



**UNIVERSIDADE FEDERAL
DE SANTA CATARINA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E DE ALIMENTOS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

Édipo da Silva Almeida

Conexão nanobiotecnologia e ciência dos alimentos: biossíntese de nanopartículas de prata por extratos crioconcentrados de fluidos alimentares de origem vegetal

Florianópolis, SC

2022

Édipo da Silva Almeida

Conexão nanobiotecnologia e ciência dos alimentos: biossíntese de nanopartículas de prata por extratos crioconcentrados de fluidos alimentares de origem vegetal

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Kátia Rezzadori

Coorientador: Prof.^a Dr.^a Débora de Oliveira

Florianópolis, SC

2022

Ficha de identificação da obra

A ficha de identificação é elaborada pelo próprio autor.

Orientações em:

<http://portalbu.ufsc.br/ficha>

Édipo da Silva Almeida

Conexão nanobiotecnologia e ciência dos alimentos: biossíntese de nanopartículas de prata por extratos crioconcentrados de fluidos alimentares de origem vegetal

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Engenheiro de Alimentos” e aprovado em sua forma final pelo Curso de Engenharia de Alimentos

Florianópolis, SC, 22 de Março de 2022.

Prof. Dr. João Borges Laurindo

Coordenador de Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Kátia Rezzadori

Orientadora

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Centro de Ciência e Tecnologia dos Alimentos (CTA/UFSC)

Prof. Dr. Acácio Zielinski

Avaliador

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Departamento de Engenharia Química e de Alimentos (EQA/UFSC)

Me. Marcelo de Souza dos Santos

Avaliador

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Departamento de Engenharia Química e de Alimentos (EQA/UFSC)

“Reinvente-se, pois todos somos imperfeitos. O poeta e o tosco, o louco e o equilibrado, o altruísta e o individualista, o tolerante e o impaciente coexistem na mesma mente, habitam a minha e a sua personalidade.”

Augusto Cury

Dedico esse trabalho aos meus pais, Dona Maria Betânia e meu velho Sr. Ruy José, dos quais a duras penas custei a convencê-los de que o incurso em uma segunda graduação seria uma boa ideia. Será que foi? Confesso que até aqui ainda não arquitetei uma resposta categórica, mas quando perante olhares circunspectos dos meus pais pude ouvir destes um: “...a gente vai tá contigo!” Senti que esse era o combustível que precisava pra seguir nessa empreitada maluca.

Obrigado por confiarem nesse filho desajuizado, compassivo e perseverante.

AGRADECIMENTOS

As vezes quando o assunto vem à tona, vira e mexe encontro pessoas que acham estranho eu dizer que a fé comporta muitas dúvidas. Diante de minhas limitações, não me abstenho dos temas polêmicos de Deus: Porque ele se esconde? O que ele reserva pra mim? É imerso nesse oceano de incertezas que cheguei a uma conclusão. Ao comprometer-me sinceramente a tais dúvidas que descobri que não possuo fé suficiente para não crer Nele, embora minha natureza as vezes me guie por um caminho oposto. Meio contraproducente não?! Graças a Deus, foi ele quem me deu esse privilégio do livre arbítrio de questionar, de tentar achar uma lógica sobre seus planos. E é nesse misterioso mar de dúvidas que alguma lógica pode ser encontrada. Eu só cheguei até aqui graças a Ele. Ele é a lógica pela qual perduro, e é a Ele que primeiramente agradeço.

Aos meus pais pela incansável paciência ante esse filho que teima em não seguir a cartilha da conduta pela qual, por eles fui educado.

- Dona Betânia, meu velho pai, Sr. Ruy José, obrigado por terem até aqui, me permitido ser só aquilo que consigo ser nesse momento. Obrigado por me acolherem do jeito que eu sou. Obrigado por amarem a minha realidade, e não minha expectativa. Obrigado pelo amor traduzido, mesmo à distância, em olhares mansos, afáveis e carinhosos. Amo vocês por me olharem devagar, num mundo onde tanta gente nos olham depressa demais.

- Amo vocês!

- Seu filho tá se formando novamente!

Aos amigos, que fiz, às parcerias que firmei. A esse amor de amizade, que contempla tão poucos, mais que é abarrotado de estima e afeto. Foram vocês que me aceitaram expressar esse sentimento, da maneira menos natural, orgânica e instintiva. Não cabe a mim verbalizar nomes, pois se algum dia vocês lerem esse texto, saberão que sempre amei vocês.

A minha orientadora desse Trabalho de Conclusão de Curso, Professora Kátia Rezzadori que sem delongas me aceitou de cara. Aos meus orientadores da pós-graduação, Professora

Débora de Oliveira, com seu “*jeitão bizarro, porém fabulosa*”, e ao Prof. Dachamir Hotza, das quais os elogios não cabem nessa página, afinal é mais prudente adotar o “*menos é mais*” nesse momento. Direta e indiretamente, foi devido a paciência e confiança de vocês que estou conseguindo mais essa conquista. Professores, muito obrigado!

Aos laboratórios que me permitiram executar esse trabalho, em especial, o Laboratório de Transferência de Massa (LABMASSA/EQA/UFSC) e o Laboratório de Separação por Membranas (LABSEM/EQA/UFSC).

A UFSC e em especial, o Departamento de Engenharia de Engenharia de Alimentos, graduação e pós-graduação. Vocês não imaginam o tamanho da minha gratidão. Embarcar na Engenharia de Alimentos virou minha vida de ponta-cabeça! Vocês me reinventaram! Muitíssimo obrigado!

À cidade de Florianópolis que me proporcionou um misto de tantas alegrias e tristezas que passei a amá-la e considerá-la minha nova casa longe da minha cultura e raízes. Guardarei com carinho, cada esquina, cada casa e cada aventura que vivi nesta cidade.

A todos os demais amigos, parceiros e colegas que de alguma maneira contribuíram nesta minha conquista; do meu orientador ao porteiro do laboratório, meus sinceros agradecimentos de coração.

A todos vocês, muito obrigado!

RESUMO

A *Morinda citrifolia*, amplamente conhecida como “noni”, fornece frutos dos quais é matéria-prima não só para o preparo de alimentos, como bebidas, mas também é utilizada, por exemplo, no preparo de cosméticos. No entanto, o processamento do fruto resulta na geração de resíduos, em que as folhas representam a maioria. Levando-se em consideração que as folhas de noni são comprovadamente detentoras de alta quantidade de compostos bioativos com propriedades fitoterápicas, este estudo propõe a aplicação de duas técnicas de concentração por congelamento em bloco multiestágio realizada pelo método de degelo passivo, conhecido como crioconcentração, via método gravitacional e via método assistido por micro-ondas para promover uma maior rapidez e eficiência no processo de concentração dos componentes bioativos presentes nas folhas de *Morinda citrifolia* L. A execução de ambos os processos de crioconcentração resultaram em extratos concentrados que posteriormente foram utilizados como meio de reação para síntese de nanopartículas de prata. O efeito das etapas de crioconcentração sobre as características físicas e químicas das frações concentradas resultou em maior presença de teor de fenólicos e sólidos totais, acarretando também em um percentual de eficiência na retenção de fenólicos e sólidos acima de 90%, e extratos até 7 vezes mais concentrados que suas respectivas porções iniciais. A aplicação dos extratos concentrados na biossíntese de nanopartículas de prata resultou em um material polidisperso, estável e com tamanho variando entre 23 e 41 nm. Concluímos que a utilização de ambos os sistemas de crioconcentração permitiu a obtenção de frações concentradas com promissor valor biológico e nutricional; indicando que a técnica também pode contribuir como referência no uso de uma tecnologia sustentável na geração de nanometais com propriedades aprimoradas.

Palavras-chave: *Morinda citrifolia*. Resíduos alimentares. Compostos bioativos. Crioconcentração. Nanopartículas de prata.

ABSTRACT

Morinda citrifolia, widely known as “noni”, provides fruit which is a raw material not only for the preparation of food, such as beverages, but is also used, for example, in the preparation of cosmetics. However, the processing of the fruit results in the generation of waste, in which the leaves represent the majority. Taking into account that noni leaves are proven to contain a high amount of bioactive compounds with phytotherapeutic properties, this study proposes the application of two concentration techniques by freezing in a multistage block performed by the passive thaw method, known as cryoconcentration, via gravitational method and via microwave-assisted method to promote greater speed and efficiency in the concentration process of the bioactive components present in the leaves of *Morinda citrifolia* L. The execution of both cryoconcentration processes resulted in concentrated extracts that were later used as a medium reaction method for the synthesis of silver nanoparticles. The effect of the cryoconcentration steps on the physical and chemical characteristics of the concentrated fractions resulted in a greater presence of phenolic content and total solids, also resulting in a percentage of efficiency in the retention of phenolics and solids above 90%, and extracts up to 7 times more concentrated than their respective initial portions. The application of concentrated extracts in the biosynthesis of silver nanoparticles resulted in a polydisperse, stable material with a size varying between 23 and 41 nm. We conclude that the use of both cryoconcentration systems allowed obtaining concentrated fractions with promising biological and nutritional value; indicating that the technique can also contribute as a reference in the use of a sustainable technology in the generation of nanometals with improved properties.

Keywords: *Morinda citrifolia*. Food waste. Bioactive compounds. cryoconcentration. Silver nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração esquemática básica de um processo de crioconcentração em blocos. ...	28
Figura 2 - Comparações de tamanho onde objetos variam em tamanho de 1 metro a 1 picometro. A nanotecnologia é aplicada na manipulação de estruturas entre 1 e 100 nm.....	29
Figura 3 - Representação esquemática do mecanismo de biorredução e formação das AGNPs de extratos de <i>Capsicum annum</i>	32
Figura 4 - Fluxograma geral das etapas experimentais de congelamento e degelo que será usado em ambos os métodos de crioconcentração.	36
Figura 5 - Resumo esquemático do aparato instrumental utilizado (a) no processo de crioconcentração em blocos gravitacional e (b) micro-ondas assistido.	38
Figura 6 - Teor de sólidos totais (mg.L^{-1}) calculados para ambos os métodos de crioconcentração: (a) em blocos gravitacional e (b) assistido por micro-ondas.	44
Figura 7 - Teor de sólidos totais (mg GAE.mL^{-1}) calculados para ambos os métodos de crioconcentração: (a) em blocos gravitacional e (b) assistido por micro-ondas.	46
Figura 8 - Eficiência (%) dos processos de retenção de sólidos totais e fenólicos totais para ambos os métodos de crioconcentração empregados.....	47
Figura 9 - Fator de concentração dos processos de retenção de sólidos totais e fenólicos totais para ambos os métodos de crioconcentração empregados.	48
Figura 10 - Extratos de <i>M. citrifolia</i> antes e após ambos os processos de crioconcentração, representados pelas amostras <i>in natura</i> e CC4.....	50
Figura 11 – Aparência em diferentes períodos de tempo da solução coloidal contendo as AgNPs do extrato referente ao último estágio de crioconcentração em blocos gravitacional (CC4-CCG) das folhas de <i>M. citrifolia</i>	51
Figura 12 - Aparência da solução coloidal contendo as AgNPs no início e após 24 horas de reação, do extrato referente ao último estágio de crioconcentração assistida por micro-ondas (CC4-CCM) das folhas de <i>M. citrifolia</i>	52

Figura 13 - Distribuição de tamanho de partícula realizado via ensaio DLS para as AgNPs do extrato <i>in natura</i> das folhas de <i>M. citrifolia</i>	53
Figura 14 - Distribuição de tamanho de partícula realizado via ensaio DLS para as AgNPs do extrato referente ao último estágio de crioconcentração em blocos gravitacional (CC4-CCG) das folhas de <i>M. citrifolia</i>	54
Figura 15 - Distribuição de tamanho de partícula realizado via ensaio DLS para as AgNPs do extrato referente ao último estágio de crioconcentração assistido por micro-ondas (CC4-CCM) das folhas de <i>M. citrifolia</i>	54
Figura 14 - Micrografia em MEV-EDS das AgNPs referentes ao extrato <i>in natura</i> das folhas de <i>M. citrifolia</i>	56
Figura 15 - Micrografia em MEV-EDS das AgNPs referentes ao extrato CC4-CCG das folhas de <i>M. citrifolia</i>	57
Figura 16 - Micrografia em MEV-EDS das AgNPs referentes ao extrato CC4-CCM das folhas de <i>M. citrifolia</i>	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo dos principais componentes bioquímicos presentes em folhas de noni. ...	22
Tabela 2 - Resumo de alguns estudos envolvendo a biossíntese de	33
Tabela 3 – Resumo dos resultados analíticos referentes ao processo de CCG dos extratos de folhas de <i>M. citrifolia</i>	60
Tabela 4 - Resumo dos resultados analíticos referentes ao processo de CCM dos extratos de folhas de <i>M. citrifolia</i>	61
Tabela 5 - Resumo dos resultados analíticos referentes às análises de fator de concentração e eficiência em ambos os processos de crioconcentração dos extratos de folhas de <i>M. citrifolia</i>	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNPs: Nanopartículas de prata;

CC1, CC2, CC3 e CC4: Crioconcentrado 1, Crioconcentrado 2, Crioconcentrado 3, e Crioconcentrado 4;

CCG: Crioconcentração em blocos gravitacional;

CCM: Crioconcentração assistida por micro-ondas;

C_f : Fator de concentração;

DLS: Espalhamento de luz dinâmico;

EDS: Espectroscopia por energia dispersiva;

FT: Teor de fenólicos totais;

MEV: Microscopia eletrônica por varredura;

η : Eficiência percentual de crioconcentração ;

ST: Teor de sólidos totais;

PZ: Potencial zeta.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3. REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1 O QUE É NONI?	20
3.2 CONCENTRAÇÃO DE FLUIDOS ALIMENTARES.....	26
3.3 NANOTECNOLOGIA E NANOBIOLOGIA	28
3.3.1 Biossíntese de nanometais por plantas	30
3.3.2 <i>Morinda citrifolia</i> como matéria-prima na biossíntese de nanometais	32
4. METODOLOGIA EMPREGADA	35
4.1 COLETA E TRATAMENTO DA MATÉRIA-PRIMA	35
4.2 ENSAIOS DE CRIOCONCENTRAÇÃO.....	36
4.2.1 Crioconcentração em Blocos Gravitacional (CCG)	36
4.2.2 Crioconcentração assistida por micro-ondas (CCM)	37
4.3 BIOSSÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA	38
4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS OBTIDAS	39
4.4.1 Caracterização das amostras crioconcentradas	39
4.4.1.1 <i>Determinação do teor de fenólicos totais (FT) e sólidos totais (ST)</i>	39
4.4.1.2 <i>Fator de concentração (C_f) e eficiência do processo</i>	40
4.4.2 Caracterização das nanopartículas de prata	41
4.4.2.1 <i>Determinação de tamanho e estabilidade das nanopartículas</i>	41

4.4.2.2 <i>Ensaio em Microscopia Eletrônica de Varredura acoplado em Espectrômetro de Dispersão de Energia (MEV-EDS)</i>	41
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 TEOR DE SÓLIDOS E FENÓLICOS TOTAIS DOS CRIOCONCENTRADOS	43
5.2 BIOSÍNTESE DAS AGNPS POR EXTRATOS CRIOCONCENTRADOS DE <i>MORINDA CITRIFOLIA</i>	50
5.2.1 Efetividade da biossíntese e análise do tamanho e estabilidade das nanopartículas	50
5.2.2 Análise das AgNPs por MEV-EDS	56
6. CONCLUSÕES	63
7. REFERÊNCIAS	64

1. INTRODUÇÃO

A nanotecnologia, um novo campo emergente e fascinante da ciência, permite pesquisas avançadas em muitas áreas, e recentes descobertas nanotecnológicas podem abrir novas aplicações no campo da biotecnologia e da agricultura. No campo da eletrônica, energia, medicina e ciências da vida. Ademais a nanotecnologia oferece pesquisas em expansão, como ciência e tecnologia reprodutiva, conversão de resíduos agrícolas e alimentares em energia e outros subprodutos úteis por meio de nanobioprocessamento enzimático, sensores químicos, limpeza de água e prevenção de doenças (AL-WHAIBI; FIROZ; AL-KHAISHANY, 2015).

De fato, a busca por novas rotas de biossíntese tem ditado o ritmo de novas pesquisas no campo da biossíntese de nanometais com propriedades funcionais (PAPER et al., 2016). As novas e sustentáveis metodologias sobre a ditada “nanotecnologia verde” foram recentemente desenvolvidas para a síntese de nanopartículas. Novas rotas bioquímicas de precursores naturais têm sido estudados analiticamente para o projeto e síntese de nanopartículas com o tamanho, forma e funcionalidades desejadas (SINGH et al., 2018).

A utilização de micro-organismos (fungos e bactérias), bem como produtos naturais (sucos de frutas, polissacarídeos e extratos vegetais) contendo abundantes átomos de hidrogênio para a biossíntese de nanopartículas, é mais vantajosa quando comparada aos métodos convencionais de síntese em termos de biocompatibilidade, baixa produção, custo e atmosfera química bioreductora natural (LI et al., 2011; EL-SHERBINY; SALIH, 2018). Essas vias sintéticas não usam solventes tóxicos, precursores químicos e agentes redutores adicionais (EL-RAFIE; EL-RAFIE; ZAHRAN, 2013). A síntese verde de nanopartículas metálicas também emprega aminoácidos, fitoquímicos, polissacarídeos, polifenóis e vitaminas como componentes percussores da biotransformação (KUMAR et al., 2014). É notável que há uma necessidade imensa de desenvolver melhores metodologias e abordagens usando nanotecnologia verde para aumentar a adequação da biossíntese de nanometais, uma dessas abordagens é via uso de extratos vegetais, ao que parece, apropriação de novos mecanismos e vias que possibilitem elevar o rendimento da bioprodução por meio do uso de plantas, caracterizasse como uma nova ferramenta na aquisição de um método/tecnologia inovadora.

Atualmente, entende-se que a preferência do consumidor por alimentos é influenciada principalmente pelas informações nutricionais. Frutas e vegetais fornecem não apenas nutrientes essenciais à vida, mas também outros componentes biologicamente ativos para a promoção da saúde e prevenção de doenças, como minerais e outros elementos químicos que promovem, por exemplo, entre outras características, a atividade antioxidante (ESCALANTE-MINAKATA et al., 2013; SAFIEI et al., 2017).

Uma estratégia inovadora envolvendo a possibilidade de aquisição de componentes bioativos, baseia-se no uso de todas as partes das plantas. Neste estudo, nos limitaremos a propor uma alternativa de utilização de uma tecnologia limpa e de baixo custo para promover tal possibilidade, focando apenas em alimentos líquidos. Assim, a concentração de alimentos líquidos é considerada atualmente uma inovação na indústria de alimentos. O objetivo dessa técnica basicamente é remover a água e aumentar o teor de sólidos dos alimentos, prolongando a vida de prateleira e conseqüentemente promovendo estabilidade microbiana (PETZOLD et al., 2018). Outro fator que determina a necessidade de implementação da concentração de alimentos líquidos é a complexidade bioquímica dos sistemas alimentares. Nesse sentido, muitas pesquisas têm sido realizadas no desenvolvimento de tecnologias que preservem os componentes biológicos sensíveis à degradação térmica, como proteínas, lipídios, ácidos orgânicos, vitaminas, fenóis e compostos aromáticos, por exemplo (OSTHOFF; HUGO; WIT, 2006; CORREA; RUIZ; MORENO, 2018).

Valendo-se do fato já exposto de que a biossíntese de nanometais por intermédio do uso de plantas envolve a participação direta de componentes fitoquímicos no mecanismo de bioprodução, e que a concentração de bioativos de líquido alimentares, sobretudo de origem vegetal, abrange o aumento do conteúdo de componentes bioquímicos desses alimentos. Temos em posse a possibilidade de obtenção de uma nova ferramenta dinâmica e inovadora que promova a compilação da técnica de concentração de ativos de líquidos alimentares de origem vegetal, e uso desses ativos na biossíntese de nanometais com propriedades funcionais.

Nesse estudo, faremos uso das folhas de *Morinda citrifolia*, também conhecida como noni, estruturas vegetais de uma planta largamente utilizada não só na indústria de alimentos via utilização de seus frutos, como também na indústria farmacêutica (NELSON, 2003; CHAN-BLANCO et al., 2006). O processamento do fruto do noni

resulta em uma grande geração de resíduos, dos quais as folhas constituem a maior parte dessa perda (NELSON; ELEVITCH, 2006). Além do uso na preparação de chás, as folhas de noni também se caracterizam pelos componentes bioativos com propriedades fitoterápicas como: antraquinonas e compostos cumarínicos (THANI et al., 2010); carotenóides (AALBERSBERG et al., 1993); flavonóides (DENG; WEST; JENSEN, 2010); iridoides (SANG et al., 2001b) e minerais (ALI; KENGANORA; MANJULA, 2016).

Em adição a matéria prima prescrita em nosso estudo, a técnica de crioconcentração será o método/ferramenta para obtenção dos bioativos vegetais para biossíntese das nanopartículas metálicas. Basicamente, a crioconcentração consiste em resfriar suspensões aquosas até a formação de gelo, que é então separado do líquido remanescente, para aumentar o teor de sólidos. Sua principal vantagem é a preservação da qualidade nutricional, sensorial e funcional dos produtos processados devido às baixas temperaturas de operação (AIDER; DE HALLEUX, 2009; CORREA; RUIZ; MORENO, 2018).

Diante do exposto, o desenvolvimento deste estudo avaliar a eficiência do processo de crioconcentração dos compostos bioativos presentes no extrato aquoso de folhas de *Morinda citrifolia*, e a aplicação das frações concentradas na biossíntese de nanopartículas, com ênfase na bioprodução de nanopartículas de prata (AgNPs). Tal investigação fará uso de métodos que incluem tecnologias limpas, de baixo custo e alto rendimento, integrando o aproveitamento de resíduos da indústria alimentícia com alto valor biológico. A originalidade deste estudo está relacionada à comparação de dois processos que objetivam a concentração de componentes bioativos de um extrato líquido de folhas com grande acúmulo de espécies fitoquímicas.

Baseado na premissa exposta por Nagra, Shabbir, *et al.* (2020), onde a biorredução de nanopartículas metálicas por intermédio de plantas ocorre por uma combinação de compostos bioativos presentes em extratos vegetais como enzimas, proteínas, aminoácidos, vitaminas, polissacarídeos, etc. Esperamos que aliar a técnica de crioconcentração à biossíntese de metais resulte na geração de nanopartículas estáveis em um sistema coloidal, com propriedades funcionais melhoradas. De acordo com a literatura prescrita, não há relatos até o momento da utilização dos processos citados anteriormente para a finalidade/objetivo supracitado.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Promover a biossíntese de nanopartículas de prata (AgNPs) por meio da utilização de extratos crioconcentrados de folhas de *Morinda citrifolia*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as técnicas de crioconcentração em blocos gravitacional e crioconcentração assistida por micro-ondas na separação e acúmulo de compostos bioativos do extrato aquoso de folhas de *Morinda citrifolia*;
- Fazer uso das frações concentradas como meio de reação para biorredução posterior síntese de nanopartículas de prata;
- Promover a caracterização das nanopartículas geradas, avaliando o tamanho e estabilidade em solução coloidal.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 O QUE É NONI?

Morinda citrifolia é o nome científico do vegetal, amplamente conhecido pelo nome comercial "Noni". É uma planta perene, frutífera, com tamanho médio que varia de 10 a 20 metros de altura e originária do Sudeste Asiático (NELSON, 2001; SANG et al., 2001a). As plantas de Noni pertencem à família *Rubiaceae* (família do café) e à subfamília *Rubioideae* (LACHENMEIER et al., 2006). O noni também são caracterizadas por apresentarem grandes folhas lanceoladas, seu caule é reto e seus frutos são ovais e carnudos com pele áspera, medindo cerca de 3 a 10 cm de comprimento e 3 a 6 cm de largura (LIN et al., 2014; MOTSHAKERI; GHAZALI, 2015).

Os frutos do Noni apresentam tonalidades que variam entre o verde, o amarelo e o branco, dependendo do estágio de maturação, e podem conter até 260 sementes. A fruta também é conhecida por ter um odor azedo muito desagradável quando já está em estágio avançado de maturação (NELSON, 2005; LIN et al., 2014). Seu nome popular varia de acordo com o local de cultivo, com nomes como amora indiana ou “nuna” na Índia (CHAN-BLANCO et al., 2006), mengkudu na Malásia (CARRILLO-LÓPEZ; YAHIA, 2011) ou fruta de queijo na Austrália (ROSS, 2001). Seu nome mais popular: noni, foi introduzido por imigrantes polinésios ao chegarem ao território onde hoje fica a ilha do Haváí, há cerca de 2.000 anos (WANG et al., 2002).

Diferentes partes da planta, como raiz, caule, frutas e folhas, são tradicionalmente usadas por várias culturas do Leste Asiático para o tratamento terapêutico de inúmeras doenças, como artrite, dores de cabeça, queimaduras e até distúrbios relacionados à tuberculose, diabetes e hipertensão (DIXON; MCMILLEN; ETKIN, 1999; CHAN-BLANCO et al., 2006; ALI; KENGANORA; MANJULA, 2016). Conforme relatado por Solomon (1999), as evidências científicas sobre as propriedades terapêuticas do suco de noni eram bastante limitadas. Atualmente, Dussossoy, Bony, et al. (2014), constataram que o suco de noni possui propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, assim como Motshakeri & Ghazali (2015) afirmaram que o suco de noni é um importante protagonista no próspero mercado de bebidas funcionais.

Análises químicas e nutricionais constataram que *Morinda citrifolia* possui alto valor nutricional (SHALAN; MUSTAPHA; MOHAMED, 2017). São quase 200

compostos fitoquímicos com propriedades bioativas já identificados e isolados de diferentes partes da planta (ALMEIDA; OLIVEIRA; HOTZA, 2019). É importante ressaltar que a composição bioquímica desses compostos difere completamente não só dependendo da estrutura da planta, mas também em relação ao local de origem e época de colheita (CHAN-BLANCO et al., 2006; DENG; WEST; JENSEN, 2010; ASSANGA et al., 2013).

A grande maioria dos compostos bioativos presentes em diferentes regiões da *Morinda citrifolia* têm atividade biológica comprovada. Na verdade, como as folhas de Noni serão nossa matéria-prima para uso neste estudo, a Tabela 1 resume uma lista dos muitos componentes bioquímicos detectados nas folhas de noni – matéria-prima de nosso estudo –, juntamente com suas respectivas propriedades biológicas identificadas.

De acordo Deng, West *et al.* (2010), sabe-se que a comercialização de componentes do noni como alimento fitoterápico e suplemento alimentar possibilitou aumentar sua disponibilidade em todo o mundo. A sua utilização tem trazido benefícios a mais pessoas, abrindo caminho para inúmeros produtos de noni bem como o desenvolvimento e investigação de novas pesquisas nos mais diversos domínios tecnológicos da medicina, farmácia, indústria alimentar, biotecnologia e até no âmbito da ciência dos materiais, tal como descrito nos estudos desenvolvidos por Suman, Radhika Rajasree, *et al.* (2014) e Morales-Lozoya, Espinoza-Gómez, *et al.* (2021) na elaboração de nanoestruturas metálicas a partir de extratos de *Morinda citrifolia*.

Tabela 1 - Resumo dos principais componentes bioquímicos presentes em folhas de noni.

Classificação bioquímica	Composto bioativo	Quantidade	Atividade biológica	Referência
Aminoácidos	Alanina	6% (p/p)	--	(DITTMAR, 1993; ELKINS, 1998)
	Arginina	7% (p/p)	--	(DITTMAR, 1993; ELKINS, 1998)
	Ácido aspártico	10% (p/p)	--	(DITTMAR, 1993; ELKINS, 1998)
	Cisteína	1% (p/p)	--	(DITTMAR, 1993; ELKINS, 1998)
	Ácido glutâmico	1% (p/p)	--	(DITTMAR, 1993; ELKINS, 1998)
	Glicina	6% (p/p)	--	(DITTMAR, 1993; ELKINS, 1998; SINGH; SINGH, 2013)
	Histidina	3% (p/p)	--	(DITTMAR, 1993; ELKINS, 1998)
	Isoleucina	16 (p/p)	--	(DITTMAR, 1993; ELKINS, 1998)
	Lisina	16% (p/p)	--	(DITTMAR, 1993; ELKINS, 1998; SINGH; SINGH, 2013)
	Metionina	3% (p/p)	--	(DITTMAR, 1993; ELKINS, 1998; SINGH; SINGH, 2013)
Fenilalanina	5% (p/p)	--	(DITTMAR, 1993; ELKINS, 1998; SINGH; SINGH, 2013)	
Prolina	5% (p/p)	--	(DITTMAR, 1993; ELKINS, 1998)	

-- Dados não informados pelo autor.

Continua

Tabela 1 - Resumo dos principais componentes bioquímicos presentes em folhas de noni.

Classificação bioquímica	Composto bioativo	Quantidade	Atividade biológica	Referência
Aminoácidos	Serina	5% (p/p)	--	(DITTMAR, 1993; ELKINS, 1998)
	Triptofano	1-3% (p/p)	--	(DITTMAR, 1993; ELKINS, 1998)
	Treonina	5% (p/p)	--	(DITTMAR, 1993; ELKINS, 1998)
	Tirosina	2% (p/p)	--	(DITTMAR, 1993; ELKINS, 1998; SINGH; SINGH, 2013)
	Valina	8% (p/p)	--	(DITTMAR, 1993; ELKINS, 1998)
Antraquinonas	Damnacantal	--	Antitumoral	(THANI et al., 2010)
Carotenóides	β -caroteno	12,4 mg/100g	Antioxidante e antimicrobiano	(AALBERSBERG et al., 1993)
Cumarinas	Escopoletina	--	Anticâncer	(THANI et al., 2010)
Flavonóides	Rutina	7,93 mg/g		(DENG; WEST; JENSEN, 2008)
	Quercetina-3-O- β -D-glucopiranosídeo	--	Anti-inflamatório, antioxidante, anticancer	(SANG et al., 2001a)

-- Dados não informados pelo autor.

Continua

Tabela 1 - Resumo dos principais componentes bioquímicos presentes em folhas de noni.

Classificação bioquímica	Composto bioativo	Quantidade	Atividade biológica	Referência
Flavonóides	Quercetina-3- <i>O</i> - α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosídeo	--	Anti-inflamatória, anticâncer, antioxidante	(SANG et al., 2001a)
	Quercetina-3- <i>O</i> - β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)]- β -D-galactopiranosídeo	--	Anti-inflamatória, anti-câncer, antioxidante e anti-histamínica	(SANG et al., 2001a)
Iridóides	Ácido asperulosídico	--	Imunoestimulante	(SANG et al., 2001a)
	Asperulosida	--	Anti-obesidade	(DENG; WEST; JENSEN, 2008)
	Citrifolinosida A	--	Hipoglicêmico	(SANG et al., 2001a)
Minerais	Cálcio	5,462 mg/g	--	(PETER; PETER, 2018)

-- Dados não informados pelo autor.

Continua

Tabela 1 - Resumo dos principais componentes bioquímicos presentes em folhas de noni.

Classificação bioquímica	Composto bioativo	Quantidade	Atividade biológica	Referência
Minerais	Cobre	0,00233 mg/g	--	(PETER; PETER, 2018)
	Ferro	0,00447 mg/g	--	(PETER; PETER, 2018)
	Magnésio	0,57 mg/g	--	(PETER; PETER, 2018)
	Postássio	1,219 mg/g	--	(PETER; PETER, 2018)
Nucleídeos	Citidina	--	--	(SANG et al., 2002)
Sacarídeos	β -D-glucopiranoose-penta-acetato	--	--	(SU et al., 2005)

Finalização

3.2 CONCENTRAÇÃO DE FLUIDOS ALIMENTARES

Tendo em conta que os líquidos alimentares, tais como sucos de fruta, leite, soro de leite, extratos de chá ou café, são soluções aquosas complexas em que a água constitui a maioria. Sabe-se que a água constitui até 95% da composição desses alimentos (AIDER; DE HALLEUX; AKBACHE, 2007). Com o objetivo de reduzir os custos de armazenamento, preservando a melhor qualidade dessas soluções alimentares, a ideia de concentrar essas soluções para reduzir a atividade de água e, assim, evitar o crescimento microbiano foi validada no processamento industrial (VAN BEEK; BUDDE; VAN ESCH, 2018).

Assim, existem os processos de concentração de soluções alimentares, que basicamente é o processo de retirada de uma determinada parte do teor de água dessas soluções. Independentemente dos avanços recentes na ciência de separação e automação de processos, os métodos de concentração de alimentos líquidos requerem uma seleção cuidadosa e um entendimento completo das transformações bioquímicas envolvidas. Uma seleção incorreta das condições do processo pode causar efeitos nocivos no perfil sensorial e nutricional do produto final e/ou impor altos custos de produção. Uma ampla gama de métodos de concentração de sucos de fruta, principalmente baseados em evaporação térmica, liofilização, filtração/destilação por membrana, osmose direta/reversa ou secagem foram desenvolvidos e são frequentemente praticados (ADNAN; MUSHTAQ; ISLAM, 2018). Em resumo, a concentração desses líquidos alimentares pode ser realizada por três métodos principais: evaporação, osmose reversa e crioconcentração (concentração por congelamento) (AIDER; DE HALLEUX; AKBACHE, 2007).

Uma das técnicas emergentes na concentração de líquidos alimentares é a crioconcentração, trata-se tecnologia amplamente utilizada na indústria alimentícia para concentrar diversos alimentos líquidos e recuperar compostos biológicos sensíveis ao calor, como proteínas, polifenóis, vitaminas hidrossolúveis e aromáticos. A tecnologia de crioconcentração é muito adequada na indústria de alimentos devido à sua capacidade de reter a qualidade nutricional e os compostos aromáticos voláteis do produto. Esta característica é atribuída às baixas temperaturas de operação adequadas para prevenir a degradação de componentes sensíveis de alimentos líquidos (AIDER; DE HALLEUX, 2009).

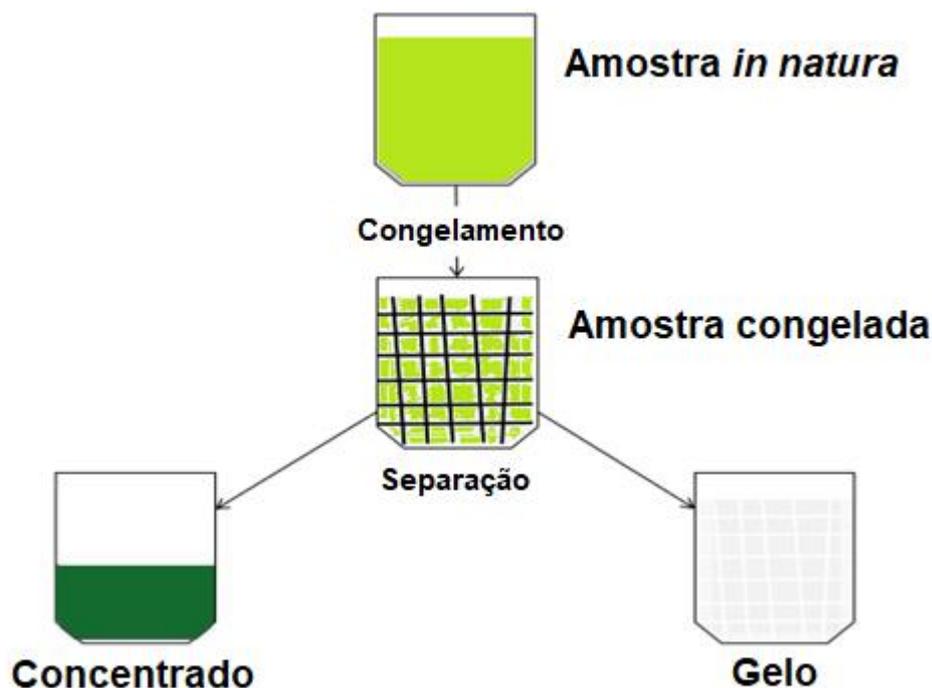
Teoricamente, a crioc Concentração deve ser mais eficaz do que a evaporação para uma determinada remoção de água (calor de fusão latente: 0,33 kJ/g de água; calor de evaporação latente: 2,26 kJ/g de água). Porém, o investimento em concentradores de congelamento convencionais é mais caro do que a compra de evaporadores. Os altos custos operacionais se devem principalmente à perda de concentrado que acompanha a formação dos cristais de gelo e à dificuldade de remoção dos cristais de gelo sem perder os sólidos alimentares. Além disso, o grau de concentração alcançado é inferior ao da evaporação. Portanto, a prioridade da crioc Concentração sobre a evaporação é explicada pela qualidade dos produtos concentrados: a crioc Concentração é reconhecidamente a melhor entre os métodos de concentração, proporcionando maior retenção em sabores e compostos termicamente frágeis (AIDER; DE HALLEUX; MELNIKOVA, 2008; PETZOLD et al., 2015; ORELLANA-PALMA; GONZÁLEZ; PETZOLD, 2019).

Embora o processo industrial de crioc Concentração pareça ser complexo devido à necessidade de um arcabouço estrutural. Outros métodos que priorizam a minimização de equipamentos e facilidade de operação têm ganhado espaço. Algumas técnicas como a cristalização em suspensão e a crioc Concentração eutética são descritas na literatura (AIDER; DE HALLEUX, 2009). No entanto, é fato de que o futuro industrial da crioc Concentração tem sido vinculado a desenvolvimentos na configuração de sistemas de uma etapa (crioc Concentração em blocos) do que sistemas convencionais de concentração por congelamento (cristalização em suspensão), devido à etapa de separação ser mais simples (PETZOLD et al., 2016).

Uma vantagem desses sistemas de uma etapa é sua simplicidade em termos de construção e operação do equipamento. Na crioc Concentração em blocos, por exemplo, todo alimento líquido é congelado (bloco de gelo), depois descongelado e a fração concentrada é separada da fração de gelo por método gravitacional. O processo consiste em três etapas que são congelamento, descongelamento e separação. Nessas condições, o controle do processo de descongelamento é fundamental para atingir uma eficiência próxima a 90% (ORELLANA-PALMA et al., 2017a). Entretanto, para aumentar a eficiência do processo de crioc Concentração em blocos, técnicas assistidas ou as chamadas forças externas, como ultrassom, centrifugação, microondas ou vácuo podem ser acopladas ao processo (AIDER; DE HALLEUX; MELNIKOVA, 2008; PETZOLD;

AGUILERA, 2013; ORELLANA-PALMA et al., 2017b). Uma ilustração esquemática básica do processo de crioconcentração em blocos é mostrada na Figura 1.

Figura 1 - Ilustração esquemática básica de um processo de crioconcentração em blocos.



Fonte: Adaptado de Aider & De Halleux (2009)

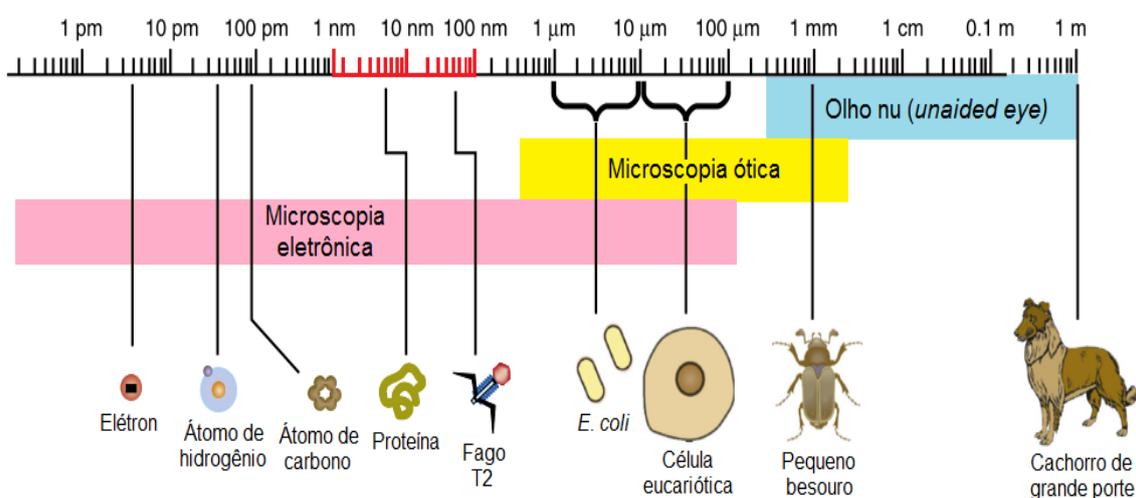
3.3 NANOTECNOLOGIA E NANOBIOTECNOLOGIA

Em 1959, Richard Feynman foi o primeiro cientista a sugerir que dispositivos e materiais poderiam algum dia ser fabricados em escala atômica e a introduzir o conceito de nanotecnologia na comunidade científica. Nesse mesmo ano, em uma conferência no Instituto de Tecnologia da Califórnia intitulada: *There is plenty of room at the bottom* (“Há bastante espaço no fundo”), o físico norte-americano descreveu com maestria a possibilidade de manipular átomos em uma escala jamais explorada e esboçou a ideia de construir objetos *bottom-up* (“de baixo para cima”). Nasce, assim, a nanotecnologia (DE MORAIS et al., 2014). Por definição, nanotecnologia (“nano” em grego significa anão) pode ser definida como a “ciência e a engenharia envolvidas na concepção, síntese, caracterização e aplicação de materiais e dispositivos cuja menor organização funcional em pelo menos uma dimensão está na escala nanométrica”. A nanotecnologia envolve a

manipulação individual de moléculas simples ou mesmo átomos (CLARK; PAZDERNIK, 2016).

Atualmente a nanotecnologia concentra-se principalmente no projeto, síntese e manipulação da estrutura e tamanho das partículas com dimensões menores que 100 nm (JAIN, 2011). A Figura 2 busca ilustrar um comparativo em escada de tamanhos onde a nanotecnologia é abordada. A nanotecnologia combina os princípios com procedimentos físicos e químicos para gerar partículas nanométricas com a função específica. A nanotecnologia está criando agora um sentimento crescente de entusiasmo nas ciências da vida, especialmente nos dispositivos biomédicos e na medicina. Nanopartículas exibem propriedades completamente novas ou melhoradas com base em características específicas, como tamanho, forma e orientação (NAIKOO et al., 2021).

Figura 2 - Comparações de tamanho onde objetos variam em tamanho de 1 metro a 1 picometro. A nanotecnologia é aplicada na manipulação de estruturas entre 1 e 100 nm.



Fonte: Adaptado de Clark & Pazdernik (2016).

Levando-se em consideração que os componentes internos de células biológicas estão na mesma escala como os estudados por nanotecnologia. Desse modo, o principal objetivo prático da nanobiotecnologia está em usar componentes biológicos para realizar tarefas em nanoescala (SINGH et al., 2016).

A síntese biológica de nanopartículas é um método econômico e ecológico e tem capacidade de substituir os métodos físicos e químicos, pois esses métodos são comumente tóxicos e caros. Conseqüentemente, nanomateriais foram sintetizados usando microorganismos e extratos de plantas. O uso de extratos de plantas para síntese de nanopartículas é potencialmente vantajoso em relação aos microrganismos devido à facilidade de escalonar os riscos biológicos e ao processo elaborado de manutenção de culturas de células

Os métodos biológicos podem empregar células de microrganismos ou extratos de plantas para a produção de nanopartículas. A biossíntese de nanopartículas é uma adição recente e empolgante ao grande repertório de métodos de síntese de nanopartículas e, agora, as nanopartículas entraram em um período de exploração comercial. Au, Ag, Zn e Cu produzidas por plantas medicinais têm se mostrado as mais ativas farmacologicamente, possivelmente devido à fixação de vários resíduos farmacologicamente ativos (SARATALE et al., 2018).

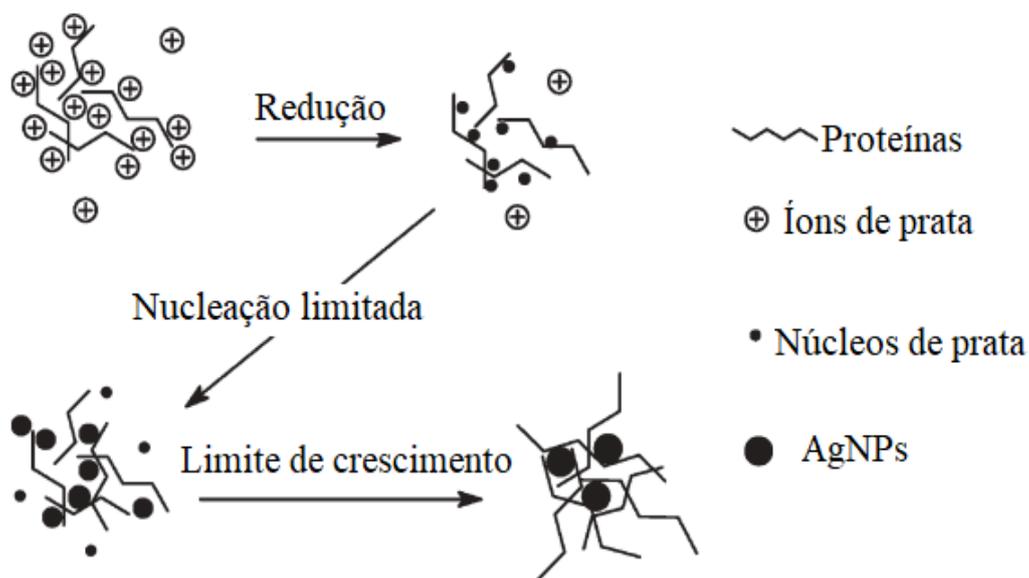
3.3.1 Biossíntese de nanometais por plantas

Entre os diferentes sistemas vivos aproveitados para a síntese de nanopartículas de metal, as plantas encontraram aplicação predominante no processo de síntese, pois o uso de plantas para a biossíntese de nanopartículas de metal pode ser benéfico em comparação com outros agentes biológicos (KUMAR; CHISTI; CHAND, 2013). No caso de sistemas vegetais, o processo elaborado de manutenção das culturas de células é eliminado. No cenário atual da nanotecnologia, as plantas são melhores sintetizadores em relação aos outros métodos biológicos devido à abundância da disponibilidade dos recursos vegetais quando comparados às outras formas de recursos biológicos. Além disso, as plantas fornecem uma plataforma melhor para a síntese de nanopartículas, pois são produtos químicos não tóxicos e fornecem agentes de cobertura naturais. Além disso, o uso de extratos de plantas também reduz o custo de isolamento de microrganismos e meios de cultura, aumentando a viabilidade competitiva de custo em relação à síntese de nanopartículas por microrganismos (PRASAD, 2014; AL-WHAIBI; FIROZ; AL-KHAISHANY, 2015; SIDDIQUI; AL-WHAIBI; MOHAMMAD, 2015).

O mecanismo exato e os componentes responsáveis pelas nanopartículas sintéticas mediadas por plantas ainda precisam ser elucidados. Foi proposto que proteínas, aminoácidos, ácidos orgânicos, vitaminas, bem como metabólitos secundários, como flavonóides, alcalóides, polifenóis, terpenóides, compostos heterocíclicos e polissacarídeos, têm papéis significativos na redução de sais metálicos e, além disso, atuam como agentes de cobertura e estabilização para nanopartículas sintetizadas (PERALTA-VIDEA et al., 2016). El-Kassas & El-Sheekh, (2014), por exemplo mostraram que o grupo funcional hidroxila de polifenóis e o grupo carbonila de proteínas do extrato de *Corallina officinalis* poderiam auxiliar na formação e estabilização de nanopartículas de ouro.

Philip et al. (2011) mostraram a síntese e estabilização de nanopartículas de prata e ouro por ligação de biomoléculas em extrato de folhas de *Murraya koenigii*. De acordo com a investigação, existem diferentes mecanismos para sintetizar nanopartículas em diferentes espécies de plantas. Singh et al. (2016) complementa que as plantas dicotiledôneas contêm muitos metabólitos secundários que podem ser adequados para a síntese de nanopartículas. A Figura 3 apresenta uma ilustração esquemática do mecanismo de biossíntese de nanopartículas de prata por meio do extrato de *Capsicum annum* usado por Li et al. (2007). Nesse estudo, de acordo com os autores, os íons de prata sofrem interação eletrostática com as proteínas presentes no extrato vegetal, o que leva à formação do complexo de prata.

Figura 3 - Representação esquemática do mecanismo de biorredução e formação das AGNPs de extratos de *Capsicum annum*



Fonte: Adaptado de Li *et al.* (2007)

3.3.2 *Morinda citrifolia* como matéria-prima na biossíntese de nanometais

Tal como já descrito previamente, dentre os diversos seres vivos com potencial para síntese de nanopartículas metálicas, os vegetais possuem papel predominante no processo de síntese. Sua utilização pode ser benéfica comparada a outros agentes biológicos, uma vez que com o uso de vegetais na biossíntese de nanometais, o processo de manutenção de culturas celulares é eliminado (MITTAL; CHISTI; BANERJEE, 2013). A relevante propriedade de biossíntese de nanopartículas metálicas inclui a *Morinda citrifolia*. A Tabela 2 explora resumidamente alguns exemplos do potencial que o noni apresenta na biossíntese de nanopartículas metálicas.

Tabela 2 - Resumo de alguns estudos envolvendo a biossíntese de nanometais por *M. citrifolia*.

Nanopartícula metálica	Estrutura vegetal	Tamanho (nm)	Caracterização	Propriedade biológica	Referência
Ag	Folhas	100	UV-Vis e DLS	Antimicrobiana	(PAI et al., 2015)
	Raiz	30 a 55	FTIR, DRX, FE-SEM e MET	Citotóxica	(SUMAN et al., 2013)
	Folhas	9 a 69	UV-Vis, EDS, FTIR e FE-SEM	Antimicrobiana	(SYAFI UDDIN et al., 2017)
	Folhas	10 a 60	UV-Vis, FTIR, MEV e MET	Antimicrobiana	(SATHISHKUMAR et al., 2012)
	Folhas, Frutos e Sementes	3 a 11	UV-Vis, FTIR, MET	Antimicrobiana	(MORALES-LOZOYA et al., 2021)
AgCl	Folhas	12	UV-Vis, FTIR, DRX e MET	Antimicrobiana	(ASHOK KUMAR; PALANICHAMY; ROOPAN, 2014)
Al	Raiz	Não informado	FIA e FAAS	Não informado	(TONTRONG; KHONYOUNG; JAKMUNEE, 2012)
Au	Raiz	12,37 a 38,26	DRX, FTIR, FE-SEM, EDS e MET	Não informada	(SUMAN et al., 2014)
	Raiz	20,46 a 39,20	DRX, FTIR, EDS e FE-SEM	Larvicida	(SUMAN et al., 2015)
TiO ₂	Folhas	15 a 19	DRX, FTIR, UV-Vis, EDS e MEV	Antimicrobiana	(SUNDRARAJAN et al., 2017)

Abreviações: UV-Vis (espectroscopia no ultravioleta visível); FTIR (espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier); DLS (espalhamento de luz dinâmico); DRX (difração de raios-X); EDS (espectroscopia de raios-X por dispersão em energia); FE-SEM (microscopia eletrônica de transmissão com emissão de campo); MEV (microscopia eletrônica de varredura).

A biossíntese do metal nobre ouro (Au) via utilização do extrato aquoso de raízes de *Morinda citrifolia* foi desenvolvida por (SUMAN et al., 2014). Os autores promoveram a pulverização das amostras das raízes para preparação do extrato aquoso seguida da adição de uma solução aquosa contendo ácido cloro-áurico para redução das nanopartículas de ouro em ambiente com ausência de luz. As análises de caracterização revelaram nanopartículas com formato triangular, com tamanho médio variando entre 12,37 e 38,26 nm.

Um novo método hidrotérmico desenvolvido por (SUNDRARAJAN et al., 2017), promoveu a biossíntese de nanopartículas de dióxido de titânio a partir do extrato etanólico de folhas de *Morinda citrifolia*. Para promover a fitossíntese, foi adicionado ao extrato 0,1 M de TiCl₄, posteriormente a solução foi transferida para uma autoclave de

ação inoxidável revestida com teflon a 120 °C por 8 horas. A caracterização do extrato por difração em raios-X (DRX) identificou um pico principal a 27,3° correspondente ao TiO₂ na fase rutilo tetragonal. As nanopartículas de TiO₂ possuíam formato esférico com tamanho médio variando entre 15 e 19 nm. As nanopartículas de TiO₂ também apresentaram propriedades antimicrobianas contra *E. coli*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Aspergillus níger*. Outro trabalho semelhante promovendo a biossíntese de TiO₂ a partir do extrato aquoso da raiz de *M. citrifolia*, propriedades larvicida contra *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* foram identificadas no extrato (SUMAN et al., 2015).

Dentre as nanopartículas metálicas biossintetizadas por *M. citrifolia*, talvez seja a prata (Ag) o nanometal mais desejado no processo de síntese. (SYAFIUDDIN et al., 2017) promoveram a biossíntese de nanopartículas de prata (AgNPs) oriundas de extratos aquosos de folhas de diversos vegetais, dentre eles a *Morinda citrifolia*. A biossíntese foi possível devido à redução de íons de prata pela adição AgNO₃ no extrato aquoso. O processo de biossíntese incluiu a centrifugação do extrato contendo AgNO₃ seguida de sua caracterização. As AgNPs possuíam formato esférico com tamanhos de até 69 nm, além de propriedades antimicrobianas contra *Bacillus cereus* e *E.coli*.

Foi identificado que nanopartículas de prata (AgNPs) biossintetizadas via utilização de extrato aquoso da raiz de *M. citrifolia* possui efeito citotóxico altamente significativo sobre células de HeLa. O efeito citotóxico foi possível por meio do tratamento com diferentes concentrações do extrato contendo as AgNPs células semeadas em placas de cultura de tecidos. A realização da análise de citotoxicidade MTT pela redução do corante brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] confirmou o efeito citotóxico das AgNPs (SUMAN et al., 2013).

4. METODOLOGIA EMPREGADA

4.1 COLETA E TRATAMENTO DA MATÉRIA-PRIMA

A matéria-prima utilizada neste trabalho foi gentilmente cedida por proprietários do interior da cidade de Pombal, estado da Paraíba, Brasil. As folhas foram podadas aleatoriamente de diferentes árvores de *Morinda citrifolia*, de um mesmo lote de cultivo, visando a padronização da composição do material. As folhas podadas apresentavam um tom de verde escuro brilhante, variando em tamanho de arredondado, fino e pontiagudo, variando em tamanho de 8 a 25 cm de comprimento.

As folhas de *M. citrifolia* foram lavadas com água corrente, visando a remoção de eventuais resíduos de solo recorrentes do próprio plantio ou de possíveis insetos. Após a lavagem, as folhas serão imersas em solução de água clorada (200 ppm) por 15 min, seguido de enxágue com água corrente.

Posteriormente, as folhas foram submetidas a um processo de branqueamento conforme descrito por Xavier; Machado; Costa (2014). Após o branqueamento, o material será seco ao ar e mantido a 45 °C por um período não superior a 12h. As folhas de noni então serão moídas em moinho Wiley (Tecnal, TE-605/1), e posteriormente acondicionadas em sacos de polietileno e armazenadas a -24 ° C até a preparação do extrato.

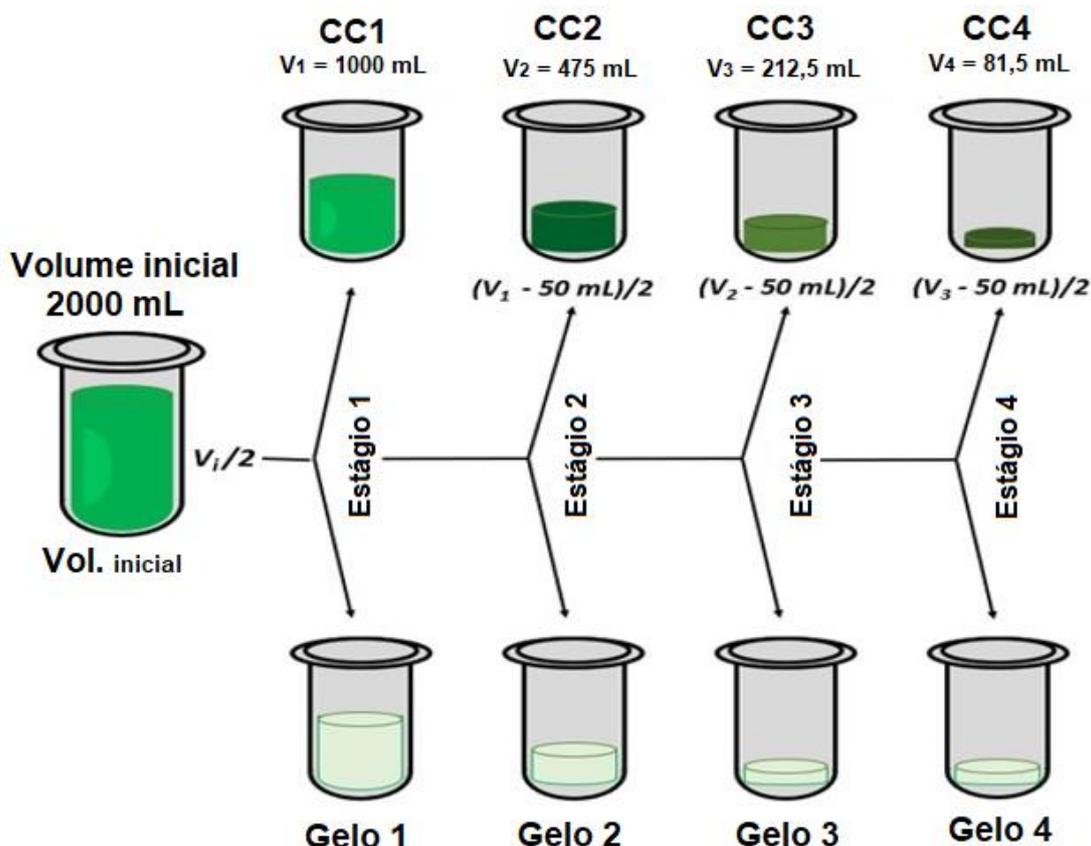
O preparo do extrato foi realizado por infusão das folhas secas e trituradas de *Morinda citrifolia* em água ultrapura. A preparação do extrato aquoso seguiu a metodologia descrita por Shalan; Mustapha; Mohamed (2017) com poucas modificações. Este procedimento consiste em um sistema fechado com agitação contínua e temperatura controlada de 40 °C composto por 40 g de folhas suspensas em 1 L (4% (p / v)) de água ultra pura por 20 min. Após a extração, a solução será submetida a filtração a vácuo com papel de filtro qualitativo para remoção dos sólidos em suspensão. Após a filtração, o material foi resfriado (aproximadamente 4 °C) por 30 min, para seguimento do processo de crioconcentração.

4.2 ENSAIOS DE CRIOCONCENTRAÇÃO

4.2.1 Crioconcentração em Blocos Gravitacional (CCG)

O processo de crioconcentração das folhas de *Morinda citrifolia* seguiu o protocolo adotado por Adorno et al. (2017) e Aider & Ounis (2012) com pequenas modificações. A Figura 4 apresenta um esboço esquemático do aparato experimental do fluxograma geral para ambos os métodos de congelamento e separação das frações aquosas de folhas de *M. citrifolia* em estágios (blocos) aplicados nesse estudo.

Figura 4 - Fluxograma geral das etapas experimentais de congelamento e degelo que será usado em ambos os métodos de crioconcentração.



Fonte: Do autor.

Em resumo, um volume inicial de alimentação de 2.000 mL do extrato aquoso das folhas de *M. citrifolia* é dividido em recipientes de 200 mL cada. As amostras então,

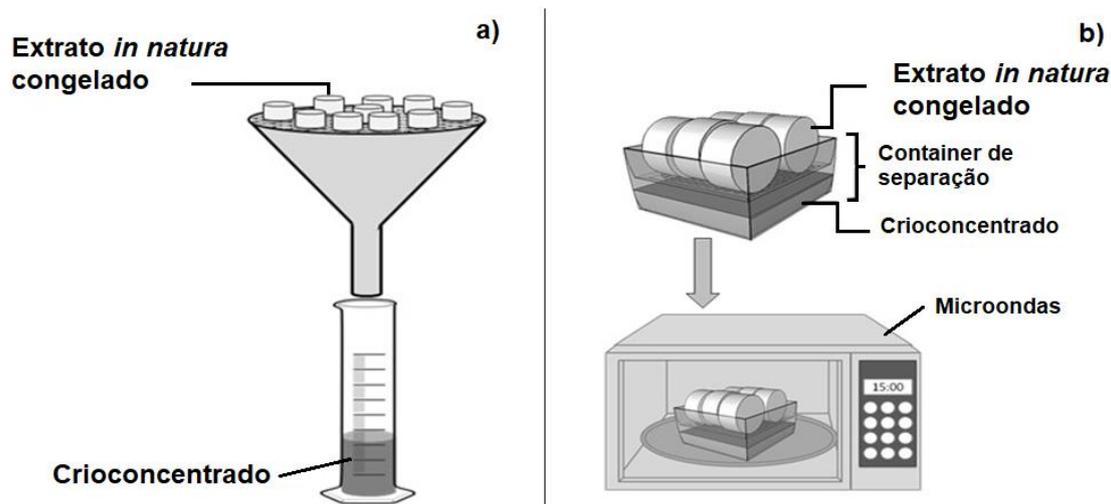
são congeladas por ar frio até a temperatura ser reduzida para -20 ± 2 °C. Após o congelamento do extrato em pequenos blocos, o modo de descongelamento utilizado para separar todo o bloco congelado foi dividido em duas fases: a fração concentrada e a fração de gelo residual. A crioconcentração é realizada por descongelamento passivo (método gravitacional de descongelamento) dos blocos de extrato congelado, durante a qual a solução inicial contendo o extrato congelado das folhas de *M. citrifolia* será deixada a 20 ± 2 °C. O descongelamento para formação das amostras concentradas foi então, dividido em quatro etapas ou ciclos. Em cada ciclo, 50% do volume congelado é descongelado. O volume descongelado durante o primeiro ciclo de criopreservação foi novamente congelado e usado como solução de alimentação para o segundo ciclo de criopreservação. Este procedimento será repetido no terceiro e quarto ciclo de crioconcentração, resultando em quatro volumes de concentrado: CC1 a CC4 (crioconcentrados 1 a crioconcentrados 4) e quatro volumes de gelo residual. A cada ciclo de crioconcentração, 50 mL da amostra concentrada serão coletadas e congeladas novamente a -24 °C para análises posteriores.

4.2.2 Crioconcentração assistida por micro-ondas

A execução dessa etapa experimental é bastante similar a crioconcentração gravitacional. Para a CCM repetimos a metodologia adotada por Adorno et al. (2017) e Aider & Ounis (2012) acrescida do estudo de Khajehei et al. (2015) com poucas modificações na execução dos experimentos. Um volume inicial de 2.000 mL do extrato aquoso das folhas de *M. citrifolia* é dividido em recipientes contendo 200 mL do volume do extrato em cada um. Amostras de extrato de folhas de *M. citrifolia* foram então congeladas por resfriamento indireto em câmara de ar resfriado até atingir a temperatura de -20 ± 2 °C. Após o congelamento do extrato em porções de 200 mL, o método de descongelamento foi realizado para separar cada porção congelada em duas fases: a fração concentrada e a fração correspondente ao gelo residual. A CCM ocorre por meio do método de degelo passivo em blocos, onde cada bloco consistirá em uma etapa do processo. Neste estudo, o descongelamento passivo seguido com o auxílio da técnica assistida por micro-ondas para promover uma maior velocidade e eficiência no processo de concentração dos componentes bioativos presentes nas folhas de noni. No descongelamento assistido por micro-ondas a formação das frações congeladas e de gelo,

segue idêntico ao método de CCG. A Figura 5 expõe resumidamente o arcabouço instrumental utilizado na realização dos ensaios de crioconcentração.

Figura 5 - Resumo esquemático do aparato instrumental utilizado (a) no processo de crioconcentração em blocos gravitacional e (b) micro-ondas assistido.



Fonte: Do autor.

4.3 BIOSÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

A produção das nanopartículas de prata seguiu o princípio do mecanismo de biorredução de íons metálicos adicionados a uma solução contendo o extrato vegetal em estudo. A metodologia básica para promover a biossíntese seguirá os ensaios descritos por Syafiuddin et al. 2017 e Morales-Lozoya et al. (2021) com poucas adaptações.

Nesse estudo, primeiramente procuraremos separar os ensaios de biossíntese e posterior caracterização em dois grupos, no primeiro o extrato vegetal usado será a fração crioconcentrada referente a última etapa da CCG, ou seja, a fração CC4. No outro grupo, o extrato vegetal usado será a fração CC4 do processo de CCM. Em ambos os grupos, a biossíntese seguirá o seguinte protocolo: primeiramente uma solução aquosa de 1 mM AgNO_3 será preparada para a síntese de nanopartículas de prata. A mistura de reação será acrescentada de 5 mL dos extratos vegetais crioconcentrados brutos a 95 ml de solução aquosa a 1 mM de AgNO_3 em frascos Erlenmeyer de 250 mL. A mistura de reação será

mantida em ambiente desprovido de luz a temperatura ambiente controlada de 28 °C sob leve agitação em uma incubadora durante 24 horas. Para o controle, também foi preparada uma solução de 100 mL de AgNO₃ com a mesma concentração sem extrato de folhas e o mesmo procedimento será incluído utilizando os extratos de *M. citrifolia in natura*. A obtenção das soluções coloidais será realizada por meio da centrifugação do meio reacional 10 min a 4000 rpm, em seguida, a solução será filtrada a vácuo com membrana de náilon 0,2 µm. As suspensões foram mantidas sob armazenamento em tubos falcon em ambiente desprovido de luminosidade.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS OBTIDAS

4.4.1 Caracterização das amostras crioconcentradas

4.4.1.1 Determinação do teor de fenólicos totais (FT) e sólidos totais (ST)

A determinação do teor de compostos fenólicos totais (FT) presentes nas frações crioconcentradas por CCG e CCM e nas frações de gelo para cada etapa do processo de crioconcentração. A análise seguiu a metodologia apresentada por Singleton & Rossi (1965), adotado por Martin-Diana et al. (2017), via digitalização colorimétrica de Folin-Ciocalteu. O método consiste na reação de 100 µL de amostra, 7 mL de água ultrapura, 0,5 mL de Folin-Ciocalteu e 1,5 mL de solução de carbonato de sódio a 20% (p/v). A mistura foi mantida no escuro à temperatura ambiente (24 °C) por 120 min. A absorbância foi determinada com ajuste de comprimento de onda em 765 nm em um espectrofotômetro (UV-Vis mini-1240 Tokyo, Japão) usando água ultrapura como branca. O mesmo procedimento foi utilizado para construir a curva analítica, elaborada a partir de soluções de ácido gálico na faixa de 200-800 mg.mL⁻¹ e os resultados expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico por mililitros de extrato (mgGAE.mL⁻¹).

A quantidade de sólidos totais (ST) também foi aplicada às frações crioconcentradas por CCG e CCM. O método é descrito por AOAC (2010), e é determinado pela medida de perda de massa após secagem das amostras a 105 °C por 24 horas e expresso como matéria seca/teor de massa total (g.100 g⁻¹).

4.4.1.2 Fator de concentração (C_f) e eficiência do processo

O fator de concentração para cada fração crioconcentrada e gelo nos diferentes estágios de crioconcentração foi calculado de acordo com Aider et al. (2008). O fator de concentração (C_f) foi calculado em função do aumento do teor de sólidos totais em cada etapa do processo (TS_i) em relação ao teor de sólidos totais do extrato inicial (TS_0). O fator de concentração é calculado pela seguinte equação:

$$C_f = \frac{TS_i}{TS_0} \quad (1)$$

onde TS_i é o teor de sólidos totais para cada etapa de crioconcentração ($i = 1, 2, 3$ e 4^a etapa) (mg.L^{-1}); e TS_0 é o teor de sólidos totais no extrato inicial (mg.L^{-1}).

A eficiência do processo de crioconcentração foi definida como o aumento do teor de compostos fenólicos para cada etapa do processo em relação ao conteúdo fenólico residual presente em cada fração de gelo para cada etapa do processo. Teoricamente, quanto menor o teor de compostos fenólicos presentes em cada fração de gelo, maior a concentração da solução concentrada em sua respectiva etapa de criopreservação. A eficiência do processo η (%) foi calculada pela seguinte equação:

$$\eta(\%) = \frac{P_i - P_f}{P_i} \cdot 100 \quad (2)$$

onde P_i é a quantidade de compostos fenólicos totais (mgGAE.mL^{-1}) presentes nas soluções de crioconcentração para cada etapa do processo; e P_f é o teor de compostos fenólicos (mgGAE.mL^{-1}) presentes na fração correspondente de gelo.

4.4.2 Caracterização das nanopartículas de prata

4.4.2.1 Determinação de tamanho e estabilidade das nanopartículas

A medição do tamanho das nanopartículas de prata será determinada por espalhamento de luz dinâmico (DLS) em um equipamento Nano-flex MicrotracS3000/S3500 Series - Particle Metrix.

Para a execução experimental da medição do tamanho das AgNPs via DLS, cerca de 10 mL das suspensões coloidais serão transferidas para um béquer de 50 mL. Em seguida, o componente contendo a fonte de luz a laser é imerso, na amostra. A análise da frequência da luz incidida sobre as partículas será executada pelo software do equipamento gerando um histograma contendo a distribuição cumulativa e percentual do tamanho das nanopartículas.

A determinação da estabilidade das nanopartículas será realizada via avaliação do potencial zeta das soluções coloidais. Tal ensaio será realizado em outro equipamento acoplado ao Nano-flex (Stabino Control2.00.23 – Particle Metrix). Para a execução experimental, as amostras contendo as AgNPs serão transferidas para uma célula cilíndrica de teflon, a solução será agitada e um valor em mV do potencial zeta (PZ) instantâneo e o pH da amostra é rapidamente determinado.

4.4.2.2 Ensaios em Microscopia Eletrônica de Varredura acoplado em Espectrômetro de Dispersão de Energia (MEV-EDS)

As análises em microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas de prata foram realizadas com a finalidade de avaliar a forma, o tamanho e os aspectos de disposição espacial das nanopartículas. Os ensaios com ambos os equipamentos foram realizados no LCME/UFSC.

A preparação das amostras de nanopartículas de prata para visualização no MEV-EDS foi conduzida a partir da diluição das amostras em 50% (v/v) seguida de gotejamento das mesmas sobre pequenos suportes de alumínio previamente limpos e esterilizados denominados “*stubs*”. Após o gotejamento, os *stubs* foram levados à uma incubadora à vácuo onde permaneceram por um período de 48 h para promover a secagem da amostra gotejada. As análises em MEV-EDS foram realizadas em um equipamento

(JEOL, modelo JSM-6390LV) operando em uma voltagem de 30,0 kV com ampliação máxima das imagens de 50000x. O sistema de espectrometria por dispersão de energia (EDS) acoplado ao microscópio eletrônico promoveu a caracterização química/análise elementar do material de ensaio, permitindo a identificação e confirmação da presença das nanopartículas de prata.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados obtidos dos ensaios de crioconcentração foram apresentados como média \pm desvio padrão (DP). As diferenças entre as médias foram comparadas pelo teste de diferença mínima significativa de Tukey (LSD), com nível de significância de 5%. A análise de correlação de Pearson (r) foi aplicada para verificar a força da correlação entre as respostas avaliadas em $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas no Software Statistica® v. 8.5 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, EUA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 TEOR DE SÓLIDOS E FENÓLICOS TOTAIS DOS CRIOCONCENTRADOS

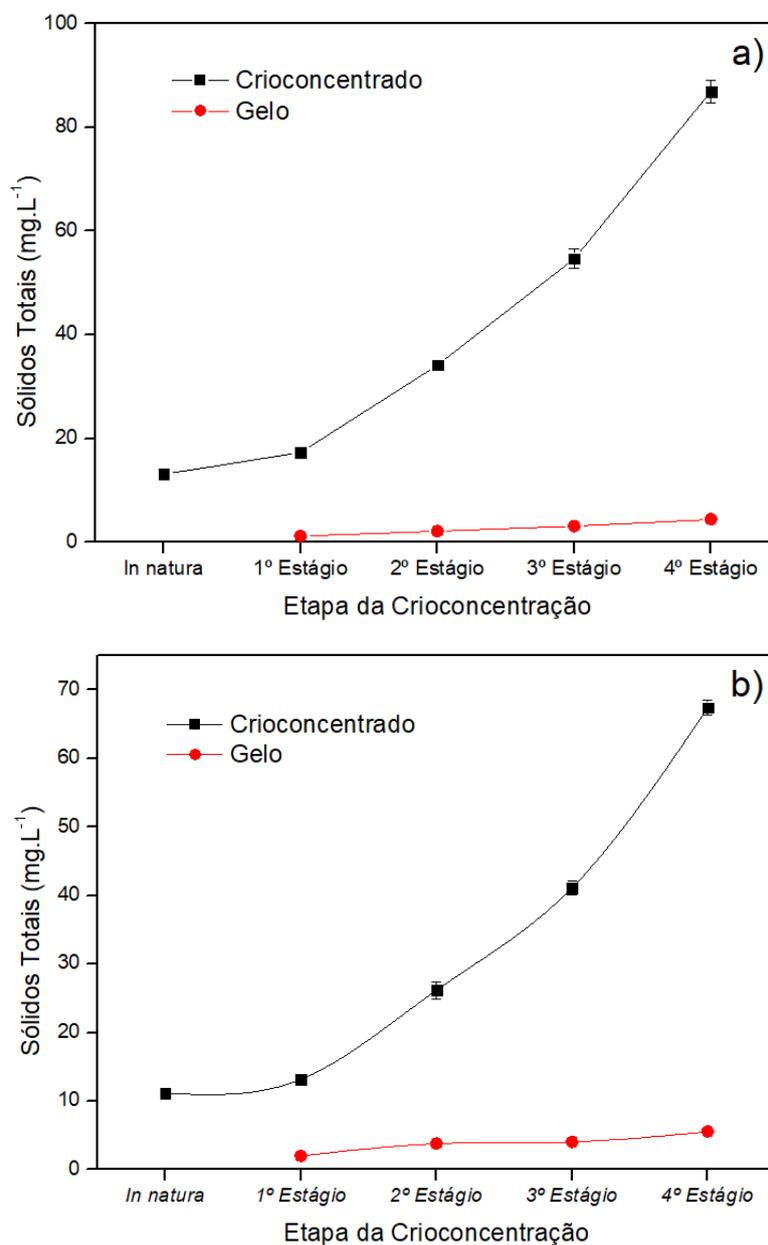
A Figura 6 apresenta os níveis de FT para as frações concentradas e de gelo residual para ambos os processos de crioconcentração, em blocos gravitacional e micro-ondas, aplicados aos extratos aquosos de folhas de *Morinda citrifolia*. A análise estatística dos dados mostrou que as etapas de crioconcentração para ambos os métodos proporcionou efeito significativo na evolução da matéria seca total ($p < 0,05$). Em ambos os métodos de crioconcentração, há um aumento significativo nas quantidades de FT, onde a análise estatística para os dados das frações concentradas (CC1 a CC4) revelou diferença significativa para cada valor correspondente à etapa de crioconcentração ($p < 0,05$), destacando a elevação dos valores de FT a medida que as etapas da CCG e CCM progrediam. Os dados analíticos do teor de FT juntamente com a análise estatística podem ser visualizados na Tabela 3 e 4 para os processos de CCG e CCM respectivamente.

Para o processo de CCG, as frações concentradas para as quatro etapas do processo apresentaram valores de FT variando de $0,81 \pm 0,03$ mg GAE.mL⁻¹ para a amostra *in natura*, $0,89 \pm 0,01$ mg GAE.mL⁻¹ na primeira etapa da CCG, culminando com um valor de $6,11 \pm 0,01$ mg GAE.mL⁻¹ na última etapa do processo (Tabela 3). Tais resultados confirmam a técnica de acúmulo de fenólicos por congelamento e degelo gravitacional como satisfatória. Tal valor de FT ao final da quarta etapa foi superior aos apresentados nos estudos de empregados por Haas et al. (2022) e Boaventura et al. (2015), que aplicaram o processo de crioconcentração para retenção de polifenóis em amostras de suco de laranja e folhas erva-mate (*Ilex paraguariensis*), demonstrando assim a potencialidade das folhas perante diferentes matérias-primas usadas como extrato.

Quanto ao método de CCM, o aumento significativo do teor de FT em cada etapa do processo faz com que o método, assim como foi para a técnica de CCG, satisfatório, muito embora o acúmulo de FT no final da última etapa de CCM foi inferior ao apresentado pelo método de CCG. O aumento de FT para a técnica de CCM variou de $0,71 \pm 0,01$ mg GAE.mL⁻¹ a $5,81 \pm 0,46$ mg GAE.mL⁻¹ para as amostras *in natura* e CC4, respectivamente. O valor apresentado por CC4 no método de CCM representou uma redução de aproximadamente 5,16% em relação ao valor de FT apresentado no método

de CCG, o que tornou este último método de crioconcentração sutilmente mais eficaz na retenção de sólidos do extrato de folhas de *M. citrifolia* em este estudo, onde embora estatisticamente não há inferência em relação aos valores de FT para CC4 tanto na CCG quanto na CCM, ambos os processos foram satisfatórios, onde inclusive o método de retenção de FT via CCM obteve valores superiores aos trabalhos desenvolvidos por Aider & Ounis (2012) e Orellana-Palma et al. (2017b).

Figura 6 - Teor de sólidos totais (mg.L^{-1}) calculados para ambos os métodos de crioconcentração: (a) em blocos gravitacional e (b) assistido por micro-ondas.



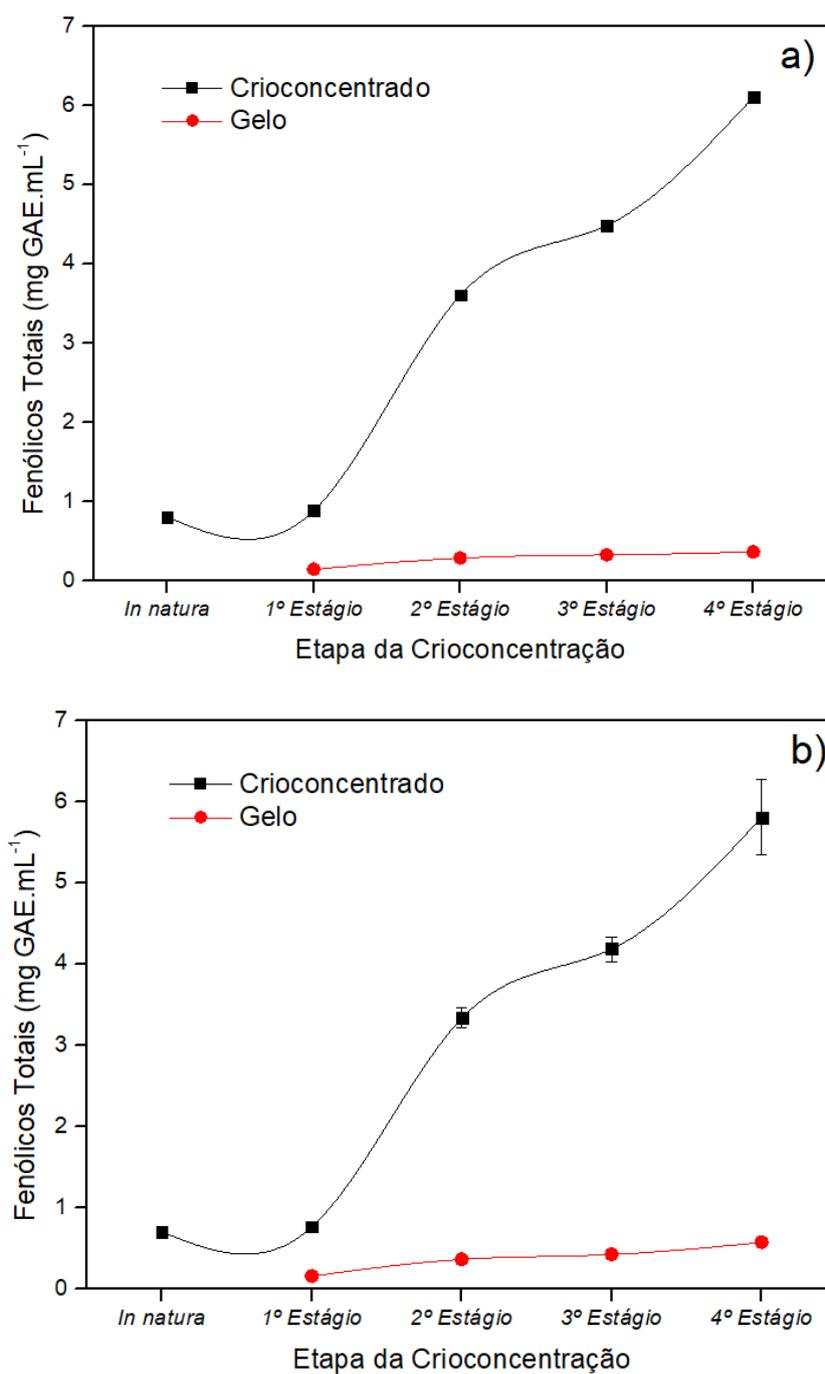
É importante mencionar que as diferenças com estudos anteriores podem ser explicadas por fatores como tipo de colheita, estágio de maturação, condições climáticas das frutas/folhas frescas e/ou métodos específicos usados durante o preparo dos extratos (LIN et al., 2014). Entretanto e de fato, o aumento do fator de concentração de FT para amostras do extrato aquoso de folhas de *M. citrifolia* para ambos os métodos de crioconcentração utilizados refere-se a outra variável que pode estar associada ao efeito significativo de retenção de sólidos totais (ST). Tal efeito remete a capacidade de ambos os processos permitirem não somente o acúmulo de bioativos como também a conservação destes, onde que a execução de ambos os processos não promove injúrias ou degradações nos componentes bioquímicos do extrato, uma vez que o processo é caracterizado como não-térmico, resulta em baixíssimas frações de perdas residuais, caracterizado pelos baixos valores das frações de gelo (Tabela 3 e 4) e é amplamente validado (AREND et al., 2017; PETZOLD et al., 2018; MUÑOZ et al., 2019).

Os resultados expostos para retenção de ST apresentam-se como um complemento ao que foi obtido para FT. A Figura 7 apresenta o comportamento do acúmulo de ST para as frações concentradas e de gelo residual para ambos os processos de crioconcentração aplicados aos extratos aquosos de folhas de *Morinda citrifolia*. As Tabelas 3 e 4 expõem os valores analíticos para esse ensaio. Novamente a análise estatística dos dados mostrou que as etapas de crioconcentração para ambos os métodos de crioconcentração proporcionou efeito significativo na evolução da matéria seca total ($p < 0,05$). Para o processo de CCG o teor de ST variou de $13,12 \pm 0,04 \text{ mg.mL}^{-1}$ para $86,91 \pm 2,24 \text{ mg.mL}^{-1}$ nas amostras *in natura* e CC4 respectivamente. Já o processo de CCM apresentou uma variação do teor de ST de $11,12 \pm 0,22 \text{ mg.mL}^{-1}$ para $67,43 \pm 1,12 \text{ mg.mL}^{-1}$ nas amostras *in natura* e CC4 respectivamente.

Segundo Orellana-Palma; González e Petzold (2019), o aumento do teor de matéria sólida no gelo pode ser explicado devido ao alto teor de sólidos retidos nas frações de gelo com o avanço das etapas do processo, mesmo que em quantidades desprezíveis perante a grande quantidade de sólidos retidos nas frações concentradas. Além disso, o comportamento da concentração de soluto atribuído a ambos os métodos de crioconcentração também pode estar relacionado ao fenômeno da eluição, onde ocorre a movimentação dos solutos durante a formação dos cristais de gelo, e devido a esse fenômeno, os solutos foram expelidos e acumulados na fração líquida. Resultados

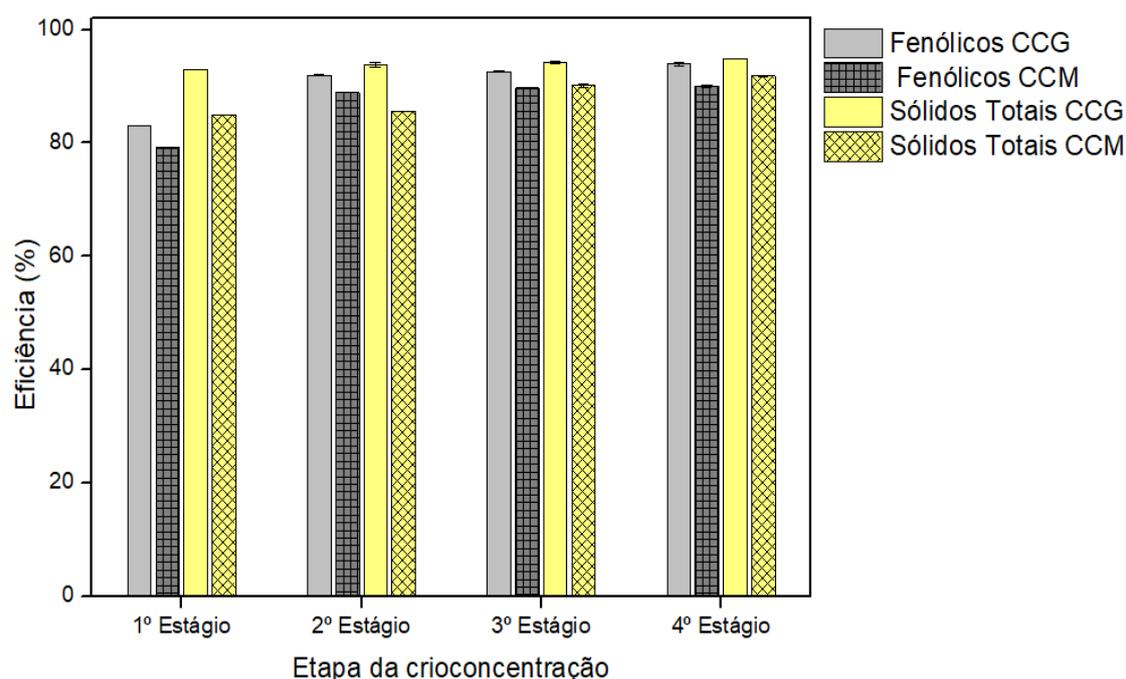
semelhantes são apresentados em estudos envolvendo a crioconcentração da solução de sacarose e extrato de café (MORENO et al., 2013; PETZOLD; NIRANJAN; AGUILERA, 2013).

Figura 7 - Teor de sólidos totais (mg GAE.mL^{-1}) calculados para ambos os métodos de crioconcentração: (a) em blocos gravitacional e (b) assistido por micro-ondas.



As Figuras 8 e 9 apresentam respectivamente a eficiência e fator de concentração tanto para retenção de sólidos quanto para acúmulo de FT em ambos os métodos de crioconcentração. Os valores analíticos podem ser visualizados em mais detalhes na Tabela 5.

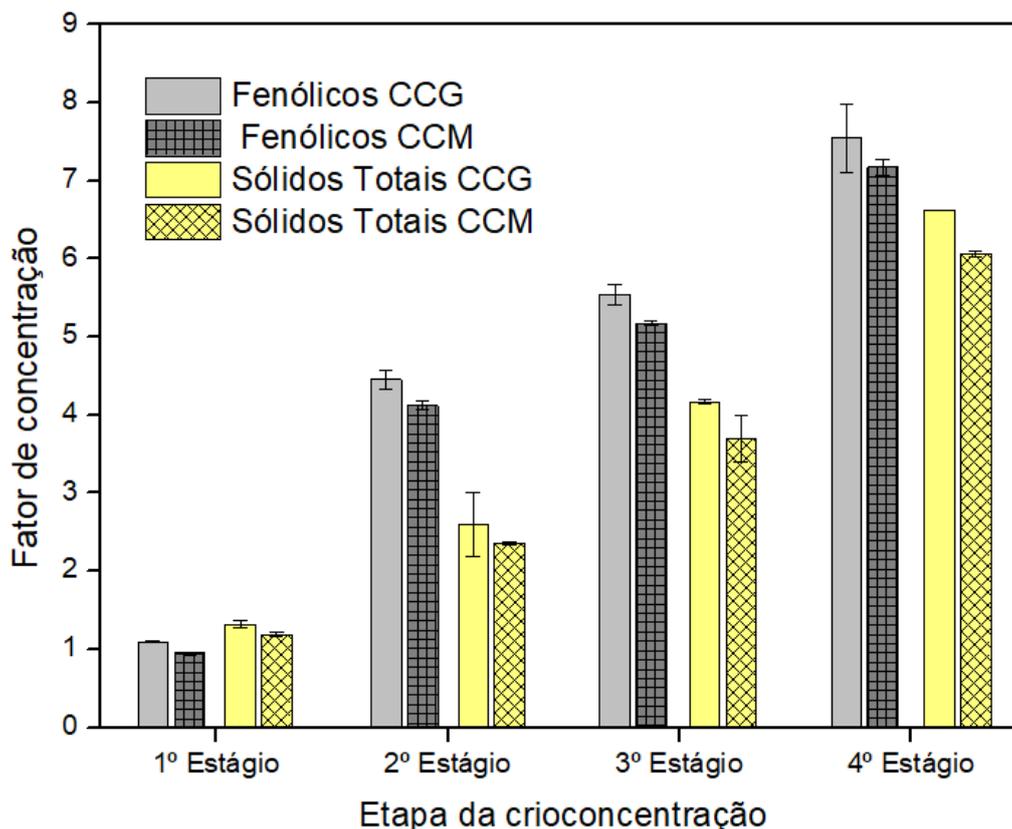
Figura 8 - Eficiência (%) dos processos de retenção de sólidos totais e fenólicos totais para ambos os métodos de crioconcentração empregados.



Como esperado, o extrato *in natura* das folhas de *M. citrifolia* apresentou baixa concentração de ST e FT quando comparado às frações concentradas (CC1 a CC4). Tal resultado reflete conseqüentemente na elevação progressiva tanto da eficiência quanto do C_f . Ou seja, os resultados obtidos com os diferentes métodos de crioconcentração mostraram que, à medida que os ciclos avançavam, os solutos aprisionados eram maiores que a concentração inicial. Em resumo, como disposto na Tabela 5, tanto para o método de CCG como para o método de CCM, os fatores de concentração e as eficiências na retenção de fenólicos e sólidos totais no último estágio do processo foram, em ambos os processos, respectivamente superiores a 7 e 6 vezes mais elevados quando comparados a

solução *in natura*, representando respectivamente uma eficiência superior a 90% ao final da CCG e da CCM (Tabela 5).

Figura 9 - Fator de concentração dos processos de retenção de sólidos totais e fenólicos totais para ambos os métodos de crioconcentração empregados.

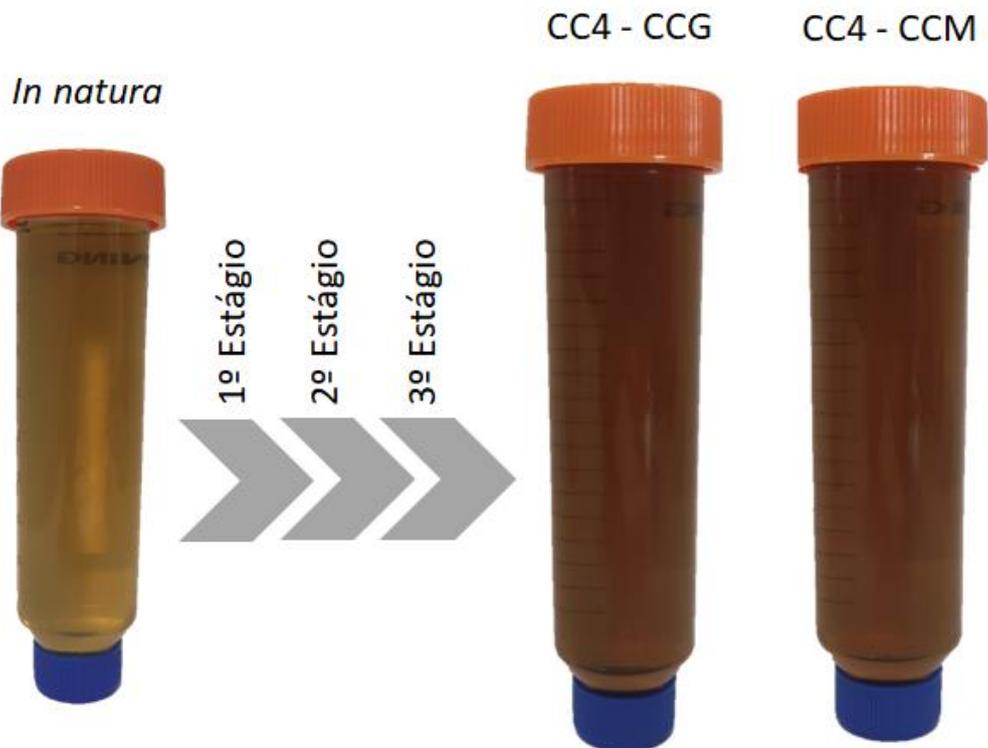


De fato, o parâmetro correspondente a eficiência e C_f , nada mais é do que um reflexo do comportamento obtido para a retenção de sólidos obtidos durante as etapas do processo de crioconcentração. Este aspecto corrobora com o exposto por Haas et al. (2022) e Aider & De Halleux (2008), ou seja, independentemente do tipo de método de descongelamento utilizado, o teor de matéria seca total aumentou com o aumento dos ciclos de crioconcentração.

Nas condições experimentais utilizadas no presente estudo, ambos os métodos de crioconcentração obtiveram efeito significativo na evolução da eficiência e do C_f . Segundo Aider & De Halleux (2009), esse efeito ocorre porque a quantidade de água livre na solução do extrato *in natura* diminui ao passar de um estágio para outro. De fato, ao

analisar os valores referentes ao C_f para ambos os métodos de crioconcentração (Figura 8 e 9; Tabela 5), percebe-se que o teor de ST aumenta significativamente na terceira e quarta etapa do processo. Considerando que parte da água, chamada de água livre, pode congelar facilmente, o restante da água se liga e se organiza de forma muito diferente da água em massa (água livre). Portanto, espera-se que a quantidade dessa água (não aglutinante) aumente, aumentando assim o teor de matéria sólida total nas amostras e, conseqüentemente, aumentando com as etapas de crioconcentração (PRAWITWONG; TAKIGAMI; PHILLIPS, 2007). Assim, o aumento da matéria sólida total da primeira etapa para a segunda etapa em ambos os processos de crioconcentração é muito menor do que o registrado nas duas últimas etapas do processo (Figura 8 e 9; Tabela 5). Por fim, Haas et al. (2022) menciona que outro importante parâmetro físico-químico associado à qualidade e efetividade do processo de crioconcentração é a cor dos extratos finais obtidos. Embora, nesse estudo, a apresentação dessa sutil diferença no aspecto da cor seja plenamente qualitativo, fica evidente, tal como mostrado na Figura 10, as diferenças na tonalidade da cor entre a amostra *in natura* e as amostras referentes ao último estágio de crioconcentração, indicando, como já descrito, a retenção de maiores quantidades de sólidos nas amostras mais concentradas.

Figura 10 - Extratos de *M. citrifolia* antes e após ambos os processos de crioconcentração, representados pelas amostras *in natura* e CC4.



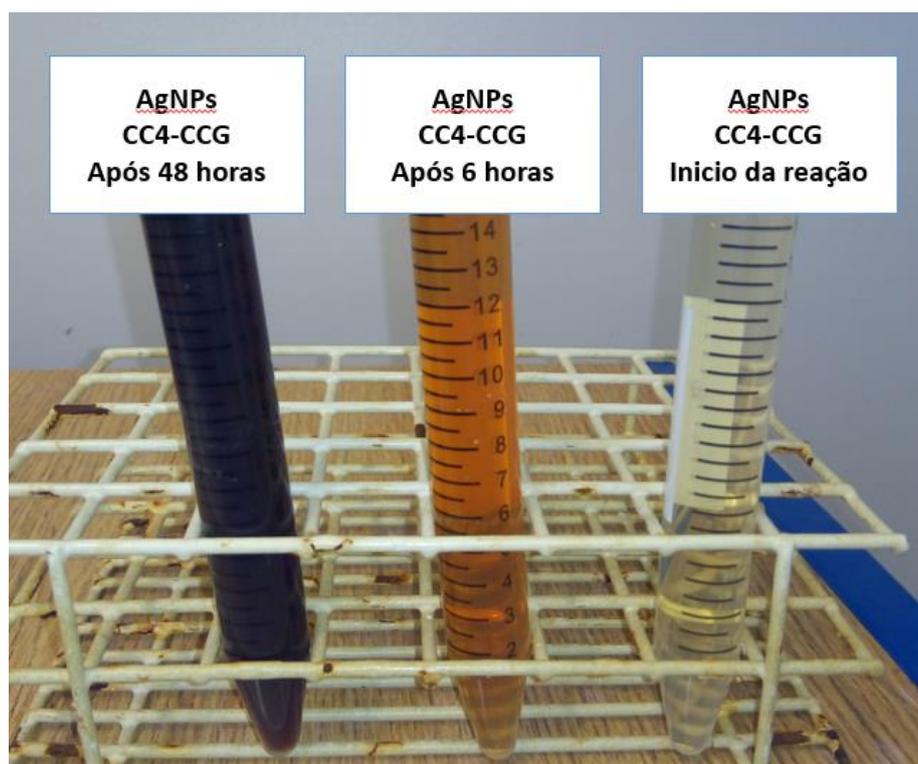
5.2 BIOSÍNTESE DAS AgNPs POR EXTRATOS CRIOCONCENTRADOS DE *Morinda citrifolia*

5.2.1 Efetividade da biossíntese e análise do tamanho e estabilidade das nanopartículas

Como já descrito, a biossíntese das AgNPs foi promovida por meio da adição do sal de prata (AgNO_3) no filtrado contendo os extratos *in natura* e CC4 para ambos os processos de crioconcentração estudados, permitindo assim que os compostos fenólicos e demais biomoléculas presentes no extrato atuem no mecanismo de biorredução dos íons de prata bem como no processo de estabilização das nanopartículas. Com relação à eficiência da biossíntese mediada pelas folhas de *M. citrifolia*, a alteração na cor do meio de reação foi a primeira evidência da formação das AgNPs. As Figuras 11 e 12 apresentam respectivamente o aspecto dos extratos oriundos de ambos os processos de crioconcentração das folhas de *M.*

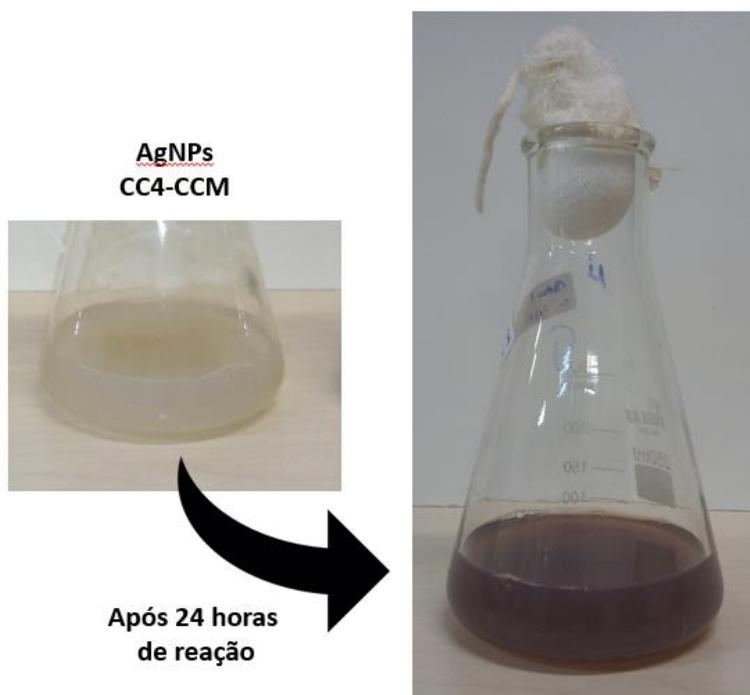
citrifolia perante a mudança na coloração da solução quando submetida ao tratamento com AgNO_3 .

Figura 11 – Aparência em diferentes períodos de tempo da solução coloidal contendo as AgNPs do extrato referente ao último estágio de crioconcentração em blocos gravitacional (CC4-CCG) das folhas de *M. citrifolia*.



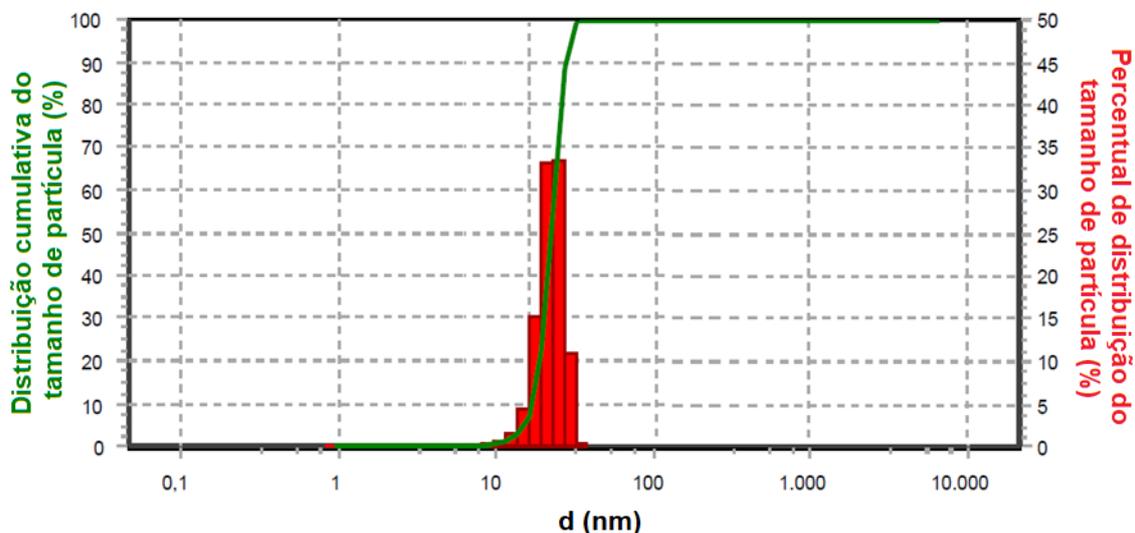
Durante o processo de biossíntese as AgNPs foram formadas conforme a tonalidade da solução foi variando entre uma cor acastanhada a quase preta. Com o passar do tempo, a mistura ficou cada vez mais escura, mas permaneceu altamente estável em após 24h de tratamento. Essa mudança de cor corrobora com o estudo de Pai et al. (2015), indicando claramente a redução de íons Ag^+ confirmando qualitativamente a formação das AgNPs. Portanto, assim como também descrito por Saratale et al. (2018), a partir das observações visuais ficou claro que o extrato vegetal de *M. Citrifolia* foi um bom agente redutor de íons Ag^+ para nanopartículas de Prata.

Figura 12 - Aparência da solução coloidal contendo as AgNPs no início e após 24 horas de reação, do extrato referente ao último estágio de crioconcentração assistida por micro-ondas (CC4-CCM) das folhas de *M. citrifolia*.



A análise do tamanho e estabilidade das AgNPs realizadas via ensaios DLS e potencial zeta estão dispostas nas Figuras 13, 14 e 15; e nas Tabelas 3 e 4. Verifica-se que ambos os processos de crioconcentração inferiram mudanças em relação a distribuição cumulativa percentual de tamanho de partícula, uma vez que o tratamento com AgNO_3 nas amostras CC4 tanto da CCG quanto da CCM resultaram em tamanhos de partículas menores quando comparadas com o extrato *in natura*.

Figura 13 - Distribuição de tamanho de partícula realizado via ensaio DLS para as AgNPs do extrato *in natura* das folhas de *M. citrifolia*.



O tamanho médio das AgNPs variou de 41 nm para a amostra *in natura*, reduzindo para 34 nm e 23 nm para CC4-CCM e CC4-CCG respectivamente. A leve redução de tamanho médio das nanopartículas as caracterizam como materiais ativos ao estudo em nanotecnologia, uma vez que, de acordo com Clark & Pazdernik (2016), as propriedades físicas e químicas das nanopartículas variam quando dispostas em escalas de tamanho maiores a 100 nm, e estas baseiam suas propriedades na tese de que as estruturas superficiais envolvidas são muito maiores em comparação com os volumes acarretando em maiores áreas de contato. Os tamanhos de nanopartículas obtidos nesse estudo apresentaram tamanhos médios menores aos apresentados por Sathishkumar et al. (2012) e Pai et al. (2015), das quais também utilizou-se extratos de folhas de *M. citrifolia*.

De fato, quando uma nanopartícula diminui de tamanho, uma grande proporção de seus átomos estará disposta na região superficial da nanopartícula quando comparada com as camadas mais internas. Pode-se tomar como exemplo prático que uma nanopartícula com tamanho de 30 nm possui cerca de 5% de seus átomos dispostos em sua superfície; já para uma dada nanopartícula com tamanho de 10 nm, essa proporção aumenta para 20%, chegando em até 50% para uma nanopartícula de 5 nm. Por consequência, pode-se deduzir que quanto menor for uma nanopartícula, essa irá apresentar uma quantidade maior de fração de átomos em sua superfície quando comparada com nanopartículas maiores. Sendo assim, nanopartículas ocorrem em sua superfície, as nanopartículas que apresentarem menor

tamanho serão extremamente mais reativas quando comparadas com nanopartículas maiores (CAO, 2011; SRIVATSAN, 2012).

Figura 14 - Distribuição de tamanho de partícula realizado via ensaio DLS para as AgNPs do extrato referente ao último estágio de crioconcentração em blocos gravitacional (CC4-CCG) das folhas de *M. citrifolia*.

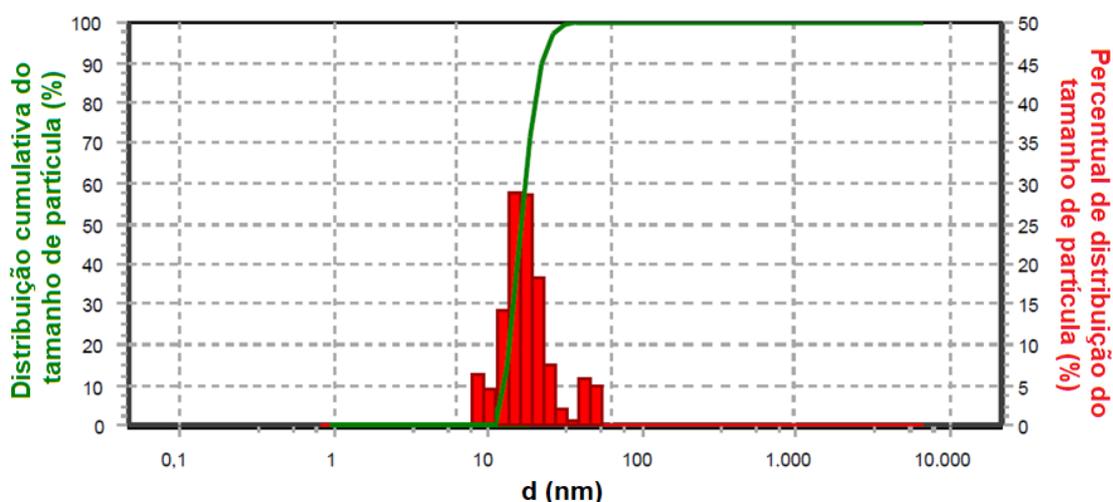
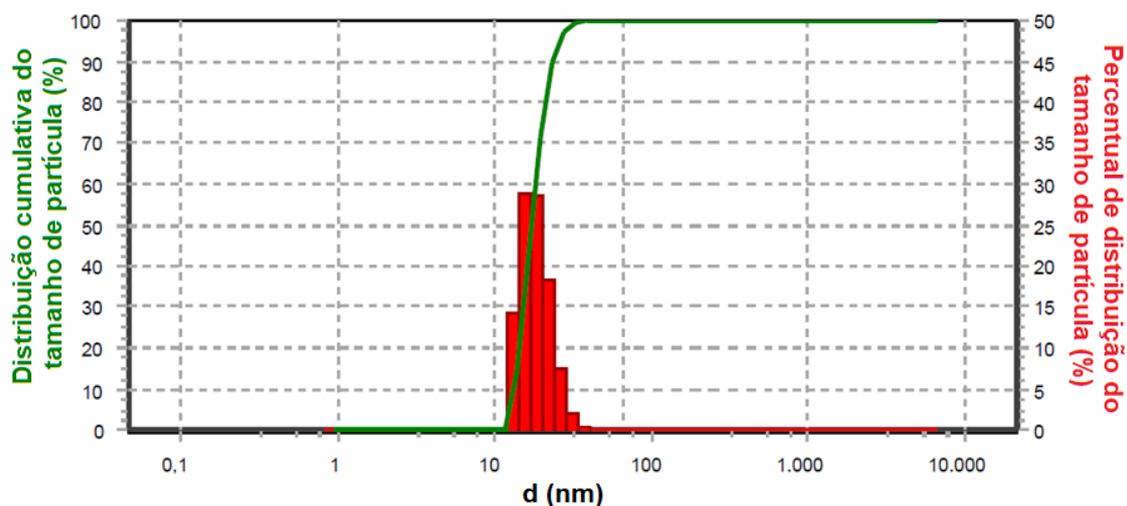


Figura 15 - Distribuição de tamanho de partícula realizado via ensaio DLS para as AgNPs do extrato referente ao último estágio de crioconcentração assistido por micro-ondas (CC4-CCM) das folhas de *M. citrifolia*.



A atividade biológica da *M. citrifolia* deve-se à sua composição bioquímica. Como já mencionado nesse estudo, aproximadamente 200 fitoquímicos já foram isolados e identificados em diferentes partes desta planta. Entretanto, quando se trata de sua aplicação na biossíntese de nanopartículas, alguns dos compostos fitoquímicos presentes na *M. citrifolia*, por exemplo, ácido cítrico, ácido ascórbico e aminoácidos podem contribuir na reação de biorredução, formação e manutenção da estabilidade das AgNPs em solução coloidal (JADOUN et al., 2021). A análise de potencial zeta foi aplicada nesse estudo, sob o conceito de estabilidade eletrostática das nanopartículas em solução. De acordo com a Tabela 3 e 4 para a amostra de AgNPs resultantes do extrato *in natura* das folhas de *M. citrifolia* foi de -9,85 mV, já as amostras de AgNPs referentes aos extratos CC4-CCG e CC4-CCM obtiveram um potencial zeta de -28,24 mV e -15,85 mV respectivamente.

Partindo da premissa de que a região superficial de nanopartículas sólidas dispersas em um meio líquido pode ser vista como uma região de transição entre uma estrutura cristalina organizada com padrão definido, e uma região desprovida de qualquer ordem. Nessa região, os planos cristalográficos estão interrompidos e os átomos apresentam-se disponíveis para efetuar ligações químicas. Isso resulta em um desbalanceamento das cargas elétricas, tornando a superfície da nanopartícula, por consequência, carregada eletricamente, formando uma nuvem de cargas elétricas que circundam a nanopartícula. Tal nuvem de cargas origina a dupla camada elétrica que consiste de uma camada fixa de íons de carga elétrica contrária à da superfície da nanopartícula (camada de Stern) e de uma camada móvel de íons, conhecida como camada difusa (SHAW, 1992; OLIVEIRA et al., 2000).

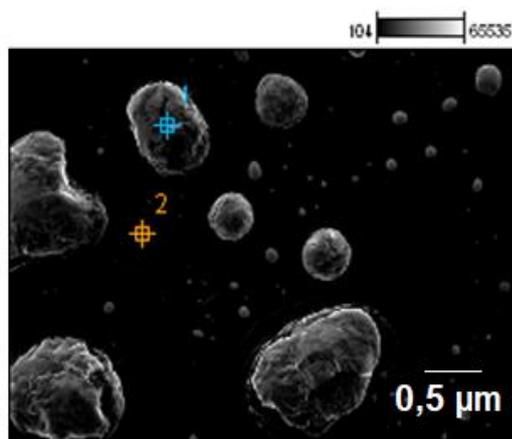
A estabilização eletrostática é uma consequência da presença da dupla camada (camada de Stern) de íons adsorvidos nas nanopartículas carregadas eletricamente. A diferença entre o potencial elétrico da camada difusa e a dispersão eletricamente neutra, conhecida como potencial zeta (PZ), que uma vez determinada experimentalmente nesse estudo, torna-se um parâmetro importante na determinação da estabilidade em um sistema coloidal, onde em suma, se dois sistemas contendo diferentes valores de PZ, forem comparados permanecendo as demais variáveis intrínsecas a manutenção da estabilidade desse sistema, a expectativa é que o sistema que apresente os valores mais altos ou mais baixos de PZ, sejam os mais estáveis em relação à agregação (HUNTER, 1981). Portanto, os

valores obtidos para PZ nas amostras de nanop prata utilizadas com os extratos crioconcentrados, conferem a esta, quando comparadas com o extrato *in natura*, maior estabilidade coloidal.

5.2.2 Análise das AgNPs por MEV-EDS

Os ensaios em MEV-EDS dispostos nas Figuras 14, 15 e 16, conferem uma abordagem semiquantitativa aos resultados obtidos, uma vez que o objetivo do uso do MEV é prioritariamente visualizar os aspectos morfológicos e de polidispersividade das AgNPs.

Figura 16 - Micrografia em MEV-EDS das AgNPs referentes ao extrato *in natura* das folhas de *M. citrifolia*



Full scale counts: 1394

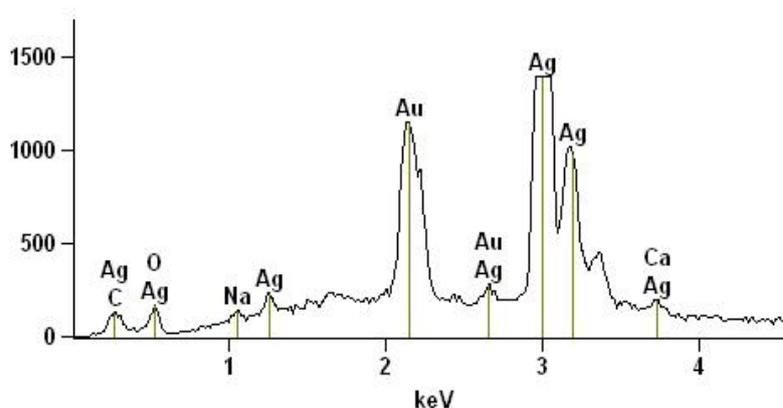
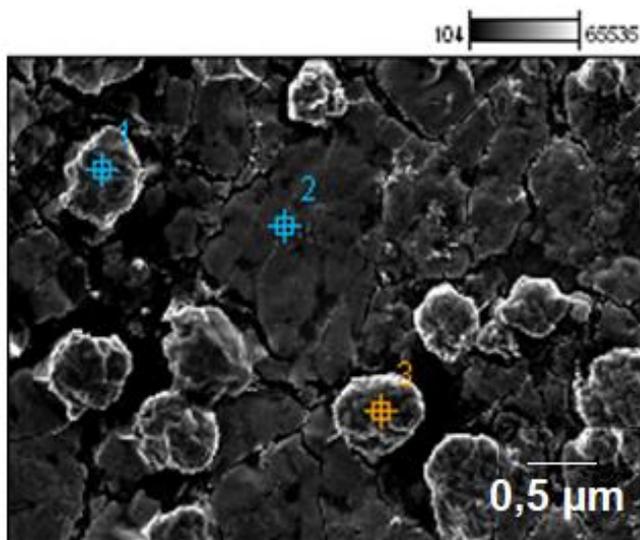
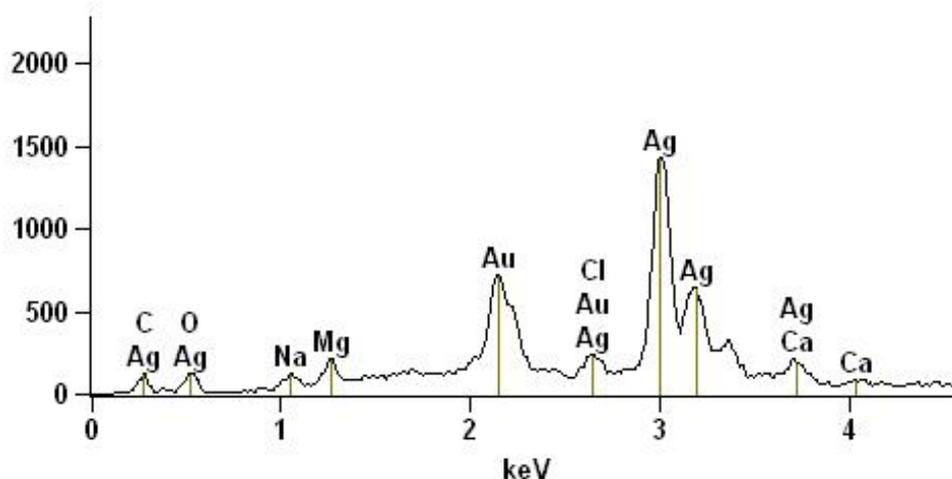


Figura 17 - Micrografia em MEV-EDS das AgNPs referentes ao extrato CC4-CCG das folhas de *M. citrifolia*.



Full scale counts: 1666

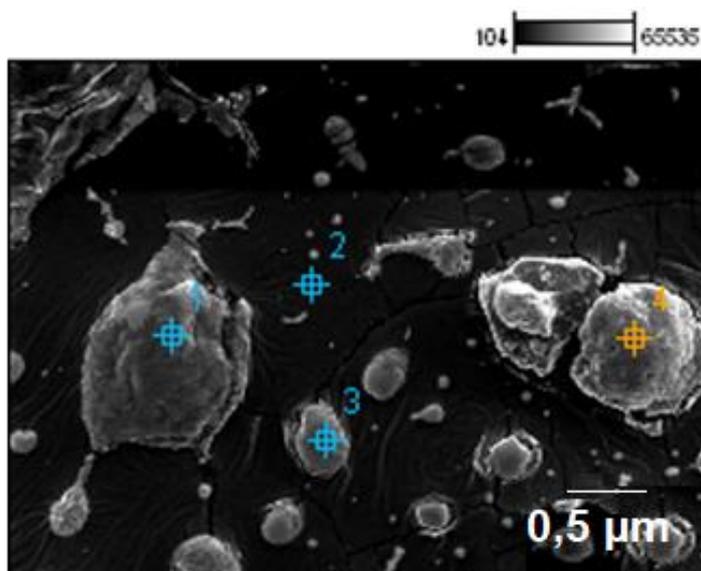


O uso do EDS acoplada ao sistema de microscopia possui o intuito de ser uma ferramenta qualitativa na confirmação da formação das AgNPs, corroborando assim com a efetividade da biossíntese. Nas micrografias em MEV-EDS, observa-se uma distribuição dispersa de AgNPs, seja nas amostras oriundas do extrato vegetal *in natura*, quando dos crioconcentrados em ambos os métodos de concentração executados.

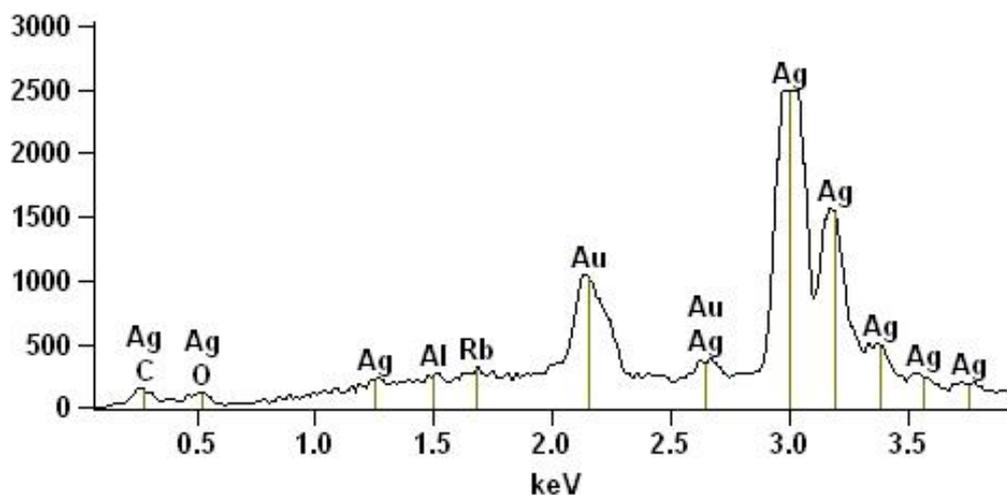
As AgNPs apresentaram-se como pequenos agregados em escala de até 500 nm, devido às limitações do equipamento. Como bem apresentado de acordo com as Figuras

14, 15 e 16, pode-se inferir que as nanopartículas de prata possuem formato aproximadamente esférico.

Figura 18 - Micrografia em MEV-EDS das AgNPs referentes ao extrato CC4-CCM das folhas de *M. citrifolia*.



Full scale counts: 2488



Além disso, é possível perceber a presença de resíduos de matéria orgânica não reativa, oriundo do extrato vegetal no entorno das AgNPs, tal aspecto é bastante comum, uma vez que tal presença de resíduos do extrato vegetal é resultante do maior acúmulo de

sólidos presentes nas amostras mais concentradas, esse resultado é bastante similar ao obtido por Morales-Lozoya et al. (2021). A presença de prata metálica foi confirmada analisando a amostra por EDS, para determinar sua composição. A presença de elementos químicos como Cu (suporte da amostra), Si, Na, Cl, O e C (oriundos do extrato), fazem parte da composição da amostra aquosa e corroboram com os estudos dispostos por Cvetkovikj et al. (2013) e Samateh et al. (2018). Por fim, a partir do ensaio EDS, também pode-se observar o pico de energia incidente, que de acordo com Suman et al. (2014), é característico da prata (3,0 keV), bem como sua abundância relativa nesse ponto.

Tabela 3 – Resumo dos resultados analíticos referentes ao processo de CCG dos extratos de folhas de *M. citrifolia*.

Amostra	Sólidos Totais (mg.L⁻¹)	Fenólicos Totais (mg GAE.mL⁻¹)	Tamanho de partícula (nm)	Potencial zeta (mV)
<i>In natura</i>	13,12 ± 0,04 ^a	0,81 ± 0,03 ^a	41	-9,85
CC1	17,33 ± 0,32 ^b	0,89 ± 0,01 ^b	--	--
CC2	34,18 ± 0,53 ^c	3,61 ± 0,03 ^c	--	--
CC3	54,69 ± 1,82 ^d	4,49 ± 0,06 ^d	--	--
CC4	86,91 ± 2,24 ^e	6,11 ± 0,01 ^e	23	-28,24
Gelo 1	1,21 ± 0,02 ^f	0,15 ± 0,01 ^f	--	--
Gelo 2	2,12 ± 0,03 ^g	0,29 ± 0,05 ^g	--	--
Gelo 3	3,14 ± 0,13 ^h	0,33 ± 0,01 ^h	--	--
Gelo 4	4,45 ± 0,20 ⁱ	0,37 ± 0,03 ⁱ	--	--

Os dados são expressos como média ± DP (n = 3). Os valores seguidos da mesma letra não diferem (ANOVA, seguido do teste de Tukey; p<0,05). Letras diferentes indicam diferenças significativas (p<0,05) para cada etapa da crioconcentração analisada.

-- Valores inexistentes.

Tabela 4 - Resumo dos resultados analíticos referentes ao processo de CCM dos extratos de folhas de *M. citrifolia*.

Amostra	Sólidos Totais (mg.L⁻¹)	Fenólicos Totais (mg GAE.mL⁻¹)	Tamanho de partícula (nm)	Potencial zeta (mV)
<i>In natura</i>	11,12 ± 0,22 ^a	0,71 ± 0,02 ^a	41	-9,85
CC1	13,18 ± 0,30 ^b	0,77 ± 0,02 ^b	--	--
CC2	26,17 ± 1,23 ^c	3,34 ± 0,12 ^c	--	--
CC3	41,15 ± 1,04 ^d	4,19 ± 0,15 ^d	--	--
CC4	67,43 ± 1,12 ^e	5,81 ± 0,46 ^e	34	-15,85
Gelo 1	1,98 ± 0,02 ^f	0,16 ± 0,00 ^f	--	--
Gelo 2	3,78 ± 0,03 ^g	0,37 ± 0,01 ^g	--	--
Gelo 3	4,03 ± 0,14 ^h	0,43 ± 0,02 ^h	--	--
Gelo 4	5,54 ± 0,20 ⁱ	0,58 ± 0,04 ⁱ	--	--

Os dados são expressos como média ± DP (n = 3). Os valores seguidos da mesma letra não diferem (ANOVA, seguido do teste de Tukey; p<0,05). Letras diferentes indicam diferenças significativas (p<0,05) para cada etapa da crioconcentração analisada.

-- Valores inexistentes.

Tabela 5 - Resumo dos resultados analíticos referentes às análises de fator de concentração e eficiência em ambos os processos de crioconcentração dos extratos de folhas de *M. citrifolia*.

Tipo de crioconcentração/Amostra		Fator de concentração para fenólicos	Fator de concentração para sólidos totais	Eficiência na retenção de fenólicos (%)	Eficiência na retenção de sólidos (%)
CCG	CC1	1,09 ± 0,01 ^a	1,32 ± 0,01 ^a	83,15 ± 0,01 ^a	93,01 ± 0,36 ^a
	CC2	4,45 ± 0,12 ^b	2,60 ± 0,05 ^b	91,97 ± 0,12 ^b	93,79 ± 0,41 ^{ab}
	CC3	5,54 ± 0,12 ^c	4,16 ± 0,03 ^c	92,65 ± 0,12 ^c	94,25 ± 0,23 ^c
	CC4	7,54 ± 0,43 ^d	6,62 ± 0,10 ^d	93,94 ± 0,23 ^d	94,87 ± 0,03 ^d
CCM	CC1	0,95 ± 0,01 ^e	1,18 ± 0,02 ^e	79,22 ± 0,01 ^e	84,97 ± 0,01 ^e
	CC2	4,12 ± 0,05 ^f	2,35 ± 0,01 ^f	88,92 ± 0,03 ^f	85,55 ± 0,03 ^f
	CC3	5,17 ± 0,03 ^g	3,70 ± 0,30 ^g	89,83 ± 0,01 ^g	90,20 ± 0,33 ^g
	CC4	7,17 ± 0,10 ^{dh}	6,06 ± 0,0 ^h	90,01 ± 0,20 ^{gh}	91,78 ± 0,11 ^h

Os dados são expressos como média ± DP (n = 3). Os valores seguidos da mesma letra não diferem (ANOVA, seguido do teste de Tukey; p<0,05). Letras diferentes indicam diferenças significativas (p<0,05) para cada etapa da crioconcentração analisada.

6. CONCLUSÕES

A opção pela utilização de técnicas de crioconcentração em bloco pelo método gravitacional e assistido por micro-ondas foi bastante satisfatória e eficiente no processo de retenção de compostos bioativos presentes em extratos de folhas de *M. citrifolia*. Diante desses métodos, não é necessário o uso de equipamentos robustos e caros, com fácil execução do processo e alto desempenho na recuperação do produto final.

Ambos os métodos de crioconcentração permitiram a retenção de grande quantidade de sólidos e compostos fenólicos nas frações concentradas, com altos fatores de concentração na retenção de solutos e alta eficiência na concentração de compostos fenólicos. Embora o uso da técnica de crioconcentração gravitacional tenha resultado em maior acúmulo de sólidos e compostos fenólicos retidos; ambos os métodos são considerados eficientes para esta finalidade.

Ambos os métodos de crioconcentração também permitiram a obtenção de um extrato concentrado com potencial comprovadamente demonstrado para síntese de nanometais com propriedades aprimoradas, uma vez que quando comparadas com o extrato *in natura*, o uso dos extratos mais concentrados em compostos fenólicos possibilitou a biossíntese de nanopartículas de prata de menor tamanho e maior estabilidade.

Por fim, levando em consideração que as folhas de noni são comprovadamente detentoras de alta quantidade de compostos bioativos com propriedades fitoterápicas, o presente estudo comprovou que a aplicação de uma tecnologia não térmica, conhecida como crioconcentração, para a separação e concentração de compostos bioativos de *Morinda citrifolia* não fomente foi altamente benéfica, como também abriu precedentes para exploração do produto obtido no amplo campo da nanobiotecnologia, tornando inédita a utilização da técnica na referida matéria-prima vegetal. Os resultados apresentados também sugerem que o presente estudo pode contribuir como referência na utilização de uma tecnologia barata e sustentável no reaproveitamento e tratamento de resíduos da indústria alimentícia, na geração de um produto promissor de alto valor biológico, visando potencializar a aquisição de bioativos, como compostos fenólicos; com ampla funcionalidade, bem como propriedades nutricionais e fitoterápicas aprimoradas.

7. REFERÊNCIAS

- (AOAC), A. of O. A. C. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 18, Revisi. ed. [s.l: s.n.]
- AALBERSBERG, W. G. L.; HUSSEIN, S.; SOTHEESWARAN, S.; PARKINSON, S. Carotenoids in the Leaves of *Morinda citrifolia*. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, v. 2, n. 1, p. 51–54, 1993.
- ADNAN, A.; MUSHTAQ, M.; ISLAM, T. ul. Fruit Juice Concentrates. In: **Fruit Juices: Extraction, Composition, Quality and Analysis**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018. p. 217–240.
- ADORNO, W. T.; REZZADORI, K.; AREND, G. D.; CHAVES, V. C.; REGINATTO, F. H.; DI LUCCIO, M.; PETRUS, J. C. C. Enhancement of phenolic compounds content and antioxidant activity of strawberry (*Fragaria × ananassa*) juice by block freeze concentration technology. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 3, p. 781–787, 2017.
- AIDER, M.; DE HALLEUX, D. Passive and microwave-assisted thawing in maple sap cryoconcentration technology. **Journal of Food Engineering**, v. 85, n. 1, p. 65–72, 2008.
- AIDER, M.; DE HALLEUX, D. Cryoconcentration technology in the bio-food industry: Principles and applications. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 3, p. 679–685, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2008.08.013>>.
- AIDER, M.; DE HALLEUX, D.; AKBACHE, A. Whey cryoconcentration and impact on its composition. **Journal of Food Engineering**, v. 82, n. 1, p. 92–102, 2007.
- AIDER, M.; DE HALLEUX, D.; MELNIKOVA, I. Gravitational and microwave-assisted thawing during milk whey cryoconcentration. **Journal of Food Engineering**, v. 88, n. 3, p. 373–380, 2008.
- AIDER, M.; OUNIS, W. Ben. Skim milk cryoconcentration as affected by the thawing mode: Gravitational vs. microwave-assisted. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n. 1, p. 195–202, 2012.
- AL-WHAIBI, M. H.; FIROZ, M.; AL-KHAISHANY, M. Y. Role of Nanoparticles in Plants. In: **Nanotechnology and Plant Sciences**. 1. ed. [s.l.] Springer,

Cham, 2015. p. 19–35.

ALI, M.; KENGANORA, M.; MANJULA, S. N. Health Benefits of *Morinda citrifolia* (Noni): A Review. **Pharmacognosy Journal**, v. 8, n. 4, p. 321–334, 2016.

ALMEIDA, É. S.; OLIVEIRA, D.; HOTZA, D. Properties and Applications of *Morinda citrifolia* (Noni): A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 00, p. 1541- 4337.12456, 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1541-4337.12456>>.

AREND, G. D.; ADORNO, W. T.; REZZADORI, K.; LUCCIO, M. Di; CHAVES, V. C.; REGINATTO, F. H.; PETRUS, J. C. C. Concentration of phenolic compounds from strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch) juice by nano filtration membrane. **Journal of Food Engineering**, v. 201, p. 36–41, 2017.

ASHOK KUMAR, D.; PALANICHAMY, V.; ROOPAN, S. M. Photocatalytic action of AgCl nanoparticles and its antibacterial activity. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 138, p. 302–306, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.06.011>>.

ASSANGA, I.; L.M, L. L.; E.G., R.-C.; SALIDO, G.-; ACOSTA-SILVA, A. A.; MEZA-CUETO, C. Y.; L., R.-P. J. Effect of maturity and harvest season on antioxidant activity, phenolic compounds and ascorbic acid of *Morinda citrifolia* L. (noni) grown in Mexico (with track change). **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 29, p. 4630–4639, 2013.

BREMER BOAVENTURA, B. C.; DA SILVA, E. L.; LIU, R. H.; PRUDÊNCIO, E. S.; DI PIETRO, P. F.; BECKER, A. M.; AMBONI, R. D. de M. C. Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) infusion obtained by freeze concentration technology on antioxidant status of healthy individuals. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, n. 2, p. 948–954, 2015.

CAO, G. Physical Chemistry of Solid Surfaces. In: **Nanostructures and Nanomaterials - Synthesis, Properties, and Applications**. 2. ed. [s.l.] World Scientific Series in Nanoscience and Nanotechnology, 2011. 2p. 19–60.

CARRILLO-LÓPEZ, A.; YAHIA, E. M. Noni (*Morinda citrifolia* L.). In: **Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits**. Elhadi M.

ed. [s.l.] Woodhead Publishing Limited, 2011. 4p. 51–64.

CHAN-BLANCO, Y.; VAILLANT, F.; MERCEDES PEREZ, A.; REYNES, M.; BRILLOUET, J. M.; BRAT, P. The noni fruit (*Morinda citrifolia* L.): A review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 6–7, p. 645–654, 2006.

CLARK, D. P.; PAZDERNIK, N. J. Nanobiotechnology. **Biotechnology**, p. 219–248, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123850157000077>>.

CORREA, L. J.; RUIZ, R. Y.; MORENO, F. L. Effect of falling-film freeze concentration on bioactive compounds in aqueous coffee extract. **Journal of Food Process Engineering**, v. 41, n. 1, p. 1–8, 2018.

CVETKOVIKJ, I.; STEFKOV, G.; ACEVSKA, J.; STANOEVA, J. P.; KARAPANDZOVA, M.; STEFOVA, M.; DIMITROVSKA, A.; KULEVANNOVA, S. Polyphenolic characterization and chromatographic methods for fast assessment of culinary *Salvia* species from South East Europe. **Journal of Chromatography A**, v. 1282, n. 22, p. 38–45, 2013.

DE MORAIS, M. G.; MARTINS, V. G.; STEFFENS, D.; PRANKE, P.; DA COSTA, J. A. V. Biological applications of nanobiotechnology. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 14, n. 1, p. 1007–17, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24730317>>.

DENG, S.; WEST, B. J.; JENSEN, C. J. Simultaneous characterisation and quantitation of flavonol glycosides and aglycones in noni leaves using a validated HPLC-UV/MS method. **Food Chemistry**, v. 111, n. 2, p. 526–529, 2008.

DENG, S.; WEST, B. J.; JENSEN, C. J. A quantitative comparison of phytochemical components in global noni fruits and their commercial products. **Food Chemistry**, v. 122, n. 1, p. 267–270, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.031>>.

DITTMAR, A. *Morinda citrifolia* L. - Use in Indigenous Samoan Medicine. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, v. 1, n. 3, p. 77–92, 1993.

DIXON, A. R.; MCMILLEN, H.; ETKIN, N. L. Ferment this: The

transformation of noni, a traditional polynesian medicine (*Morinda citrifolia*, Rubiaceae). **Economic Botany**, v. 53, n. 1, p. 51–68, 1999.

DUSSOSSOY, E.; BONY, E.; MICHEL, A.; BOUDARD, F.; GIAIMIS, J.; BRAT, P.; VAILLANT, F. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of the *Morinda citrifolia* fruit (Noni). **Acta Horticulturae**, v. 1040, p. 69–74, 2014.

EL-RAFIE, H. M.; EL-RAFIE, M. H.; ZAHRAN, M. K. Green synthesis of silver nanoparticles using polysaccharides extracted from marine macro algae. **Carbohydrate Polymers**, v. 96, n. 2, p. 403–410, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.071>>.

EL-SHERBINY, I. M.; SALIH, E. Green Synthesis of Metallic Nanoparticles Using Biopolymers and Plant Extracts. In: KANCHI, S.; AHMED, S. (Ed.). **Green Metal Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Their Applications**. 1. ed. [s.l.] Scrivener Publishing LLC, 2018. p. 89–115.

ELKINS, R. M. H. **Hawaiian Noni: Prize Herb of Hawaii and the South Pacific**. [s.l.] Woodland Publishing. Pleasant Grove, UT, 1998.

ESCALANTE-MINAKATA, P.; IBARRA-JUNQUERA, V.; CHÁVEZ-RODRÍGUEZ, A. M.; DE JESÚS ORNELAS-PAZ, J.; EMPARAN-LEGASPI, M. J.; PÉREZ-MARTÍNEZ, J. D.; VILLAVELÁZQUEZ-MENDOZA, C. I. Evaluation of the freezing and thawing cryoconcentration process on bioactive compounds present in banana juice from three different cultivars. **International Journal of Food Engineering**, v. 9, n. 4, p. 445–455, 2013.

H.Y., E.-K.; M.M., E.-S. Cytotoxic activity of biosynthesized gold nanoparticles with an extract of the red seaweed *Corallina officinalis* on the MCF-7 human breast cancer cell line. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 10, p. 4311–4317, 2014.

HAAS, I. C. da S.; ESPINDOLA, J. S. de; DE LIZ, G. R.; LUNA, A. S.; BORDIGNON-LUIZ, M. T.; PRUDÊNCIO, E. S.; DE GOIS, J. S.; FEDRIGO, I. M. T. Gravitational assisted three-stage block freeze concentration process for producing enriched concentrated orange juice (*Citrus sinensis* L.): Multi-elemental profiling and polyphenolic bioactives. **Journal of Food Engineering**, v. 315, n. August 2021, 2022.

HUNTER, R. J. The Calculation of Zeta Potential. In: **Zeta Potential in Colloid Science: Principles and applications**. London: Academic Press Limited, 1981. p. 59–124.

JADOUN, S.; ARIF, R.; JANGID, N. K.; MEENA, R. K. Green synthesis of nanoparticles using plant extracts: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 19, n. 1, p. 355–374, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10311-020-01074-x>>.

JAIN, K. K. Nanobiotechnology. **Comprehensive Biotechnology**, p. 599–614, 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780080885049000684>>.

KHAJEHEI, F.; NIAKOUSARI, M.; ESKANDARI, M. H.; SARSHAR, M. Production of Pomegranate Juice Concentrate by Complete Block Cryoconcentration Process. **Journal of Food Process Engineering**, v. 38, n. 5, p. 488–498, 2015.

KUMAR, A.; CHISTI, Y.; CHAND, U. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 2, p. 346–356, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.01.003>>.

KUMAR, S.; SINGH, M.; HALDER, D.; MITRA, A. Mechanistic study of antibacterial activity of biologically synthesized silver nanocolloids. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 449, n. 1, p. 82–86, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.02.027>>.

LACHENMEIER, K.; MUSSHOFF, F.; MADEA, B.; REUSCH, H.; LANCHENMEIER, D. Authentication of Noni (*Morinda citrifolia*) Juice. **Deutsche Lebensmittel-Rundschau**, v. 2, p. 58–61, 2006.

LI, S.; SHEN, Y.; XIE, A.; YU, X.; QIU, L.; ZHANG, L.; ZHANG, Q. Green synthesis of silver nanoparticles using *Capsicum annuum* L. extract. **Green Chem**, v. 9, p. 852–858, 2007.

LI, X.; XU, H.; CHEN, Z.-S.; CHEN, G. Biosynthesis of Nanoparticles by Microorganisms and Their Applications. **Nanostructures for Medicine and Pharmaceuticals**, p. 1–16, 2011.

LIN, S.-Y.; LIAO, Y.-Y.; ROAN, S.-F.; CHEN, I.-Z.; CHEN, P.-A. Growth of noni fruits (*Morinda citrifolia* L.) and accumulation of phenolic compounds during fruit development. **Scientia Horticulturae**, v. 178, p. 168–174, 2014. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2014.08.013>>.

MARTIN-DIANA, A. B.; IZQUIERDO, N.; ALBERTOS, I.; SANCHEZ, M. S.; HERRERO, A.; SANZ, M. A.; RICO, D. Valorization of Carob's Germ and Seed Peel as Natural Antioxidant Ingredients in Gluten-Free Crackers. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, n. 2, p. 1–13, 2017.

MITTAL, A. K.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 2, p. 346–356, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.01.003>>.

MORALES-LOZOYA, V.; ESPINOZA-GÓMEZ, H.; Z. FLORES-LÓPEZ, L.; SOTELO-BARRERA, E. L.; NÚÑEZ-RIVERA, A.; CADENA-NAVA, R. D.; ALONSO-NUÑEZ, G.; RIVERO, I. A. Study of the effect of the different parts of *Morinda citrifolia* L. (noni) on the green synthesis of silver nanoparticles and their antibacterial activity. **Applied Surface Science**, v. 537, n. September 2020, p. 147855, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2020.147855>>.

MORENO, F. L.; ROBLES, C. M.; SARMIENTO, Z.; RUIZ, Y.; PARDO, J. M. Effect of separation and thawing mode on block freeze-concentration of coffee brews. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, n. 4, p. 396–402, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2013.02.007>>.

MOTSHAKERI, M.; GHAZALI, H. M. Nutritional, phytochemical and commercial quality of Noni fruit: A multi-beneficial gift from nature. **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, n. 1, p. 118–129, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2015.06.004>>.

MUÑOZ, I. de B.; RUBIO, A.; BLANCO, M.; RAVENTÓS, M.; HERNÁNDEZ, E.; PRUDÊNCIO, E. S. Progressive freeze concentration of skimmed milk in an agitated vessel: Effect of the coolant temperature and stirring rate on process performance. **Food Science and Technology International**, v. 25, n. 2, p. 150–159, 2019.

NAGRA, U.; SHABBIR, M.; ZAMAN, M.; MAHMOOD, A.; BARKAT, K. Review on Methodologies Used in the Synthesis of Metal Nanoparticles: Significance of Phytosynthesis Using Plant Extract as an Emerging Tool. **Current Pharmaceutical**

Design, v. 26, p. 5188–5204, 2020.

NAIKOO, G. A.; MUSTAQEEM, M.; HASSAN, I. U.; AWAN, T.; ARSHAD, F.; SALIM, H.; QURASHI, A. Bioinspired and green synthesis of nanoparticles from plant extracts with antiviral and antimicrobial properties: A critical review. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 25, n. 9, p. 101304, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jscs.2021.101304>>.

NELSON, S. Noni Seed Handling and Seedling Production. **Fruits and Nuts**, p. 8–11, 2005.

NELSON, S. C. Noni cultivation in Hawaii. **Fruits and Nuts**, n. 4, p. 2–5, 2001.

NELSON, S. C. Noni Cultivation and Production in Hawai‘i. In: Proceedings of the 2002 Hawai‘i Noni Conference, Mānoa, Hawai‘i. **Anais...** Mānoa, Hawai‘i: Agriculture and Human Resources, 2003.

NELSON, S. C.; ELEVITCH, C. R. Making noni products. In: **Noni : the complete guide for consumers and growers**. Holualoa, Hawaii.: Permanent Agriculture Resources, 2006. p. 67–80.

OLIVEIRA, I. R.; STUDART, A. R.; PILEGGI, R. G.; PANDOLFELLI, V. C. **Dispersão e empacotamento de partículas: Princípios e aplicações em processamento cerâmico**. São Paulo: Fazenda Arte, 2000.

ORELLANA-PALMA, P.; GONZÁLEZ, Y.; PETZOLD, G. Improvement of Centrifugal Cryoconcentration by Ice Recovery Applied to Orange Juice. **Chemical Engineering and Technology**, n. 4, p. 925–931, 2019.

ORELLANA-PALMA, P.; PETZOLD, G.; GUERRA-VALLE, M.; ASTUDILLO-LAGOS, M. Impact of block cryoconcentration on polyphenol retention in blueberry juice. **Food Bioscience**, v. 20, n. August, p. 149–158, 2017a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2017.10.006>>.

ORELLANA-PALMA, P.; PETZOLD, G.; PIERRE, L.; PENSABEN, J. M. Protection of polyphenols in blueberry juice by vacuum-assisted block freeze concentration. **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, p. 1093–1102, 2017b.

OSTHOFF, G.; HUGO, A.; WIT, M. de. The composition of cheetah (*Acinonyx jubatus*) milk. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 145, n. Part B, p. 265–

269, 2006.

PAI, A. R.; KAVITHA, S.; S, S. R. A. J.; PRIYANKA, P.; VRINDA, A.; VIVIN, T. S.; SASIDHARAN, S. Green synthesis and characterizations of silver nanoparticles using fresh leaf extract of *Morinda citrifolia* and its anti-microbial activity studies. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 3, p. 459–461, 2015.

PAPER, R.; SABRI, M. A.; UMER, A.; AWAN, G. H.; HASSAN, M. F.; HASNAIN, A. Selection of Suitable Biological Method for the Synthesis of Silver Nanoparticles Regular Paper. p. 1–20, 2016.

PERALTA-VIDEA, J. R.; HUANG, Y.; PARSONS, J. G.; ZHAO, L.; LOPEZ-MORENO, L.; HERNANDEZ-VIEZCAS, J. A.; GARDEA-TORRESDEY, J. L. Plant-based green synthesis of metallic nanoparticles: scientific curiosity or a realistic alternative to chemical synthesis? **Nanotechnology for Environmental Engineering**, v. 1, n. 1, p. 1–29, 2016.

PETER, P. I.; PETER, K. V. Noni (*Morinda citrifolia* L .): Research and Development. **New Age Herbals**, p. 55–69, 2018.

PETZOLD, G.; AGUILERA, J. M. Centrifugal freeze concentration. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 20, p. 253–258, 2013. Disponible em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2013.05.010>>.

PETZOLD, G.; MORENO, J.; GIANELLI, M. P.; CERDA, F.; MELLA, K.; ZÚÑIGA, P.; ORELLANA, P. Approach of food technologies for preservation and enrichment of bioactive compounds, improving the organoleptic properties. In: GRUMEZESCU, A.; HOLBAN, A.-M. (Ed.). **Food Processing for Increased Quality and Consumption**. 1st. ed. [s.l.] Academic Press, 2018. p. 67–92.

PETZOLD, G.; MORENO, J.; LASTRA, P.; ROJAS, K.; ORELLANA, P. Block freeze concentration assisted by centrifugation applied to blueberry and pineapple juices. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 30, p. 192–197, 2015. Disponible em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2015.03.007>>.

PETZOLD, G.; NIRANJAN, K.; AGUILERA, J. M. Vacuum-assisted freeze concentration of sucrose solutions. **Journal of Food Engineering**, v. 115, n. 3, p. 357–

361, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.10.048>>.

PETZOLD, G.; ORELLANA, P.; MORENO, J.; CERDA, E.; PARRA, P. Vacuum-assisted block freeze concentration applied to wine. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 36, p. 330–335, 2016.

PHILIP, D.; UNNI, C.; AROMAL, S. A.; VIDHUA, V. K. Murraya Koenigii leaf-assisted rapid green synthesis of silver and gold nanoparticles. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 78, n. 2, p. 899–904, 2011.

PRASAD, R. Synthesis of Silver Nanoparticles in Photosynthetic Plants. **Journal of Nanoparticles**, v. 2014, p. 1–8, 2014.

PRAWITWONG, P.; TAKIGAMI, S.; PHILLIPS, G. O. Phase transition behaviour of sorbed water in Konjac mannan. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 8, p. 1368–1373, 2007.

ROSS, I. A. **Medicinal Plants of the World: Chemical Constituents, Traditional and Modern Medicinal Uses, Volume 2**. 1. ed. [s.l.] Humana Press, 2001.

SAFIEL, N. Z.; NGADI, N.; JOHARI, A.; ZAKARIA, Z. Y.; JUSOH, M. Grape Juice Concentration by Progressive Freeze Concentrator Sequence System. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, n. 1, p. 1–11, 2017.

SAMATEH, M.; POTTACKAL, N.; MANAFIRASI, S.; VIDYASAGAR, A.; MALDARELLI, C.; JOHN, G. Unravelling the secret of seed-based gels in water: the nanoscale 3D network formation. **Scientific Reports**, v. 8, p. 1–8, 2018.

SANG, S.; CHENG, X.; ZHU, N.; STARK, R. E.; BADMAEV, V.; GHAI, G.; ROSEN, R. T.; HO, C. Flavonol Glycosides and Novel Iridoid Glycoside from the Leaves of Morinda citrifolia. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4478–4481, 2001a.

SANG, S.; CHENG, X.; ZHU, N.; WANG, M.; JHOO, J. W.; STARK, R. E.; BADMAEV, V.; GHAI, G.; ROSEN, R. T.; HO, C. T. Iridoid glycosides from the leaves of Morinda citrifolia. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 6, p. 799–800, 2001b.

SANG, S.; WANG, M.; KAN, H.; LIU, G.; DONG, Z.; BADMAEV, V.; ZHENG, Q. Y.; GHAI, G.; ROSEN, R. T.; HO, C.-T. Chemical Components in Noni Fruits and Leaves (*Morinda citrifolia* L). In: HO, C.-T.; ZHENG, Q. Y. (Ed.). **Quality**

Management of Nutraceuticals. Washington, DC: American Chemical Society, 2002. p. 134–150.

SARATALE, R. G.; SARATALE, G. D.; SHIN, H. S.; JACOB, J. M.; PUGAZHENDHI, A.; BHAIASARE, M.; KUMAR, G. New insights on the green synthesis of metallic nanoparticles using plant and waste biomaterials: current knowledge, their agricultural and environmental applications. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 11, p. 10164–10183, 2018.

SATHISHKUMAR, G.; GOBINATH, C.; KARPAGAM, K.; HEMAMALINI, V.; PREMKUMAR, K.; SIVARAMAKRISHNAN, S. Phyto-synthesis of silver nanoscale particles using *Morinda citrifolia* L. and its inhibitory activity against human pathogens. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 95, p. 235–240, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.03.001>>.

SHALAN, N. A. A. M.; MUSTAPHA, N. M.; MOHAMED, S. Noni leaf and black tea enhance bone regeneration in estrogen-deficient rats. **Nutrition**, v. 33, p. 42–51, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2016.08.006>>.

SHAW, D. J. Colloid stability. In: **Introduction to Colloid and Surface Chemistry**. Fourth ed. [s.l: s.n.]p. 210–243.

SIDDIQUI, M. H.; AL-WHAIBI, M. H.; MOHAMMAD, F. **Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts**. [s.l: s.n.]

SINGH, D. R.; SINGH, S. Phytochemicals in plant parts of noni (*Morinda citrifolia* L.) with special reference to fatty acid profiles of seeds. **Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences**, v. 83, n. 3, p. 471–478, 2013.

SINGH, J.; DUTTA, T.; KIM, K.-H.; RAWAT, M.; SAMDDAR, P.; KUMAR, P. ‘Green’ synthesis of metals and their oxide nanoparticles: applications for environmental remediation. **Journal of nanobiotechnology**, v. 16, n. 84, p. 1–24, 2018.

SINGH, P.; KIM, Y. J.; ZHANG, D.; YANG, D. C. Biological Synthesis of Nanoparticles from Plants and Microorganisms. **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 7, p. 588–599, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.02.006>>.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with

phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal Enology Viticulture**, v. 16, p. 44–58, 1965.

SOLOMON, N. **The Noni Phenomenon. Discover the powerful tropical healer that fights cancer, lowers high blood pressure and relieves chronic pain.** [s.l.] Direct Source Publishing, 1999.

SRIVATSAN, T. S. *Nanomaterials: Synthesis, Properties, and Applications*, A. S. Edelstein and R. C. Cammarata, Editors. **Materials and Manufacturing Processes**, v. 27, n. 10, p. 1145–1145, 2012. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10426914.2012.689458>>.

SU, B. N.; PAWLUS, A. D.; JUNG, H. A.; KELLER, W. J.; MCLAUGHLIN, J. L.; KINGHORN, A. D. Chemical constituents of the fruits of *Morinda citrifolia* (Noni) and their antioxidant activity. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 4, p. 592–595, 2005.

SUMAN, T. Y.; RADHIKA RAJASREE, S. R.; KANCHANA, A.; ELIZABETH, S. B. Biosynthesis, characterization and cytotoxic effect of plant mediated silver nanoparticles using *Morinda citrifolia* root extract. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 106, p. 74–78, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.01.037>>.

SUMAN, T. Y.; RADHIKA RAJASREE, S. R.; RAMKUMAR, R.; RAJTHILAK, C.; PERUMAL, P. The Green synthesis of gold nanoparticles using an aqueous root extract of *Morinda citrifolia* L. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 118, p. 11–16, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2013.08.066>>.

SUMAN, T. Y.; RAVINDRANATH, R. R. S.; ELUMALAI, D.; KALEENA, P. K.; RAMKUMAR, R.; PERUMAL, P.; ARANGANATHAN, L.; CHITRARASU, P. S. Larvicidal activity of titanium dioxide nanoparticles synthesized using *Morinda citrifolia* root extract against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* and its other effect on non-target fish. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 5, n. 3, p. 224–230, 2015.

SUNDRARAJAN, M.; BAMA, K.; BHAVANI, M.; JEGATHEESWARAN, S.;

AMBIKA, S.; SANGILI, A.; NITHYA, P.; SUMATHI, R. Obtaining titanium dioxide nanoparticles with spherical shape and antimicrobial properties using *M. citrifolia* leaves extract by hydrothermal method. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 171, n. February, p. 117–124, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.05.003>>.

SYAFIUDDIN, A.; SALMIATI; HADIBARATA, T.; SALIM, M. R.; KUEH, A. B. H.; SARI, A. A. A purely green synthesis of silver nanoparticles using *Carica papaya*, *Manihot esculenta*, and *Morinda citrifolia*: synthesis and antibacterial evaluations. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 40, n. 9, p. 1349–1361, 2017.

THANI, W.; VALLISUTA, O.; SIRIPONG, P.; RUANGWISES, N. Anti-proliferative and antioxidative activities of Thai noni/Yor (*Morinda citrifolia* Linn.) leaf extract. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 41, n. 2, p. 482–489, 2010.

TONTRONG, S.; KHONYOUNG, S.; JAKMUNEE, J. Flow injection spectrophotometry using natural reagent from *Morinda citrifolia* root for determination of aluminium in tea. **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 624–629, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.100>>.

VAN BEEK, T.; BUDDE, M.; VAN ESCH, J. Membrane-Freeze Concentration Hybrid for Temperature-Sensitive Biomolecules. Investigation, Application, and Techno-Economic Benefits. **Chemical Engineering and Technology**, v. 41, n. 12, p. 2385–2392, 2018.

WANG, M.-Y.; WEST, B. J.; JENSEN, C. J.; NOWICKI, D.; SU, C.; PALU, A. K.; ANDERSON, G. *Morinda citrifolia* (Noni): a literature review and recent advances in Noni research. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 23, n. 12, p. 1127–1141, 2002.

XAVIER, M. M. M.; MACHADO, A. V.; COSTA, R. de O. Bleaching of fruit and vegetables: A literature review. **Brazilian Journal of Agrotechnology**, v. 4, n. 1, p. 6–9, 2014.