. Ele compreendeu 49% da atividade antioxidante eluída e 50% do total de fenólicos. Consequentemente, a remoção dos corantes escuros de melado reduziria aproximadamente à metade a atividade antioxidante do produto. O material polimérico com coloração escura em eluição perto do volume vazio compreendeu 14% da atividade antioxidante eluída.

[00179] As quantidades de conjuntos de filtragem de gel liofilizado variaram de 0,5 g a 18 g, com altas massas obtidas para os dois conjuntos que contêm açúcares. A recuperação da atividade antioxidante foi de mais de 92% em três dos conjuntos liofilizados, mas perdas significativas da atividade antioxidante foram encontradas nos Conjuntos 2 e 5.

[00180] As impressões digitais de HPLC dos conjuntos liofilizados exibiram algumas diferenças distintas que puderam ser utilizadas para caracterizar as amostras. Análise de proteínas por meio de desnaturação de eletroforese de gel de poliacrilamida exibiu uma ausência de material de proteína acima de 14 kDa em todas as amostras liofilizadas. O Conjunto 1 exibiu um traço de mancha de proteína perto da frente de tintura. Esta pode ser proteína unida associada a taninos hidrolisáveis.

[00181] As amostras liofilizadas serão analisadas em seguida para caracterização de polissacarídeos e polifenol, bem como determinar a sua capacidade de inibição de enzimas do intestino.

[00182] O exemplo demonstra que os perfis de coloração obtidos por meio da filtragem de gel de melado dependeram do pH e/ou da composição do tampão e que pode ser produzido um extrato com alto teor de antioxidantes com menos coloração de acordo com a presente invenção. Sob pH 7,5, a maior parte da coloração escura foi eluída no volume vazio, enquanto sob pH 5, 0 foi observado um segundo pico de coloração escura sob peso molecular mais baixo. O tampão com pH 5,0 continha 10% de acetonitrila, o que poderá haver contribuído para uma alteração das propriedades de permeação do gel.

[00183] Esse extrato com alto teor de antioxidante e coloração mais baixa será útil como um aditivo para alimentos para reduzir o GI, reduzir a carcinogenicidade ou alterar a composição do corpo sem interferir com a cor ou propriedades organolépticas do alimento. Além disso, um extrato de coloração mais baixa de acordo com a presente invenção é útil em aplicações farmacêuticas, especialmente quando a coloração e

o amargor forem questões importantes.

#### Exemplo 7

[00184] Os níveis de dezesseis compostos fenólicos foram determinados em frações básicas e ácidas aquosas de duas amostras de extratos de melado de acordo com o primeiro aspecto da presente invenção e uma amostra de açúcar pulverizada com extrato de melado de acordo com o primeiro aspecto da presente invenção. Os compostos fenólicos foram isolados por meio extração de acetato de etila das amostras.

[00185] Três amostras foram recebidas para avaliação. Os detalhes de cada amostra são exibidos abaixo.

Amostra 1: fração unida por XAD de melado (pó).

Amostra 2: fração purificada com MF de melado (retido de 0,5 kDa de permeado de 30 kDa, pó) (MFP).

Amostra 3: açúcar com baixo GI.

#### Métodos

[00186] Preparação de amostras - limpeza por Extração de Fase Sólida (SPE) em Fase Reversa: um cartucho de SPE C<sub>18</sub> (4 ml, 600 mg; Alltech Associates, Deerfield IL) foi condicionado com metanol (3 ml) e ácido fórmico (0,05%, 6 ml). Fração unida por XAD (Amostra 1) (189,5 mg) foi dissolvida em ácido fórmico aquoso (0,05%, 10 ml) em um frasco volumétrico. Uma parcela desta solução (3 ml) foi carregada sobre o cartucho, lavada com ácido fórmico (0,05%, 5 ml) e eluída com metanol aquoso (20% seguido por 60% e 100%, 5 ml cada), resultando em três frações. Observou-se a eluição da maior parte da coloração marrom na fração de metanol aquoso a 60%.

[00187] Extração de solvente: uma parcela de cada amostra (cerca de 200 mg) foi dissolvida em água (10 ml) que havia sido acidificada (pH 1,6) ou basificada (pH 9,6).

Adicionou-se benzoato de metil-4-formilato (7,4 µg) a cada solução na forma de padrão interno (ISTD). As misturas foram extraídas em seguida com acetato de etila (2 x 10 ml), o solvente foi evaporado a vácuo (40 °C) e as misturas foram reconstituídas em ácido fórmico aquoso (0,1%, 5 ml) antes de serem submetidas a análise de HPLC e LC/MS.

[00188] Análise de HPLC: HPLC foi conduzida utilizando um sistema Shimadzu equipado com duas bombas LC-10ADVP sob alta pressão, um autoamostrador SIL-10ADVP (circuito de amostragem de 250 µl), um forno de coluna CTO-10ADVP e um detector de conjunto de fotodiodos SPD-M10ADVP (Shimadzu Inc., Rydalmere, NSW, Austrália). A coluna utilizada para a separação dos polifenóis foi Luna C<sub>18</sub> (4,6 mm diâmetro interno x 250 mm comprimento, tamanho de partícula de 5 µm, Phenomenex, Lane Cove, NSW, Austrália). As fases móveis utilizadas para a separação foram de 2% TFA em água (A) e 0,5% TFA em acetonitrila:água (1:1) (B) sob uma velocidade de fluxo de 1 ml/min. Os analisados foram eluídos utilizando um gradiente linear: 20-50% B por vinte minutos, 50-100% B por dez minutos permaneceu a 100% B por mais dez minutos. A detecção foi conduzida a 280, 320 e 370 nm. Os analisados foram identificados por meio de comparação do seu tempo de eluição (e fragmentos m/z característicos de análise de LC/MS, Tabela 2) com os de padrões autênticos (Sigma-Aldrich, Castle-Hill, NSW, Austrália).

[00189] Análise de LC-MS: análise de LC-MS foi conduzida em um espectrômetro de massa Quantum TSQ (ThermoFinnigan, NSW, Austrália) equipado com um sistema de fornecimento de solventes quaternário e um autoamostrador. Uma parcela (10 µl) de cada extrato investigado foi cromatografada

em uma coluna analítica Ultracarb® (2,1 x 150 mm, tamanho de partícula de 5 µm) (Phenomenex, NSW, Austrália) que foi aquecida a 30 °C em um forno. A fase móvel consistiu de ácido fórmico a 0,5% em água (A) e ácido fórmico a 0,5% em acetonitrila e água (1:1) (B) na velocidade de 300 µl/min.

[00190] Utilizou-se um gradiente linear (20% B a 100% B ao longo de dezenove minutos). Íons foram gerados utilizando uma fonte de eletropulverização no modo negativo sob condições definidas após otimização utilizando uma solução de ácido clorogênico.

#### Resultados

[00191] Conforme explicado abaixo, considerou-se que a amostra de XAD contém níveis significativamente mais altos de dezesseis compostos fenólicos selecionados que a amostra de açúcar com baixo GI e MFP. Vários componentes adicionais, que incluem tricina e diosmetina glicosídeos, foram provisoriamente identificados na amostra de XAD por meio de experimentos de LC-MS/MS.

[00192] Abordagem de extração: uma extração com base em SPE da fração polifenólica foi conduzida inicialmente. Conforme esperado de descobertas anteriores, a fração de metanol a 60% continha mais compostos polifenólicos (com base em absorção de UV a 280, 320 e 370 nm) que as outras duas frações de metanol. Os traços de UV das extrações de SPE exibiram, entretanto, baixa relação sinal-ruído.

[00193] Utilizou-se em seguida uma abordagem alternativa, com base em extração de acetato de etila. Os traços de HPLC resultantes (Figura 12) exibiram um número maior de picos em uma abundância significativamente mais alta e melhor resolução que os traços da limpeza de SPE. Desta forma,

apenas os extratos de acetato de etila foram utilizados para o restante do estudo. Extração de acetato de etila foi conduzida sobre soluções aquosas acidificadas e basificadas das amostras para garantir que o máximo de compostos possível seria extraído das amostras.

[00194] Quantificação de polifenóis selecionados: inicialmente, os níveis de compostos selecionados foram determinados quantitativamente em extratos ácidos e básicos das três amostras contra benzoato de netil-4-formila. Este composto exibiu, entretanto, uma orientação relativa a matrizes forte e, desta forma, os resultados obtidos da sua utilização foram questionáveis. Para eliminar essa orientação, uma curva de calibragem externa de ácido *p*-cournárico foi estabelecida e utilizada para obter resultados quantitativos. Cada composto foi quantificado com base na sua absorção máxima de UV em um dos três comprimentos de onda (280, 320 ou 370 nm). Nenhum fator de resposta foi determinado para compostos individuais e, portanto, os resultados de todos os compostos (além de ácido *p*-cournárico) são de natureza semiquantitativa. Os resultados obtidos para os compostos selecionados são exibidos na Figura 13. Na figura:

<sup>a</sup> As amostras foram pesadas na forma em que foram fornecidas. Nenhum tratamento adicional foi aplicado antes da extração.

<sup>b</sup> Foram conduzidas análises com tamanho de amostra ampliado (cerca de 800 mg para MFP e cerca de 1604 mg para açúcar).

<sup>c</sup> Traço = menos de 0,1 mg/kg.

[00195] Como se pode observar, a amostra de XAD foi de longe a mais rica, dentre todas as três amostras, nesses

fenólicos. Além disso, as frações de MFP e XAD ácidas continham uma quantidade maior de compostos polifenólicos em comparação com as frações básicas correspondentes. Isso era esperado, considerando que ácidos fenólicos tais como ácidos coumáricos, ferúlicos e siríngicos foram relatados anteriormente como sendo os principais componentes fenólicos de produtos de cana de açúcar. A amostra de açúcar continha a quantidade mais baixa de compostos polifenólicos em comparação com as amostras de XAD e MFP. Era provável, entretanto, que muitos dos polifenólicos de açúcar estivessem abaixo do limite de detecção do método de HPLC devido ao teor de açúcar mais alto (por unidade de peso) nesta amostra em comparação com as amostras de XAD e MFP. Para superar este problema, foram realizadas análises com maior tamanho de amostra, a fim de detectar compostos adicionais no açúcar com baixo GI (somente fração ácida). Análises de tamanho de amostra ampliado também foram realizadas para a amostra de MFP para aumentar a quantidade de compostos detectados (somente fração ácida).

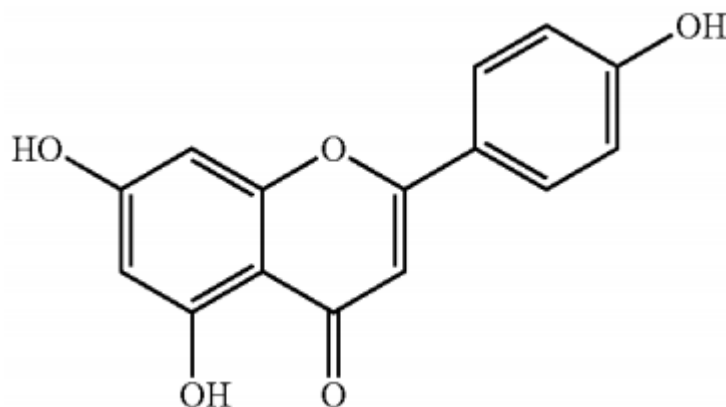
[00196] A presença/ausência de compostos selecionados em algumas amostras (devido a restrições de tempo) foi confirmada por estudos de LC-MS (tais como reações de parente-produto, monitoramento de reação selecionada e reações específicas de produto). A Figura 14 resume os experimentos de LC-MS realizados para cada amostra e as informações produzidas para cada analisado. Na figura, a identificação de tricina foi baseada apenas na fragmentação de MS, pois nenhum composto de referência autêntico pôde ser obtido e, portanto, é provisório.

[00197] Alguns compostos exibidos como "não detectados" na Figura 13 foram detectados em algumas amostras durante vários experimentos de LC-MS (tais como apigenina em

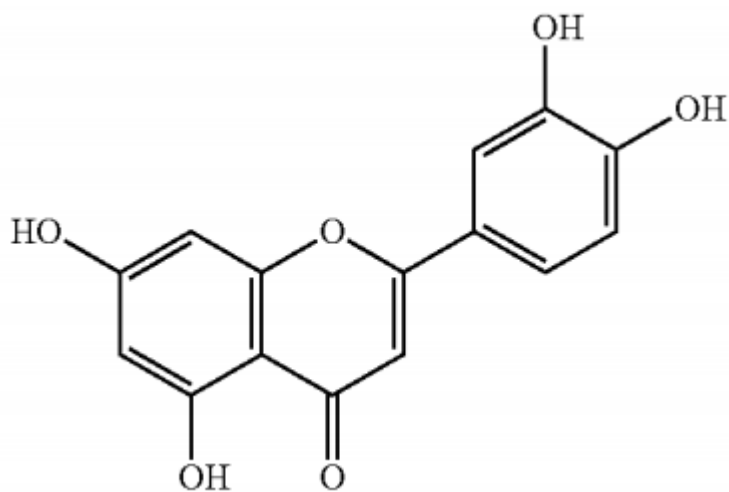


galato de (-)- catequina XAD-básico e MFP-básico em luteolina MFP-ácida e MFP-básica em MFP-ácido e MFP-básico). Isso se deve possivelmente à melhor sensibilidade do sistema de LC-MS em operação no modo de monitoramento de reação selecionada (SRM) em comparação com detecção de UV empregada pela abordagem de HPLC.

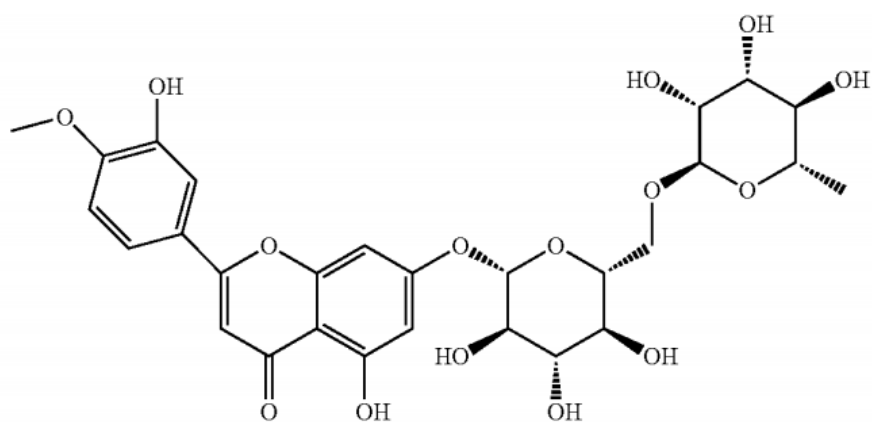
[00198] Uma série de experimentos de LC-MS/MS foi conduzida sobre a amostra de XAD-ácido em uma tentativa de identificar o máximo de componentes fenólicos adicionais possível no quadro de tempo fornecido. Os compostos principalente dirigidos incluíram flavona glicosídeos encontrados anteriormente em extratos de cana de açúcar, diosmetina (aglicona livre de diosmina, já detectada nos extratos) e glicosídeos que contêm agliconas cuja presença é confirmada nos extratos (apigenina, tricina, luteolina, quercetina). Os resultados encontram-se resumidos na Tabela 11 abaixo. Vários dos componentes identificados temporariamente possuem estruturas similares que diferem apenas na natureza dos grupos ilustrado pelas estruturas abaixo.



Apigenina



Luteolina



Diosmina

Tabela 11

	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>	R <sup>6</sup>
Tricina-7-O-neo-hesperosida	H	Glc-Rha	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>
Luteolina-8-C-(ramnosilglicosídeo)	H	H	Glc-Rha	OH	OH	H
Tricina-7-O-glicosídeo	H	Glc-Rha	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>
Chaftosídeo	Glc	H	Ara	H	OH	H
Isochaftosídeo	Ara	H	Glc	H	OH	H

Relação de Compostos Identificados a Partir de Experimentos de LC-MS/MS no Extrato de XAD-Ácido

Composto	Detectado em XAD-ácido
Diosmetina	Sim
Miricetina	Sim
Tricina-7-O-neo-hesperidosida	Sim
Luteolina-8-C-(ramnosilglicosídeo)	Sim
Vitexina	Não
Tricina	Sim
Orientina	Não
Tricina-7-O-glicosídeo	Sim
Chaftosídeo	Sim
Isochaftosídeo	Sim

4,5-dimetil-luteolina-8-C-glicosídeo	Não
Luteolina/caempferol glicosídeos	Não
Tricina glicosídeos	Sim
Apigenina glicosídeos	Não
Diosmetina glicosídeos	Sim
Quercetina glicosídeos	Não

[00199] SRM e experimentos específicos de produtos ressaltaram a presença de compostos que contêm tricina adicionais (aos exibidos na Tabela 20) no extrato de XAD-ácido (Figura 15). Aparentemente, entretanto, os compostos que contêm diosmetina são o grupo dominante, pelo menos nos extratos de XAD-ácido, pois vários deles foram detectados durante análise específica de produtos ( $m/z$  299) (Figura 16).

#### Conclusão

[00200] A análise HPLC e LCMS dos pós de XAD e MF de cana de açúcar demonstrou que ambos continham uma série exclusiva de polifenóis e flavonoides muito diferente em nível e mistura da encontrada em outras fontes vegetais. Eles também

foram diferentes dos encontrados em extratos obtidos por meio de outros métodos.

[00201] Conforme esperado, o pó de XAD continha níveis mais altos dos polifenóis em comparação com o pó de MF. O padrão geral de polifenóis encontrado no açúcar com baixo GI analisado também foi similar ao encontrado nos pós de XAD e MF. Isso reforçou o uso do pó de MF na forma de um xarope com alto Brix como uma fonte de pulverização de enriquecimento para impregnar/revestir cristais de açúcar brutos ou refinados para fornecer novos ingredientes funcionais com maior atividade antioxidante e um equilíbrio mineral favorável.

[00202] Estes extratos podem também ser utilizados para gerar produtos que possuem benefícios clínicos que incluem a influência do GI de alimentos e modificação da composição do corpo. Esse xarope ou pó poderá ser utilizado para enriquecer outras fontes alimentícias tais como fibras e farinhas, para fornecer resultados funcionais similares.

#### Exemplo 8

[00203] Uma solução de pulverização apropriada para pulverização sobre açúcar bruto para convertê-lo em um produto de açúcar com baixo GI foi produzida a partir do xarope do permeado de membrana de 30 kDa (P1) do Exemplo 1.

[00204] O permeado (P1) compreendeu cerca de 4, 5 g/l de polifenóis, 30 g/l de frutose, 30 g/l de glicose e 110 g/l de sacarose, que possui um valor Brix de 15 a 25.

[00205] A estabilidade na armazenagem do permeado foi aumentada por meio da evaporação até 60-70 BRIX e aumento de cerca de quatro vezes na concentração. A composição foi, portanto, de cerca de 18 g/l de polifenóis, 120 g/l de frutose, 120 g/l de glicose e 440 g/l de sacarose.

[00206] Este xarope concentrado foi pulverizado sobre um açúcar base. O açúcar base consistiu de (i) açúcar branco cristalino e (ii) açúcar bruto em processo de um moinho primário ou refinaria no estágio fugaz. A quantidade de solução de pulverização variou dependendo do teor inicial de polifenol e fitoquímico por quilograma do açúcar base. Tipicamente, foram adicionados de 1 a 12 ml do xarope de pulverização concentrado a cada quilograma de açúcar base, em que a quantidade exata depende da variedade de cana de açúcar sendo processada. Para algumas variedades de cana de açúcar, a concentração de fitoquímicos adequada poderá ser atingida com adição mínima de xarope de pulverização (dependendo da quantidade de açúcares redutores remanescente e da concentração de fitoquímicos) Após o tratamento fugaz, o açúcar foi seco em um secador de açúcar cilíndrico giratório e, ao sair, uma amostra foi retirada em linha ou fora dela para teste de controle de qualidade/garantia de qualidade, para garantir que seja atingido um nível de polifenóis adequado.

[00207] Pode-se utilizar um procedimento de pulverização similar para impregnar ou revestir açúcar de cana branco, açúcar de beterraba e outros veículos tais como fibras (por exemplo, bagaço) e farinha de várias fontes de cereais, a fim de fornecer um produto enriquecido bioativo para uso como um ingrediente alimentício funcional.

#### Exemplo 9

[00208] Diferentes fluxos de processamento foram analisados durante a produção de açúcar bruto em um moinho e, no caso de melado, comparados com extratos preparados segundo o método de ultrafiltração de acordo com a presente invenção.

[00209] Amostras: amostras foram recolhidas a

partir dos fluxos de processamento a seguir: primeiro suco extraído (FEJ), tanque de tampão (BT), filtrado de lodo de moagem (MMF), lodo de moagem (MM), suco de fornecimento do evaporador (ESJ), xarope (SYR), melado (MOL) e açúcar bruto (RS). As amostras foram armazenadas, congeladas e transportadas para a instalação de teste.

[00210] Remoção do sedimento: amostras líquidas (sucos e filtrados de lodo de moagem) foram centrifugadas a 5000 rpm por dez minutos a 5 ° C de os sobrenadantes foram filtrados a vácuo através de papéis-filtro Whatman nº 1. Xaropes, melado e açúcar bruto foram diluídos até 10%, 10% e 40%, respectivamente, antes da remoção do sedimento. Amostras para análise mineral não foram tratadas para remover sedimento.

[00211] Extratos de lodo de moagem: um extrato de lodo de moagem foi preparado por meio da homogeneização de 20 g de lodo de moagem por um minuto em 45 ml de água deionizada quente (60 °C), centrifugação a 5000 rpm por cinco minutos e decantação do sobrenadante. A pelota foi novamente extraída em 45 ml de água deionizada quente e o sobrenadante foi novamente recolhido. Os extratos combinados foram compostos até 100 ml com água deionizada e filtrados a vácuo através de papéis-filtro Whatman nº 1.

[00212] Análises: foram utilizados os métodos de análise a seguir:

Componente	Método
Total de fenólicos	Procedimento colorimétrico de Folin-Ciocalteu. Resultados expressos como gramas de equivalentes de catequina por litro.
Perfil de polifenóis	HPLC RP, coluna C18 (Luna 3 µm, Phenomenex) a 30 °C, gradiente linear de 3 a 21% de acetonitrila por doze minutos, 21 a 60% por um minuto e 21 a 60% por três minutos. Detecção a 214 nm.
Atividade antioxidante	Substrato de ABTS. Resultados expressos como gramas de equivalentes de ácido gálico por litro.
Mono e dissacarídeos	HPLC RP, coluna de NH <sub>2</sub> a 40 °C, eluição isocrática com 88% de acetonitrila a 1 ml/min por vinte minutos. Detecção de RI.
Ácidos cis e trans-aconíticos	HPLC de partição moderada por íons, coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad). Eluição isocrática com 0,004 M de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> a 0,6 ml/min por quarenta minutos a 30 °C. Detecção de UV. Amostras diluídas em água antes da injeção.
Total de sólidos	Forno a vácuo a 70 °C por dezesseis horas.
Densidade	Medidor de densidade Anton Paar. Leituras a 20 °C em g/ml.
Nitrogênio total	Método de Kjeldahl utilizando unidades de destilação e digestão Foss Tecator.
Nitrogênio não de proteína	Amostra (2,5 g) tornada 50 ml com ácido tricloroacético a 12% e filtrada. Parcela (20 ml) analisada por meio do método de Kjeldahl.
Gordura	Hidrólise ácida seguida por extração de Mojonnier.
Polissacarídeos	Medição de polissacarídeos solúveis (Roberts, 1981). Precipitação de polissacarídeos com etanol a 100%, lavagem com etanol a 80%, digestão de precipitado em ácido sulfúrico a 1% e medição do total de açúcares redutores por ácido fenolsulfúrico a 485 nm com glicose como referência. Resultados expressos como
	grama de polissacarídeo por litro.
Na, K, Ca, Mg, PO <sub>4</sub> , SO <sub>4</sub>	Plasma acoplado indutivamente - espectroscopia de emissão ótica (ICP-OES) em instrumento Varian vista Pro em UQ. Os elementos foram testados sobre amostras não filtradas e não diluídas.
Cl	Analizador colorimétrico automático (Seal AQ2), Método EPA (EPA-124-A).

#### Extrato

[00213] O melado foi extraído por várias vezes utilizando as etapas de processo a seguir segundo o processo de acordo com a presente invenção:

a) aquecimento e diluição do melado com água até que a viscosidade da solução resultante seja de 0,05 a 0,1 Pa s (50 a 100 centipoise) e de 30 a 50 Brix sob uma temperatura de cerca de 50°C;

b) centrifugação do diluente utilizando uma centrífuga de desobstrução contínua em que o sobrenadante é processado diretamente através de uma membrana cerâmica ou de aço inoxidável (de 0,1 a 0,5 micron) utilizando uma pressão de 4 Bar (0,4 MPa), velocidade de fluxo de cerca de 30 a 100 l/hora e temperatura de 35 a 50°C;

c) aquecimento da solução da etapa (b) a 75°C e sua manutenção em seguida naquela faixa de temperatura por cerca de vinte minutos até a formação de um precipitado de sais de cálcio e magnésio insolúveis;

d) separação do precipitado e da matéria particulada grande da solução produzida na etapa (c) por meio de passagem da mistura através de uma membrana cerâmica ou de aço inoxidável (de 0,1 a 0,5 micron) utilizando uma pressão de 4 Bar (0,4 MPa), velocidade de fluxo de 30 a 100 l/hora e temperatura de 50°C, em que o retido é descartado e o permeado é recolhido;

e) tratamento do permeado recolhido da etapa (d) por meio da sua passagem através de uma combinação de membranas de ultrafiltração enroladas em espiral.

[00214] As membranas de ultrafiltração foram alteradas a cada vez em que o processo era conduzido. As



membranas de ultrafiltração apresentaram exclusão de tamanho que varia de 1000 a 50.000 Daltons. Os extratos isolados desta forma continham as composições descritas na Figura 25. Na figura, Perm = Permeado; Ret = Retido e os dados exibem percentuais de cada componente de melado no permeado e no retido.

#### Resultados

[00215] Conforme ilustrado pelas Figuras 17 a 24, a composição dos diferentes fluxos de processamento varia amplamente. Além disso, a composição dos fluxos de processamento varia a composição dos fluxos de batelada de cana de açúcar para outra.

[00216] Nas figuras, são utilizadas as abreviações seguir:

BT = tanque de tampão

MMF = filtrado de lodo de moagem

MM = lodo de moagem

MME = extrato de lodo de moagem (extrato de água quente, 20 g/100 ml de extrato total)

ESJ = suco de fornecimento de evaporador

SYR = xarope

MOL = melado

RS = açúcar bruto

FEJ = primeiro suco extraído (na Figura 17, a amostra é retirada da Batelada 3; nenhuma amostra de FEJ foi fornecida para a Batelada 1 ou Batelada 2)

#### Conclusão

[00217] Estas descobertas demonstram claramente a partição de fitoquímicos bioativos em fluxos de processo de cana de açúcar moída primária. Essa partição indica que certos

fluxos serão apropriados para a diferente exploração comercial desses fitoquímicos.

[00218] Suco clarificado, xarope, melado e extratos de lodo de moagem são todos fontes potenciais como estoques de alimentação para a recuperação de bioativos tais como polifenóis e antioxidantes, ácidos orgânicos e minerais. Melado é a fonte preferida. Lodo de moagem e bagaço também são fontes úteis de fitoquímicos em que é desejada uma composição diferente, especialmente com níveis mais altos de policosanóis e fitoesteróis, mas níveis mais baixos de carboidratos.

[00219] Cada um dos cinco extratos de ultrafiltração preparados a partir dos melados foi utilizado como estoque de alimentação para processamento adicional utilizando XAD. O uso desses extratos como estoques de alimentação oferece o claro benefício de minimização da possibilidade de envenenamento das resinas de XAD, de forma a aumentar a eficiência e a vida útil das resinas.

#### Exemplo 10

[00220] Três processos de extração separados foram conduzidos conforme segue para preparar materiais de partida apropriados para uso no processo de acordo com o segundo aspecto da presente invenção:

1. Topos de cana fibrilada foram secos em um forno a vácuo a 40°C de um Grupo. O material seco foi extraído com n-heptano utilizando um extrator soxhlet por cerca de quatro horas, durante o quê foram completados pelo menos dez ciclos. O extrato foi seco sobre sulfato de sódio anidro e evaporado até secar para gerar um material oleoso/ceroso em rendimento de 1,2%, com base no peso seco de topos de cana.

2. O bagaço foi tratado da mesma forma. O

material seco gerou um material oleoso/ceroso em rendimento de 0,65%, com base no peso seco do bagaço.

3. Lodo de moagem foi tratado da mesma forma. O material seco gerou um material oleoso/ceroso em rendimento de 6,53%, com base no peso seco de lodo de moagem.

[00221] Os três extratos foram submetidos em seguida ao processo do Exemplo 9 para fornecer três extratos de acordo com a presente invenção. Os extratos continham alto teor de polifenóis, mas baixo teor de açúcar, e seriam úteis para aplicações em que açúcares não são necessários.

[00222] O exemplo também demonstra que uma série de estoques de alimentação pode ser utilizada na produção dos extratos descritos como parte da presente invenção.

#### Exemplo 11

[00223] O método de acordo com o segundo aspecto da presente invenção foi utilizado para produzir um extrato de acordo com a presente invenção a partir de BioDunder® (vinhaça).

#### Tabela 12

Composição de Extrato de BioDunder® (vinhaça)

Componente	BioDunder®
Total de sólidos (g/100 g)	10,4
°Brix	11,4
Densidade (g/ml)	1,05
Coloração (A <sub>420</sub> )	17,8
Condutividade (M eq. NaCl)	0,25
pH	4,1
Total de fenólicos (g CE/l)	6,2
Atividade antioxidante (g GAE/l)	1,8
Frutose (g/l)	1
Glicose (g/l)	1
Sacarose (g/l)	3
Cinza (g/100 g)	4

Conclusão:

[00224] O extrato produzido neste exemplo continha alto teor de polifenóis, mas baixo teor de açúcares, e seria útil para aplicações em que açúcares não são necessários. o exemplo também demonstra que Vinhaça é um estoque de alimentação útil para a produção de extratos de acordo com a presente invenção.

Exemplo 12

[00225] Este exemplo demonstra que melado de um moinho primário possui uma composição diferente de uma refinaria.

Tabela 13

Composição de Melado de Diferentes Fontes

Componente	Moinho 1 (Moinho primário)	Moinho 2 (Refinaria)
Total de sólidos (g/100 g)	75,4	84,3
Brix	76	79
Coloração (ICU) A420	117 407	58 957
Total de fenólicos (mg CE/100 g DW)	2842	1258
Atividade antioxidante (mg GAE/100 g DW)	864	373
Frutose (g/100 g DW)	9,7	5,2
Glicose (g/100 g DW)	6,0	5,2
Sacarose (g/100 g DW)	38,4	59,0

[00226] O exemplo demonstra que a fonte de melado pode variar e que este fator necessita ser considerado na produção dos extratos de acordo com a presente invenção.

#### Exemplo 13

[00227] Neste exemplo, a composição de lodo de moagem foi analisada para demonstrar o seu potencial como estoque de alimentação para preparar extratos de acordo com a presente invenção. Os resultados encontram-se na Figura 26.

[00228] Os extratos aquosos produzidos neste exemplo continham alto teor de polifenóis, mas baixo teor de açúcares, o que demonstra que lodo de moagem seria útil para a produção de extratos para aplicações em que açúcares não são necessários.

#### Exemplo 14

[00229] A tabela a seguir exhibe as diferenças nos extratos obtidos utilizando o método descrito no Pedido de Patente Internacional nº WO 2005/117608 em comparação com os extratos de acordo com a presente invenção.

Tabela 14

Composição de Extratos Elaborados Utilizando Diferentes Processos

Composto	Método da WO 2005/117608	MF
Umidade (% p/p)	2 - 5	3 - 6
Sacarose (%)	0,1 - 0,2	50 - 75
Glicose (%)	0,2 - 0,6	6 - 15
Frutose (%)	1,2 - 2,4	6 - 15
Cálcio (mg/g)	6 - 8	3 - 4
Magnésio (mg/g)	2 - 3	1,5 - 3,0
Potássio (mg/g)	0,2 - 0,3	8 - 12
Sódio (mg/g)	0,05 - 0,07	1 - 2
Polifenóis (mg CE/g)	180 - 240	15 - 25
Antioxidantes (mg GAE/g)	50 - 70	4 - 7
Ácido transaconítico (%)	0 - 0,1	1,5 - 3,0
Fosfato (mg/g)	n/d	0,2 - 0,4
Cloreto (mg/g)	n/d	1,8 - 2,5
Sulfato (mg/g)	n/d	10 - 15

[00230] É importante observar que os estoques alimentação de melado variam significativamente, particularmente de composição mineral, como resultado da capacidade de variação da cana sendo processada e das condições de processamento utilizadas (particularmente na etapa de adição de cal e floculação para clarificar o suco misturado).

[00231] A tabela acima demonstra que o método de acordo com a presente invenção produz um extrato que possui uma composição muito diferente do extrato descrito no Pedido de Patente Internacional nº WO 2005/117608. Esta diferença não é simplesmente a diferença do estoque de alimentação de melado utilizado. O extrato de acordo com a presente invenção contém um teor de polifenóis muito mais baixo e um teor dos demais fitoquímicos muito mais alto, o que o torna mais próximo da composição natural da cana de açúcar.

Exemplo 15

[00232] Este exemplo compara o extrato obtido de Vinhaça do Exemplo 11 com os conjuntos 1 a 4 do Exemplo 6.

Tabela 15

Comparação de Extrato de Vinhaça com Diferentes Frações de Extrato de Melado

Resumo de resultados, mg/kg					
Compostos alvo	BioDunder®	Conj. 1	Conj. 2	Conj. 3	Conj. 4
Ácido cinâmico	473,60			2,5	16,9
Epicatequina		3,1	6,1	69,1	268,2
Ácido gálico				6,3	
Mircetina	23,7			1,0	62,9
Ácido protocatecoico		15,2	8,0		
Ácido siríngico	58,0	2,7	6,1	68,3	261,9
Ácido vanílico	176,0		4,6	8,5	81,8
Baunilha		5,4		7,5	6,3
Ácido para-hidroxibenzoico			3,7		28,3
Ácido p-coumárico		5,0			
Apigenina	29,5				
Ácido cafeico			0,8	3,1	
Diosmina	19,0				
Ácido ferúlico					4,7
Caempferol	88,0				

[00233] A expressão "que compreende" e formas da expressão "que compreende" conforme utilizado no presente relatório descritivo e nas reivindicações não limita a presente invenção para excluir nenhuma variante ou adição.

[00234] Modificações e aprimoramentos da presente invenção serão facilmente evidentes para os técnicos no assunto. Essas modificações e aprimoramentos destinam-se a encontrar-se dentro do escopo da presente invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE UM EXTRATO DERIVADO DE CANA DE AÇÚCAR QUE POSSUI CARACTERÍSTICAS DE REDUÇÃO DE ÍNDICE GLICÊMICO, caracterizado por compreender as etapas de:

a) aquecimento e diluição de um produto derivado de cana de açúcar até que a solução resultante tenha um teor de sólidos solúveis de 30 a 50 Brix;

b) (i) centrifugação do produto da etapa (a);  
ou, alternativamente,

b) (ii) ajuste do pH de 7,2 a 9,5 do produto da etapa (a) com uma base;

c) aquecimento do produto da etapa (b) até uma temperatura na faixa de 70 a 80°C e, em seguida, sua manutenção àquela faixa de temperatura por um período de tempo até a formação de um precipitado de sais de cálcio e magnésio insolúveis;

d) remoção do precipitado e material particulado grande da mistura produzida na etapa (c) através de uma membrana de cerâmica ou aço inoxidável com um tamanho de poro entre 0,1 e 0,5 microns sob uma temperatura de 35 a 50°C; e

e) tratamento do produto da etapa (d) passando por uma membrana de ultrafiltração de 30 a 100 kDa sob uma temperatura de 30 a 60°C para isolar extratos desejados.

2. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo produto derivado de cana de açúcar ser selecionado a partir do grupo que consiste em fluxo de alimentação de suco de cana de açúcar bruto, xarope clarificado, xarope concentrado, melaço, melado de moagem primária e de refinaria, xarope dourado, açúcar mascavo, bagaço, vinhaça, lixo de campo, cortes de cana, medula,



extremidades em crescimento, polpa, lodo de moagem e suas misturas.

3. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo produto derivado da cana de açúcar ser melaço.

4. PROCESSO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fracionamento na etapa (e) ser realizado utilizando uma ou mais membranas ou filtros de fracionamento selecionados a partir do grupo que consiste em microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração e suas misturas.

5. PROCESSO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado por compreender adicionalmente a etapa (f) de refino dos produtos recolhidos da etapa (e) com um tratamento selecionado a partir do grupo que consiste em cromatografia de troca iônica, cromatografia hidrofóbica, ultrafiltração, nanofiltração, permeação de gel, osmose reversa e suas misturas, para isolar os extratos desejados.

FIG.1

Componente	Sugar sample																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Umidade	0.01	0.01	0.01	0.02	0.80	0.51	1.14	1.64	0.16	1.06	1.54	0.11	0.08	0.20	0.07	0.09	0.07	0.09	0.08	0.78
Coloração	803	1200	1040	1080	6640	10790	8430	6700	1990	25290	17710	771	848	1420	776	1070	763	1460	819	4030
fenólicos	15.9	20.9	17.4	17.1	76.2	98.1	89.1	81.7	27.2	180.3	153.8	15.1	16.2	29.3	13.0	19.4	16.2	28.4	17.7	76.5
Atividade antioxid.	2.5	6.4	5.5	5.3	22.1	26.3	24.4	24.4	8.1	42.3	39.4	4.5	5.5	8.9	4.2	6.0	4.6	10.0	5.9	25.3
Frutose	0.02	0.03	0.02	0.02	0.42	0.56	0.63	0.30	0.06	0.78	1.50	0.02	0.03	0.07	0.03	0.04	0.03	0.08	0.04	0.33
Glicose	0.03	0.04	0.03	0.02	0.41	0.44	0.82	0.34	0.05	1.30	1.86	0.02	0.01	0.05	0.02	0.04	0.03	0.10	0.04	0.54
Sacarose	99.2	98.6	99.1	99.4	97.1	97.0	95.6	96.7	98.3	94.9	93.4	98.7	98.4	98.9	98.8	99.0	99.3	96.4	97.4	95.3
Ácido t-aconítico	13.2	19.3	14.4	13.8	48.6	32.9	58.0	80.0	21.6	3.3	24.4	12.6	14.0	38.6	20.3	17.2	6.5	31.9	17.4	84.2
Sódio	87	23	24	31	43	68	122	86	54	72	75	44	11	24	25	41	15	26	18	51
Potássio	396	204	176	116	782	948	976	1427	264	636	1054	372	229	626	121	473	275	331	114	1189
Cálcio	356	66	117	46	335	279	410	683	139	242	385	329	42	114	232	52	29	207	5	323
Magnésio	74	43	33	27	162	159	189	220	68	122	194	28	31	91	27	30	23	45	17	134
Ferro	12	7	10	7	26	13	12	19	18	12	12	8	8	11	15	9	13	11	8	23
Fosfato	59	17	14	2	16	21	22	33	8	16	20	1	9	10	13	8	8	20	3	47
Sulfato	349	290	383	401	567	656	532	648	441	448	449	489	471	533	476	499	586	540	525	599
Cloreteo	52	75	81	32	462	500	513	1081	145	336	621	90	65	242	53	91	51	85	34	419

Fig 2

Amostra	Volume (l)	Total de Fenólicos (g CE/l)	Antiox. (g GAE/l)	Frutose (g/l)	Glicose (g/l)	Sacarose (g/l)	Total de açúcares (g/l)	Total de sólidos (g/100g)	Cinza (g/100g)	Conduct. (NaCl, M)	A420	pH	Briz
0.1/0	80+	8.72	3.37	25	20	162	207	30.8	3.8	0.22	61.2	7.57	35.0
0.1/R1	34+	10.00	3.48	26	20	172	218	32.9	4.1	0.21	81.4	7.32	39.0
0.1/P1		8.56	2.95	29	18	169	216	30.7	3.8	0.23	53.2	7.29	36.0
0.1/P2	46	8.40	2.92	25	18	156	199	30.5	3.7	0.23	53.6	7.45	35.0
0.5/0	40+	5.64	1.92	22	12	89	123	20.1	2.5	0.20	31.3	6.77	23.0
0.5/R1	25+	8.40	2.33	30	18	109	157	23.6	2.6	0.19	39.9	6.88	27.0
0.5/RW		6.58	2.36	8.0	4.0	126	134	21.6	1.8	0.05	44.0	6.74	25.0
0.5/P1		0.84	0.33	13	9.6	5.8	28	5.9	1.6	0.24	0.48	7.24	5.8
0.5/P2	15	0.64	0.26	11	7.8	2.8	22	4.8	1.5	0.24	0.33	7.15	4.8
0.5/PWC	80	0.42	0.16	7.1	4.5	2.8	14	2.9	0.75	0.12	0.23	7.17	2.9
RO/0	80+	0.42	0.16	7.1	4.5	2.8	14	2.9	0.75	0.12	0.23	7.17	2.9
RO/R1	10+	0.96	0.39	15	11	6.7	32	6.5	1.8	0.28	0.66	7.53	6.7



Fig. 4

Amostra	Volume (l)	Total de fenólicos (g CE/l)	Antiox. (g GAE/l)	Frutose (g/l)	Glicose (g/l)	Sacarose (g/l)	Total de açúcares (g/l)	Total de sólidos (g/100g)	Cinza (g/100g)	Conduct. (NaCl, M)	A420	pH	Brix
0.1/0	80+	6.88	2.42	25	21	147	193	26.5	3.1	0.21	51.4	8.07	30.0
0.1/R1	30+	8.10	2.79	30	20	156	206	28.7	3.3	0.20	64.2	7.70	32.0
0.1/P1		6.84	2.31	24	23	151	198	26.8	3.3	0.22	40.9	7.74	30.0
0.1/P2	50	6.18	2.07	25	17	138	180	25.0	3.1	0.21	35.7	7.85	28.0
30/0	50+	4.60	1.46	18	14	68	100	17.2	2.1	0.19	20.2	5.04	19.0
30/R1	10+	6.30	1.91	18	26	61	105	19.4	2.2	0.17	33.7	4.88	21.0
30/P1		2.76	0.88	13	13	74	100	15.4	1.9	0.19	4.79	5.31	15.8
30/P2	40	2.60	0.85	15	16	73	104	15.1	1.9	0.19	4.47	5.34	15.4
0.5/0	36+	2.60	0.85	15	16	73	104	15.1	1.9	0.19	4.47	5.34	15.4
0.5/RW	16+	2.10	0.69	9.0	9.0	63	81	12.0	0.9	0.07	3.80	5.39	12.3
0.5/P1		0.21	0.09	1.8	1.8	0.2	3.8	1.5	0.64	0.11	0.063	5.35	1.4
0.5/P2	20	0.20	0.09	2.0	2.0	0.2	4.2	1.4	0.69	0.10	0.056	5.36	1.3
0.5/PW	70	0.11	0.04	1.0	0.8	BDL	1.8	0.76	0.32	0.05	0.056	5.56	0.7
0.5/PWC	90	0.12	0.05	1.2	1.1	0.1	2.4	0.91	0.44	0.06	0.052	5.48	0.9
RO/0	90+	0.12	0.05	1.2	1.1	0.1	2.4	0.91	0.44	0.06	0.052	5.48	0.9
RO/R1	20+	0.25	0.11	2.5	2.3	0.3	5.1	1.8	0.74	0.12	0.103	5.49	1.8

Fig. 5

Amostra	Volume (l)	Cis- aconítico (g/l)	Trans- aconítico (g/l)	(g/l)	Na (mg/l)	K (mg/l)	Ca (mg/l)	Mg (mg/l)	Fe (mg/l)	Cl (mg/l)	PO <sub>4</sub> (mg/l)	SO <sub>4</sub> (mg/l)
0.1/0	80+	1.59	7.02	10.3	867	5058	1021	502	26.0	3540	96.1	435.0
0.1/R1	30+	1.80	7.53		897	5207	1190	548	35.7	4220	146.4	452.4
0.1/P1		1.70	6.73	3.5	1018	5989	1116	578	21.7	3540	80.3	491.4
0.1/P2	50	1.58	6.31		945	5548	1019	515	18.1	3340	72.1	460.4
30/0	50+	1.03	4.24		692	3971	765	400	15.2	2520	52.9	345.6
30/R2	10+	1.16	4.82		618	3532	724	375	20.9	2680	61.3	324.9
30/P1		0.93	3.76	0.20	526	2988	502	281	3.5	1840	26.8	237.5
30/P2	40	0.88	3.52		583	3288	549	304	3.9	180	28.6	255.3
0.5/0	36+	0.88	3.52		583	3288	549	304	3.9	180	28.6	255.3
0.5/R1	16+	0.77	3.24		229	1290	456	253	3.5	180	26.3	231.4
0.5/P1		0.024	0.027		173	932	42	19	0.1	900	0.7	2.6
0.5/P2	20	0.021	0.024		186	977	44	19	0.1	900	0.9	2.3
0.5/PW	70	0.008	0.021		122	631	27	12	0.1	560	1.5	2.8
0.5/PWC	90	0.009	0.023		141	738	32	15	0.1	760	1.0	1.3
RO/0	90+	0.009	0.023		141	738	32	15	0.1	760	1.0	1.3
RO/R1	20+	0.02	0.045		296	1592	68	31	0.1	1580	0.7	2.1

Fig. 6

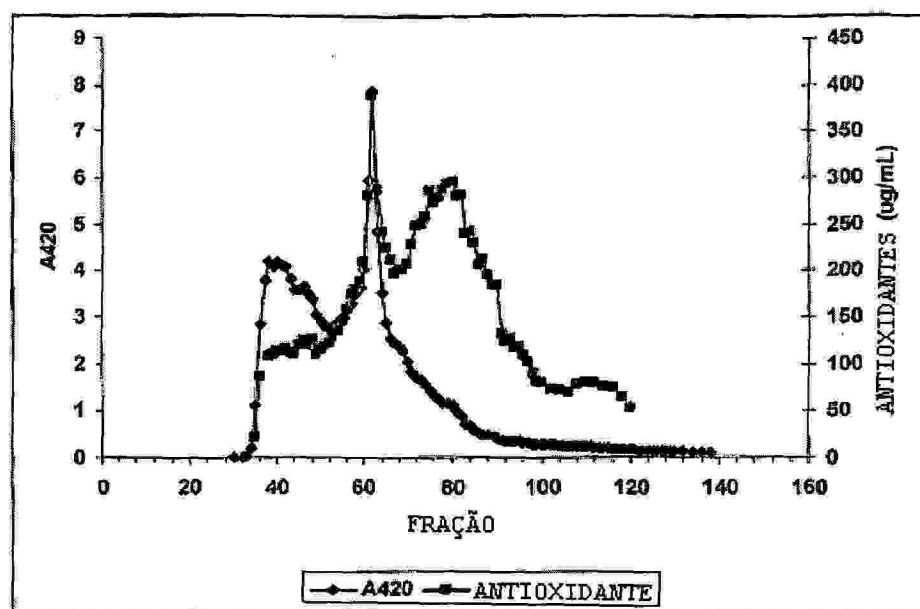


Fig. 7

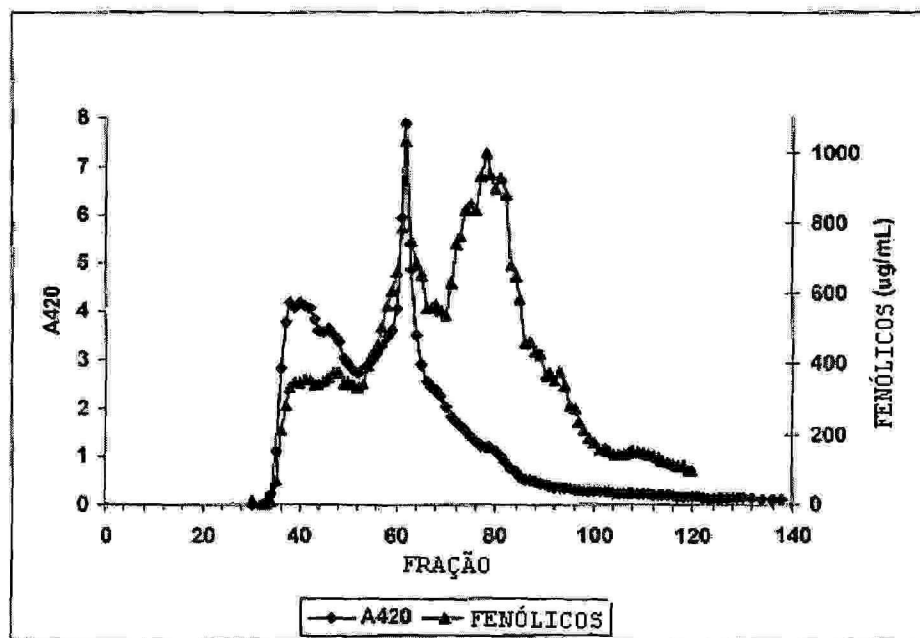


Fig. 8

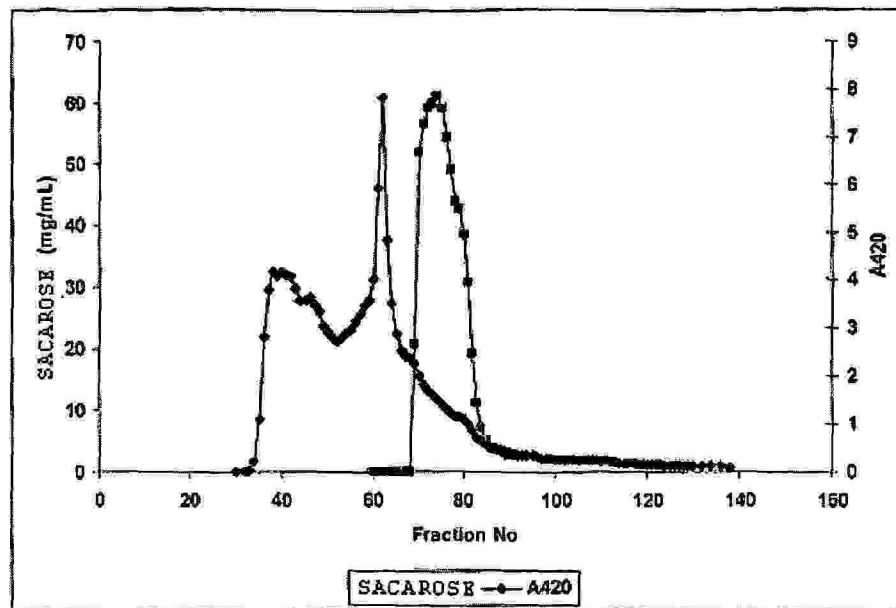


Fig. 9

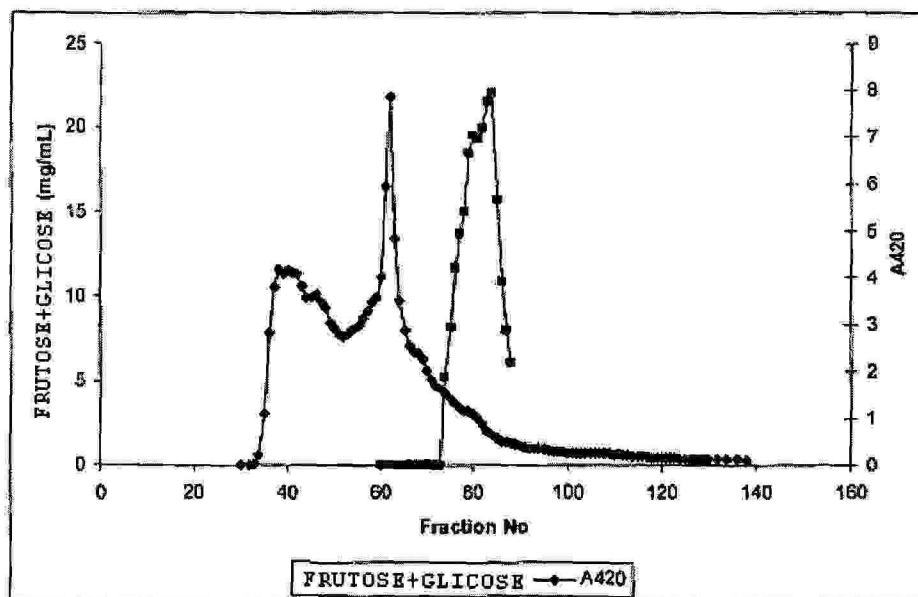




Fig. 10

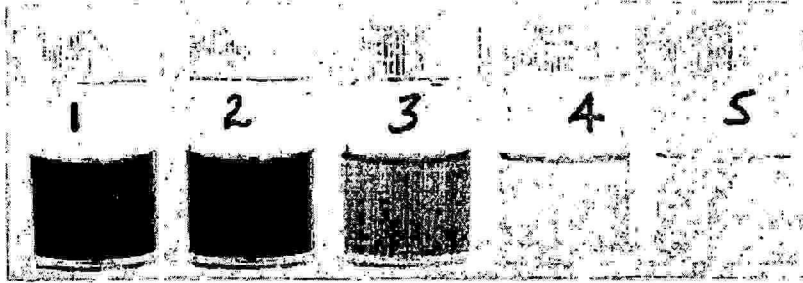


Fig. 11

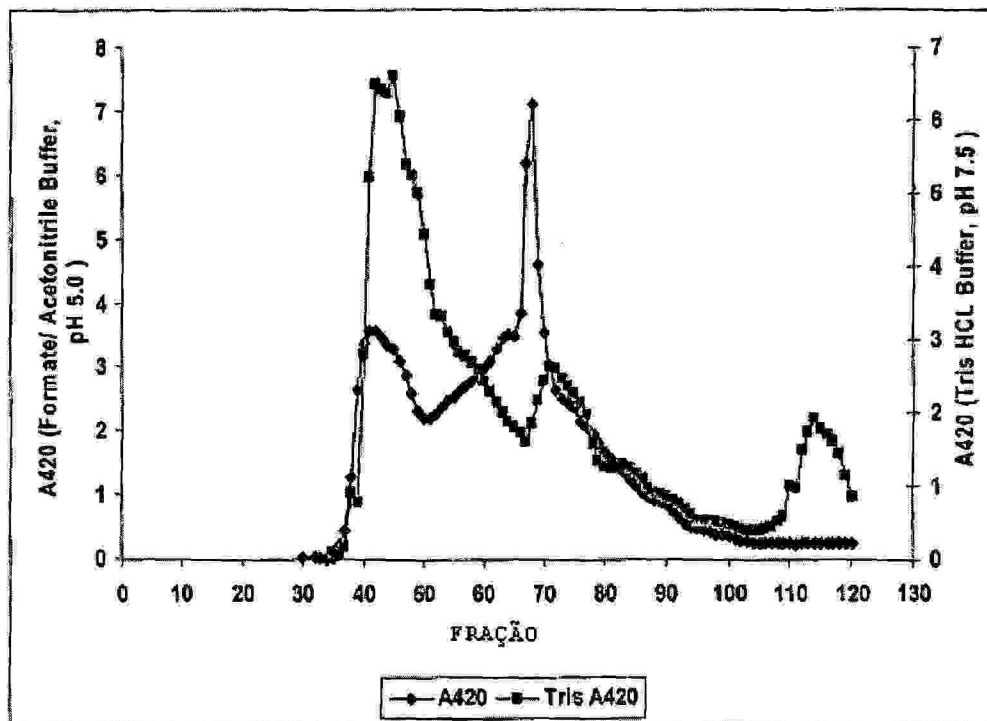


Fig. 12

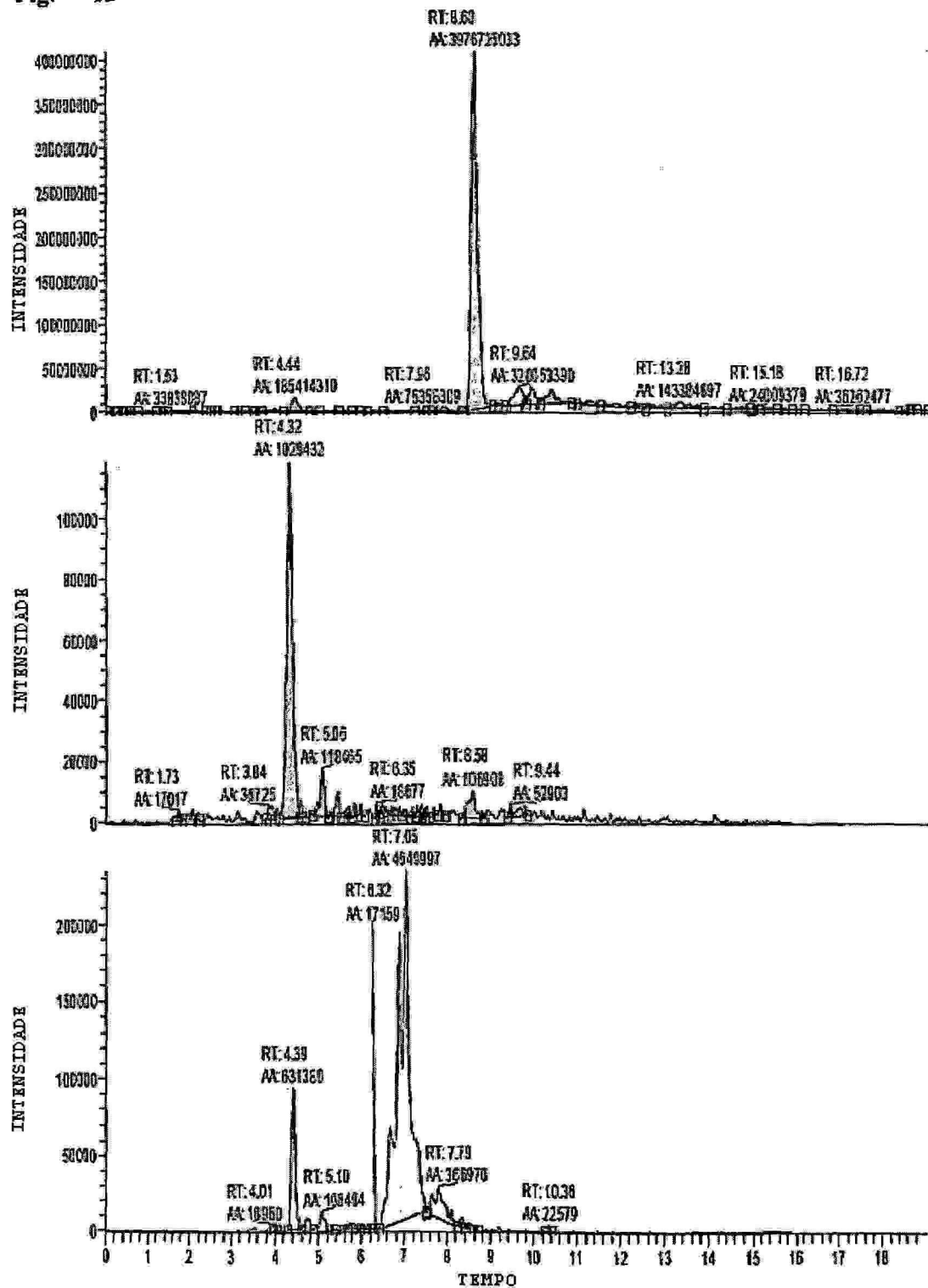


Fig. 13

FRAÇÃO (AMOSTRA) / QUANTIDADE NA AMOSTRA (MG/KG) <sup>A</sup>						
COMPOSTO	XAD (ÁCIDO)	XAD (BÁSICO)	MFP (ÁCIDO) <sup>B</sup>	MFP (BÁSICO)	AÇÚCAR (ÁCIDO) <sup>B</sup>	AÇÚCAR (BÁSICO)
ÁCIDO CAFEICO	168.8	207.4	12.0	9.6	0.6	NÃO DETECTADO
ÁCIDO CLOROGENICO	368.2	123.1	26.3	2.5	0.7	NÃO DETECTADO
ÁCIDO P-COUMÁRICO	1170.9	1253.8	30.9	22.8	2.2	0.2
ÁCIDO FERÚLICO	738.8	724.1	34.7	30.8	0.5	NÃO DETECTADO
ÁCIDO GÁLICO	NÃO DETECTADO	NÃO DETECTADO	4.6	0.8	0.1	NÃO DETECTADO
ÁCIDO SIRÍNGICO	433.5	472.6	85.5	52.3	0.6	NÃO DETECTADO
ÁCIDO VANÍLICO	2.13	NÃO DETECTADO	2.7	NÃO DETECTADO	TRAÇO <sup>C</sup>	NÃO DETECTADO
APIGENINA	34.8	NÃO DETECTADO	1.7	NÃO DETECTADO	0.12	NÃO DETECTADO
(+)-CATEQUINA	NÃO DETECTADO	175.2	1.0	7.0	0.22	NÃO DETECTADO
GALATO DE (-)-CATEQUINA	NÃO DETECTADO	NÃO DETECTADO	5.9	NÃO DETECTADO	0.40	NÃO DETECTADO
DIOSMINA	303.6	114.3	2.3	4.1	TRAÇO <sup>C</sup>	NÃO DETECTADO
(-)-EPICATEQUINA	168.8	207.4	7.8	6.7	0.4	NÃO DETECTADO
CAEMPEROL	NÃO DETECTADO	NÃO DETECTADO	0.3	NÃO DETECTADO	TRAÇO <sup>C</sup>	NÃO DETECTADO
LUTEOLINA	18.6	41.3	0.7	NÃO DETECTADO	TRAÇO <sup>C</sup>	NÃO DETECTADO
QUERCETINA	91.3	137.1	4.7	2.6	TRAÇO <sup>C</sup>	NÃO DETECTADO
RUTINA	59.3	59.3	1.8	1.7	TRAÇO <sup>C</sup>	NÃO DETECTADO
Total	3663.8	3515.7	222.8	140.9	6.0	0.2

Figura 14

	MFP-ácido	MFP-base	XAD-ácido	XAD-base
	Detectado na amostra			
Apigenina	sim	sim	sim	sim
Galato de (-) - catequina	sim	sim	não	não
Ácido clorogênico	sim	sim	sim	sim
Ácido cafeico	sim	sim	sim	sim
Diosmina	sim	sim	sim	sim
Tricina <sup>a</sup>	não analisada	não analisada	sim	não analisada
Luteolina	sim	sim	sim	não
Quercetina	não analisada	não analisada	sim	não analisada
Rutina	sim	sim	não analisada	não analisada
Ácido siríngico	não analisado	não analisado	sim	não analisado
Ácido vanílico	sim	não	sim	não

Fig. 15

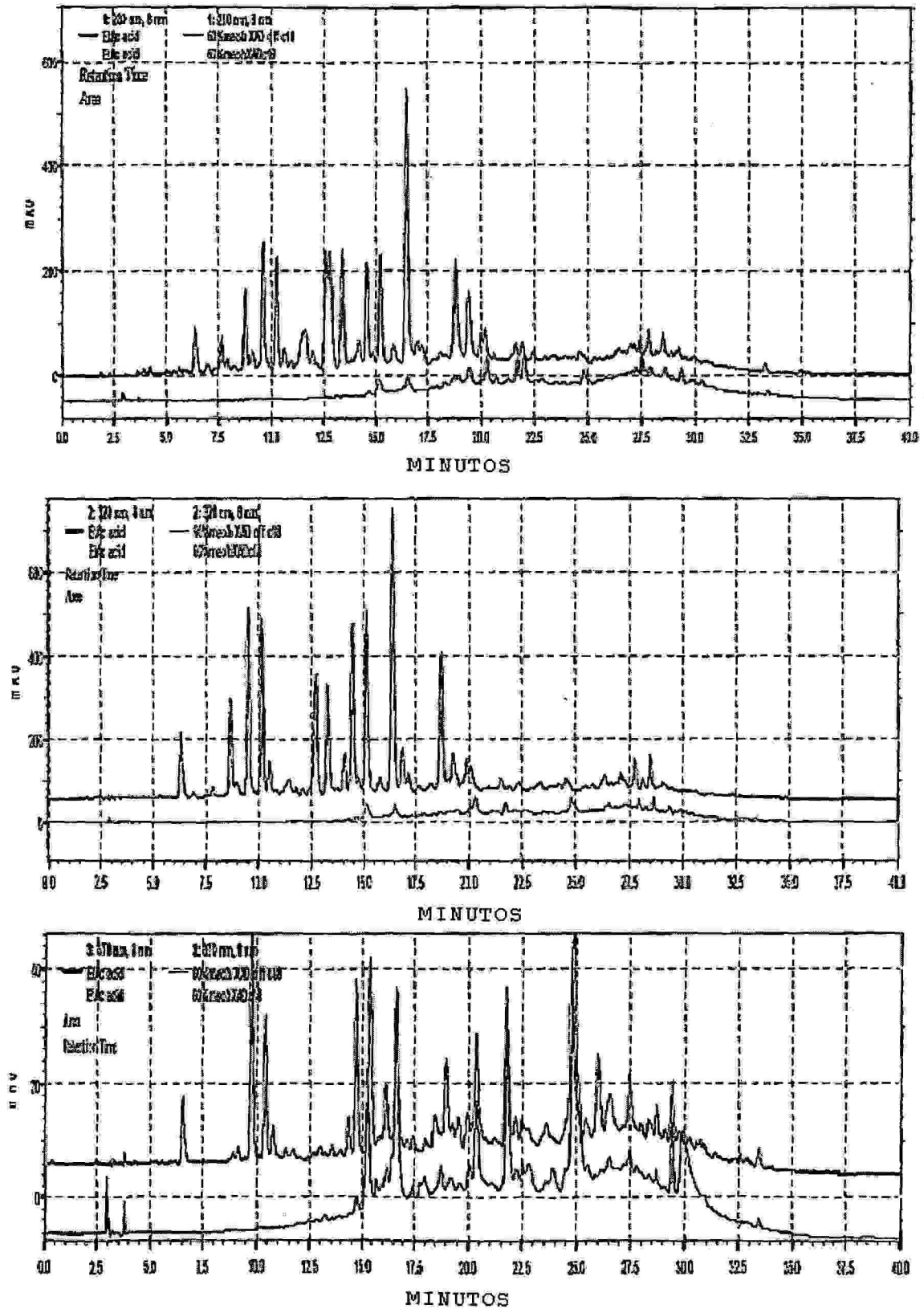
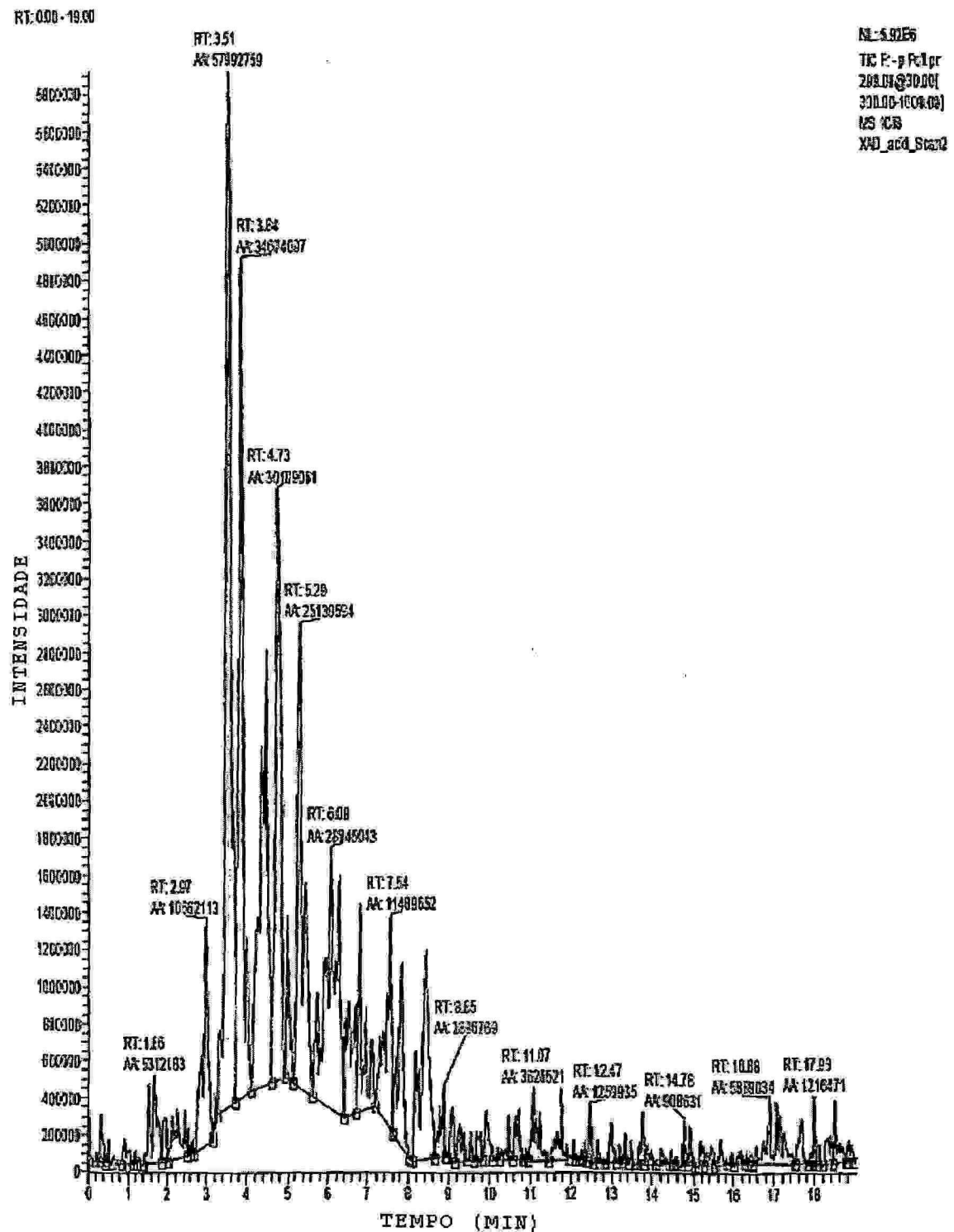


Figure 16



Componente	Fluxo de processo								
	FEJ	BT	MMF	NH	MMB	ESJ	SYR	MOL	RS
Total de sólidos (g/100 g) (filtrado)	20,0	14,1	10,7	-	0,29	13,0	7,0	7,7	35,1
Total de sólidos (g/100 g) (não filtrado)	20,4	14,4	11,0	31,2	-	13,0	72,3	80,0	100
Densidade (g/ml) (filtrado)	1,079	1,055	1,044	-	1,000	1,054	1,029	1,034	1,152
Frutose (g/100 g DW)*	4,5	3,2	2,0	-	0	1,6	2,2	11,7	BDL
Glicose (g/100 g DW)	4,8	3,8	2,3	-	0	1,7	2,1	9,5	BDL
Sacarose (g/100 g DW)	86	77	76	-	0	89	88	42	99,3
Polissacarídeos (g/100 g DW)	-	0,52	-	4,9	-	-	-	2,9	0,053
Total de fenólicos (mg de equivalentes de catequina/100 g DW)	330	362	402	-	1580	309	391	2500	21,1
Atividade de antioxidante (mg de equivalentes de ácido gálico/100 g DW)	68,1	75,9	142	-	563	104	115	726	6,7
Gordura (g/100 g DW)	-	-	-	3,3	-	-	-	-	-
N total (g/100 g DW)	0,18	0,13	0,14	0,65	0,34	0,11	0,10	0,75	0,01
N não de proteína (g/100 g DW)	-	-	-	0,07	-	-	-	0,70	-
Proteína (g/100 g DW) (TN-NPN) x 6,25	-	-	-	3,63	-	-	-	0,31	-
Análise de FALA:									
Ca (mg/kg) <sup>a</sup>	45,4	148	542	3547	-	238	1490	8102	116
Mg (mg/kg)	204	147	185	626	-	111	569	3348	37,1
Fe (mg/kg)	127	71,2	142	3958	-	2,49	32,3	172	2,83
K (mg/kg)	1061	880	1290	838	-	777	4122	29.320	227
Análise UQ:									
Ca (mg/kg) <sup>b</sup>		144		3167				8411	381
Mg		141		721				3221	32
Na		3,3		26				428	21
K		857		1446				33.679	238
Cr		0,1		3,6				0	2,2
Se		0,3		2,1				3,0	6,4
P04-P		114		1484				676	1,1
S04-S		113		198				3330	23
Cl		723		30				22.716	43
Ácido cis-aconítico (mg/100 g DW)	n/a	47,5	58,3	n/a	30,7	28,6	170	543	4,1
Ácido trans-	n/a	489	481	n/a	640	515	1723	1964	60

FIG.17

Componente	Fluxo de processo								
	FE J	BT	MMF	MM	MMB	ESJ	SYR	MOL	RS
Total de sólidos (g/100 g) (filtrado)	-	13,4	13,7	-	0,40	13,5	6,3	7,1	35,2
Total de sólidos (g/100 g) (não filtrado)	-	13,8	13,7	23,2	-	13,5	64,5	73,3	100
Densidade (g/ml) (filtrado)	-	1,053	1,054	-	1,000	1,053	1,024	1,029	1,151
Frutose (g/100 g DW) <sup>a</sup>	-	4,0	1,4	-	0	1,5	2,0	12,8	EDL
Glicose (g/100 g DW)	-	4,1	1,3	-	0	1,6	1,7	9,2	EDL
Sacarose (g/100 g DW)	-	81	91	-	0	89	87	52	98,8
Polissacarídeos (g/100 g DW)	-	0,44	-	6,1	-	-	-	2,4	0,041
Total de fenólicos (mg de equivalentes de catequina/100 g DW)	-	349	317	-	1593	296	305	2054	19,9
Atividade de antioxidante (mg de equivalentes de ácido gálico/100 g DW)	-	78,0	118	-	514	104	105	650	6,4
Gordura (g/100 g DW)	-	-	-	6,2	-	-	-	-	-
N total (g/100 g DW)	-	0,24	0,18	1,37	0,75	0,16	0,14	0,68	0,01
N não de proteína (g/100 g DW)	-	-	-	0,12	-	-	-	0,67	-
Proteína (g/100 g DW) (TN-NPN) x 6,25	-	-	-	7,81	-	-	-	0,06	-
Análise de FALA:									
Ca (mg/kg) <sup>d</sup>	-	189	332	6009	-	246	2287	6300	106
Mg (mg/kg)	-	141	134	847	-	102	918	2580	32,0
Fe (mg/kg)	-	71,3	16,1	1734	-	1,73	10,2	154	3,55
K (mg/kg)	-	807	989	621	-	966	9558	23.870	178
Análise UQ:									
Ca (mg/kg) <sup>e</sup>		173		5819				6652	94
Mg		128		820				2495	31
Na		3,5		3,9				265	6,7

FIG. 18



Componente	Número de amostra						
	1	2	3	4	5	6	7
Total de sólidos (g/100 g) (filtrado)	14,1	13,4	14,1	13,9	16,7	15,1	17,1
Total de sólidos (g/100 g) (não filtrado)	14,4	13,8	14,6	14,3	16,8	15,4	17,2
Densidade (g/ml) (filtrado)	1,055	1,053	1,055	1,054	1,066	1,059	1,067
Frutose (g/100 g DW)	4,5	4,0	3,7	3,7	2,7	2,2	2,0
Glicose (g/100 g DW)	4,8	4,1	4,2	3,9	2,2	2,3	2,2
Sacarose (g/100 g DW)	86	81	81,5	81,0	84,8	82,5	89,7
Polissacarídeos (g/100 g DW)	0,52	0,44	0,48	0,46	0,52	0,47	0,35
Total de fenólicos (mg eq. catequina/100 g DW)	362	349	427	382	414	384	274
Atividade antioxidante (mg eq. ácido gálico/100 g DW)	76	78	110	85	100	101	72
N total (g/100 g DW)	0,13	0,24	-	-	-	-	-
Ácido cis-aconítico (mg/100 g DW)	47,5	39,6	42,8	51	30,7	32	36,2
Ácido trans-aconítico (mg/100 g DW)	489	414	294	439	351	374	410

FIG. 19

Componente	Amostra n°						
	1	2	3	4	5	6	7
Total de sólidos (g/100 g)	31,2	23,2	27,0	25,0	24,2	25,7	26,6
Polissacarídeos (g/100 g DW)	4,9	6,1	5,9	8,2	9,5	10,8	10,6
Total de lipídios (g/100 g DW)	3,3	6,2	4,6	5,6	7,4	6,7	7,0

FIG. 20

Componente	Amostra n°						
	1	2	3	4	5	6	7
Total de sólidos (g/100 g) (filtrado)	10,7	13,7	13,6	12,4	13,9	14,5	13,0
Total de sólidos (g/100 g) (não filtrado)	11,0	13,7	13,7	12,4	13,8	14,5	13,1
Densidade (g/ml) (filtrado)	1,044	1,054	1,054	1,049	1,054	1,057	1,051
Frutose (g/100 g DW)	2,0	1,4	1,4	1,6	1,9	1,7	2,0
Glicose (g/100 g DW)	2,3	1,3	1,5	1,8	1,8	1,8	2,2
Sacarose (g/100 g DW)	76,0	91,0	91,1	91,0	89,9	86,2	84,4
Polissacarídeos (g/100 g DW)	-	-	-	-	-	-	-
Total de fenólicos (mg eq. catequina/100 g DW)	402	317	338	327	326	343	329
Atividade antioxidante (mg eq ácido gálico/100 g)	142	118	126	131	118	155	135

DW)							
N total (g/100 g DW)	0,14	0,18	0,16	0,16	0,14	0,14	0,13
Ácido <i>cis</i> -aconítico (mg/100 g DW)	58,3	37,2	34	36,5	38,5	39,2	47,9
Ácido <i>trans</i> -aconítico (mg/100 g DW)	481	494	480	459	466	458	522

FIG. 21

Componente	Amostra n°						
	1	2	3	4	5	6	7
Total de sólidos (g/100 g) (filtrado)	0,3	0,4	0,5	0,4	0,4	0,7	0,9
Total de sólidos (g/100 g) (não filtrado)	-	-	-	-	-	-	-
Densidade (g/ml) (filtrado)	1,000	1,000	1,001	1,000	1,000	1,002	1,003
Frutose (g/100 g DW)	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
Glicose (g/100 g DW)	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
Sacarose (g/100 g DW)	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
Polissacarídeos (g/100 g DW)	-	-	-	-	-	-	-
Total de fenólicos (mg eq. catequina/100 g DW)	1580	1593	1423	1495	1521	1266	1356
Atividade antioxidante (mg eq ácido gálico/100 g	563	514	353	502	616	315	334

DW)							
N total (g/100 g DW)	0,34	0,75	0,77	0,45	1,03	0,42	0,33
Ácido <i>cis</i> -aconítico (mg/100 g DW)	30,7	50	151	51,6	177	147	340
Ácido <i>trans</i> -aconítico (mg/100 g DW)	640	47	765	409	2450	760	1730

FIG. 22

5

10

15

20

Componente	Amostra n°						
	1	2	3	4	5	6	7
Total de sólidos (g/100 g) (filtrado)	7,7	7,1	7,5	7,9	7,8	7,8	7,7
Total de sólidos (g/100 g) (não filtrado)	80,0	73,3	77,8	81,7	80,2	80,6	80,7
Densidade (g/ml) (filtrado)	1,034	1,029	1,031	1,033	1,032	1,032	1,032
Frutose (g/100 g DW)	11,7	12,8	8,9	9,5	13,2	10,8	11,6
Glicose (g/100 g DW)	9,5	9,2	7,5	7,7	9,2	9,3	10,3
Sacarose (g/100 g DW)	42,0	52,0	46,6	45,3	38,2	37,0	38,7
Polissacarídeos (g/100 g DW)	2,9	2,4	2,8	3,0	2,9	3,0	3,1
Total de fenólicos (mg eq. catequina/100 g DW)	2500	2054	2351	2503	2733	2713	2700
Atividade antioxidante (mg eq ácido gálico/100 g DW)	726	650	804	864	869	899	873
N total (g/100 g DW)	0,75	0,68	-	-	-	-	-
Ácido cis-aconítico (mg/100 g DW)	543	500	597	570	597	589	578
Ácido trans-aconítico (mg/100 g DW)	1964	1688	1920	2020	1960	2210	2120

FIG. 23

Componente	Amostra n°						
	1	2	3	4	5	6	7
Total de sólidos (g/100 g) (filtrado)	35,1	35,2	35,0	35,1	34,9	35,0	35,0
Total de sólidos (g/100 g) (não filtrado)	100	100	99,9	99,9	99,5	99,6	99,5
Densidade (g/ml) (filtrado)	1,152	1,151	1,151	1,151	1,151	1,151	1,151
Frutose (g/100 g DW)	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL
Glicose (g/100 g DW)	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL	BDL
Sacarose (g/100 g DW)	99,3	98,8	99,5	99,4	98,8	99,3	98,9
Polissacarídeos (g/100 g DW)	0,053	0,041	0,068	0,044	0,080	0,063	0,091
Total de fenólicos (mg eq. catequina/100 g DW)	21,1	19,9	22,6	24,8	61,1	43,0	60,0
Atividade antioxidante (mg eq ácido gálico/100 g DW)	6,7	6,4	8,3	8,7	21,6	15,5	21,3
N total (g/100 g DW)	0,01	0,01	-	-	-	-	-
Ácido cis-aconítico (mg/100 g DW)	4,1	3,7	4,5	4,1	8,6	7,1	8,3
Ácido trans-aconítico (mg/100 g DW)	60	62,1	74	60	177	111	156

FIG. 24

Componente	Fracionamento de componente em diferentes tamanhos de poro (%)									
	1000 Da		5000 Da		10.000 Da		30.000 Da		50.000 Da	
	Perm.	Ret.	Perm.	Ret.	Perm.	Ret.	Perm.	Ret.	Perm.	Ret.
Polifenóis	63	41	81	24	72	27	72	20	73	23
Antioxidantes	67	39	76	24	69	30	73	30	72	24
Açúcares	89	1,1	92	0,55	87	0,59	93	-	100	-
Ácidos orgânicos	81	1,1	89	0,5	91	0,7	77	0,4	93	0,6
Total de sólidos	95	7,6	98	5,0	96	5,9	99	6,0	99	4,9

FIG. 25

5

10

15

20

Componente	Amostra n°								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Total de sólidos (g/100 g)	1,1	1,5	1,4	N/T	0,9	0,8	0,5	0,8	1,2
Brix	1,1	1,4	1,4	N/T	1,0	0,8	0,5	0,8	1,2
Densidade (g/ml)	1,002	1,003	1,003	N/T	1,002	1,001	1,000	1,001	1,003
Coloração (A <sub>420</sub> )	0,5	0,8	0,5	N/T	0,4	0,5	0,4	0,5	0,7
Frutose (g/100 g DW)	0,7	1,0	1,4	N/T	BDL	BDL	BDL	1,1	1,3
Glicose (g/100 g DW)	1,6	1,5	1,3	N/T	BDL	BDL	BDL	1,0	1,2
Sacarose (g/100 g DW)	85,1	80,6	71,0	N/T	88,5	69,3	75,3	71,7	74,7
Total de fenólicos (mg eq. catequina/100 g DW)	729	629	752	N/T	712	855	985	1093	687
Atividade antioxidante (mg eq. ácido gálico/10 g DW)	297	318	327	N/T	340	427	403	452	304

FIG. 26