



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Betina Luiza Koop

**Desenvolvimento de compósitos à base de compostos bioativos do jambolão
(*Syzygium cumini* (L.) Skeels) e montmorilonita: estudo da interação
bioativo/argila para aplicação em alimento e embalagem**

Florianópolis

2022

Betina Luiza Koop

**Desenvolvimento de compósitos à base de compostos bioativos do jambolão
(*Syzygium cumini* (L.) Skeels) e montmorilonita: estudo da interação
bioativo/argila para aplicação em alimento e embalagem**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do título de doutora em engenharia de alimentos.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Alcilene Rodrigues M. Fritz
Coorientador: Prof. Dr. Germán Ayala Valencia.

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Koop, Betina Luiza

Desenvolvimento de compósitos à base de compostos bioativos do jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) e montmorilonita: estudo da interação bioativo/argila para aplicação em alimento e embalagem / Betina Luiza Koop ; orientador, Alcilene Rodrigues Monteiro Fritz , coorientador, Germán Ayala Valencia, 2022.

172 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. Compostos bioativos; Corante natural; Argilas minerais; Propriedades antioxidantes; Efeito anti-inflamatório.. I. Fritz , Alcilene Rodrigues Monteiro . II. Valencia, Germán Ayala . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Betina Luiza Koop

**Desenvolvimento de compósitos à base de compostos bioativos do jambolão
(*Syzygium cumini* (L.) Skeels) e montmorilonita: estudo da interação
bioativo/argila para aplicação em alimento e embalagem**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Dra Alcilene Rodrigues Monteiro Fritz - Presidente - UFSC

Prof. Dr. Acácio Antonio Ferreira Zielinski - Membro interno - UFSC

Prof. Dra Silvani Verruck - Membro externo - UFSC

Prof. Dra Simone Hickmann Flôres - Membro externo - UFRGS

Certificamos que esta é a versão **original e final** do trabalho de conclusão que foi
julgado adequado para obtenção do título de doutora em Engenharia de Alimentos.

Profa. Dra Sandra Regina Salvador Ferreira
Coordenadora do Programa

Profa. Dra Alcilene Rodrigues Monteiro Fritz
Orientadora

Florianópolis, 2022.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, por me conceder força e proteção! Aos meus pais, pelo amor e carinho incondicional, pela educação e apoio, por não medirem esforços para me ajudar em todos os momentos. Aos meus irmãos, cunhado (a), pela nossa amizade, por todo apoio e companheirismo.

Ao meu noivo, Mateus Antonio Knapp, por estar sempre disponível a me ajudar, pela paciência, apoio e incentivo. A toda minha família e amigos que sempre me dão forças para continuar.

Agradeço à minha orientadora Prof. Dra. Alcilene Rodrigues Monteiro e ao meu Coorientador Germán Ayala Valencia, pela confiança, oportunidade, conhecimentos compartilhados e por todo apoio prestado no desenvolvimento da tese.

Agradeço aos meus colegas e amigos de laboratório (PROFI) pela amizade, companheirismo, pelo conhecimento compartilhado e por toda ajuda. Agradeço aos integrantes do grupo de pesquisa NanoBioFood, pela amizade, ajuda e por todos os conhecimentos compartilhados.

Agradeço aos Professores: Marco Di Luccio, Vania Zanella Pinto, Luciano Tormen, Eduardo Monguilhott Dalmarco e Silvani Verruck pela colaboração no trabalho e disponibilidade de uso de seus laboratórios para realização dos experimentos.

Ao laboratório PROFI, onde foi realizada a maior dos experimentos, por dar suporte e condições para realização do trabalho. À Central de Análises do EQA, LINDEN, LCME pela disponibilidade de equipamentos e suporte necessários para realização das análises.

À UFSC e ao PPGEAL pela oportunidade de realizar este trabalho. Agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina, à CAPES e ao CNPq, pelo suporte financeiro e ensino de qualidade.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos pelos ensinamentos. A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho, muito obrigada!

RESUMO

O jambolão é uma fruta exótica, pouco valorizada e rica em compostos bioativos, como as antocianinas, o ácido gálico e a catequina que possuem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Estudos que possam mostrar a importância dos compostos dessa matéria-prima, a partir da sua recuperação, permitirá a valorização deste fruto, ainda não comercializado para consumo de mesa e/ou para fins industriais. Um dos compostos identificados como majoritários na polpa de jambolão são as antocianinas, pigmentos naturais, que podem ser utilizados na indústria de alimentos, farmacêutica, de embalagens e de cosméticos, principalmente como corante em alimentos, mas também como um ingrediente ativo. Entretanto, as antocianinas se degradam na presença de luz, alta temperatura ($> 40\text{ }^{\circ}\text{C}$), pH alcalino e oxigênio. A proteção destes compostos é essencial para a manutenção de sua efetividade. Neste contexto, esta pesquisa se propôs a extrair e proteger as antocianinas da polpa de jambolão, desenvolvendo um material biohíbrido, por intercalação dos compostos bioativos em uma matriz adsorvente. Portanto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver, caracterizar e aplicar um biohíbrido à base de compostos bioativos do extrato de jambolão e montmorilonita. Para alcançar o objetivo, a pesquisa foi realizada em etapas, conforme apresentadas a seguir. Na etapa 1: foi realizada a extração dos compostos bioativos da polpa e casca dos frutos pelo método sólido-líquido usando água destilada e ácido cítrico (1%). O extrato foi caracterizado quanto sua composição química em que foram identificados os compostos fenólicos, catequina e ácido gálico, e também foram identificadas antocianinas, como petunidina, malvidina e delphinidina, 3,5-diglicosídeo, responsáveis pelas propriedades bioativas do extrato. A partir desse resultado, seguiu-se para a etapa 2, com o objetivo de proteger os compostos bioativos, um material biohíbrido foi produzido usando montmorilonita e extrato de jambolão e o estudo da adsorção e dessorção dos compostos bioativos do extrato na argila (montmorilonita) a diferentes temperaturas (10, 20 e 30 $^{\circ}\text{C}$) e pHs (1,5; 2,5 e 3,5) foi realizado. Foi analisado também, a efetividade do material quanto suas atividades biológicas. O biohíbrido obtido apresentou coloração rosa e estável em condições controladas de armazenamento a 5 e 25 $^{\circ}\text{C}$ por 60 dias. Além disso, apresentou propriedade antioxidante por DPPH e efeito anti-inflamatório com redução significativa de óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF- α e IL-1 β . Na etapa seguinte, balas de gelatina foram desenvolvidas usando o extrato ou o biohíbrido como corante natural. Foram analisadas as propriedades físico-químicas das balas e sua digestibilidade em modelo de digestão *in vitro*. As balas de gelatina com biohíbrido apresentaram coloração roxa intensa e maior estabilidade quando comparadas as balas com extrato. O biohíbrido protegeu as balas quanto a cor, fenólicos totais, antocianinas e proporcionou liberação controlada dos compostos bioativos durante a digestão. As frações de compostos bioativos das balas foram identificadas na fase intestinal, indicando que estão acessíveis e podem exercer sua bioatividade. Na terceira e última etapa o biohíbrido foi aplicado em indicadores a base de amido produzidos por termocompressão. O biohíbrido foi bem disperso na matriz de amido, de acordo com os resultados de sua morfologia e o indicador inteligente desenvolvido apresentou propriedades como mudança de cor em diferentes pH's (ácido e básico) e sob vapor de amônia, resultado semelhante também foi observado para o extrato de jambolão. Assim, uma das aplicações desse material pode ser no monitoramento da qualidade de produtos cárneos durante o armazenamento.

Palavras-chave: Compostos bioativos; Corante natural; Argilas minerais; Propriedades antioxidantes; Efeito anti-inflamatório.

ABSTRACT

Jambolan is an exotic fruit that is undervalued and rich in bioactive compounds, such as anthocyanins, gallic acid, and catechin, which have antioxidant and anti-inflammatory properties. Studies showing the importance of the compounds of this raw material from its recovery will allow the valorization of this fruit, which is not yet commercialized for table consumption and/or industrial purposes. One of the compounds identified as the majority in jambolan pulp are anthocyanins, natural pigments, which can be used in the food, pharmaceutical, packaging, and cosmetics industries, mainly as a coloring agent in foods but also as an active ingredient. However, anthocyanins degrade in the presence of light, high temperature ($> 40\text{ }^{\circ}\text{C}$), alkaline pH, and oxygen. The protection of these compounds is essential to maintain their effectiveness. In this context, this research aimed to extract and protect anthocyanins from jambolan pulp, developing a biohybrid material by intercalating the bioactive compounds in an adsorbent matrix. Therefore, this work aimed to develop, characterize and apply a biohybrid based on bioactive compounds from jambolan extracts and montmorillonite. The research was carried out in stages to achieve the objective, as shown below. Stage 1: the extraction of the bioactive compounds from the pulp and peel of the fruits was carried out by the solid-liquid method using distilled water and citric acid (1%). The extract was characterized by its chemical composition, in which compounds such as catechin and gallic acid were identified, and anthocyanins such as petunidin, malvidin, and delphinidin, 3,5-diglycoside, responsible for the bioactive properties of the extract were also identified. From this result, we proceeded to step 2. In order to protect the bioactive compounds, a biohybrid material was produced using montmorillonite and jambolan extract, and the study of the adsorption and desorption of bioactive compounds onto clay (montmorillonite) at different temperatures (10, 20, and 30 $^{\circ}\text{C}$) and pHs (1.5; 2.5 and 3.5) was carried out. It also analyzed the effectiveness of the material regarding its biological activities. The biohybrid obtained showed a pink color and was stable under controlled storage conditions at 5 and 25 $^{\circ}\text{C}$ for 60 days. In addition, it showed antioxidant properties by DPPH and an anti-inflammatory effect with a significant reduction of nitric oxide and pro-inflammatory cytokines IL-6, TNF- α , and IL-1 β . In the next step, gelatin candies were developed using the extract or the biohybrid as a natural dye. The physicochemical properties of the candies and their digestibility were analyzed in an *in vitro* digestion model. Gelatin candies with biohybrid showed intense purple color and greater stability when compared to candies with the extract. The biohybrid protected the candies in terms of color, total phenolic compounds, and anthocyanins and provided controlled release of bioactive compounds during digestion. The fractions of bioactive compounds in the candies were identified in the intestinal phase, indicating that they are available and can exert their bioactivity. In the third and last step, the biohybrid was applied to indicators based on starch produced by thermocompression. The biohybrid was well dispersed in the starch matrix, according to the results of its morphology, and the intelligent indicator developed showed properties such as color change at different pH's (acidic and basic), and under ammonia vapor, a similar result was also observed for jambolan extract. Thus, one of the applications of this material can be in monitoring the quality of meat products during storage.

Keywords: Bioactive compounds. Natural dye. Mineral clays. Antioxidant properties. Anti-inflammatory effect.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Frutos de jambolão maduros. | 28 |
| Figura 2 - Estrutura básica das antocianidinas..... | 33 |
| Figura 3 - Transformações estruturais de antocianinas em solução ácida para neutra. | 35 |
| Figura 4 - Possíveis mecanismos de degradação para delphinidina e petunidina. | 36 |
| Figura 5 - Processo de separação por membranas de Ultrafiltração (UF) e Nanofiltração (NF). | 38 |
| Figura 6 - Processo de adsorção de compostos bioativos com o uso de argilas. | 40 |
| Figura 7 - Estrutura da argila montmorilonita. | 42 |
| Figura 8 – Resumo gráfico do capítulo..... | 51 |
| Figura 9 - Fluxos de permeado da filtração do extrato de jambolão em diferentes membranas (a - UH004, b - NP010, c - NF270, d - NF90). | 59 |
| Figura 10 - Dados experimentais e modelos preditos para o fluxo de permeado da filtração do extrato de jambolão por UF e NF..... | 61 |
| Figura 11 - Espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier da superfície das membranas antes e depois da filtração por Ultra (UF) e Nanofiltração (NF). | 62 |
| Figura 12 - Aspectos visuais das frações de extrato de jambolão obtidas por UF e NF para as membranas (a) UH004, (b) NP010, (c) NF270 e (d) NF90..... | 65 |
| Figura 13 - Cromatograma das antocianinas identificadas no extrato de jambolão concentrado e extrato da alimentação. | 70 |
| Figura 14 - Fator de concentração para sólidos totais (ST), fenólicos totais (FT), antocianinas (ACNs), ácido gálico e catequina. | 71 |
| Figura 15 - Resumo gráfico do capítulo. | 73 |
| Figura 16 - (a) Extrato rico em antocianinas (ACNs); (b) Montmorilonita (Mnt) adicionada ao extrato; (c) Biohíbrido precipitado (BH) no final do experimento de adsorção..... | 81 |
| Figura 17 - Isotherma de adsorção (teor de ACNs estimado no equilíbrio $[C_e]$ /teor de ACNs estimado no tempo zero $[C_0]$ vs. concentração de montmorilonita no tempo t $[Mnt]$ /concentração máxima de montmorilonita $[Mnt_m]$), em diferentes temperaturas. | 82 |

| | |
|---|-----|
| Figura 18 - (a) Isoterma de adsorção (teor de antocianinas estimadas no equilíbrio $[C_e]$ /teor de antocianinas no tempo inicial $[C_0]$ vs. concentração de montmorilonita (Mnt) no tempo $[Mnt]$ /concentração máxima de Mnt $[Mnt_m]$), em diferentes temperaturas (10 °C $[■]$ e 20 °C $[●]$), e pH = 1,5; (b) Langmuir (-) e Freundlich (- -) equações ajustadas à curva isotérmica de adsorção típica (teor de ACNs adsorvida na Mnt no equilíbrio $[Q_e]$ vs. teor de ACNs estimadas no equilíbrio $[C_e]$). | 83 |
| Figura 19 - Cinética de adsorção (concentração de antocianinas (ACNs) estimadas no tempo t $[C_t/C_0]$ vs. Tempo (min)), em diferentes concentrações de montmorilonita (Mnt) (0,003 $[■]$, 0,007 $[●]$, 0,013 $[▲]$, e 0,027 $[✕]$ g de Mnt/mg de ACNs), a 20 °C e pH = 1,5. | 86 |
| Figura 20 - Taxa de dessorção (D, %) do biohíbrido (BH) vs. tempo de dessorção (t) em diferentes concentrações de etanol (95% $[■]$ e 50% $[●]$). | 89 |
| Figura 21 - Difractogramas de raio X (DRX) para Mnt não tratada (MNT); Mnt tratada com ácido cítrico (MNT-M); biohíbrido (BH) e biohíbrido após dessorção (DES). | 91 |
| Figura 22 - Espectros FTIR para Mnt não tratada (-), Mnt tratada com ácido cítrico (-) biohíbrido (-) e biohíbrido após dessorção (-). | 92 |
| Figura 23 - Imagens MEV e EDS obtidas para (a) Mnt não tratada, (b) Mnt tratada com ácido e (c) BH. | 93 |
| Figura 24 - (A) Cor visível do pó biohíbrido (BH) (sobrenadante) imerso em soluções tampão com diferentes pHs (1 e 12); (B) Mudança de cor (ΔE^*) do BH exposto ao vapor de amônia: a) 15%, b) 10% e c) 5% nos tempos: 0, 2, 4, 8 e 10 min. | 97 |
| Figura 25 - (A) Mudanças de cor do indicador biohíbrido (BH) no armazenamento de camarão, imediatamente após a embalagem e após três dias de armazenamento a 5 e 25 °C. (B) Valores de mudança de cor (ΔE^*) do indicador BH ($[●]$) e pH da carne de camarão ($[■]$) no armazenamento a 5 °C (a) e 25 °C (b). | 99 |
| Figura 26 - Avaliação da viabilidade celular do extrato (EXT) e biohíbrido (BH) sobre macrófagos RAW 264.7. | 107 |
| Figura 27 – Efeito dos extratos sobre os níveis de metabólitos de óxido nítrico (NOx) em macrófagos RAW 264.7. | 109 |
| Figura 28 - Mensuração das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α e IL-6 em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS. | 112 |

| | |
|--|-----|
| Figura 29 - (A) Concentração de antocianinas (ACNs) para o extrato (EXT) e biohíbrido (BH) nas temperaturas de 60 e 90 °C em função do tempo. (B) Cor do biohíbrido e extrato após aquecimento. | 122 |
| Figura 30 - (A) Espectro UV-vis do extrato de jambolão e (B) variação de cor do extrato e biohíbrido em diferentes soluções tampão (pH 1 a 12). | 143 |
| Figura 31 - Aspecto visual e micrografias eletrônicas de varredura dos indicadores inteligentes. | 144 |
| Figura 32 - Espectro infravermelho com transformada de Fourier dos indicadores. | 147 |
| Figura 33 - Difrátogramas de raios X dos indicadores. | 148 |
| Figura 34 - Termogramas de calorimetria diferencial de varredura referentes ao primeiro (a) e segundo (b) ciclo de aquecimento dos indicadores inteligentes. | 150 |
| Figura 35 - Mudança de cor dos indicadores inteligentes após exposição a NH ₄ OH. | 152 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Tabela 1 - Estudos dos compostos identificados em frutos de jambolão (2015-2020). | 29 |
| Tabela 2 - Possíveis aplicações do fruto de jambolão na indústria de alimentos..... | 30 |
| Tabela 3 - Estudos da aplicação de montmorilonita em sistemas com antocianinas. | 44 |
| Tabela 4 - Especificações técnicas das membranas utilizadas..... | 53 |
| Tabela 5 - Modelos do mecanismo de <i>fouling</i> propostos por Hermia..... | 54 |
| Tabela 6 - Avaliação dos parâmetros de <i>fouling</i> propostos pelo modelo de Hermia para membranas de Ultra (UF) e Nanofiltração (NF) e ângulo de contato. | 60 |
| Tabela 7 - pH, ST e SST das frações de extrato de jambolão: alimentação, concentrado e permeado obtidas por UF e NF. | 64 |
| Tabela 8 - Luminosidade (L^*), intensidade da cor vermelha (a^*), intensidade da cor amarela (b^*) e variação global de cor (ΔE^*) para as frações do extrato obtidas por UF e NF. | 65 |
| Tabela 9 – Antocianinas, fenólicos totais e capacidade antioxidante determinada por DPPH e ABTS para as frações do extrato de jambolão obtidas por UF e NF. | 66 |
| Tabela 10 - Compostos fenólicos do extrato concentrado de jambolão obtidos por UF e NF. | 69 |
| Tabela 11 - Parâmetros dos modelos de isoterma de adsorção para antocianinas adsorvidas em montmorilonita a 10 e 20 °C..... | 85 |
| Tabela 12 - Parâmetros cinéticos para adsorção de antocianinas (ACNs) em montmorilonita (Mnt) a 20 °C e pH=1,5..... | 88 |
| Tabela 13 - Cor aparente e valores de cor dos pós biohíbridos (BH) a 5 e 25 °C após 60 dias de armazenamento. | 95 |
| Tabela 14 - Valores de citotoxicidade determinados para o EXT e BH..... | 108 |
| Tabela 15 - Valores estatísticos da inibição do NOx. | 110 |
| Tabela 16 - Valores de % de inibição da mensuração das citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF- α e IL-1 β em macrófagos RAW 264.7..... | 113 |
| Tabela 17 - Descrição das formulações das balas de gelatina sem e com adição de antocianinas (ACNs). | 118 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 18 - Parâmetros cinéticos do efeito da temperatura na estabilidade das antocianinas do extrato de jambolão e BH..... | 123 |
| Tabela 19 - Parâmetros de cor para o extrato de jambolão (EXT) e o biohíbrido (BH) durante o aquecimento..... | |
| Tabela 20 - pH, atividade de água (a_w) e umidade das balas de gelatina..... | 126 |
| Tabela 21 - Perfil de textura das balas de gelatina. | 127 |
| Tabela 22 - Compostos bioativos e atividade antioxidante das balas de gelatina... | 128 |
| Tabela 23 - Aspecto visual e parâmetros de cor das balas de gelatina. | 130 |
| Tabela 24 - Teor de compostos bioativos para as balas de gelatina durante as etapas de digestão gastrointestinal <i>in vitro</i> | 131 |
| Tabela 25 - Parâmetros de cor e aspecto visual das balas sem e com antocianinas (ACNs) expostas a luz..... | 134 |
| Tabela 26 - Espessura, teor de umidade, solubilidade em água e ângulo de contato dos indicadores. | 145 |
| Tabela 27 - Parâmetros de cor (L^* , a^* , b^* e ΔE^*) dos indicadores. | 151 |
| Tabela 28 - Mudança visual de cor dos indicadores inteligentes após exposição a NH_4OH | 154 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACNs - Antocianinas

ABTS - 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

BH - Biohíbrido

BC - Bala controle

BBH - Bala com adição de biohíbrido

BEXT - Bala com adição de extrato

EDS - Espectroscopia de Energia Dispersiva no Raio-X

DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

DSC - Calorimetria exploratória diferencial

DRX - Difração por raio-X

EXT - Extrato de jambolão

FT - Fenólicos totais

FTIR - Espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier

HPLC-DAD-MS - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detecção de arranjo de diodos e espectrometria de massa

IBH-1: indicador com adição de 1% de biohíbrido

IBH-3: indicador com adição de 3% de biohíbrido

IBH-5: indicador com adição de 5% de biohíbrido

IC: indicador controle

LPS - Endotoxina lipopolissacarídeo

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

Mnt - Motmorilonita

MWCO - Ponto de corte molar

NF - Nanofiltração

NOx - Óxido nítrico

ST - Sólidos totais

SST - Sólidos solúveis totais

UF - Ultrafiltração

EAG - Equivalente em ácido gálico

EC3G - Equivalente de cianidina-3-glicosídeo

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| DIAGRAMA CONCEITUAL | 21 |
| CAPÍTULO 1 | 23 |
| 1 INTRODUÇÃO | 23 |
| 1.1 OBJETIVOS | 25 |
| 1.1.1 Objetivo geral | 25 |
| 1.1.2 Objetivos específicos..... | 25 |
| CAPÍTULO 2 | 27 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 27 |
| 2.1 JAMBOLÃO (<i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels)..... | 27 |
| 2.2 ANTOCIANINAS: ESTRUTURA E ESTABILIDADE..... | 32 |
| 2.3 ESTRATÉGIAS PARA RECUPERAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS | 37 |
| 2.3.1 Processo de adsorção de compostos bioativos | 39 |
| 2.3.2 Montmorilonita (Mnt)..... | 41 |
| 2.3.4 Estudo teórico do processo de adsorção | 45 |
| 2.4 ESTUDO DA BIODISPONIBILIDADE DOS COMPOSTOS BIOATIVOS | 47 |
| CAPÍTULO 3 - CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DO EXTRATO DE JAMBOLÃO POR ULTRA (UF) E NANOFILTRAÇÃO (NF) E CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES | 51 |
| 3.1 MATERIAL | 52 |
| 3.1.1 Matéria prima | 52 |
| 3.1.2 Extração | 52 |
| 3.1.3 Concentração do extrato de jambolão | 52 |
| 3.1.4 Avaliação do processo de concentração | 54 |
| 3.1.4.1 Mecanismo de fouling..... | 54 |
| 3.1.4.2 Ângulo de contato | 54 |
| 3.1.4.3 Espectroscopia de infravermelho transformada de fourier (FTIR)..... | 55 |
| 3.1.5 Caracterização do extrato..... | 55 |
| 3.1.5.1 Análises físico-químicas..... | 55 |
| 3.1.5.2 Cor..... | 55 |

| | |
|--|-----------|
| 3.1.5.3 Caracterização das antocianinas dos extratos (ACNs) | 56 |
| 3.1.5.4. Fenólicos totais | 56 |
| 3.1.5.5 Atividade antioxidante (DPPH e ABTS)..... | 57 |
| 3.1.5.6 HPLC-DAD-MS | 57 |
| 3.1.6 Análise estatística | 58 |
| 3.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES | 58 |
| 3.2.1 Concentração do extrato de jambolão por UF e NF | 58 |
| 3.2.2 Produtos obtidos da filtração do extrato de jambolão por UF e NF | 63 |
| 3.2.3 Antocianinas, fenólicos totais e capacidade antioxidante | 66 |
| 3.3 CONCLUSÃO..... | 71 |
| CAPÍTULO 4 - ADSORÇÃO E DESSORÇÃO DAS ANTOCIANINAS DOS FRUTOS DE JAMBOLÃO EM MONTMORILONITA | 73 |
| 4.1 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 74 |
| 4.1.1 Matérias-primas..... | 74 |
| 4.1.2 Extração de antocianinas e caracterização | 74 |
| 4.1.3 Experimentos de adsorção..... | 74 |
| 4.1.3.1 Isotermas de adsorção | 74 |
| 4.1.3.2 Cinética de adsorção..... | 75 |
| 4.1.4 Experimentos de dessorção..... | 76 |
| 4.1.5 Caracterização cristalina e química do biohíbrido | 76 |
| 4.1.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Raios-X Dispersiva de Energia (EDS) | 77 |
| 4.1.7 Conteúdo fenólico total (FT) e capacidade antioxidante do biohíbrido | 77 |
| 4.1.8 Estabilidade de cor | 78 |
| 4.1.9 Efeito do pH na cor do biohíbrido..... | 78 |
| 4.1.10 Sensibilidade do biohíbrido à amônia | 79 |
| 4.1.11 Aplicação do biohíbrido como sensor em alimento..... | 79 |
| 4.1.12 Análise estatística | 79 |
| 4.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES | 80 |
| 4.2.1 Concentração de antocianinas monoméricas totais (ACNs) no extrato de jambolão | 80 |

| | |
|---|------------|
| 4.2.2 Experimentos de adsorção..... | 80 |
| 4.2.2.1 <i>Isotermas de adsorção.....</i> | 80 |
| 4.2.2.2 <i>Cinética de adsorção.....</i> | 86 |
| 4.2.3 Experimentos de dessorção..... | 89 |
| 4.2.4 Caracterização cristalina e química do biohíbrido..... | 90 |
| 4.2.4.1 <i>Difratogramas de raio X (DRX).....</i> | 90 |
| 4.2.4.2 <i>Espectros de FTIR.....</i> | 91 |
| 4.2.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Raios-X de Dispersão de Energia (EDS)..... | 92 |
| 4.2.6 Conteúdo fenólico total (FT) e capacidade antioxidante do biohíbrido | 93 |
| 4.2.7 Estabilidade de cor | 94 |
| 4.2.8 Efeito do pH na cor do biohíbrido..... | 96 |
| 4.2.9 Sensibilidade do biohíbrido a amônia..... | 96 |
| 4.2.10 Aplicação do biohíbrido como sensor em alimento..... | 97 |
| 4.3 CONCLUSÃO..... | 99 |
| CAPÍTULO 5 - POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DO JAMBOLÃO FRENTE A MACRÓFAGOS RAW 264.7 ESTIMULADOS POR LPS..... | 101 |
| 5.1 METODOLOGIA <i>IN VITRO</i> | 102 |
| 5.1.1 Cultura de macrófagos (RAW 264.7)..... | 102 |
| 5.1.2 Determinação de viabilidade celular com azul de tripan | 102 |
| 5.1.3 Viabilidade celular (citotoxicidade)..... | 103 |
| 5.1.4 Dosagem de metabólitos do óxido nítrico (NO_x)..... | 104 |
| 5.1.5 Quantificação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1β, TNF-α e IL-6)..... | 105 |
| 5.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES | 105 |
| 5.2.1 Viabilidade celular (citotoxicidade)..... | 106 |
| 5.2.2 Efeitos dos compostos bioativos do extrato e BH nos níveis de óxido nítrico (NO_x)..... | 108 |
| 5.2.3 Quantificação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1β, TNF-α e IL-6) | 110 |
| 5.3 CONCLUSÃO..... | 113 |

| | |
|--|------------|
| CAPÍTULO 6 - APLICAÇÃO DO EXTRATO DE JAMBOLÃO E BIOHÍBRIDO EM BALAS DE GELATINA..... | 114 |
| 6.1. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 114 |
| 6.1.1 Materiais..... | 114 |
| 6.1.2 Obtenção de extrato de jambolão e caracterização das ACNs | 115 |
| 6.1.3 Fenólicos totais e atividade antioxidante..... | 115 |
| 6.1.4 Obtenção do biohíbrido (BH) | 116 |
| 6.1.5 Estabilidade térmica, cinética de degradação e parâmetros de das ACNs do extrato de jambolão e do BH..... | 116 |
| 6.1.6 Elaboração das balas de gelatina com adição de ACNs..... | 117 |
| 6.1.7 Caracterização físico-química e funcional das balas..... | 118 |
| 6.1.8 Efeito da luz na estabilidade de cor das balas de gelatina..... | 119 |
| 6.1.9 Digestibilidade gastrointestinal <i>in vitro</i> das balas de gelatina | 119 |
| 6.1.10 Análise estatística | 121 |
| 6.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES | 121 |
| 6.2.1 Estabilidade térmica, cinética de degradação e parâmetros de cor das antocianinas do extrato de jambolão e do biohíbrido | 121 |
| 6.2.2 Caracterização físico-química, funcional e parâmetros de cor das balas de gelatina..... | 125 |
| 6.2.3 Perfil de textura das balas de gelatina | 126 |
| 6.2.4 Propriedades funcionais das balas de gelatina..... | 127 |
| 6.2.5 Aspecto visual e cor das balas de gelatina..... | 129 |
| 6.2.6 Alterações do teor de antocianinas, fenólicos totais e atividade antioxidante durante a digestão gastrointestinal <i>in vitro</i> das balas de gelatina..... | 130 |
| 6.2.7 Estabilidade das balas de gelatina sob luz durante o armazenamento... | 134 |
| 6.3 CONCLUSÃO..... | 135 |
| CAPÍTULO 7 - INDICADORES INTELIGENTES DE AMIDO E BIOHÍBRIDO NATURAL FABRICADOS POR TERMOCOMPRESSÃO..... | 136 |
| 7.1 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 136 |
| 7.1.1 Materiais..... | 136 |
| 7.1.2 Extração e quantificação de ACNs de frutos de jambolão | 137 |
| 7.1.3 Espectros UV-visíveis do extrato de jambolão | 137 |

| | |
|--|------------|
| 7.1.4 Obtenção do biohíbrido | 137 |
| 7.1.5 Preparação dos indicadores inteligentes..... | 137 |
| 7.1.6 Caracterização dos indicadores inteligentes..... | 138 |
| <i>7.1.6.1 Aspecto visual, espessura e morfologia</i> | <i>138</i> |
| <i>7.1.6.2 Teor de umidade, solubilidade em água e ângulo de contato</i> | <i>139</i> |
| <i>7.1.6.3 Cristalinidade.....</i> | <i>139</i> |
| <i>7.1.6.4 Estrutura química</i> | <i>140</i> |
| <i>7.1.6.5 Propriedades térmicas.....</i> | <i>140</i> |
| <i>7.1.6.6 Cor.....</i> | <i>140</i> |
| 7.1.7 Análise estatística | 141 |
| 7.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 141 |
| 7.2.1 Espectros UV-visíveis do extrato de jambolão..... | 141 |
| 7.2.2 Aspecto visual, espessura e morfologia dos indicadores..... | 143 |
| 7.2.3 Teor de umidade, solubilidade em água e ângulo de contato..... | 145 |
| 7.2.4 Espectros FTIR dos indicadores..... | 146 |
| 7.2.5 Análise de difração por raio-X dos indicadores | 147 |
| 7.2.6 Propriedades térmicas dos indicadores | 148 |
| 7.2.7 Cor dos indicadores..... | 151 |
| 7.2.8 Sensibilidade à amônia..... | 151 |
| 7.3 CONCLUSÃO..... | 155 |
| 8 CONCLUSÕES FINAS E TRABALHOS FUTUROS | 155 |
| 8.1 CONCLUSÕES FINAIS..... | 155 |
| 8.2 Trabalhos futuros | 156 |

DIAGRAMA CONCEITUAL

Por que do presente estudo?

- O jambolão é uma fruta rica em compostos bioativos com potencial para aplicação como corante natural,
- O fruto de jambolão não é comercializado para consumo de mesa e/ou para fins industriais,
- Antocianinas majoritárias no fruto são instáveis a temperaturas > 40 °C, pH neutro e alcalino e na presença de oxigênio,
- A intercalação dos compostos bioativos em argilas promove sua estabilização,
- A montmorilonita é uma argila natural e não tóxica que pode ser aplicada em alimentos.

O que já foi feito?

- Biohíbridos de extrato de açaí, mirtilo e batata doce roxa foram obtidos pela intercalação em montmorilonita, estes estudos se concentraram na caracterização físico-química dos biohíbridos. A bioacessibilidade de antocianinas e extrato de cereja foi avaliada por digestão gastrointestinal *in vitro* (GUTIÉRREZ; PONCE; ALVAREZ, 2017; LI et al., 2019a; OGAWA et al., 2017; SINGH; KITTS, 2019; TEIXEIRA-NETO et al., 2012).

Contribuição do estudo: disponibilizar dados de adsorção e dessorção de antocianinas (ACNs) na argila, respostas quanto: às propriedades funcionais, o comportamento da digestão gastrointestinal *in vitro*, a estabilidade do biohíbrido sob luz e temperatura e quando aplicado em alimentos e como indicador inteligente em embalagens.

Hipóteses

- É possível adsorver os compostos bioativos do extrato na argila montmorilonita,
- É possível melhorar a estabilidade dos compostos adsorvidos em relação as condições ambientais (temperatura e luz),
- A cor, atividade antioxidante e anti-inflamatória são preservadas no biohíbrido,
- As propriedades funcionais do biohíbrido são preservadas quando aplicado em alimentos,
- É possível aplicar o biohíbrido em filmes de amido como indicador inteligente.

Métodos experimentais

- Extração e identificação dos compostos bioativos do fruto de jambolão,
- Estudo da adsorção e dessorção das ACNs do extrato em montmorilonita,
- Avaliação das propriedades funcionais do biohíbrido através da atividade antioxidante e anti-inflamatória,
- Avaliação da estabilidade do biohíbrido em condições de armazenamento (5 e 25 °C por 60 dias),
- Aplicação do biohíbrido e extrato como corante na produção de balas à base de gelatina,
- Estudo de digestibilidade das balas em modelo de digestão *in vitro*,
- Aplicação do biohíbrido em indicadores inteligentes produzidos por termocompressão utilizando amido de mandioca.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

A tendência do consumo de alimentos naturais, como consequência das mudanças no estilo de vida da população em todo mundo, é um desafio para as indústrias de alimentos em disponibilizar produtos mais saudáveis e seguros ao consumidor. A incorporação de ingredientes alimentares, conhecidos como aditivos, são fundamentais para garantir a qualidade e segurança dos alimentos. Os aditivos são adicionados intencionalmente para conferir funcionalidades tecnológicas, aumentar o prazo de validade e/ou melhorar as propriedades físico-químicas, sensoriais e microbiológicas, bem como propriedades nutricionais (ALBUQUERQUE et al., 2020).

Neste contexto, compostos bioativos especialmente antocianinas ganham grande destaque, pois podem ser aplicadas como antioxidantes, corantes naturais e antimicrobianos (PANGHAL et al., 2019). Os corantes são utilizados para melhorar a qualidade sensorial dos alimentos em relação a cor, que sofre degradação durante o processamento e é um dos atributos mais importantes na aceitabilidade e decisão de compra do consumidor (FREITAS-SÁ et al., 2018).

O jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) é uma excelente fonte alternativa de corantes naturais. Os principais compostos do fruto são as antocianinas, um grupo de pigmentos fenólicos solúveis em água, capazes de produzir cores vivas e atraentes (vermelho/roxa) que variam em função do pH; devido à sua não toxicidade são aplicadas como corante alimentar, por exemplo em iogurte (FREITAS-SÁ et al., 2018; RODRIGUEZ-AMAYA, 2019; TAVARES et al., 2016). Além disso, o fruto apresenta outros compostos fenólicos, como ácido gálico e catequina. Estes compostos lhe conferem atividade antioxidante e anti-inflamatória. A atividade antioxidante do jambolão foi avaliada em estudos *in vitro*, e aplicado em alimentos, como ingrediente funcional em macarrão, demonstrando redução do radical DPPH (PANGHAL et al., 2019), já a adição do extrato em linguiça fresca não apresentou redução da oxidação lipídica (PEREIRA et al., 2019). Além disso os frutos de jambolão são reconhecidos por sua atividade anti-inflamatória, com potencial anticancerígeno, antidiabético e antiobesidade (ABDIN et al., 2020; QAMAR et al., 2022). No entanto os poucos

estudos existentes da aplicação do jambolão em alimentos são insuficientes para consolidar seu potencial.

No Brasil este fruto é inexplorado, e seu consumo é na forma *in natura* na região nordeste, sem relatos de comercialização. Entre os obstáculos do uso do jambolão como matéria-prima na indústria de alimentos, são a falta de produção em larga escala, período de colheita curto (2 meses por ano) e alta perecibilidade (DE CARVALHO et al., 2017; TAVARES et al., 2020).

Para obtenção de corantes naturais de frutas a primeira etapa é a extração. A técnica mais utilizada para extração de compostos bioativos do fruto de jambolão é a extração sólido-líquido, uma técnica de baixo custo e simples execução. Além disso, antocianinas são compostos hidrofílicos, podendo ser extraídas com o uso de água, e a adição de ácido ao solvente promove maior recuperação dos compostos (BARROS et al., 2019). No entanto os compostos extraídos encontram-se diluídos no solvente, assim o processo de separação por membranas é uma técnica eficiente para concentrar os compostos bioativos, e como vantagem não utiliza temperatura (KELLY; KELLY; O'MAHONY, 2019).

Extratos concentrados de frutas são uma ótima fonte de pigmentos com uma variedade de cores para aplicação em produtos alimentícios, contudo sua aplicação ainda é desafiadora, uma vez que esses compostos apresentam baixa estabilidade a condições de processamento e armazenamento (temperatura, oxigênio, pH e luz) de alimentos, além de questões relacionadas ao fornecimento de frutas alternativas como o jambolão (ALBUQUERQUE et al., 2020).

O desenvolvimento de pigmentos biohíbridos (BH) que combinam antocianinas a substratos inorgânicos, como argilas minerais, por intercalação, têm sido amplamente investigados para reverter essas limitações e proteger os compostos do ambiente externo. Este campo de pesquisa cresceu a partir de estudos sobre o primeiro e mais famoso exemplo de biohíbrido, o Maya blue, composto por argilas minerais (paligorsquita, sepiolita e atapulgita) e corante índigo (VAN OLPHEN, 1966).

Na literatura diversos estudos têm reportado a adsorção de antocianinas utilizando argilas minerais tais como saponita, sepiolita, haloisita, caulinita e montmorilonita. Nestas pesquisas foram avaliadas as caracterizações físico-químicas, atividade antioxidante, antimicrobiana, fotoestabilidade, alterações de cor com o pH, estabilidade em meio alcalino e reversibilidade ácido/base (BRANDÃO LIMA et al.,

2020; GUTIÉRREZ; PONCE; ALVAREZ, 2017; LI et al., 2019a). No entanto os estudos não avaliaram a estabilidade do biohíbrido em condições de armazenamento e a aplicação em alimentos e embalagem. Além disso, poucos estudos avaliaram a cinética de adsorção/dessorção dos compostos bioativos na argila. A montmorilonita foi a argila escolhida para adsorção do extrato de jambolão, pois é uma argila natural, livre de toxinas e amplamente aplicada em medicamentos, além de ser biodegradável e barata (MASSARO et al., 2018).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Produzir, caracterizar e aplicar um biohíbrido à base de extrato de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) e montmorilonita.

1.1.2 Objetivos específicos

- Extrair e concentrar o extrato de jambolão por ultra e nanofiltração,
- Caracterizar as frações de extrato de jambolão concentradas por membranas,
- Estudar o efeito do tempo, temperatura e pH no mecanismo de adsorção das ACNs na montmorilonita,
- Estudar a dessorção dos compostos em fluídos simuladores de alimentos (hidrofóbicos, hidrofílicos e ácidos),
- Caracterizar as propriedades antioxidantes do BH,
- Avaliar o efeito anti-inflamatório *in vitro* dos compostos bioativos do fruto de jambolão (biohíbrido e extrato),
- Avaliar a estabilidade do BH no armazenamento em relação a temperatura,
- Aplicar o extrato e o BH como corante natural em balas de gelatina,
- Caracterizar as balas de gelatina e verificar a estabilidade durante o armazenamento,
- Estudar a digestibilidade *in vitro* dos compostos presentes nas balas de gelatina ao longo do sistema gastrointestinal,

- Produzir indicadores inteligentes por termocompressão utilizando amido de mandioca, glicerol e pigmento biohíbrido.

CAPÍTULO 2

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo são apresentados os principais assuntos pertinentes a esta tese. Primeiramente informações referentes ao fruto estudado: jambolão, suas principais características e aplicações. Antocianinas do fruto, estrutura e estabilidade. Recuperação, concentração e estabilização de compostos bioativos do fruto. Além da avaliação da biodisponibilidade dos compostos bioativos quando ingeridos. Parte da revisão de literatura é baseada no artigo já publicado pela autora: Flavonoids, anthocyanins, betalains, curcumin, and carotenoids: Sources, classification and enhanced stabilization by encapsulation and adsorption. Publicado na revista Food Research International, disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110929>.

2.1 JAMBOLÃO (*SYZYGIUM CUMINI* (L.) SKEELS)

Jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) é uma árvore pertencente à família Myrtaceae, originária da Índia e amplamente distribuída no continente africano e na América Latina devido a sua adaptação a climas tropicais e subtropicais. A maioria das árvores frutíferas de jambolão no Brasil são encontradas nas planícies costeiras, serras e planaltos, crescendo em vários tipos de solo. Diferentes sinônimos populares são utilizados para designar a espécie *S. cumini*: jambolão, azeitona-roxa e ameixa preta (DE PAULO FARIAS et al., 2020; DE SOUSA SABINO; DE BRITO; DA SILVA JÚNIOR, 2018).

As frutas têm formato elíptico, são compostas por uma única semente medindo 1,5-3,5 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro, possuem epicarpo fino, liso, brilhante, aderente e coloração roxa. O mesocarpo é muito suculento e possui coloração branca a roxa de acordo com o período de maturação. O endocarpo é composto por uma única semente de cor verde ou marrom (Figura 1) (DE PAULO FARIAS et al., 2020).

Figura 1 - Frutos de jambolão maduros.



Fonte: Autora (2020).

No Brasil, o jambolão tem origem doméstica sendo consumido *in natura* no Nordeste, ainda não existem relatos de sua comercialização e uso como matéria-prima industrial. O jambolão é considerado um fruto perecível, especialmente pela fragilidade de sua pele que oferece pouca proteção contra danos físicos ou agentes infecciosos, a vida útil do jambolão é de 2-3 dias sob refrigeração, além disso o período de colheita é de aproximadamente dois meses (fevereiro/março) portanto este fruto é quase totalmente inutilizado (VENUGOPAL; CHERITA; ANU-APPAIAH, 2018).

Embora pouco consumido como fruto fresco ou processado, os frutos do jambolão são uma importante fonte de nutrientes, sua composição é constituída por proteínas, lipídios, fibras, carboidratos (glicose, frutose, maltose, sacarose, manose e galactose), aminoácidos (cisteína, alanina, asparagina, glutamina e tirosina) vitaminas (B1 tiamina, B2 riboflavina, C ácido ascórbico) e minerais (K, Ca, Zn, Mg, Fe, P, Na) (DE SOUSA SABINO; DE BRITO; DA SILVA JÚNIOR, 2018). Além disso, possui inúmeros compostos bioativos, como: flavonóis (rutina, miricetina), flavan-3-ols (catequina, epicatequina), ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido caféico) (CHANG; ALASALVAR; SHAHIDI, 2019; SERAGLIO et al., 2018; TAVARES et al., 2016), e antocianinas, sendo as principais delphinidina 3,5-diglicosídeo, petunidina 3,5-diglicosídeo e malvidina 3,5-diglicosídeo, responsáveis pela coloração dos frutos (FARIA; MARQUES; MERCADANTE, 2011; TAVARES et al., 2016).

Os principais compostos identificados em frutos de jambolão nos últimos 5 anos são apresentados na Tabela 1, estes compostos conferem benefícios para a saúde humana como antioxidante, anti-inflamatório, antidiabético e antiviral (DE PAULO FARIAS et al., 2020), e possuem potencial como conservante (antimicrobiano

e antioxidante), corante natural e ingrediente funcional para aplicação em alimentos (PANGHAL et al., 2019; TAVARES et al., 2020). O extrato da fruta de jambolão mostrou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella Typhimurium*, *Shigella flexneri* e contra a levedura *Candida albicans* em modelos experimentais *in vitro* (HAQUE et al., 2017; SINGH et al., 2016).

Tabela 1 - Estudos dos compostos identificados em frutos de jambolão (2015-2020).

| Partes do fruto | FT | ACNs | Principais compostos identificados | Referências |
|---|----------------|---|---|------------------------|
| Polpa | 206,9 | 213 | Ácido gálico, ácido clorogênico, ácido ferúlico, rutina, miricetina, quercetina | Branco et al. (2016) |
| Polpa liofilizada | 1174 | - | Ácido gálico, quercetina, ácido caféico, ácido sinápico, delphinidina | Singh et al. (2016) |
| Fruto integral fresco | - | 24,60 - 6,94 (malvidina 3,5-O-diglicosídeo) | ACN: delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina e malvidina diglicosídeos. Flavonoides: miricetina, laricitrina, siringetina, catequina, epicatequina Fenólicos: ácido gálico, ácido elágico. | Tavares et al. (2016) |
| Fruto integral fresco | - | 1318,4 | ACN: delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina e malvidina diglicosídeos. Miricetina e ácido gálico. | Lestario et al. (2017) |
| Fruto integral liofilizado (estágio intermediário/maduro) | 1002,70-957,72 | 552,94 - 869,30 | Cumarina, isoquercetina, naringenina, quercetina, pinobanksin, siringaldeido, ácidos: caféico, clorogênico, p-cumárico, gálico, siríngico e sinápico. | Seraglio et al. (2018) |

Fonte: Autora (2020). ACNs: antocianinas monoméricas totais (mg EC3G/100 g) - EC3G: equivalente de cianidina-3-glicosídeo; FT: fenólicos totais (mg EAG/100 g) - EAG: equivalente de ácido gálico.

O potencial futuro dessa fruta como matéria-prima para o desenvolvimento de produtos diferenciados, estão apresentados na literatura como: produção de bebidas fermentadas (VENUGOPAL; CHERITA; ANU-APPAIAH, 2018), bebidas não alcoólicas (SOARES et al., 2019), sorvete (SOARES et al., 2018) e geleia (ASLAM et

al., 2019). Estudos das possíveis aplicações dos frutos de jambolão são apresentadas na Tabela 2, bem como seus principais resultados. No entanto, o aproveitamento do fruto de jambolão e suas aplicações não foram amplamente estudadas.

Outros pesquisadores estudaram o uso de tecnologias alternativas para melhorar a aplicação do fruto de jambolão como ingrediente alimentar em pó, devido à maior versatilidade de seu uso pelas indústrias (DE CARVALHO et al., 2017; TAVARES et al., 2020). Desta forma o produto em pó pode ser utilizado na substituição de corantes sintéticos, como antioxidante natural, indicador de pH (embalagens), ingrediente em formulações farmacêuticas e no enriquecimento de formulações alimentícias.

Contudo para a produção e uso de frutas alternativas em escala industrial existem vários desafios a serem superados. A maioria das frutas exóticas não possuem um sistema de cultivo, dificultando o acesso e disponibilidade do material. Além disso, as diferenças encontradas na composição dos frutos entre as cultivares e os períodos de maturação, podem influenciar no rendimento da extração e na estabilidade dos compostos. Outro fator é a menor estabilidade de extratos naturais durante a extração, processamento de alimentos e prazo de validade do produto, em relação ao calor, alterações de pH, presença de luz, oxigênio e íons metálicos, discutidos no próximo tópico (ALBUQUERQUE et al., 2020; RODRIGUEZ-AMAYA, 2019).

Tabela 2 - Possíveis aplicações do fruto de jambolão na indústria de alimentos.

| Objetivo | Principais resultados | Referências |
|--|--|-----------------------|
| Aproveitamento do fruto de jambolão através da produção de geleia utilizando o albedo do maracujá em substituição à pectina comercial. | O fruto do jambolão mostrou-se favorável à elaboração da geleia. No entanto, o aumento do teor de polpa de jambolão promoveu impacto negativo nas características sensoriais, como sabor adstringente, arenosidade e granularidade. A formulação 40/60 polpa/açúcar; 0% ácido cítrico e 3% albedo de maracujá foi a melhor avaliada. | Teles et al. (2021) |
| Avaliar a alteração das antocianinas e flavonóis do suco de jambolão em pó produzido pelo método de secagem em leito de espuma | Reduções de 7 a 9% na concentração de antocianinas nos pós foram observadas apenas em função do tempo (150 dias) de armazenamento e não | Tavares et al. (2020) |

| | | |
|---|--|------------------------|
| durante o armazenamento (4, 25 e 35 °C/150 dias). | da temperatura, e pequenas variações nas concentrações molares (qualitativamente das antocianinas) foram observadas, sem degradação de compostos. | |
| Desenvolver e caracterizar filmes indicadores colorimétricos, compostos de quitosana, álcool polivinílico e antocianinas dos frutos de jambolão preparados por casting. | As antocianinas do extrato de jambolão não modificaram a integridade física dos filmes, mas afetaram a espessura e as propriedades ópticas dos filmes. As antocianinas do filme foram degradadas pela luz visível dentro de 336 h (14 dias) a 20 °C. Os filmes contendo antocianinas mostraram mudanças visíveis da cor vermelha para azul quando usados para monitorar a frescura do camarão (4 e 20 °C). | Merz et al. (2020) |
| Utilização do extrato da pele de jambolão para desenvolver um indicador de qualidade por imobilização em tiras de papel filtro. | O indicador de qualidade desenvolvido produziu respostas confiáveis em relação a deterioração com mudança da coloração de violeta escuro para amarelo devido alterações do pH. | Talukder et al. (2020) |
| Elaboração de macarrão funcional com a incorporação da polpa de jambolão e avaliação da qualidade nutricional, fotoquímica, antioxidante e atributos sensoriais do produto. | Macarrão com 30% de polpa foi considerado o mais aceitável (8,1 ± 0,28 aceitação global) e com melhores propriedades nutricionais; cinzas minerais (1,98 ± 0,17%), fibras (5,35 ± 0,01%), antioxidantes (9,94 ± 0,02% de redução do radical DPPH), teor de carotenoides (5487 ± 1,99 µg / 100 g) e fenólicos totais (133,5 ± 0,52 mg de EAG/100 g). | Panghal et al. (2019) |
| Elaboração de linguiça fresca de frango com adição de extrato de jambolão (polpa e casca - extrato etanólico e aquoso) e avaliação da estabilidade. | O extrato etanólico (50%) apresentou maior atividade antioxidante (EC50 = 12,15 mg/mL) em relação ao extrato aquoso (EC50 = 23,40 mg/mL). A adição do extrato etanólico (2-4%) não alterou a umidade, o teor de proteínas, lipídios, pH e a cor, mas acelerou a oxidação lipídica da linguiça no armazenamento. | Pereira et al. (2019) |

| | | |
|--|---|--------------------------|
| Investigar a interação <i>trans</i> modal da cor na percepção do sabor e na aceitação pelo consumidor de iogurtes coloridos com pós de casca de jabuticaba e jambolão. | Os consumidores conseguiram diferenciar as cores resultantes do iogurte adicionado de corantes sintéticos e pós de jambolão e jabuticaba. Os iogurtes com adição de jambolão apresentaram menor aceitação de sabor 5,9 em relação ao iogurte de jabuticaba 6,9. | Freitas-sá et al. (2018) |
|--|---|--------------------------|

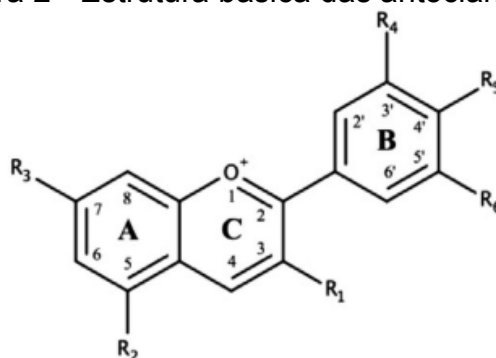
Fonte: Autora (2020). EC50 - quantidade de amostra necessária para reduzir 50% do radical DPPH.

2.2 ANTOCIANINAS: ESTRUTURA E ESTABILIDADE

Antocianinas são compostos bioativos pertencentes à classe dos flavonoides obtidos de alimentos à base de plantas (frutas, flores e tecidos vegetais), pigmentos solúveis em água que possuem uma variedade de cores da rosa ao azul, dependendo do pH do ambiente. As fontes naturais de antocianinas incluem todos os tipos de frutas vermelhas e roxas (jambolão, morango, amora; etc.) além de muitos vegetais de cor escura, como cebola roxa, rabanete vermelho, feijão preto, berinjela, milho roxo, repolho roxo, batata-doce roxa, etc. (TARONE; CAZARIN; MAROSTICA JUNIOR, 2020).

Estruturalmente as antocianinas são compostas por uma unidade aglicona (C₆-C₃-C₆-antocianidinas) que consiste em um anel aromático (A) ligado a um anel heterocíclico (C) com oxigênio, ligado por uma ligação carbono-carbono a um terceiro anel aromático (B) (Figura 2). Quando as antocianidinas são encontradas em sua forma glicosídica (ligadas a uma porção de açúcar nas posições 3 e 5) elas são conhecidas como antocianinas (ACNs). A glicosilação resulta na formação de uma rede de ligação H intermolecular que ajuda a estabilizar a molécula de ACN, e evita a degradação de intermediários instáveis em compostos de ácido fenólico e aldeído, além de melhorar sua solubilidade em água (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009; CELLI; TAN; SELIG, 2018).

Figura 2 - Estrutura básica das antocianidinas.



| Antocianidina | R ₄ | R ₅ | R ₆ |
|---------------|------------------|----------------|------------------|
| Cianidina | OH | OH | H |
| Delfinidina | OH | OH | OH |
| Malvidina | OCH ₃ | OH | OCH ₃ |
| Pelargonidina | H | OH | H |
| Peonidina | OCH ₃ | OH | H |
| Petunidina | OCH ₃ | OH | OH |

Fonte: Adaptado de Celli, Tan e Selig (2018). Nota: R₁, R₂, R₃ ligação OH para todas as antocianidinas.

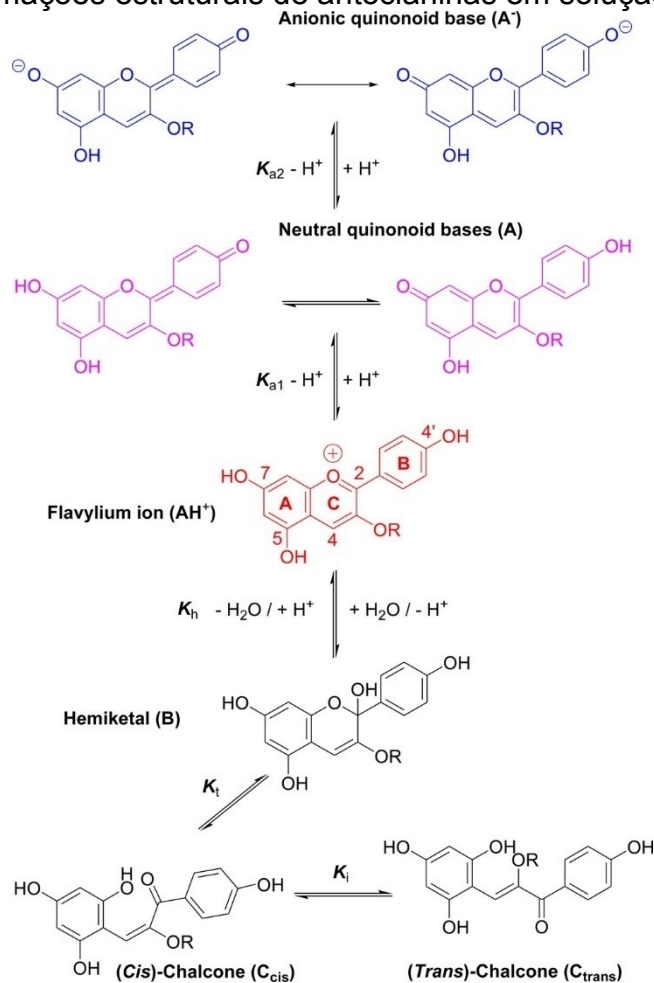
Existem uma variedade de ACNs na natureza que podem diferir em relação ao tipo, número e posição das porções de açúcar ligadas a estrutura principal e em relação aos ácidos alifáticos ou aromáticos ligados ao açúcar na molécula. Glicose, galactose, ramnose, arabinose, xilose e rutinose são os grupos de açúcares frequentemente ligados a antocianidinas por substituições dos grupos hidroxila nas posições 3 (isto é, 3-glicosídeos) e 5 (isto é, 3,5-diglicosídeos). Em certos casos, esses grupos de açúcares podem ser esterificados (acilados) com ácidos alifáticos ou aromáticos orgânicos (por exemplo, ácidos cafeico, ferúlico, cinâmico, malônico, acético e málico). A acilação com ácidos orgânicos também pode melhorar a estabilidade das ACNs, no entanto, a solubilidade em água é reduzida (HE; GIUSTI, 2010). Cianidina, delfinidina, pelargonidina, peonidina, petunidina e malvidina são as antocianidinas mais estudadas devido sua maior disponibilidade, suas estruturas variam na substituição das posições (R₄, R₅ e R₆), de acordo com a Tabela 2 (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

A estabilidade das ACNs é afetada por vários fatores como pH, temperatura de armazenamento, estrutura química, concentração, luz, oxigênio e solventes. A antocianidina mais estável é a pelargonidina, seguida pela malvidina, peonidina, petunidina, cianidina e delfinidina. Estas antocianinas têm sua estabilidade afetada pelo padrão de substituição do anel B (Figura 2), diminuindo com grupos hidroxilas e

aumentando com o número de grupos metoxilas (SANTOS-BUELGA; GONZÁLES-PARAMÁS, 2018).

A estrutura química das ACNs muda em função do pH no qual elas estão expostas. Sendo assim, em valores de $\text{pH} < 2$ o cátion flavilium (AH^+ , laranja/vermelho) é a espécie predominante e contribui para as cores púrpura e vermelha. Em condições ácidas leves o AH^+ perde um próton que é convertido em bases pela desprotonação de um dos três grupos OH de ácidos fenólicos (em C7, C4' ou C5, nesta ordem), assim em valores de pH entre 2 e 4 as bases quinoidais (A, azul/violeta) predominam (Figura 3). Quando o pH está próximo da neutralidade, A pode perder outro próton e formar sua forma ionizada A^- . Também é possível que em $\text{pH} > 2$, o AH^+ se torne propenso à adição de água (hidratação) em C2, formando uma pseudobase de carbinol ou hemiacetal (B, incolor) que se equilibra rapidamente com Ccis (chalcona, amarela) que está em equilíbrio lento com Ctrans (Figura 3) (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009; SANTOS-BUELGA; GONZÁLES-PARAMÁS, 2018; TROUILLAS et al., 2016).

Figura 3 - Transformações estruturais de antocianinas em solução ácida para neutra.

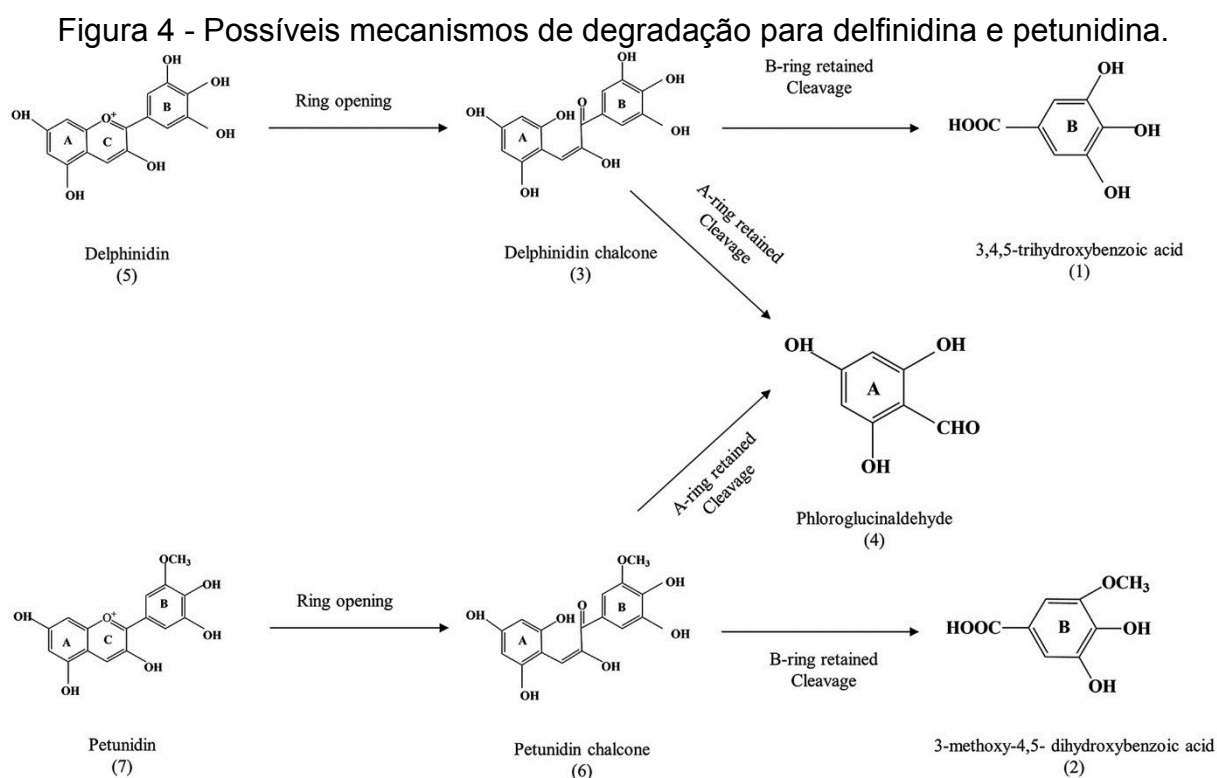


Fonte: Trouillas et al. (2016).

Antocianinas são termolábeis e o aumento da temperatura resulta na sua degradação, estudos da degradação isotérmica de antocianinas mostram uma cinética de reação de primeira ordem. A cinética de degradação térmica para o suco de jambolão em pó foi avaliada durante o armazenamento nas temperaturas de 4, 25 e 35 °C, foram encontrados valores de meia-vida de 630 (35 °C) a 2310 (4 °C) dias e uma energia de ativação de 26,15 kJ/mol determinada pela equação de Arrhenius. O menor valor da constante de velocidade cinética (k) que indica a degradação térmica das antocianinas foi obtida para a temperatura de 4 °C (TAVARES et al., 2020).

Diferentes mecanismos de degradação de antocianinas em relação a temperatura são sugeridos, a primeira via de degradação é a hidrólise da ligação glicosídica (ligação com o açúcar) da antocianina e formação de aglicona (antocianidina, muito instável) (SUN et al., 2011; TARONE; CAZARIN; MAROSTICA JUNIOR, 2020). Para as antocianidinas delphinidina e petunidina a próxima etapa é

abertura do anel C heterocíclico para formar derivados de chalcona, após os dois anéis A das antocianinas são degradados em cloroglucinaldeído, e o anel B da delphinidina é clivado para formar o ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico, e o da petunidina se divide para produzir ácido 3-metoxi-4,5-dihidroxibenzoico (Figura 4) (WANG et al., 2019).



Fonte: Wang et al. (2019).

A presença de oxigênio pode acelerar a degradação das antocianinas por meio de um mecanismo oxidativo direto e/ou pela ação de enzimas oxidantes. Na presença de oxigênio, enzimas como a polifenoloxidase catalisam a oxidação do ácido clorogênico e convertem em o-quinona que reage com as antocianinas para formar produtos de coloração marrom instáveis (CAVALCANTI; SANTOS; MEIRELES, 2011).

Em relação ao efeito da luz, geralmente é investigada a fotodegradação dos compostos dedicando-se principalmente em caracterizar o efeito da luz na estabilidade da cor, observa-se diminuição do teor de antocianinas sobre exposição a luz. No entanto, a luz também contribui para o acúmulo de antocianinas em frutos que depende da intensidade, duração da aplicação e qualidade da luz. Além disso, a luz UV-C também é aplicada na descontaminação da superfície de frutos (IOANNOU et

al., 2012). Neste contexto, para superar as limitações de estabilidade das antocianinas e possibilitar sua aplicação técnicas de estabilização como a adsorção de compostos em argilas minerais estão sendo estudadas.

2.3 ESTRATÉGIAS PARA RECUPERAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

A primeira etapa para recuperação dos compostos bioativos de frutas e resíduos é a extração. Na extração, a técnica empregada e o solvente utilizado são os principais fatores para maximizar a recuperação de compostos, evitando substâncias indesejadas.

A técnica mais estudada para extração de compostos bioativos da fruta de jambolão é a extração sólido-líquido. Todos os estudos realizaram a extração da polpa em pó utilizando-se como solventes: álcool etílico/ácido clorídrico (85:15), água e etanol acidificado com ácido clorídrico e ácido cítrico, e temperatura de extração variando de 4-60 °C (DA SILVA et al., 2018; DO CARMO BRITO et al., 2017; MARAN et al., 2015; MERZ et al., 2020). Outra técnica estudada foi a extração supercrítica com dióxido de carbono (MARAN; PRIYA; MANIKANDAN, 2014). É importante observar que os solventes utilizados para extração dos compostos devem ser seguros para aplicação em alimentos (GRAS).

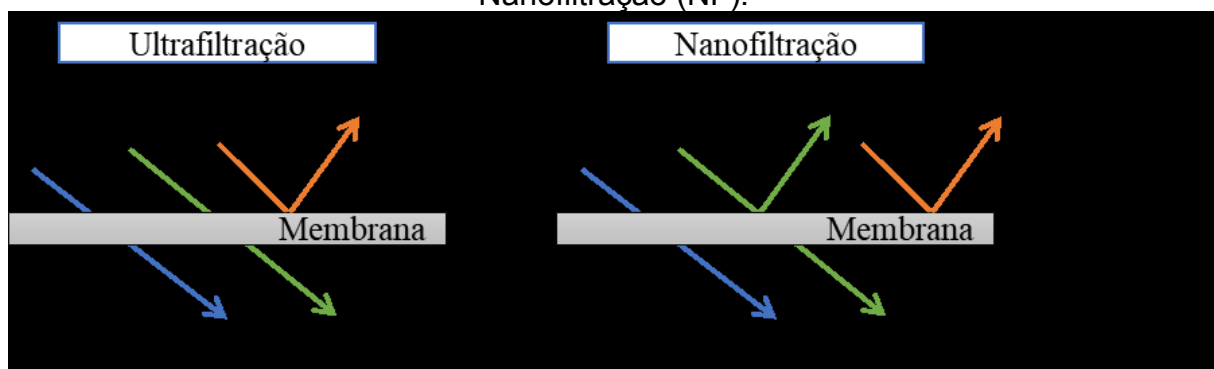
Os principais compostos do jambolão são as antocianinas (moléculas polares) que podem ser extraídas eficientemente utilizando água como solvente. Recentemente demonstrou-se que a adição de ácido a água pode aumentar a extração dos compostos fenólicos e antocianinas (BARROS et al., 2019). De tal modo, a água acidificada é uma alternativa aos solventes orgânicos e não apresenta toxicidade para aplicação em formulações alimentícias e farmacêuticas. Porém, os compostos bioativos encontram-se diluídos no solvente de extração, o que requer uma etapa de concentração dos compostos, como concentração por membranas e adsorção (KELLY; KELLY; O'MAHONY, 2019).

O processo de separação por membranas é utilizado para concentrar, separar, purificar e/ou eliminar substâncias desejáveis ou indesejáveis. No caso dos compostos ativos, como antocianinas, o uso de membranas é desejável por ser considerada uma tecnologia limpa e economicamente viável, com alta eficiência de

separação, fácil implementação e operação, baixo consumo de energia e pressão. Além disso não utiliza solventes e altas temperaturas, uma vantagem para aplicação em compostos termolábeis quando comparada com as técnicas convencionais de concentração: evaporação e destilação (ANTÓNIA NUNES et al., 2019; MARTÍN; DÍAZ-MONTAÑA; ASUERO, 2018).

A concentração dos compostos bioativos é alcançada com base no tamanho dos poros da membrana. As técnicas mais utilizadas para esses casos são a ultrafiltração (UF) que utiliza membranas que rejeitam as macromoléculas, e a nanofiltração (NF) que usa membranas que fracionam espécies orgânicas iônicas de peso molecular relativamente baixo com diâmetro molecular na faixa de 0,5 a 2 nm (NAZIR et al., 2019). Ambas permitem separar moléculas de diferentes pesos moleculares. A separação é realizada por uma barreira física a membrana, impulsionada por uma força motriz a pressão transmembranar. Neste processo uma solução (alimentação) é separada em duas novas correntes, permeado e retentado ou concentrado (Figura 5) (CASTRO-MUÑOZ; FÍLA, 2018).

Figura 5 - Processo de separação por membranas de Ultrafiltração (UF) e Nanofiltração (NF).



Fonte: Adaptado de Castro-Muñoz e Fíla (2018). Nota: UF (2 - 100 nm tamanho de poro, 0,1 – 7 bar pressão necessária), NF (0,5 - 2 nm tamanho de poro, 3 - 25 bar pressão necessária).

A aplicação de membranas para concentrar compostos bioativos solúveis em água e solventes orgânicos apresentou crescente interesse nos últimos anos (GUNATHILAKE, 2019). Vários estudos mostram a eficácia da UF e NF para concentrar e fracionar compostos fenólicos e antocianinas de suco de morango (*Fragaria x ananassa Duch*), extrato etanólico de açaí (*Euterpe edulis*), extrato aquoso de pequi (*Caryocar brasiliense Camb.*), e suco de sabugueiro (*Sambucus nigra L.*), os concentrados apresentam alta capacidade antioxidante com potencial para aplicação

como ingrediente funcional (AREND et al., 2017; DE SANTANA MAGALHÃES et al., 2019; TUNDIS et al., 2018; VIEIRA et al., 2018). Apenas um estudo da concentração de antocianinas do suco de jambolão combinando os processos de UF e NF foi reportado na literatura (GHOSH et al., 2018). Embora o uso de membranas seja eficiente, o maior desafio é o problema de incrustações que leva a uma perda significativa na permeabilidade da membrana. A incrustação é observada pela redução no fluxo de permeado, ou como um aumento na pressão transmembrana. A interação do soluto com a membrana é influenciada diretamente pela concentração de soluto na solução de alimentação e pelo tamanho dos poros da membrana (CASTRO-MUÑOZ; FÍLA, 2018; KELLY; KELLY; O'MAHONY, 2019).

Para avaliar os mecanismos de incrustação modelos foram desenvolvidos com base na equação de Hermia que identifica o mecanismo de incrustação na superfície da membrana: bloqueio dos poros e/ou formação de torta (ZHENG et al., 2018). Logo avaliar os mecanismos de incrustação e os compostos adsorvidos são fatores importantes para escolha da membrana utilizada no processo de filtração.

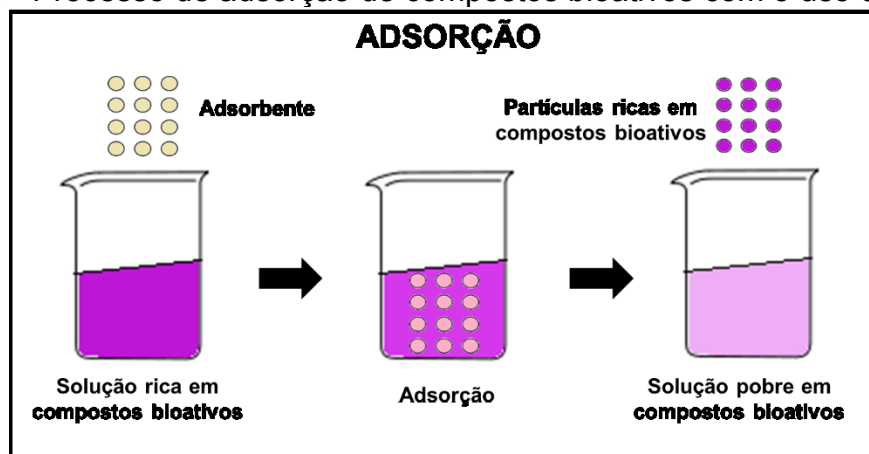
2.3.1 Processo de adsorção de compostos bioativos

A adsorção é um processo de transferência de massa do soluto presente na fase líquida para o adsorvente sólido formando um filme (adsorvido). Quando o adsorvente entra em contato com um líquido contendo um soluto, a adsorção ocorre até atingir o equilíbrio, ou seja, a saturação da superfície do adsorvente. O processo de adsorção pode ser dividido em dois tipos principais: adsorção física e química. Na adsorção física, o adsorvido adere à superfície por meio de interações intermoleculares fracas como forças de Van der Waals. Por outro lado, na adsorção química, as moléculas aderem na superfície do material formando uma ligação química por meio da troca de elétrons (NGULUBE et al., 2017).

A adsorção é aplicada na recuperação de compostos fenólicos e na separação de antocianinas. Os adsorventes mais utilizados na recuperação de compostos fenólicos são as resinas macroporosas que permitem concentrar e remover açúcares da solução. Recentemente a adsorção de corantes naturais e sintéticos em materiais hospedeiros inorgânicos (argilas minerais) é reportada como um método promissor para melhorar a estabilidade de compostos bioativos (KELLY;

KELLY; O'MAHONY, 2019; TAGUCHI et al., 2018). O processo de recuperação de compostos bioativos por adsorção em argilas é apresentado na Figura 6.

Figura 6 - Processo de adsorção de compostos bioativos com o uso de argilas.



Fonte: Adaptado de Luiza Koop et al. (2022).

Argilas minerais são materiais terrosos cristalinos naturais de granulometria fina (~2 μm) compostos quimicamente de silicatos de alumínio hidratados, e minerais essenciais, como: magnésio, ferro, cálcio, potássio ou sódio, organizados em diferentes camadas alternadas sobrepostas. Além dos minerais também podem conter compostos orgânicos, como sais solúveis, partículas de quartzo, calcita, entre outros minerais não argilosos e componentes amorfos (MORAES et al., 2017).

As argilas minerais mais estudadas pertencem a família dos filossilicatos (folhas de silicatos lamelares hidratadas), e se diferenciam de acordo com a combinação de suas folhas de sílica tetraédrica (T) e alumina octaédrica (O), por exemplo argilas 1:1 (T:O) caulinita e haloisita e 2:1 (T:O:T) montmorilonita e bentonita, também conhecidas como nanoargilas (nanoclays) (SCHOONHEYDT; JOHNSTON; BERGAYA, 2018).

As argilas possuem íons permutáveis em sua superfície, que levam a adsorção de cátions e ânions por troca iônica, os íons encontrados na superfície das argilas incluem H^+ , K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , NH_4^+ , Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , e NO_3^- , e a troca catiônica ocorre prontamente sem afetar a estrutura da argila (HUANG et al., 2011). A capacidade de adsorção das argilas depende da carga negativa líquida na superfície, da composição, estrutura química, tamanho de poros e da área superficial das argilas (NGULUBE et al., 2017).

O primeiro estudo do uso de argila mineral para estabilização de pigmentos, é o Maya Blue, onde diferentes argilas minerais (paligorsquita, sepiolita e atapulgita) e corantes orgânicos (maya blue e azul índigo) foram usados para preparar pigmentos estáveis (VAN OLPHEN, 1966). Em relação à estabilização de antocianinas por argilas minerais, Li et al. (2019a) obtiveram pigmentos híbridos reversíveis em ácido/base por incorporação de ACNs (extrato de mirtilo) em sepiolita, haloisita, caolinita e montmorilonita; o estudo demonstrou a influência da composição da argila nas propriedades de cor. ACN/sepiolita apresentou a melhor coloração, estabilidade térmica e estabilidade química em diferentes meios: HCl, etanol anidro e NaOH. A paligorsquita também foi estudada para fornecer aprimoramento na estabilidade das ACNs, mostrando boa estabilidade térmica, química e reversibilidade (ácido/básico) (LI et al., 2019b).

Brandão Lima et al. (2020) e Lima et al. (2020) relataram a obtenção de pigmentos híbridos reversíveis em ácido/base preparados por incorporação de ACNs (corante de uvas vermelhas comercial) em saponita natural e modificada, com β -ciclodextrina, brometo de hexadeciltrimetilamônio e brometo de cetiltrimetilamônio. O estudo demonstrou que a interação eletrostática da argila com as ACNs promoveu maior estabilidade sob exposição à luz LED e proteção ao oxigênio. A saponita modificada com brometo de cetiltrimetilamônio estabilizou a forma de base quinoidal (azul) das ACNs. Estes são os únicos estudos que avaliaram a estabilidade de argilas no armazenamento, no entanto apenas alterações de cor com a exposição a luz foram verificadas.

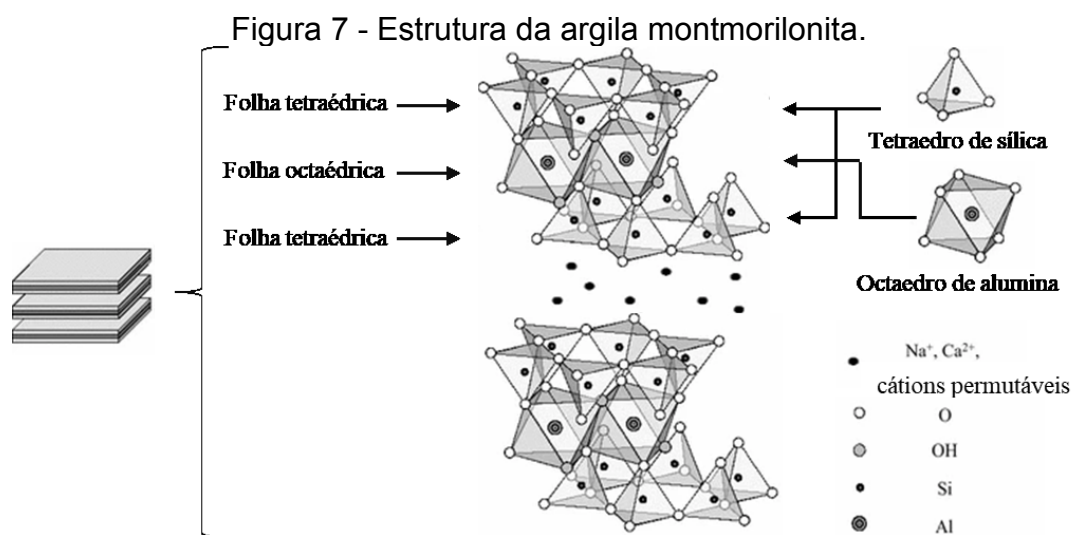
A montmorilonita também foi estudada para estabilização de ACNs e a maioria dos estudos se dedicou a caracterização físico-química dos biohíbridos, diferentes estudos são apresentados na Tabela 3.

2.3.2 Montmorilonita (Mnt)

A argila Mnt é um material inorgânico natural pertence ao grupo das esmectitas, obtida por meio da purificação da bentonita pura, composta por quartzo, cristobalita, feldspato e zeólitos, sendo a Mnt o principal componente. Sua estrutura é composta por uma camada de argila 2:1 com cátions permutáveis entre as camadas

e fórmula química $((\text{Na}, \text{Ca})_{0.33}(\text{Al}, \text{Mg})_2[\text{Si}_4\text{O}_{10}](\text{OH})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O})$ (MACHADO; DE FREITAS; WYPYCH, 2019; UDDIN, 2008).

A camada de argila 2:1 consiste em duas folhas de sílica tetraédricas (T) imprensando uma folha octaédrica de alumina (O). Devido à substituição isomórfica (por exemplo, Al^{3+} para Si^{4+} na folha T e/ou Al^{3+} para Mg^{2+} na folha O) uma carga líquida negativa em excesso é gerada, que comumente é balanceada pela adsorção de cátions, como Li^+ , Na^+ e Ca^{2+} entre as camadas, esses cátions podem ser facilmente substituídos por outros cátions orgânicos ou inorgânicos (Figura 7) (PARK et al., 2016). As partículas de Mnt apresentam forma de placa (1 nm de espessura e 0,2-2 microns de diâmetro) e adsorção pode ocorrer de três formas: na superfície externa, nas bordas e no espaço entre as camadas (JAYRAJSINH et al., 2017).



Fonte: Adaptado de Park et al. (2016).

A Mnt se destaca pela versatilidade de aplicações em diferentes áreas: farmacêutica, cosmética e alimentos. As indústrias farmacêuticas e cosméticas utilizam argilas minerais como excipiente ou estabilizante de emulsões (cremes), suspensões fluídas (administração tópica) e para liberação controlada em comprimidos e cápsulas (VISERAS et al., 2010). Muitos estudos utilizaram a argila como agente ativo para administração de medicamentos, pois a interação argila-droga pode aumentar a estabilidade *in vivo*, bem como na circulação sanguínea, e também pode melhorar a solubilidade dos medicamentos e proporcionar liberação controlada de moléculas bioativas (PARK et al., 2016). Por exemplo, híbridos à base de Mnt e

dexibuprofeno (anti-inflamatório) mostram alta capacidade de ligação do fármaco a argila com perfil de liberação sustentada por 12 h (LI et al., 2018). Nanocompósitos de Mnt/extrato aquoso de urtiga foram elaborados para aprimorar seus efeitos terapêuticos antiglicação (*in vivo*) e possibilitaram aumento da biodisponibilidade (RUTAKHLI; SABAHI; RIAZI, 2019). Além disso, é importante notar que a Mnt foi comprovada com baixa toxicidade por estudos *in vivo*, e pode ser considerada segura para ingestão de medicamentos orais com aprovação da FDA (Food and Drug Administration) (MASSARO et al., 2018; VISERAS et al., 2010).

Na área de alimentos a Mnt é utilizada para remoção/recuperação de compostos fenólicos de resíduos industriais, por exemplo Balooch et al. (2018) estudou a adsorção de compostos fenólicos (antifúngicos) de resíduos industriais das cascas e sementes de romã em Mnt. Para descafeinação de chás e cafés, como extrato de chá verde e extrato de café (SHIONO et al., 2017a, 2017b). Em embalagens, devido a disponibilidade na natureza, alta estabilidade, baixo custo e a pequena quantidade de Mnt (menos de 10%) necessária para aprimorar as propriedades funcionais de filmes (SOTHORNVIT, 2019). A Mnt foi utilizada para estabilizar pigmentos de antocianinas em filmes de gelatina contendo suco de acerola (RIBEIRO et al., 2018a). Além disso, filmes de quitosana tiveram suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes melhoradas pela introdução de Mnt (2,5%) reduzindo a oxidação lipídica de carne de aves refrigerada pela metade e a contaminação microbiológica entre 6 e 16%, em relação ao controle (PIRES; DE SOUZA; FERNANDO, 2018).

Atualmente é de grande interesse aprimorar a estabilidade dos compostos bioativos para sua aplicação, assim a intercalação de compostos em argilas minerais (biohíbridos) tem se destacado. Ácido gálico, catequina e ACNs do extrato de açai foram adsorvidas em Mnt, e a adição de Mnt em suco de acerola promoveu a estabilização de pigmentos (AHMAT; THIEBAULT; GUÉGAN, 2019; RIBEIRO et al., 2018b; RUTAKHLI; SABAHI; RIAZI, 2019; TEIXEIRA-NETO et al., 2012). Neste contexto a adsorção dos compostos bioativos do extrato de jambolão em Mnt pode promover a estabilização dos mesmos em relação a temperatura, luz e oxigênio, e obter um novo corante natural biohíbrido. Além disso, até o momento não existem relatos da aplicação de biohíbridos em alimentos. Estudos da aplicação de Mnt em alimentos com antocianinas são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Estudos da aplicação de montmorilonita em sistemas com antocianinas.

| Objetivo | Principais resultados | Referências |
|---|---|-----------------------------|
| Avaliação da estabilidade de cor e das ACNs do suco de acerola clarificado adicionado de Mnt em diferentes concentrações (0-6%). | Adição de 4 - 6% de Mnt alterou a cor inicial do suco de acerola de vermelho pálido para tons mais escuros e avermelhados, e conferiu maior estabilidade durante o tempo de armazenamento em diferentes pHs. Com o aumento da concentração de Mnt maior retenção de antocianinas foi observada no precipitado. | Ribeiro et al. (2018b) |
| Obtenção de materiais híbridos combinando argilas minerais (Mnt, saponita) com extrato de açaí (<i>Euterpe oleracea Mart.</i>) para aumentar a estabilidade do corante e facilitar seu uso e armazenamento. | A interação com os minerais argilosos melhorou a estabilidade dos corantes de açaí contra o calor e suas propriedades antioxidantes foram preservadas após a intercalação. A saponita apresentou maior adsorção de antocianinas (54 mmol de cianidina/100 g de argila) em relação a Mnt (48,4 mmol/100 g de argila) nas mesmas condições. | Teixeira-Neto et al. (2012) |
| Estabilização de ACNs de um pó comercial (Grape Color BC-120) pela intercalação em Mnt. | As ACNs apresentaram maior estabilidade contra a luz visível e ambiente alcalino, que foi atribuída a interação eletrostática e a proteção do corante ao oxigênio atmosférico. | Kohno et al. (2009) |
| Elaboração de filmes de quitosana/PVA com antocianinas de cenoura preta (indicador natural de pH) e bentonita para melhorar as propriedades mecânicas, estruturais e de barreira. | A adição de bentonita proporcionou redução na permeabilidade ao vapor de água e na resistência à tração. Os filmes com adição de bentonita e antocianinas apresentaram melhor estabilidade térmica e inibição do crescimento bacteriano contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . | Koosha; Hamedi (2019) |
| Elaboração de filmes de gelatina com suco de acerola e Mnt (0-6,5%) para melhorar as propriedades mecânicas e a estabilidade da cor. | O aumento do teor de Mnt aumentou a resistência à tração e o módulo de elasticidade dos filmes, e reduziu a permeabilidade ao vapor de água. Em relação a cor dois efeitos foram observados: mudança da cor de amarelo para vermelho, e estabilização da cor do filme durante o armazenamento (3,9% de Mnt). | Ribeiro et al. (2018a) |

| | | |
|---|--|----------------------------------|
| Obtenção de sistemas estruturados (nano-embalagens) de alimentos, a partir de Mnt natural e modificada com extrato de mirtilo, e avaliação do seu potencial como materiais ativos e inteligentes. | O sistema estruturado manteve a atividade antioxidante do extrato de mirtilo e apresentou comportamento inteligente quando testado sob diferentes condições de pH. No entanto, as argilas e o extrato não apresentaram atividade antimicrobiana (<i>Escherichia coli</i> e <i>Listeria monocytogenes</i>), sendo descartado o efeito ativo do sistema. | Gutiérrez; Ponce; Alvarez (2017) |
| Elaboração de um biohíbrido por complexação de ACNs do extrato de batata doce roxa com argilas minerais (saponita e Mnt). | A saponita sintética mostrou cor rosa clara (pH ácido), e a Mnt mostrou ausência de cor (pH básico) quando complexadas com o extrato de batata doce roxa. O biohíbrido saponita/extrato foi avaliado e exibiu mudança de cor reversível após exposição a vapores ácidos e básicos (azul) indicando que pode ser aplicado como sensor de atmosfera. | Ogawa et al. (2017) |

Fonte: Autora (2022).

2.3.4 Estudo teórico do processo de adsorção

Modelos isotérmicos são ferramentas importantes para o estudo do comportamento da adsorção, descrevem a relação entre a capacidade de adsorção do adsorvente no equilíbrio e a concentração de equilíbrio do adsorbato no líquido a temperatura constante (CHEN et al., 2016a). Geralmente as isotermas de adsorção são estabelecidas quando ocorre contato entre o adsorbato e o adsorvente por tempo suficiente para a concentração da interface entrar em equilíbrio dinâmico com a concentração de adsorbato existente na solução (AL-GHOUTI; DA'ANA, 2020; AWAD et al., 2019).

Os modelos de Langmuir (Eq. 1) e Freundlich (Eq. 2) têm sido os mais estudados em processos de adsorção de fenólicos em Mnt e antocianinas em outras argilas minerais, como laponita e saponita (AHMAT; THIEBAULT; GUÉGAN, 2019; BRANDÃO LIMA et al., 2020; CAPELLO et al., 2019; SHIONO et al., 2017a).

O modelo de Langmuir assume que a espessura da camada adsorvida é uma molécula (adsorção em monocamada) na qual o processo de adsorção ocorre em

locais localizados, idênticos e equivalentes. A adsorção é homogênea, ou seja, todos os locais devem ter igual afinidade com o adsorvido; a energia de adsorção é constante, e não há interação entre as moléculas adsorvidas. De outro modo o modelo de Freundlich é aplicável à adsorção não ideal em multicamadas de soluto, a superfície do adsorvente é heterogênea, e os locais de adsorção na superfície do adsorvente não são uniformes (AL-GHOUTI; DA'ANA, 2020).

$$Q_e = \frac{Q_m K_L C_e}{1 + K_L C_e} \quad (1)$$

$$Q_e = K_F C_e^{1/n} \quad (2)$$

Onde C é o conteúdo total de ACNs no extrato no equilíbrio (mg/L); Q_e é o conteúdo total de ACNs adsorvido na Mnt no equilíbrio (mg/g); Q_m é a capacidade máxima de adsorção (mg/g); K_L é a constante de Langmuir (L/mg); K_F ($L^{1/n} \text{ mg}^{(1-1/n)}/g$) e n (adimensional) são as constantes de Freundlich.

Outra possível modelagem aos dados de adsorção é através da cinética de adsorção que fornece informações sobre a taxa de adsorção e o desempenho do adsorvente usado. Dois modelos têm sido muito utilizados em estudos para modelagem dos dados de cinética: Pseudo-primeira-ordem (Eq. 3) e Pseudo-segunda-ordem (Eq. 4) (WANG; GUO, 2020).

$$Q_t = Q_e - Q_e e^{-k_1 t} \quad (3)$$

$$Q_t = \frac{k_2 Q_e^2 t}{1 + k_2 Q_e t} \quad (4)$$

Onde Q_t é a quantidade de ACNs adsorvida na Mnt no tempo de contato t (min) (mg/g); k_1 (1/min) e k_2 (g/mg min) são constantes dos modelos associados com a taxa de adsorção.

Isotermas de adsorção (Langmuir e Freundlich) e modelos cinéticos (primeira e segunda ordem) foram estudados na adsorção de antocianinas para purificação do extrato de jambolão. A adsorção foi realizada empregando seis adsorventes

(Amberlite XAD7HP, Amberlite XAD4, Amberlite IRC86, Amberlite IRC120, Dowex 50XW8 e Sílica gel (50 - 100 mesh). Amberlite XAD7HP apresentou maior capacidade de adsorção (1,07 mg/mL de adsorvente) e capacidade de dessorção (87,62%) entre todos os adsorventes estudados. A adsorção de antocianinas correlacionou-se melhor usando a isoterma de Langmuir e o modelo cinético de segunda ordem foi o mais apropriado para explicar a adsorção das ACNs (JAMPANI; NAIK; RAGHAVARAO, 2014). Poucos estudos de adsorção de compostos bioativos em argilas avaliam a cinética de adsorção; para antocianinas/Mnt não foram encontrados relatos na literatura.

2.4 ESTUDO DA BIODISPONIBILIDADE DOS COMPOSTOS BIOATIVOS

Os compostos bioativos extraídos dos frutos de jambolão apresentam inúmeros efeitos benéficos a saúde, contudo podem ser degradados no processo de digestão de alimentos devido as variações de pH, reduzindo a biodisponibilidade no organismo. Para os compostos bioativos apresentarem funcionalidade estes precisam estar bioacessíveis biodisponíveis e serem biodisponibilizados através do sistema circulatório ao local-alvo da ação (THAKUR et al., 2020). Avaliar o efeito da interação dos compostos bioativos com Mnt é uma etapa importante para verificar a liberação, estabilidade e bioacessibilidade em condições de digestão simulada *in vitro*.

Biodisponibilidade é definida como a quantidade de nutrientes ingeridos que atingem a circulação sistêmica e se encontram disponíveis para utilização em funções fisiológicas normais, e compreende dois conceitos: bioatividade e bioacessibilidade. A bioacessibilidade corresponde a quantidade de nutrientes liberados da matriz alimentar disponíveis para a absorção no intestino ou o material disponível após as transformações digestivas dos alimentos para absorção. A bioatividade inclui todos os efeitos fisiológicos que gera, ou seja, como o composto atinge a circulação sistêmica, como é transportado para a célula alvo e a interação com as biomoléculas (FERNÁNDEZ-GARCÍA; CARVAJAL-LÉRIDA; PÉREZ-GÁLVEZ, 2009; THAKUR et al., 2020).

A bioacessibilidade dos compostos bioativos pode ser analisada por diferentes métodos *in vivo* e *in vitro*. No entanto as análises *in vitro* são mais utilizadas pois não necessitam o uso de animais e apresentam menor custo. Os métodos *in vitro*

de digestão gastrointestinal (estático e dinâmicos) e com membranas de diálise estão sendo amplamente utilizados para avaliação da biodisponibilidade as vezes seguidos de ensaios de transporte por culturas de células intestinais humanas (Caco-2) e/ou modelo de cultura de células de absorção gástrica (MKN-28) (MARQUES PEIXOTO et al., 2016).

A digestão gastrointestinal *in vitro* avalia as fases da digestão (boca, estômago, intestino delgado e intestino grosso), composição, concentração de fluidos digestivos (enzimas, sais, tampão, polímeros biológicos) e o tempo de incubação das amostras em cada estágio digestivo, essas etapas variam em diferentes estudos (TING et al., 2015).

O modelo estático é o método mais simples de digestão e apresenta boa reprodutibilidade, custo relativamente baixo e fácil avaliação de cada fase, este modelo imita os processos bioquímicos que ocorrem no trato gastrointestinal e normalmente usa um único conjunto de condições iniciais (pH, concentração de enzimas e sais biliares) para cada parte do trato gastrointestinal com agitação da amostra por movimentos orbitais, assim é amplamente utilizado para avaliar a digestão de alimentos (LI et al., 2020; LUCAS-GONZÁLEZ et al., 2018). Contudo diferentes metodologias foram aplicadas para o modelo de digestão estático, sendo identificada a necessidade de uma harmonização das condições de digestão que foi realizada pela rede internacional INFOGEST que elaborou um protocolo padrão para utilização deste modelo (BRODKORB et al., 2019).

De forma geral, a digestão dos alimentos ocorre em 3 etapas: boca, estômago e intestino delgado. A primeira etapa consiste na mastigação (desintegração mecânica) dos alimentos, por meio da moagem e mistura com a saliva. A desintegração mecânica da estrutura dos alimentos permite a liberação parcial dos compostos e possivelmente pode melhorar a bioacessibilidade no intestino, no entanto também aumenta a área superficial para interações com enzimas digestivas e proteínas da saliva. Além disso, a amilase salivar começa a digerir os alimentos a um pH ideal de 5,6 a 7,9 (BRODKORB et al., 2019). Nesta fase, as antocianinas são ingeridas em suas formas naturais, e as reações de biotransformação são iniciadas (BRAGA et al., 2018).

No estômago o alimento é desintegrado por forças mecânicas e por interações químicas (secreção do suco gástrico, sais biliares e enzimas digestivas) e deve ser

considerado o tempo de digestão (FERRUA; SINGH, 2010). Os compostos liberados da matriz alimentar são hidrolisados pelo ambiente ácido (pH 1,5-3,5) e as antocianinas predominam na sua forma estrutural de cátion flavilium (cor vermelha) (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

Os estágios finais da digestão ocorrem no intestino delgado, responsável pela decomposição das macromoléculas e absorção de água e nutrientes, composto por duodeno (0,25 a 0,3 m), jejuno (~ 1,22 m) e íleo (~ 1,52 m). A maior parte da digestão ocorre no duodeno, enquanto os nutrientes digeridos são absorvidos no jejuno e no íleo (LI et al., 2020). O pH intestinal varia em torno de 6,7 a 7,4 e nesta etapa as antocianinas são transformadas em moléculas de baixo peso molecular como ácidos fenólicos e catecol (BRAGA et al., 2018).

Os benefícios a saúde humana dos polifenóis são obtidos na fase intestinal, onde a fração de compostos disponível atinge o cólon e se torna substrato para a microbiota intestinal, que catabolizam os compostos ingeridos para liberar metabólitos frequentemente mais ativos e melhor absorvidos que os compostos fenólicos nativos, estes são responsáveis pelos efeitos benéficos dos polifenóis (QUATRIN et al., 2020). Além disso, os polifenóis também podem exercer efeitos semelhantes aos prebióticos modulando o crescimento de bactérias benéficas do gênero *Bifidobacteria* e *Lactobacillus* (ESPÍN; GONZÁLEZ-SARRÍAS; TOMÁS-BARBERÁN, 2017).

A bioacessibilidade das antocianinas dos pós da casca de jabuticaba, jambolão e jambo foi estudada por simulação da digestão *in vitro* acoplada aos modelos de absorção gástrica (células MKN-28) e intestinal (células Caco-2). A bioacessibilidade após a digestão gástrica foi de 13% para a jabuticaba, 45% para o jambo e 65% para o jambolão, enquanto no intestino foi de 10% para a jabuticaba, 15% para o jambo e 45% para o jambolão. O modelo de absorção intestinal (Caco-2) demonstrou maior eficiência de transporte para as antocianinas do jambo (0,8%), em comparação com jabuticaba (0,2%) e jambolão (0,3%), da mesma forma para o modelo de absorção gástrica (MKN-28), a eficiência foi de 19,7% para o jambo, 9,7% para jabuticaba e 14,1% para o jambolão. Os resultados mostraram que o pó de jambolão foi capaz de fornecer os maiores valores de concentração após os ensaios de transporte gástrico e intestinal. Assim o fruto pode ser considerado uma fonte rica em antocianinas para o consumo humano (MARQUES PEIXOTO et al., 2016). Em

contraste recentemente Sousa et al. (2021) avaliaram a bioacessibilidade de alguns compostos bioativos da polpa de jambolão após simulação de digestão oral, gástrica, duodenal e colônica. No estudo as ACNs foram identificadas em cada fase da digestão. No cólon nenhuma ACNs foi identificada, já na fase duodenal foram identificadas petunidina e delphinidina ambas 3,5-O-glicosídeos. Assim o presente estudo demonstrou que as antocianinas do jambolão são degradadas após digestão *in vitro*. Mesmo assim, o fruto pode ser considerado bioativo e sua atividade antioxidante das frações bioacessíveis no cólon está correlacionada com os flavonoides não antocianinas e proantocianidina.

A bioacessibilidade da formulação de ACNs do extrato de cereja azeda com argila mineral a base de cátions foi avaliada, não houve diferença significativa entre a recuperação de ACNs na formulação com argila mineral em comparação ao controle, portanto a presença da argila mineral não apresentou efeito na redução da bioacessibilidade e no aumento da capacidade antioxidante das ACNs (SINGH; KITTS, 2019). Observou-se que o estudo não produziu um biohíbrido, a argila mineral foi adicionada ao extrato de cereja e nesta solução foram adicionados os fluidos digestivos.

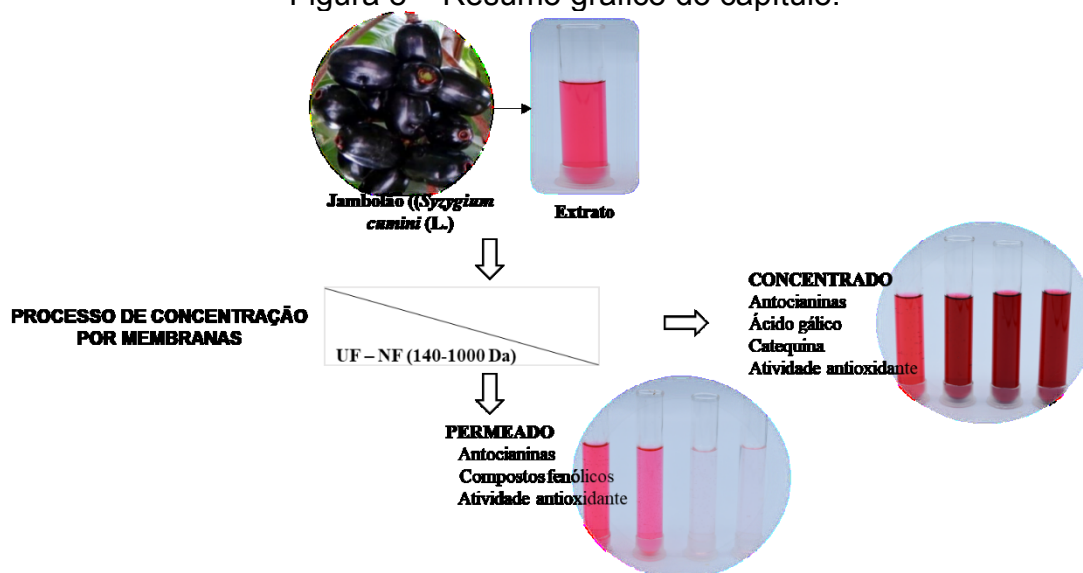
Portanto, estes são os únicos trabalhos que avaliaram a digestibilidade do jambolão e de ACNs com argila mineral, assim são necessários novos estudos para elucidar estes resultados. Além disso, a baixa disponibilidade das antocianinas na fase intestinal sugere novos estudos para proteção dos compostos nas diferentes fases de digestão *in vitro*.

CAPÍTULO 3 - CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DO EXTRATO DE JAMBOLÃO POR ULTRA (UF) E NANOFILTRAÇÃO (NF) E CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES

O jambolão é uma fruta inexplorada rica em compostos bioativos como antocianinas, catequina e ácido gálico. Assim, a extração de compostos bioativos permite agregar valor ao fruto. Nesse contexto, o presente estudo relata pela primeira vez a recuperação e concentração do extrato da fruta de jambolão por ultra e nanofiltração.

Os resultados deste capítulo foram publicados na revista *Plant Foods for Human Nutrition*, com artigo de pesquisa intitulado: *Bioactive Compounds from Jambolan (*Syzygium cumini* (L.)) Extract Concentrated by Ultra and Nanofiltration: a Potential Natural Antioxidant for Food*. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11130-021-00878-8>. A Figura 8 apresenta um resumo gráfico do presente capítulo.

Figura 8 – Resumo gráfico do capítulo.



Fonte: Autora (2022).

3.1 MATERIAL

Os frutos de jambolão foram colhidos manualmente de árvores locais, na cidade de Florianópolis, SC, Brasil, em fevereiro de 2019. A argila montmorilonita (CP31) foi doada pela empresa Bentonisa. Os reagentes utilizados foram: ácido cítrico (Vetec, Brasil), etanol (Neon, Brasil), cloreto de potássio (Dinâmica, Brasil), acetato de sódio (Dinâmica, Brasil), Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich), carbonato de sódio (Dinâmica, Brasil), os radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), e 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) (Sigma-Aldrich), metanol para HPLC (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), ácido fórmico (Lichropur, Darmstadt, Alemanha), padrões de ácidos fenólicos (ácido vanílico, ácido gálico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido caféico e ácido clorogênico) e flavonoides (catequina, epicatequina, quercetina e miricetina) da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St Louis, MO, EUA). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.1.1 Matéria prima

Os frutos maduros de jambolão foram colhidos de árvores locais (Florianópolis/SC), selecionados e lavados, e após a polpa e a casca foram separadas manualmente e imediatamente armazenadas a -18 ± 2 °C.

3.1.2 Extração

Para obtenção do extrato polpa e casca congeladas ($5 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$) foram adicionadas a uma solução de água acidificada (ácido cítrico a 1%) e trituradas usando um misturador doméstico (Oyster, Brasil). Em seguida, o processo de extração foi realizado por 10 min a 23 °C, sob agitação magnética (750 rpm) (IKA, Brasil). Após o extrato aquoso foi centrifugado (Solab, Brasil) a 4677 g por 5 min, o sobrenadante foi coletado e o precipitado residual foi submetido a uma nova extração seguindo o mesmo protocolo descrito anteriormente. Então as duas frações foram misturadas e o extrato foi processado em uma unidade de membrana.

3.1.3 Concentração do extrato de jambolão

O extrato de jambolão foi concentrado usando quatro membranas planas com diferentes pontos de corte molar (MWCO) variando de 180 a 4000 g. mol⁻¹. As características de cada membrana polimérica utilizada são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Especificações técnicas das membranas utilizadas.

| Membrana | Material | MWCO (g. mol ⁻¹) |
|------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| UH004 (Microdyn Nadir) | Polietersulfona hidrofílica | 4000 |
| NP010 (Microdyn Nadir) | Polietersulfona | 1000 |
| NF270 (Dow Filmtech) | Poliamida TFC | 200-300 |
| NF90 (Dow Filmtech) | Poliamida | 180 |

Nota: UF - ultrafiltração (UH004), NF - nanofiltração, MWCO - ponto de corte molar.

Antes da utilização as membranas foram tratadas por imersão em etanol (99%) por 2 h e após foram imersas em água deionizada por 24 h. Os ensaios de ultra e nanofiltração foram realizados em uma célula de filtração sem saída, com capacidade volumétrica de 250 mL acoplada a um manômetro. A pressão transmembrana foi obtida por pressurização de nitrogênio (99,99%, White Martins, Brasil) no espaço superior da célula de permeação. As filtrações foram realizadas com pressão de 8 bar para UF e 12 bar para NF sob agitação magnética (750 rpm). 50 g (± 1) de extrato de jambolão foram transferidos para a célula de filtração (*Dead-end*) a 25 °C. O fluxo de permeado (J) foi calculado utilizando a Equação 5. Para obter a massa de permeado as amostras foram coletadas a cada 10 min.

$$J = \frac{m}{A * t} \quad (5)$$

Onde: m é a massa acumulada de permeado (kg); A é a área efetiva da membrana (m²) para permeação, e t é o tempo de processo (s).

O ponto final do processo de concentração foi estabelecido em 80% de recuperação ou fator de redução volumétrica igual a 5. A eficiência do processo foi calculada utilizando o fator de concentração (FC) para os extratos concentrados. FC foi calculado para as análises de sólidos totais, compostos fenólicos totais, conteúdo total de antocianinas, ácido gálico e catequina, conforme a Equação 6.

$$FC = \frac{C_c}{C_a} \quad (6)$$

Onde: C_c é a concentração de constituinte no concentrado e C_a é a concentração de constituinte na alimentação.

As frações de alimentação, concentrado e permeado foram coletadas para análises posteriores, e todos os ensaios foram realizados em duplicata.

3.1.4 Avaliação do processo de concentração

3.1.4.1 Mecanismo de *fouling*

O mecanismo de *fouling* para as membranas de filtração foi identificado utilizando o modelo proposto por Hermia (1982) (Tabela 5). O modelo de bloqueio de poros descreve quatro mecanismos diferentes de incrustação: bloqueio completo de poros para $n = 2$; bloqueio interno dos poros para $n = 1,5$; bloqueio intermediário dos poros para $n = 1,0$; e formação de torta para $n = 0$, sendo, n o número que indica o mecanismo de incrustação (adimensional). De acordo com as equações do modelo um coeficiente de bloqueio de poros (valor K) pode ser calculado por regressão não linear dos dados experimentais (ZHENG et al., 2018).

Tabela 5 - Modelos do mecanismo de *fouling* propostos por Hermia.

| Modelos de bloqueio dos poros | Hermia's model | Diagrama esquemático |
|--|-----------------------------|----------------------|
| $J = J_0 \times \exp(-K \times t); K (s^{-1})$ | Bloqueio completo dos poros | |
| $J = (J_0^{-0.5} + K \times t)^{-2}; K (m s^{-2})$ | Bloqueio interno dos poros | |
| $J = (J_0^{-1} + K \times t)^{-1}; K (m^{-1})$ | Bloqueio intermediário | |
| $J = (J_0^{-2} + K \times t)^{-0.5}; K (s m^{-2})$ | Formação de torta | |

Nota: J é fluxo volumétrico ($m \cdot s^{-1}$), t é o tempo de filtração (s), K é a constante dos modelos (a unidade depende do mecanismo).

3.1.4.2 Ângulo de contato

As medidas do ângulo de contato da superfície das membranas antes e após a permeação do extrato foram obtidas pelo método da gota séssil, utilizando um goniômetro (RAMÉ-HART, 250). Três gotas de extrato de jambolão foram adicionadas à superfície das membranas usando uma seringa (25 °C). Foram realizadas dez medições para cada amostra.

3.1.4.3 Espectroscopia de infravermelho transformada de fourier (FTIR)

As análises de infravermelho por transformada de fourier (FTIR, Cary 660, Agilent, US) da superfície das membranas foram realizadas na região do infravermelho entre os comprimentos de onda de 400 a 4000 cm^{-1} , usando uma resolução de 4 cm^{-1} com 20 varreduras.

3.1.5 Caracterização do extrato

3.1.5.1 Análises físico-químicas

O pH, teor de sólidos totais (ST) e sólidos solúveis totais (SST) dos extratos foram determinados nas amostras da alimentação, permeado e concentrado em triplicata. O pH da solução foi medido usando um medidor de pH (Gehaka, PG3000). ST foi determinado de acordo com o método AOAC (2005). SST (°Brix) foi medido em um refratômetro manual (Atago, modelo PAL-BX / RI, Japão).

3.1.5.2 Cor

A cor dos extratos foi medida com colorímetro (Minolta Chroma Meter CR-400, Konica Minolta, Osaka, Japão). Os parâmetros luminosidade (L^*), intensidade da cor verde-vermelho (a^*) e intensidade da cor azul-amarelo (b^*) foram registrados, e a variação global da cor (ΔE^*) foi calculada em relação ao extrato da alimentação, conforme a Equação 7. As análises foram realizadas a 25 ± 1 °C em triplicata.

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (7)$$

Onde: $\Delta L^* = L^*_{\text{alimentação}} - L^*_{\text{concentrado}}$; $\Delta a^* = a^*_{\text{alimentação}} - a^*_{\text{concentrado}}$;
 $\Delta b^* = b^*_{\text{alimentação}} - b^*_{\text{concentrado}}$.

3.1.5.3 Caracterização das antocianinas dos extratos (ACNs)

A quantificação de antocianinas monoméricas totais foi realizada pelo método diferencial de pH (GIUSTI; WROLSTAD, 2001), utilizando um espectrofotômetro (Quimis, Q898U2M5, Brasil). As leituras das amostras foram realizadas a 520 e 700 nm e água destilada foi utilizada como branco. Alíquotas de extrato foram dissolvidas em tampão de cloreto de potássio 0,025 M (pH = 1) e tampão de acetato de sódio 0,4 M (pH = 4,5). A concentração total de antocianinas nos extratos foi calculada usando a seguinte Equação 8:

$$ACNs = \frac{AM_w DF}{\epsilon L} \quad (8)$$

Onde A = [(A 520 nm – A 700 nm) pH 1,0 - (A 520 nm – A 700 nm) pH 4,5], M_w é o peso molecular da cianidina-3-glicosídeo (449,2 g mol⁻¹), DF é o fator de diluição, ϵ é o coeficiente de extinção molar da cianidina-3-glicosídeo (26,900 L mol⁻¹ cm⁻¹) e L é o comprimento do caminho óptico (1 cm). O teor total de antocianinas foi expresso em mg equivalente de cianidina-3-O-glicosídeo por g de fruta fresca.

3.1.5.4. Fenólicos totais

Compostos fenólicos totais (FT) foram determinados pelo método de Folin-Ciocalteu de acordo com Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós (1999) com pequenas modificações. Extrato de jambolão (200 µL), água destilada (2 mL) e reagente Folin-Ciocalteu (0,25 N) (2 mL) foram misturados e, após 5 min, foram adicionados à reação 3 mL de carbonato de sódio (7,5%). As amostras foram incubadas a 25 °C por 2 h, e absorbância foi medida a 750 nm (Quimis, Q898U2M5, Brasil). Metanol foi utilizado como branco e os compostos FT foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico (EAG)/g de fruta fresca.

3.1.5.5 Atividade antioxidante (DPPH e ABTS)

Atividade antioxidante por ABTS foi realizada de acordo com Re et al. (1999). As amostras reagiram com o radical ABTS⁺ por 6 min, após a absorbância foi medida a 734 nm em um espectrofotômetro (Quimis, Q898U2M5, Brasil) e etanol foi usado como branco. O mesmo procedimento foi utilizado para preparar uma curva padrão de ácido gálico (0 - 75 mg/L). Os resultados foram expressos em mg equivalente de ácido gálico (EAG)/100 g de fruta fresca.

A capacidade antioxidante do extrato de jambolão também foi determinada pela eliminação do radical DPPH[•] de acordo com o método descrito por Brand-Williams et al. (1995). As amostras reagiram com a solução DPPH por 30 min. Em seguida, a absorbância foi medida a 515 nm em um espectrofotômetro (Quimis, Q898U2M5, Brasil) e metanol foi usado como branco. Uma curva padrão de ácido gálico (0 - 100 mg/L) foi preparada, e os resultados foram expressos em mg equivalente de ácido gálico (EAG)/100 g de fruta fresca.

3.1.5.6 HPLC-DAD-MS

A identificação das antocianinas e a quantificação dos fenólicos individuais do extrato de jambolão concentrado foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detecção de arranjo de diodos e espectrometria de massa (HPLC-DAD-MS) de acordo com o método descrito por Pilatti-Riccio et al. (2019) usando um detector de matriz de diodos, acoplado a um espectrômetro de massa contendo uma fonte de ionização por eletropulverização e um analisador de quadrupolo (LCMS-2020, Shimadzu, Kyoto, Japão). Os parâmetros usados foram as configurações padrão do fabricante. As varreduras de MS (espectrometria de massa) foram realizadas nos dois modos (positivo/ negativo) em uma faixa de massa de 140 a 800 Da. As análises foram realizadas com uma coluna C18 (5µm, 4,6 x 25mm; NST, Santos, Brasil). A fase móvel foi composta por água acidificada com ácido fórmico (0,1%) e metanol acidificado com ácido fórmico (0,1%) com sistema de eluição em gradiente. A vazão da fase móvel foi de 1,2 mL.min⁻¹ e o volume de injeção de 10 µL.

A identificação dos compostos fenólicos foi realizada pela comparação dos tempos de retenção dos picos com os tempos de retenção dos padrões, seguida pela

confirmação comparando os espectros de massa dos picos e padrões da amostra. A quantificação foi realizada através da área do pico obtida pelos sinais do detector de matriz de diodos (SPD-20A/20AV, Shimadzu, Kyoto, Japão) a 262, 272, 310, 323, 324 e 325 nm para ácidos fenólicos (ácido vanílico, ácido gálico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido caféico e ácido clorogênico) e 279, 370, 372 nm para flavonoides (catequina, epicatequina, quercetina e miricetina).

A identificação das antocianinas foi realizada utilizando ESI-MS (ionização por eletropulverização - espectrometria de massa), em modo positivo, com faixa de varredura de 100-800 m/z, e os compostos foram identificados com base em dados espectroscópicos (UV-Vis e MS) de relatórios anteriores (DE CARVALHO et al., 2017; TAVARES et al., 2016).

3.1.6 Análise estatística

A análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey será realizada para verificar a significância estatística dos dados. As análises estatísticas foram realizadas com um nível de confiança de 95% utilizando o software Statistic 6.0 (StatSoft Inc., EUA). As análises experimentais foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em média \pm desvio padrão.

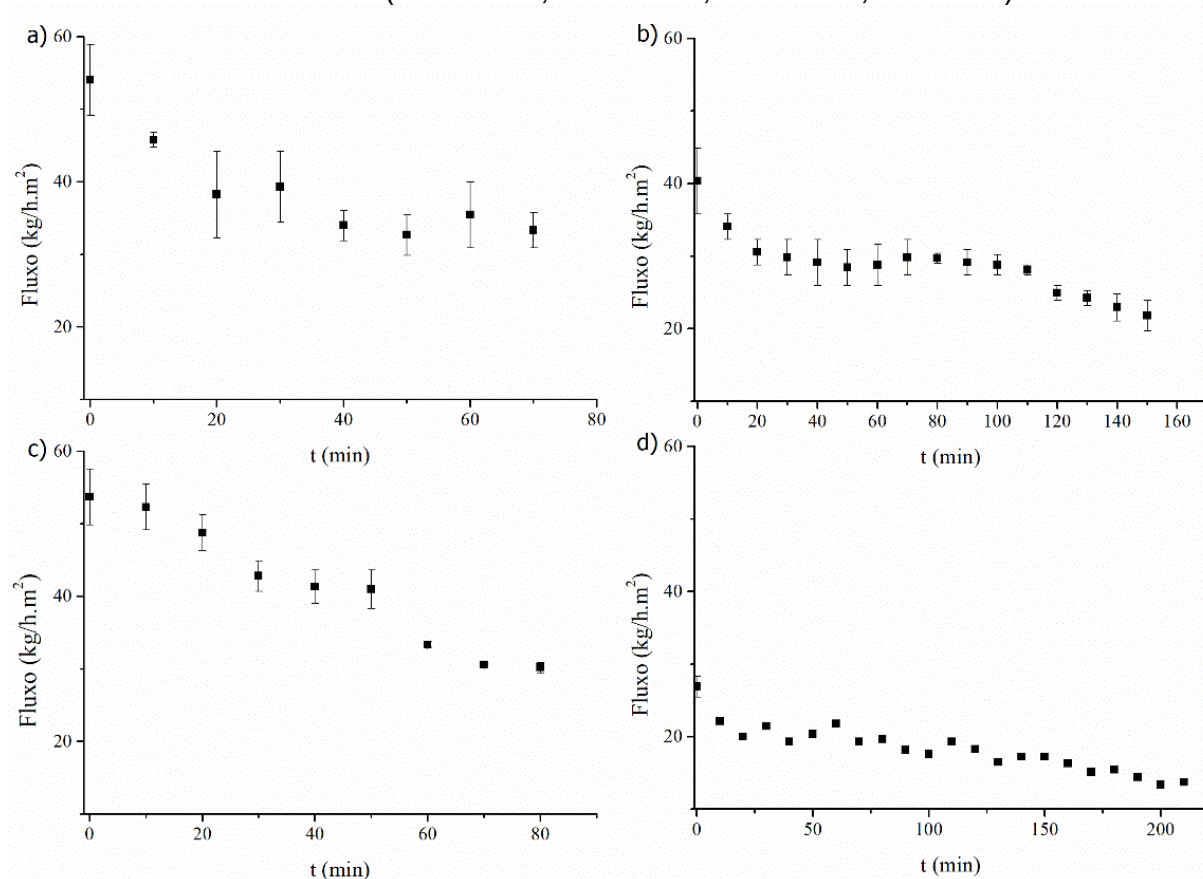
3.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.2.1 Concentração do extrato de jambolão por UF e NF

Os fluxos de permeado do extrato de jambolão em função do tempo de operação durante o processo de UF e NF em módulo *dead-end* estão apresentados na Figura 9. Os fluxos iniciais de permeado foram 54,04, 40,36, 53,69 e 26,88 kg/h.m² para as membranas UH004, NP010, NF270 e NF90, respectivamente. Observou-se uma redução do fluxo de permeado nos primeiros 20 min de filtração para todos os experimentos, comportamento típico de processos de filtração *dead-end* (DE SANTANA MAGALHÃES et al., 2019). A redução no fluxo de permeado ocorre devido a polarização e adsorção de solutos na superfície da membrana aumentando a

resistência a filtração o que leva à incrustação da membrana e a diminuição gradual do fluxo até o final do processo (VIEIRA et al., 2018).

Figura 9 - Fluxos de permeado da filtração do extrato de jambolão em diferentes membranas (a - UH004, b - NP010, c - NF270, d - NF90).



Os fluxos de permeado no final dos ensaios foram de 33,34, 21,79, 30,18 e 13,68 Kg/h.m² para as membranas UH004, NP010, NF270 e NF90, respectivamente. A membrana NF90 apresentou a maior porcentagem de decaimento do fluxo de permeado (49,11%) quando comparado ao fluxo inicial, seguido pela NP010 (46,01%), NF270 (43,79%) e UH004 (38,30%). Os mecanismos de incrustação que atuam na redução do fluxo de permeado durante o processo foram avaliados usando o modelo de Hermia, conforme mostrado na Tabela 6.

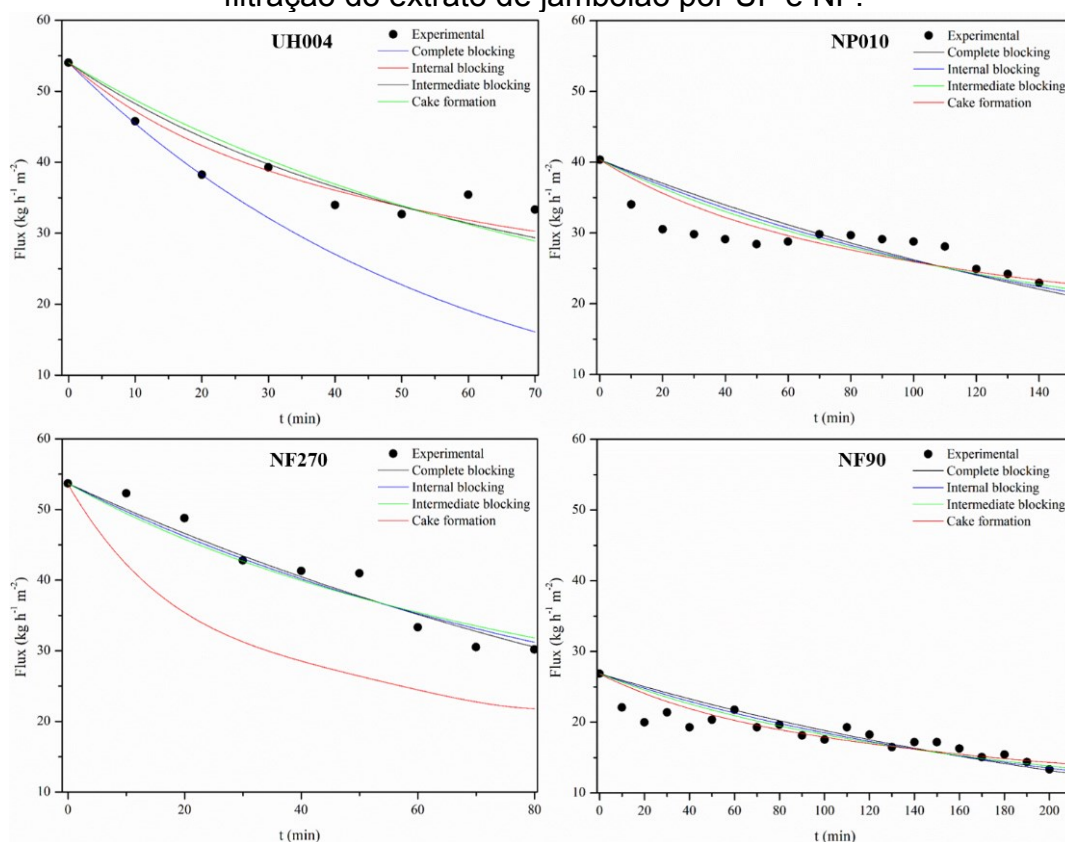
Tabela 6 - Avaliação dos parâmetros de *fouling* propostos pelo modelo de Hermia para membranas de Ultra (UF) e Nanofiltração (NF) e ângulo de contato.

| Membrana | Modelo | | | | Ângulo de contato (°)* | |
|----------|----------------|------|------|------|------------------------|------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | Antes | Depois |
| | R ² | | | | | |
| UH004 | 0,86 | 0,84 | 0,86 | 0,90 | 58,8 ± 0,7 | 64,1 ± 0,2 |
| NP010 | 0,72 | 0,73 | 0,74 | 0,76 | 55,2 ± 2,3 | 63,9 ± 0,4 |
| NF270 | 0,96 | 0,96 | 0,95 | 0,83 | 44,3 ± 1,4 | 43,8 ± 1,6 |
| NF90 | 0,88 | 0,85 | 0,85 | 0,84 | 46,2 ± 3,0 | 63,0 ± 1,0 |

Nota: R² - coeficiente de determinação. 1 - Bloqueio completo, 2 - Bloqueio interno, 3 - Bloqueio intermediário, 4 - Formação de torta. *Antes e depois da filtração.

Para a membrana UH004 as equações do modelo apresentaram bom ajuste aos dados experimentais com $R^2 > 0,83$ para o bloqueio intermediário, bloqueio interno e para a formação de torta. O modelo de bloqueio completo dos poros não se ajustou aos dados experimentais (Figura 10). O melhor ajuste dos dados foi observado para a formação de torta ($R^2 = 0,90$). Neste modelo, supõe-se que as partículas sejam muito maiores que o tamanho dos poros da membrana (GHALAMI CHOOBAR et al., 2019). No entanto a membrana UH004 possui maior MWCO entre as membranas utilizadas, de tal modo outras propriedades, como rugosidade e hidrofobicidade atuam na redução do fluxo. Para a membrana NP010, os valores de $R^2 < 0,80$ sugeriram que os modelos de Hermia não se ajustaram aos dados experimentais (Figura 10).

Figura 10 - Dados experimentais e modelos preditos para o fluxo de permeado da filtração do extrato de jambolão por UF e NF.



Fonte: Autora (2020).

A membrana NF270 mostrou uma boa correlação para o modelo de bloqueio completo dos poros, bloqueio interno e bloqueio intermediário. Para o modelo de formação de torta os dados experimentais não se ajustaram. Os dados de fluxo de permeado da membrana NF90 mostraram uma boa correlação com todos os modelos de Hermia (Figura 10).

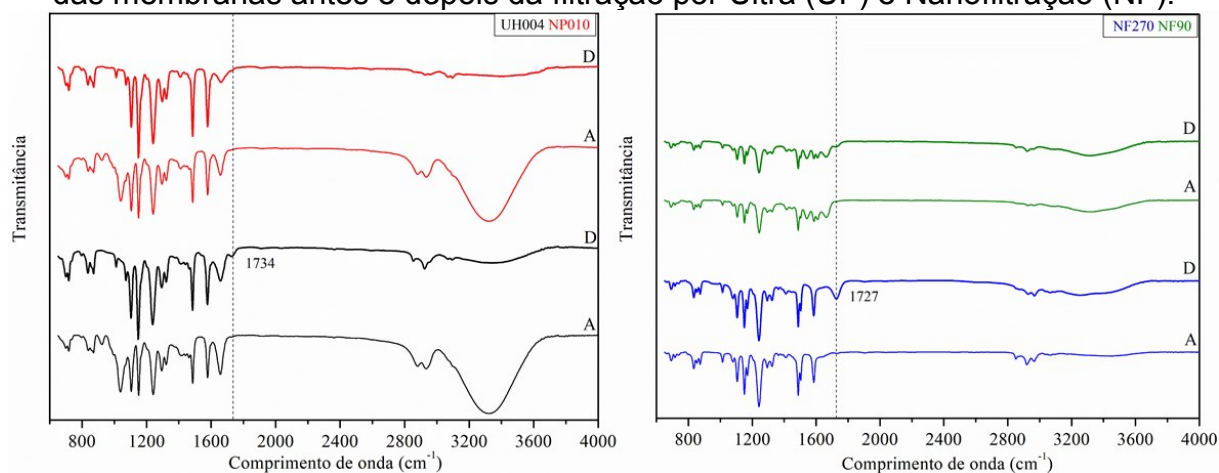
Para as membranas NF270 e NF90, o modelo que melhor se ajustou aos dados de fluxo foi o bloqueio completo dos poros ($R^2 = 0,96$ e $0,88$) e bloqueio interno ($R^2 = 0,96$ e $0,85$). Nestes modelos, as partículas são consideradas maiores que o tamanho de poros da membrana ou iguais, assim podem bloquear completamente a entrada dos poros ou bloquear internamente os poros da membrana (GHALAMI CHOOBAR et al., 2019). As membranas de NF apresentam tamanho de corte de 180-300 Da, assim as antocianinas como petunidina 3,5-diglicosídeo, malvidina 3,5-diglicosídeo e delphinidina 3,5-diglicosídeo (641 , 655 e 627 g.mol⁻¹) foram retidas permanecendo na fração concentrada. Portanto, esses compostos podem ser

depositados na superfície da membrana reduzindo o fluxo de permeado (GHOSH et al., 2018).

Os ângulos de contato das membranas de UF (58,76 ° e 55,19 °) foram maiores que as membranas de NF (44,33 ° e 46,22 °). O menor ângulo de contato das membranas NF pode ser explicado devido aos grupos amidas polares presentes na estrutura polimérica, que podem interagir com solventes polares através da ligação de hidrogênio (VIEIRA et al., 2018). Os ângulos de contato para NF90, UH004 e NP010 aumentaram após o processo de filtração, indicando deposição e adsorção de incrustantes orgânicos hidrofóbicos na superfície (Tabela 6).

A mudança visível na cor das superfícies da membrana após a filtração pode indicar a deposição de substâncias cromóforas (antocianinas). Especialmente para UH004 e NF270, foram observadas manchas na superfície. Espectros FTIR das membranas limpas e incrustadas (Figura 11) fornecem informações adicionais sobre a natureza química dos contaminantes e suas interações com a superfície membrana. Para NF270 e UH004 foram observadas bandas em torno de 1700 cm^{-1} , atribuídas aos grupos C=C e C=O dos anéis aromáticos das antocianinas (SWER; CHAUHAN, 2019). A membrana NF270 é composta de poliamida semi-aromática piperazina, que pode ser confirmada pelas bandas em 2966 cm^{-1} (alongamento alifático C-H) e 1600 cm^{-1} (amida I) (TANG; KWON; LECKIE, 2009). Outras bandas da membrana NF270 não mostraram diferença após a permeação do extrato.

Figura 11 - Espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier da superfície das membranas antes e depois da filtração por Ultra (UF) e Nanofiltração (NF).



Nota: A - antes e D - depois da filtração do extrato de jambolão. Fonte: Autora (2020).

A membrana NF90 mostrou espectros de FTIR característicos de poliamida aromática, com bandas de 1663 cm^{-1} (amida I), 1541 cm^{-1} (amida II) e 1609 cm^{-1} (amida aromática), também descritos por Chen et al. (2018) que estudaram a caracterização físico-química de membranas de NF comerciais. Os espectros de FTIR da membrana NP010 após a filtração mostraram bandas de maior intensidade (Figura 10), mas não apresentaram bandas de antocianinas. Portanto, a quantidade de extrato de jambolão depositada na superfície da membrana pode ser considerada desprezível. Bandas em 3313 cm^{-1} , 1039 , 923 cm^{-1} foram atribuídos ao agente conservante (glicerol) na superfície das membranas NP010 e UH004 antes da limpeza (ESMAEILI et al., 2019).

3.2.2 Produtos obtidos da filtração do extrato de jambolão por UF e NF

A Tabela 7 apresenta os valores de pH, SST e ST das frações do extrato de jambolão: alimentação, concentrado e permeado. A polpa de jambolão apresentou pH de 3,80 e cor roxa. A extração dos compostos fenólicos e antocianinas da polpa com água acidificada diminui o pH (2,69) e houve mudança da cor das antocianinas para vermelho, pois em solução ácida ($\text{pH} \leq 3$), as antocianinas predominam na forma de cátions flavilium (DO CARMO BRITO et al., 2017). O uso de solventes acidificados pode aumentar a eficiência de extração de alguns compostos, em particular as antocianinas (BLACKHALL et al., 2018). Chaudhary e Mukhopadhyay (2013) relataram maior teor de antocianinas extraídas de frutos de jambolão com a adição de ácido cítrico (1%).

Tabela 7 - pH, ST e SST das frações de extrato de jambolão: alimentação, concentrado e permeado obtidas por UF e NF.

| Membrana | Fluido | pH | ST (%) | SST (°Brix) |
|----------|-------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | Alimentação | 2,69 ± 0,01 ^d | 1,19 ± 0,03 ^g |
| UH004 | Concentrado | 2,57 ± 0,01 ^h | 1,59 ± 0,04 ^d | 1,65 ± 0,07 ^f |
| | Permeado | 2,59 ± 0,01 ^h | 1,47 ± 0,01 ^e | 1,41 ± 0,01 ^d |
| NP010 | Concentrado | 2,53 ± 0,01 ^e | 2,07 ± 0,01 ^c | 2,05 ± 0,07 ^c |
| | Permeado | 2,74 ± 0,01 ^c | 1,30 ± 0,02 ^f | 1,25 ± 0,07 ^e |
| NF270 | Concentrado | 2,30 ± 0,01 ^g | 6,74 ± 0,04 ^b | 6,20 ± 0,01 ^b |
| | Permeado | 3,05 ± 0,01 ^a | 0,20 ± 0,03 ^h | 0,30 ± 0,01 ^g |
| NF90 | Concentrado | 2,38 ± 0,01 ^f | 7,27 ± 0,01 ^a | 6,80 ± 0,01 ^a |
| | Permeado | 3,02 ± 0,01 ^b | 0,09 ± 0,01 ⁱ | 0,20 ± 0,01 ^g |

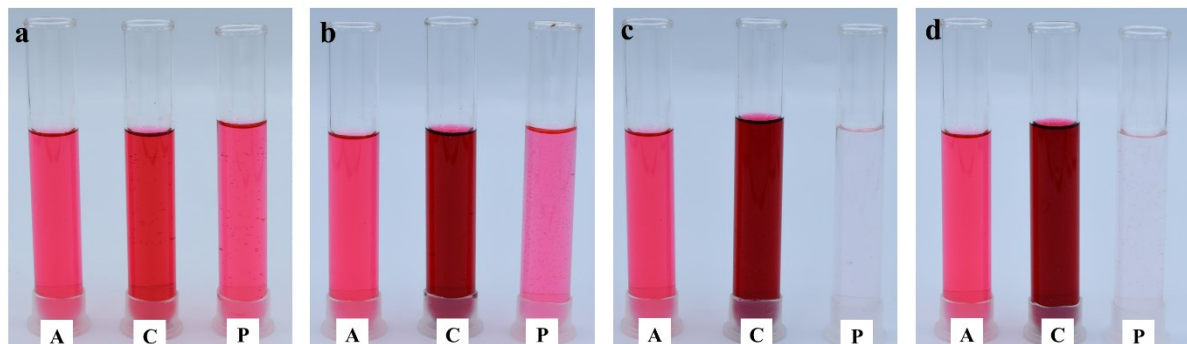
Nota: Resultados com letra minúscula igual na mesma coluna, indica que as frações não diferiram significativamente ($p > 0.05$), de acordo com o teste de Tukey. ST: sólidos totais; SST: sólidos solúveis totais; Ultrafiltração (UF); Nanofiltração (NF).

Fonte: Autora (2020).

O conteúdo de SST da alimentação e dos extratos concentrados apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) apenas nos ensaios de NF. A membrana NF270 concentrou os SST de 1,55 para 6,20 °Brix com fator de concentração igual a 4. Ghosh et al. (2018) mostraram um aumento de 16,07 para 19,36 °Brix, e fator de concentração igual a 1,20 na concentração de suco de jambolão. No presente estudo observou-se maior concentração de SST utilizando-se a mesma membrana de NF (300 Da) mostrando maior eficiência do processo. Os teores de ST dos extratos de UF e NF apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$), e como esperado todas as frações concentradas foram superiores à fração de alimentação.

Os parâmetros de cor das frações de extrato das membranas NF apresentaram maior valor de L^* para as frações de permeado em relação ao concentrado e a alimentação (Figura 12). O valor de L^* para o permeado da membrana UH004 foi ligeiramente menor que o extrato de alimentação, conforme esperado (Tabela 8). Estes resultados corroboram com relatórios anteriores para a concentração de antocianinas de diferentes extratos vegetais (AREND et al., 2017; MACHADO; MELLO; HUBINGER, 2015; VIEIRA et al., 2018).

Figura 12 - Aspectos visuais das frações de extrato de jambolão obtidas por UF e NF para as membranas (a) UH004, (b) NP010, (c) NF270 e (d) NF90.



Nota: A - alimentação, P - permeado, C – concentrado. Ultrafiltração (UF) e Nanofiltração (NF). Fonte: Autora (2020).

Tabela 8 - Luminosidade (L^*), intensidade da cor vermelha (a^*), intensidade da cor amarela (b^*) e variação global de cor (ΔE^*) para as frações do extrato obtidas por UF e NF.

| Membrana | Fluido | L^* | a^* | b^* | ΔE^* |
|----------|-------------|--------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|
| | Alimentação | $38,68 \pm 0,16^d$ | $33,50 \pm 0,02^a$ | $17,86 \pm 0,11^a$ | - |
| UH004 | Concentrado | $35,77 \pm 0,22^e$ | $33,01 \pm 0,19^a$ | $17,84 \pm 0,36^a$ | $2,98 \pm 0,20^e$ |
| | Permeado | $37,88 \pm 0,21^d$ | $34,13 \pm 0,22^a$ | $18,03 \pm 0,09^a$ | $1,04 \pm 0,30^f$ |
| NP010 | Concentrado | $32,95 \pm 1,40^f$ | $32,82 \pm 1,06^a$ | $17,38 \pm 1,41^a$ | $5,98 \pm 1,10^d$ |
| | Permeado | $40,90 \pm 0,23^c$ | $32,86 \pm 0,27^a$ | $15,94 \pm 0,14^b$ | $3,00 \pm 0,46^e$ |
| NF270 | Concentrado | $23,75 \pm 0,39^h$ | $13,74 \pm 0,21^c$ | $3,02 \pm 0,01^d$ | $28,87 \pm 0,27^b$ |
| | Permeado | $57,23 \pm 0,09^a$ | $2,76 \pm 0,03^e$ | $2,86 \pm 0,03^d$ | $38,91 \pm 0,07^a$ |
| NF90 | Concentrado | $27,18 \pm 1,50^g$ | $18,13 \pm 1,21^b$ | $5,37 \pm 0,39^c$ | $22,96 \pm 0,16^c$ |
| | Permeado | $53,16 \pm 0,15^b$ | $11,84 \pm 0,06^d$ | $4,04 \pm 0,03^{c,d}$ | $29,49 \pm 0,13^b$ |

Nota: Resultados com letra minúscula igual na mesma coluna indicam que as frações não diferiram significativamente ($p > 0,05$), de acordo com o teste de Tukey. Ultrafiltração (UF) e Nanofiltração (NF). Fonte: Autora (2020).

O maior valor de a^* (33,50) para o extrato da alimentação representa a transição de cores entre vermelho e rosa, e para os extratos concentrados observa-se a diminuição dos valores de a^* e b^* (cor azulada), pois os extratos concentrados apresentaram coloração mais escura. Alterações na cor dos extratos estão associadas à concentração de antocianinas, como petunidina que apresenta cor vermelho escuro ou púrpura e malvidina de cor púrpura, as principais antocianinas presentes no extrato (MARAN et al., 2015). Ghosh et al. (2018) demonstraram o mesmo comportamento para o suco de jambolão concentrado por NF. Em relação aos valores de ΔE^* , verificou-se maior diferença para as frações permeadas das membranas NF quando comparadas a alimentação, essa diferença indica a concentração de compostos de cor (Tabela 8).

3.2.3 Antocianinas, fenólicos totais e capacidade antioxidante

De acordo com a Tabela 9, o conteúdo de FT e ACNs das frações concentradas dos processos NF é superior a alimentação. Para os extratos de UF, as ACNs dos extratos da alimentação e concentrado não apresentaram diferença ($p > 0,05$). Por outro lado, o teor de FT dos concentrados foi maior que a alimentação.

Tabela 9 – Antocianinas, fenólicos totais e capacidade antioxidante determinada por DPPH e ABTS para as frações do extrato de jambolão obtidas por UF e NF.

| Membrana | Fluido | ACNs (mg/g) | FT (mg EAG/g) | DPPH (mg EAG/100g) | ABTS (mg EAG/100g) |
|----------|--------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| UH004 | A | 2,36 ± 0,11 ^d | 4,06 ± 0,04 ^e | 67,46 ± 0,01 ^e | 86,95 ± 0,01 ^e |
| | C | 2,51 ± 0,10 ^d | 6,32 ± 0,01 ^d | 102,43 ± 0,03 ^d | 107,42 ± 0,11 ^d |
| | P | 2,11 ± 0,03 ^e | 3,73 ± 0,01 ^f | 65,19 ± 0,01 ^f | 82,60 ± 0,04 ^f |
| NP010 | C | 5,43 ± 0,13 ^c | 9,71 ± 0,01 ^c | 133,15 ± 0,01 ^c | 127,10 ± 0,03 ^c |
| | P | 1,40 ± 0,07 ^f | 3,69 ± 0,02 ^f | 68,00 ± 0,04 ^g | 76,02 ± 0,01 ^g |
| NF270 | C | 9,81 ± 0,06 ^a | 18,22 ± 0,02 ^a | 274,01 ± 0,06 ^b | 319,16 ± 0,08 ^a |
| | P | 0,09 ± 0,02 ^g | 0,60 ± 0,01 ^h | 33,70 ± 0,02 ^h | 40,33 ± 0,03 ⁱ |
| NF90 | C | 9,18 ± 0,04 ^b | 18,00 ± 0,02 ^b | 278,39 ± 0,03 ^a | 279,96 ± 0,02 ^b |
| | P | 0,18 ± 0,01 ^g | 0,98 ± 0,01 ^g | 32,92 ± 0,03 ⁱ | 51,29 ± 0,02 ^h |

Resultados com letra minúscula igual na mesma coluna indicam que as frações não diferiram significativamente ($p > 0,05$), de acordo com o teste de Tukey. A: alimentação, C: concentrado e P: permeado. Ultrafiltração (UF) e Nanofiltração (NF). Fonte: Autora (2020).

A NF foi mais eficaz na concentração de antocianinas e fenólicos do extrato de jambolão. O fator de concentração para FT variou de 1,56 (UH004) a 4,49 (NF270) e para ACNs de 1,06 (UH004) a 4,15 (NF270). Os fatores de concentração do presente estudo estão de acordo com Vieira et al. (2018) que obtiveram um fator de concentração igual a 4,00 para cianidina-3-glicosídeo e cianidina-3-rutinosídeo na concentração do extrato etanólico de jussara usando a membrana NF270.

Os resultados de ACNs do extrato de jambolão na alimentação (2,36 mg. g⁻¹) estão de acordo com Branco et al. (2016) que encontraram 2,13 mg. g⁻¹ para polpa de jambolão e foram superiores a De Carvalho et al. (2017) que encontraram 1,58 mg. g⁻¹ para frutas frescas de jambolão. O teor de FT do extrato de jambolão na alimentação (4,06 mg EAG. g⁻¹ fruta fresca) foi maior que o obtido por Branco et al. (2016) para polpa de jambolão (2,07 mg EAG. g⁻¹) e De Carvalho et al. (2017) 1,22 mg de EAG. g⁻¹ para frutas frescas de jambolão. As diferenças observadas no teor de compostos fenólicos e antocianinas dos estudos reportados, estão relacionadas as diferenças nas

metodologias de extração e quantificação e além disso o estágio de maturação dos frutos pode afetar sua composição (BRANCO et al., 2016; SERAGLIO et al., 2018).

Os compostos fenólicos e antocianinas dos frutos de jambolão são responsáveis por sua alta capacidade antioxidante que foi avaliada pelos métodos de ABTS e DPPH. A capacidade antioxidante dos extratos concentrados apresentou aumento significativo ($p < 0,05$) para todas as membranas utilizadas neste trabalho. As membranas NF270 e NF90 produziram uma fração concentrada com alta capacidade antioxidante (319,16 e 279,96 mg EAG. 100 g^{-1}), atribuída as antocianinas e os compostos fenólicos identificados e quantificados por HPLC-DAD-MS (Tabela 10). De acordo com Tavares et al. (2016) cerca de 74 compostos fenólicos individuais podem ser detectados nas partes comestíveis do jambolão principalmente na pele, como antocianinas, galotaninos e elagitaninos os principais fenólicos presentes no jambolão. Assim, o extrato concentrado pode ser um potente antioxidante para aplicação em alimentos, embora a antocianina petunidina com maior concentração no extrato de jambolão apresente poucos estudos de suas propriedades e aplicações. No entanto as antocianinas, malvidina e delphinidina demonstram boa capacidade antioxidante (KHOO et al., 2017).

Coefficientes de correlação (r) entre a atividade antioxidante, fenólicos e antocianinas do extrato concentrado foram obtidos e apresentaram altas correlações entre a atividade antioxidante DPPH e ABTS e o conteúdo de fenólicos ($r = 0,99$ e $r = 0,98$, respectivamente) e antocianinas ($r = 0,98$ e $r = 0,97$, respectivamente) esses compostos são os principais responsáveis pela atividade antioxidante do extrato. Outros estudos também avaliaram os coeficientes de correlação em extratos de frutas com boa correlação para ABTS, DPPH e compostos fenólicos ($r = 0,94$ e $r = 0,98$, respectivamente) e antocianinas ($r = 0,85$ e $r = 0,93$) na NF de suco de morango (AREND et al., 2017). Seraglio et al. (2018) relataram $r > 0,669$ entre DPPH e ácidos fenólicos em diferentes frutos de *Myrtaceae* (jabuticaba, guabiju e jambolão).

A atividade antioxidante dos extratos de jambolão pelo método ABTS foi superior ao método DPPH. Como também foi demonstrado por Arend et al. (2017) para suco de morango. A diferença da capacidade antioxidante entre os métodos ocorre porque o ABTS é mais eficaz para sistemas antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos, enquanto o DPPH para sistemas hidrofóbicos (KIM et al., 2002).

Compostos fenólicos (flavonoides e ácidos fenólicos) do extrato bruto (alimentação) e do extrato concentrado através de UF e NF foram quantificados por HPLC-DAD-MS (Tabela 10). Catequina, ácido gálico e epicatequina foram os principais compostos presentes no extrato de jambolão. No extrato da alimentação dois compostos, catequina (28,97 $\mu\text{g. g}^{-1}$ fruta fresca) e ácido gálico (27,32 $\mu\text{g. g}^{-1}$ fruta fresca) foram quantificados, e os extratos concentrados por NF, apresentaram cinco compostos quantificáveis (catequina, ácido gálico, epicatequina, ácido p-cumarico e ferúlico). Quercetina não foi identificada no extrato de jambolão. De acordo com estudos anteriores, os principais flavonoides detectados na polpa de jambolão foram galocatequina (85,82 $\mu\text{g. g}^{-1}$ fruta fresca), catequina (5,23 $\mu\text{g. g}^{-1}$ fruta fresca) e epicatequina (3,47 $\mu\text{g. g}^{-1}$ fruta fresca) (TAVARES et al., 2016). Coelho et al. (2016) relataram concentrações de catequina e ácido gálico para polpa congelada de 38,7 e 22,9 $\mu\text{g. g}^{-1}$ e para suco fresco de 30,7 e 28,1 $\mu\text{g. g}^{-1}$, respectivamente, resultados que corroboram com o presente estudo.

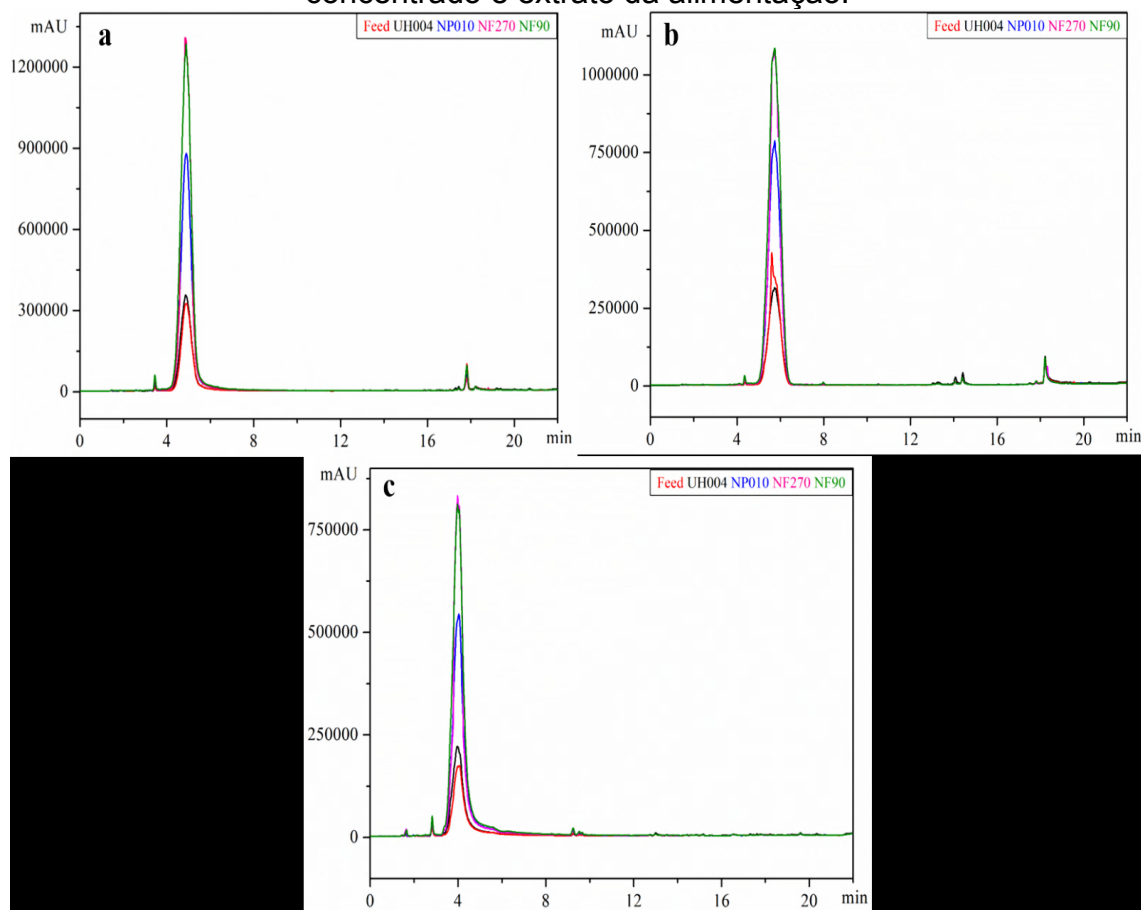
Tabela 10 - Compostos fenólicos do extrato concentrado de jambolão obtidos por UF e NF.

| Compostos fenólicos ($\mu\text{g/g}$) | Alimentação | UH004 | NP010 | NF270 | NF90 |
|---|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| Ácidos fenólicos | | | | | |
| Ácido gálico | $27,32 \pm 0,81^a$ | $29,76 \pm 0,59^a$ | $32,83 \pm 4,16^a$ | $135,84 \pm 4,79^b$ | $132,03 \pm 6,87^b$ |
| Ácido p-cumárico | <LOQ | <LOQ | $15,18 \pm 0,83$ | $40,05 \pm 0,72$ | $41,58 \pm 0,45$ |
| Ácido ferúlico | <LOQ | <LOQ | <LOQ | $15,09 \pm 0,74$ | $14,04 \pm 0,91$ |
| Ácido vanílico | <LOQ | <LOQ | <LOQ | <LOQ | <LOQ |
| Ácido caféico | <LOQ | <LOQ | <LOQ | <LOQ | <LOQ |
| Ácido clorogénico | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| Flavonoides | | | | | |
| Catequina | $28,97 \pm 0,87^a$ | $53,02 \pm 0,75^b$ | $68,95 \pm 4,79^c$ | $138,19 \pm 7,07^d$ | $141,08 \pm 2,31^d$ |
| Epicatequina | <LOQ | <LOQ | <LOQ | $55,40 \pm 7,06$ | $55,77 \pm 8,33$ |
| Miricetina | <LOQ | <LOQ | <LOQ | <LOQ | <LOQ |
| Quercetina | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |

Nota: Resultados com letra minúscula igual na mesma linha, indica que as frações não diferiram significativamente ($p > 0.05$), de acordo com o teste de Tukey. LOQ – Limite de quantificação, n.d. - não detectado. Ultrafiltração (UF) e Nanofiltração (NF). Fonte: Autora (2020).

Seis antocianinas foram identificadas no extrato de jambolão derivadas da molécula 3,5-diglicosídeo: malvidina (mv), delphinidina (dp), petunidina e cianidina (cy); e derivadas de 3-glicosídeo: mv, dp, cy. Esse perfil foi semelhante ao descrito anteriormente para frutos de jambolão (DE CARVALHO et al., 2017; TAVARES et al., 2016). As antocianinas com altas proporções molares no extrato de jambolão foram petunidina 3,5-diglicosídeo, malvidina 3,5-diglicosídeo e delphinidina 3,5-diglicosídeo, como mostrado nos cromatogramas da Figura 13. Os maiores picos identificados foram correspondentes as antocianinas petunidina, malvidina e delphinidina.

Figura 13 - Cromatograma das antocianinas identificadas no extrato de jambolão concentrado e extrato da alimentação.

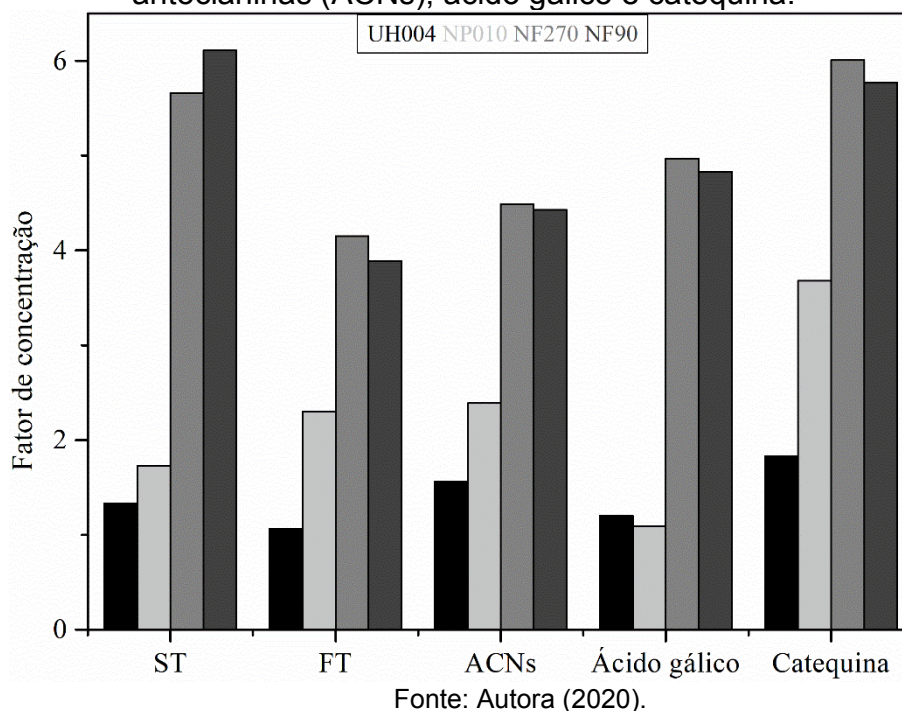


Nota: a) $m/z = 641$ - petunidina 3,5-diglicosídeo, b) $m/z = 655$ - malvidina 3,5-diglicosídeo, c) $m/z = 627$ - delphinidina 3,5-diglicosídeo. Íons moleculares ($[M]^+$ de antocianinas, como cátions flavilium, em modo de ionização positivo) no experimento MS. Fonte: Autora (2020).

Em resumo, a NF apresentou a maior retenção de ACNs, FT, ácido gálico e catequina, quando comparada à UF (Figura 14). O extrato concentrado das membranas NF270 e NF90 apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) para ACNs e FT, mas não apresentou diferença para ácido gálico e catequina. No entanto, a

membrana NF270 pode ser considerada mais eficiente na concentração do extrato de jambolão porque apresentou alto fluxo de permeado e menor decaimento do fluxo inicial.

Figura 14 - Fator de concentração para sólidos totais (ST), fenólicos totais (FT), antocianinas (ACNs), ácido gálico e catequina.



Este estudo demonstrou que a tecnologia de membranas pode ser uma alternativa às técnicas térmicas tradicionais, como a evaporação a vácuo, comumente usada para concentrar compostos bioativos de frutas e subprodutos agroalimentares, que podem afetar os compostos bioativos, com degradação da cor, perda de valores nutricionais e, às vezes, conferindo gosto de “cozido”. Assim, compostos bioativos concentrados que utilizam membranas e baixa temperatura podem ser uma opção para o desenvolvimento de novos produtos, como ingredientes alimentares funcionais (BHATTACHARJEE; SAXENA; DUTTA, 2017).

3.3 CONCLUSÃO

Um processo integrado baseado na extração com água acidificada seguida de concentração por nanofiltração pode ser utilizado com sucesso para a produção de extrato bioativo dos frutos de jambolão (*Syzygium cumini* (L.)), contendo uma

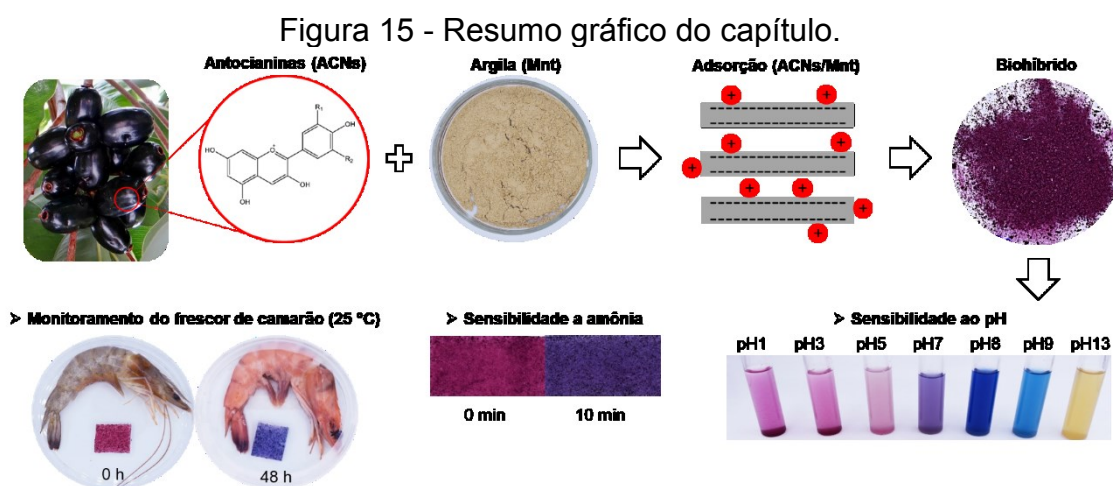
elevada quantidade de antocianinas e compostos fenólicos. A membrana NF270 foi a mais efetiva para a concentração do extrato, apresentando fator de concentração $> 4,0$ para antocianinas e compostos fenólicos. Catequina, ácido gálico e epicatequina foram os principais compostos fenólicos do extrato de jambolão, e as principais antocianinas foram petunidina, malvidina e delphinidina, 3,5-diglicosídeo. Os resultados sugerem que o extrato concentrado do fruto de jambolão pode ser obtido utilizando a membrana NF270, pois apresentou maior fator de concentração para os compostos fenólicos e antocianinas. O extrato concentrado pode ser utilizado como ingrediente para dar cor, enriquecer e melhorar a qualidade dos alimentos devido seu efeito antioxidante.

Para os próximos estudos utilizou-se apenas o extrato de jambolão (alimentação). O extrato concentrado obtido da membrana NF270 não foi aplicado, devido a necessidade de alteração do tema da tese em função da Covid-19, falta da membrana NF270 e pouco volume de extrato concentrado obtido em cada experimento.

CAPÍTULO 4 - ADSORÇÃO E DESSORÇÃO DAS ANTOCIANINAS DOS FRUTOS DE JAMBOLÃO EM MONTMORILONITA

A aplicação das antocianinas é limitada por sua instabilidade a condições ambientais externas como luz, pH, oxigênio e temperatura (ALBUQUERQUE et al., 2020; RODRIGUEZ-AMAYA, 2019). Assim, estudos para melhorar a estabilidade das ACNs durante o armazenamento e distribuição para uso em embalagens ou alimentos são essenciais. O desenvolvimento de materiais biohíbridos que combinam antocianinas a substratos inorgânicos (argilas) por intercalação tem sido investigado para reverter essas limitações e proteger os compostos do ambiente externo (MACHADO; DE FREITAS; WYPYCH, 2019).

Portanto, nesta etapa do estudo o objetivo foi desenvolver um novo material biohíbrido pela adsorção de ACNs em Mnt, estudar o efeito do pH e temperatura no processo de adsorção das ACNs dos frutos de jambolão em Mnt. Além disso, foram avaliadas as propriedades físico-químicas, propriedades antioxidantes, estabilidade de cor, e aplicação do BH como indicador de pH e na detecção de gás amônia em alimento. Um resumo gráfico do presente capítulo é apresentado na Figura 15.



Fonte: Autora (2022).

4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.1 Matérias-primas

Frutos de jambolão foram colhidos manualmente em estágio totalmente maduro, na cidade de Florianópolis, SC, Brasil, em fevereiro de 2020. Os frutos foram imediatamente lavados, e a polpa e a casca foram separadas manualmente das sementes e armazenadas a -18 ± 2 °C. A montmorilonita bruta (CP31- Bentonisa, Brasil) foi utilizada como adsorvente. Os reagentes utilizados foram: água destilada, ácido cítrico (Vetec, Brasil), etanol (Neon, Brasil), cloreto de potássio (Dinâmica, Brasil), acetato de sódio (Dinâmica, Brasil), Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich), carbonato de sódio (Dinâmica, Brasil), os radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), e 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) (Sigma-Aldrich). Todos os reagentes utilizados são de grau analítico.

4.1.2 Extração de antocianinas e caracterização

A extração e a determinação do teor de antocianinas monoméricas (ACNs) totais do fruto de jambolão foram realizadas de acordo com o descrito nos itens: 3.1.2 Extração e 3.1.5.3 Caracterização das antocianinas dos extratos (ACNs).

4.1.3 Experimentos de adsorção

4.1.3.1 Isotermas de adsorção

As isotermas de adsorção foram obtidas nas temperaturas de 10 e 20 °C em extratos com pH ajustado (1,5, 2,5 e 3,5) utilizando ácido cítrico. A Mnt foi adicionada ao extrato de jambolão em uma proporção entre 0,003 e 0,027 g por mg de ACNs. Os extratos foram agitados a 700 rpm, utilizando um agitador magnético, no escuro por 30 min. Modelos isotérmicos de Langmuir (Eq. (9)) e Freundlich (Eq. (10)) foram ajustados aos dados experimentais, usando uma rotina computacional desenvolvida no software MATLAB (R2013a; MathWorks Inc, Natick, MA, EUA).

$$Q_e = \frac{Q_m K_L C_e}{1 + K_L C_e} \quad (9)$$

$$Q_e = K_F C_e^{1/n} \quad (10)$$

Onde C_e é o conteúdo total de ACNs no extrato em equilíbrio (mg/L); Q_e é o conteúdo total de ACNs adsorvidas na Mnt no equilíbrio (mg/g); Q_m é a capacidade máxima de absorção (mg/g); K_L é a constante de Langmuir (L/mg); K_F ($L^{1/n} \cdot mg^{(1-1/n)}/g$) e n (adimensional) são as constantes de Freundlich.

4.1.3.2 Cinética de adsorção

A cinética de adsorção foi realizada para as melhores condições de adsorção. A Mnt foi adicionada ao extrato (pH 1,5) na proporção de 0,003, 0,007, 0,013 e 0,027 g por mg de ACNs. A solução foi agitada a 20 °C e 700 rpm no escuro. A concentração de ACNs adsorvidas na Mnt foram calculadas em diferentes tempos (1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 min), usando o método descrito no capítulo 3, item 3.1.5.3. Os dados da cinética de adsorção foram estimados usando a Eq. (11):

$$Q_{exp} = \frac{C_0 - WC_e}{V} \quad (11)$$

Onde Q_{exp} é a concentração de ACNs adsorvidas na Mnt (mg/g) no tempo de contato t (min), C_0 é a concentração inicial de ACNs no extrato (mg/L), C_e é a concentração de ACNs no equilíbrio (mg/L), W é o peso seco da Mnt (g), e V é o volume de extrato de jambolão (L).

Modelos cinéticos de pseudo-primeira ordem (Eq. (12)) e pseudo-segunda ordem (Eq. (13)) foram ajustados aos dados experimentais usando uma rotina computacional desenvolvida no software MATLAB (R2013a; MathWorks Inc, Natick, MA, EUA).

$$Q_t = Q_e - Q_e e^{-k_1 t} \quad (12)$$

$$Q_t = \frac{k_2 Q_e^2 t}{1 + k_2 Q_e t} \quad (13)$$

Onde Q_t é a concentração de ACNs adsorvida na Mnt (mg/g) no tempo t (min); k_1 (1/min) e k_2 (g/mg·min) são as constantes associadas aos modelos de adsorção.

4.1.4 Experimentos de dessorção

Após o processo de adsorção, o material decantado foi separado do sobrenadante e seco (forno a vácuo) a 35 °C por 4 h. Após a secagem, o material decantado foi denominado biohíbrido (BH), e foi acondicionado em dessecadores contendo sílica gel a 25 °C (\approx 0% UR) por 7 dias no escuro (CAPELLO et al., 2019; COELHO LEANDRO et al., 2021).

Fluidos simuladores de alimentos, incluindo soluções de água e álcool nas concentrações de 10%, 50% e 95% (v/v), e solução ácida (3% (v/v) água: ácido acético), foram usados como soluções de dessorção dos compostos bioativos presentes no BH. Aproximadamente 0,6 g de BH foi adicionado a 50 mL das soluções de dessorção. Os experimentos de dessorção foram realizados sob agitação constante (700 rpm) no escuro a 20 °C por 30 min.

A taxa de dessorção (D , %) e a capacidade de dessorção (Q_d , mg/g) das ACNs adsorvidas na Mnt foram calculadas com as Eq. (14) e Eq. (15), respectivamente:

$$D = \frac{C_m - C_{dt}}{C_m} 100 \quad (14)$$

$$Q_d = \frac{C_{dt} V_d}{W_d} \quad (15)$$

Onde C_m é a concentração máxima de ACNs na solução de dessorção (mg/L); C_{dt} é a concentração de ACNs em diferentes tempos (mg/L), V_d é o volume da solução de dessorção (L), e W_d é o peso seco do BH em pó (g).

4.1.5 Caracterização cristalina e química do biohíbrido

A caracterização físico-química foi realizada utilizando o BH antes e após os experimentos de dessorção. Mnt não tratada e tratada com ácido cítrico foram usados como controles. A estrutura cristalina das amostras de pó foi obtida usando um difratômetro de raios X (Rigaku MiniFlex600 DRX, Japão), operando a 40 kV e 15 mA (CuK α 1 λ = 1,54056 Å de radiação). Os difratogramas foram registrados a 20 °C, entre $2\theta = 2,5^\circ$ e 70° , a $20^\circ/\text{min}$ (CAPELLO et al., 2019).

A distância interplanar d (nm) foi calculada a partir do ângulo de difração na intensidade máxima do pico encontrado nos difratogramas de DRX e usando a Lei de Bragg's (Eq. (16)):

$$N \lambda = 2 d \sin (\theta) \quad (16)$$

Onde λ é o comprimento de onda (nm), N é a ordem de reflexão ($N = 1$, adimensional). As ligações químicas do BH foram estudadas usando uma espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR, Cary 600, Agilent, US); as análises foram realizadas na região do infravermelho entre 4000 e 400 cm^{-1} usando resoluções de 4 cm^{-1} com 20 varreduras em pellets de KBr (CAPELLO et al., 2019).

4.1.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Raios-X Dispersiva de Energia (EDS)

As características morfológicas das amostras foram avaliadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (JSM 6390LV, JEOL, Tóquio, Japão), acoplada a uma fonte de elétrons de tungstênio, um detector de elétrons secundário e uma voltagem acelerada de 10 kV. Cinco micrografias foram tiradas em pontos de amostra aleatórios com ampliação de 100X e 1.000X simultaneamente para análise de Espectroscopia de Raios-X Dispersos de Energia (EDS).

4.1.7 Conteúdo fenólico total (FT) e capacidade antioxidante do biohíbrido

Os compostos fenólicos totais das amostras (solução dessorvida do BH e extrato de jambolão) foram determinados de acordo com o método descrito em 3.1.5.4. Fenólicos totais.

A capacidade antioxidante das amostras (solução dessorvida do BH e extrato de jambolão) foi determinada de acordo com o método descrito por Brand-Williams et al. (1995). Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição do radical DPPH (%).

4.1.8 Estabilidade de cor

A estabilidade de cor do BH foi avaliada após 60 dias de armazenamento em incubadora climática artificial (BOD) a 5 e 25 °C, no escuro. As imagens do BH foram capturadas nos tempos 0, 7, 15, 30 e 60 dias por uma câmera digital (Nikon D5500, Nikon Corporation, Japão), e os parâmetros de cor foram determinados usando um sistema de visão computacional (CÁRDENAS-PÉREZ et al., 2017). As imagens foram analisadas utilizando o software Image J (National Institute Health, Bethesda, MD, USA) equipado com o plugin Color Space Converter para converter cores do sistema RGB para escala CIELab. As medições de cor foram baseadas nas coordenadas CIELab, luminosidade (L^*), intensidade de cor verde-vermelha (a^*) e intensidade de cor azul-amarela (b^*) (COELHO LEANDRO et al., 2021). A mudança de cor (ΔE^*) do BH no tempo inicial (controle) e durante o armazenamento (amostra) foi calculada usando a Eq. (17).

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (17)$$

Onde: $\Delta L^* = L^*_{\text{controle}} - L^*_{\text{amostra}}$; $\Delta a^* = a^*_{\text{controle}} - a^*_{\text{amostra}}$; $\Delta b^* = b^*_{\text{controle}} - b^*_{\text{amostra}}$.

4.1.9 Efeito do pH na cor do biohíbrido

O BH foi imerso em soluções tampão com diferentes pHs (variando entre 1 e 12), agitando-se à temperatura ambiente. As imagens das soluções foram capturadas por uma câmera digital (Nikon D5500, Nikon Corporation, Japão). Para visualizar as

mudanças de cor, amostras de cores foram criadas a partir dos valores L^* , a^* e b^* de cada solução usando o software Adobe Photoshop CC (Adobe Systems, Inc., San Jose, CA, EUA) (ZHAO et al., 2020).

4.1.10 Sensibilidade do biohíbrido à amônia

A cinética de resposta do BH aos vapores básicos foi avaliada pela sua exposição aos vapores de NH_3 por um tempo total de 10 min. 1 mL de solução aquosa de NH_4OH (5, 10 e 15% v/v) foi introduzido em um recipiente fechado (placa de Petri com dimensões de 90 mm de diâmetro x 15 mm de altura). Após o BH em pó (50 mg) foi aderido a uma fita dupla face (20 x 15 mm), e exposto à atmosfera de amônia por 2, 4, 6, 8 e 10 min (ZIA et al., 2021).

As imagens do BH foram capturadas por uma câmera digital (Nikon D5500, Nikon Corporation, Japão), e os valores L^* , a^* e b^* foram medidos usando o software Image J. A mudança de cor (ΔE^*) do BH controle e do BH exposto (amostra) ao vapor de amônia foi calculada usando a Eq. (17).

4.1.11 Aplicação do biohíbrido como sensor em alimento

O BH em pó (50 mg) foi aderido a uma fita dupla face (20x15 mm) e utilizado para avaliar o frescor de camarões durante o armazenamento. Primeiramente, $18 \pm 1,5$ g de amostras de camarão foram posicionadas dentro de placas de Petri e seladas com parafilme, sendo o BH colocado na parte inferior. Placas de Petri foram mantidas refrigeradas (5 °C, $\approx 60\%$ UR) e simulando condições aceleradas sob temperatura ambiente (25 °C, $\approx 60\%$ UR) em BOD. As imagens do BH foram capturadas nos tempos 0, 24, 48 e 72 h para avaliar a mudança de cor.

A mudança de cor (ΔE^*) do BH controle e BH em diferentes tempos de armazenamento (amostra) foi calculada usando a Eq. (17). O pH dos camarões foi medido em três pontos diferentes usando um medidor de pH de sólidos (Testo-205).

4.1.12 Análise estatística

A análise de variância (ANOVA) e o teste de comparações múltiplas de Tukey foram realizados ao nível de significância de 5% utilizando o software Statistic 6.0 (StatSoft Inc., EUA). Todas as análises experimentais foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.2.1 Concentração de antocianinas monoméricas totais (ACNs) no extrato de jambolão

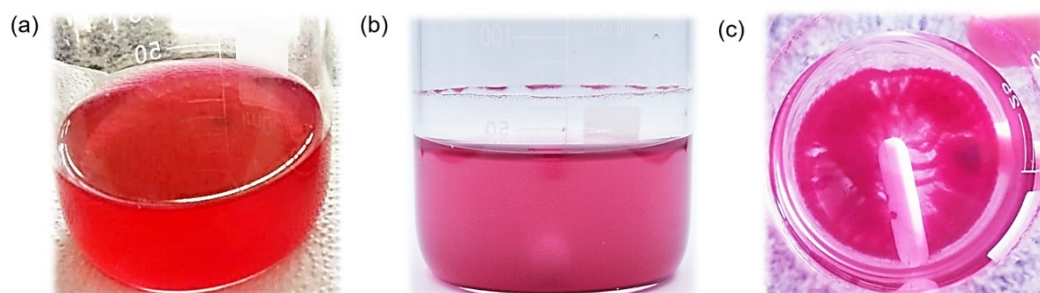
O teor de ACNs no extrato de jambolão foi de 1,70 mg/g de fruta fresca. Este resultado está de acordo com o descrito por De Carvalho et al. (2017) and Koop et al. (2021), que relataram valores de ACNs de 1,58 e 2,36 mg/g de fruta fresca, respectivamente. O pH do extrato foi de 2,5 e apresentou coloração vermelha (Figura 16a), típica de ACNs em solução ácida ($\text{pH} \leq 3$). A cor vermelha do extrato foi associada à presença de ACNs predominantemente na forma de cátions flavilium (DO CARMO BRITO et al., 2017). Segundo dados relatados anteriormente, o extrato de jambolão é composto por antocianinas, como petunidina e malvidina, compostos fenólicos, ácido gálico e catequina (KOOP et al., 2021).

4.2.2 Experimentos de adsorção

4.2.2.1 *Isotermas de adsorção*

A adsorção das ACNs sob a Mnt ocorreu nos primeiros 5 min, onde foi observado um material decantado com coloração rosa no fundo do béquer, indicando a adsorção das ACNs na superfície da Mnt, para todos os valores de pH avaliados (Figura 16b, c). Comportamento semelhante foi observado para adsorção de ACNs do extrato de casca de berinjela em argila Laponita (Lap) (CAPELLO et al., 2019; COELHO LEANDRO et al., 2021).

Figura 16 - (a) Extrato rico em antocianinas (ACNs); (b) Montmorilonita (Mnt) adicionada ao extrato; (c) Biohíbrido precipitado (BH) no final do experimento de adsorção.

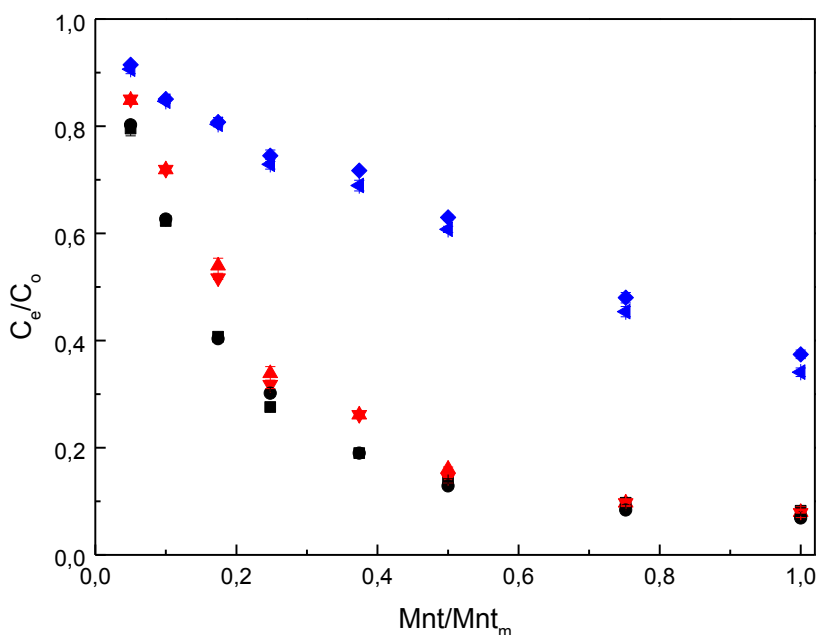


Fonte: Autora (2022).

Em geral, a adsorção das ACNs do extrato na Mnt apresentou influência significativa em relação ao pH do meio (1,5, 2,5 e 3,5). A recuperação de ACNs diminuiu à medida que o pH dos extratos aumentou (Figura 17), sendo a melhor condição de adsorção obtida em pH 1,5. Em condições ácidas $\text{pH} < 3$ as ACNs apresentam estrutura de cátions flavilium, enquanto a Mnt possui carga negativa em pHs de 2 a 12. Portanto, a estabilização das ACNs na Mnt ocorre devido as interações eletrostáticas (ZACARONI et al., 2015).

No entanto, a adsorção das ACNs não foi significativamente afetada pela temperatura (10 e 20 °C, $p > 0,05$), indicando que os sítios ativos da argila não foram modificados na faixa de temperatura estudada (Figura 18 a). Na literatura Coelho Leandro et al. (2021) estudaram a adsorção de ACNs usando Lap em diferentes temperaturas (5 a 40 °C), e Shiono et al. (2017) estudaram a descafeinação do extrato de chá verde com Mnt a 5 e 35 °C. Os autores concluíram que a temperatura não influenciou no processo de adsorção dos compostos.

Figura 17 - Isoterma de adsorção (teor de ACNs estimado no equilíbrio [C_e]/teor de ACNs estimado no tempo zero [C_0] vs. concentração de montmorilonita no tempo t [Mnt]/concentração máxima de montmorilonita [Mnt_m]), em diferentes temperaturas.

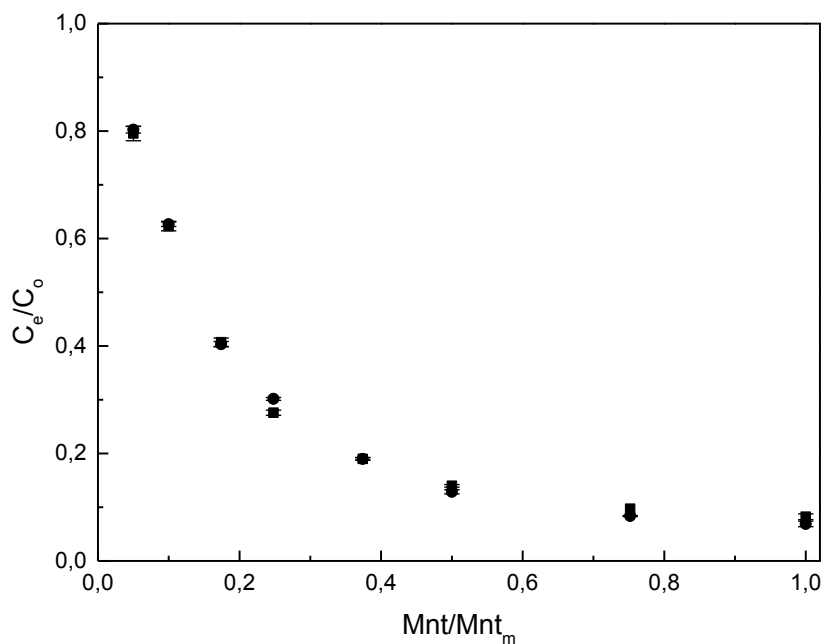


Nota: pH = 1,5 - (10 °C [■], 20 °C [●]); pH = 2,5 - (10°C [▼], 20°C [▲]); e pH = 3,5 - (10 °C [◆], 20 °C [◄]). Antocianinas (ACNs), Montmorilonita (Mnt). Fonte: Autora (2022).

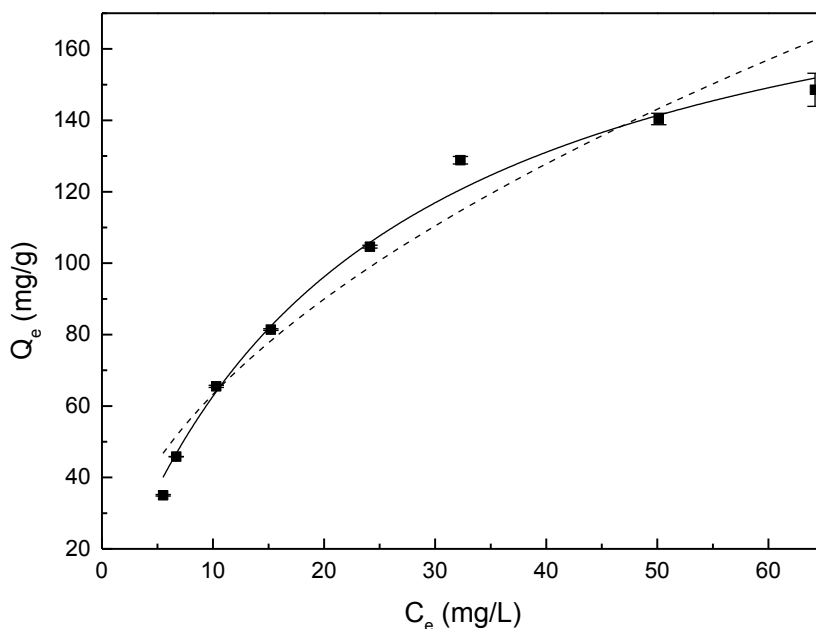
Os dados experimentais de adsorção de equilíbrio (Q_e) foram ajustados pelos modelos de Langmuir e Freundlich para as melhores condições de adsorção obtidas na temperatura de 20 °C e pH 1,5 (Figura 18a, b). Os modelos isotérmicos de Freundlich e Langmuir apresentaram valores elevados de coeficiente de determinação, demonstrando bom ajuste aos dados experimentais ($R^2 > 0,90$ e $0,96$, respectivamente). Com base no valor de R^2 , o modelo isotérmico de Langmuir foi o mais adequado para explicar a adsorção das ACNs sob a Mnt ($p < 0,05$), sugerindo adsorção em monocamada (Tabela 11). Além disso, de acordo com o valor da constante de Langmuir (K_L) a adsorção das ACNs na Mnt pode ser classificada como favorável ($0 < K_L < 1$) (CAPELLO et al., 2019; CHEN et al., 2016b). A isoterma de Langmuir também foi usada para descrever o processo de adsorção de ACNs do extrato de jambolão em argilas (laponita) e resinas macroporosas (COELHO LEANDRO et al., 2021; JAMPANI; NAIK; RAGHAVARAO, 2014).

Figura 18 - (a) Isoterma de adsorção (teor de antocianinas estimadas no equilíbrio $[C_e]$ /teor de antocianinas no tempo inicial $[C_0]$) vs. concentração de montmorilonita (Mnt) no tempo $[Mnt]$ /concentração máxima de Mnt $[Mnt_m]$), em diferentes temperaturas (10 °C $[\blacksquare]$ e 20 °C $[\bullet]$), e pH = 1,5; (b) Langmuir (-) e Freundlich (- -) equações ajustadas à curva isotérmica de adsorção típica (teor de ACNs adsorvida na Mnt no equilíbrio $[Q_e]$ vs. teor de ACNs estimadas no equilíbrio $[C_e]$).

(a)



(b)



Fonte: Autora (2022).

O modelo isotérmico de Langmuir não apresentou diferença significativa na capacidade de adsorção da Mnt com o aumento da temperatura do meio ($p > 0,05$). A capacidade máxima de adsorção foi de 212,04 mg de ACNs/g de Mnt (Tabela 11). Esse resultado é superior quando comparado aos valores obtidos por Coelho Leandro et al. (2021) para adsorção de ACNs do extrato de jambolão em Lap ($Q_m = 15,98$ mg/g) e por Capello et al. (2019) para adsorção de ACNs do extrato de casca de berinjela em Lap ($Q_m = 14,65$ mg/g). Portanto, a Mnt pode ser considerada um material promissor para a recuperação de ACNs. As discrepâncias entre os resultados obtidos podem estar associadas à diferença estrutural entre a Lap e a Mnt e a maior taxa de agitação (700 rpm) utilizada na pesquisa atual em comparação aos estudos que utilizaram 250 rpm.

Tabela 11 - Parâmetros dos modelos de isoterma de adsorção para antocianinas adsorvidas em montmorilonita a 10 e 20 °C.

| pH | T (°C) | Freundlich | | | Langmuir | | |
|-----|--------|--|-------------|----------------|-----------------------------|--------------|----------------|
| | | K_F (L ^{1/n} .mg ^(1-1/n) /g) | N | R ² | Q_m (mg/g) | K_L (L/mg) | R ² |
| 1,5 | 10 | 21,10 ± 2,09 | 2,04 ± 0,15 | 0,9319 | 212,04 ± 18,72 ^A | 0,04 ± 0,01 | 0,9766 |
| | 20 | 20,60 ± 0,78 | 2,04 ± 0,06 | 0,9535 | 205,80 ± 7,31 ^A | 0,04 ± 0,01 | 0,9904 |

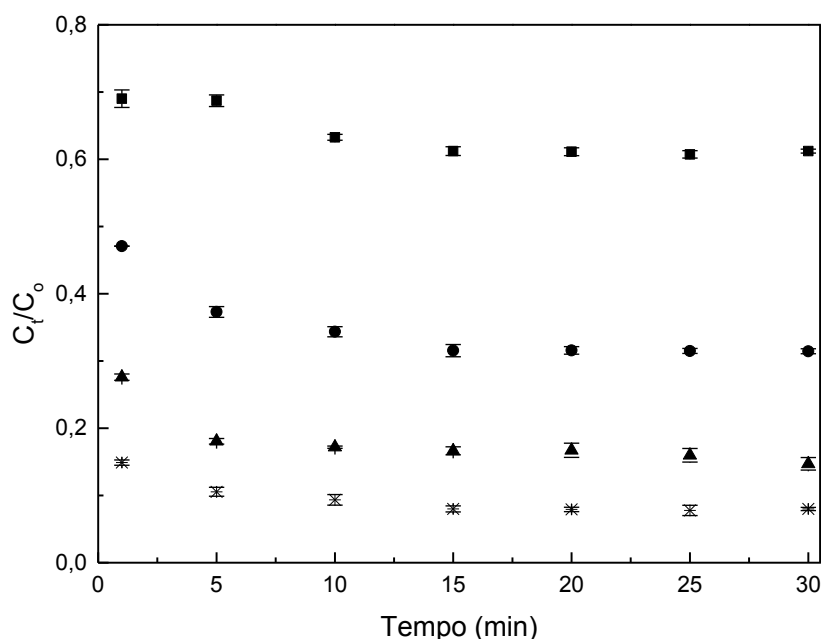
Nota: Média ± desvio padrão (n = 3). K_F = constante de Freundlich; n = intensidade da adsorção; Q_m = capacidade teórica máxima de adsorção; K_L = constante de Langmuir. As médias na mesma coluna seguidas da mesma letra maiúscula não são significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Fonte: Autora (2022).

4.2.2.2 Cinética de adsorção

Os perfis cinéticos de adsorção (Figura 19) mostram que a maior adsorção de ACNs em Mnt ocorreu nos primeiros 5 min, aproximando-se do equilíbrio em aproximadamente 15 min, independentemente da concentração de Mnt utilizada. Valores de adsorção de ACNs entre 43% e 93% foram obtidos usando 0,003 e 0,027 g de Mnt/mg de ACNs, respectivamente, sugerindo que a capacidade de adsorção da Mnt foi influenciada positivamente pela concentração. Anteriormente, Coelho Leandro et al. (2021) utilizaram 0,595 g de Lap/mg de ACNs para obter a mesma recuperação, evidenciando que a Mnt é um material promissor para recuperação de ACNs.

Figura 19 - Cinética de adsorção (concentração de antocianinas (ACNs) estimadas no tempo t [C_t/C_0] vs. Tempo (min)), em diferentes concentrações de montmorilonita (Mnt) (0,003 [■], 0,007 [●], 0,013 [▲], e 0,027 [✱] g de Mnt/mg de ACNs), a 20 °C e pH = 1,5.



Fonte: Autora (2022).

Os valores dos modelos cinéticos de pseudo-primeira ordem e pseudo-segunda ordem para a adsorção de ACNs na Mnt são apresentados na Tabela 12. Ao comparar os coeficientes de determinação (R^2) para os modelos cinéticos, observou-se que os valores de R^2 foram muito próximos. No entanto, para o modelo cinético de pseudo-segunda ordem, as capacidades teóricas de adsorção (Q_e) não apresentaram diferença significativa em relação aos valores

experimentais (Q_{exp}) ($p > 0,05$). Assim, este foi escolhido como o melhor modelo para explicar a adsorção de ACNs na Mnt. O modelo cinético de pseudo-segunda ordem assume que o mecanismo primário que controla a adsorção é a reação química entre os íons ACNs e os grupos funcionais presentes na superfície da argila. Este modelo cinético também foi o mais adequado para explicar a adsorção do cobre da cachaça, e a adsorção da cafeína de extratos de chá, usando Mnt como adsorvente (SHIONO et al., 2017a; ZACARONI et al., 2015), e para explicar a adsorção de antocianinas do jambolão na Amberlite XAD7HP (JAMPANI; NAIK; RAGHAVARAO, 2014).

Tabela 12 - Parâmetros cinéticos para adsorção de antocianinas (ACNs) em montmorilonita (Mnt) a 20 °C e pH=1,5.

| pH | Mnt/ACNs (g/mg) | Modelo pseudo-primeira ordem | | | | Modelo pseudo-segunda ordem | | |
|-----|--------------------|------------------------------|----------------------------|-------------------------|--------|-----------------------------|---------------------|--------|
| | | Q_{exp} (mg/g) | Q_e (mg/g) | K_1 (min^{-1}) | R^2 | Q_e (mg/g) | K_2 (g/mg min) | R^2 |
| 1,5 | 0,003 | 162,37 ± 1,51 ^A | 156,96 ± 0,38 ^B | 1,99 ± 0,17 | 0,9803 | 160,44 ± 0,35 ^A | 0,03 ± 0,01 | 0,9820 |
| | 0,007 | 103,53 ± 0,77 ^A | 101,37 ± 0,50 ^B | 1,55 ± 0,01 | 0,9923 | 104,08 ± 0,52 ^A | 0,03 ± 0,00 | 0,9977 |
| | 0,013 | 63,23 ± 0,87 ^A | 62,83 ± 0,18 ^A | 2,02 ± 0,05 | 0,9986 | 63,69 ± 0,25 ^A | 0,09 ± 0,00 | 0,9993 |
| | 0,027 | 35,37 ± 0,15 ^A | 35,13 ± 0,08 ^A | 2,76 ± 0,03 | 0,9992 | 35,35 ± 0,08 ^A | 0,37 ± 0,00 | 0,9994 |

Nota: Média ± desvio padrão (n = 3). As médias na mesma linha seguidas da mesma letra maiúscula não são significativamente diferentes ($p > 0,05$). Q_{exp} é a quantidade de ACNs adsorvidas na Mnt (mg/g), Q_e é o conteúdo total de ACNs adsorvidas na Mnt em equilíbrio (mg/g), k_1 (1/min) e k_2 (g/mg·min) são constantes dos modelos associados à taxa de adsorção.

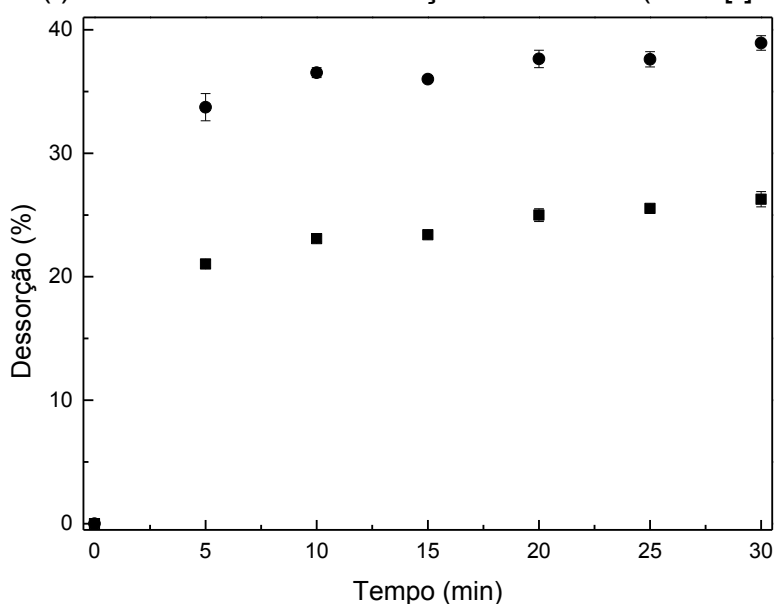
Fonte: Autora (2022).

4.2.3 Experimentos de dessorção

A taxa de dessorção das ACNs liberadas do BH fluidos que simulam alimentos, incluindo soluções de água e álcool nas concentrações de 10%, 50% e 95% v/v, e solução ácida (3% v/v água: ácido acético) foi avaliada. Não houve dessorção de ACNs na solução ácida e alcoólica (10% v/v); o BH decantado apresentou coloração rosa, e o sobrenadante era transparente, indicando ausência de ACNs. A dessorção das ACNs do BH foi possível em soluções alcoólicas de 50 e 95% v/v, com razão de dessorção (D) de $38,93 \pm 0,45$ e $26,28 \pm 0,61\%$, e a capacidade de dessorção (Q_d) foi de $2,05 \pm 0,02$, e $1,38 \pm 0,03$ mg/g, respectivamente (Figura 20).

Após os experimentos de dessorção o BH apresentou coloração rosa intensa, indicando que as antocianinas ainda estavam adsorvidas na superfície da Mnt. Os valores de D obtidos neste estudo sugerem que ocorreu baixa difusão do pigmento, devido à reação química entre as ACNs e a Mnt, descrita por modelos cinéticos de pseudo-segunda ordem. Um baixo valor de capacidade de dessorção ($47,88 \pm 5,41\%$) foi obtido por Coelho Leandro et al. (2021), para ACNs adsorvidas em Lap, os autores consideraram que as ACNs apresentaram alta estabilidade química com Lap.

Figura 20 - Taxa de dessorção (D, %) do biohíbrido (BH) vs. tempo de dessorção (t) em diferentes concentrações de etanol (95% [▪] e 50% [•]).



Fonte: Autora (2022).

4.2.4 Caracterização cristalina e química do biohíbrido

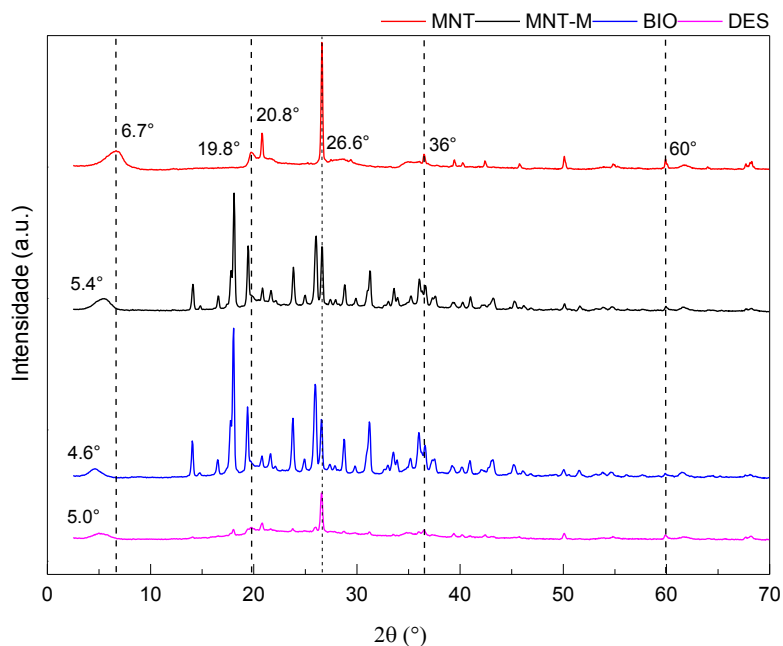
4.2.4.1 Difractogramas de raio X (DRX)

Os DRX para Mnt antes e depois da adsorção são apresentados na Figura 21. Para Mnt não tratada os difratogramas exibiram um padrão de difração característico de um material cristalino com vários picos de difração entre $2\theta=6,7^\circ$ e 60° (COELHO LEANDRO et al., 2021). Observou-se uma boa dispersão dos picos característicos da argila, a $2\theta=6,7^\circ$, $19,8^\circ$, $20,8^\circ$, $26,6^\circ$, 36° e 60° , o que é atribuído à estrutura T-O-T da montmorilonita e do SiO_2 (MENDONÇA et al., 2019).

Para a Mnt tratada com ácido os espectros de DRX (Figura 21) mostraram que o ácido cítrico adsorvido produziu um deslocamento do valor d , atribuído à intercalação das moléculas de ácido na camada intermediária da Mnt. Os valores de d (Å) aumentaram de 13,2 (Mnt não tratado) para 16,4 Å (Mnt modificado), indicando que as moléculas de ácido estão ocupando o espaço entre camadas da Mnt. Além disso, observou-se novos picos na região entre 14° e 50° (2θ), provavelmente devido ao ácido cítrico cristalino adsorvido na superfície do Mnt (MENDONÇA et al., 2019).

As reflexões a $2\theta=5,4^\circ$ ($d = 16,4\text{Å}$) e $2\theta=4,6^\circ$ ($d = 19,2\text{Å}$) observadas para Mnt tratado com ácido e para o BH, respectivamente, apresentaram aumento no espaçamento d ($d = 16,4 - 19,2\text{Å}$), sugerindo que a água e as ACNs foram adsorvidas entre as camadas da Mnt (CAPELLO et al., 2019; GUTIÉRREZ; PONCE; ALVAREZ, 2017; RIBEIRO et al., 2018a). Este resultado confirmou que as ACNs foram adsorvidas no espaço entre as camadas da Mnt. Em concordância, Gutiérrez et al. (2017) demonstraram que os cátions inorgânicos (Mnt) foram substituídos por cátions orgânicos por reação de troca (extrato de mirtilo).

Figura 21 - Difratoogramas de raio X (DRX) para Mnt não tratada (MNT); Mnt tratada com ácido cítrico (MNT-M); biohíbrido (BH) e biohíbrido após dessorção (DES).



Nota: Montmorilonita (MNT). Fonte: Autora (2022).

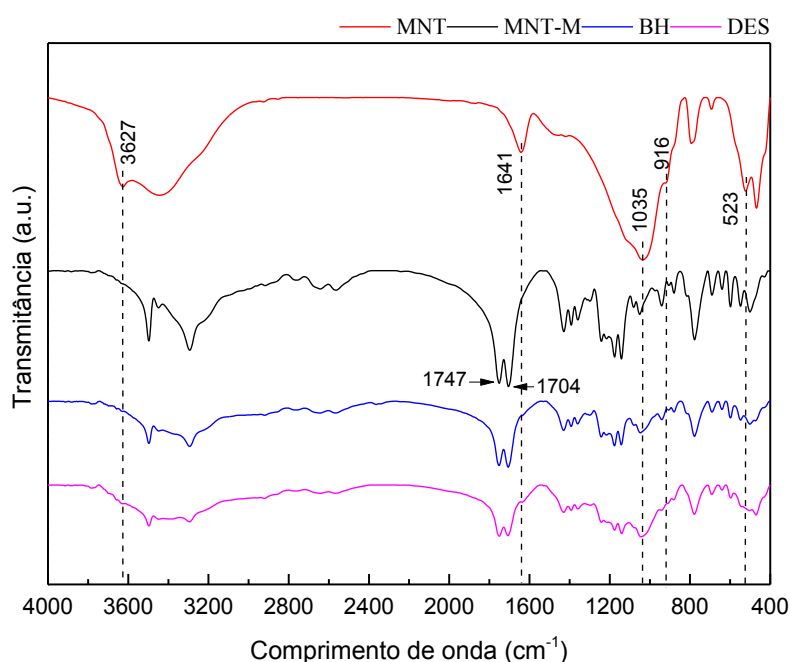
4.2.4.2 Espectros de FTIR

Os espectros de FTIR da Mnt não tratada, Mnt tratada com ácido, BH e BH após dessorção apresentaram diferenças para cada material (**Figura 22**). O espectro de Mnt mostrou bandas atribuídas à flexão Al-O-Si e Al-Al-OH (523 e 916 cm^{-1}), alongamento Si-O (1035 cm^{-1}), hidratação e grupos OH estruturais (1641 , e 3627 cm^{-1}) (KOOSHA; HAMED, 2019b; MENDONÇA et al., 2019; TYAGI; CHUDASAMA; JASRA, 2006).

Especificamente, na região entre 3627 e 3000 cm^{-1} , a intensidade da banda de absorção está associada aos grupos OH das moléculas de água presentes nas amostras de argila (GUTIÉRREZ; PONCE; ALVAREZ, 2017). Após a modificação da Mnt com ácido cítrico, as bandas relacionadas aos grupos estruturais OH (1641 e 3627 cm^{-1}) desapareceram, o que pode estar relacionado ao ataque de prótons e a desidroxilação. As bandas destacadas em 1747 e 1704 cm^{-1} atribuídas a C=O correspondem a ácidos carboxílicos indicando a presença de ácido cítrico. Outras bandas entre 1430 e 1035 cm^{-1} , observadas para esses materiais, também estão relacionadas à presença de ácido cítrico (MENDONÇA et al., 2019).

Os espectros de FTIR do BH após a dessorção mostram uma redução nas bandas características do ácido cítrico, o que era esperado (Figura 19b). Para o BH não foram observadas bandas de ACNs nos espectros de FTIR. Capello et al. (2019) também relataram que picos típicos de antocianinas não foram observados por espectroscopia FTIR em biohíbrido de ACNs/Lap devido à sobreposição com os picos de sílica amorfa.

Figura 22 - Espectros FTIR para Mnt não tratada (-), Mnt tratada com ácido cítrico (-) biohíbrido (-) e biohíbrido após dessorção (-).



Nota: Espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier (FTIR), Montmorilonita (MNT).
Fonte: Autora (2022).

4.2.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Raios-X de Dispersão de Energia (EDS)

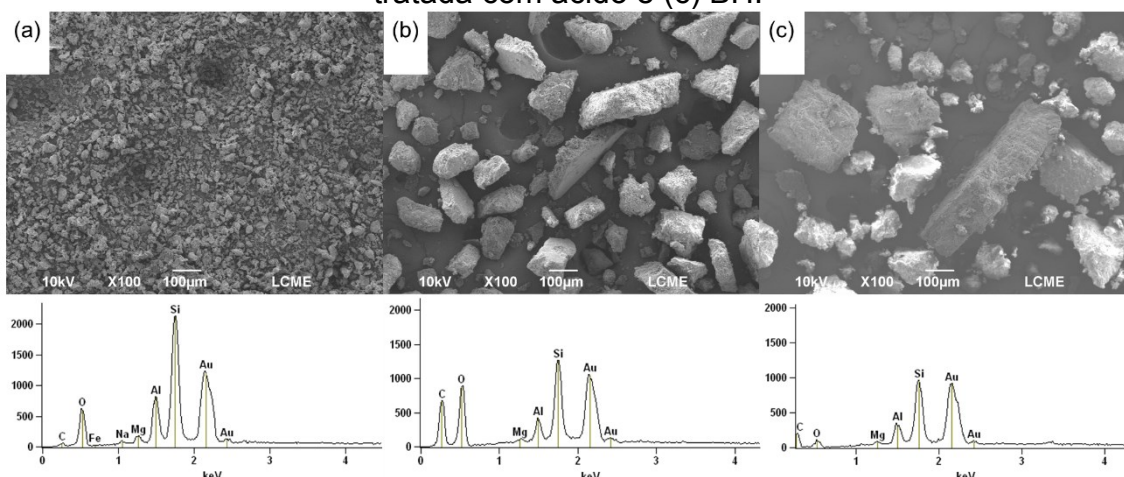
Imagens MEV da Mnt não tratada, Mnt tratada com ácido e BH são mostradas na Figura 23. Para Mnt não tratada, a imagem mostra aglomerados de tamanhos e formas distintas. A morfologia da superfície da Mnt tratada com ácido e BH mostrou um aumento de aglomerados que pode estar associado à ativação ácida e adsorção de ácido cítrico e ACNs na superfície. Os resultados de EDS confirmam a presença de silício (Si), alumínio (Al), oxigênio (O), magnésio (Mg), sódio (Na) e ferro (Fe) como os principais componentes da Mnt (Figura 23) (JAYRAJSINH et al., 2017; MENDONÇA et al., 2019). A presença

de carbono (C) é atribuída a fixação das amostras em fita de carbono sob os stubs de alumínio (CAPELLO et al., 2019).

Para a Mnt tratada com ácido, a presença de carbono (C) e oxigênio (O) confirma a ativação do ácido cítrico. O ácido cítrico é absorvido pela Mnt e não é perdido durante o processo de secagem, permanecendo no espaço entre camadas e/ou na superfície da argila (MENDONÇA et al., 2019).

Nas amostras de EDS para o BH pode-se observar a adsorção de antocianinas na Mnt, onde prótons atacaram as camadas de Mnt substituindo os cátions trocáveis e aumentando a área superficial. Este resultado está de acordo com o aumento dos valores de d (Å) indicando que as moléculas estão ocupando o espaço entre camadas da Mnt (CAPELLO et al., 2019; COELHO LEANDRO et al., 2021).

Figura 23 - Imagens MEV e EDS obtidas para (a) Mnt não tratada, (b) Mnt tratada com ácido e (c) BH.



Fonte: Autora (2022).

4.2.6 Conteúdo fenólico total (FT) e capacidade antioxidante do biohíbrido

A dessorção das ACNs e compostos fenólicos foi realizada em solução de etanol (50% v/v), a melhor condição de dessorção. Os compostos obtidos a partir da solução de dessorção foram analisados por FT e capacidade antioxidante (DPPH). O teor de FT dessorvido do BH foi de $0,12 \pm 0,01$ mg/mL que representa 38,71% da adsorção de FT (72%) do extrato de jambolão ($0,31 \pm 0,01$ mg/mL). Esses resultados são satisfatórios, pois o jambolão é rico em compostos fenólicos (antocianinas, ácido gálico, catequina e ácido p-cumárico)

(KOOP et al., 2021; TAVARES et al., 2016), e a Mnt tem a capacidade de adsorver compostos fenólicos. Balooch et al. (2018) relataram a adsorção de compostos fenólicos do extrato de romã em Mnt, com adsorção de 95,62% para ácido gálico 38% rutina e 5,40% ácido elágico.

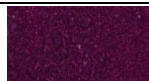

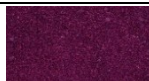
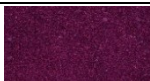






A capacidade antioxidante de inibição do radical DPPH para o extrato de jambolão e ACNs após dessorção do BH foi de 79% e 23,88%, respectivamente. Os resultados foram considerados satisfatórios uma vez que houve baixa liberação de compostos fenólicos do BH (ver Seção 4.2.3).

4.2.7 Estabilidade de cor

A estabilidade de cor do material BH somente foi possível pois a adsorção das ACNs na Mnt foi eficiente. Para o BH armazenado a 5 °C não houve diferença significativa de cor ($p > 0,05$); no entanto a 25 °C foram observadas mudanças de cor (Tabela 13). O valor da mudança global de cor após 60 dias de armazenamento foi de 2,37, não perceptível a olho nu (ANDRETTA et al., 2019).

A estabilidade de cor de um indicador colorimétrico é considerada um parâmetro essencial para fornecer um feedback visual adequado ao consumidor, uma vez que as ACNs podem ser continuamente degradados devido às condições ambientais, como meio alcalino exposição à luz e flutuações de temperatura resultando em desbotamento da cor (ALBUQUERQUE et al., 2020; YONG; LIU, 2020). Nesse contexto, o BH mostrou-se um material promissor.

Tabela 13 - Cor aparente e valores de cor dos pós biohíbridos (BH) a 5 e 25 °C após 60 dias de armazenamento.

| Temperatura (5 °C) | | | | | |
|---------------------|---|---|---|---|---|
| Tempo (dias) | 0 | 7 | 15 | 30 | 60 |
| Cor |  |  |  |  |  |
| L* | 16,08 ± 0,12 ^A | 15,93 ± 0,25 ^A | 15,76 ± 0,43 ^A | 15,41 ± 0,25 ^A | 15,48 ± 0,37 ^A |
| a* | 31,58 ± 0,25 ^A | 31,72 ± 0,37 ^A | 31,85 ± 0,22 ^A | 31,53 ± 0,27 ^A | 30,70 ± 0,86 ^A |
| b* | -11,19 ± 0,18 ^A | -11,45 ± 0,83 ^A | -11,52 ± 0,32 ^A | -11,64 ± 0,17 ^A | -11,63 ± 0,09 ^A |
| ΔE* | 0 | 0,76 ± 0,48 ^A | 0,72 ± 0,31 ^A | 0,87 ± 0,14 ^A | 1,27 ± 0,56 ^A |
| Temperatura (25 °C) | | | | | |
| Tempo (dias) | 0 | 7 | 15 | 30 | 60 |
| Cor |  |  |  |  |  |
| L* | 20,20 ± 0,30 ^A | 20,46 ± 0,36 ^A | 20,34 ± 0,07 ^A | 20,24 ± 0,56 ^A | 19,96 ± 0,91 ^A |
| a* | 33,60 ± 0,63 ^{A,B} | 33,70 ± 1,01 ^{A,B} | 34,43 ± 0,24 ^B | 32,16 ± 0,45 ^A | 31,99 ± 0,79 ^A |
| b* | -15,70 ± 0,15 ^A | -15,03 ± 0,21 ^{A,B} | -14,83 ± 0,51 ^{A,B} | -14,58 ± 0,40 ^B | -14,46 ± 0,59 ^B |
| ΔE* | 0 | 1,29 ± 0,32 | 1,39 ± 0,32 | 2,01 ± 0,78 | 2,37 ± 0,59 |

Nota: Média ± desvio padrão (n = 3). Média ± desvio padrão (n = 3). As médias na mesma linha seguidas da mesma letra maiúscula não são significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Fonte: Autora (2022).

4.2.8 Efeito do pH na cor do biohíbrido

As imagens das respostas do BH a diferentes pHs de 1 a 12 (Figura 24A) mostraram mudança de cor para ambos os meios, ácido e alcalino. Em pH de 1 a 5 não houve alteração de cor; o BH apresentou coloração rosa, indicando que as ACNs permaneceram em sua forma de cátion flavílium. Na faixa de pH de 6 a 9, o BH mudou para uma cor roxa e azul, devido a oxidação das ACNs para base quinoidal. Finalmente, em pH 12, a oxidação das ACNs exibiu uma cor amarela (forma de chalcona) (GIUSTI; WROLSTAD, 2001). Resultados semelhantes são relatados para biohíbridos de Mnt/extrato de mirtilo e Lap/extrato de jambolão (COELHO LEANDRO et al., 2021; GUTIÉRREZ; PONCE; ALVAREZ, 2017). Assim, o BH pode ser aplicado como material indicador colorimétrico para monitorar o frescor de pescados, como camarão, uma vez que o aumento do pH (> 7) está associado à formação de compostos nitrogenados voláteis (por exemplo, amônia e aminas) como resultado do crescimento microbiano (MERZ et al., 2020).

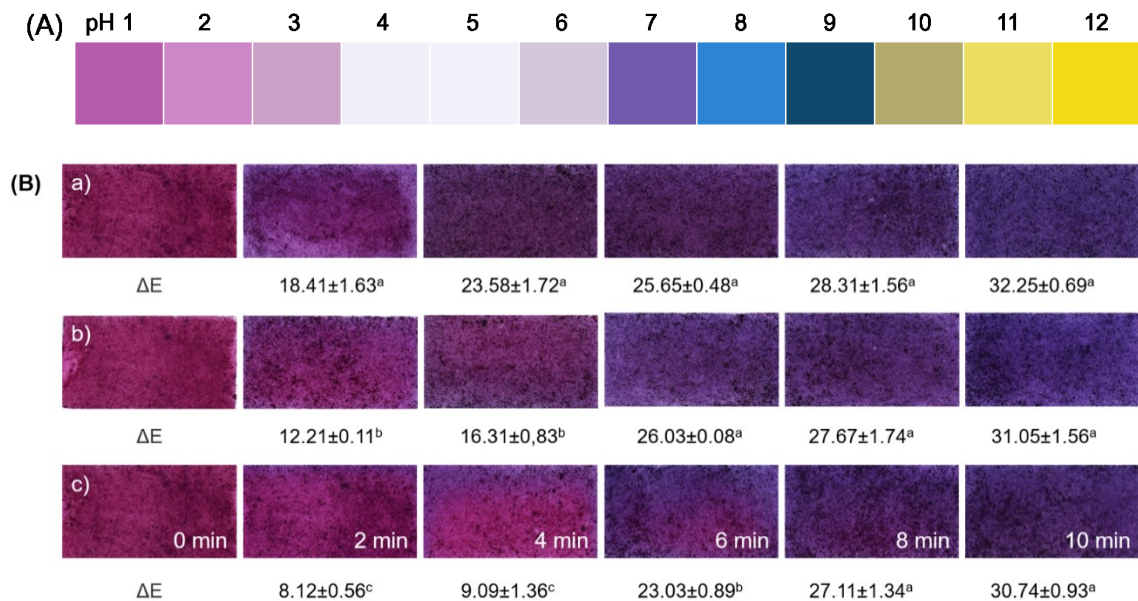
4.2.9 Sensibilidade do biohíbrido a amônia

O BH foi exposto a vapor de amônia (5, 10 e 15% v/v) para avaliar reações colorimétricas com compostos nitrogenados voláteis. O BH apresentou uma mudança significativa de cor (ΔE^*) de rosa para roxo após 6 min quando exposto ao vapor de amônia, independente da concentração utilizada (Figura 24B). A mudança de cor do BH foi mais significativa nas maiores concentrações de amônia e longo tempo de exposição, como esperado. Aos 10 min, os valores de ΔE^* foram: 32,25, 31,05, e 30,74 para as concentrações de 5, 10 e 15%, e não houve diferença significativa em relação ao tempo para todas as soluções testadas.

As mudanças de cor das ACNs expostas ao vapor de amônia ocorreram devido a transformações estruturais das moléculas causadas por íons hidroxila e a formação de ânions de oxigênio. Os íons amônio podem estimular a criação de uma condição alcalina na superfície do BH, resultante da hidratação e hidrólise do vapor de amônia (NH_3) no interior do BH. A mudança colorimétrica em tempo real do BH

devido os compostos voláteis é uma propriedade essencial para aplicações em embalagens inteligentes com detecção de cor (ALIZADEH-SANI et al., 2021). Como resultado, o BH pode ser usado como um indicador para detecção de amônia volátil.

Figura 24 - (A) Cor visível do pó biohíbrido (BH) (sobrenadante) imerso em soluções tampão com diferentes pHs (1 e 12); (B) Mudança de cor (ΔE^*) do BH exposto ao vapor de amônia: a) 15%, b) 10% e c) 5% nos tempos: 0, 2, 4, 8 e 10 min.



Nota: As médias na mesma coluna seguidas da mesma letra minúscula não são significativamente diferentes ($p > 0,05$). Fonte: Autora (2022).

4.2.10 Aplicação do biohíbrido como sensor em alimento

O BH em pó foi aplicado para monitorar o frescor de camarões durante o armazenamento a 5 e 25 °C, em recipientes fechados (placa de Petri) conforme apresentado na Figura 25A. A cor rosa inicial do BH foi usada como amostra de referência ($\Delta E^* = 0$). Após 24 h de armazenamento, observou-se mudança significativa de cor (levemente roxo) ($\Delta E^* = 13,27$), indicando as primeiras alterações na qualidade do produto *in natura* (Figura 25B). Após 48 h, a mudança de cor foi mais pronunciada, de roxo para azul ($\Delta E^* = 46,70$). Já nas 72 h, houve diminuição da intensidade da cor azul sem diferença significativa ($\Delta E^* = 47,68$), essa coloração é um indicativo que o pH do produto se tornou básico (pH > 7).

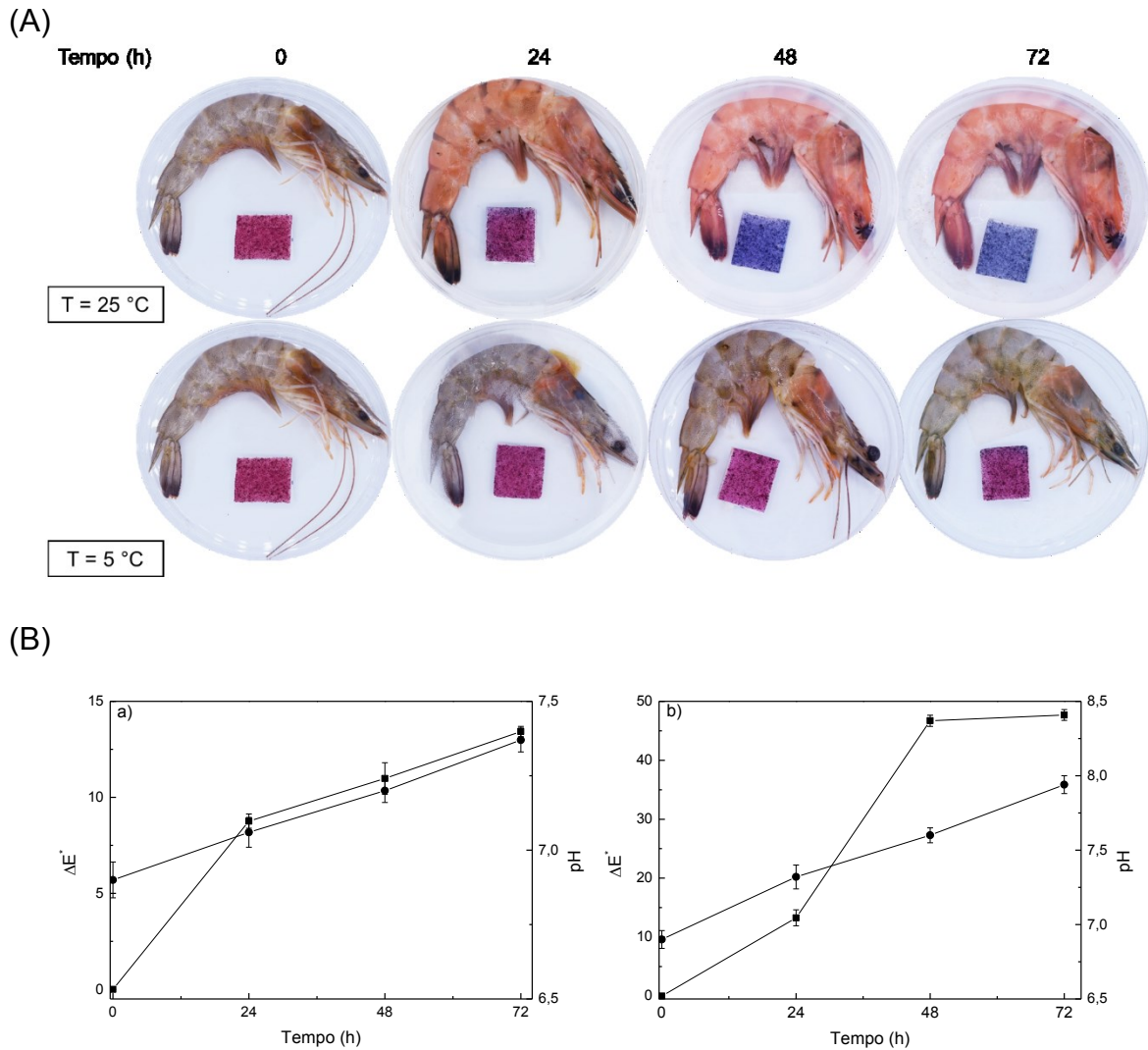
Para as amostras armazenadas a 5 °C, foram observadas variações de cor menos significativas. No início, o BH apresentava coloração rosa e, durante o armazenamento, observou-se aumento da intensidade da cor tornando-se levemente roxa após 72 h ($\Delta E^* = 13,43$). No entanto, segundo Andretta et al. (2019) as diferenças de cor podem ser detectadas pelo olho humano quando os valores de ΔE^* são superiores a 3,0.

Na temperatura de armazenamento de 5 °C, como esperado, o camarão sofreu menor degradação quando comparado ao armazenamento em condição ambiente (25 °C). O pH da carne do camarão foi de 6,90 e aumentou significativamente durante o armazenamento para todas as amostras, de 6,90 a 7,37 a 5 °C e de 6,90 a 7,94 a 25 °C. Esses resultados indicam que a carne de camarão se torna mais básica com o aumento do tempo de armazenamento.

Conforme mostrado na Figura 25B, os valores de pH da carne de camarão estão de acordo com o aumento dos valores de ΔE^* do BH durante o armazenamento, uma vez que a mudança de cor ocorre devido às mudanças de pH. Assim, para avaliar a correlação entre os valores de ΔE^* do indicador BH e o pH da carne de camarão, foi utilizado o método de regressão de Pearson, obtendo-se um coeficiente de correlação (R) de 0,94 para o armazenamento a 5 e 25 °C.

O aumento do pH é consequência da deterioração da carne. As proteínas da carne são muito suscetíveis a bactérias e bolores e, durante a deterioração, vários compostos nitrogenados voláteis, como amônia e aminas são produzidos (VEDOVE; MANIGLIA; TADINI, 2021; ZHANG et al., 2019). Quando a amônia volátil é produzida pelo camarão, primeiro ela é adsorvida na superfície do BH; em seguida, hidrolisam as antocianinas produzindo íons hidroxila, alterando o pH do ambiente (ZIA et al., 2021). Assim, o BH desenvolvido neste trabalho pode ser potencialmente utilizado como indicador de deterioração de alimentos perecíveis, principalmente para garantir a segurança do produto durante o armazenamento. Além disso, o uso de indicadores colorimétricos é um método prático e simples de monitoramento do frescor de camarão, podendo ser incorporado diretamente na embalagem.

Figura 25 - (A) Mudanças de cor do indicador biohíbrido (BH) no armazenamento de camarão, imediatamente após a embalagem e após três dias de armazenamento a 5 e 25 °C. (B) Valores de mudança de cor (ΔE^*) do indicador BH ([●]) e pH da carne de camarão ([■]) no armazenamento a 5 °C (a) e 25 °C (b).



Fonte: Autora (2022).

4.3 CONCLUSÃO

A montmorilonita (Mnt) foi eficiente na adsorção de antocianinas e na obtenção de um novo material biohíbrido (BH). O processo de adsorção foi independente da temperatura (10 e 20 °C); no entanto, apresentou alta capacidade de adsorção em pH mais baixo, e melhor capacidade de adsorção quando comparada a outras nanoargilas e adsorventes. Assim, a capacidade máxima de adsorção foi de

212,04 mg de ACNs/g de Mnt, onde 93% das ACNs do extrato de jambolão foram recuperados pela adição de Mnt a 20 °C e pH 1,5. Na pesquisa atual, a capacidade máxima de adsorção foi dez vezes maior quando comparada com BH à base de laponita. O material BH obtido apresentou coloração rosa estável por 60 dias de armazenamento a 5 e 25 °C, no escuro. A cor do BH mudou de acordo com a variação de pH e ao vapor de amônia. O BH apresentou mudança de cor visual de rosa para azul, correlacionada com a modificação do pH nos camarões armazenados a 25 °C. Além disso, o BH possui propriedades antioxidantes. Esses resultados sugerem que o BH pode ser utilizado em embalagem inteligente para monitorar a qualidade dos alimentos.

CAPÍTULO 5 - POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DO JAMBOLÃO FRENTE A MACRÓFAGOS RAW 264.7 ESTIMULADOS POR LPS

A inflamação pode ser definida como a resposta protetora e temporária do sistema imunológico inato a um agente agressor, podendo ser este um trauma ou agentes patogênicos, resultando na eliminação de estímulos prejudiciais, tais como microorganismos e células danificadas; e na reparação do tecido. A inflamação é caracterizada por uma série de eventos em nível celular, que são essenciais para a sobrevivência, apresentando alguns efeitos benéficos. Por outro lado, uma condição crônica pode ser gerada, onde ocorre uma ativação imune persistente com a presença dominante de macrófagos no tecido lesado (FACCHIN et al., 2022; FULLERTON; GILROY, 2016; JOSEPH; EDIRISINGHE; BURTON-FREEMAN, 2014).

No processo inflamatório a endotoxina lipopolissacarídeo (LPS) atua como iniciador de inflamação, é um constituinte das paredes celulares de bactérias Gram-negativas. Os macrófagos estimulados por LPS liberam vários mediadores inflamatórios, como citocinas (e.g., TNF- α , IL-6 e IL-1 β) e óxido nítrico (NOx), que fornecem diferentes funções e respostas aos sinais de estresse do sistema (ABDIN et al., 2020; BILUCA et al., 2020; FACCHIN et al., 2022).

Vários estudos destacaram a capacidade dos compostos fenólicos de bagas em atenuar a inflamação em macrófagos estimulados por LPS. Os compostos fenólicos são conhecidos por atuarem como moléculas antioxidantes e anti-inflamatórias, conferindo assim consideráveis efeitos protetores potenciais contra o desenvolvimento de doenças crônicas relacionadas à inflamação. Atuam eliminando e prevenindo a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio que são geradas durante o processo de inflamação (GASPARRINI et al., 2021; JOSEPH; EDIRISINGHE; BURTON-FREEMAN, 2014).

Além disso a busca por um estilo de vida mais saudável tem levado ao consumo de alimentos funcionais, visando a redução do uso de medicamentos. Sabe-se que os alimentos funcionais podem reduzir o risco de doenças como câncer, obesidade, condições inflamatórias e patologias cardiovasculares, além de possuir alto valor nutricional. Neste contexto os frutos de jambolão são reconhecidos por sua atividade anti-inflamatória, com potencial anticancerígeno, antidiabético e

antiobesidade (ABDIN et al., 2020; QAMAR et al., 2022). No entanto são escassas as investigações que elucidam o efeito anti-inflamatório *in vitro* do fruto de jabolão.

Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito anti-inflamatório *in vitro* dos compostos bioativos do fruto de jabolão (extrato e biohíbrido) em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS através de sua capacidade de inibir o óxido nítrico (NOx) e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α e IL-6).

5.1 METODOLOGIA *IN VITRO*

5.1.1 Cultura de macrófagos (RAW 264.7)

Para os experimentos *in vitro*, foi utilizada a linhagem celular de macrófagos RAW 264.7, cedidos pela Professora Dra^a. Cláudia Maria Oliveira Simões do Laboratório de Virologia Aplicada (LVA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). As células foram mantidas em estufa à 5% de CO₂ com umidade e temperatura controlada (37 °C). O meio de cultura utilizado foi preparado com Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) isento de fenol, com suplementação de Soro Fetal Bovino (10%) e antibiótico à 1% (Penicilina). Os experimentos foram conduzidos entre a 3^a e a 8^a passagem, com confluência celular de aproximadamente 80%. Todo o material utilizado foi devidamente esterilizado e utilizado em local apropriado e isento de microrganismos contaminantes. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Imunologia no Centro de Ciências da Saúde (CCS).

5.1.2 Determinação de viabilidade celular com azul de tripan

Os experimentos foram conduzidos após a verificação prévia da viabilidade celular. Desta forma, a quantificação das células viáveis foi realizada através da técnica de azul de Tripan, que se baseia na capacidade que o corante apresenta em atravessar o citoplasma de células mortas, corando-as de azul. Sendo assim, antes de cada experimento, as células foram descoladas das garrafas, centrifugadas e

ressuspendidas em 5 mL de meio de cultura. Uma alíquota desta suspensão foi separada em um eppendorf, onde foi acrescentado o corante azul de Tripán, em uma diluição 1:2. Após homogeneização, 10 µL foram transferidos para uma câmara de Neubauer. Todas as células não coradas (viáveis) foram contadas nos 4 quadrantes com o auxílio de um microscópio óptico comum (aumento de 400x). O número obtido foi utilizado para realização de plaqueamento em placas de 96 poços nas concentrações necessárias.

5.1.3 Viabilidade celular (citotoxicidade)

Os compostos em estudo passaram pela avaliação do potencial de citotoxicidade, onde a viabilidade celular dos macrófagos RAW 264.7 foi mensurada após o tratamento dos mesmos com com extrato de jambolão (EXT) e solução dessorvida do biohíbrido (BH) obtidos de acordo com as metodologias descritas no Capítulo 4.

Para isto, optou-se por realizar o teste fluorescente com Resarzurina, descrito por PRÄBST et al. (2017). A Resarzurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido) é um corante redox fracamente fluorescente, que quando reduzido a resorufina torna-se rosa com altíssima fluorescência em vermelho.

Para este experimento foram utilizadas placas de 96 poços, com uma concentração de 5×10^4 células/poço. Após o plaqueamento, a mesma foi incubada por 24 h (5% de CO₂ e temperatura de 37 °C) para a adesão e proliferação da linhagem celular. Após o período de incubação, os poços foram tratados com as concentrações estipuladas para EXT e BH (100, 30, 10, 3 e 1 µg de ACNs/mL) com posterior incubação de 24 h. O sobrenadante foi descartado e os poços foram lavados duas vezes com solução tampão de fosfato estéril (PBS). Em seguida, 100 µl da solução de Resarzurina (pH 7,4 e concentração final de 1,5 mg/mL) foi adicionada em cada poço. Decorridas duas horas de incubação (37 °C), a placa foi homogeneizada para a leitura da densidade óptica em 530/590 nm em espectrofluorômetro de microplaca Gemini XPS (Molecular Devices, CA, EUA) no Laboratório de Tecnologias

Integradas (IntelLab), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), campus Trindade, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

A partir deste teste, foi possível determinar as concentrações de CC_{10} e CC_{50} de cada composto, ou seja, a concentração capaz de matar 10% e 50% das células, e conseqüentemente manter uma viabilidade de 90% e 50%, respectivamente. As concentrações foram calculadas por regressão não linear utilizando o logaritmo da concentração em função da resposta normalizada (porcentagem da viabilidade celular), e os cálculos foram realizados com auxílio do programa GraphPad Prism® versão 6.0 (San Diego, CA, EUA).

5.1.4 Dosagem de metabólitos do óxido nítrico (NOx)

A produção de NOx, foi mensurada indiretamente, sendo quantificada pela formação de seus metabólitos em nitrito (NO_2^-), através da reação de Griess (GREEN et al., 1982). Os reagentes empregados na reação apresentam a capacidade de reduzir nitrito, produzindo um composto de tonalidade rósea que representa a soma de todos os metabólitos presentes na amostra, quantificada através de densidade óptica à 540 nm (DIRSCH; STUPPNER; VOLLMAR, 1998). Para o experimento, foram utilizadas placas de 96 poços com concentração celular de 5×10^4 células/poço e incubação por 24 h para confluência celular adequada. Posteriormente, os macrófagos foram pré-tratados com a CC_{10} para o EXT e BH e após 30 min, todos os grupos (exceto o branco) foram estimulados com LPS (1 μ g/mL), por mais 24 h. Os grupos foram divididos em: Branco (veículo), controle negativo (LPS 1 μ g/mL), controle positivo (Dexametasona 7 μ M) e tratamento com EXT e BH (1, 3 e 10 μ g/mL).

Após a incubação de 24 h em estufa (5% de CO_2 e temperatura de 37 °C), o sobrenadante foi coletado para a realização da dosagem dos metabólitos do NOx. Em uma placa de 96 poços, foram adicionados 50 μ l do sobrenadante e 50 μ l do reagente de Griess, seguido por incubação durante 40 min (em temperatura ambiente e ao abrigo de luz). A leitura da densidade óptica foi realizada em 540 nm com o auxílio do leitor de ELISA MB-580 (HEALES, Gouwei Road, SZX, CN).

Após os valores de inibição de NO_x foram calculados através de análise estatística descritiva, utilizando o logaritmo da concentração em função da resposta normalizada (porcentagem da inibição de NO_x). Os resultados foram expressos pela média ± erro padrão da média com auxílio do programa GraphPad Prism® versão 6.0 (San Diego, Califórnia, EUA). Estes resultados foram apresentados através da média ± erro padrão ($p < 0.05$) sobre a porcentagem de inibição do NO_x de cada amostra comparado ao controle negativo (LPS 1 µg/mL).

5.1.5 Quantificação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1β, TNF-α e IL-6)

Após o plaqueamento e adesão em placas de 24 poços (1x10⁵ cel/poço) por 24 h, os macrófagos RAW 264.7 foram tratados com a melhor concentração do EXT e BH (10 µg/mL). Após 30 min, as células foram induzidas com LPS (1 µg/mL) (exceto o grupo branco), seguido por outra incubação de 24 h. O sobrenadante foi coletado para a mensuração dos níveis das citocinas IL-6, TNF-α (Peprotech/Rocky Hill, Estados Unidos da América) e IL-1β (BD San Diego, Califórnia, Estados Unidos da América). Todas as citocinas foram mensuradas através de kits comerciais pelo método inumoenzimático (ELISA), seguindo as instruções do fabricante. Nestes protocolos foram utilizados anticorpos monoclonais específicos para cada citocina, sendo que suas concentrações foram estimadas através da interpolação da curva padrão de cada kit. As densidades ópticas foram determinadas em comprimento de onda de 450 nm e os resultados para cada citocina foram expressos em pg/mL.

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O presente estudo é o primeiro relato da avaliação da atividade anti-inflamatória de extrato e biohíbrido rico em compostos bioativos do fruto de jabolão. Inicialmente realizou-se uma triagem de citotoxicidade e experimentos anti-inflamatórios *in vitro* com macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS. Em seguida, avaliou-se a capacidade do EXT e BH em inibir a secreção de NO_x e citocinas pró-inflamatórias (IL-1β, TNF-α e IL-6) após estimulação com LPS em concentrações não citotóxicas.

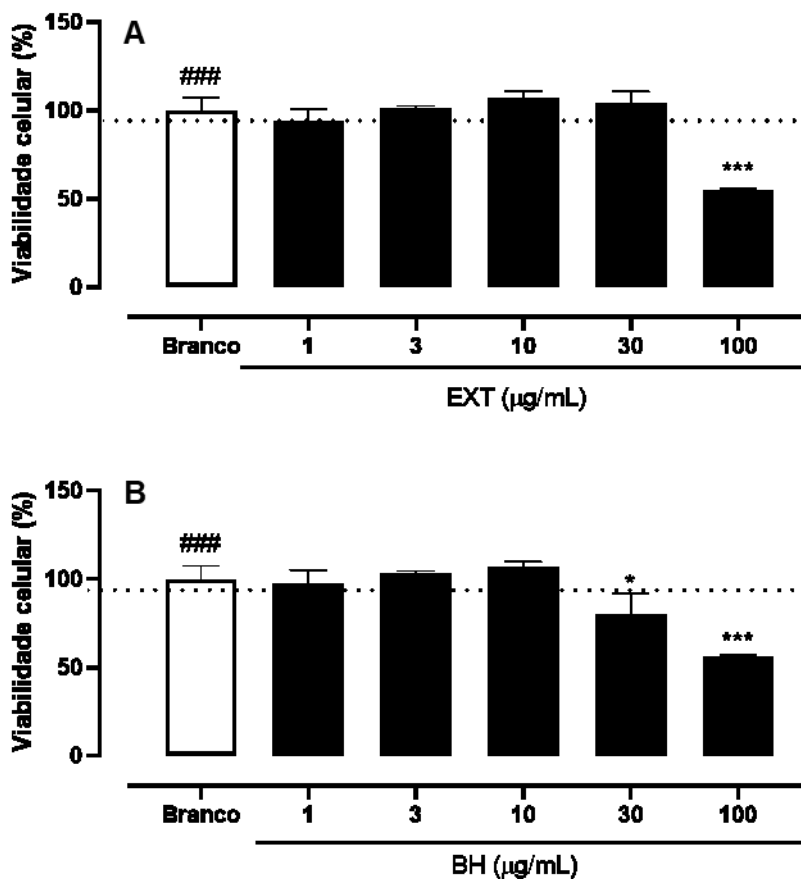
5.2.1 Viabilidade celular (citotoxicidade)

Os impactos citotóxicos do EXT e BH sobre a viabilidade celular foram investigados (Figura 26). O EXT apresentou citotoxicidade significativa em macrófagos RAW 264.7 apenas na maior concentração testada de 100 µg/mL (% de redução da viabilidade: 100 µg/mL: $55,0 \pm 0,4$). Já o BH apresentou citotoxicidade significativa a partir da dose de 30 µg/mL (Figura 1B) (% de redução de viabilidade: 30 µg/mL: $80,0 \pm 6,7$; 100 µg/mL: $56,6 \pm 0,4$).

A partir da curva de viabilidade celular determinou-se a CC_{10} e CC_{50} para o EXT e o BH. Sabe-se que a CC_{10} representa a concentração mínima de cada composto necessária para matar 10% da população de células, garantindo uma viabilidade de 90%. Da mesma forma a CC_{50} , representa a capacidade de manter uma viabilidade de 50% das células. Em modelos de inflamação, onde o objetivo é manter uma viabilidade alta de células durante os experimentos, buscam-se compostos que apresentem baixa citotoxicidade. Desta forma, trabalhar com as doses correspondentes a CC_{10} de cada composto ajuda a minimizar os riscos relacionados à perda e morte celular (CHAN et al., 2017). Neste contexto, observou-se que o EXT apresentou menor citotoxicidade (22 µg/mL) em relação ao BH (15 µg/mL) (Tabela 14).

Uma vez definida a CC_{10} dos macrófagos RAW 264.7 tratados com EXT e BH a atividade anti-inflamatória desses materiais foi avaliada. O efeito anti-inflamatório do EXT e BH foi avaliado através da medição da produção de mediadores inflamatórios e citocinas pelos macrófagos estimulados por LPS.

Figura 26 - Avaliação da viabilidade celular do extrato (EXT) e biohíbrido (BH) sobre macrófagos RAW 264.7.



Nota: Viabilidade celular determinada pela técnica de fluorescência com Resazurina. Onde, Branco: Células tratadas somente com solução de tampão de fosfato estéril (PBS, pH 7,6). A) EXT; B) BH (1-100 µg de ACNs/mL); cada barra representa a média de sobrevivência dos macrófagos em experimentos independentes \pm erro padrão da média (n=3) ($p > 0.05$), onde * $p < 0.05$ e *** $p < 0.001$. Fonte: Autora (2022).

Tabela 14 - Valores de citotoxicidade determinados para o EXT e BH.

| Compostos | CC ₁₀ (µg/mL) | CC ₅₀ (µg/mL) |
|-----------|--------------------------|--------------------------|
| EXT | 22 | 198 |
| BH | 15 | 143 |

Nota: EXT: extrato de jambolão; BH: biohíbrido. CC₁₀: concentração mínima de cada composto necessária para matar 10% das células; CC₅₀: concentração mínima de cada composto necessária para matar 50% das células. Fonte: Autora (2022).

5.2.2 Efeitos dos compostos bioativos do extrato e BH nos níveis de óxido nítrico (NO_x)

O óxido nítrico (NO_x) é um radical livre bioativo de vida curta que serve como molécula mensageira para vários processos fisiológicos e patológicos. Uma superprodução de NO_x permite identificar o grau/estágio da inflamação aguda e crônica (FACCHIN et al., 2022; JOSEPH; EDIRISINGHE; BURTON-FREEMAN, 2014).

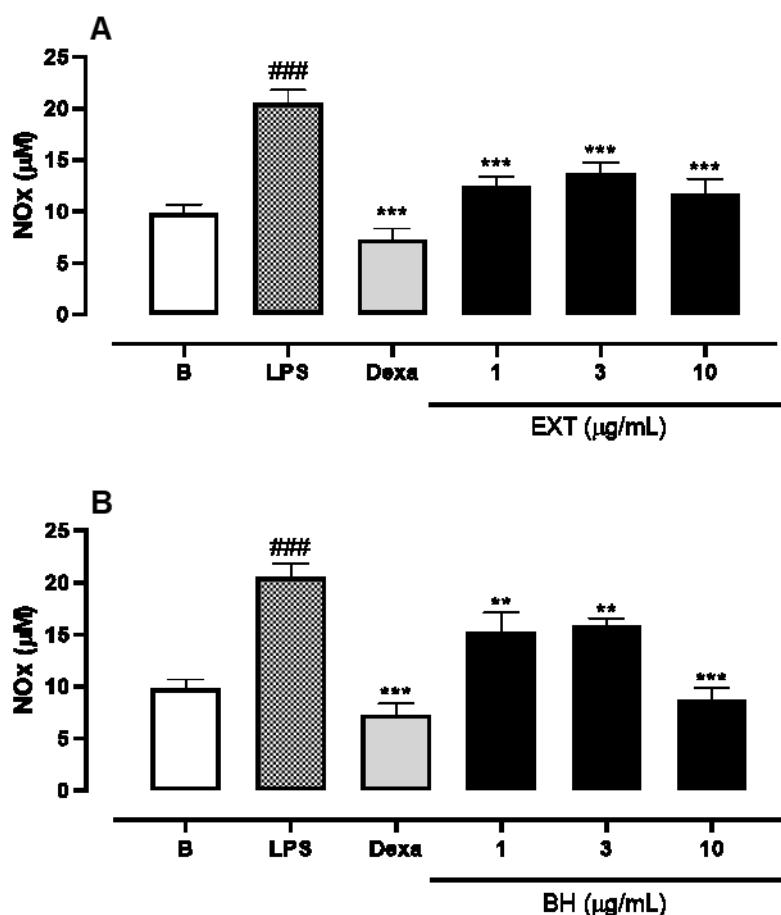
Baseando-se na CC₁₀ do EXT e BH, optou-se por realizar o doseamento de NO_x partindo da concentração de 10 µg/mL (menor CC₁₀ encontrada entre as 2 amostras testadas), sendo assim, a capacidade de cada amostra de reduzir a produção de NO_x foi testada nas concentrações de 1, 3 e 10 µg/mL.

O EXT e o BH apresentaram redução na produção de NO_x nas 3 doses testadas (1, 3 e 10 µg/mL) (Figura 27 A, B) ($p < 0.001$). Além disso, o BH apresentou maior potencial de inibição na dose de 10 µg/mL (% de inibição: $57,2 \pm 3,0$) quando comparado ao EXT na mesma concentração (% de inibição: $42,5 \pm 3,8$) (Tabela 15). Para o fármaco de referência Dexametasona, na dose de 7 µg/mL observou-se uma % inibição de $64,3 \pm 2,5$. O fármaco Dexametasona foi capaz de inibir a produção de NO_x, como esperado (Tabela 15).

Van de velde et al. (2019) relataram inibição inferior a 10% na produção de NO_x para extratos de morango e amora na concentração de 50 µg/mL. Abdin et al. (2020) avaliaram a atividade anti-inflamatória de diglicosídeos de ACNs isoladas da polpa de jambolão e relataram que a malvidina 3,5-diglicosídeo (40 µg/ml) reduziu a produção de NO_x para $43,65 \pm 4,93$ µmol/L em comparação com as células tratadas com LPS ($67,84 \pm 4,95$ µmol/L), ou seja 35,66%. Duarte et al. (2018) avaliaram o efeito anti-inflamatório da pelargonidina-3-O-glicosídeo (P3G) principal antocianina do

fruto de morango e relataram que a secreção de NOx pelos macrófagos tratados com LPS foi significativamente inibida pelo tratamento com P3G nas doses de 64 e 128 $\mu\text{g/L}$ (% inibição: $23,8 \pm 5,7$ e $40,3 \pm 7,1$ $\mu\text{mol/L}$, respectivamente). No presente estudo observou-se maiores reduções de NOx com o uso de EXT e BH rico em compostos bioativos do fruto de jabolão.

Figura 27 – Efeito dos extratos sobre os níveis de metabólitos de óxido nítrico (NOx) em macrófagos RAW 264.7.



Nota: Doseamento de NOx através dos reagentes de Griess. Onde, Branco (B) representa células tratadas apenas com os veículos (DMSO e PBS estéril); LPS (endotoxina lipopolissacarídeo) representa as células tratadas com DMSO (1%) e induzida por LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) e Dexa (dexametasona) representa o grupo pré-tratado com Dexametasona (7 $\mu\text{g/mL}$) e induzido após 30 minutos com LPS. A) Extrato (EXT) e B) Biohíbrido (BH); células tratadas nas concentrações de 1, 3 e 10 μg de ACNs/mL, sobre os níveis de metabólitos de NOx e induzidas após 30 minutos com LPS. Os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão $n = 3$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Fonte: Autora (2022).

Tabela 15 - Valores estatísticos da inibição do NOx.

| Tratamento | Concentração | % de inibição |
|------------|--------------|---------------|
| LPS | 1 µg/mL | 20,5 ± 0,7 |
| Dexa | 7 µg/mL | 64,3 ± 2,5 |
| EXT | 1 µg/mL | 39,0 ± 2,5 |
| | 3 µg/mL | 32,9 ± 2,7 |
| | 10 µg/mL | 42,5 ± 3,8 |
| BH | 1 µg/mL | 25,5 ± 5,2 |
| | 3 µg/mL | 22,3 ± 1,7 |
| | 10 µg/mL | 57,2 ± 3,0 |

Nota: Valores expressos em % para a inibição do NOx, partindo da técnica de mensuração dos metabólitos do óxido nítrico pelos reagentes de Griess. LPS: Endotoxina lipopolissacarídeo; Dexa: Dexametasona; EXT: extrato; BH: biohíbrido. Fonte: Autora (2022).

5.2.3 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS (IL-1 β , TNF- α e IL-6)

As citocinas são responsáveis pela regulação e manutenção do processo inflamatório. Portanto as quantidades de IL-6, IL-1 β e TNF- α são aumentadas através da inflamação e desempenham papéis fundamentais na resposta à inflamação nas células. Assim, obstruir as influências de mediadores pró-inflamatórios pode ser uma escolha terapêutica atraente (FACCHIN et al., 2022; GASPARRINI et al., 2021). Neste contexto, para assegurar uma possível atividade anti-inflamatória, o EXT e BH devem apresentar capacidade de reduzir a produção destas citocinas.

Nesta etapa EXT e BH foram testados frente a sua capacidade de diminuir a produção das principais citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF- α e IL-1 β , na concentração de 10 µg/mL, dose definida anteriormente como a melhor concentração para a inibição de NOx.

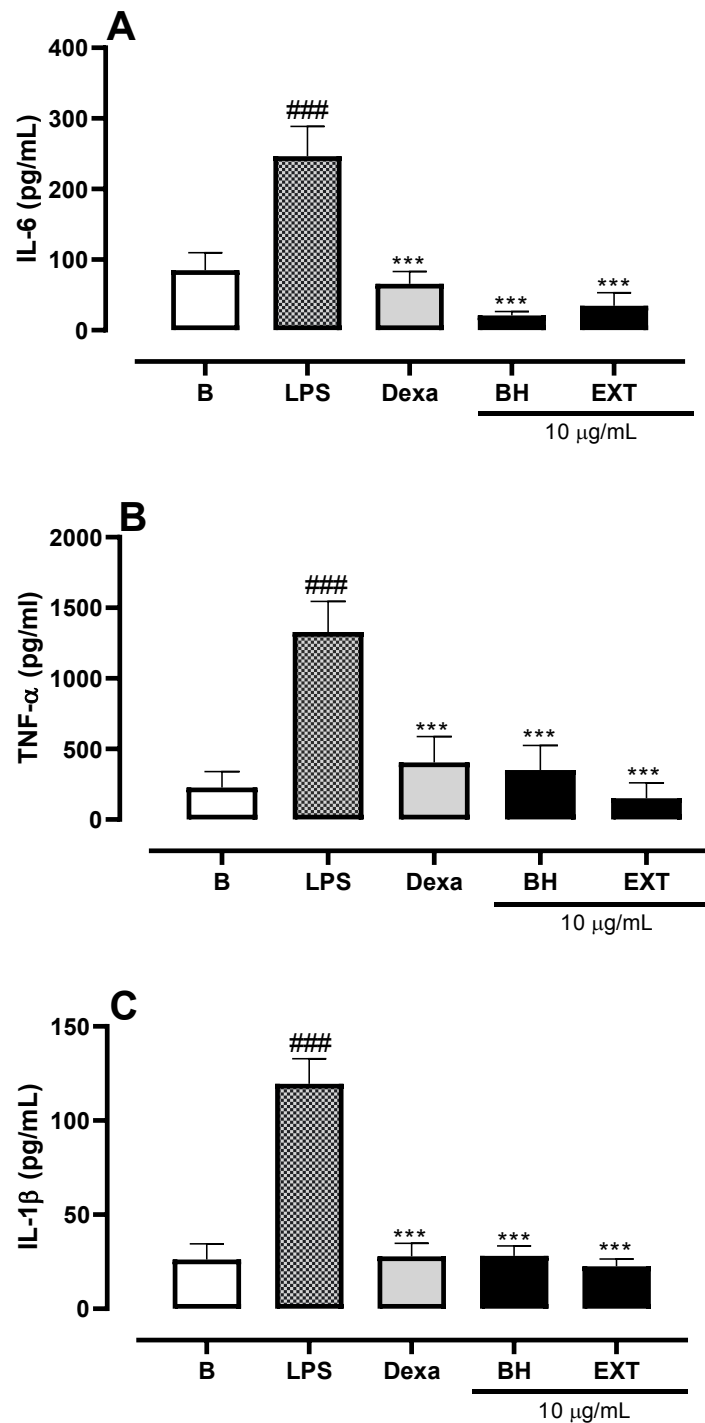
A partir deste experimento, podemos observar que o BH e o EXT apresentaram a capacidade de inibir significativamente a produção das 3 citocinas analisadas (Figura 28) ($p < 0,001$). A inibição de IL-6, TNF- α e IL-1 β pelos compostos testados foi similar aos resultados obtidos pelo fármaco de referência Dexametasona (Figura 28) ($p < 0,001$).

Entre as citocinas pró-inflamatórias secretadas pelos macrófagos, o TNF- α desempenha um papel multifuncional na resposta inata, que regula positivamente a produção de outras citocinas pró-inflamatórias importantes, como a IL-1 β (BILUCA et al., 2020; JOSEPH; EDIRISINGHE; BURTON-FREEMAN, 2014). O BH e o EXT suprimiram a secreção de TNF- α , atingindo uma inibição de 72,8 e 88,3%, respectivamente.

A IL-6 também é uma citocina multifuncional pró-inflamatória que estimula a produção de proteínas de fase aguda em reações inflamatórias. Essas proteínas refletem a presença e a intensidade da inflamação e podem ser usadas como guia para diagnóstico e manejo da inflamação (GASPARRINI et al., 2021). A aplicação de EXT e BH mostrou inibição da IL-6, como pode ser observado na Tabela 16 que apresenta as porcentagens de inibição de cada dose comparadas ao controle negativo (LPS 1 μ g/mL) expressas nos gráficos.

Abdin et al. (2020) relataram redução na produção de IL-6, IL-1 β e TNF- α em 70,54%, 66,26% e 72,67%, respectivamente, em comparação ao LPS, com o uso de malvidina 3,5-diglicosídeo (80 μ g/ml), isolada da polpa de jambolão. Valores superiores foram obtidos no presente estudo demonstrando o potencial da utilização do extrato de jambolão e do BH, que são constituídos majoritariamente por compostos fenólicos como: ácido gálico e catequina, além de antocianinas como: petunidina, malvidina e definidina.

Figura 28 - Mensuração das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α e IL-6 em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS.



Nota: Mensuração das citocinas A) IL-6, B) TNF- α e C) IL-1 β através de kits comerciais de ELISA. Onde, Branco (B) representa células tratadas apenas com os veículos (DMSO e PBS estéril), LPS (endotoxina lipopolissacarídeo) representa células tratadas com DMSO (1%) e induzidas com LPS (1 μ g/mL) e Dexa (dexametasona) representa o grupo pré-tratado com Dexamentasona (7 μ g/mL) e induzido após 30 minutos com LPS. O tratamento foi realizado com a melhor concentração de extrato

(EXT) e biohíbrido (BH) e induzidas após 30 minutos com LPS. Os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão $n = 3$; ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$. Fonte: Autora (2022).

Tabela 16 - Valores de % de inibição da mensuração das citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF- α e IL-1 β em macrófagos RAW 264.7.

| Tratamento | Concentração | IL-6 (% de inibição) | TNF- α (% de inibição) | IL-1 β (% de inibição) |
|------------|---------------|----------------------|-------------------------------|------------------------------|
| LPS | 1 μ g/mL | 11,6 \pm 6,0 | 12,7 \pm 4,3 | 6,4 \pm 3,8 |
| Dexa | 7 μ g/mL | 72,7 \pm 4,1 | 68,6 \pm 6,3 | 76,6 \pm 2,9 |
| BH | 10 μ g/mL | 91,4 \pm 1,4 | 72,8 \pm 6,8 | 76,4 \pm 2,2 |
| EXT | 10 μ g/mL | 85,7 \pm 4,4 | 88,3 \pm 4,3 | 81,1 \pm 1,6 |

Nota: Valores estatísticos da inibição das citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF- α e IL-1 β através de kits comerciais de ELISA. Onde, os valores foram calculados através de análise de estatística descritiva, utilizando o logaritmo da concentração em função da resposta normalizada (porcentagem da inibição de cada citocina). Resultados expressos como média \pm erro padrão (% de inibição) e calculados com auxílio do programa GraphPad Prism® versão 6.0 (San Diego, CA, EUA).

5.3 CONCLUSÃO

Pela primeira vez, o efeito anti-inflamatório dos compostos bioativos do fruto de jambolão (extrato e adsorvidos em argila) sob macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS foi investigado. Os resultados mostraram redução significativa para NOx e citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF- α e IL-1 β . Os efeitos anti-inflamatórios observados estão associados à composição fenólica do extrato de jambolão. No entanto, mais estudos devem ser realizados para identificar os compostos que influenciam nessa bioatividade. Além disso esses resultados demonstraram que o consumo humano de frutos de jambolão pode ser um importante suplemento alimentar no tratamento de condições inflamatórias.

CAPÍTULO 6 - APLICAÇÃO DO EXTRATO DE JAMBOLÃO E BIOHÍBRIDO EM BALAS DE GELATINA

Nos dias atuais os consumidores buscam por alimentos naturais e atrativos que conferem benefícios a saúde. Em alimentos prontos para o consumo a cor é um dos aspectos sensoriais mais importante, além de ser um critério de decisão de compra. Durante o processamento e armazenamento dos alimentos, observam-se perdas da cor natural do produto, como solução são adicionados aditivos para conferir uma aparência mais atrativa. Os aditivos sintéticos são os principais corantes utilizados pelas indústrias alimentícias. No entanto, estão sendo progressivamente substituídos por fontes naturais, devido principalmente à exigência dos consumidores e alguns efeitos adversos à saúde, como reações alérgicas e toxicidade (ALBUQUERQUE et al., 2020; MANZOOR et al., 2021).

Balas de gelatina estão sendo utilizadas como matriz para adição de fármacos e compostos bioativos, afim de promover liberação controlada e benefícios a saúde humana, são consumidas tanto por crianças quanto por adultos devido às cores atrativas, formas e sabores característicos (GUNES et al., 2022). Neste contexto a aplicação de antocianinas para substituição de corantes sintéticos em balas de gelatina mostra-se como uma alternativa promissora. Portanto o objetivo do presente capítulo foi desenvolver balas de gelatina com adição de corantes naturais: biohíbrido (ACNs adsorvidas em Mnt) e extrato de jambolão. As propriedades físico-químicas, funcionais e estabilidade sob luz durante o armazenamento foram avaliadas, além disso avaliou-se a estabilidade dos compostos ao longo da simulação gastrointestinal *in vitro* das balas de gelatina.

6.1. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1.1 Materiais

Frutos de jambolão foram colhidos manualmente de árvores locais em Florianópolis, SC, Brasil, em março de 2021. Os frutos foram colhidos no estágio

maduro, após realizou-se o despulpamento manual e a polpa foi armazenada a -18 ± 2 °C. Montmorilonita bruta (CP31- Bentonisa, Brasil), ácido cítrico (Vetec, Brasil) e extrato de jambolão foram utilizados para a produção do biohíbrido. Para a produção das balas de gelatina utilizou-se: gelatina bovina (bloom 250, Gelnex, Brasil), mel silvestre (Mel buss, Brasil), extrato de jambolão, biohíbrido e água destilada. Folin-Ciocalteu e ácido gálico foram utilizados para análises de compostos fenólicos totais, Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) para eliminação de radicais livres por DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (Sigma-Aldrich), tampão cloreto de potássio (pH = 1,0) e tampão acetato de sódio (pH = 4,5) para quantificação de antocianinas monoméricas totais. Para as condições gastrointestinais simuladas *in vitro*, as enzimas α -amilase (Sigma-Aldrich A1031), pepsina da mucosa gástrica suína (Sigma-Aldrich P7012), pancreatina do pâncreas suíno (Sigma-Aldrich P7545) e sais biliares bovinos (Sigma-Aldrich B3883) foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

6.1.2 Obtenção de extrato de jambolão e caracterização das ACNs

O extrato de jambolão foi obtido de acordo com o método descrito por Koop et al. (2021). A quantificação de antocianinas monoméricas totais foi realizada pelo método diferencial de pH (GIUSTI; WROLSTAD, 2001), de acordo com o método descrito em 3.1.5.3.

6.1.3 Fenólicos totais e atividade antioxidante

Os compostos fenólicos totais (FT) foram determinados pelo método de Folin-Ciocalteu de acordo com Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós (1999) com pequenas modificações e os resultados de FT foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico por litro de amostra (mg EAG/L).

A capacidade antioxidante das amostras foi determinada pela eliminação do radical DPPH• de acordo com o método descrito por Brand-Williams et al. (1995). A absorbância foi medida a 515 nm em um espectrofotômetro (Quimis, Q898U2M5, Brasil), e os resultados foram expressos em micromol de equivalente de Trolox por litro de amostra ($\mu\text{mol ET/L}$).

6.1.4 Obtenção do biohíbrido (BH)

Para obter o biohíbrido, primeiramente, o pH do extrato de jambolão foi ajustado para 1,5, no qual 0,027 g de Mnt/mg de ACNs foram adicionadas ao extrato e agitado (700 rpm) a 20 °C por 30 min. Após a adsorção, o material decantado foi separado do sobrenadante e seco (forno a vácuo) a 35 °C por 4 h. O pó de BH foi condicionado em dessecadores contendo sílica gel a 25 °C (\approx 0% R.H.) por 7 dias no escuro (CAPELLO et al., 2019; COELHO LEANDRO et al., 2021).

6.1.5 Estabilidade térmica, cinética de degradação e parâmetros de das ACNs do extrato de jambolão e do BH

A estabilidade térmica das ACNs do extrato de jambolão e BH foi analisada de acordo com o método descrito por Wang et al. (2021) com modificações. As amostras foram adicionadas em frascos de vidro com tampa de rosca e após introduzidas em uma estufa de convecção pré-aquecida sob temperatura controlada de 60 e 90 °C. Três tubos de cada amostra foram coletados nos tempos 0, 15, 30, 60, 120 e 180 min e rapidamente resfriados em freezer vertical. O teor de ACNs para cada amostra foi determinado de acordo com o método descrito em 3.1.5.3.

Para avaliar a estabilidade térmica das ACNs os dados obtidos foram ajustados a um modelo de cinética de degradação de primeira ordem (TEIXEIRA et al., 2021; WANG et al., 2021). A constante da taxa de degradação das antocianinas (k) para cada temperatura foi definida por uma regressão dos dados experimentais em função da concentração inicial com o aumento do tempo, conforme descrito pela Equação 18:

$$C_t = C_{t_0} * e^{-kt} \quad (18)$$

Onde, C_t é a concentração de ACNs em um determinado tempo em mg/L ; C_{t_0} é a concentração inicial de ACNs em mg/L; t é o tempo em s e k é a constante cinética de degradação em min^{-1} .

A partir dos dados da constante cinética de degradação (k) foi encontrado o tempo de meia vida ($t_{1/2}$), de acordo com a Equação 19:

$$t_{1/2} = \frac{\ln(0,5)}{k} \quad (19)$$

Após os experimentos também foram capturas imagens do extrato e BH afim de avaliar a degradação de cor de acordo com o método descrito na secção 4.1.8. Com os valores de a^* e b^* foram calculados os parâmetros: Cromo (C^*) e ângulo de matiz (Hue°), de acordo com as Eq. 20 e Eq. 21:

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (20)$$

$$\text{Hue}^\circ = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (21)$$

Por fim para visualizar as mudanças de cor, amostras de cores foram criadas a partir dos valores L^* , a^* e b^* de cada imagem usando o software Adobe Photoshop CC (Adobe Systems, Inc., San Jose, CA, EUA) (ZHAO et al., 2020).

6.1.6 Elaboração das balas de gelatina com adição de ACNs

As balas de gelatina com adição de ACNs foram preparadas de acordo com um estudo anterior com modificações (MUTLU; TONTUL; ERBAŞ, 2018). A composição das balas está listada na Tabela 17, sendo utilizada uma razão mássica de 60:40 (mel: gelatina hidratada sem e com adição de ACNs).

Foram elaboradas três formulações: balas com adição de BH (BBH), preparadas misturando-se a gelatina granulada com BH em pó; balas com extrato de ACNs (BEXT) onde o extrato foi utilizado para hidratar a gelatina granulada, e balas

controle sem ACNs (BC). Para as balas com extrato e BH a concentração de ACNs inicial foi a mesma.

Na primeira etapa de elaboração adicionou-se gelatina granulada em água destilada (23 °C) por 30 min para sua hidratação. Após a gelatina hidratada foi depositada em banho-maria a 60 °C por 30 min, e então adicionou-se mel pré-aquecido a 60 °C sob a mistura de gelatina homogeneizando-se manualmente por 2 min. Por fim a mistura foi vertida em moldes cilíndricos (3 x 15 mm) resfriada a temperatura ambiente por 30 min e acondicionada por 24 h em geladeira a 7 °C. Após as balas foram desenhadas e cortadas em fatias (3 x 2 mm) que foram acondicionadas por três dias em dessecador contendo solução saturada de carbonato de potássio (43,2% de umidade relativa) a 20 °C.

Tabela 17 - Descrição das formulações das balas de gelatina sem e com adição de antocianinas (ACNs).

| Ingredientes (g/100 g) | Formulações | | |
|---------------------------|-------------|------|-----|
| | BC | BEXT | BBH |
| Mel | 60 | 60 | 60 |
| Gelatina | 8 | 8 | 8 |
| Água | 32 | - | 31 |
| Ácido cítrico | 0,5 | - | - |
| EXT | - | 32 | - |
| BH | - | - | 1 |

Nota: BC: bala controle; BEXT: bala com adição de extrato (EXT); BBH: bala com adição de biohíbrido (BH). Fonte: Autora (2022).

6.1.7 Caracterização físico-química e bioativa das balas

A atividade de água (a_w) das balas de gelatina foi medida com um higrômetro a 25 °C. As balas foram cortadas em laminas circulares de 2 mm de espessura colocadas em recipientes de amostra e realizada a leitura (Aqualab, Decagon Devices). O pH das balas foi medido diretamente com o uso de um pHmetro para sólidos (Testo 205-Brasil). O teor de umidade foi determinado de acordo com AOAC (2005).

O perfil de textura das balas (TPA) de gelatina foi realizada usando um dispositivo de análise de textura (TA-Xt plus; Stable Micro Systems, Surrey, UK). Para cada ensaio 10 amostras foram comprimidas duas vezes a uma taxa de compressão

de 50% com uma sonda plana circular de 35 mm e velocidade de 2 mm.s⁻¹ a temperatura ambiente (MUTLU; TONTUL; ERBAŞ, 2018; TIREKI; SUMNU; SAHIN, 2021) Os parâmetros de textura dureza, elasticidade, coesão, gomosidade, resiliência e mastigabilidade foram gerados a partir do gráfico força-tempo.

As propriedades funcionais das balas foram avaliadas por fenólicos totais, antocianinas monoméricas totais e atividade antioxidante por DPPH. 5 g de amostra foram adicionadas em um tubo falcon com 20 mL de água destilada, após adicionou-se o tubo em banho-maria (40 °C/5 min) para dissolução das balas. Os tubos foram centrifugados a 4677 g por 10 min (Kasvi, Brasil) e o sobrenadante coletado. A quantificação dos compostos e atividade antioxidante da solução obtida foi realizada de acordo com o descrito nos itens 6.1.2 e 6.1.3.

6.1.8 Efeito da luz na estabilidade de cor das balas de gelatina

Para estudar o efeito da luz na estabilidade de cor das balas de gelatina, amostras (BC, BEXT e BBH) foram colocadas dentro de uma câmara (60 x 40 cm) a 10 cm de uma lâmpada halógena (25 W, cor branca, Kian CFL Reta, China) durante 14 dias a 20 °C. Fotos foram registradas diariamente com uma câmera digital (Nikon D5500, Nikon Corporation, Japão). As imagens foram analisadas utilizando o software Image J (National Institute Health, Bethesda, MD, USA) equipado com o plugin Color Space Converter para converter cores do sistema RGB para escala CIELab. As medidas de cor foram baseadas nas coordenadas CIELab, luminosidade (L*), intensidade de cor verde-vermelho (a*) e intensidade de cor azul-amarelo (b*) (COELHO LEANDRO et al., 2021). A mudança global de cor (ΔE^*) das amostras sem luz (controle) e submetidas a luz durante o armazenamento (amostra) também foi calculada.

6.1.9 Digestibilidade gastrointestinal *in vitro* das balas de gelatina

Os ensaios de digestibilidade *in vitro* das balas com ACNs e bala controle foram realizados conforme protocolo de simulação da digestão gastrointestinal definida pela INFOGEST e descrito por Minekus et al. (2014) e Brodkorb et al. (2019)

com algumas modificações. A simulação foi realizada sequencialmente para as fases oral (fração de liberação da matriz na boca), gástrica (fração de liberação da matriz no estômago) e intestinal (fração de liberação da matriz pelo intestino delgado). Os fluidos de cada etapa apresentavam a seguinte composição:

- Fluido de simulação salivar (SSF): 15,1 mM KCl, 3,7 mM KH₂PO₄, 13,6 mM NaHCO₃, 0,15 mM MgCl₂(H₂O), 0,06 mM (NH₄)₂CO₃, 1,1 mM HCl e 1,5 mM CaCl₂(H₂O)₂;
- Fluido de simulação gástrica (SGF): 6,9 mM KCl, 0,9 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 47,2 mM NaCl, 0,12 mM MgCl₂(H₂O), 0,5 mM (NH₄)₂CO₃, 15,6 mM HCl e 0,15 mM CaCl₂(H₂O)₂;
- Fluido de simulação intestinal (SIF): 6,8 mM KCl, 0,8 mM KH₂PO₄, 85 mM NaHCO₃, 38,4 mM NaCl, 0,33 mM MgCl₂(H₂O), 8,4 mM HCl e 0,6 mM CaCl₂(H₂O)₂.

Inicialmente todas as soluções utilizadas no experimento foram aquecidas a 37 °C, e a simulação foi executada na mesma temperatura. As amostras (5 g) foram transferidas para um tubo falcon (50 mL) e a simulação da fase oral foi iniciada pela adição de SSF 1:1 (m/v) e solução de α -amilase salivar humana (75 U/mL). A mistura foi então ajustada para pH 7 e incubada a 37 °C em banho maria sob agitação de 100 rpm por 2 min. Em seguida, o bolo oral foi misturado com SGF 1:1 (v/v) e seu pH ajustado para 3 com HCl 1M e adicionado de solução de pepsina suína (2.000 U/mL). A mistura foi então incubada a 37 °C em banho maria sob agitação de 100 rpm por 2 h.

Para a fase do intestino delgado, o quimo gástrico foi misturada com SIF 1:1 (v/v), contendo pancreatina (100 U/mL baseada na atividade da tripsina) e sais biliares (10 mM). O pH foi ajustado para 7 usando NaOH 1M e as amostras foram novamente incubadas a 37 °C em banho maria sob agitação de 100 rpm por 2 h. Amostras foram coletadas para todas as fases de digestão (inicial, oral, gástrica e intestinal). Em seguida, todas as amostras foram centrifugadas a 4677 g por 15 min (Kasvi, Brasil) e armazenadas a -20 °C até análise posterior. Os experimentos de digestão *in vitro* foram realizados em duplicata. As frações foram analisadas em triplicata para antocianinas, fenólicos totais e atividade antioxidante por DPPH. A bioacessibilidade para ACNs e FT das amostras foi calculada de acordo com a Equação 22:

$$\text{Bioacessibilidade (\%)} = \frac{n_x}{n_i} \times 100 \quad (22)$$

Onde n_x é o conteúdo quantificado após cada etapa da digestão, e n_i é o conteúdo quantificado antes da digestão (inicial).

6.1.10 Análise estatística

A análise experimental foi realizada em triplicata e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. A análise de variância (ANOVA) e o teste de comparações múltiplas de Tukey foram realizados a um nível de significância de 5% utilizando o software Statistic 6.0 (StatSoft Inc., EUA).

6.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES

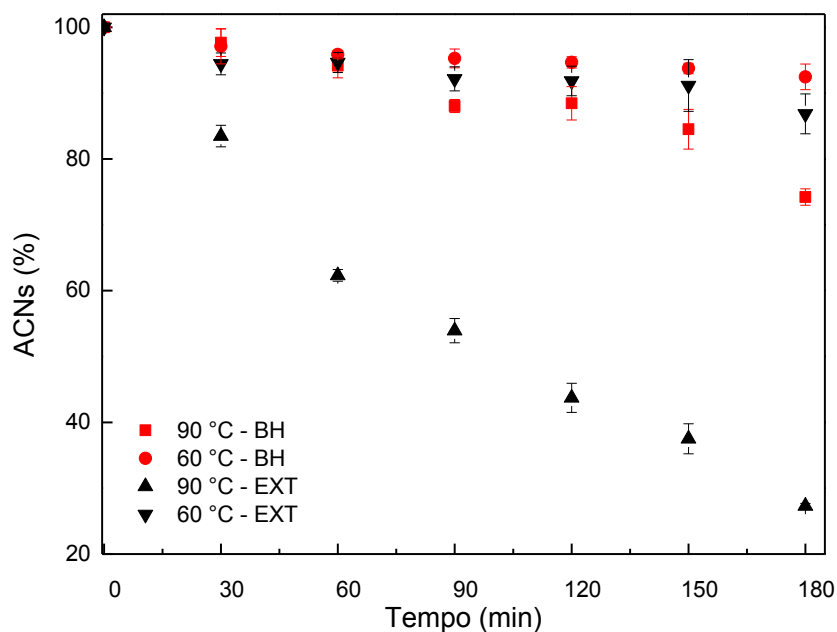
6.2.1 Estabilidade térmica, cinética de degradação e parâmetros de cor das antocianinas do extrato de jambolão e do biohíbrido

As balas de gelatina podem ser produzidas por fervura de agentes gelificantes e açúcares, usando duas técnicas de mistura: a frio (60 °C) e a quente (90 - 100 °C) (MUTLU; TONTUL; ERBAŞ, 2018). Embora o aquecimento seja uma abordagem eficaz para esterilização ou cozimento na fabricação de alimentos, as ACNs são degradadas em temperaturas > 40 °C (LUIZA KOOP et al., 2022). Além disso ocorre perda de sua coloração, o que não é desejável, pois no presente estudo buscamos substituir corantes sintéticos por naturais.

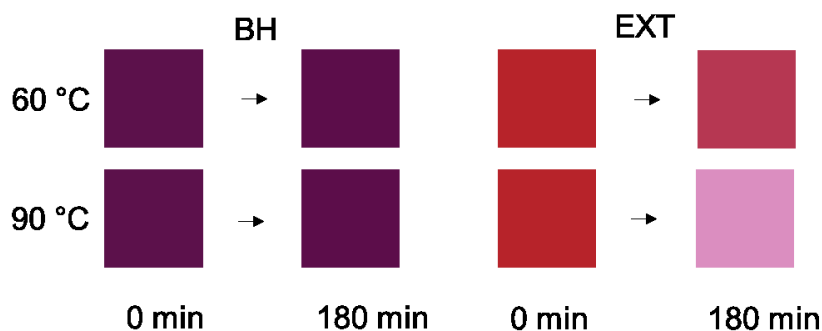
Neste contexto o teor de ACNs e os parâmetros de cor foram medidos durante o aquecimento do extrato de jambolão e do BH antes da produção das balas (60 e 90 °C/180 min). A preservação do teor de ACNs com o tempo de aquecimento em função da temperatura é apresentado na Figura 29A, podemos observar que as ACNs apresentaram maior degradação com o aumento da temperatura, comportamento já conhecido (TEIXEIRA et al., 2021; WANG et al., 2021).

Figura 29 - (A) Concentração de antocianinas (ACNs) para o extrato (EXT) e biohíbrido (BH) nas temperaturas de 60 e 90 °C em função do tempo. (B) Cor do biohíbrido e extrato após aquecimento.

(A)



(B)



Fonte: Autora (2022).

A amostra BH teve menor redução no teor de ACNs quando comparada ao extrato nas duas temperaturas estudadas, indicando estabilização das ACNs com a adsorção em Mnt (Figura 29A). Outros estudos também demonstram estabilidade térmica de ACNs adsorvidas em argila (LI et al., 2019b, 2019a).

A redução do teor de ACNs também foi avaliada pelo modelo cinético de primeira ordem. O coeficiente de determinação (R^2) obtido variou de 0,90 a 0,98, o que indica a qualidade do ajuste do modelo cinético de primeira ordem aos dados

experimentais (Tabela 18). Os valores de k e $t_{1/2}$ aumentaram com a temperatura, indicando que uma maior degradação ocorreu em temperaturas de processamento mais altas. Na temperatura de 90 °C o $t_{1/2}$ para as ACNs livres foi de 1,65 h e aumento para 7,70 h no BH. O aumento do valor de meia-vida das ACNs presentes no BH confirma sua proteção contra a degradação térmica devido a presença de Mnt.

Tabela 18 - Parâmetros cinéticos do efeito da temperatura na estabilidade das antocianinas do extrato de jambolão e BH.

| Amostras | k (min⁻¹) | R² | t_{1/2} (h) |
|-----------------|-----------------------------|----------------------|----------------------------|
| BH 60 °C | 0,0004 | 0,9316 | 28,87 |
| BH 90 °C | 0,0015 | 0,9067 | 7,70 |
| EXT 60 °C | 0,0007 | 0,9355 | 19,25 |
| EXT 90 °C | 0,0067 | 0,9890 | 1,65 |

Nota: BH: biohíbrido; EXT: extrato de jambolão; k: constante da taxa de degradação das antocianinas; R²: coeficiente de determinação; t_{1/2}: meia-vida. Fonte: Autora (2022).

Além disso, a degradação do pigmento vermelho das ACNs durante o aquecimento resulta na redução da vermelhidão das amostras (a^*), assim as alterações nos valores de cor foram examinadas (Figura 29B). A Tabela 19 apresenta os valores de cor para o extrato e o BH durante o aquecimento em termos de L*, a^* , C* e Hue°. Para o extrato após o tratamento térmico a 90 °C por 180 min, os valores de L* e o Hue° moveram-se para valores mais altos e o valor de C* para valores mais baixos, o que indica que o aquecimento causou degradação das antocianinas, a cor das soluções tornou-se mais clara, com menor intensidade da cor vermelha.

Tabela 19 - Parâmetros de cor para o extrato de jambolão (EXT) e o biohíbrido (BH) durante o aquecimento.

| Tempo (min) | Amostras | | | | |
|-------------|----------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| | BH | | EXT | | |
| | 60 °C | 90 °C | 60°C | 90°C | |
| L* | 0 | 19,31±0,77 ^a | 18,54±1,15 ^a | 44,03±0,23 ^a | 43,72±0,85 ^a |
| | 30 | 18,58±0,91 ^a | 17,61±0,39 ^{a,b} | 44,47±0,57 ^a | 45,56±0,53 ^{a,b} |
| | 60 | 18,03±0,68 ^a | 17,20±0,35 ^{a,b,c} | 44,24±0,48 ^a | 47,40±0,32 ^{b,c} |
| | 90 | 17,48±1,12 ^a | 16,80±0,75 ^{a,b,c} | 44,01±0,70 ^a | 49,23±0,92 ^{c,d} |
| | 120 | 18,37±1,54 ^a | 16,13±0,37 ^{b,c} | 45,41±0,57 ^{a,b} | 51,51±1,18 ^{d,e} |
| | 150 | 18,39±1,90 ^a | 15,51±0,91 ^c | 46,50±0,59 ^{b,c} | 52,38±1,21 ^e |
| | 180 | 17,72±0,66 ^a | 15,52±0,73 ^c | 47,09±0,41 ^c | 54,83±0,55 ^f |
| a* | 0 | 37,75±0,88 ^a | 37,61±1,15 ^a | 52,28±0,33 ^a | 52,33±0,15 ^a |
| | 30 | 37,02±0,25 ^a | 36,93±0,67 ^{a,b} | 52,58±0,86 ^a | 51,58±0,62 ^a |
| | 60 | 37,04±0,80 ^a | 36,70±0,16 ^{a,b} | 52,13±0,40 ^{a,b} | 48,20±0,61 ^b |
| | 90 | 37,07±1,36 ^a | 36,48±0,99 ^{a,b} | 51,67±0,18 ^{a,b} | 44,82±0,63 ^c |
| | 120 | 37,57±0,90 ^a | 35,55±1,05 ^{a,b} | 51,01±0,86 ^{a,b,c} | 42,34±0,40 ^d |
| | 150 | 36,75±1,31 ^a | 34,96±1,43 ^{a,b} | 50,59±0,50 ^{b,c} | 32,22±0,59 ^e |
| | 180 | 36,74±1,45 ^a | 34,60±1,39 ^b | 49,39±0,62 ^c | 30,55±0,41 ^f |
| C* | 0 | 38,82±0,82 ^a | 38,67±1,05 ^a | 55,99±0,49 ^a | 56,03±0,35 ^a |
| | 30 | 38,05±0,35 ^a | 37,87±0,63 ^{a,b} | 56,37±1,13 ^a | 54,77±0,41 ^a |
| | 60 | 38,05±0,94 ^a | 37,62±0,08 ^{a,b} | 55,84±0,71 ^a | 50,98±0,43 ^{a,b} |
| | 90 | 38,05±1,54 ^a | 37,37±0,79 ^{a,b} | 55,31±0,31 ^{a,b} | 47,19±0,51 ^c |
| | 120 | 38,52±0,77 ^a | 36,42±0,99 ^{a,b} | 54,53±1,14 ^{a,b,c} | 43,86±0,22 ^d |
| | 150 | 37,64±1,55 ^a | 35,73±1,39 ^b | 53,68±0,43 ^{b,c} | 32,87±0,70 ^e |
| | 180 | 37,72±1,30 ^a | 35,33±1,19 ^b | 52,47±0,50 ^c | 31,02±0,48 ^f |
| Hue° | 0 | 346,56±1,00 ^a | 346,56±1,03 ^a | 20,96±0,85 ^a | 20,93±0,84 ^a |
| | 30 | 346,63±0,69 ^a | 347,20±0,41 ^a | 21,13±0,72 ^a | 19,65±0,98 ^{a,b} |
| | 60 | 346,82±0,80 ^a | 347,35±0,61 ^a | 21,00±0,76 ^a | 18,94±0,85 ^{a,b} |
| | 90 | 347,02±0,94 ^a | 347,49±1,58 ^a | 20,88±1,20 ^a | 18,24±0,79 ^b |
| | 120 | 347,27±1,36 ^a | 347,60±0,83 ^a | 20,67±0,66 ^a | 15,11±1,35 ^c |
| | 150 | 347,63±1,40 ^a | 348,15±0,93 ^a | 19,54±0,45 ^a | 11,38±0,85 ^d |
| | 180 | 346,89±1,27 ^a | 348,39±1,79 ^a | 19,70±1,59 ^a | 9,96±0,93 ^d |

Nota: Resultados com letra minúscula igual na mesma coluna indicam que não houve diferença significativamente entre as amostras ($p > 0,05$), de acordo com o teste de Tukey, para L*, a*, C* e Hue° em função do tempo de aquecimento. Fonte: Autora (2022).

Para o BH o valor de a* e C* diminuiu indicando menor intensidade da cor vermelha, no entanto não houve diferença significativa ($p > 0,05$) para o ângulo de tonalidade (Hue°). Portanto o BH manteve sua coloração vermelho/púrpura, que é característica da presença de ACNs do fruto jambolão. Tavares et al. (2020) obtiveram valores de Hue° semelhantes (320°), que foram atribuídos a coloração vermelho-púrpura para o pó de suco de jambolão, além disso a cor do pó foi preservada durante o armazenamento.

Na temperatura de 60 °C houve diminuição significativa da intensidade da cor vermelha para o extrato apenas nos tempos 150 e 180 min ($p < 0,05$). Em contraste o BH manteve sua coloração. Estes resultados demonstram que as amostras extrato e BH sofreram menor alteração de cor e redução do teor de ACNs na temperatura de 60 °C, sendo escolhida para preparação das balas de gelatina.

6.2.2 Caracterização físico-química, bioativa e parâmetros de cor das balas de gelatina

A caracterização físico-química das balas de gelatina produzidas está apresentada na Tabela 20. Os valores de atividade de água das balas estão de acordo com valores relatados (0,7 - 0,8) por Rivero et al. (2021) para balas adicionadas de compostos bioativos de frutas e Mutlu et al. (2018) para balas com adição de mel e suco de frutas. A atividade de água considerada segura para produtos de confeitaria varia entre 0,55 - 0,75. Em valores de $a_w > 0,6$ pode haver crescimento de fungos durante o armazenamento (ERGUN; LIETHA; HARTEL, 2010), assim ácido cítrico foi adicionado na formulação das balas como conservante. Rivero et al. (2021) também adicionaram ácido cítrico e extrato de própolis para evitar o desenvolvimento de fungos em balas de gelatina.

O teor de umidade das balas foi de aproximadamente 14% e não houve diferença significativa entre as formulações ($p > 0,05$). Este resultado está de acordo com os valores de umidade obtidos para balas de gelatina que variam de 10 a 20% (ERGUN; LIETHA; HARTEL, 2010; MUTLU; TONTUL; ERBAŞ, 2018; RIVERO et al., 2021). De modo geral o teor de umidade e a_w em balas de gelatina está diretamente relacionada a sua textura e atividade microbiana. Esses fatores são influenciados pela temperatura de cozimento, teor de gelatina adicionado, tempo de retenção das balas no amido de secagem ou em umidade relativa controlada (ÇOBAN et al., 2021; ERGUN; LIETHA; HARTEL, 2010; MUTLU; TONTUL; ERBAŞ, 2018).

As balas de gelatina apresentaram valor de pH=3,6 e não houve diferença significativa entre as amostras ($p > 0,05$), devido a padronização da concentração de ácido cítrico nas formulações. O valor de pH está de acordo com outros estudos que produziram balas de gelatina com adição de extrato de frutas e ácido cítrico e

obtiveram valores de pH entre 3,0 a 5 (ÇOBAN et al., 2021). Além disso, segundo Cano-Lamadrid et al. (2020) a adição de 1% de ácido cítrico melhorou a cor, a atividade antioxidante e os atributos sensoriais de balas de gelatina à base de suco de romã. Ainda valores de pH ácidos contribuem para estabilidade de compostos bioativos, como as antocianinas (GUNES et al., 2022).

Tabela 20 - pH, atividade de água (a_w) e umidade das balas de gelatina.

| Parâmetros | Amostras | | |
|-------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| | BC | BEXT | BBH |
| pH | 3,60 ± 0,02 ^a | 3,59 ± 0,02 ^a | 3,58 ± 0,01 ^a |
| a_w | 0,787 ± 0,002 ^a | 0,781 ± 0,001 ^b | 0,778 ± 0,001 ^c |
| Umidade (%) | 13,59 ± 0,28 ^a | 14,60 ± 0,37 ^b | 13,69 ± 0,46 ^{a,b} |

Nota: Resultados com letra minúscula igual na mesma linha indicam que não houve diferença significativamente entre as amostras ($p > 0,05$), de acordo com o teste de Tukey. BC: bala controle; BEXT: bala com adição de extrato; BBH: bala com adição de biofibrido.

Fonte: Autora (2022).

6.2.3 Perfil de textura das balas de gelatina

A textura é um dos fatores mais importantes para determinar a aceitação sensorial dos produtos de confeitaria. A análise de textura por TPA foi realizada e os parâmetros de dureza, mastigabilidade, gomosidade, adesividade, elasticidade e coesão foram determinados (Tabela 21).

Para os parâmetros dureza, mastigabilidade e gomosidade, os maiores valores foram obtidos para a bala BBH que apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação a amostra controle, e foi semelhante a amostra adicionada de extrato. Esse comportamento pode estar relacionado a adição de solutos nas balas com extrato e BH que favorecem a formação de redes e ocasionaram uma melhor reticulação entre as cadeias poliméricas dentro do sistema de gel (CASAS-FORERO et al., 2021).

Comportamento semelhante foi observado por Casas-Forero et al. (2021) para a adição de suco de mirtilo crioconcentrado em géis de gelatina. Especificamente, Staroszczyk et al. (2020) avaliaram a incorporação de compostos bioativos em filmes de gelatina de peixe e indicaram que a maior resistência do gel com suco de frutas foi atribuída à interação da gelatina com as antocianinas.

Os valores de dureza obtidos (8,60 a 10,44 N) foram menores aos reportados por Çoban et al. (2021) que adicionaram extrato rico em antocianinas como corante natural em balas de gelatina, onde a dureza variou de 11,43 a 15,85 N. E similares a balas de gelatina adicionadas de mel e suco de frutas, onde a dureza foi de aproximadamente 8 N para todas as formulações (MUTLU; TONTUL; ERBAŞ, 2018). Valores menores para o parâmetro dureza são considerados positivos em termos de aceitação e qualidade do produto, pois balas macias são preferidas pelo consumidor e além disso a dureza afeta a liberação de sabor, devido a maior taxa de difusão (ÇOBAN et al., 2021).

Os parâmetros de adesividade, elasticidade e coesão não apresentaram diferença estatística significativa entre as formulações ($p > 0,05$), indicando que a adição de antocianinas não afetou a estrutura das balas de gelatina. Comportamento semelhante foi observado para géis de gelatina com extrato de mirtilo crioconcentrado (CASAS-FORERO et al., 2021). Além disso, os valores de coesividade indicam a força das ligações internas que formam a estrutura do produto, valores na faixa de 0,7 - 0,9 foram obtidos por estudos anteriores, e estão de acordo com o presente estudo (ÇOBAN et al., 2021; MIRANDA et al., 2020; RIVERO et al., 2021).

Tabela 21 - Perfil de textura das balas de gelatina.

| Parâmetros | Amostras | | |
|---|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| | BC | BEXT | BBH |
| Análise de perfil de textura (TPA) | | | |
| Dureza (N) | 8,60 ± 0,59 ^a | 9,87 ± 0,93 ^{a,b} | 10,44 ± 0,79 ^b |
| Mastigabilidade | 7,36 ± 0,46 ^a | 8,40 ± 0,77 ^{a,b} | 8,84 ± 0,67 ^b |
| Gomosidade (N) | 7,83 ± 0,49 ^a | 9,02 ± 0,84 ^{a,b} | 9,44 ± 0,69 ^b |
| Adesividade (N.s) | -3,05 ± 0,64 ^a | -3,67 ± 0,98 ^a | -2,96 ± 0,75 ^a |
| Elasticidade | 0,94 ± 0,01 ^a | 0,93 ± 0,02 ^a | 0,94 ± 0,01 ^a |
| Coesão | 0,91 ± 0,01 ^a | 0,91 ± 0,01 ^a | 0,90 ± 0,01 ^a |

Nota: Resultados com letra minúscula igual na mesma linha indicam que não houve diferença significativamente entre as amostras ($p > 0,05$), de acordo com o teste de Tukey. BC: bala controle; BEXT: bala com adição de extrato; BBH: bala com adição de biohíbrido.

Fonte: Autora (2022).

6.2.4 Propriedades bioativas das balas de gelatina

As propriedades funcionais das balas foram analisadas por FT, ACNs e atividade antioxidante e estão apresentados na Tabela 22. Comparando-se os valores

obtidos para balas adicionadas de extrato livre (BEXT) e BH observamos diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras com menores valores para BBH, pois os compostos bioativos adsorvidos na Mnt apresentaram pouca liberação no meio de extração.

Outros estudos também desenvolveram balas potencialmente com propriedades funcionais: Rivero et al. (2021) obtiveram 550,8 mg EAG/100 g e 1820 μ mol de Trolox/100 g para balas adicionadas de extrato de própolis e framboesa em pó como corante natural. Casas-Forero (2021) desenvolveram géis de gelatina com adição de suco de mirtilo crioconcentrado (20%) com valores de 54,6 mg EAG/100 g, 4,5 mg ACNs/100g e 41,8 μ mol de Trolox/100 g. Miranda et al. (2020) desenvolveram balas probióticas enriquecidas com polpa de juçara e obtiveram 167 mg ACNs/100 g com adição de 20% de polpa na formulação. A variação nos valores de FT, ACNs e atividade antioxidante está relacionada com a concentração e ingredientes adicionados na formulação, não sendo encontradas formulações semelhantes.

No presente estudo as propriedades bioativas das balas de gelatina desenvolvidas estão atribuídas a adição de mel e extrato de jambolão na formulação, ou seja, os resultados apresentados na Tabela 22 para FT e DPPH correspondem a bala integral. O jambolão é uma fruta rica em compostos fenólicos, sendo os principais o ácido gálico e a catequina, além das antocianinas majoritárias no fruto, como a petunidina, malvidina, delphinidina e cianidina (KOOP et al., 2021; TAVARES et al., 2016). O mel é um produto natural pronto para o consumo produzido a partir de diferentes tipos de néctar ou melada, coletados pelas abelhas em uma variedade de plantas, assim, existe uma grande variação do perfil de flavonoides entre as amostras; podemos destacar a catequina, epicatequina, kaempferol e miricetina (GONÇALVES et al., 2021).

Tabela 22 - Compostos bioativos e atividade antioxidante das balas de gelatina.

| Parâmetros | Amostras | | |
|----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | BC | BEXT | BBH |
| ACNs (mg/100 g) | - | 15,97 \pm 0,32 ^a | 3,67 \pm 0,26 ^b |
| FT (mg EAG/100 g) | 178,82 \pm 0,64 ^a | 220,95 \pm 1,48 ^b | 210,81 \pm 2,12 ^c |
| DPPH (μ mol TE/100 g) | 29,94 \pm 2,70 ^a | 177,53 \pm 1,56 ^b | 63,01 \pm 3,50 ^c |

Nota: Resultados com letra minúscula igual na mesma linha indicam que não houve diferença significativa entre as amostras ($p > 0,05$), de acordo com o teste de Tukey. BC: bala controle; BEXT: bala com adição de extrato; BBH: bala com adição de biohíbrido. Fonte: Autora (2022).

6.2.5 Aspecto visual e cor das balas de gelatina

Além das balas apresentarem propriedades funcionais, o aspecto visual e a cor são características que influenciam a decisão de compra de produtos pelo consumidor. Pode-se observar na Tabela 23 que as balas de gelatina apresentaram aspecto visual uniforme para todas as formulações, e o BH em pó foi distribuído uniformemente na matriz de gelatina. Além disso as partículas não foram visíveis a olho nu e o BH conferiu coloração mais intensa a amostra quando comparada ao extrato puro. Ribeiro et al. (2018) produziram filmes de gelatina com adição de Mnt e extrato de acerola; os filmes produzidos apresentaram superfície uniforme com intensificação e estabilização da cor.




Todos os parâmetros de cor L^* , a^* e b^* apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras, como observado na Tabela 23. A amostra controle apresentou maior luminosidade com valores próximos ao amarelo; com a adição de ACNs a intensidade da cor vermelha (a^*) aumentou e conseqüentemente houve diminuição da luminosidade para ambas formulações.

A BEXT apresentou coloração entre o laranja e vermelho, com valores de a^* e b^* semelhantes. Já para a BBH a tonalidade vermelha diminui e o valor de b^* apresentou característica azulada, pois a cor da bala mudou para tonalidade vermelha/roxa. As diferenças na coloração das balas adicionadas de ACNs na mesma concentração são atribuídas ao estado físico, extrato líquido e partículas e a influência da cor do mel na mistura. Outro fator pode ser o pH das ACNs, no entanto no presente estudo os valores obtidos não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$).

Resultados semelhantes foram obtidos por Casas-Forero et al. (2021) que avaliaram o efeito da adição de suco de mirtilo crioconcentrado em géis de gelatina. Os géis apresentaram coloração intensa e avermelhada ($a^*= 1,4$ e $b^*= -0,1$) semelhante ao suco crioconcentrado fresco. No presente estudo a coloração da BBH é semelhante ao BH em pó. Çoban et al. (2021) adicionaram extrato de berberina em balas de gelatina e obtiveram amostras com cor vermelha e aumento da intensidade

em função da concentração de antocianinas ($a^* = 2,82$ e $b^* = -0,01$). Em resumo a BBH tem potencial para ser melhor aceita sensorialmente devido a cor atrativa que remete a adição de ACNs como corante natural, uma vez que o parâmetro de cor é uma das características com maior impacto na decisão de compra do consumidor.

Tabela 23 - Aspecto visual e parâmetros de cor das balas de gelatina.

| Parâmetros de cor | Aspecto visual | | |
|-------------------|---|---|---|
| |  |  |  |
| | BC | BEXT | BBH |
| L* | 51,96±1,42 ^a | 33,91±1,67 ^b | 19,31±0,94 ^c |
| a* | 20,10±0,95 ^a | 38,35±0,34 ^b | 28,66±1,21 ^c |
| b* | 58,02±1,10 ^a | 34,44±2,14 ^b | -7,48±1,39 ^c |

Nota: Resultados com letra minúscula igual na mesma linha indicam que não houve diferença significativa entre as amostras ($p > 0,05$), de acordo com o teste de Tukey. BC: bala controle; BEXT: bala com adição de extrato; BBH: bala com adição de biohíbrido.

Fonte: Autora (2022).

6.2.6 Alterações do teor de antocianinas, fenólicos totais e atividade antioxidante durante a digestão gastrointestinal *in vitro* das balas de gelatina

A fim de determinar o comportamento de degradação dos compostos bioativos presentes nas balas durante a digestão gastrointestinal *in vitro*, o teor de ACNs, FT e atividade antioxidante foram determinados. Conforme mostrado na Tabela 24, após a digestão oral simulada as ACNs livres presentes na BEXT apresentaram liberação de 95%, devido a fusão da gelatina a 37 °C (CASAS-FORERO et al., 2021). Além disso a digestão oral é uma etapa rápida e não ocorre degradação de ACNs, mesmo em meio neutro (pH 7). Em contraste a BBH apresentou liberação de apenas 16%, devido a adsorção das ACNs na Mnt.

Tabela 24 - Teor de compostos bioativos para as balas de gelatina durante as etapas de digestão gastrointestinal *in vitro*.

| | ACNs (mg/100 g) | | Bioaccessibilidade (%) | |
|-----------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | BEXT | BBH | BEXT | BBH |
| Fase inicial* | 16,47±0,06 ^a | 16,00±0,52 ^a | - | - |
| Fase oral | 15,71±0,06 ^b | 2,57±0,07 ^b | 95,39±0,01 ^a | 16,04±0,30 ^a |
| Fase gástrica | 15,89±0,19 ^b | 2,65±0,05 ^b | 96,72±0,80 ^a | 16,56±0,23 ^a |
| Fase intestinal | 7,10±0,08 ^c | 5,53±0,04 ^c | 43,24±0,33 ^b | 34,56±0,18 ^b |
| | FT (mg EAG/100 g) | | Bioaccessibilidade (%) | |
| Fase inicial* | 44,26±0,21 ^a | 34,01±0,38 ^a | - | - |
| Fase oral | 25,38±1,02 ^b | 6,78±0,55 ^b | 57,34±2,05 ^a | 19,95±1,39 ^a |
| Fase gástrica | 38,91±1,01 ^c | 10,00±1,05 ^c | 87,90±1,97 ^b | 29,41±2,67 ^b |
| Fase intestinal | 21,53±1,03 ^d | 17,82±0,94 ^d | 48,63±2,01 ^c | 52,41±2,32 ^c |

Nota: Resultados com letra minúscula igual na mesma coluna para antocianinas e fenólicos totais indicam que não houve diferença significativa entre as amostras ($p > 0,05$), de acordo com o teste de Tukey. ACNs: antocianinas; FT: fenólicos totais; BEXT: bala com adição de extrato; BBH: bala com adição de biohíbrido. * Fase inicial: valor adicionado de composto bioativos nas balas. Fonte: Autora (2022).

As ACNs da BEXT apresentaram maior concentração após a digestão gástrica (96,72%), sendo que a condição ácida do meio mantém as ACNs estáveis. Victoria-Campos et al. (2022) demonstraram estabilidade de ACNs isoladas de frutas em meio gástrico > 100% (136, 115% para cianidina-3-O-glicosídeo e malvidina-3-O-glicosídeo, respectivamente). Esse comportamento pode ser uma consequência da transformação de ACNs em cátions flavilium mediados pelo baixo pH do meio gástrico. Nesta condição as ACNs absorvem mais luz em 520 nm em relação as ACNs nativas, causando uma superestimação da sua concentração (MCDOUGALL et al., 2005; VICTORIA-CAMPOS et al., 2022). No presente estudo as ACNs do extrato e BH, bem como as balas apresentavam pH ácido.

Na digestão intestinal, as ACNs liberadas são instáveis e são decompostas devido ao tempo que permanecem em ambiente neutro. Consequentemente o teor de ACNs das BEXT diminuiu significativamente para 43,24%. A sensibilidade das ACNs ao pH neutro ou levemente alcalino já foi relatada anteriormente. Victoria-Campos et al. (2022) demonstraram redução significativa de ACNs isoladas de frutas em condições intestinais. Obtendo-se estabilidade de 82,5% para cianidina-3-O-glicosídeo e 63,97% para malvidina-3-O-glicosídeo. Marques Peixoto et al. (2016) obtiveram estabilidade de 45% para ACNs do fruto de jambolão após a fase de digestão intestinal. Em contraste recentemente Sousa et al. (2021) avaliaram a

bioacessibilidade de alguns compostos bioativos da polpa de jambolão após a digestão e 93% das ACNs foram degradadas na fase intestinal, pois as ACNs do jambolão não são aciladas e, portanto, são facilmente desestabilizadas em pH neutro ou alcalino. Na fase colônica, as ACNs não degradadas podem ter sido complexadas com outros compostos e não foram identificadas.

Além disso a estabilidade das ACNs na BEXT após digestão intestinal (43%) pode ser atribuída a proteção da gelatina. O mesmo foi demonstrado por meio da encapsulação de extratos de farelo de arroz com gelatina. A gelatina protegeu os compostos bioativos durante a digestão principalmente os ácidos fenólicos, flavonoides e antocianinas, isso é atribuído a ligação entre as cargas negativas (gelatina) e as cargas positivas (compostos) (PEANPARKDEE; BOROMPICHAICHARTKUL; IWAMOTO, 2021).

Neste contexto a degradação das ACNs durante a fase intestinal tem sido atribuída ao pH neutro da solução, onde o anel C e a ligação glicosídica na estrutura das ACNs são clivados e depois degradados em outros fenólicos de baixo peso molecular (HAO et al., 2021). Outro fator é a ligação das ACNs a proteínas e sais biliares e conseqüente precipitação de complexos indigeríveis. Em relação a estrutura os resultados até o momento mostram que a glicação aumenta a estabilidade das ACNs (VICTORIA-CAMPOS et al., 2022; WOODWARD et al., 2009).

Para a amostra BBH as ACNs apresentaram maior liberação na fase intestinal (34,56%). Esse comportamento foi atribuído as ligações das ACNs com a Mnt no processo de adsorção que conferiram proteção e liberação gradual durante a digestão. Outro fator pode ser a proteção da gelatina conforme foi observado para a BEXT. Singh e Kitts (2019) avaliaram a digestibilidade de extratos de cereja adicionados de argila mineral. Os autores observaram interação entre as ACNs e a argila, dificultando a liberação na fase gástrica. Na fase intestinal as ACNs foram degradadas (> 70%), não sendo observado efeito de proteção com a adição da argila. É importante destacar que o estudo não realizou a adsorção dos compostos na argila, e não encontramos estudos que avaliam a digestibilidade de compostos bioativos adsorvidos em argilas.

Para FT o comportamento de liberação e estabilidade durante a digestão para a BEXT e BBH foi semelhante as ACNs. Para BEXT a maior concentração de FT foi

na fase gástrica com redução significativa na fase intestinal. Já para a BBH a maior liberação foi obtida na fase intestinal. Sousa et al. (2021) demonstraram que o maior teor de FT da polpa de jambolão foi obtida na fase gástrica (58%) com redução significativa na fase intestinal (28%).

É importante observar que o teor de FT na fase intestinal apresentou maior liberação para a BBH e maior estabilidade para a BEXT em relação as ACNs. Inada et al. (2020) demonstram que após a digestão intestinal da casca e semente de jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*), o teor de ACNs diminui para 25%, enquanto o teor de ácido elágico aumentou para 74%. Em contraste, o teor de FT (principalmente ácidos fenólicos) de frutos de uvaia após a digestão intestinal sofreu redução, que pode estar associada à sensibilidade desses compostos a valores de pH mais elevados, uma vez que a hidrólise de tais compostos em moléculas menores durante o processo digestivo resulta em moléculas menos estáveis em pH alcalino (DE PAULO FARIAS et al., 2021).

A atividade antioxidante das balas durante a digestão gastrointestinal foi avaliada pelo ensaio de DPPH. Os valores de DPPH das amostras BBH e BEXT após a fase intestinal foram maiores em comparação com a amostra não digerida (335,8 e 364,47 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$ para BBH e BEXT). Comportamento semelhante foi reportado para a digestibilidade de extrato de cereja com adição de argila (SINGH; KITTS, 2019) e para a polpa de uvaia (DE PAULO FARIAS et al., 2021). Arend et al. (2022) demonstraram aumento da atividade antioxidante após a fase intestinal para extrato concentrado de folhas de beterraba. Santana Andrade et al. (2022) demonstraram aumento significativo da atividade antioxidante após a digestão da casca de jambolão pelo método FRAP.

O aumento na atividade antioxidante para as amostras após a digestão intestinal está associado a degradação ou transformação de compostos nativos e formação de novos compostos com atividade antioxidante (HAO et al., 2021; SANTANA ANDRADE et al., 2022). Sousa et al. (2021) observaram aumento significativo na atividade antioxidante de frutos de jambolão da fase oral para a fase duodenal pelos ensaios de ABTS e FRAP. E relataram que esse comportamento pode ser devido a liberação de polifenóis (não antocianinas) no intestino delgado com fortes

efeitos antioxidantes, como ácido quínico, ácido caféico, ácido gálico, derivados de miricetina e epigallocatequina.







6.2.7 Estabilidade das balas de gelatina sob luz durante o armazenamento

Avaliar a estabilidade à luz é um fator essencial para determinar a embalagem utilizada no armazenamento a longo prazo de alimentos e bebidas. O efeito do tempo de exposição a luz na estabilidade de cor das balas com ou sem antocianinas foi investigado. Os parâmetros de cor das balas de gelatina sem luz e após 14 dias de exposição a luz foram apresentados na Tabela 25. Para a BEXT os valores de L^* , b^* e ΔE^* aumentaram, enquanto o valor de a^* diminuiu, estes resultados mostram o desbotamento da cor das balas com extrato, que pode ser observado pelo aspecto visual das balas com valor de $\Delta E^* > 3$ indicando que a diferença de cor é perceptível (ANDRETTA et al., 2019).

De acordo com os parâmetros de cor (Tabela 25) observamos que a BBH apresentou melhor estabilidade comparada com a BEXT, com valor de ΔE^* significativamente menor ($p < 0,05$). Além disso, mesmo com valor de $\Delta E^* > 3$, a diferença visual de cor não é perceptível. Esse resultado confirma que a adsorção das ACNs do extrato de jambolão em argila Mnt possibilitou estabilização de cor das balas adicionadas de BH sob exposição a luz. Resultados semelhantes foram reportados por Lima et al. (2020) que demonstram estabilidade a luz para pigmentos híbridos obtidos pela adsorção de ACNs em saponita.

Tabela 25 - Parâmetros de cor e aspecto visual das balas sem e com antocianinas (ACNs) expostas a luz.

| Tempo (dias) | Amostras | Parâmetros de cor | | | |
|--------------|----------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|------------------------|
| | | L^* | a^* | b^* | ΔE^* |
| 0 | BC | 55,84±1,28 ^a | 26,19±1,28 ^a | 62,23±0,95 ^a | - |
| | BEXT | 33,91±1,67 ^a | 38,35±0,34 ^a | 34,44±2,14 ^{a,b} | - |
| | BBH | 19,31±0,94 ^a | 28,66±1,21 ^a | -7,48±1,39 ^a | - |
| 14 | BC | 55,93±0,40 ^a | 24,28±0,40 ^a | 60,34±0,76 ^a | 3,35±0,40 ^a |
| | BEXT | 38,36±1,88 ^b | 30,96±0,41 ^b | 38,99±0,86 ^b | 9,36±0,38 ^b |

| BBH | 20,05±0,94 ^a | 27,04±0,51 ^a | -6,35±0,40 ^a | 3,42±0,53 ^c |
|---|---|---|-------------------------|------------------------|
| Aspecto visual | | | | |
| 0 dias | | | | |
|  |  |  | | |
| 14 dias | | | | |
|  |  |  | | |
| BC | BEXT | BBH | | |

Nota: Resultados com letra minúscula igual na mesma coluna para os parâmetros de cor entre o tempo 0 e 14 dias de cada tratamento indicam que não houve diferença significativa entre as amostras ($p > 0,05$), de acordo com o teste de Tukey. BC: bala controle; BEXT: bala com adição de extrato; BBH: bala com adição de biohíbrido. Fonte: Autora (2022).

6.3 CONCLUSÃO

As balas de gelatina com adição de extrato de jambolão (BEXT) e biohíbrido (BBH) apresentaram aparência uniforme e cor atrativa, além de perfil nutricional melhorado com a adição de compostos bioativos do mel e do fruto jambolão. Ambas as formulações apresentaram características físico-químicas esperadas para balas de gelatina. A bioacessibilidade das ACNs e FT para a BEXT após a digestão *in vitro* apresentou redução significativa. Entretanto para a BBH observou-se maior concentração na fase intestinal. Ainda para ambas as balas, frações de compostos permaneceram disponíveis após digestão e podem exercer sua bioatividade. A BEXT apresentou degradação de cor quando exposta a luz, indicando a necessidade de proteção para aumentar a sua vida útil. Para a BBH a variação de cor não foi significativa. Por fim este estudo revela que o uso de BH em balas de gelatina é viável

e é uma alternativa inovadora e promissora para a indústria de alimentos na substituição de corantes sintéticos.

CAPÍTULO 7 - INDICADORES INTELIGENTES DE AMIDO E BIOHÍBRIDO NATURAL FABRICADOS POR TERMOCOMPRESSÃO

Incorporar pigmentos naturais biohíbridos (ACNs/argila) em embalagens inteligentes é uma estratégia para evitar o uso de pigmentos sintéticos, que podem entrar em contato com os alimentos e ainda promover maior estabilidade de cor com o tempo. Além disso, é de grande importância o desenvolvimento de novos materiais de embalagem que sejam biodegradáveis e ecologicamente corretos (PINTO et al., 2021).

Portanto estudos sobre a aplicação de pigmentos biohíbridos podem contribuir para a substituição de pigmentos sintéticos no setor de embalagens. Além disso, o método de termocompressão ainda não foi explorado. Portanto, este trabalho tem como objetivo desenvolver e caracterizar indicadores inteligentes à base de amido de mandioca e antocianinas de frutos de jabolão (*Syzygium cumini L.*) estabilizados em montmorilonita por termocompressão.

Os resultados deste capítulo foram aceitos para publicação na revista International Journal of Biological Macromolecules, com artigo de pesquisa intitulado: Intelligent labels manufactured by thermo-compression using starch and natural biohybrid based.

7.1 MATERIAIS E MÉTODOS

7.1.1 Materiais

Frutos de jabolão foram colhidos manualmente em Florianópolis, SC, Brasil, em fevereiro de 2021, em estágio totalmente maduro. Os frutos foram selecionados e lavados, e a polpa e a casca foram separadas manualmente e imediatamente armazenadas a -18 ± 2 °C. Montmorilonita crua (CP31 - Bentonisa, Brasil), fécula de

mandioca (C.S.) (Juréia, Brasil), glicerol P.A. (Neon, Brasil), água destilada e ácido cítrico P.A. (Vetec, Brasil) foram empregados nos experimentos.

7.1.2 Extração e quantificação de ACNs de frutos de jambolão

O extrato de jambolão foi obtido de acordo com o método descrito no item 3.1.2. As antocianinas do extrato de jambolão foram quantificadas pelo método de pH diferencial (GIUSTI; WROLSTAD, 2001), de acordo com o descrito em 3.1.5.3.

7.1.3 Espectros UV-visíveis do extrato de jambolão

O extrato de jambolão (10 μ L) foi dissolvido em 5 mL de tampão com um pH de 1-12. Em seguida, os espectros das soluções em diferentes faixas de pH foram escaneados (400-800 nm) usando um espectrofotômetro (Quimis, Q898U2M5, Brasil) (CHENG et al., 2022a). As imagens das soluções foram capturadas por uma câmera digital (Nikon D5500, Nikon Corporation, Japão). Além disso, para visualizar as mudanças de cor, amostras de cores foram criadas a partir dos valores L^* , a^* e b^* de cada solução usando o software Adobe Photoshop CC (Adobe Systems, Inc., San Jose, CA, EUA) (ZHAO et al., 2020).

7.1.4 Obtenção do biohíbrido

Para obter o biohíbrido, primeiramente, o pH do extrato de jambolão foi ajustado para 1,5, no qual 0,027 g de Mnt/mg de ACNs foram adicionadas ao extrato e agitado (700 rpm) a 20 °C por 30 min. Após a adsorção, o material decantado foi separado do sobrenadante e seco (forno a vácuo) a 35 °C por 4 h. O pó de BH foi condicionado em dessecadores contendo sílica gel a 25 °C (\approx 0% R.H.) por 7 dias no escuro (CAPELLO et al., 2019; COELHO LEANDRO et al., 2021).

7.1.5 Preparação dos indicadores inteligentes

Os indicadores inteligentes foram preparados de acordo com o método descrito por Gaviria et al. (2021) com modificações. A formulação do indicador controle (IC) foi preparada com 3 g de fécula de mandioca, 0,9 g de glicerol (30% com base na massa de amido) e 1,2 g de água destilada (40% com base na massa de amido). As formulações de indicadores inteligentes contendo ACNs foram preparadas conforme mencionado para formulação de IC, com a adição de BH (1%, 3% e 5% com base na massa de amido, sendo nomeado como indicador contendo 1% (IBH-1), indicador contendo 3% (IBH-3), e indicador contendo 5% (IBH-5) de BH). Todos os ingredientes foram misturados manualmente em placa de Petri com bastão de vidro e então acondicionados em dessecadores, contendo soluções saturadas de brometo de sódio (NaBr, umidade relativa (UR) = 58%) a 25 °C por 4 dias. Após o período de armazenamento, os pós hidratados (2 g) foram colocados entre duas folhas de Mylar (15 cm x 20 cm). As placas foram inseridas em prensa hidráulica aquecida a 130 °C e prensadas a 5 toneladas por 2 min. Os indicadores obtidos foram resfriados e facilmente removidos das folhas. Em seguida, os indicadores foram acondicionados em dessecadores contendo soluções saturadas de NaBr (UR = 58%) a 25 °C, por no mínimo 7 dias, antes da caracterização. Todas as caracterizações foram realizadas em triplicata para cada indicador.

7.1.6 Caracterização dos indicadores inteligentes

7.1.6.1 Aspecto visual, espessura e morfologia

Imagens da superfície do indicador inteligente foram capturadas por uma câmera digital (Nikon D5500, Nikon Corporation, Japão), e o aspecto visual foi avaliado. A espessura dos indicadores (*e*) foi determinada usando um micrômetro digital (0,001 mm; Mitutoyo). A média de 10 pontos diferentes foi medida em cada indicador (VALENCIA et al., 2019).

Os indicadores foram acondicionados em dessecador preenchido com sílica gel anidra, imersos em nitrogênio líquido e posteriormente fraturados para avaliação da morfologia. A superfície e a microestrutura interna foram analisadas por

microscopia eletrônica de varredura (SEM, JSM-6390LV, JEOL, Japão) a uma tensão de aceleração de 5 kV (MERZ et al., 2020).

7.1.6.2 Teor de umidade, solubilidade em água e ângulo de contato

As amostras dos indicadores foram secas em estufa a 105 °C por 24 h e resfriadas em dessecador com sílica gel, e imediatamente pesadas (FONSECA et al., 2020). O teor de umidade foi expresso em porcentagem (Eq. 23):

$$\text{UMD (\%)} = \frac{M - m}{M} \times 100 \quad (23)$$

Onde M é o peso do indicador antes de seco (g), e m é o peso do indicador depois de seco (g).

A solubilidade em água (SA) dos indicadores foi determinada pela imersão de três amostras de cada (3 x 2 cm) com peso seco inicial conhecido em 50 mL de água destilada sob agitação contínua (100 rpm) a 20 °C por 24 h. Após, o indicador foi retirado da água destilada e seco em estufa a 105 °C por 24 h. SA (%) foi calculado pela diferença entre a massa inicial determinada a partir da amostra UMD (%) e a massa final após a secagem (GAVIRIA et al., 2021).

O ângulo de contato com a água dos indicadores foi medido de acordo com o método padrão ASTM D7334, usando um tensiômetro óptico (Ramé-Hart 250). Os indicadores foram fixados no suporte do equipamento e uma gota de água destilada (4 µL) foi liberada na superfície de cada etiqueta por meio de uma seringa automática de precisão. As medidas de ângulo de contato (°) foram obtidas analisando a forma de cada gota séssil imediatamente após ser gotejada nas amostras. Foram realizadas cinco medições por indicador em triplicata. O ângulo formado entre a superfície do indicador e a tangente à gota foi calculado usando o software DROPImage Advanced.

7.1.6.3 Cristalinidade

Os difratogramas de raios X (DRX) dos indicadores foram obtidos usando um difratômetro de raios X (Rigaku MiniFlex600 DRX, Japão), operando a 40 kV e 15 mA (CuK α 1 λ = 1,54056 Å de radiação). Os espectros foram registrados a 20 °C, entre $2\theta = 2^\circ$ e 90° , a $20^\circ \text{ min}^{-1}$ (VALENCIA et al., 2016).

7.1.6.4 Estrutura química

As características estruturais das amostras de indicadores foram investigadas usando um espectrômetro infravermelho com transformada de Fourier (FTIR, Cary 600, Agilent, EUA) equipado com Refletância Total Atenuada Universal (ATR) na região do infravermelho entre 650 e 4000 cm^{-1} com uma resolução de 4 cm^{-1} e 20 varreduras (CAPELLO et al., 2019).

7.1.6.5 Propriedades térmicas

As transições térmicas dos indicadores foram analisadas por calorimetria de varredura diferencial (Jade-DSC, Perkin Elmer, EUA). Aproximadamente 5 mg de cada indicador foram colocados em uma panela de alumínio hermeticamente selada e depois aquecidos de -30° C a 200° C a uma taxa de $10^\circ \text{ C} \cdot \text{min}^{-1}$ em uma atmosfera inerte ($45 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ N₂ seco). Uma panela vazia foi usada como referência (GAVIRIA et al., 2021).

7.1.6.6 Cor

As imagens da superfície dos indicadores foram capturadas e analisadas usando o software Image J (National Institute Health, Bethesda, MD, EUA) equipado com o plug-in Color Space Converter para converter cores do sistema RGB para a escala CIELab. As medições de cor foram baseadas em coordenadas CIELab, luminosidade (L^*), intensidade de cor verde-vermelha (a^*) e intensidade de cor azul-amarela (b^*) (COELHO LEANDRO et al., 2021).

7.1.6.7 Sensibilidade à amônia

A cinética de resposta dos indicadores (IBH-3 e IBH-5) aos vapores básicos foi avaliada pela sua exposição aos vapores de NH_3 por 15 min. O indicador foi introduzido em um recipiente fechado (placa de Petri com dimensões de 90 mm de diâmetro x 15 mm de altura), e foi adicionado 1 mL de solução aquosa de NH_4OH (10 e 25% v/v) (CHENG et al., 2022a). Imagens dos indicadores foram capturadas a cada 2 min por uma câmera digital (Nikon D5500, Nikon Corporation, Japão), e os valores L^* , a^* e b^* foram medidos usando o software Image J. A mudança de cor (ΔE^*) do indicador controle (sem exposição) e indicador exposto a NH_3 (amostra) foram calculadas através da Eq. (24).

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (24)$$

where: $\Delta L^* = L^*_{\text{control}} - L^*_{\text{sample}}$; $\Delta a^* = a^*_{\text{control}} - a^*_{\text{sample}}$; $\Delta b^* = b^*_{\text{control}} - b^*_{\text{sample}}$.

7.1.7 Análise estatística

A análise experimental foi realizada em triplicata e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. A análise de variância (ANOVA) e o teste de comparações múltiplas de Tukey foram realizados a um nível de significância de 5% utilizando o software Statistic 6.0 (StatSoft Inc., EUA).

7.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES

7.2.1 Espectros UV-visíveis do extrato de jambolão

Para avaliar o frescor dos alimentos utilizando embalagens inteligentes por meio de indicadores naturais, como as antocianinas, uma das propriedades mais importantes é a mudança de cor devido à alteração do pH dos alimentos. Assim, a capacidade de mudança de cor dependente do pH e os espectros UV-vis das ACNs do extrato de jambolão foram avaliados na faixa de pH de 1-12. As cores do extrato

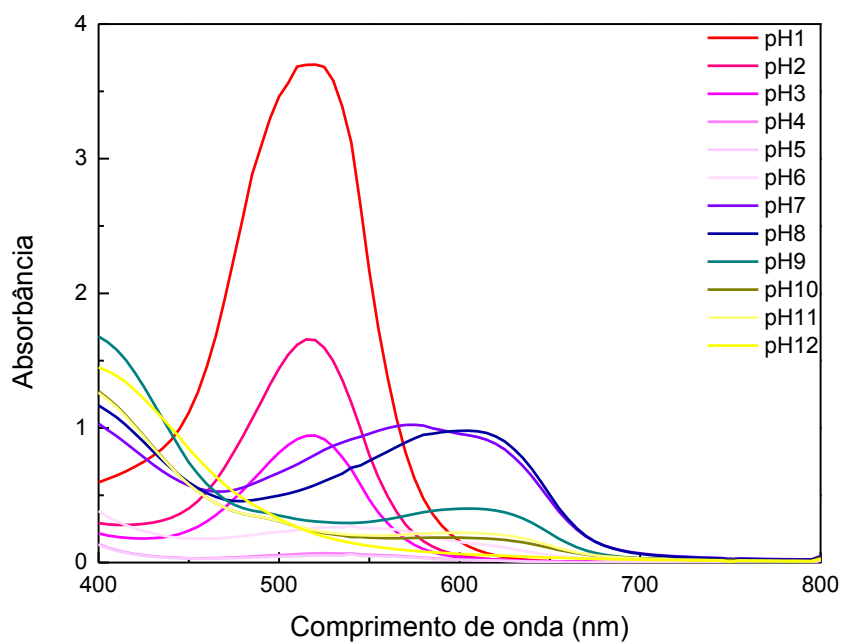
na faixa de pH 1-3 variaram de vermelho a rosa, em pH 4-5 incolor, em pH 6-8 de roxo a azul e em pH 9-12 de verde a amarelo (Figura 30A). A cor e a estrutura química das ACNs são influenciadas pelo pH da solução, assim pode-se observar mudanças de cátion flavílium em pH 1-3 (rosa/vermelho) para pseudobase carbinol em pH 4-5 (incolor), após bases quinoidais (roxo/azul) em pH 6-8 e por fim chalcona (amarelo) em pH 9-12 (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

Ao mesmo tempo, quando o pH da solução tampão foi aumentado de 1 para 12, a banda máxima de absorção UV-vis foi deslocada (de 520 para 600 nm). Conforme mostrado na Figura 30B. Com o aumento do pH de 1 a 3, o pico máximo de absorção (λ_{max}) da solução de ACNs a 520 nm foi significativamente diminuído. Em pH 3, a cor rosa da solução desbotou e em pH 4-6 a absorbância diminuiu acentuadamente. Além disso, o pico máximo de absorção em 600 nm é atribuído a estruturas quinoidais azuis em pH 7-8. Resultados semelhantes foram obtidos para extrato rico em antocianinas do jambolão (SARI et al., 2012).

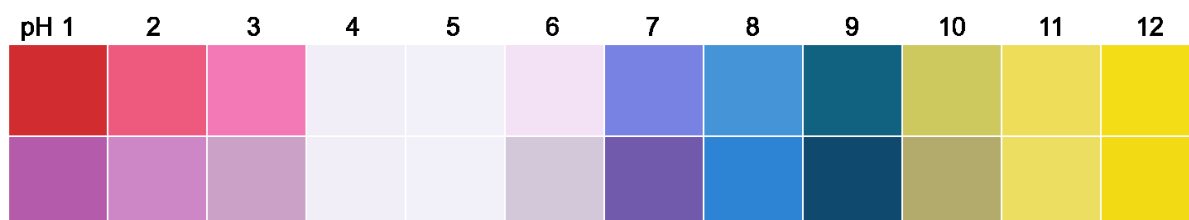
Através destes resultados concluímos que o extrato de jambolão possui propriedades de mudança de cor responsiva ao pH (pH 1-12), confirmando seu potencial como pigmento natural para aplicação em indicadores inteligentes. No entanto, é amplamente conhecido que as ACNs são instáveis, principalmente na presença de luz e calor (LUIZA KOOP et al., 2022). Neste contexto, ACNs do extrato de jambolão foram adsorvidas em montmorilonita para melhorar sua estabilidade, obtendo-se um material BH. O BH apresentou coloração rosa após a secagem, típico de materiais contendo ACNs. Além disso, o BH manteve a capacidade de mudança de cor dependente do pH atribuída as ACNs do extrato de jambolão, como pode ser visto na Figura 30B.

Figura 30 - (A) Espectro UV-vis do extrato de jambolão e (B) variação de cor do extrato e biohíbrido em diferentes soluções tampão (pH 1 a 12).

(A)



(B)



Nota: Figura 30B, parte superior variação de cor do extrato e inferior do biohíbrido. Fonte: Autora (2022).

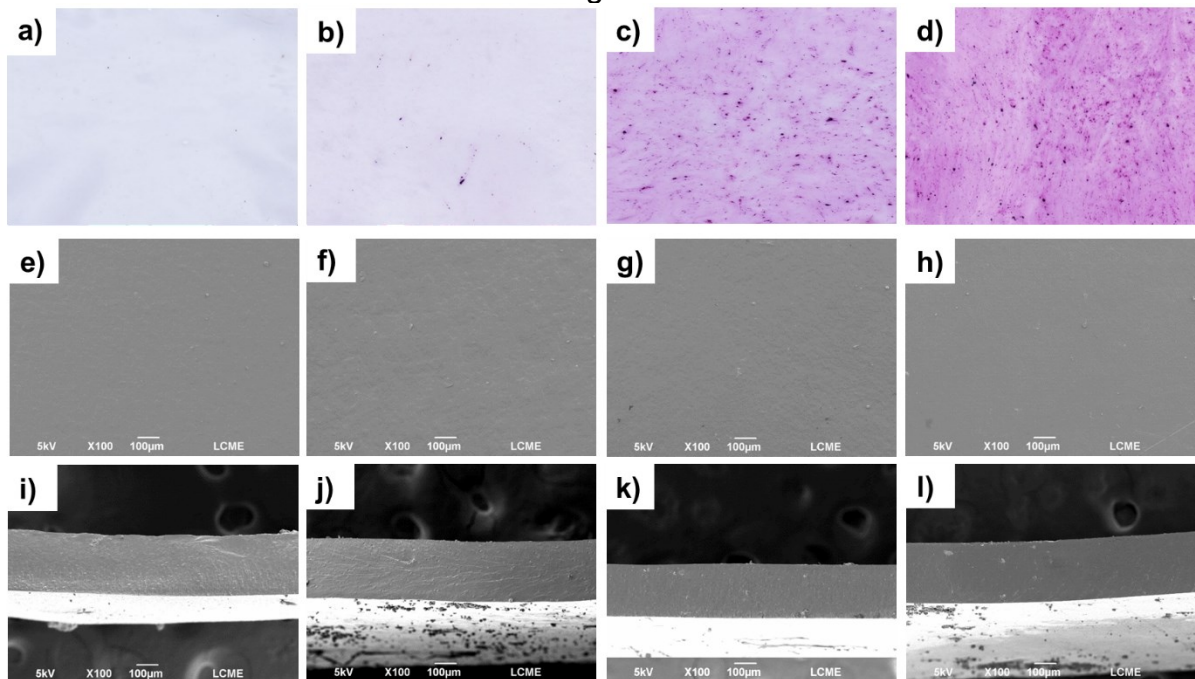
7.2.2 Aspecto visual, espessura e morfologia dos indicadores

As imagens do indicador controle e dos indicadores inteligentes são mostradas na Figura 31. Ambos os indicadores foram fáceis de manusear e facilmente removidos das folhas de mylar após a termocompressão. As imagens da superfície dos indicadores apresentaram ausência de bolhas ou rachaduras (Figura 31e-h). No

entanto, os indicadores inteligentes apresentaram pequenos pontos na superfície, atribuídos as partículas de BH dispersas na matriz (Figura 31c e 31d).

Os valores de espessura dos indicadores apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) com o aumento da concentração de BH (Tabela 26). A espessura do IC foi de 0,260 mm, e para os indicadores inteligentes com BH: 0,248 mm (3% de BH) e 0,246 mm (5% de BH). Esse resultado sugere que a presença de BH reduziu a interação do amido com a água e, conseqüentemente, durante o processo de termocompressão, a água evaporou rapidamente, diminuindo a espessura dos indicadores. Esse comportamento pode ser comprovado devido à redução na intensidade da banda em 3316 cm^{-1} (grupos O-H livres) com a adição de BH (ver Seção 7.2.4), indicando perda de água.

Figura 31 - Aspecto visual e micrografias eletrônicas de varredura dos indicadores inteligentes.



Nota: a-d: aspecto visual dos indicadores; e-h: microestrutura da superfície; i-l: microestrutura da fratura (a, e, i – indicador controle; b, f, j – indicador com 1% de biohíbrido; c, g, k – indicador com 3% de biohíbrido; d, h, l - indicador com 5% de biohíbrido). Fonte: Autora (2022).

As micrografias MEV obtidas das superfícies e seções transversais do IC e dos indicadores contendo BH são mostradas na Figura 31. Pode-se observar que a seção transversal e a superfície (Figura 31 e-l) de todos os indicadores eram homogêneas

sem separação de fases, demonstrando que o BH, amido de mandioca e o glicerol tiveram excelente compatibilidade e foram bem dispersos nos indicadores. A boa compatibilidade entre o amido e o BH pode ser atribuída às ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila (OH) das ACNs e do amido.

Resultados semelhantes foram apresentados por Cheng et al. (2022b), os grupos OH do extrato de antocianinas de repolho roxo e fosfato de amido acetilado formaram ligações de hidrogênio intermoleculares, resultando em indicadores altamente densos e coesos. Gaviria et al. (2021) produziram filmes de amido com adição de pó de laponita e jambolão e apresentam boa dispersão da nanoargila, e compatibilidade entre os componentes.

| Indicadores | Espessura (mm) | Umidade (%) | Solubilidade em água (%) | Ângulo de contato (°) |
|-------------|----------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| IC | 0,260 ± 0,011 ^a | 16,99 ± 0,33 ^a | 26,40 ± 0,44 ^a | 87,72 ± 4,67 ^a |
| IBH-1 | 0,257 ± 0,011 ^a | 17,37 ± 0,47 ^a | 27,75 ± 0,73 ^{a,b} | 80,82 ± 7,76 ^b |
| IBH-3 | 0,248 ± 0,006 ^b | 17,43 ± 0,57 ^a | 29,67 ± 0,17 ^b | 80,35 ± 4,53 ^b |
| IBH-5 | 0,246 ± 0,008 ^b | 16,98 ± 0,22 ^a | 32,69 ± 0,98 ^c | 73,17 ± 5,90 ^c |

Tabela 26 - Espessura, teor de umidade, solubilidade em água e ângulo de contato dos indicadores.

Nota: As médias na mesma coluna seguidas da mesma letra minúscula não são significativamente diferentes ($p > 0,05$). IC: indicador controle; IBH-1: indicador com adição de 1% de biohíbrido; IBH-3: indicador com adição de 3% de biohíbrido e IBH-5: indicador com adição de 5% de biohíbrido.

Fonte: Autora (2022).

7.2.3 Teor de umidade, solubilidade em água e ângulo de contato

O teor de umidade dos indicadores não apresentou diferença significativa com a adição de BH ($p > 0,05$). Assim, ACNs e Mnt não alteraram significativamente a higroscopicidade dos indicadores. Em concordância Capello et al. (2021b) produziram filmes de quitosana contendo biohíbrido e mostraram que o teor médio de umidade dos filmes não se alterou significativamente com o aumento da concentração de biohíbrido. Outros estudos também não mostraram alterações nos valores de umidade quando nanoargilas e extratos de antocianinas foram adicionados a indicadores baseados em biopolímeros (GAVIRIA et al., 2021; VALENCIA et al., 2019).

No entanto, os valores de solubilidade em água aumentaram nos indicadores contendo BH (Tabela 26); isso pode ser devido à interação do amido com a Mnt,

melhorando assim a solubilidade em água dos indicadores, o que é confirmado pela diminuição do ângulo de contato com a água.

O ângulo de contato com a água foi usado como indicador do grau de hidrofiliicidade da superfície do rótulo indicador. Ângulos de contato maiores significam superfícies mais hidrofóbicas ($> 90^\circ$) (LLANOS et al., 2021). Para a IC, o ângulo de contato foi de $87,72^\circ$, que caracteriza uma superfície hidrofílica ($< 90^\circ$). Para o IBH-5 o ângulo de contato com a água diminuiu para $73,17^\circ$. Logo, o ângulo de contato diminuiu com o aumento da concentração de Mnt; esse comportamento pode ser devido à dispersão eficiente dos grupos silicatos hidroxilados (Si-OH), responsáveis pela natureza hidrofílica da Mnt (CYRAS et al., 2008; LLANOS et al., 2021).

Resultados semelhantes foram relatados para indicadores com adição de extratos de antocianinas que tendem a reduzir os valores de ângulo de contato com a água (GAVIRIA et al., 2021; GUTIÉRREZ; ALVAREZ, 2018). Além disso, Romero-Bastida et al. (2016) demonstraram que ao misturar amido e argila adicionados de glicerol, o amido interage com a Mnt, e o glicerol fica livre para interagir com a água, levando a um comportamento mais hidrofílico.

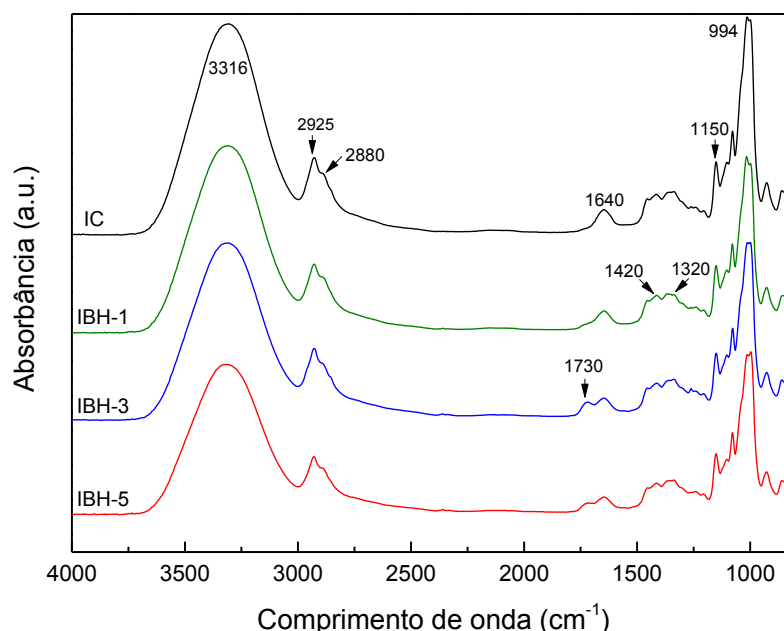
7.2.4 Espectros FTIR dos indicadores

Os espectros FTIR dos indicadores evidenciam várias bandas típicas da estrutura do amido (Figura 32). Os espectros de todos os indicadores mostraram uma ampla banda de absorção entre $3000-3700\text{ cm}^{-1}$ devido à vibração de estiramento de -OH. A banda 3316 cm^{-1} corresponde ao estiramento -OH do amido, glicerol e água do indicador controle, e os picos em 2925 e 2880 cm^{-1} foram relacionados às vibrações de flexão C-H. Além disso, quando o BH foi adicionado, a intensidade dos picos em 2925 cm^{-1} e 2880 cm^{-1} enfraqueceu. Isso pode ser devido à formação de ligações de hidrogênio entre amido, glicerol e BH (CHENG et al., 2022b; QIN et al., 2019).

Além disso, a banda 3316 cm^{-1} diminuiu com o aumento da concentração de BH, sugerindo uma diminuição nos grupos O-H. A absorbância em 1420 e 1320 cm^{-1} para todos os indicadores foi associada às vibrações -OH e -CH nos anéis de amido, respectivamente. O pequeno pico em torno de 1640 cm^{-1} pode ser devido à curvatura

O–H, e as bandas de 994 a 1150 cm^{-1} corresponderam ao anel de piranose característico do resíduo de glicose do amido (GAVIRIA et al., 2021; QIN et al., 2019). Notavelmente, a incorporação do BH não alterou significativamente as posições das bandas do indicador de amido (GAVIRIA et al., 2021). No entanto, uma banda distinta em 1730 cm^{-1} foi observada nos indicadores contendo BH, atribuída aos grupos C=C e C=O para anéis aromáticos das antocianinas (PEREIRA JR.; DE ARRUDA; STEFANI, 2015; SAFITRI et al., 2021). Assim, os resultados comprovam que o BH foi misturado com sucesso no indicador de amido.

Figura 32 - Espectro infravermelho com transformada de Fourier dos indicadores.



Nota: IC: indicador controle; IBH-1: indicador com adição de 1% de biohíbrido (BH); IBH-3: indicador com adição de 3% de biohíbrido; IBH-5: indicador com adição de 5% de biohíbrido.

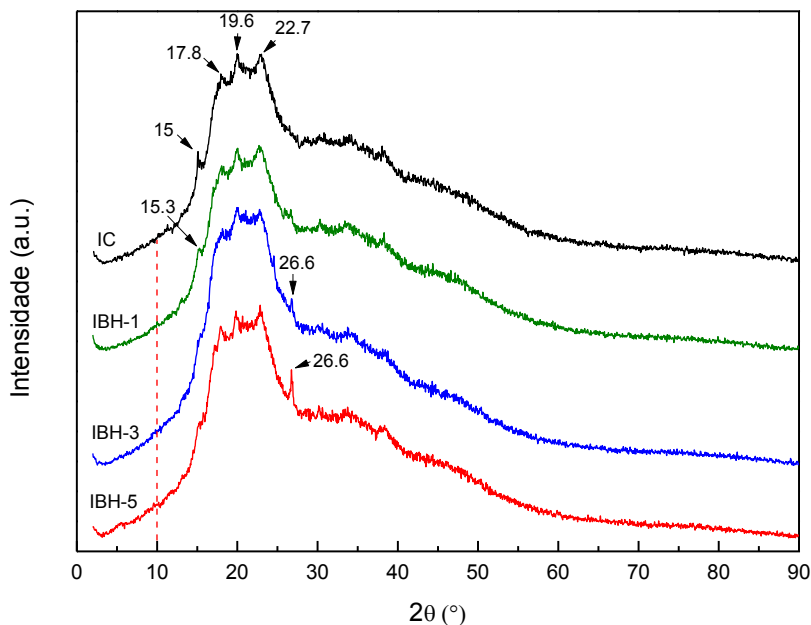
Fonte: Autora (2022).

7.2.5 Análise de difração por raio-X dos indicadores

Todos os indicadores exibiram um difratograma de DRX típico de materiais semicristalinos (Figura 33), que foi alterado pela presença do BH. O IC exibiu um difratograma de DRX típico de materiais de amido de tubérculo com um padrão de difração tipo A, com picos principais em aproximadamente $2\theta \approx 15^\circ$ (5.9 Å), 17.8° (4.98 Å), 19.6° (4.52 Å) e 22.7° (3.91 Å) (CAICEDO CHACON et al., 2019; DOS SANTOS

LIMA et al., 2021). O pico de difração observado a 22,7° também foi associado as interações da ligação de hidrogênio entre amilose-glicerol (GAVIRIA et al., 2021).

Figura 33 - Difratomogramas de raios X dos indicadores.



Nota: IC: indicador controle; IBH-1: indicador com adição de 1% de biohíbrido (BH); IBH-3: indicador com adição de 3% de biohíbrido; IBH-5: indicador com adição de 5% de biohíbrido.

Fonte: Autora (2022).

A presença de BH modificou a estrutura dos indicadores. O pico a 15,3° (5,79 Å) foi deslocado para o IBH-1 e diminuído para o IBH-3 e IBH-5. Além disso, nos indicadores com a adição de BH, um pico em 26,6° (3,35 Å) foi observado com um aumento de intensidade para as concentrações mais altas de Mnt. Não foram observados picos de reflexão em $2\theta < 10^\circ$, indicando que as placas de montmorilonita estavam distantes, de modo que a estrutura dos indicadores pode ser considerada esfoliada (AOUADA; MATTOSO; LONGO, 2011; GUTIÉRREZ; ALVAREZ, 2018).

7.2.6 Propriedades térmicas dos indicadores

Todos os indicadores exibiram termogramas DSC com picos endotérmicos durante a primeira varredura (Figura 34a), típicos de um sistema polimérico semicristalino, associado à fusão dos cristalitos de amido oriundos da amilopectina e

amilose cocristalizadas durante o processo de formação do filme. Além disso, o indicador controle apresentou temperatura de fusão e entalpia de fusão de 87,5 °C (T_m) e 152,1 J g⁻¹ (ΔH), respectivamente. Esses parâmetros térmicos são típicos de filmes à base de amido (GAVIRIA et al., 2021; VALENCIA et al., 2019).

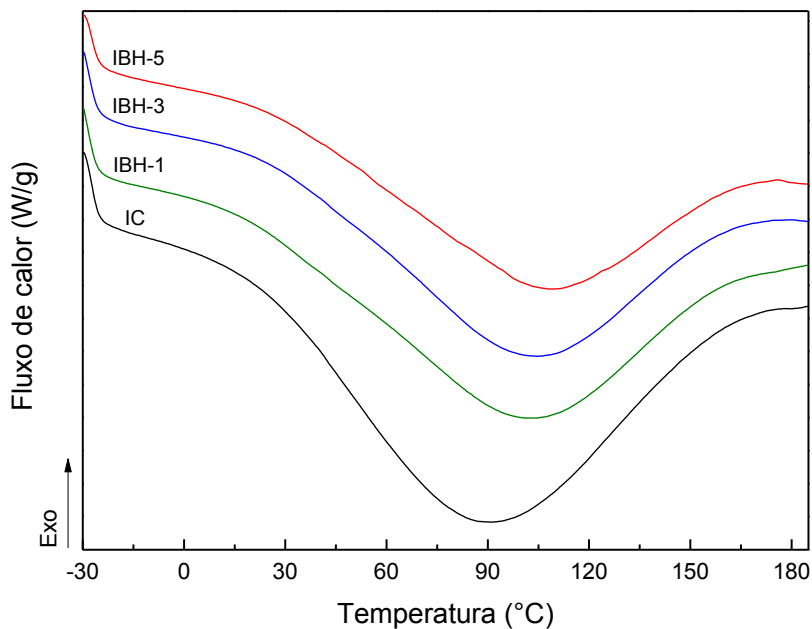
Pode-se observar que a T_m dos indicadores aumentou de 87,5 °C para 105,9 °C quando o teor de BH aumentou de 0 a 5%. A mudança na posição desse pico indica que os teores de Mnt favorecem a formação de domínios cristalinos maiores e diminuem a mobilidade das cadeias poliméricas (AOUADA; MATTOSO; LONGO, 2011). Além disso, o ΔH diminuiu de 152,1 J g⁻¹ (IC) para 95,8 J g⁻¹ (IBH-5) quando a quantidade de Mnt presente nos marcadores aumentou, mostrando que a formação de uma fase amorfa foi favorecida.

Resultados semelhantes foram relatados, em que a mistura de amido e Mnt aumenta a temperatura de decomposição dos filmes, indicando uma melhora em sua estabilidade atribuída às intensas interações entre o amido e a Mnt (AOUADA; MATTOSO; LONGO, 2011; ROMERO-BASTIDA et al., 2016). Por outro lado, Gutiérrez & Alvarez (2018) mostraram que a adição de biohíbrido dentro da matriz de amido termoplástico (TPS) resultou em uma menor resistência térmica em comparação com o filme de TPS puro. Este tipo de comportamento tem sido geralmente associado ao efeito plastificante dos extratos polifenólicos.

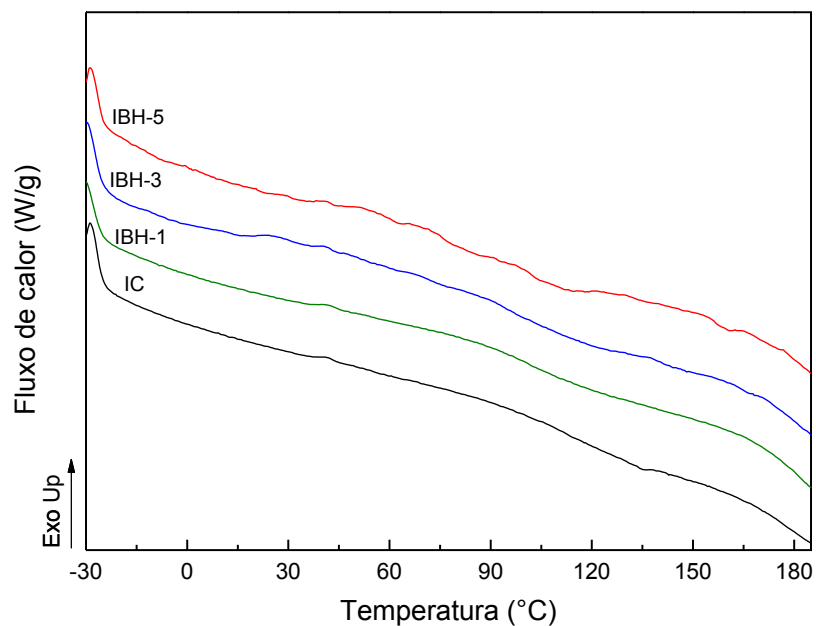
Na segunda varredura, todos os indicadores exibiram curvas DSC típicas para materiais amorfos (VALENCIA et al., 2019). Os termogramas de aquecimento mostram uma transição vítrea (T_g) para o indicador controle a 90 °C que diminuiu para ≈ 86 (IBH-1), 82 (IBH-3) e 77 °C (IBH-5) com a adição de BH (Figura 34b). Da mesma forma, Gaviria et al. (2021) demonstraram uma diminuição da T_g com a adição de laponita em filme de amido.

Figura 34 - Termogramas de calorimetria diferencial de varredura referentes ao primeiro (a) e segundo (b) ciclo de aquecimento dos indicadores inteligentes.

(a)



(b)



Nota: IC: indicador controle; IBH-1: indicador com adição de 1% de biohíbrido (BH); IBH-3: indicador com adição de 3% de biohíbrido; IBH-5: indicador com adição de 5% de biohíbrido.

Fonte: Autora (2022).

7.2.7 Cor dos indicadores

Os parâmetros de cor luminosidade (L^*), vermelhidão/verde (a^*), amarelo/azul (b^*) e mudança de cor (ΔE^*) para os indicadores inteligentes são mostrados na Tabela 27. A incorporação de BH na matriz de amido influenciou significativamente os valores de L^* , a^* , b^* e ΔE^* quando comparados ao IC ($p < 0,05$) (Tabela 27). Valores positivos de a^* indicam que a cor dos indicadores tende ao vermelho, enquanto o parâmetro b^* de todos os indicadores apresentou valor negativo, o que indica tendência à cor azul. O aumento nos valores de a^* dos indicadores com a adição de BH era esperado, devido à presença de ACNs. Em contraste, os valores de b^* diminuíram, indicando que os indicadores apresentaram uma tendência a coloração roxa.

A luminosidade (L^*) dos indicadores diminuiu com uma maior concentração de BH devido à cor se tornar mais intensa. Esses resultados também foram observados por Merz et al. (2020) e Gaviria et al. (2021) para filmes indicadores com ACNs dos frutos de jambolão. Além disso, pode-se observar pelo aspecto visual dos indicadores inteligentes coloração semelhante para os IC e IBH-1 e maior luminosidade (Figura 31 a,b). Portanto, para avaliar a aplicação dos indicadores como sensor de amônia, foram utilizados apenas o IBH-3 e o IBH-5.

Tabela 27 - Parâmetros de cor (L^* , a^* , b^* e ΔE^*) dos indicadores.

| Indicadores | Parâmetros | | | |
|-------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------|
| | L^* | a^* | b^* | ΔE^* |
| IC | 90,23 ± 0,32 ^a | 1,56 ± 0,12 ^a | -7,16 ± 0,13 ^a | 0 |
| IBH-1 | 89,08 ± 2,74 ^b | 3,92 ± 0,61 ^b | -8,73 ± 0,32 ^b | 2,52 ^a |
| IBH-3 | 75,92 ± 1,56 ^c | 22,89 ± 2,14 ^c | -22,48 ± 2,36 ^c | 29,88 ^b |
| IBH-5 | 71,35 ± 1,62 ^d | 34,16 ± 2,54 ^d | -27,21 ± 1,84 ^d | 42,71 ^c |

Nota: As médias na mesma coluna seguidas da mesma letra minúscula não são significativamente diferentes ($p > 0,05$). IC: indicador controle; IBH-1: indicador com adição de 1% de biohíbrido; IBH-3: indicador com adição de 3% de biohíbrido e IBH-5: indicador com adição de 5% de biohíbrido.

Fonte: Autora (2022).

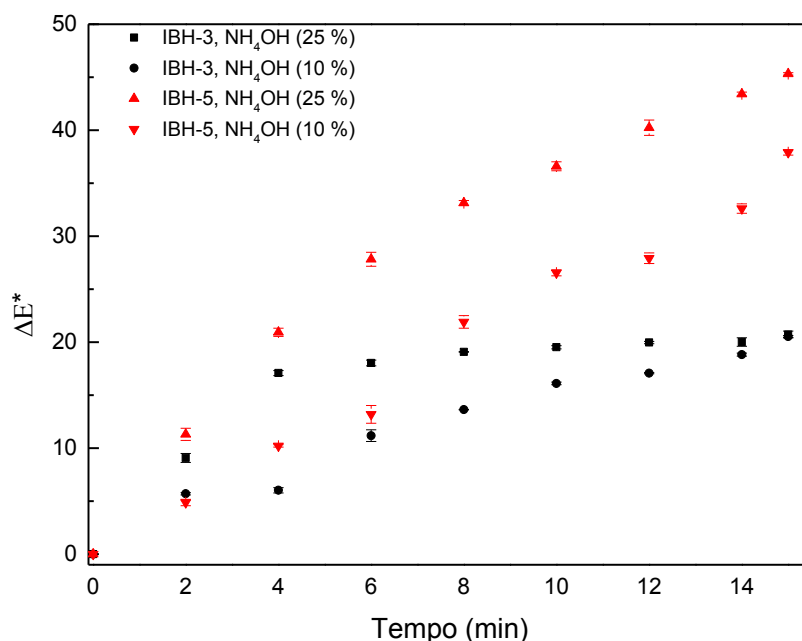
7.2.8 Sensibilidade à amônia

Para verificar a aplicação prática dos indicadores como dispositivo sensor, os indicadores inteligentes foram colocados em uma placa de Petri contendo NH_4OH (10 e 25% v/v). A amônia é usada para simular a deterioração de proteínas de alimentos

de origem animal, liberando gás nitrogênio e, portanto, pode ser usada como um indicador para determinar a deterioração de alimentos. Estudos anteriores examinaram a eficácia do gás de amônia em reagir com ACNs em filmes inteligentes e mudar de cor para determinar o frescor da carne (CHENG et al., 2022b, 2022a; GAVIRIA et al., 2021; HASHIM et al., 2022; MERZ et al., 2020).

De acordo com a Figura 35, os indicadores (IBH-3 e IBH-5) apresentaram mudanças de cor perceptíveis de roxo para azul. A mudança de cor dos indicadores inteligentes é atribuída à amônia volátil combinada com as moléculas de água para gerar íons amônio (NH_4^+) e íons hidróxido (OH^-) criando um ambiente alcalino na superfície do indicador que causa alterações na estrutura e cor das ACNs (CHENG et al., 2022a; HASHIM et al., 2022).

Figura 35 - Mudança de cor dos indicadores inteligentes após exposição a NH_4OH .



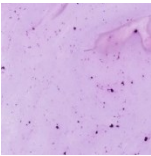
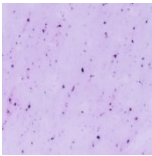
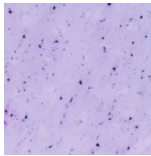
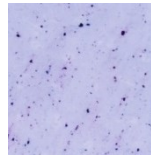
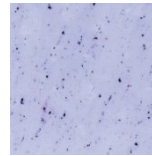
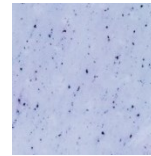
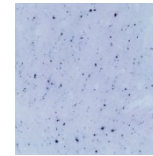
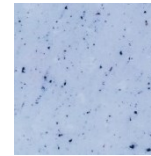
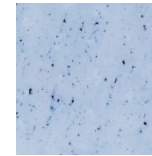
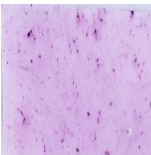
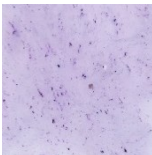
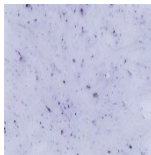
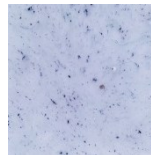
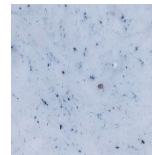
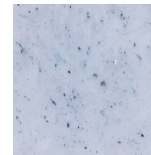

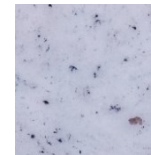
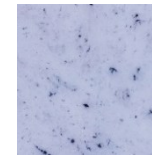
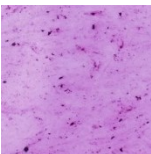
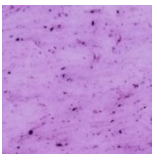
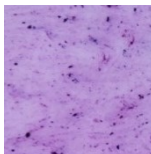
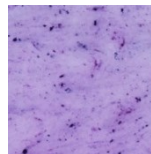
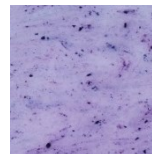
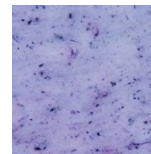
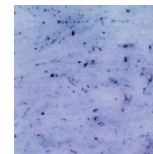
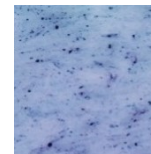
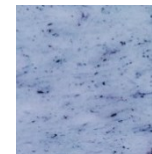
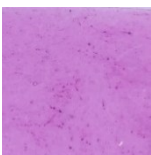
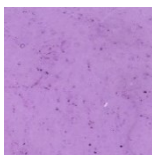
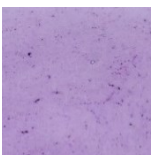
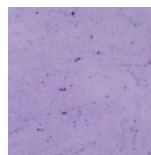
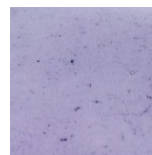


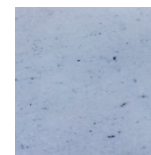

Nota: IBH-3: indicador com adição de 3% de biohíbrido; IBH-5: indicador com adição de 5% de biohíbrido. Fonte: Autora (2022).

O IBH-3 e o IBH-5 apresentaram mudança gradual de roxo para azul aos 15 min (pH básico) para ambas as concentrações de amônia. No entanto, ao comparar as concentrações de amônia, a concentração de 25% apresentou maior capacidade de mudança de cor (Tabela 28), embora a mudança de cor na concentração de 10%

tenha sido comprovada. Além disso, foi possível verificar que a amostra IBH-5 apresentou coloração mais intensa e maior mudança de cor global em relação ao IBH-3. Assim, a mudança de cor do IBH-5 após exposição à amônia pode ser percebida mais facilmente quando comparada ao IBH-3.

A mudança de cor global para ambos os indicadores após exposição à solução de amônia em 2 min foi > 3 , e de acordo com Andretta et al. (2019) essa mudança pode ser percebida pelo olho humano. Além disso, a cor das ACNs em soluções de pH (1-12) (Figura 30B) está correlacionada com a mudança de cor dos indicadores. Portanto, os indicadores desenvolvidos apresentaram sensibilidade à amônia e podem ser aplicados em embalagens inteligentes.

Tabela 28 - Mudança visual de cor dos indicadores inteligentes após exposição a NH_4OH .

| $\text{NH}_4\text{OH}\%$ (v/v) | Tempo (min) | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|-------------|---|---|---|--|---|---|---|---|---|
| | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 | 12 | 14 | 15 | |
| IBH-3 | 10 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| | 25 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| IBH-5 | 10 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| | 25 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

Nota: IBH-3: indicador com adição de 3% de biohíbrido; IBH-5: indicador com adição de 5% de biohíbrido. Fonte: Autora (2022).

7.3 CONCLUSÃO

Na pesquisa atual, foram desenvolvidos indicadores inteligentes por termocompressão utilizando fécula de mandioca, glicerol e pigmento biohíbrido (Mnt/ACNs). O biohíbrido foi obtido pela adsorção das ACNs dos frutos de jambolão em Mnt. ACNs do extrato de jambolão mostraram uma capacidade de mudança de cor dependente do pH visível em pH 1-12, e o BH manteve a característica de cor. Os indicadores produzidos a partir de biohíbrido e amido apresentaram superfície homogênea e cor púrpura preservada após a termocompressão, devido à presença de BH que melhorou a estabilidade térmica dos indicadores. Por fim, os indicadores contendo BH (3 e 5%) demonstraram seu potencial como indicador de cor, uma vez que a cor nesses materiais mudou de roxo para azul quando exposta à solução de amônia, que simula a deterioração dos produtos cárneos. Assim, os indicadores inteligentes desenvolvidos podem monitorar o frescor dos produtos cárneos.

8 CONCLUSÕES FINAS E TRABALHOS FUTUROS

8.1 CONCLUSÕES FINAIS

A extração sólido-líquido da polpa e casca usando água acidificada foi eficiente na recuperação de compostos bioativos dos frutos de jambolão. O extrato apresentou atividade antioxidante por DPPH e ABTS e os compostos bioativos como ácido gálico, catequina e antocianinas (petunidina, malvidina e delphinidina - 3,5-diglicosídeo) foram identificados no extrato.

A montmorilonita foi eficiente na adsorção das antocianinas, onde 93% das ACNs do extrato de jambolão foram recuperadas pela adição de Mnt a 20 °C e pH 1,5. O material BH obtido apresentou coloração rosa estável por 60 dias de armazenamento a 5 e 25 °C.

O extrato de jambolão e o biohíbrido apresentaram atividade anti-inflamatória sob macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS com redução significativa para NOx

e citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF- α e IL-1 β . Os efeitos anti-inflamatórios observados foram associados à composição fenólica do extrato de jambolão.

Balas de gelatina com adição de extrato de jambolão e biohíbrido foram desenvolvidas e apresentaram aparência uniforme e cor atrativa, além de perfil nutricional melhorado com a adição de compostos bioativos do mel e do fruto jambolão. A bioacessibilidade das ACNs e FT para a BEXT após a digestão *in vitro* apresentou redução significativa. Entretanto para a BBH observou-se preservação dos compostos e liberação controlada. Para ambas formulações, frações de compostos permaneceram disponíveis após digestão e podem exercer sua bioatividade.

Os indicadores inteligentes apresentaram superfície homogênea e cor roxa preservada após a termocompressão, devido à presença de BH que melhorou a estabilidade térmica dos indicadores. Por fim, os indicadores contendo BH (3 e 5%) demonstraram seu potencial como indicador de cor, uma vez que a cor nesses materiais mudou de roxo para azul quando exposta à solução de amônia semelhante ao extrato de jambolão.

Por fim o material biohíbrido desenvolvido na presente tese pode ser aplicado como corante de alimentos e como indicador inteligente.

8.2 TRABALHOS FUTUROS

- Identificar e quantificar os compostos bioativos adsorvidos em montmorilonita e os compostos liberados após dessorção,
- Avaliar as propriedades anti-inflamatórias do extrato e biohíbrido *in vivo*,
- Avaliar o armazenamento das balas de gelatina e a degradação dos compostos bioativos,
- Avaliar a aceitação e intenção de compra das balas de gelatina por análise sensorial,
- Identificar e quantificar os compostos bioativos após a digestão *in vitro*,
- Aplicar os indicadores inteligentes no monitoramento da qualidade de produtos cárneos,

- Estudar a mudança de cor dos indicadores correlacionando com o crescimento microbiano e bases nitrogenadas voláteis.

REFERÊNCIAS

ABDIN, M. et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of target anthocyanins di-glucosides isolated from *Syzygium cumini* pulp by high speed counter-current chromatography. **Journal of Food Biochemistry**, v. 44, n. 6, p. 1050–1062, 2020.

AHMAT, A. M.; THIEBAULT, T.; GUÉGAN, R. Phenolic acids interactions with clay minerals: A spotlight on the adsorption mechanisms of Gallic Acid onto montmorillonite. **Applied Clay Science**, v. 180, n. January, p. 105188, 2019.

AL-GHOUTI, M. A.; DA'ANA, D. A. Guidelines for the use and interpretation of adsorption isotherm models: A review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 393, n. January, p. 122383, 2020.

ALBUQUERQUE, B. R. et al. Could fruits be a reliable source of food colorants? Pros and cons of these natural additives. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 0, n. 0, p. 1–31, 2020.

ALIZADEH-SANI, M. et al. pH-responsive color indicator films based on methylcellulose/chitosan nanofiber and barberry anthocyanins for real-time monitoring of meat freshness. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 166, p. 741–750, 2021.

ANDRETTA, R. et al. Development and characterization of pH-indicator films based on cassava starch and blueberry residue by thermocompression. **Food Hydrocolloids**, v. 93, n. February, p. 317–324, 2019.

ANTÓNIA NUNES, M. et al. Valorization of olive pomace by a green integrated approach applying sustainable extraction and membrane-assisted concentration. **Science of the Total Environment**, v. 652, p. 40–47, 2019.

AOAC. **Association of Official Analytical Chemistry**. 18. ed. Washington: Official Methods of Analysis, 2005.

AOUADA, F. A.; MATTOSO, L. H. C.; LONGO, E. New strategies in the preparation of exfoliated thermoplastic starch-montmorillonite nanocomposites. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 3, p. 1502–1508, 2011.

AREND, G. D. et al. Concentration of phenolic compounds from strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch) juice by nanofiltration membrane. **Journal of Food Engineering**, v. 201, p. 36–41, 2017.

AREND, G. D. et al. Gravitational and microwave-assisted multi-stages block freeze concentration process to obtain enriched concentrated beet (*Beta vulgaris* L.)

by-products extract: bioactive compounds and simulated gastrointestinal profile. **Food and Bioproducts Processing**, v. 133, p. 77–86, 2022.

ASLAM, A. et al. Studying the influence of packaging materials and storage on the physiochemical and microbial characteristics of black plum (*Syzygium cumini*) jam. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 43, n. 5, p. 1–11, 2019.

AWAD, A. M. et al. Adsorption of organic pollutants by natural and modified clays: A comprehensive review. **Separation and Purification Technology**, v. 228, n. June, p. 115719, 2019.

BALOOCH, M. et al. Intercalation technique can turn pomegranate industrial waste into a valuable by-product. **LWT - Food Science and Technology**, v. 98, n. June, p. 99–105, 2018.

BARROS, H. D. F. Q. et al. Influence of different types of acids and pH in the recovery of bioactive compounds in Jaboticaba peel (*Plinia cauliflora*). **Food Research International**, 2019.

BHATTACHARJEE, C.; SAXENA, V. K.; DUTTA, S. Fruit juice processing using membrane technology: A review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 43, n. July, p. 136–153, 2017.

BILUCA, F. C. et al. Investigation of phenolic compounds, antioxidant and anti-inflammatory activities in stingless bee honey (*Meliponinae*). **Food Research International**, v. 129, n. October 2019, p. 108756, 2020.

BLACKHALL, M. L. et al. Optimized extraction of anthocyanins from Reid Fruits' *Prunus avium* 'Lapins' cherries. **Food Chemistry**, v. 256, n. February, p. 280–285, 2018.

BRAGA, A. R. C. et al. Bioavailability of anthocyanins: Gaps in knowledge, challenges and future research. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 68, n. July 2017, p. 31–40, 2018.

BRANCO, I. G. et al. Influence of pasteurization on antioxidant and in vitro anti-proliferative effects of jambolan (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) fruit pulp. **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 225–230, 2016.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, p. 25–30, 1995.

BRANDÃO LIMA, L. C. et al. Saponite-anthocyanin pigments: Slipping between the sheets. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 300, n. February, 2020.

BRODKORB, A. et al. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. **Nature Protocols**, v. 14, n. 4, p. 991–1014, 2019.

CAICEDO CHACON, W. D. et al. Mathematical Models for Prediction of Water

Evaporation and Thermal Degradation Kinetics of Potato Starch Nanoparticles Obtained by Nanoprecipitation. **Starch/Staerke**, v. 71, n. 1–2, p. 1–7, 2019.

CANO-LAMADRID, M. et al. Quality Parameters and Consumer Acceptance of Jelly Candies Based on Pomegranate Juice “Mollar de Elche”. **Foods**, v. 9, n. 516, p. 1–17, 2020.

CAPELLO, C. et al. Adsorption and desorption of eggplant peel anthocyanins on a synthetic layered silicate. **Journal of Food Engineering**, v. 262, n. June, p. 162–169, 2019.

CAPELLO, C. et al. Preparation and Characterization of Colorimetric Indicator Films Based on Chitosan/Polyvinyl Alcohol and Anthocyanins from Agri-Food Wastes. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 29, n. 5, p. 1616–1629, 2021.

CÁRDENAS-PÉREZ, S. et al. Evaluation of the ripening stages of apple (Golden Delicious) by means of computer vision system. **Biosystems Engineering**, v. 159, p. 46–58, 2017.

CASAS-FORERO, N. et al. Effects of cryoconcentrate blueberry juice incorporation on gelatin gel: A rheological, textural and bioactive properties study. **LWT - Food Science and Technology**, v. 138, n. November 2020, p. 110674, 2021.

CASTAÑEDA-OVANDO, A. et al. Chemical studies of anthocyanins: A review. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 859–871, 2009.

CASTRO-MUÑOZ, R.; FÍLA, V. Membrane-based technologies as an emerging tool for separating high-added-value compounds from natural products. **Trends in Food Science and Technology**, v. 82, n. September, p. 8–20, 2018.

CAVALCANTI, R. N.; SANTOS, D. T.; MEIRELES, M. A. A. Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems-An overview. **Food Research International**, v. 44, n. 2, p. 499–509, 2011.

CELLI, G. B.; TAN, C.; SELIG, M. J. **Anthocyanidins and anthocyanins**. [s.l.] Elsevier, 2018.

CHAN, C. et al. Incompatibility of chemical protein synthesis inhibitors with accurate measurement of extended protein degradation rates. **Pharmacology Research and Perspectives**, v. 5, n. 5, p. 1–12, 2017.

CHANG, S. K.; ALASALVAR, C.; SHAHIDI, F. Superfruits: Phytochemicals, antioxidant efficacies, and health effects—A comprehensive review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 10, p. 1580–1604, 2019.

CHAUDHARY, B.; MUKHOPADHYAY, K. Solvent optimization for anthocyanin extraction from *Syzygium cumini* L. Skeels using response surface methodology. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 64, n. 3, p. 363–371, 2013.

CHEN, Y. et al. Adsorption properties of macroporous adsorbent resins for separation of anthocyanins from mulberry. **Food Chemistry**, v. 194, p. 712–722,

2016a.

CHEN, Y. et al. Adsorption properties of macroporous adsorbent resins for separation of anthocyanins from mulberry. **Food Chemistry**, v. 194, p. 712–722, 2016b.

CHEN, Z. et al. Physicochemical characterization of tight nanofiltration membranes for dairy wastewater treatment. **Journal of Membrane Science**, v. 547, p. 51–63, 2018.

CHENG, M. et al. Effect of dual-modified cassava starches on intelligent packaging films containing red cabbage extracts. **Food Hydrocolloids**, v. 124, n. PA, p. 107225, 2022a.

CHENG, M. et al. An eco-friendly film of pH-responsive indicators for smart packaging. **Journal of Food Engineering**, v. 321, n. October 2021, p. 110943, 2022b.

ÇOBAN, B. et al. Utilization of the barberry extract in the confectionery products. **LWT - Food Science and Technology**, v. 145, n. December 2020, 2021.

COCK, I. A. N. E.; CHEESMAN, M. PLANTS OF THE GENUS SYZYGIVM (MYRTACEAE): A REVIEW ON ETHNOBOTANY, MEDICINAL PROPERTIES AND PHYTOCHEMISTRY. In: **Bioactive Compounds of Medicinal Plants**. [s.l: s.n.]. p. 35–84.

COELHO, E. M. et al. Phenolic Profile, Organic Acids and Antioxidant Activity of Frozen Pulp and Juice of the Jambolan (*Syzygium Cumini*). **Journal of Food Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 211–219, 2016.

COELHO LEANDRO, G. et al. Adsorption-desorption of anthocyanins from jambolan (*Syzygium cumini*) fruit in Iaponite® platelets: Kinetic models, physicochemical characterization, and functional properties of biohybrids. **Food Research International**, v. 140, n. March 2020, 2021.

CYRAS, V. P. et al. Physical and mechanical properties of thermoplastic starch/montmorillonite nanocomposite films. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, n. 1, p. 55–63, 2008.

DA SILVA, W. P. et al. Description of jambolan (*Syzygium cumini* (L.)) anthocyanin extraction kinetics at different stirring frequencies of the medium using diffusion models. **Heat and Mass Transfer/Waerme- und Stoffuebertragung**, v. 54, n. 11, p. 3275–3285, 2018.

DE CARVALHO, T. I. M. et al. Dehydration of jambolan [*Syzygium cumini* (L.)] juice during foam mat drying: Quantitative and qualitative changes of the phenolic compounds. **Food Research International**, v. 102, p. 32–42, 2017.

DE PAULO FARIAS, D. et al. A critical review of some fruit trees from the Myrtaceae family as promising sources for food applications with functional claims. **Food Chemistry**, v. 306, n. September 2019, p. 125630, 2020.

DE PAULO FARIAS, D. et al. Effect of in vitro digestion on the bioaccessibility and bioactivity of phenolic compounds in fractions of *Eugenia pyriformis* fruit. **Food Research International**, v. 150, n. September, 2021.

DE SANTANA MAGALHÃES, F. et al. Recovery of phenolic compounds from pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) fruit extract by membrane filtrations: Comparison of direct and sequential processes. **Journal of Food Engineering**, v. 257, n. October 2018, p. 26–33, 2019.

DE SOUSA SABINO, L. B.; DE BRITO, E. S.; DA SILVA JÚNIOR, I. J. Jambolan— *Syzygium jambolanum*. In: **Exotic Fruits**. [s.l: s.n.]. p. 251–256.

DIRSCH, V. M.; STUPPNER, H.; VOLLMAR, A. M. The griess assay: Suitable for a bio-guided fractionation of anti-inflammatory plant extracts? **Planta Medica**, v. 64, n. 5, p. 423–426, 1998.

DO CARMO BRITO, B. DE N. et al. Anthocyanins of Jambolão (*Syzygium cumini*): Extraction and pH-Dependent Color Changes. **Journal of Food Science**, v. 82, n. 10, p. 2286–2290, 2017.

DOS SANTOS LIMA, K. T. et al. Physicochemical Properties of Modified Starches Obtained by Anti-Solvent Precipitation Containing Anthocyanins from Jambolan (*Syzygium cumini*) Fruit. **Starch/Staerke**, v. 2000221, p. 1–10, 2021.

DUARTE, L. J. et al. Molecular mechanism of action of Pelargonidin-3-O-glucoside, the main anthocyanin responsible for the anti-inflammatory effect of strawberry fruits. **Food Chemistry**, v. 247, n. October 2017, p. 56–65, 2018.

ERGUN, R.; LIETHA, R.; HARTEL, R. W. Moisture and shelf life in sugar confections. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 50, n. 2, p. 162–192, 2010.

ESMAEILI, M. et al. Vanillin as an Antifouling and Hydrophilicity Promoter Agent in Surface Modification of Polyethersulfone Membrane. **Membranes**, v. 9, n. 4, p. 56, 2019.

ESPÍN, J. C.; GONZÁLEZ-SARRÍAS, A.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. The gut microbiota: A key factor in the therapeutic effects of (poly)phenols. **Biochemical Pharmacology**, v. 139, p. 82–93, 2017.

FACCHIN, B. M. et al. Inflammatory biomarkers on an LPS-induced RAW 264.7 cell model: a systematic review and meta-analysis. **Inflammation Research**, n. 0123456789, 2022.

FARIA, A. F.; MARQUES, M. C.; MERCADANTE, A. Z. Identification of bioactive compounds from jambolão (*Syzygium cumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions. **Food Chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1571–1578, 2011.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; CARVAJAL-LÉRIDA, I.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. In

vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. **Nutrition Research**, v. 29, n. 11, p. 751–760, 2009.

FERRUA, M. J.; SINGH, R. P. Modeling the fluid dynamics in a human stomach to gain insight of food digestion. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 7, p. 151–162, 2010.

FONSECA, J. DE M. et al. Hydroxypropyl methylcellulose-TiO₂ and gelatin-TiO₂ nanocomposite films: Physicochemical and structural properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 151, p. 944–956, 2020.

FREITAS-SÁ, D. D. G. C. et al. Effect of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell) O. Berg) and jamelão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) peel powders as colorants on color-flavor congruence and acceptability of yogurts. **LWT - Food Science and Technology**, v. 96, n. May, p. 215–221, 2018.

FULLERTON, J. N.; GILROY, D. W. Resolution of inflammation: A new therapeutic frontier. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 8, p. 551–567, 2016.

GASPARRINI, M. et al. The efficacy of berries against lipopolysaccharide-induced inflammation: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 117, n. January, p. 74–91, 2021.

GAVIRIA, Y. A. R. et al. Nanostructured pH-Indicator Films Based on Cassava Starch, Laponite, and Jambolan (*Syzygium cumini*) Fruit Manufactured by Thermo-Compression. **Starch/Stärke**, v. 2000208, p. 1–11, 2021.

GHALAMI CHOOBAR, B. et al. Fouling mechanism identification and analysis in microfiltration of laundry wastewater. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, 2019.

GHOSH, P. et al. Quantification and Concentration of Anthocyanidin from Indian Blackberry (Jamun) by Combination of Ultra- and Nano-filtrations. **Food and Bioprocess Technology**, v. 11, n. 12, p. 2194–2203, 2018.

GIUSTI, M.; WROLSTAD, R. E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-visible Spectroscopy. **Handbook of Food Analytical Chemistry**, v. 2–2, p. 19–31, 2001.

GONÇALVES, A. C. et al. Dietary Effects of Anthocyanins in Human Health: A Comprehensive Review. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 7, p. 690, 2021.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982.

GUNATHILAKE, K. D. P. P. **Emerging technologies available for the enhancement of bioactives concentration in functional beverages**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.

GUNES, R. et al. Soft Confectionery Products: Quality Parameters, Interactions with Processing and Ingredients. **Food Chemistry**, v. 385, n. February, p.

132735, 2022.

GUTIÉRREZ, T. J.; ALVAREZ, V. A. Bionanocomposite films developed from corn starch and natural and modified nano-clays with or without added blueberry extract. **Food Hydrocolloids**, v. 77, p. 407–420, 2018.

GUTIÉRREZ, T. J.; PONCE, A. G.; ALVAREZ, V. A. Nano-clays from natural and modified montmorillonite with and without added blueberry extract for active and intelligent food nanopackaging materials. **Materials Chemistry and Physics**, v. 194, p. 283–292, 2017.

HAO, Y. et al. Stability and mechanism of phenolic compounds from raspberry extract under in vitro gastrointestinal digestion. **LWT - Food Science and Technology**, v. 139, n. 3, p. 110552, 2021.

HAQUE, R. et al. Antimicrobial Activity of Jambul (&i>Syzygium cumini&/i>) Fruit Extract on Enteric Pathogenic Bacteria. **Advances in Microbiology**, v. 07, n. 03, p. 195–204, 2017.

HASHIM, S. B. H. et al. Intelligent colorimetric pH sensing packaging films based on sugarcane wax/agar integrated with butterfly pea flower extract for optical tracking of shrimp freshness. **Food Chemistry**, v. 373, n. PB, p. 131514, 2022.

HE, J.; GIUSTI, M. M. Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 1, n. 1, p. 163–187, 2010.

HUANG, R. et al. Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies of adsorption of Cd(II) from aqueous solution onto HACC-bentonite. **Desalination**, v. 280, n. 1–3, p. 297–304, 2011.

INADA, K. O. P. et al. Bioaccessibility of phenolic compounds of jaboticaba (*Plinia jaboticaba*) peel and seed after simulated gastrointestinal digestion and gut microbiota fermentation. **Journal of Functional Foods**, v. 67, n. November 2019, p. 103851, 2020.

IOANNOU, I. et al. Review of the effects of food processing and formulation on flavonol and anthocyanin behaviour. **Journal of Food Engineering**, v. 111, n. 2, p. 208–217, 2012.

JAMPANI, C.; NAIK, A.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Purification of anthocyanins from jamun (*Syzygium cumini* L.) employing adsorption. **Separation and Purification Technology**, v. 125, p. 170–178, 2014.

JAYRAJSINH, S. et al. Montmorillonite nanoclay as a multifaceted drug-delivery carrier: A review. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 39, p. 200–209, 2017.

JOSEPH, S. V; EDIRISINGHE, I.; BURTON-FREEMAN, B. M. Berries: Anti-inflammatory Effects in Humans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62,

n. 18, p. 3886–3903, 7 maio 2014.

KELLY, N. P.; KELLY, A. L.; O'MAHONY, J. A. Strategies for enrichment and purification of polyphenols from fruit-based materials. **Trends in Food Science and Technology**, v. 83, n. October 2018, p. 248–258, 2019.

KHOO, H. E. et al. Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. **Food and Nutrition Research**, v. 61, n. 1, 2017.

KIM, D. O. et al. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 13, p. 3713–3717, 2002.

KOHNO, Y. et al. Stabilization of natural anthocyanin by intercalation into montmorillonite. **Applied Clay Science**, v. 42, n. 3–4, p. 519–523, 2009.

KOOP, B. L. et al. Bioactive Compounds from Jambolan (*Syzygium cumini* (L .)) Extract Concentrated by Ultra- and Nanofiltration : a Potential Natural Antioxidant for Food. **Plant Foods for Human Nutrition**, 2021.

KOOSHA, M.; HAMED, S. Intelligent Chitosan/PVA nanocomposite films containing black carrot anthocyanin and bentonite nanoclays with improved mechanical, thermal and antibacterial properties. **Progress in Organic Coatings**, v. 127, n. November 2018, p. 338–347, 2019a.

KOOSHA, M.; HAMED, S. Intelligent Chitosan/PVA nanocomposite films containing black carrot anthocyanin and bentonite nanoclays with improved mechanical, thermal and antibacterial properties. **Progress in Organic Coatings**, v. 127, n. December 2018, p. 338–347, 2019b.

LESTARIO, L. N. et al. Changes in polyphenolics during maturation of Java plum (*Syzygium cumini* Lam.). **Food Research International**, 2017.

LI, C. et al. Current in vitro digestion systems for understanding food digestion in human upper gastrointestinal tract. **Trends in Food Science and Technology**, v. 96, n. June 2019, p. 114–126, 2020.

LI, S. et al. A comparative study on color stability of anthocyanin hybrid pigments derived from 1D and 2D clay minerals. **Materials**, v. 12, n. 20, p. 1–14, 2019a.

LI, S. et al. Acid/base reversible allochromic anthocyanin/palygorskite hybrid pigments: Preparation, stability and potential applications. **Dyes and Pigments**, v. 171, n. May, p. 107738, 2019b.

LI, T. et al. Design and preparation acid-activated montmorillonite sustained-release drug delivery system for dexibuprofen in vitro and in vivo evaluations. **Applied Clay Science**, v. 163, n. July, p. 178–185, 2018.

LIMA, L. C. B. et al. Saponite-anthocyanin derivatives: The role of organoclays

in pigment photostability. **Applied Clay Science**, v. 191, n. April, p. 105604, 2020.

LLANOS, J. H. R. et al. Increase in the physical performance of nanostructured starch/chitosan blends with montmorillonite. **Colloid and Polymer Science**, v. 299, n. 12, p. 1901–1915, 2021.

LUCAS-GONZÁLEZ, R. et al. In vitro digestion models suitable for foods: Opportunities for new fields of application and challenges. **Food Research International**, v. 107, n. February, p. 423–436, 2018.

LUIZA KOOP, B. et al. Flavonoids, anthocyanins, betalains, curcumin, and carotenoids: sources, classification and enhanced stabilization by encapsulation and adsorption. **Food Research International**, v. 153, n. January, p. 110929, 2022.

MACHADO, J. P. E.; DE FREITAS, R. A.; WYPYCH, F. Layered clay minerals, synthetic layered double hydroxides and hydroxide salts applied as pickering emulsifiers. **Applied Clay Science**, v. 169, n. December 2018, p. 10–20, 2019.

MACHADO, M. T. C.; MELLO, B. C. B. S.; HUBINGER, M. D. Evaluation of pequi (*Caryocar Brasiliense* Camb.) aqueous extract quality processed by membranes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 95, p. 304–312, 2015.

MANZOOR, M. et al. Valorization of natural colors as health-promoting bioactive compounds: Phytochemical profile, extraction techniques, and pharmacological perspectives. **Food Chemistry**, v. 362, n. May, p. 130141, 2021.

MARAN, J. P. et al. Extraction of natural anthocyanin and colors from pulp of jamun fruit. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 6, p. 3617–3626, 2015.

MARAN, J. P.; PRIYA, B.; MANIKANDAN, S. Modeling and optimization of supercritical fluid extraction of anthocyanin and phenolic compounds from *Syzygium cumini* fruit pulp. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 9, p. 1938–1946, 2014.

MARQUES PEIXOTO, F. et al. Simulation of in vitro digestion coupled to gastric and intestinal transport models to estimate absorption of anthocyanins from peel powder of jaboticaba, jamelão and jambo fruits. **Journal of Functional Foods**, v. 24, p. 373–381, 2016.

MARTÍN, J.; DÍAZ-MONTAÑA, E. J.; ASUERO, A. G. Recovery of Anthocyanins Using Membrane Technologies: A Review. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 143–175, 2018.

MASSARO, M. et al. The use of some clay minerals as natural resources for drug carrier applications. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 9, n. 4, p. 1–22, 2018.

MCDUGALL, G. J. et al. Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an in vitro digestion system. **Journal of Agricultural and Food**

Chemistry, v. 53, n. 15, p. 5896–5904, 2005.

MENDONÇA, F. G. et al. Use of montmorillonite to recover carboxylic acids from aqueous medium. **Separation and Purification Technology**, v. 229, n. November 2018, p. 115751, 2019.

MERZ, B. et al. A novel colorimetric indicator film based on chitosan, polyvinyl alcohol and anthocyanins from jambolan (*Syzygium cumini*) fruit for monitoring shrimp freshness. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 153, p. 625–632, 2020.

MINEKUS, M. et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. **Food and Function**, v. 5, n. 6, p. 1113–1124, 2014.

MIRANDA, J. S. et al. Probiotic jelly candies enriched with native Atlantic Forest fruits and *Bacillus coagulans* GBI-30 6086. **LWT - Food Science and Technology**, v. 126, n. December 2019, p. 109275, 2020.

MORAES, J. D. D. et al. Clay minerals: Properties and applications to dermocosmetic products and perspectives of natural raw materials for therapeutic purposes—A review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 534, n. 1–2, p. 213–219, 2017.

MUTLU, C.; TONTUL, S. A.; ERBAŞ, M. Production of a minimally processed jelly candy for children using honey instead of sugar. **LWT - Food Science and Technology**, v. 93, n. March, p. 499–505, 2018.

NAZIR, A. et al. Membrane separation technology for the recovery of nutraceuticals from food industrial streams. **Trends in Food Science and Technology**, v. 86, p. 426–438, 2019.

NGULUBE, T. et al. An update on synthetic dyes adsorption onto clay based minerals: A state-of-art review. **Journal of Environmental Management**, v. 191, p. 35–57, 2017.

OGAWA, M. et al. Bio-geo hybrid pigment; clay-anthocyanin complex which changes color depending on the atmosphere. **Dyes and Pigments**, v. 139, p. 561–565, 2017.

PANGHAL, A. et al. Nutritional, phytochemical, functional and sensorial attributes of *Syzygium cumini* L. pulp incorporated pasta. **Food Chemistry**, v. 289, p. 723–728, 2019.

PARK, J. H. et al. Application of montmorillonite in bentonite as a pharmaceutical excipient in drug delivery systems. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 46, n. 4, p. 363–375, 2016.

PEANPARKDEE, M.; BOROMPICHAICHARTKUL, C.; IWAMOTO, S. Bioaccessibility and antioxidant activity of phenolic acids, flavonoids, and anthocyanins of encapsulated Thai rice bran extracts during in vitro gastrointestinal digestion. **Food**

Chemistry, v. 361, n. January, p. 130161, 2021.

PEREIRA, G. C. A. et al. Jambolão extracts as synthetic additive substitutes in fresh chicken sausage during cold storage. **International Food Research Journal**, v. 26, n. 3, p. 811–817, 2019.

PEREIRA JR., V. A.; DE ARRUDA, I. N. Q.; STEFANI, R. Active chitosan/PVA films with anthocyanins from *Brassica oleraceae* (Red Cabbage) as Time-Temperature Indicators for application in intelligent food packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 180–188, 2015.

PILATTI-RICCIO, D. et al. Impact of the use of saccharides in the encapsulation of *Ilex paraguariensis* extract. **Food Research International**, v. 125, 2019.

PINTO, L. et al. Biopolymer hybrid materials: Development, characterization, and food packaging applications. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 28, n. January, p. 100676, 2021.

PIRES, J. R. A.; DE SOUZA, V. G. L.; FERNANDO, A. L. Chitosan/montmorillonite bionanocomposites incorporated with rosemary and ginger essential oil as packaging for fresh poultry meat. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 17, p. 142–149, 2018.

PRÄBST, K. et al. Chapter 2 of Cell Viability Assays. **Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin**, v. 1601, p. 1–17, 2017.

QAMAR, M. et al. Phytochemical Profile, Biological Properties, and Food Applications of the Medicinal Plant *Syzygium cumini*. **Foods**, v. 11, n. 3, p. 1–21, 2022.

QIN, Y. et al. Preparation and characterization of active and intelligent packaging films based on cassava starch and anthocyanins from *Lycium ruthenicum* Murr. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 134, p. 80–90, 2019.

QUATRIN, A. et al. Bioaccessibility and catabolism of phenolic compounds from jaborcaba (*Myrciaria trunciflora*) fruit peel during in vitro gastrointestinal digestion and colonic fermentation. **Journal of Functional Foods**, v. 65, n. July 2019, 2020.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p. 1231–1237, 1999.

RIBEIRO, H. L. et al. Montmorillonite as a reinforcement and color stabilizer of gelatin films containing acerola juice. **Applied Clay Science**, v. 165, n. July, p. 1–7, 2018a.

RIBEIRO, H. L. et al. Stabilizing effect of montmorillonite on acerola juice anthocyanins. **Food Chemistry**, v. 245, n. November 2017, p. 966–973, 2018b.

RIVERO, R. et al. Development and characterization of two gelatin candies with alternative sweeteners and fruit bioactive compounds. **LWT - Food Science and Technology**, v. 141, n. January, p. 110894, 2021.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Update on natural food pigments - A mini-review on carotenoids, anthocyanins, and betalains. **Food Research International**, v. 124, n. May 2018, p. 200–205, 2019.

ROMERO-BASTIDA, C. A. et al. Effect of amylose content and nanoclay incorporation order in physicochemical properties of starch/montmorillonite composites. **Carbohydrate Polymers**, v. 152, p. 351–360, 2016.

RUTAKHLI, A.; SABAHI, H.; RIAZI, G. H. Nanocomposite of montmorillonite/nettle extract: A potential ingredient for functional foods development. **Journal of Functional Foods**, v. 57, n. January, p. 166–172, 2019.

SAFITRI, E. et al. Optical pH sensor based on immobilization anthocyanin from *dioscorea alata* L. Onto polyelectrolyte complex pectin–chitosan membrane for a determination method of salivary pH. **Polymers**, v. 13, n. 8, 2021.

SANTANA ANDRADE, J. K. et al. Bioaccessibility of bioactive compounds after in vitro gastrointestinal digestion and probiotics fermentation of Brazilian fruits residues with antioxidant and antidiabetic potential. **LWT - Food Science and Technology**, v. 153, n. October 2020, 2022.

SANTOS-BUELGA, C.; GONZÁLES-PARAMÁS, A. M. Anthocyanins. In: **Reference Module in Food Science**. [s.l: s.n.]. p. 1–12.

SARI, P. et al. Colour properties, stability, and free radical scavenging activity of jambolan (*Syzygium cumini*) fruit anthocyanins in a beverage model system: Natural and copigmented anthocyanins. **Food Chemistry**, v. 132, n. 4, p. 1908–1914, 2012.

SCHOONHEYDT, R. A.; JOHNSTON, C. T.; BERGAYA, F. Clay minerals and their surfaces. **Developments in Clay Science**, v. 9, p. 1–21, 2018.

SERAGLIO, S. K. T. et al. Nutritional and bioactive potential of Myrtaceae fruits during ripening. **Food Chemistry**, v. 239, p. 649–656, 2018.

SHIONO, T. et al. Selective decaffeination of tea extracts by montmorillonite. **Journal of Food Engineering**, v. 200, p. 13–21, 2017a.

SHIONO, T. et al. Caffeine adsorption of montmorillonite in coffee extracts. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 81, n. 8, p. 1591–1597, 2017b.

SINGH, A.; KITTS, D. D. In Vitro Bioaccessibility of Tart Cherry Anthocyanins in a Health Supplement Mix Containing Mineral Clay. **Journal of Food Science**, v. 84, n. 3, p. 475–480, 2019.

SINGH, J. P. et al. In vitro antioxidant and antimicrobial properties of jambolan (*Syzygium cumini*) fruit polyphenols. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 1025–1030, 2016.

SINGLETON, V. .; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152–158, 1999.

SOARES, J. C. et al. Jambolan sherbets overrun, color, and acceptance in relation to the sugar, milk, and pulp contents in formulation. **Food Science and Technology**, v. 38, p. 313–318, 2018.

SOARES, J. C. et al. Physicochemical characteristics and sensory acceptance of jambolan nectars (*Syzygium cumini*). **Food Science and Technology**, v. 39, n. suppl 1, p. 8–14, 2019.

SOTHORNVIT, R. Nanostructured materials for food packaging systems: new functional properties. **Current Opinion in Food Science**, v. 25, p. 82–87, 2019.

SOUSA, M. DE M. et al. Antioxidant action and enzyme activity modulation by bioaccessible polyphenols from jambolan (*Syzygium cumini* (L.) Skeels). **Food Chemistry**, v. 363, n. June, 2021.

STAROSZCZYK, H. et al. Fish gelatin films containing aqueous extracts from phenolic-rich fruit pomace. **LWT - Food Science and Technology**, v. 117, n. July 2019, 2020.

SUN, J. et al. Identification of degradation pathways and products of cyanidin-3-sophoroside exposed to pulsed electric field. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 1203–1210, 2011.

SWER, T. L.; CHAUHAN, K. Stability studies of enzyme aided anthocyanin extracts from *Prunus nepalensis* L. **LWT - Food Science and Technology**, v. 102, p. 181–189, 2019.

TAGUCHI, T. et al. An easy and effective method for the intercalation of hydrophobic natural dye into organo-montmorillonite for improved photostability. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, v. 116, n. December 2017, p. 168–173, 2018.

TALUKDER, S. et al. Jamun fruit (*Syzygium cumini*) skin extract based indicator for monitoring chicken patties quality during storage. **Journal of Food Science and Technology**, v. 57, n. 2, p. 537–548, 2020.

TANG, C. Y.; KWON, Y. N.; LECKIE, J. O. Effect of membrane chemistry and coating layer on physicochemical properties of thin film composite polyamide RO and NF membranes. I. FTIR and XPS characterization of polyamide and coating layer chemistry. **Desalination**, v. 242, p. 149–167, 2009.

TARONE, A. G.; CAZARIN, C. B. B.; MAROSTICA JUNIOR, M. R. Anthocyanins: New techniques and challenges in microencapsulation. **Food Research International**, v. 133, n. February, 2020.

TAVARES, I. M. DE C. et al. Comprehensive study of the phenolic composition of the edible parts of jambolan fruit (*Syzygium cumini* (L.) Skeels). **Food Research International**, v. 82, p. 1–13, 2016.

TAVARES, I. M. DE C. et al. Storage stability of the phenolic compounds, color

and antioxidant activity of jambolan juice powder obtained by foam mat drying. **Food research international (Ottawa, Ont.)**, v. 128, n. October 2019, p. 108750, 2020.

TEIXEIRA-NETO, Â. A. et al. Hybrid materials based on smectite clays and nutraceutical anthocyanins from the Açai fruit. **European Journal of Inorganic Chemistry**, n. 32, p. 5411–5420, 2012.

TEIXEIRA, R. F. et al. An eco-friendly pressure liquid extraction method to recover anthocyanins from broken black bean hulls. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 67, n. October 2020, 2021.

TELES, J. S. et al. Physicochemical and sensory characterization of jambolan jams. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 45, n. 9, p. 1–14, 2021.

THAKUR, N. et al. Recent updates on bioaccessibility of phytonutrients. **Trends in Food Science and Technology**, v. 97, n. January, p. 366–380, 2020.

TING, Y. et al. Using in vitro and in vivo models to evaluate the oral bioavailability of nutraceuticals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 5, p. 1332–1338, 2015.

TIREKI, S.; SUMNU, G.; SAHIN, S. Correlation between physical and sensorial properties of gummy confections with different formulations during storage. **Journal of Food Science and Technology**, v. 58, n. 9, p. 3397–3408, 2021.

TOMAS, M. Effect of dietary fiber addition on the content and in vitro bioaccessibility of antioxidants in red raspberry puree. **Food Chemistry**, v. 375, n. June 2021, p. 131897, 2022.

TROUILLAS, P. et al. Stabilizing and Modulating Color by Copigmentation: Insights from Theory and Experiment. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 9, p. 4937–4982, 2016.

TUNDIS, R. et al. Concentration of Bioactive Compounds from Elderberry (*Sambucus nigra* L.) Juice by Nanofiltration Membranes. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 73, n. 4, p. 336–343, 2018.

TYAGI, B.; CHUDASAMA, C. D.; JASRA, R. V. Determination of structural modification in acid activated montmorillonite clay by FT-IR spectroscopy. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 64, n. 2, p. 273–278, 2006.

UDDIN, F. Clays, nanoclays, and montmorillonite minerals. **Metallurgical and Materials Transactions A: Physical Metallurgy and Materials Science**, v. 39, n. 12, p. 2804–2814, 2008.

VALENCIA, G. A. et al. Physical and morphological properties of nanocomposite films based on gelatin and Laponite. **Applied Clay Science**, v. 124–125, p. 260–266, 2016.

VALENCIA, G. A. et al. Morphological and physical properties of nano-

biocomposite films based on collagen loaded with Iaponite®. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 19, n. November 2018, p. 24–30, 2019.

VAN DE VELDE, F. et al. Anti-inflammatory and wound healing properties of polyphenolic extracts from strawberry and blackberry fruits. **Food Research International**, v. 121, n. September 2018, p. 453–462, 2019.

VAN OLPHEN, H. Maya Blue: A Clay-Organic Pigment? Manganese Nodules: Thorium-230: Protactinium-231 Ratios. **Science**, v. 154, n. 741, p. 645–646, 1966.

VEDOVE, T. M. A. R. D.; MANIGLIA, B. C.; TADINI, C. C. Production of sustainable smart packaging based on cassava starch and anthocyanin by an extrusion process. **Journal of Food Engineering**, v. 289, n. July 2020, p. 110274, 2021.

VENUGOPAL, K. S.; CHERITA, C.; ANU-APPAIAH, K. A. Augmentation of chemical and organoleptic properties in Syzygium cumini wine by incorporation of grape seeds during vinification. **Food Chemistry**, v. 242, p. 98–105, 2018.

VICTORIA-CAMPOS, C. I. et al. Gastrointestinal metabolism and bioaccessibility of selected anthocyanins isolated from commonly consumed fruits. **Food Chemistry**, v. 383, n. July 2021, 2022.

VIEIRA, G. S. et al. Influence of nanofiltration membrane features on enrichment of jussara ethanolic extract (*Euterpe edulis*) in anthocyanins. **Journal of Food Engineering**, v. 226, p. 31–41, 2018.

VISERAS, C. et al. Current challenges in clay minerals for drug delivery. **Applied Clay Science**, v. 48, n. 3, p. 291–295, 2010.

WANG, F. et al. Effects of heat, ultrasound, and microwave processing on the stability and antioxidant activity of delphinidin and petunidin. **Journal of Food Biochemistry**, v. 43, n. 5, p. 1–11, 2019.

WANG, J.; GUO, X. Adsorption kinetic models: Physical meanings, applications, and solving methods. **Journal of Hazardous Materials**, v. 390, n. January, p. 122156, 2020.

WANG, S. et al. Nanocomplexes derived from chitosan and whey protein isolate enhance the thermal stability and slow the release of anthocyanins in simulated digestion and prepared instant coffee. **Food Chemistry**, v. 336, n. July 2020, p. 127707, 2021.

WOODWARD, G. et al. Anthocyanin stability and recovery: Implications for the analysis of clinical and experimental samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 12, p. 5271–5278, 2009.

YONG, H.; LIU, J. Recent advances in the preparation, physical and functional properties, and applications of anthocyanins-based active and intelligent packaging

films. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 26, n. July, p. 100550, 2020.

ZACARONI, L. M. et al. Natural clay and commercial activated charcoal: Properties and application for the removal of copper from cachaça. **Food Control**, v. 47, p. 536–544, 2015.

ZHANG, J. et al. Preparation of an intelligent pH film based on biodegradable polymers and roselle anthocyanins for monitoring pork freshness. **Food Chemistry**, v. 272, n. August 2018, p. 306–312, 2019.

ZHAO, L. et al. Protective effect and mechanism of action of xanthan gum on the color stability of black rice anthocyanins in model beverage systems. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 3800–3807, 2020.

ZHENG, Y. et al. Membrane fouling mechanism of biofilm-membrane bioreactor (BF-MBR): Pore blocking model and membrane cleaning. **Bioresource Technology**, v. 250, n. August 2017, p. 398–405, 2018.

ZIA, J. et al. Porous pH natural indicators for acidic and basic vapor sensing. **Chemical Engineering Journal**, v. 403, n. July 2020, p. 126373, 2021.