

**JÉSSICA ANARELLIS BARBOSA DOS SANTOS**

**EXTRAÇÃO E ENCAPSULAÇÃO DE ANTOCIANINAS E  
OUTROS COMPOSTOS FENÓLICOS DO JAMBOLÃO  
(*Syzygium cumini* (L.) Skeels)**

**NATAL/RN  
2023**

JÉSSICA ANARELLIS BARBOSA DOS SANTOS

EXTRAÇÃO E ENCAPSULAÇÃO DE ANTOCIANINAS E OUTROS COMPOSTOS  
FENÓLICOS DO JAMBOLÃO (*Syzygium cumini* (L.) Skeels)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Orientador(a): Profa. Dra. Juliana Kelly da Silva Maia  
Coorientador(a): Profa. Dra. Thaís Souza Passos

Natal/RN  
2023

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN  
Sistema de Bibliotecas - SISBI  
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial do Centro Ciências  
da Saúde - CCS

Santos, Jéssica Anarellis Barbosa dos.

Extração e encapsulação de antocianinas e outros compostos fenólicos do jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) / Jéssica Anarellis Barbosa dos Santos. - 2023.

102f.: il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Natal, RN, 2023.

Orientadora: Juliana Kelly da Silva Maia.

Coorientadora: Thaís Souza Passos.

1. Pigmentos Biológicos - Dissertação. 2. Antioxidantes - Dissertação. 3. Ultrassom - Dissertação. 4. Nanopartículas - Dissertação. 5. Proteínas do Soro do Leite - Dissertação. I. Maia, Juliana Kelly da Silva. II. Passos, Thaís Souza. III. Título.

RN/UF/BS-CCS

CDU 667.27

JÉSSICA ANARELLIS BARBOSA DOS SANTOS

EXTRAÇÃO E ENCAPSULAÇÃO DE ANTOCIANINAS E OUTROS COMPOSTOS  
FENÓLICOS DO JAMBOLÃO (*Syzygium cumini* (L.) Skeels)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição,  
da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito parcial à obtenção  
do título de Mestre em Nutrição.

Aprovada em 24 de agosto de 2023.

Profa. Dra. Ana Heloneida de Araújo Morais  
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Nutrição  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Juliana Kelly da Silva Maia  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN  
Orientador(a)

Profa. Dra. Thaís Souza Passos  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN  
Coorientador(a)

Profa. Dra. Priscilla Moura Rolim  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN  
Membro interno

Profa. Dra. Jaluza Luana Carvalho de Queiroz  
Universidade Potiguar - UnP  
Membro externo

*Dedico este trabalho às mulheres da minha vida. À Vó Inácia, minha ancestral, in memoriam, que continua viva através de mim e de cada sonho realizado. À Tia Juraci, nossa Barbosa mais velha, a tia, mãe, avó e matriarca viva. À minha mãe Josélia e às minhas irmãs Roberta e Maria Júlia: Ubuntu! Eu sou porque nós somos!*

## **AGRADECIMENTOS**

Parafrazeando Snoop Dogg em seu discurso de recebimento de sua estrela na calçada da fama, começo agradecendo a mim por acreditar em mim, agradeço a mim por ter trabalhado duro e por não desistir. Sou grata por tudo que aprendi nestes dois anos como discente do Programa de Pós-Graduação em Nutrição e pelas experiências que me fizeram amadurecer como profissional da área de alimentos e servidora da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Agradeço às minhas orientadoras Juliana Maia e Thaís Passos, pela confiança, pelos inúmeros ensinamentos, pela disponibilidade e especialmente pela paciência e motivação. Nos dias em que os resultados e experimentos pareciam frustrados, vocês sempre tiveram uma atitude otimista e saídas inteligentes para os percalços que encontramos. É um privilégio poder contar com a experiência de vocês nesse processo.

Aos técnicos de laboratório e alunos externos ao Departamento de Nutrição que foram fundamentais para o andamento deste projeto: Luiz Ricardo, Neymar Moraes, Waleska e Stephanie, Dayane, Allyne e Igor. A Rafael Fernandes, professor do Instituto de Química, por toda a disponibilidade e pelas trocas de conhecimento. Aos Professores Cristiane Assis, Cícero Aragão e Francisco Júnior, do Departamento de Farmácia, pelas importantes contribuições para este trabalho.

À Professora Renata Alexandra, agradeço por todo o apoio e pela compreensão. Às minhas alunas orientandas de TCC Ana Karoline e Maíra Heloísa, que também participaram da construção desse trabalho. Às colegas do PPGNUT Luciana, Thaís Emilly e Beatriz. Este ano comemoro 10 anos de trabalho no Departamento de Nutrição, e aproveito para agradecer às professoras e colegas do DNUT, pelo apoio direto ou indireto, pois tenho sorte de trabalhar ao lado de pessoas tão legais no melhor departamento desta universidade.

Ao meu companheiro, Diego Tardelle, por subir às alturas para coletar todo o jambolão utilizado nessa pesquisa, pelo apoio incondicional, pelo cuidado diário e amparo emocional. Esse trabalho também é para você. Te amo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

*“São pacientes, assíduos e perseverantes  
Executam segundo as regras herméticas  
Desde a trituração, a fixação  
A destilação e a coagulação  
Trazem consigo cadinhos  
Vasos de vidro, potes de louça  
Todos bem e iluminados  
Evitam qualquer relação com pessoas  
De temperamento sórdido (...)  
Os alquimistas estão chegando”*

**Jorge Ben Jor**

## RESUMO

### EXTRAÇÃO E ENCAPSULAÇÃO DE ANTOCIANINAS E OUTROS COMPOSTOS FENÓLICOS DO JAMBOLÃO (*Syzygium cumini* (L.) Skeels)

O jambolão (*Syzygium cumini* L. Skeels) têm sido estudado como potencial fonte de antioxidantes e corantes alimentares devido à composição fenólica, que inclui antocianinas. O objetivo deste trabalho foi extrair e encapsular antocianinas e outros compostos fenólicos de jambolão, comparando três técnicas de extração em etanol acidificado 70% (v/v): extração convencional em banho-maria (EC), exaustiva com agitação (EE) e assistida por ultrassom (EAU). Na encapsulação, foram desenvolvidas duas formulações: 7,33% de extrato (20 mg de antocianinas monoméricas totais - AMT; 97 mg fenóis totais - FT), 1,67% de pectina e 5% de proteína do soro do leite concentrada (EWPC) ou isolada (EWPI). Foi realizada nanoprecipitação em diferentes composições de fase antissolvente (acetona absoluta – EWPC100 e EWPI100, 70% v/v - EWPC70 e EWPI70, ou 50% v/v – EWPC50 e EWPI50). Com isso, os extratos ricos foram avaliados quanto ao tipo e teor de CFT e AMT e potencial antioxidante, por métodos colorimétricos e cromatográficos. As nanopartículas foram caracterizadas por diferentes métodos físicos e químicos, eficiência de incorporação do ativo, e quanto ao efeito no potencial antioxidante. Para os teores de FT [EC: 4564,7 (59,3); EE: 3326,85 (65,3); EAU: 3479,41 (6,6) mg/ 100g], EC diferiu significativamente de EE e EC, no entanto, para AMT [EC: 708,44 (14,93); EE: 639,61 (32,9); EAU: 771,51 (11,6) mg/ 100g], EAU apresentou concentrações significativamente maiores. As atividades antioxidantes [EC: 421,85 (1,83); EE: 377,42 (36,79); EAU: 300,99 (25,66) mmol eq. trolox/ g] diferiram significativamente entre EC e EAU, e entre EE e EAU. As IC50 no teste ABTS [EC: 0,18; EE: 0,20; EAU: 0,21 mg/mL] foram similares a outras matrizes vegetais, corroborando o potencial de antioxidante do jambolão. Foram identificados 13 compostos nos extratos por HPLC, com destaque para malvidina 3,5-diglicosídeo, delphinidina 3-galactosídeo, cianidina 3,5-diglicosídeo, ácidos caftárico e gálico, e procianidina B2. Entre os encapsulados, as EE% de FT [73,81 (6,72)% a 84,65 (1,26)%] não diferiram significativamente, porém, EWPC100 e50, EWPI100 e 50 apresentaram maiores EE% de AMT [56,89 (1,29)%; 48,65 (1,74)%; 35,24 (1,24)%; 36,33 (2,76), respectivamente], sendo os sistema com acetona 70%

não seguiram para análises subsequentes. As imagens de MEV mostraram que as partículas foram formadas, apresentando formato circular e superfície lisa. Os potenciais Zeta variaram entre -16,18 (EWPC100) e -18,80 mV (EWPI50) em pH>6,5. Os tamanhos de partícula variaram de 82 nm (EWPI100) a 116 nm (EWPC100). FTIR mostrou que todos os encapsulados apresentaram espectros semelhantes aos das proteínas utilizadas, além de deslocamentos e formação de novas bandas, indicando interação entre os materiais. Os difratogramas apontaram que todos os encapsulados apresentaram estrutura amorfa. O processo de encapsulação potencializou a atividade antioxidante das partículas com relação ao EIJL [EIJL: 246,81 (2,76); EWPC100: 375,36 (0,89); EWPC50: 472,62 (27,68); EWPI100: 518,31 (30,96); EWPI50: 417,14 (19,62)  $\mu\text{mol eq. de trolox/ mg}$ ] com destaque para EWPC50 e EWPI100 que melhoraram a atividade antioxidante em 91,49 e 110%, respectivamente. Estes resultados mostram o potencial da nanoprecipitação e da combinação de agentes encapsulantes na produção de nanopartículas contendo polifenóis do jambolão, o que pode proteger e otimizar a aplicação destes compostos em produtos alimentícios e nutracêuticos.

**Palavras-chave:** Pigmentos Biológicos. Antioxidantes. Ultrassom. Nanopartículas. Proteínas do soro do leite.

## ABSTRACT

### EXTRACTION AND ENCAPSULATION OF ANTHOCYANINS AND OTHER POLYPHENOLS FROM JAMBOLAN (*Syzygium cumini* (L.) Skeels)

Jambolan (*Syzygium cumini* L. Skeels) has been studied as a potential source of antioxidants and food colorant due to its phenolic composition, which includes anthocyanins. This work aimed to extract and encapsulate anthocyanins and other phenolic compounds from jambolan, comparing three extraction techniques using acidified ethanol 70% (v/v): conventional extraction in water bath (EC), exhaustive extraction with agitation (EE) and ultrasound assisted extraction (EAU). For encapsulation, two formulations were developed: 7.33% extract (equivalent to 20 mg of total monomeric anthocyanins - AMT; 97 mg total phenols - FT), 1.67% pectin and 5% whey protein concentrate (EWPC ) or isolated (EWPI). Nanoprecipitation was performed in different antisolvent phase compositions (absolute acetone – EWPC100 and EWPI100, 70% v/v – EWPC70 and EWPI70, or 50% v/v – EWPC50 and EWPI50). The extracts were assessed for their type and content of CFT and AMT, as well as antioxidant potential by colorimetric and chromatographic methods. The nanoparticles were characterized using different physical and chemical methods, besides the incorporation efficiency the antioxidant potential. Regarding CFT contents [EC: 4564.7 (59.3); EE: 3326.85 (65.3); EAU: 3479.41 (6.6) mg/ 100g], EC exhibited a significant difference from EE and EAU. However, for AMT [EC: 708.44 (14.93); EE: 639.61 (32.9); EAU: 771.51 (11.6) mg/ 100g], EAU showed significantly higher concentrations. Antioxidant activities [EC: 421.85 (1.83); EE: 377.42 (36.79); EAU: 300.99 (25.66) mmol eq. trolox/g] differed significantly between EC and EAU, as well as between EE and EAU. The IC<sub>50</sub> in the ABTS test [EC: 0.18; EE: 0.20; UAE: 0.21 mg/mL] were comparable to other plant matrices, confirming the antioxidant potential of jambolan. Thirteen compounds were identified in the extracts by HPLC, highlighting: malvidin 3,5-diglycoside, delphinidin 3-galactoside, cyanidin 3,5-diglycoside, caftaric and gallic acids, and procyanidin B2. Among the encapsulates, the EE% of CFT [73.81 (6.72)% to 84.65 (1.26)%] did not differ significantly. However, EWPC100 and 50, as well as EWPI100 and 50 presented

higher EE% of AMT [56.89 (1.29)%; 48.65 (1.74)%; 35.24 (1.24)%; 36.33 (2.76), respectively]. Systems using 70% acetone were not subjected to further analysis. SEM images indicated that the particles exhibited a circular shape and smooth surface. Zeta potentials ranged from -16.18 (EWPC100) to -18.80 mV (EWPI50) at pH>6.5. Particle sizes ranged from 82 nm (EWPI100) to 116 nm (EWPC100). FTIR showed that all encapsulated displayed spectra similar to the proteins used along with shifts and emergence of new bands, suggesting material interactions. Diffractograms demonstrated an amorphous structure for all encapsulated samples. Encapsulation potentiated the antioxidant activities of the particles when compared to the EJM [EJM: 246.81 (2.76); EWPC100: 375.36 (0.89); EWPC50: 472.62 (27.68); EWPI100: 518.31 (30.96); EWPI50: 417.14 (19.62)  $\mu\text{mol eq. of trolox/ mg}$ ]. Notably, EWPC50 and EWPI100 exhibited a 91.49% and 110% increase in antioxidant activity, respectively. These findings show the potential of nanoprecipitation and the combination of encapsulating agents in producing nanoparticles containing jambolan polyphenols, which can enhance the preservation and application of these compounds in food and nutraceutical products.

**Keywords:** Biological Pigments. Antioxidants. Ultrasound. Nanoparticles. Whey Protein.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
2.1. OBJETIVO GERAL.....	17
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
3.1. JAMBOLÃO.....	18
3.1.1. Aspectos Gerais.....	18
3.1.2. Composição nutricional.....	18
3.1.3. Importância medicinal, comercial e tecnológica.....	19
3.2. COMPOSTOS FENÓLICOS.....	20
3.3. ANTOCIANINAS.....	22
3.3.1. Estrutura.....	22
3.3.2. Estabilidade e aplicação em alimentos.....	25
3.4. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE ANTOCIANINAS E OUTROS COMPOSTOS FENÓLICOS.....	26
3.5. ENCAPSULAÇÃO.....	28
3.5.1. Definição, aplicações e funcionalidades.....	28
3.5.2. Técnicas de Encapsulação.....	29
3.5.3. Agentes encapsulantes.....	30
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>33</b>
4.1. MATERIAL VEGETAL.....	33
4.2. PROCESSAMENTO DA AMOSTRA.....	33
4.3. CARACTERIZAÇÃO DA POLPA E CASCA DE JAMBOLÃO.....	33
4.3.1. Determinação da composição centesimal da polpa e casca de jambolão.....	33
4.3.2. Análise granulométrica.....	34
4.4. EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS PELOS MÉTODOS CONVENCIONAIS E ASSISTIDA POR ULTRASSOM.....	34
4.5. CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS.....	35
4.5.1. Compostos Fenólicos Totais.....	35
4.5.2. Antocianinas Monoméricas Totais.....	36

4.5.3. Atividade Antioxidante in vitro.....	36
4.5.4. Identificação dos compostos fenólicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	37
<b>4.6. ENCAPSULAÇÃO DO EXTRATO BRUTO.....</b>	<b>38</b>
4.6.1. Determinação da Eficiência de Encapsulação (EE%).....	41
4.6.2. Caracterização das partículas.....	42
4.6.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	42
4.6.2.2. Tamanho de Partícula e Índice de Polidispersão (PDI) por DLS.....	42
4.6.2.3. Potencial Zeta ( $\zeta$ ).....	42
4.6.2.4. Espectrofotometria Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)...	43
4.6.2.5. Difração de Raio-X (DRX).....	43
4.6.3. Atividade Antioxidante in vitro das partículas.....	43
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>45</b>
5.1. CARACTERIZAÇÃO DA POLPA DE JAMBOLÃO.....	45
5.1.1. Composição Centesimal.....	45
5.1.2. Análise Granulométrica.....	46
5.2. CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS DE JAMBOLÃO OBTIDOS POR MÉTODOS CONVENCIONAIS E ASSISTIDO POR ULTRASSOM.....	47
5.2.1. Identificação dos compostos fenólicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	51
5.3. ENCAPSULAÇÃO DO EXTRATO RICO EM ANTOCIANINAS E OUTROS POLIFENÓIS POR NANOPRECIPITAÇÃO.....	58
5.3.1. Eficiência de Encapsulação (EE%).....	58
5.3.2. Caracterização das partículas.....	60
5.3.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	60
5.3.2.2. Tamanho de Partícula e Índice de Polidispersão (PDI) por DLS.....	61
5.3.2.3. Potencial Zeta ( $\zeta$ ).....	65
5.3.2.4. Espectroscopia Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	69
5.3.2.5. Difração de raio X.....	72
5.3.3. Atividade Antioxidante in vitro das partículas.....	74
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>80</b>

<b>7. TRAJETÓRIA ACADÊMICA.....</b>	<b>81</b>
<b>FINANCIAMENTO.....</b>	<b>84</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>85</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels), também conhecido popularmente como jamelão, ameixa de java, azeitona roxa ou azeitona-do-nordeste, embora não seja uma espécie nativa do Brasil, tornou-se muito adaptada ao clima tropical do país, especialmente do Nordeste (1). O fruto é pequeno, de formato ovóide, de coloração roxa quase negra por fora e de polpa carnosa (2). *S. cumini* tem sido tradicionalmente utilizado como planta medicinal, tendo diferentes partes da planta (por exemplo, casca, folhas, sementes e frutos) sido empregadas no tratamento de várias doenças devido a suas atividades anti-inflamatória, anti-hiperglicêmica (3), antibacteriana (4), anticarcinogênica (5, 6), antidiabética (7), antioxidante (8) e gastroprotetora (9).

O jambolão possui uma composição rica em substâncias químicas com altos valores nutricionais e biológicos. As partes comestíveis de *S. cumini* apresentam concentrações significativas de compostos fenólicos, que são responsáveis por características sensoriais da fruta, como cor e sabor, além das propriedades bioativas associadas, principalmente, a ações antioxidantes e anti-inflamatórias (5). Dados os benefícios à saúde e o potencial tecnológico associados à sua composição fenólica, este fruto tem atraído o interesse da comunidade científica e da indústria de alimentos como uma potencial matéria-prima para o desenvolvimento de produtos (10). Ácidos fenólicos, flavonas e flavonóides como ácido gálico, miricetina e antocianinas, respectivamente, são exemplos de compostos fenólicos presentes na composição desses frutos (11).

As antocianinas são uma importante subclasse de flavonoides responsáveis pela cor característica do jambolão (10). Esses compostos são responsáveis pela coloração vermelha, azul ou roxa de diferentes vegetais e bebidas (como morango, uva, cereja, mirtilo, jabuticaba, repolho roxo, berinjela, vinho tinto) (12). Na área de alimentos, as antocianinas são candidatas a potenciais alternativas aos corantes sintéticos, devido às suas cores características e à alta solubilidade em água, permitindo sua incorporação em matrizes alimentares aquosas, além de agregar atividades biológicas que têm sido associadas a esses compostos (13).

Uma estratégia para caracterização e aplicação destas matrizes alimentícias ricas em fenólicos é a extração dos compostos de interesse. Os

métodos convencionais de extração de compostos fenólicos consistem em sua maioria na maceração do substrato vegetal com um solvente, técnica essa que é chamada de extração sólido-líquido. Todavia, esses métodos requerem, em geral, longos tempos de extração, o que pode levar a degradação parcial das antocianinas extraídas (14). O aprimoramento da performance das técnicas convencionais de extração pode ser alcançado através do uso de tecnologias de assistência aos processos, como o ultrassom, o qual proporciona a redução do tempo de extração, gerando economia de energia e de solvente através de mecanismos de intensificação (15).

Apesar do potencial tecnológico, nutracêutico e farmacológico, a utilização de compostos fenólicos como aditivos alimentares é limitada pela instabilidade e interação com outros componentes da matriz alimentar. Destacando as antocianinas que são sensíveis às condições ambientais, como pH, temperatura, oxigênio e luz. Estes compostos também são instáveis durante o processo de digestão devido ao pH intestinal, à ação de enzimas digestivas e à biotransformação pela microbiota intestinal, o que limita seu uso biológico devido à relativa baixa biodisponibilidade (16).

Com isso, há a necessidade de buscar métodos práticos e econômicos para aumentar a estabilidade e a vida útil desses compostos, principalmente aqueles que atuam como pigmentos, a citar as antocianinas (17). Métodos de estabilização de antocianinas incluem a copigmentação, exclusão de oxigênio e encapsulação. A encapsulação de antocianinas tem sido investigada no desenvolvimento de corantes naturais com melhora da estabilidade, dispersibilidade, bioacessibilidade e biodisponibilidade (18). Adicionalmente, a nanoencapsulação, ao produzir partículas contendo substâncias bioativas na escala de nanômetros, além de proteger os compostos bioativos, pode permitir a liberação controlada do núcleo e promover uma melhora da funcionalidade e das características sensoriais (19).

A produção de nanopartículas por meio da técnica de nanoprecipitação é um método de encapsulação rápido, que possui formulação e procedimento simples, de baixo custo e que pode ser empregado em sistemas envolvendo diferentes classes de compostos fenólicos, em especial antocianinas (20). Os materiais de parede formulados com a combinação de polissacarídeos e proteínas têm mostrado eficiência na estabilização de extratos bioativos por encapsulação

ao promoverem, conjuntamente, aumento da viscosidade, da repulsão eletrostática e do conteúdo sólido total (21). Complexos a base de proteína do soro do leite e pectina têm sido estudados como materiais de parede em processos de encapsulação de compostos fenólicos (22). No entanto, há escassez de estudos sobre a obtenção de nanopartículas à base de proteína do soro do leite e pectina contendo antocianinas pelo método de nanoprecipitação.

Nesta perspectiva, a presente pesquisa pretendeu produzir e caracterizar nanopartículas à base de proteína do soro do leite e pectina contendo compostos fenólicos, sobretudo antocianinas, de jambolão obtidos pela técnica de extração assistida por ultrassom, e avaliar o efeito do processo de encapsulação sobre a atividade antioxidante *in vitro* das partículas produzidas em comparação com o extrato bruto.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Extrair e encapsular compostos fenólicos, especialmente antocianinas, do jambolão (*Syzygium cumini* L. Skeels), visando avaliar o efeito da encapsulação na atividade antioxidante *in vitro*.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- \_ Avaliar a obtenção de compostos fenólicos, em especial antocianinas, das partes comestíveis (polpa + casca) do jambolão (*Syzygium cumini* L. Skeels) por três diferentes métodos de extração.
- \_ Caracterizar o perfil dos compostos fenólicos obtidos por diferentes métodos de extração.
- \_ Definir um dos métodos de extração para a obtenção do extrato a ser encapsulado.
- \_ Obter nanopartículas contendo o extrato rico em compostos fenólicos, incluindo antocianinas, do jambolão empregando a técnica de nanoprecipitação.
- \_ Caracterizar as partículas obtidas por diferentes métodos físicos e químicos, e quanto à eficiência de encapsulação.
- \_ Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* das partículas e compará-las ao extrato bruto rico em antocianinas do jambolão não encapsulado.

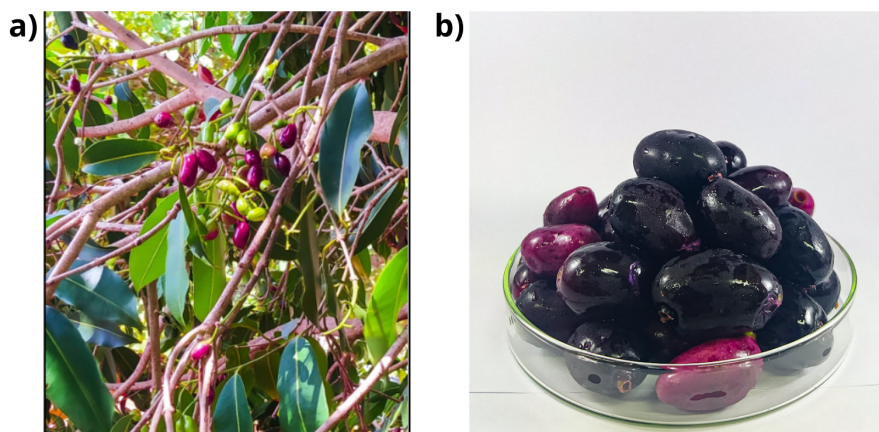
### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1. JAMBOLÃO

##### 3.1.1. Aspectos Gerais

O jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels), conhecido também como jamelão, ameixa de java, azeitona roxa ou azeitona-do-nordeste, embora não seja uma espécie nativa do Brasil, tornou-se muito adaptada ao clima tropical do país, especialmente do Nordeste (1). O fruto é pequeno, de formato ovóide, de coloração roxa quase negra por fora e de polpa carnosa (2). No Brasil, a floração ocorre nos meses de setembro e novembro e o amadurecimento dos frutos acontece entre os meses de dezembro e fevereiro (10). Constitui-se de um fruto de cor roxo-escuro, com única semente coberta de polpa comestível, mucilaginosa, doce e adstringente, que podem ser consumidas in natura ou transformadas em sucos, geleias e outras preparações (1).

**Figura 1** - Frutas de Jambolão: a) antes de serem colhidos e b) após a coleta e higienização.



Fonte: Acervo pessoal.

##### 3.1.2. Composição nutricional

O jambolão tem uma composição rica em substâncias químicas com valores nutricionais e biológicos. Os frutos têm, em média, 75% de parte comestível com cerca de 83,7% de umidade, 0,3% de gordura, 0,9% de fibra bruta, 0,7% de proteína, 14% de carboidrato e 0,4% de cinzas (3).

Nascimento-Silva *et al.* (23) traz referências quanto à composição de carboidratos na polpa de *S. cumini*, que possui 11,23 g/100 g de açúcares totais,

divididos entre frutose (6,20 g/100 g) e glicose (5,03 g/100 g). Esses altos teores de açúcares permitem a utilização da fruta como ingrediente em outros produtos, principalmente na produção de iogurtes, geleias e bebidas fermentadas como o vinho.

Em sua pesquisa, Coelho *et al.*, (24) investigaram o teor de ácidos orgânicos em polpas de jambolão, e encontraram alta concentração dos ácidos málico (9,15 g/kg) e o láctico (7,25 g/kg), além de ácido tartárico (3,24 g/kg), ácido cítrico (1,74 g/kg), ácido succínico (0,38 g/kg) e ácido acético (0,15 g/kg). Ademais, os frutos apresentam significativos valores de minerais, com 5,9 g/100 g de minerais totais dentre os quais se destacam: potássio (3,8 g/100 g), cálcio (1,04 g/100 g), magnésio (0,78g/100 g) e sódio (0,31 g/100 g) (23). Nos frutos também são encontradas vitaminas hidrossolúveis como ácido ascórbico, tiamina e niacina e aminoácidos livres como alanina, asparagina, tirosina, glutamina e cisteína (10) e outras substâncias com alto valor biológico, como é o caso dos compostos fenólicos.

### **3.1.3. Importância medicinal, comercial e tecnológica**

Dados os possíveis benefícios à saúde associados à sua composição fenólica, o jambolão tem atraído o interesse da comunidade científica e da indústria de alimentos como uma potencial matéria-prima para o desenvolvimento de produtos. Novas pesquisas estão levando ao desenvolvimento de produtos à base de jambolão como iogurtes (25, 26, 27), sucos (28, 29), polpas desidratadas em pó (30) tablets nutracêuticos (31) e materiais bio-híbridos para aplicação na indústria (24).

Nos Estados Unidos e na Europa, o jambolão é considerado uma fruta exótica, vendida em sua forma desidratada, sem sementes, como polpa, vinho ou geleia (32). No entanto, no Brasil, o uso comercial do jambolão é ainda pouco difundido, a despeito dos potenciais benefícios à saúde atribuídos a este fruto (14), o que se observa é que, independentemente da região produtora, a falta de investimentos em tecnologias para o manejo pós-colheita do jambolão resulta em altos índices de desperdício, não estimulando o cultivo e a comercialização do mesmo (10).

Neste sentido, estratégias que busquem estimular o consumo e comercialização desta fruta, tanto a partir da demonstração dos potenciais efeitos bioativos quanto com o desenvolvimento de produtos alimentícios e estratégias

tecnológicas, podem contribuir para o uso sustentável deste recurso natural, agregando benefícios em diferentes esferas. Desta forma, a aplicação fitoterápica apresenta o aspecto inovador de ser utilizada como alternativa para o manejo de doenças crônicas que são normalmente tratadas apenas com drogas sintéticas (33).

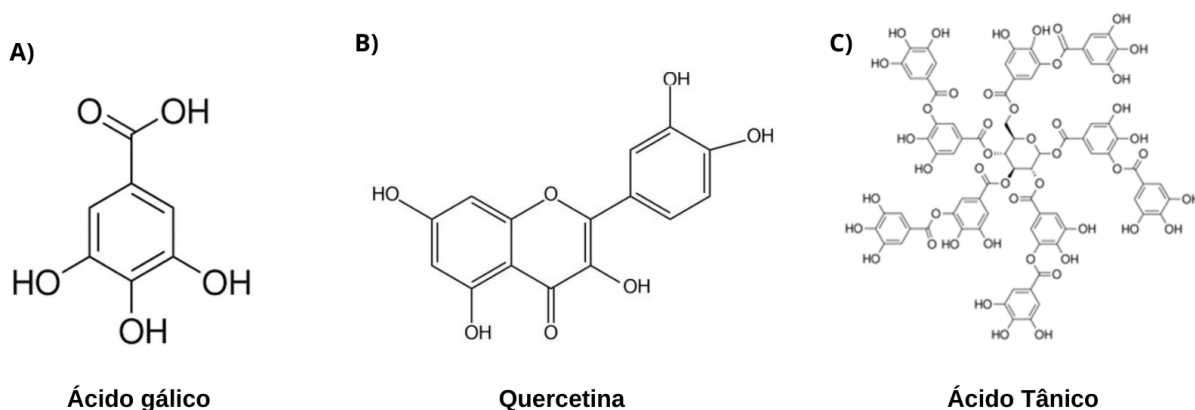
No organismo humano, a atividade metabólica normal produz constantemente radicais livres, moléculas ou fragmentos de moléculas quimicamente instáveis e bastante reativos, capazes de promover danos que podem contribuir para o envelhecimento e instalação de doenças degenerativas. Os antioxidantes apresentam-se como alternativa para prevenir e minimizar os danos oxidativos nos seres vivos e as pesquisas encontram-se voltadas para a busca de compostos naturais que exibem essa propriedade funcional. Os compostos fenólicos, com destaque para os flavonóides e ácidos fenólicos, presentes em altos teores no jambolão, são exemplos de fitoquímicos que têm sido apontados como detentores de tal propriedade (34).

*S. cumini* tem sido tradicionalmente usado como planta medicinal, tendo diferentes partes da planta (por exemplo, casca, folhas, sementes e frutos) sido popularmente empregadas no tratamento de doenças (3). Estudos mostram que o jambolão possui atividades biológicas importantes, apresentando propriedades antiproliferativas (35), redutoras de triglicérideo sérico e da hiperlipidemia (23), antivirais (36), antioxidantes e estimulante do sistema antioxidante endógeno (37, 38), anti-inflamatória, anticarcinogênica, radioprotetora, antidiabética, gastroprotetora, antidiarreica e antimicrobiana (5), sendo tais funções associadas à sua composição fenólica.

### 3.2. COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos, também denominados como ácidos fenólicos e polifenóis, são metabólitos secundários que desempenham papéis importantes no crescimento e reprodução das plantas, atuando na proteção contra patógenos e predadores, além de contribuírem para a cor e características sensoriais de frutas e vegetais. Estruturalmente, os compostos fenólicos compreendem ao menos um anel aromático contendo uma ou mais substituições hidroxila e podem variar de moléculas simples a polímeros complexos (Figura 2) (39).

**Figura 2** - Exemplos de estruturas químicas de alguns dos mais importantes grupos de compostos fenólicos: ácidos fenólicos (A), flavonoides (B) e taninos (C).



Fonte: (A) Adaptado de Shabani, Rabiei & Amini-Khoei (40). Uso permitido pelos termos do *Creative Commons CC* desde que propriamente citado; (B) Adaptado de Wadhwa *et al.* (41). Licença de uso nº 5604380152832; e (C) Adaptado de Kaczmarek (42). Uso permitido pelos termos do *Creative Commons CC* desde que propriamente citado.

Os ácidos fenólicos mais abundantes nas plantas são os ácidos hidroxicinâmicos (ácido ferúlico, ácido sinápico, ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido clorogênico, ácido rosmarínico, ácido málico e ácido shikímico) e os ácidos hidroxibenzoicos (ácido gálico, ácido vanílico, ácido protocatéquico) (43).

Já os flavonoides são compostos polifenólicos com cerca de quinze átomos de carbono em uma configuração C6–C3–C6 contendo dois anéis aromáticos que são unidos por uma ponte de 3 carbonos (um anel heterocíclico) (44). Esta classe é subdividida em grupos que se diferenciam pela quantidade e arranjo dos grupos hidroxila (-OH) e pela origem e proporção de glicosilação e alquilação desses grupos. Os subgrupos de flavonoides são: flavonas, flavonóis (rutina, quercetina, kaempferol e miricetina), flavanonas, flavan-3-ols ou flavanóis (catequina, epicatequina, galocatequina e epigalocatequina), isoflavonas, chalconas e antocianinas (43).

Os taninos são compostos fenólicos solúveis em água que possuem um sabor amargo e adstringente, com alto peso molecular (45). Neste grupo, também chamado de polihidroxi flavan-3-ol-oligômeros e polímeros, são incluídos flavonoides condensados (proantocianidinas A1, A2, C1 e procianidina B2), hidrolisáveis (galotanino ou ácido tânico polimerizado e elagitaninos) e complexos como a acutissimina (43).

As partes comestíveis de *S. cumini* possuem concentrações significativas de compostos fenólicos, variando de 995 a 1117 mg equivalente de ácido gálico (GAE)/100 g (massa seca) (23). Estas substâncias são responsáveis por características sensoriais de cor, sabor e aroma da fruta, além das propriedades bioativas associadas principalmente a ações antioxidantes e anti-inflamatórias. Tavares *et al.* (11) revelaram em seu estudo a ocorrência de 74 compostos fenólicos nas partes comestíveis do fruto, incluindo 9 flavonóis (glicosídeos de miricetina, laricitrina e siringetina), 19 flavanóis (dihexosídeos de dihidromiricetina e seus derivados metilados), 8 monômeros de flavan-3-ol (principalmente galocatequinas), 13 galotaninos e 13 elagitaninos, junto com algumas protocianidinas (prodelfinidinas galoiladas), ácidos gálico e elágico livres e 9 antocianinas (principalmente delfinidina, petunidina e malvidina).

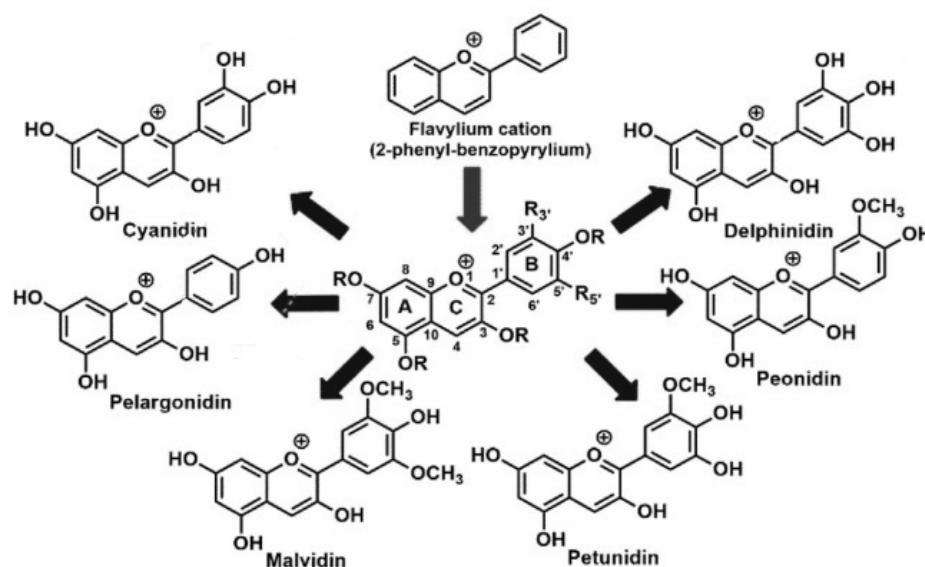
### 3.3. ANTOCIANINAS

#### 3.3.1. Estrutura

As antocianinas são a mais importante subclasse de flavonoides responsáveis pela cor característica e diversas propriedades biológicas do jambolão (10). Estes pigmentos são glicosídeos ou acil glicosídeos de antocianidinas, as quais compreendem estruturas flavilium com dois anéis aromáticos ligados por um anel heterocíclico de três carbonos contendo oxigênio. A dupla ligação conjugada da metade antocianidina constitui a cromosfera (18). Existem 6 antocianidinas mais comuns (pelargonidina, cianidina, peonidina, delfinidina, petunidina e malvidina), cujas estruturas variam de acordo com a substituição glicosídica nas posições 3 e 5 (44) (Figura 3).

Essas formas de antocianinas conjugam-se com açúcares e ácidos orgânicos para gerar uma variedade de antocianinas com diferentes cores. Suas cores variam do azul, ao final do espectro UV/Visível, quando o anel B possui mais grupos hidroxila, ao vermelho, na extremidade oposta do espectro UV/Visível, quando o anel B possui mais grupos metoxila (46).

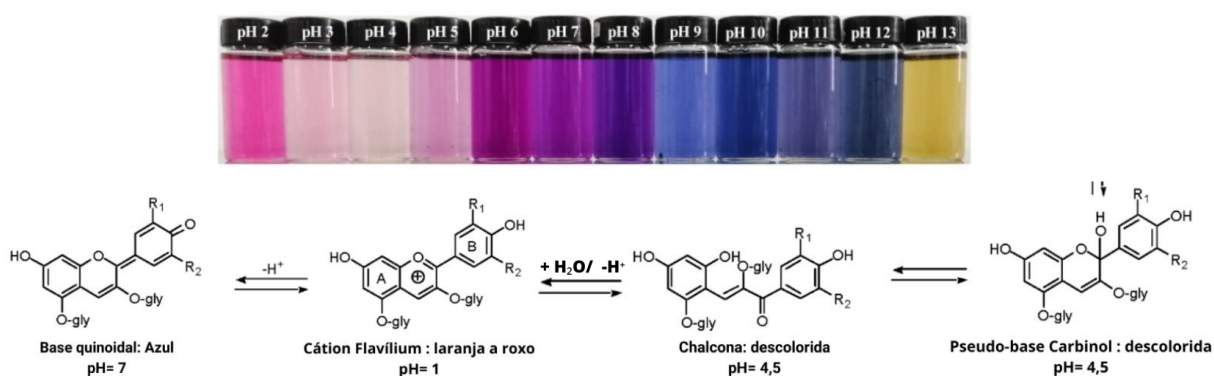
**Figura 3** - Estrutura geral do cátion flavilium com a numeração dos átomos e das 6 antocianinas mais comuns



Fonte: Adaptado de Sinopoli *et al.* (46). Licença de uso nº 5604391187257.

Em meio aquoso, como em alimentos, as antocianinas passam por transformações estruturais reversíveis de acordo com o pH, evidenciada por mudanças de cor (Figura 4). Em valores de pH abaixo de 2, o cátion flavilium de cor vermelha predomina. Entre pH 3 e 6, a hidratação do cátion flavilium ocorre no C-2 para formar a pseudobase descolorida carbinol, que pode passar por uma abertura de anel para uma chalcona amarela. Em condições próximas da neutralidade, a desprotonação do cátion flavilium gera a base quinoidal de cor azul (18).

**Figura 4** - Equilíbrio em diferentes faixas de pH das antocianinas



Fonte: Adaptado de Qin *et al.* (47). Licença de uso nº 5604400411562 .

A diversidade estrutural aumenta através da glicosilação de antocianinas com um ou mais açúcares e da acilação de moléculas de açúcar com ácidos orgânicos através de ligações éster. Ambas glicosilação e acilação modificam o tamanho molecular e a polaridade de antocianinas e podem eventualmente alterar suas propriedades físico-químicas. A glicosilação aumenta a solubilidade em água, enquanto a acilação diminui a solubilidade (48) e aumenta sua estabilidade protegendo o cátion flavilium de sofrer hidratação e consequente perda da estrutura do cátion (49).

O perfil de antocianinas identificado no jambolão é dominado por antocianidinas tri-substituídas no anel B, ou seja, 3,5-O-diglicosídeos de delphinidina (23-45%), petunidina (32-25%) e malvidina (15-38%). Os 3,5-O-diglicosídeos de antocianidinas dissustituídas no anel B, ou seja, cianidina e peonidina, juntamente com os 3-O-glicosídeos de delphinidina, cianidina, petunidina e malvidina, também foram encontrados em menores quantidades (porcentagens molares abaixo de 4%) (11). Em comparação com outras frutas conhecidas como fontes de antocianinas, o conteúdo deste composto no jambolão (771 mg/ 100 g, massa seca) (50) é superior ao do mirtilo (365 mg/ 100 g), ao do morango (38,7 mg/ 100 g), ao da amora (215,5 mg/ 100 g) (51) e pode ser comparado ao teor de antocianinas da jabuticaba (802,90 mg/ 100 g) (52).

Além de seu potencial de uso como corante natural, diferentes atividades biológicas têm sido associadas às antocianinas. Estudos têm trazido fortes evidências dos efeitos benéficos do consumo desse composto sobre várias patologias, especialmente aquelas com componente inflamatório. O mecanismo de ação das antocianinas pode ser explicado, em parte, por sua capacidade antioxidante, anti-inflamatória, assim como de modulação de diferentes aspectos da fisiologia do trato gastrointestinal, o que acaba por resultar em um efeito sistêmico (53). Sun *et al.* (54) investigaram o efeito terapêutico do extrato de antocianinas da casca de feijão preto sobre a microbiota intestinal e o metaboloma sérico, os resultados mostraram uma melhora na glicemia, no estresse oxidativo e nas respostas inflamatórias, além da mitigação dos distúrbios do metabolismo lipídico em ratos. Peng *et al.* (55) relataram que o tratamento a longo prazo de ratos com um extrato isolado de goji berry rico em antocianinas e polifenóis levou à regulação do status antioxidante no fígado (T-AOC, T-SOD, CAT, GSH e GSH-Px aumentaram e

AST, ALT, ALP e MDA diminuíram), do status anti-inflamatório no cólon (a expressão do mRNA de *iNos*, *Cox-2*, *Tnf- $\alpha$* , *Il-6*, *Il-1 $\beta$*  e *Ifn- $\gamma$*  foi significativamente reduzida), da barreira intestinal e da microbiota intestinal (proliferação de *Barnesiella*, *Alistipes*, *Eisenbergiella*, *Coprobacter* e *Odoribacter*). Além desses efeitos, o conteúdo de ácidos graxos de cadeia curta no conteúdo cecal e nas fezes foi aumentado, mostrando o potencial de utilizar extratos ricos em antocianinas como ingrediente funcional em alimentos e fármacos.

### **3.3.2. Estabilidade e aplicação em alimentos**

Apesar de seu potencial tecnológico, nutracêutico e farmacológico, a utilização de antocianinas como aditivos alimentares é limitada por sua baixa estabilidade e interação com outros componentes da matriz alimentar (18). A estabilidade das antocianinas está relacionada com o quão suscetível os cátions flavilium estão à conversão para as formas de chalcona e pseudobase carbinol descolorida (48). A cor e a estabilidade de antocianinas são influenciadas por fatores intrínsecos como estrutura química e concentração desses compostos; e por fatores extrínsecos como temperatura, pH, exposição à luz, presença de oxigênio, enzimas, íons metálicos, outros flavonóides e fenólicos, ácido ascórbico, açúcares e sulfitos (18).

Estes compostos também são instáveis durante o processo de digestão devido ao pH intestinal, à ação de enzimas digestivas e à biotransformação pela microbiota intestinal, o que limita seu uso biológico devido à relativa baixa biodisponibilidade (16). Dadas as propriedades benéficas das antocianinas, sua efetividade em tratar e prevenir doenças depende de sua biodisponibilidade e bioacessibilidade. Bioacessibilidade é definida como a fração do composto que é liberado da matriz alimentar e fica disponível para absorção pelo intestino. Já a biodisponibilidade está relacionada à estabilidade digestiva, liberação da matriz alimentar e eficiência de seu transporte transepitelial (56). Embora as antocianinas possam ser diretamente absorvidas pelas células epiteliais no intestino delgado, é difícil transferir antocianinas para o trato intestinal devido à sua instabilidade às condições dessa região. Portanto, o desafio agora é garantir a proteção dessas moléculas contra deterioração, garantindo sua biodisponibilidade (57).

### 3.4. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE ANTOCIANINAS E OUTROS COMPOSTOS FENÓLICOS

Atualmente, as pesquisas têm focado na busca por melhores fontes do pigmento em questão e na otimização da eficiência de extração e da estabilidade (18). A produção de extratos com altos níveis de antocianinas a partir de fontes naturais acessíveis tem sido considerada como um eixo de pesquisas voltadas para as indústrias de alimentos, farmacêutica e cosmética. Neste sentido, é importante desenvolver estudos que avaliem métodos de extração de polifenóis visando alto rendimento e preservação dos bioativos, bem como, viabilizar as aplicações tecnológicas (50).

Os métodos convencionais de extração de bioativos consistem em sua maioria na maceração do substrato vegetal com um solvente, técnica essa que é chamada de extração sólido-líquido. Todavia, esses métodos requerem longos tempos de extração, o que pode levar à degradação dos compostos fenólicos se realizados em alta temperatura, além do que o uso de solventes potencialmente tóxicos como metanol, acetona ou hexano tornando os fenólicos removidos inseguros para serem usados como ingrediente alimentar. Portanto, é importante usar temperatura segura e ideal, além de solventes GRAS, para obter um extrato fenólico de qualidade a partir de matrizes vegetais (58).

O tipo de tratamento físico aplicado à amostra também pode impactar o mecanismo de extração, podendo gerar um aumento nos rendimentos e causando diferentes seletividades de extração. A extração seriada exaustiva é um método de fácil adaptação, acessível, escalonável e apropriado para a obtenção de compostos sensíveis como compostos fenólicos, que podem passar por degradação térmica mesmo em temperaturas médias (60-80°C) utilizadas nos métodos de extração convencionais (59), já que há a opção de não utilizar altas temperaturas e ainda permite extrações refrigeradas a depender do equipamento auxiliar utilizado, como por exemplo, centrífugas, além de gerar bons rendimentos pois pode ser conduzida até o esgotamento da amostra (60).

O aprimoramento da performance das técnicas convencionais de extração pode ser alcançado através do uso de tecnologias de assistência aos processos, como o ultrassom, o qual proporciona a redução do tempo de extração, gerando economia de energia e de solvente através de mecanismos de intensificação. Desta

forma, possibilitando o aumento dos rendimentos de extração e da seletividade de compostos (15).

O mecanismo da técnica de extração assistida por ultrassom (EAU) é atribuído à cavitação resultante da proliferação de ondas sonoras, cujos efeitos físicos, químicos e mecânicos se dão pela formação, seguida pelo colapso de microbolhas (61), que rompem parcialmente as paredes celulares das plantas facilitando a transferência dos compostos de interesse para o solvente. A EAU utiliza equipamentos que geram ondas ultrassônicas, sejam estes na forma de banho ou de sonda. O método permite variar a concentração e o tipo de solvente, tempo, temperatura e os parâmetros de sonicação (intensidade, frequência e amplitude) visando aumentar o rendimento e/ou seletividade da extração do composto de interesse (58). Através do emprego da tecnologia de ultrassom, extrações completas podem ser concluídas em menor tempo com alta reprodutibilidade, reduzindo o consumo de solvente, simplificando a manipulação e processamento, dando maior pureza ao produto final, eliminando pós-tratamento de águas residuais e sem a necessidade de aplicação de altas temperaturas por períodos prolongados, que normalmente são empregadas em extrações convencionais como Soxhlet, maceração ou destilação. Diversas classes de componentes alimentares, como aromas, pigmentos, antioxidantes e outros compostos orgânicos e minerais podem ser extraídos, analisados e formulados de forma eficiente a partir de uma variedade de matrizes, principalmente tecidos animais, microalgas, leveduras, alimentos e materiais vegetais (62).

Estudos recentes têm buscado otimizar as condições de extração assistida por ultrassom com o objetivo de maximizar a obtenção de compostos fenólicos e antocianinas, avaliando a influência de parâmetros como composição de solvente, potência de sonicação, tempo e temperatura no rendimento e atividade antioxidante dos compostos bioativos oriundos de diversas matrizes vegetais (63, 64, 65). Pinela *et al.* (66) avaliaram a influência do tempo, temperatura, composição do solvente e potência de ultrassom na extração de antocianinas dos cálices das flores de hibisco para a produção de um corante alimentar de fonte natural, obtendo resultados de 51,76 mg/ g de resíduo, alcançando um rendimento de extração com valores mais altos do que o relatado na literatura, através da utilização desta técnica. Sabino *et al.* (14) avaliaram a extração de antocianinas de jambolão utilizando equipamentos de sonda e banho de ultrassom, e obteve os maiores rendimentos de

extração utilizando o sonicador de sonda com potência de 5000 W/L, tempo de extração de 7,5 min utilizando etanol 79,6% como solvente, obtendo valores de 60,5 mg cianidina-3-O- glicosídeo eq. por grama de fruta seca, valor 4 vezes mais alto do que o obtido pela extração seriada exaustiva avaliada neste mesmo trabalho.

Porém, além de buscar a otimização dos métodos de extração de compostos bioativos, é necessário implementar estratégias que contribuam para preservação e estabilização destes compostos, como por exemplo, técnicas de encapsulação.

### 3.5. ENCAPSULAÇÃO

#### 3.5.1. Definição, aplicações e funcionalidades

A encapsulação é definida como uma técnica na qual as substâncias, estejam elas no estado sólido, líquido ou gasoso (núcleo ou ativo), são envolvidas por um agente encapsulante. O sistema pode ser formulado para liberar seus ativos gradualmente por meio de estímulos que provocam o rompimento da parede, como aquecimento, solvatação, difusão e pressão, como também podem ser elaborados de forma a liberar os ativos em locais específicos do corpo (56).

Micropartículas e nanopartículas têm sido estudadas como ingredientes na indústria alimentícia devido às suas propriedades físico-químicas e atributos funcionais específicos. Os limites de tamanho distinguem micro e nanopartículas ainda estão em debate. Em geral, para nanopartículas, considera-se que pelo menos uma dimensão não deve exceder 100 e 200 nm (67).

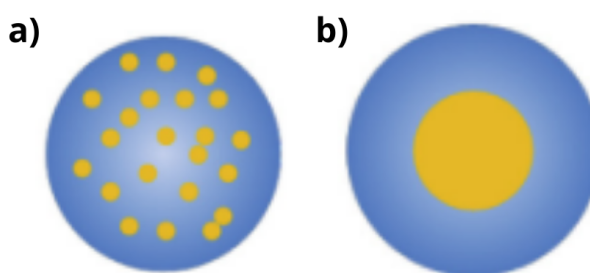
Sistemas de encapsulação na escala nano apresentam vantagens com relação aos sistemas na escala micro, como, por exemplo, maior estabilidade termodinâmica, maior bioacessibilidade, solubilidade e biodisponibilidade dos bioativos, atuando na funcionalidade e características sensoriais, taxas de difusão mais rápidas e taxas de penetração mais altas através de barreiras biológicas, o que pode impactar reações interfaciais como oxidação ou digestão (68). Estas diferenças são atribuídas principalmente a dois efeitos: (i) o pequeno tamanho e (ii) a elevada relação superfície/volume (67).

A encapsulação também oferece soluções para problemas relacionados ao processamento, transporte, armazenamento e manuseio de compostos bioativos, disfarça sabores e aromas indesejáveis, facilita a aplicação em produtos e em

alimentos e evitam a interação desses compostos com outras espécies reativas presentes em matrizes alimentares (69).

As partículas sintetizadas com biopolímeros podem ser classificadas de acordo com a estrutura, em esferas e cápsulas. No caso das esferas (Figura 5a) (estrutura homogênea) o princípio bioativo é disperso uniformemente dentro da matriz polimérica; no caso das cápsulas (Figura 5b) (montagem núcleo-casca) o composto encapsulado encontra-se incorporado em um núcleo circundado pela membrana polimérica que pode apresentar espessura variada (19). A formação específica dessas estruturas depende do tipo de material do núcleo e da parede, como também da técnica escolhida para a produção das partículas (56).

**Figura 5** - Estruturas de nanopartículas poliméricas: a) esferas e b) cápsulas



Fonte: Adaptado de Joye & McClements (2013). Licença de uso nº 5627140467772.

### 3.5.2. Técnicas de Encapsulação

Várias técnicas têm sido estudadas no *design* de micro e nanopartículas carregadas com compostos bioativos. Em geral, as técnicas usadas para fabricar nanopartículas podem ser classificadas como '*top-down*', em que ocorre a quebra dos materiais de tamanho macro em partículas na escala nano usando técnicas como homogeneização de alta pressão, microfluidização e emulsificação por ultrassom, ou '*bottom-up*', que envolve a produção de nanopartículas a partir de átomos ou moléculas individuais por meio de '*self-assembly*' ou "auto-montagem" (70, 71). Para aplicação em larga escala, esses processos devem se mostrar comercialmente viáveis devendo, portanto, ser econômicos, usar solventes não tóxicos, ser aplicáveis a ingredientes de qualidade alimentar e facilmente escalonáveis.

Dentre os métodos que têm sido estudados para a produção de nanopartículas contendo compostos fenólicos, antocianinas ou extratos ricos nessas

substâncias pode-se citar: emulsificação (72, 73, 74, 75), nanolipossomos (76), 'self-assembling' ou "auto-montagem" (16), coacervação (77), gelificação iônica (78), ultrassom (21), *electrospinning* (79) e precipitação em antissolvente ou nanoprecipitação (80).

Os métodos *bottom-up* mais usados são emulsificação espontânea e a precipitação de antissolvente. A emulsificação espontânea é usada principalmente para a criação de nanopartículas lipídicas e normalmente envolve uma mistura de surfactante/óleo em água, o que leva à formação espontânea de nanopartículas lipídicas. A precipitação antissolvente é adequada para a produção de nanopartículas a partir de diferentes ingredientes de grau alimentício além de permitir a produção de partículas muito pequenas com um controle aprimorado sobre as propriedades das partículas, como tamanho, morfologia e estado físico (71).

O método de precipitação antissolvente, ou nanoprecipitação, é um processo direto e rápido que difere dos métodos baseados em emulsão (técnicas de emulsificação-difusão, emulsão-evaporação e salinização), não sendo necessário um agente emulsificante. Este método traz como vantagens velocidade, facilidade e simplicidade na fabricação de nanopartículas (20). É uma tecnologia atraente, pois não há necessidade de equipamentos especializados e condições de operação complexas, os custos associados são relativamente baixos e a técnica pode ser aplicada para processos em larga escala (71).

Na prática, uma das formas de executar a precipitação antissolvente é pela adição de um soluto a uma solução não-solvente para induzir a supersaturação, que induz a precipitação. Essa técnica requer uma seleção cuidadosa e adequada das fases solvente e antissolvente levando em consideração a natureza dos biopolímeros ou compostos usados para produzir as nanopartículas. Vários líquidos podem ser utilizados como solvente e antissolvente, como água ou solventes orgânicos (etanol e acetona). Há diferentes etapas de produção no processo de precipitação de antissolventes: geração de supersaturação; nucleação, crescimento de cristais e coagulação (71).

### **3.5.3. Agentes encapsulantes**

Pesquisas recentes têm mostrado a importância de reduzir o uso de materiais sintéticos na produção de nanopartículas, já que estes podem apresentar

riscos toxicológicos quando consumidos, substituindo-os por fontes biopoliméricas como proteínas e gelatina e alguns polissacarídeos como gomas, celulose, quitosana, agarose, pectina e amido (20). A precipitação antissolvente é um método promissor na produção de nanopartículas a partir de polissacarídeos e/ou proteínas (71).

Os materiais de parede formulados com a combinação de polissacarídeos e proteínas têm mostrado eficiência na estabilização de extratos bioativos por encapsulação devido a seus efeitos combinados de promoverem o aumento da viscosidade, da repulsão eletrostática e do conteúdo sólido total. Enquanto os polissacarídeos são responsáveis pela gelificação ou aumento da viscosidade, as proteínas conferem a estabilidade por serem de natureza anfifílica (21).

A produção de micro e nanopartículas à base de proteínas do soro do leite tem demonstrado eficácia na melhora da solubilidade e biodisponibilidade de bioativos, sejam estes hidrofóbicos ou hidrofílicos (81). Essas proteínas representam de 18 a 20% da proteína total do leite e são obtidas a partir do soro gerado como subproduto da precipitação da caseína ou por extração direta do leite usando tecnologias modernas de concentração e isolamento de proteínas de alimentos. A proteína do soro do leite é composta principalmente de  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg),  $\alpha$ -lactalbumina ( $\alpha$ -La), imunoglobulina e albumina de soro bovino (BSA), que são reconhecidas por possuírem excelentes atividades biológicas. Essa diversidade de grupos funcionais e estruturas moleculares faz dela um agente encapsulante de características únicas, que permitem que essas proteínas se liguem a diversos compostos atuando na melhora de suas estabilidades física e química (82).

As propriedades físico-químicas das pectinas despertaram interesse para aplicação tecnológica desse polissacarídeo no desenvolvimento de nanoestruturas para o transporte de fármacos e compostos bioativos visando liberação intestinal controlada, devido ao seu baixo custo e alta eficiência de encapsulação. É o polissacarídeo vegetal mais abundante na natureza depois da celulose. As pectinas são biopolímeros aniônicos naturais e são classificadas como heteropolissacarídeos complexos compostos por ácido D-galacturônico unidos por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4, com ácido 1-4- $\alpha$ -D-galactopiranurônico – GalpA (ácido galacturônico), que compreende cerca de 70% da estrutura da pectina. As pectinas possuem propriedades importantes para a saúde e uma ampla gama de aplicações tecnológicas. Por ser considerada uma fibra solúvel, sua ingestão pode melhorar a

absorção de nutrientes e saciedade, controlar os níveis de glicose no sangue e reduzir o colesterol enquanto modula a microbiota intestinal de forma benéfica. Em relação às aplicações tecnológicas, as pectinas têm sido amplamente utilizadas na indústria alimentícia como espessante, emulsificante, gelificante, texturizante e na preparação de embalagens para proteção e armazenamento de alimentos (83).

Apesar da nanoencapsulação de compostos bioativos ter despertado o interesse dos cientistas nos últimos anos, observa-se uma carência de trabalhos robustos sobre esse tema quando se trata de antocianinas. Muitos trabalhos que tratam de encapsulação de antocianinas (16, 17, 66, 73, 74, 76, 77, 79, 84, 85, 86), mostram que ainda há uma dificuldade de se obter eficiências de encapsulação acima de 80% e menores tamanhos de partículas, dado que a maior parte dos trabalhos sobre encapsulação de antocianinas obtém produtos na escala dos micrômetros, apresentam caracterizações inconclusivas, além de explorarem muito pouco a biodiversidade das fontes de antocianinas, já que as fontes mais estudadas são as *'berries'* ou antocianinas comerciais purificadas.

Considerando, portanto, o potencial para aproveitamento de frutos de jambolão, dado o seu potencial biológico e nutricional associado ao alto teor de polifenóis e de antocianinas; o efeito tecnologias de assistência ao processo de extração em comparação aos métodos convencionais; a escassez de estudos sobre a obtenção de nanopartículas contendo compostos fenólicos, em especial antocianinas, pelo método de nanoprecipitação; esta pesquisa tem por objetivo desenvolver um método de produção de nanopartículas à base de proteínas do soro do leite e pectina contendo compostos fenólicos e antocianinas de jambolão, e caracterizá-las com relação às suas características físico-químicas e atividade antioxidante *in vitro*.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. MATERIAL VEGETAL

Os frutos maduros de *Syzygium cumini* (L.) Skeels foram obtidos de cultivos domésticos na cidade de Natal, no estado do Rio Grande do Norte/ Brasil, no período de janeiro a fevereiro de 2023. Um espécime dessa planta foi depositado no Herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Norte sob o tombo nº 27098. A pesquisa foi registrada no Sistema de Gestão do Patrimônio Genético Nacional e Tradicionais Associados (SISGEN) com o código ADAE032.

### 4.2. PROCESSAMENTO DA AMOSTRA

O processamento da amostra ocorreu de acordo com os procedimentos estabelecidos no Laboratório de Análises de Alimentos do Departamento de Nutrição/ UFRN. Os frutos foram misturados e higienizados, sendo suas sementes separadas manualmente da porção comestível (polpa e casca), que foram então submetidas a congelamento e liofilizadas a  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  sob pressão de 0.6 Pa e vácuo/ 48 h. Após a secagem, as amostras foram trituradas em liquidificador doméstico e peneiradas em malha de 20 mesh para a obtenção de um pó fino, e armazenadas ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) em embalagem escura até o momento dos testes.

### 4.3. CARACTERIZAÇÃO DA POLPA E CASCA DE JAMBOLÃO

#### 4.3.1. **Determinação da composição centesimal da polpa e casca de jambolão**

A avaliação da composição centesimal foi feita através da determinação dos teores de umidade, cinzas, proteínas, lipídios e fibras de acordo com os métodos da AOAC (87). O teor de carboidratos disponíveis foi estimado pela diferença dos valores de composição determinados experimentalmente, subtraído de 100%. Para o cálculo do valor calórico utilizou-se os coeficientes de Atwater (88), ou seja, para proteínas, 4,0, carboidratos, 4,0, lipídios, 9,0, por grama do macronutriente. A determinação da fibra alimentar insolúvel, fibra alimentar solúvel e fibra alimentar total das polpas foi realizada no Instituto de Tecnologia do Paraná – TECPAR por método enzimático-gravimétrico, protocolo 985.29 da AOAC (89). As demais análises foram realizadas no Laboratório de Análises de Alimentos do

Departamento de Nutrição, em triplicata e em base seca, com exceção da análise de umidade (realizada com amostra *in natura*).

#### **4.3.2. Análise granulométrica**

A farinha de jambolão liofilizada (30 g) foi submetida a tamisação manual em peneiras com aberturas de malha, em mesh, de 10 (2,0 mm), 18 (1,0 mm), 35 (0,50 mm), 60 (0,250 mm), 115 (0,124 mm) e 230 (0,061 mm), As quantidades retidas em cada peneira foram pesadas e expressas em porcentagem. Esta análise foi realizada no Laboratório de Sedimentação do Departamento de Geologia da UFRN.

#### **4.4. EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS PELOS MÉTODOS CONVENCIONAIS E ASSISTIDA POR ULTRASSOM**

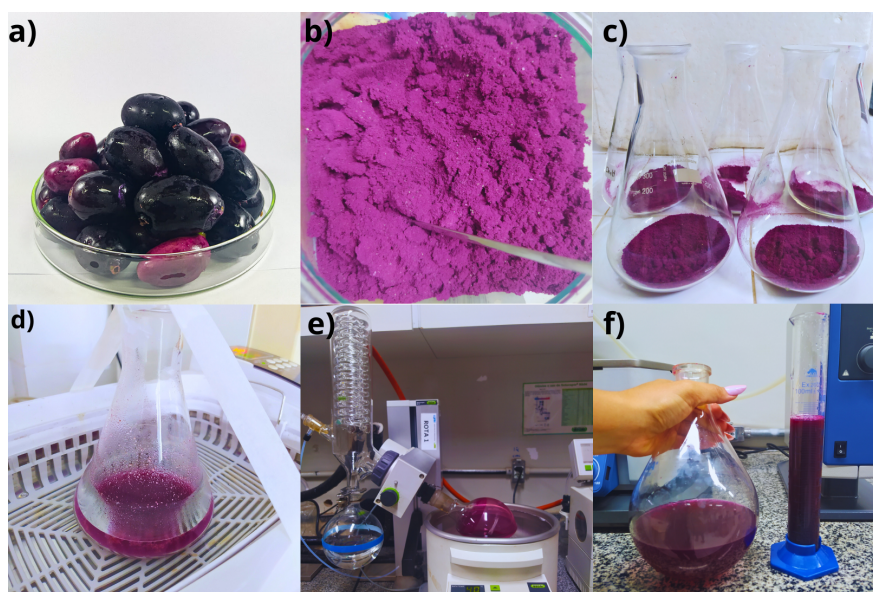
A extração convencional sólido-líquido em banho-maria (EC) foi adaptada de Tantratian *et al.* (90). Para isso, o jambolão liofilizado foi adicionado a um tubo Falcon e suspenso em solvente (etanol 70% acidificado com ácido trifluoracético 0,1%) na proporção de 1:25 p/v (g de fruta seca/ mL de solvente). A extração foi realizada com aquecimento em banho-maria a 70°C em dois ciclos de 1h. Ao final do primeiro ciclo a mistura foi filtrada em papel filtro qualitativo, o resíduo foi suspenso em solvente, submetido ao aquecimento em banho maria por mais 1 hora e filtrado.

A extração exaustiva (EE) foi realizada com agitação (Agitador de soluções Phoenix AP-59), seguida de centrifugação sob refrigeração (Fanem Excelsa® 4, modelo 280-R) a 2540 × g a 25 °C por 20 min (14). O jambolão liofilizado foi adicionado a um tubo Falcon e suspenso em solvente na proporção de 1:6 p/v (g de fruta seca/ mL etanol 70% acidificado com ácido trifluoracético 0,1%). O procedimento foi repetido três vezes até o resíduo se tornar incolor, sendo o volume ajustado ao final da extração para atingir a proporção de 1:25 p/v (g de fruta seca/ mL de solvente).

A extração assistida por ultrassom (EAU), ilustrada na Figura 6, se deu de acordo com descrito por Sabino *et al.* (14) com adaptações. O jambolão liofilizado foi adicionado a um Erlenmayer de 250 ml e suspenso em solvente (etanol 70% acidificado com ácido trifluoracético 0,1%) na proporção de 1:25 p/v (g de fruta seca/ ml de solvente), e submetidos à sonicação usando um banho de ultrassom (Schuster

L200) operando a 40 kHz e potência nominal de 135 W, a uma temperatura média de 30 °C/ 20 minutos, seguida de centrifugação (2540 × g, 25 °C /10 min), para separação do sobrenadante.

**Figura 6.** Etapas da obtenção do extrato de jambolão: a) frutos frescos, b) polpa liofilizada, c) e d) Extração Assistida por Ultrassom, e) e f) extrato concentrado por evaporação.



Fonte: Acervo pessoal.

Os extratos tiveram os volumes ajustados na proporção de 1:25 p/v (g de fruta seca/ mL de solvente), foram liofilizados e armazenado sob abrigo da luz a -20°C até as análises, quando foram resuspenso mantendo a proporção de 1:25 p/v.

#### 4.5. CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS

##### 4.5.1. Compostos Fenólicos Totais

O teor de Compostos Fenólicos Totais (CFT) foi expresso em equivalentes de ácido gálico (mg GAE/g polpa seca) (91). Amostras diluídas dos extratos (150 µl), água destilada (2400 µl) e reagente Folin-Ciocalteu (150 µl) foram homogenizados e deixados em repouso por 3 min, seguido pela adição de uma solução saturada de carbonato de sódio (300 µl). A mistura foi mantida no escuro por 120 min. A absorbância foi medida a 725 nm em espectrofotômetro (Bel

Photonics 1105). A curva de calibração foi preparada a partir de soluções de ácido gálico nas concentrações de 25 a 200 µg/ml. A análise foi realizada no Laboratório de Análises de Alimentos do Departamento de Nutrição-UFRN.

#### 4.5.2. Antocianinas Monoméricas Totais

As antocianinas monoméricas totais (AMT) foram determinadas pelo método do pH diferencial descrito por Lee *et al.* (44). A primeira diluição das amostras foi realizada em tampão cloreto de potássio 0,025 M, pH = 1,0 e uma segunda diluição, nas mesmas proporções, foi realizada em tampão acetato de sódio 0,4 M, pH 4,5. As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro (Bel Photonics 1105) a 510 e 700 nm. As diferenças entre as absorções dos sistemas de diluição foram avaliadas usando as equações (1) e (2) abaixo. Os resultados foram então expressos em equivalentes de cianidin-3-glucoside. A análise foi realizada no Laboratório de Análises de Alimentos do Departamento de Nutrição-UFRN.

$$A = [(A_{520nm} - A_{700nm})_{pH=1,0}] - [(A_{520nm} - A_{700nm})_{pH=4,5}] \quad \text{Eq. 1}$$

$$AMT (cyd - 3 - glu eq. mg/L) = \frac{AxM_w \times FD \times V \times 1000}{M_a \times L \times m} \quad \text{Eq. 2}$$

Onde:  $M_w$  é o peso molecular da cianidin-3-glucoside = 449,2 g/mol; FD: Fator de diluição da amostra em tampão; V: volume do tampão em ml;  $M_a$ : coeficiente de extinção = 26.900 mol/ L x cm; L: comprimento ótico da cubeta (1 cm); m: massa de amostra.

#### 4.5.3. Atividade Antioxidante *in vitro*

O ensaio de inibição do radical ABTS<sup>+</sup> foi baseado no método proposto por Rufino *et al.* (92) e Morais *et al.* (93) com adaptações. As análises foram realizadas no Laboratório de Compostos Bioativos do Laboratório de Engenharia de Alimentos- LEA/ UFRN.

A solução do radical ABTS<sup>+</sup> foi preparada através reação da solução estoque de 7 mM de ABTS com persulfato de potássio 145 mM, deixando a mistura repousar no escuro à temperatura ambiente de 12 a 16 horas antes do uso. A solução ABTS<sup>+</sup> foi diluída até uma absorbância de 0,80 ± 0,02 a 734 nm. Em seguida, 40 µL de amostra diluída (80x) ou padrão trolox (ácido

6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2-carboxílico) foram adicionados em 260  $\mu$ L da solução ABTS<sup>+</sup> e as absorbâncias a 734 nm foram medidas. Uma curva de Inibição foi construída com concentrações de 0,03 a 0,3 mg/ml dos extratos para determinar a concentração que reduz a atividade do radical ABTS<sup>+</sup> em 50% (IC50). Soluções etanólicas de concentrações de 50 a 250  $\mu$ mol de trolox foram usadas para preparação de uma curva de calibração para expressar os resultados como  $\mu$ mol equivalentes de trolox/ ml de extrato e por grama de polpa seca.

#### **4.5.4. Identificação dos compostos fenólicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)**

Para a identificação dos compostos fenólicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), os extratos foram concentrados por rotaevaporação e liofilizados. Os resultados foram expressos em mg/ kg de extrato liofilizado.

Os compostos fenólicos foram determinados em um cromatógrafo WATERS (modelo Alliance e2695) acoplado com DAD e detecção de fluorescência (FD), de acordo com o método descrito por Coelho *et al.* (24). No DAD, foram utilizados os seguintes comprimentos de onda: 220 nm para detecção dos compostos catequina, epicatequina galato e procianidina B1; 320 nm para resveratrol e ácidos cafeico, caftárico, clorogênico e p-cumárico; e 360 nm para kaempferol 3-glicosídeo, quercetina 3-glicosídeo, miricetina, isorhamnetina e rutina. Para a detecção de cianidina 3,5-diglicosídeo, delphinidina 3-galactosídeo, malvidina 3-glicosídeo, malvidina 3,5-diglicosídeo cianidina 3-glicosídeo, peonidina 3-glicosídeo, petunidina 3-glicosídeo delphinidina 3-glicosídeo e pelargonidina 3-glicosídeo, foi utilizado um comprimento de onda de 520 nm. Para a detecção por fluorescência, a excitação foi em 280 nm e a emissão em 360 nm para os compostos epicatequina, procianidina A2, procianidina B2 e ácidos ácido gálico e siringico. Foram usadas uma coluna Gemini NX C18, 150  $\times$  4,60 com partículas internas de 3  $\mu$ m e uma pré-coluna Gemini NX C18 4,0  $\times$  3,0 mm. Tanto a coluna quanto a pré-coluna foram produzidas pela Phenomenex. A temperatura do forno foi de 40°C e o volume de injeção foi de 10  $\mu$ L, com uma vazão de 0,6 mL/min. O gradiente utilizado na separação foi de 0 min: 100% A; 18 min: 87,5% A, 2,5% B e 10% C; 30 min: 83,5% A, 3,2% B e 13,3% C; 36 min: 75% A, 5% B e 20% C; 48,5 min: 65% A, 8,3% B e 26,7% C; 50 min: 65% A, 8,3% B e 26,7% C; 65 min: 100% A; 70 min: 100% A. As fases móveis foram as seguintes: fase A – água ultrapura com

ácido fosfórico até atingir pH 2,05; fase B – metanol; e fase C- acetonitrila. A linearidade para cada composto foi confirmada considerando o valor de  $R^2$  das curvas de calibração que variaram de 0,997 a 0,999. Os limites de detecção variaram de 0,02 a 0,3 mg/L para procianidina B2 e epigallocatequina, respectivamente, e os limites de quantificação variaram de 0,05 a 1,00 mg/L para procianidina A2 e malvidina 3-glicosídeo, respectivamente.

#### **4.6. ENCAPSULAÇÃO DO EXTRATO BRUTO**

A encapsulação do extrato bruto rico em antocianinas e outros compostos fenólicos do jambolão obtido por extração assistida por ultrassom foi realizada por meio da técnica de nanoprecipitação, escolhida a partir de testes preliminares que compararam diferentes técnicas de encapsulação, sendo elas a nanoprecipitação e a emulsificação A/O. Essa etapa foi realizada no Laboratório de Análises de Alimentos do Departamento de Nutrição-UFRN

Para a técnica de nanoprecipitação, foi necessária a formulação de duas fases: a fase solvente, na qual estavam contidos os compostos a serem encapsulados, os agentes encapsulantes e o tensoativo; e a fase antissolvente, composta de um solvente orgânico, no qual a solução anterior foi injetada até gerar a supersaturação e precipitar as partículas. Testes prévios foram realizados no sentido de estabelecer as condições em cada etapa do processo até a obtenção do material encapsulado com características satisfatórias.

Neste estudo, foi avaliada a influência do tipo de proteína utilizada como agente encapsulante em combinação com a pectina, e da composição da fase antissolvente nas características físicas e químicas das partículas produzidas. As demais variáveis do processo foram fixadas tendo como base os testes preliminares e os trabalhos anteriormente desenvolvidos pelo Grupo de Pesquisa em Nutrição e Substâncias Bioativas para Saúde do Programa de Pós-graduação em Nutrição da UFRN (94).

Para a encapsulação por nanoprecipitação, o sobrenadante obtido da EAU foi concentrado em rotaevaporador, liofilizado e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  em frasco escuro. A quantidade de extrato bruto liofilizado utilizada foi definida de acordo com o teor de antocianinas, de modo que fossem adicionados 20 mg do pigmento ao sistema. Foram desenvolvidas duas formulações, ambas contendo aproximadamente 7,33% (2,2 g) do extrato de jambolão liofilizado - E JL (20 mg de

antocianinas e 97 mg de fenólicos totais), 1,67% (0,5 g) de pectina cítrica de baixa metoxilação (PEC) (GRINDSTED® Pectin YSF357 fornecida pela *International Flavors & Fragrances* Inc. IFF), e 5% proteína do soro do leite concentrada - EWPC (1,5 g) (Nutri Whey 800F), ou proteína do soro do leite isolada - EWPI (1,5 g) (Nutri Whey Isolate I), ambas fabricadas pela Frieslandcampina®, fornecidas pela MasterSense Ingredientes e Aromas®. As formulações são apresentadas na Tabela 1 abaixo.

**Tabela 1.** Formulações desenvolvidas para as e composições das fases solvente e antissolvente avaliadas.

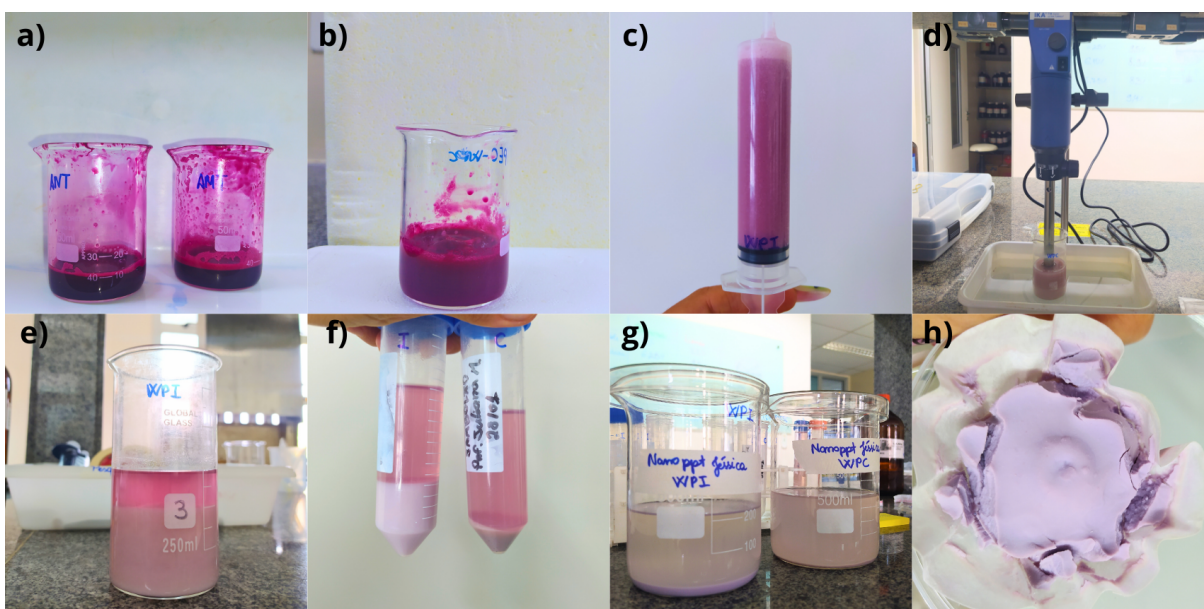
<b>Código da formulação</b>	<b>Materiais utilizados</b>	<b>Composição da fase Antissolvente</b>
EWPC100		Acetona Absoluta
EWPC70	EJL + PEC + WPC	Acetona 70% v/v
EWPC50		Acetona 50% v/v
EWPI100		Acetona Absoluta
EWPI70	EJL + PEC + WPI	Acetona 70% v/v
EWPI50		Acetona 50% v/v

EJL- extrato de jambolão liofilizado; PEC- pectina; WPC- proteína do soro do leite concentrada; WPI- proteína do soro do leite isolada; EWPC100- encapsulado em pectina e proteína do soro do leite concentrada precipitado em acetona absoluta; EWPC70- encapsulado em pectina e proteína do soro do leite concentrada precipitado em acetona 70% v/v; EWPC50- encapsulado em pectina e proteína do soro do leite concentrada precipitado em acetona 50% v/v; EWPI100- encapsulado em pectina e proteína do soro do leite isolada precipitado em acetona absoluta; EWPI70- encapsulado em pectina e proteína do soro do leite isolada precipitado em acetona 70% v/v; e EWPI50- encapsulado em pectina e proteína do soro do leite isolada concentrada isolada precipitado em acetona 50% v/v.

Todas as soluções foram preparadas pela dissolução dos componentes em água destilada à temperatura ambiente, com exceção da pectina que foi aquecida e solubilizada a 70 °C. Após resfriada, a pectina foi deixada para interagir com o extrato '*overnight*'. As proteínas, separadamente, também foram preparadas com antecedência e deixadas para hidratar '*overnight*' de modo a garantir a solvatação das cadeias. Após esse tempo, a mistura PEC+EJL foi adicionada à solução de proteínas e mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente por 3 h. Em seguida, foi adicionado Tween 80 na proporção de 10% e o volume total da

solução de injeção foi ajustado para 30 ml. O sistema permaneceu em agitação magnética por mais 1h. As composições formulações das fases antissolventes avaliadas neste estudo foram acetona absoluta, 70% e 50% v/v. A Figura 7 ilustra as etapas para a obtenção das partículas pela técnica pelo processo de nanoprecipitação.

**Figura 7.** Etapas da nanoprecipitação: a) solução de E JL, b) extrato + pectina, c) solução contendo a fase solvente da formulação EWPI, d) encapsulação por meio da técnica de nanoprecipitação, e) partículas precipitadas em acetona, f) centrifugação, g) desidratação em acetona absoluta, e h) partículas obtidas após a filtração a vácuo.

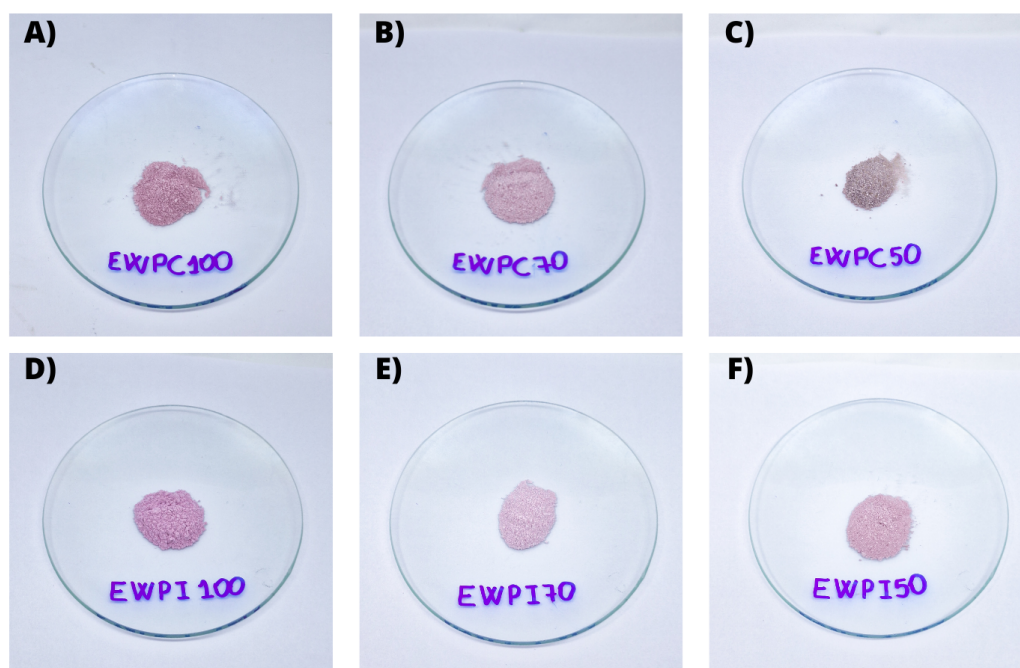


Fonte: Acervo pessoal.

EJL- extrato de jambolão liofilizado; EWPI- encapsulado a base de proteína do soro do leite isolada e pectina contendo antocianinas e outros polifenóis do jambolão.

Na etapa da precipitação, as formulações EWPC e EWPI foram injetadas em 120 ml das diferentes composições de acetona, sob ação ultradispersor (IKA®) a 17.000 rpm por 10 minutos. Em seguida, as dispersões foram centrifugadas (Fanem Excelsa® 4, modelo 280-R) a 800 rpm/ 10 min, o precipitado foi coletado e submetido a desidratação em acetona absoluta na proporção de 1:10 (p/p) por aproximadamente 16 horas. Após esse tempo, o material desidratado foi filtrado a vácuo em papel filtro qualitativo e foi liofilizado para obtenção de um pó (Figura 8).

**Figura 8.** Materiais encapsulados em pó. A) EWPC100; B) EWPC70; C) EWPC50; D) EWPI100 E) EWPI70; e F) EWPI150.



Fonte: Acervo pessoal.

EWPC100 - encapsulado em pectina e proteína do soro do leite concentrada precipitado em acetona absoluta; EWPC70 - encapsulado em pectina e proteína do soro do leite concentrada precipitado em acetona 70% v/v; EWPC50 - encapsulado em pectina e proteína do soro do leite concentrada precipitado em acetona 50% v/v; EWPI100 - encapsulado em pectina e proteína do soro do leite isolada precipitado em acetona absoluta; EWPI70 - encapsulado em pectina e proteína do soro do leite isolada precipitado em acetona 70% v/v; e EWPI50 - encapsulado em proteína do soro do leite isolada precipitado em acetona 50% v/v.

#### 4.6.1. Determinação da Eficiência de Encapsulação (EE%)

Após a etapa de centrifugação dos sistemas de encapsulação, o sobrenadante foi recolhido, o volume recuperado foi registrado e foram quantificados os teores de FT e AMT de acordo com os métodos descritos acima (Tópicos 4.5.1 e 4.5.2). A eficiência de encapsulação (EE%) foi utilizada como parâmetro para seleção dos materiais mais adequados para prosseguirem para as próximas etapas da caracterização. A EE% dos compostos fenólicos e das antocianinas foi calculada de acordo com as equações 3 e 4 descritas abaixo (16).

$$EE\% \text{ AMT} = \frac{(AMT \text{ adicionadas} - AMT \text{ sobrenadante})}{AMT \text{ adicionadas}} * 100 \text{ (Equação 3)}$$

$$EE\% FT = \frac{(FT \text{ adicionados} - FT \text{ sobrenadante})}{FT \text{ adicionados}} * 100 \text{ (Equação 4)}$$

#### 4.6.2. Caracterização das partículas

##### 4.6.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As partículas foram suspensas em acetona e as dispersões foram gotejadas em placas de silicone presas aos *stubs* com fita de carbono. Os materiais foram analisados em diferentes ampliações em alto vácuo a 5,0 kV e sem metalização usando um microscópio FEG-SEM ZEISS (AURIGA), no Laboratório de Caracterização Estrutural de Materiais do Departamento de Engenharia de Materiais da UFRN.

##### 4.6.2.2. Tamanho de Partícula e Índice de Poldispersão (PDI) por DLS

A técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) foi utilizada para determinar o diâmetro hidrodinâmico (DH) das partículas em suspensão, além de fornecer os valores de índice de poldispersão das partículas em solução. O tamanho médio das partículas foi avaliado utilizando o equipamento NANO-flex II 180° DLS *Particles Size (Colloid Metrix)* no Laboratório de Pesquisa em Petróleo (LAPET) do Instituto de Química da UFRN. O equipamento possui um laser monocromático com comprimento de onda de 785 nm.

Para a mensuração do diâmetro das partículas, o material foi disperso em tampão fosfato pH 7,0 na concentração de 1 mg/ml. Essa dispersão foi utilizada nas leituras. Os dados foram analisados utilizando o software do NANO-flex Control 0.9.7 e plotados em gráficos com a distribuição de tamanho de partícula e índice de poldispersão.

##### 4.6.2.3. Potencial Zeta ( $\zeta$ )

As medidas do Potencial Zeta das formulações em diferentes faixas de pH foram determinadas utilizando o equipamento STABINO II Particle charge Titration (Colloid Metrix), realizado no Laboratório de Pesquisa em Petróleo (LAPET – UFRN). Para isso, 10 mg da amostra foi diluída em 10 ml de solução de KCl 10 mM, e depois transferida para a célula cilíndrica de teflon. As partículas foram tituladas com soluções de HCl 0,1 M e NaOH 0,025 M de modo a construir uma curva de potencial Zeta em função do pH nos valores de 1,5 a 9,0.

#### 4.6.2.4. Espectrofotometria Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os agentes encapsulantes, o extrato bruto liofilizado, o tensoativo e os encapsulados foram registrados em transmitância e com região do infravermelho médio na faixa de 500 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ . As análises ocorreram no Laboratório de Materiais Multifuncionais e Experimentação Numérica (LAMMEN) - ECT UFRN, e o equipamento utilizado foi o espectrômetro BRUKER modelo FT-IR VERTEX 70.

#### 4.6.2.5. Difração de Raio-X (DRX)

As análises ocorreram no LAMMEN - ECT UFRN, e o equipamento utilizado foi o Difrátmetro BRUKER modelo D2 PHASER. Essa análise foi utilizada para avaliar se a fase dominante nos materiais é cristalina ou amorfa. Os agentes encapsulantes e as formulações do encapsulado foram inseridos no porta amostra cilíndrico, e os espectros foram obtidos com varredura ( $2\Theta$ ) entre  $3^\circ$  a  $70^\circ$  e passo angular  $0,02^\circ$ .

### 4.6.3. Atividade Antioxidante *in vitro* das partículas

Considerando que os compostos fenólicos totais são os principais responsáveis pela atividade antioxidante do jambolão (45), a capacidade antioxidantes das partículas foi comparada a do extrato de jambolão liofilizado (EAJ) tendo como ponto de normalização o teor de compostos fenólicos totais (CFT). Ou seja, foi calculada a quantidade em miligramas de cada sistema de partículas que, conforme a eficiência de encapsulação para CFT (EE% CFT), apresentava o mesmo teor de compostos fenólicos que o EAJ. Na sequência, a atividade antioxidante do EAJ e das partículas foi avaliada pelo ensaio de captura do radical ABTS, cuja metodologia já foi descrita no item 4.5.3 (93).

Para o EAJ, uma solução-mãe foi preparada na concentração de 40 mg/ml e, em seguida, diluída na proporção de 1:80 p/v. Para as partículas, foi utilizada uma solução-mãe na concentração de 8,2 mg/ml foi preparada e diluída em tampão pH 7,0 na proporção de 1:20 p/v. No teste, 40  $\mu\text{l}$  de amostra diluída foram adicionados em 260  $\mu\text{l}$  da solução ABTS<sup>+</sup> e as absorbâncias foram medidas a 734 nm. Para construção das curvas de calibração, soluções etanólicas de concentrações de 50 a 250  $\mu\text{mol}$  de trolox foram utilizadas. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  equivalentes de trolox/ mg de extrato ou encapsulado.

#### 4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises foram realizadas em triplicatas e os resultados foram expressos em média e desvio padrão. O software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc.; La Jolla, CA, EUA) foi usado para realizar todas as análises estatísticas. A significância dos dados foi determinada usando a Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. CARACTERIZAÇÃO DA POLPA DE JAMBOLÃO

#### 5.1.1. Composição Centesimal

Os resultados obtidos para os teores de umidade, cinzas, proteínas, lipídeos, fibra alimentar total e o teor estimado de carboidratos e valor calórico estão descritos na Tabela 2.

**Tabela 2.** Composição centesimal da polpa de jambolão.

<b>Composição centesimal (g/ 100g)</b>	<b>Base Úmida</b>	<b>Base Seca</b>
Umidade	88,14 (0,52)	ND
Cinzas	0,30 (0,01)	2,55 (0,10)
Proteínas	0,86 (0,05)	7,42 (0,38)
Lipídeos	0,19 (0,01)	1,63 (0,05)
Carboidratos	7,89	68,07
Fibras Alimentar Total	2,36 (0,27)	20,33 (2,32)
Fibra Alimentar Solúvel	ND	ND
Fibra Alimentar Insolúvel	2,36 (0,27)	20,33 (2,32)
Valor Calórico (Kcal/ 100g)	37	317

Resultados expressos como Valor médio  $\pm$  Desvio padrão. ND- Não detectado

O teor de umidade encontrado é semelhante ao reportado por Brito *et al.* (50) (87,20 g/100 g) ao estudar a composição de frutos do jambolão oriundos da região amazônica. Os teores de cinzas, proteínas e lipídeos são semelhantes aos encontrados em frutos coletados na região de Minas Gerais por Vital *et al.* (95) (cinzas: 0,30 a 0,39 g/100 g; proteínas: 0,69 a 0,81 g/100 g; lipídeos: 0,23 a 0,30 g/100g) e em frutos da região sul do país avaliados por Barcia *et al.* (96) (cinzas: 0,35 a 0,42 g/100 g; proteínas: 0,73 a 0,91 g/100 g). No entanto, o teor de fibras da amostra avaliada neste trabalho (2,55 g/100 g) foi significativamente maior que a

informada nos estudos citados, onde valores de 0,19 a 0,28 g/100 g (92) e de 0,40 a 0,57 g/100g (96) foram encontrados. Este tipo de variação da composição de frutos coletados em diferentes regiões do país é esperado, dado que a composição química dos frutos depende das condições geográficas e climáticas (clima, relevo, temperatura, umidade do ar, composição atmosférica e precipitação pluvial) (95).

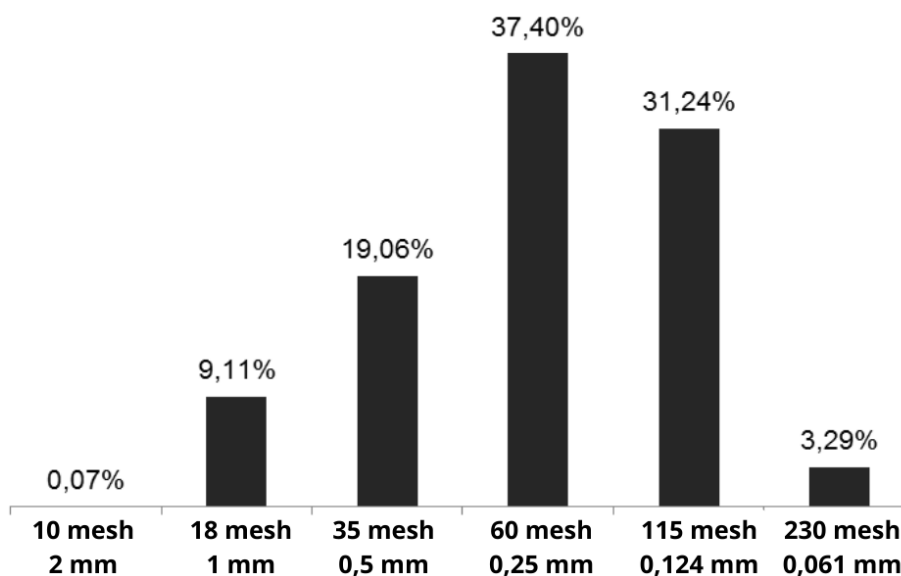
O estudo da composição química do material é essencial na etapa de delineamento dos processos extrativos pois define possíveis pré-tratamentos das amostras para extração, visando o aumento da eficiência dos resultados. O teor de água da matéria-prima afeta fortemente os processos de degradação e o rendimento de extração dos compostos fenólicos (97). Os frutos de jambolão estudados apresentaram uma alta umidade (88,14%), que foi retirada através de liofilização, técnica de desidratação reconhecidamente eficiente na remoção da água com alta preservação de compostos sensíveis pelo uso de baixas temperaturas, visando reduzir a perecibilidade da polpa, preservando assim suas características físicas e os teores de compostos bioativos.

O conteúdo lipídico é também um importante fator a ser considerado no projeto de processos de extração, especialmente quando se pensa em modelos de biorrefinaria para recuperação de produtos de alto valor agregado a partir de matérias-primas sub-utilizadas e subprodutos industriais, além de influenciar a seleção do solvente e a solubilidade dos compostos-alvo. Se o teor de lipídios for expressivo, é recomendado desengordurar a matéria-prima previamente à aplicação de técnicas de extração sólido-líquido (98), o que não foi necessário neste trabalho devido ao baixo teor de lipídios encontrado (1,63% em base seca).

### **5.1.2. Análise Granulométrica**

A partir da análise de granulometria, observa-se que a maior parte das partículas da amostra (87,70%) foram retidas nas peneiras com aberturas de 35 a 115 mesh (Figura 9), que correspondem a partículas de tamanhos entre 120 e 500  $\mu\text{m}$ , com tamanho de partícula médio (calculado por média geométrica) (99)  $d_p = 249 \mu\text{m}$ , o que categoriza a amostra como um pó (partículas de 1  $\mu\text{m}$  a 0,5 mm) (100).

**Figura 9.** Gráfico de distribuição da granulometria da polpa e casca de jambolão liofilizadas em função da abertura da malha da peneira.



Cada fase do processo de extração deve ser sistematicamente controlada, desde o pré-tratamento do material, incluindo secagem, trituração e padronização da amostra por tamisação, até a extração final, pois podem impactar a eficiência de todo o processo. A redução do tamanho das partículas por moagem aumenta a difusividade dos compostos, pois aumenta a área superficial facilitando a transferência dos ativos da matriz para o solvente, o que otimiza o tempo e a cinética de extração (101).

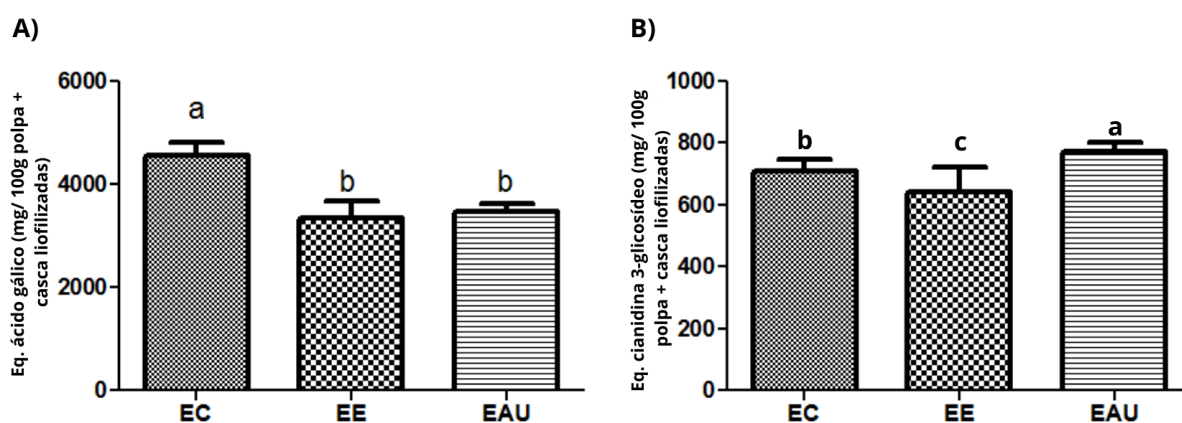
## 5.2. CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS DE JAMBOLÃO OBTIDOS POR MÉTODOS CONVENCIONAIS E ASSISTIDO POR ULTRASSOM

As técnicas convencionais de extração de antocianinas e outros compostos fenólicos baseiam-se no uso de diferentes tipos de solventes e/ou calor. Os solventes comumente utilizados são metanol, etanol, água, acetona ou suas misturas. Quando o alvo da extração são antocianinas, torna-se interessante adicionar ácidos fracos (ácido fórmico, cítrico, acético, entre outros) aos solventes, que ajudam na estabilização do cátion flavilium, o qual é estável em condições ácidas (pH ~ 3). Além disso, devido à sua natureza polar, a adição de água aos solventes também colabora para a melhora do rendimento de extração destas substâncias (102). Tendo em vista aplicações futuras, o etanol foi escolhido por ser considerado um solvente seguro para uso em ingredientes alimentares, e foi

utilizado na proporção de 70% (v/v), acidificado com ácido trifluoracético (TFA) na concentração de 0,1% (v/v), com base nas recomendações de Sabino *et al.* (14).

Os teores de compostos fenólicos totais (CFT), expressos em mg eq. ácido gálico/ 100 g de polpa + casca liofilizada (Figura 10A), encontrados foram de 4564,7 (59,3) mg/ 100 g para extração convencional (EC); 3326,85 (65,3) mg/ 100 g para extração exaustiva (EE); e 3479,41 (6,6) mg/ 100 g para extração assistida por ultrassom (EAU), não havendo diferença significativa entre EE e EAU ( $p < 0,05$ ), porém, EC diferiu significativamente ( $p < 0,05$ ) dos demais métodos. No entanto, ao avaliar os teores de antocianinas monoméricas totais (AMT) (Figura 10B), expressos em mg eq. cianidina 3-glicosídeo/ 100 g de polpa + casca liofilizada, o método EAU apresentou maiores concentrações de AMT [771,51 (11,6) mg/ 100 g], seguido pela EC [708,44 (14,93) mg/ 100 g] e EE [639,61 (32,9) mg/ 100 g]. Os resultados de AMT diferiram significativamente entre os métodos estudados ( $p < 0,05$ ), sendo possível afirmar que diferentes tratamentos afetam a seletividade da extração, visto que a EAU se mostrou mais seletiva para obtenção de um extrato rico em antocianinas em comparação aos demais métodos.

**Figura 10:** Teores de fenólicos totais (A) e antocianinas monoméricas totais (B) para os extratos obtidos por técnicas convencionais e por tecnologia de ultrassom.



Letras iguais indicam médias que não diferiram entre si (Tukey,  $p \leq 0,05$ ). EC- extração convencional; EE- extração exaustiva; EAU- extração assistida por ultrassom. A) Resultados apresentados em mg de equivalente de ácido gálico por 100 g de polpa+casca liofilizada. B) Resultados apresentados em mg de equivalente de cianidina 3-glicosídeo por 100 g de polpa+casca liofilizada.

Tempo e temperatura são dois parâmetros críticos a serem avaliados nos processos de extração. Enquanto o emprego da temperatura por um maior período

no banho-maria pode levar à degradação de compostos sensíveis como as antocianinas (59), os resultados deste estudo sugerem que a extração de alguns tipos de compostos fenólicos pode ser favorecida, pois observou-se que EC apresentou maiores teores de CFT.

O aumento nos rendimentos da extração de CFT com emprego de temperaturas mais elevadas é associado ao fato de que a energia térmica melhora a eficiência da extração por promover quebra das estruturas celulares levando ao aumento da permeabilidade da membrana e rompimento das interações da matriz vegetal (compostos fenólicos com lipoproteínas), o que causa aumento da solubilidade dos compostos fenólicos e da transferência de massa. No entanto, como foi observado a partir dos resultados de AMT obtidos, a EAU demonstra boa eficiência de extração, tanto em termos de rendimento de extração como pela economia de tempo e energia gerada nos processos, obtendo teores de AMT superiores em  $\frac{1}{6}$  do tempo de extração de EC. Tendo em vista que a temperatura empregada em métodos com significativo aquecimento pode levar a degradação de compostos fenólicos termossensíveis (59), a EAU apresenta como vantagens a melhora da qualidade do extrato considerando os compostos de maior interesse, cinética mais rápida, além de, em comparação com outros métodos de extração modernos como a extração assistida por micro-ondas, por altas pressões e extração com fluido supercrítico, o instrumento de ultrassom é mais acessível (102).

Diferente do que foi observado no presente estudo, Jovanović *et al.* (102) compararam três processos de extração de polifenóis de *Thymus serpyllum*: maceração em temperatura ambiente, extração a 80°C e EAU, utilizando etanol 50% como solvente, e encontrou diferenças significativas entre os resultados de 26,6 mg eq. ácido gálico/L, 29,8 mg eq. ácido gálico/L e 32,77 mg eq. ácido gálico/L, respectivamente. Beaudor *et al.* (103) também compararam a extração convencional com temperatura de 50°C com a EAU utilizando etanol 50% como solvente na recuperação de compostos fenólicos de borra de café. A extração convencional e EAU renderam os teores de 9 mg eq. ácido gálico/g e 12 mg eq. ácido gálico/g, respectivamente, que foram significativamente diferentes. A aplicação do ultrassom promoveu cerca de 33% de melhoria na recuperação de polifenóis e mais de 50% de economia de energia.

Diversos autores têm reportado a utilização e otimização das condições de aplicação da tecnologia de ultrassom para a extração de compostos fenólicos,

especialmente antocianinas (14, 66, 104, 105, 106). Kenari & Razavi (107) compararam os rendimentos de extratos ricos em compostos fenólicos e antocianinas de *Bouganvillea spectabilis* obtidos por maceração/agitação e banho de ultrassom, com etanol 50% como solvente, a 35°C/1h. Os melhores resultados foram observados para o extrato obtido no banho de ultrassom (CFT: 2870 mg eq. ácido gálico/ 100 g de peso fresco; AMT: 69,48 mg eq. cianidina 3-glicosídeo / 100 g de peso fresco) tendo a maceração/ agitação nas mesmas condições apresentado rendimentos de extração significativamente mais baixos (CFT: 2115 mg eq. ácido gálico/ 100 g de peso fresco; AMT: 28,31 mg eq. cianidina 3-glicosídeo / 100 g de peso fresco).

A extração assistida por ultrassom (EAU) oferece a possibilidade de reduzir ou eliminar o uso de solventes tóxicos, com melhor eficiência do processo de extração e aumento da qualidade/ seletividade e dos rendimentos da extração. Essa tecnologia também é uma técnica de extração que não promove significativo aquecimento da amostra, a temperatura amena (30°C) não afeta a estabilidade dos compostos extraídos. Em nosso estudo, a extração exaustiva obteve bons rendimentos devido ao esgotamento da matéria-prima, em que EE e EAU não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nos rendimentos de extração de CFT, embora os resultados de EAU tenham sido alcançados em  $\frac{1}{3}$  do tempo de extração de EE, em um único ciclo, sem a necessidade de conduzir a extração até a exaustão da matéria-prima.

Em outro achado importante, os extratos mostraram forte atividade antioxidante, onde a concentração que reduziu a atividade antioxidante em 50% (IC50) do ABTS foi de 0,18 mg/mL para EC; 0,20 mg/mL para EE; e 0,21 mg/mL para EAU. Valores mais baixos indicam elevada atividade antioxidante das amostras. Os resultados de atividade antioxidante avaliada por ABTS em mmol eq. trolox/ g de polpa + casca liofilizada para EC [421,85 (1,83) mmol eq. trolox/ g], EE [377,42 (36,79) mmol eq. trolox/ g] e EAU [300,99 (25,66) mmol eq. trolox/ g] diferiram significativamente entre EC e EAU e entre EE e EAU. A atividade antioxidante mais alta para EC está de acordo com o teor de CFT observado para esse extrato e corrobora com os achados de Singh *et al.* (45) que mostraram que outros compostos fenólicos além das antocianinas podem ser os principais responsáveis pela atividade antioxidante do jambolão.

Virgen-Carrillo *et al.* (108), ao investigar a atividade antioxidante (IC50) de 8 variedades de '*berries*' (framboesas, mirtilos e amoras) cultivadas no oeste do México, encontraram valores de IC50 para o ABTS que variaram de 2,26 a 7,5 mg/mL, em extratos preparados a partir das frutas liofilizadas. Huang *et al.* (109) avaliaram a atividade antioxidante por ABTS das *berries* mirtilo, amora e morango cultivadas em Nanjing, na China, e obtiveram resultados de 14,98, 11,48 e 4,44 mmol eq. trolox/ 100 g peso seco, respectivamente. Esses resultados mostram o alto potencial dos extratos de jambolão avaliados neste estudo, mesmo em comparação com outras espécies de *berries* altamente consumidas e mais conhecidas pela indústria de alimentos.

Yuan *et al.* (110) compararam a atividade antioxidante por ABTS de extratos de própolis ricos em compostos fenólicos obtidos pelos métodos de extração convencional com agitação (EC) à temperatura ambiente e assistida por ultrassom (EAU), com etanol 80% como solvente e não observaram diferença significativa nos valores de atividade antioxidante entre os métodos (EC: 2,13; EAU: 2,19 mmol eq. trolox/ g peso seco) no entanto, EAU foi obtido em um tempo de extração muito menor (17 minutos) comparado a EC (1440 min).

Os resultados obtidos para EE e EAU reforçam a hipótese que diferentes métodos de extração aplicados a uma mesma amostra podem resultar em perfis distintos de compostos, pois mesmo com teores similares de CFT, os extratos EE e EAU apresentaram diferentes atividades antioxidantes. De maneira geral, estes resultados demonstram o potencial bioativo dos extratos de jambolão, pois a atividade antioxidante tem uma relação direta com as funcionalidades biológicas (anticâncer, antidiabética, cardioprotetora, entre outras) atribuídas aos compostos fenólicos e ao jambolão (45). Além disso, ao selecionar o método, é crucial levar em conta os propósitos de utilização dos extratos gerados, como no caso do presente trabalho que visou a extração seletiva de antocianinas considerando o poder corante desta classe de fenólicos, atestando o potencial de utilização de EAU.

### **5.2.1. Identificação dos compostos fenólicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)**

Os resultados dos compostos fenólicos identificados nos extratos são mostrados na Tabela 3.

**Tabela 3:** Compostos fenólicos identificados nos extratos de jambolão obtidos por diferentes métodos de extração.

Compostos Fenólicos (mg/kg)	Método de Extração		
	EC	EE	EAU
<b>Ácidos Fenólicos</b>			
Ácido Gálico	152,96 (45,11) <sup>a</sup>	116,22 (0,95) <sup>ab</sup>	76,13 (0,56) <sup>b</sup>
Ácido Siríngico	ND	ND	ND
Ácido Caftárico	138,09 (1,29) <sup>b</sup>	157,37 (5,33) <sup>a</sup>	142,15 (11,25) <sup>b</sup>
Ácido Clorogênico	5,34 (0,40) <sup>a</sup>	4,40 (0,22) <sup>a</sup>	6,78 (5,50) <sup>a</sup>
Ácido Cafeico	17,79 (0,40) <sup>a</sup>	20,56(0,86) <sup>a</sup>	16,76 (2,50) <sup>a</sup>
Ácido p-Cumárico	ND	ND	ND
<b>Flavonoides</b>			
Hesperidina	ND	ND	ND
Cis-Resveratrol	ND	ND	ND
Narigenina	ND	ND	ND
trans-Resveratrol	ND	ND	ND
Miricetina	ND	ND	39,72*
Quercetina 3-Glicosídeo	3,33 (0,32) <sup>a</sup>	4,43 (0,09) <sup>a</sup>	4,36*
Rutina	1,46 (0,40) <sup>b</sup>	18,24 (20,90) <sup>a</sup>	33,02*
Isoramnetina	ND	ND	ND
Kaempferol 3-Glicosídeo	2,99 (1,07) <sup>a</sup>	24,89 (26,70) <sup>a</sup>	5,23 (4,30) <sup>a</sup>
<b>Flavan-3-ol e Taninos condensados</b>			
Procianidina B1	ND	13,96*	17,90 (0,37)*
Catequina	25,62 (2,65) <sup>b</sup>	31,67 (0,15) <sup>a</sup>	23,63 (0,28) <sup>b</sup>
Procianidina B2	475,85 (9,22) <sup>b</sup>	544,84 (22,47) <sup>a</sup>	488,44 (35,64) <sup>b</sup>
Epilocalocatequina galato	ND	ND	ND
Epicatequina	16,38 (1,22) <sup>b</sup>	20,20 (0,25) <sup>a</sup>	13,44 (0,13) <sup>c</sup>
Epicatequina galato	ND	ND	ND
Procianidina A2	ND	ND	ND

Antocianinas			
Cianidina 3,5-diglicosídeo	302,40 (0,40) <sup>ab</sup>	335,33 (9,43) <sup>a</sup>	281,49 (37,57) <sup>b</sup>
Delfinidina 3-galactosídeo	566,33 (26,60) <sup>ab</sup>	607,70 (31,27) <sup>a</sup>	514,88 (67,78) <sup>b</sup>
Delfinidina 3-glicosídeo	ND	ND	ND
Malvidina 3,5-diglicosídeo	2744,32 (77,07) <sup>ab</sup>	2919,28 (96,28) <sup>a</sup>	2438,60 (298,21) <sup>b</sup>
Cianidina 3-glicosídeo	ND	ND	ND
Pelargonidina 3-glicosídeo	ND	ND	ND
Peonidina 3-glicosídeo	ND	ND	ND
Malvidina 3-glicosídeo	ND	20,41 (0,06)	ND
Petunidina 3-glicosídeo	ND	ND	ND
<b>Compostos Fenólicos</b>			
<b>Totais</b>	<b>4453 (120,1)<sup>ab</sup></b>	<b>4840 (109,6)<sup>a</sup></b>	<b>4103 (455,2)<sup>b</sup></b>
<b>Antocianinas Totais</b>	<b>3613 (58,9)<sup>ab</sup></b>	<b>3883 (137)<sup>a</sup></b>	<b>3235 (403,6)<sup>b</sup></b>

Valor médio (desvio padrão). Letras iguais na mesma linha indicam médias que não diferiram entre si (Tukey,  $p \leq 0,05$ ). O símbolo “\*” indica valores em que não foi possível fazer análises estatísticas. ND- não detectado. EC- extração convencional; EE- extração exaustiva; EAU- extração assistida por ultrassom. Resultados expressos em mg/ kg de extrato liofilizado.

Foram identificados 13 compostos nos extratos, dentre os 30 padrões testados: ácidos fenólicos (caftárico, gálico, cafeico e clorogênico); monômeros de flavan-3-ol e taninos condensados (catequina, epicatequina, procianidinas B1 e B2); flavonóis (miricetina, quercetina 3-glicosídeo, rutina, kaempferol 3-glicosídeo); e antocianinas (malvidina 3,5-diglicosídeo, delfinidina 3-galactosídeo e cianidina 3,5-diglicosídeo).

As antocianinas foram os compostos predominantes encontrados nos extratos, correspondendo a cerca de 80% do total de compostos fenólicos quantificados pela análise de HPLC. O perfil identificado apresentou as seguintes antocianinas: malvidina 3,5-diglicosídeo, delfinidina 3-galactosídeo e cianidina 3,5-diglicosídeo, cujos teores diferiram significativamente entre EE e EAU, mas a diferença não foi significativa entre EC e EE, e entre EC e EAU. O extrato EE apresentou também em seu perfil malvidina 3-glicosídeo em menor quantidade.

Os altos teores de antocianinas com relação às concentrações encontradas para os demais compostos fenólicos avaliados destacam a seletividade dos métodos estudados para a obtenção de extratos ricos em antocianinas. Ademais, também indicam o grau de maturação dos frutos utilizados, visto que os níveis de flavonóis, elagitaninos e ácidos fenólicos são maiores nos estágios iniciais de maturação e diminuem com o amadurecimento do fruto, enquanto em relação às antocianinas, os valores aumentam ao longo da maturação com as maiores concentrações ocorrendo nos estágios de maturação avançados em que os frutos de jambolão apresentam cores de roxo escuro para preto (111).

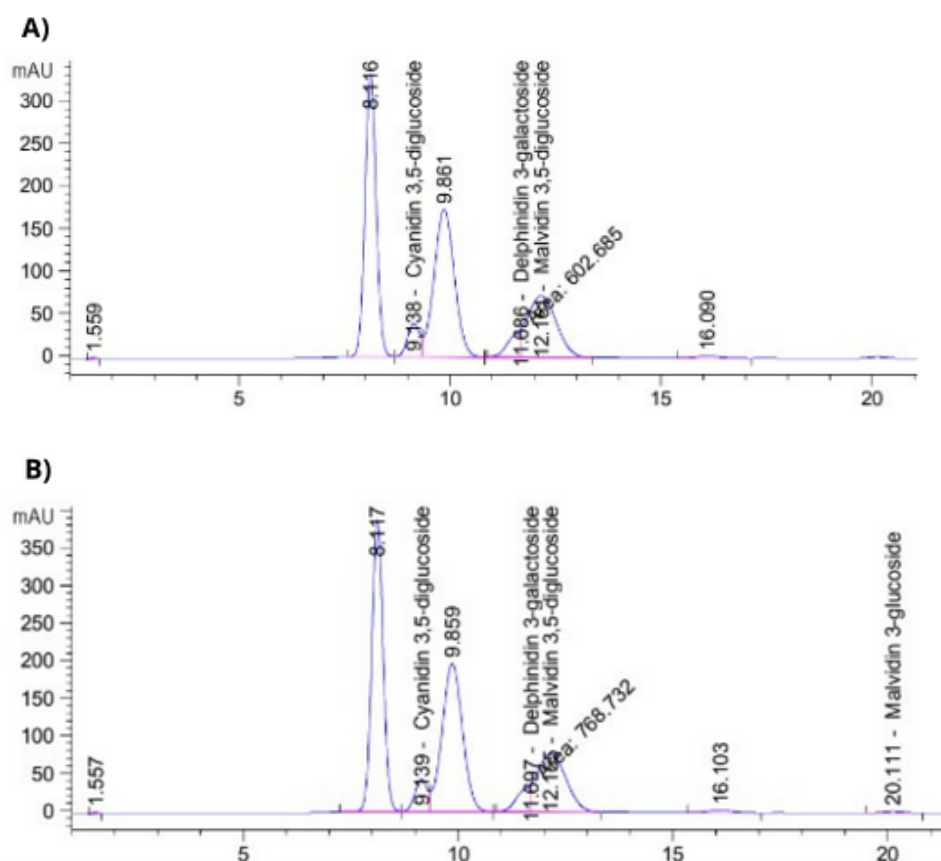
Os teores de malvidina 3,5-diglicosídeo e cianidina 3,5-diglicosídeo encontrados nos extratos condizem com os teores destes mesmos compostos identificados por Lestario *et al.* (111) [2683 (38) mg/kg e 356 (6,9) mg/kg, respectivamente] em frutos de jambolão em estágio de amadurecimento completo. Teores similares de cianidina 3,5-diglicosídeo também foram observados por Brito *et al.* (112) (290 mg/kg), que também identificou a presença de malvidina 3,5-diglicosídeo nas amostras de jambolão estudadas, mas em quantidades menores do que as encontradas em nosso estudo (1660 mg/kg). Os valores observados para os extratos estudados para malvidina 3,5-diglicosídeo e cianidina 3,5-diglicosídeo foram superiores aos encontrados por Faria *et al.* (113) ao avaliar a composição bioativa da fruta e do extrato funcional de jambolão, com quantidades malvidina 3,5-diglicosídeo de 320 e 292 mg/kg e cianidina 3,5-diglicosídeo de 88 e 67 mg/kg, respectivamente. A presença de delphinidina 3-galactosídeo não foi identificada nos estudos utilizados como referência. A discrepância entre os resultados obtidos no presente estudo e os demais resultados apresentados pode ser devido à diferença varietal, variação nas condições ambientais de crescimento, ou mesmo diferenças nos protocolos de obtenção dos extratos.

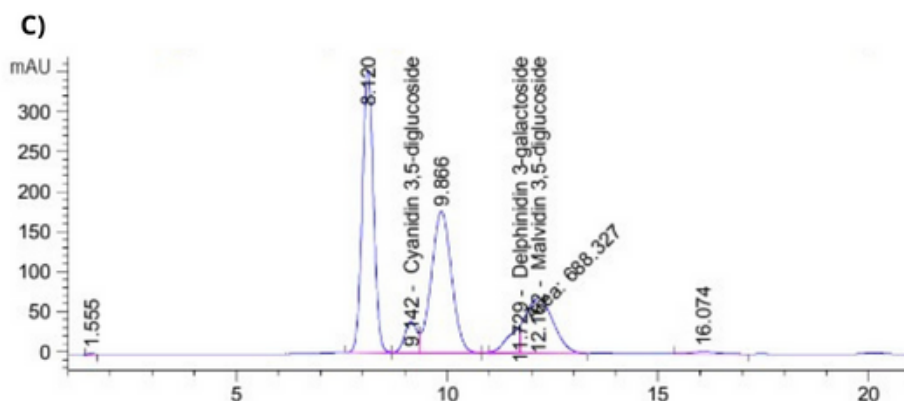
O perfil de antocianinas reportado na literatura (11, 38, 111, 112, 113, 114, 115, 116) mostra a predominância de 3,5-diglicosídeos de delphinidina, petunidina e malvidina como as principais antocianinas e 3-glicosídeos de delphinidina, cianidina e malvidina em menores quantidades, os quais não foram detectados nos extratos avaliados neste estudo. O perfil apresentado por Lestario *et al.* (111) identificou 6 antocianinas no jambolão: delphinidina 3,5-diglicosídeo, cianidina 3,5-diglicosídeo, peonidina 3,5-diglicosídeo, delphinidina 3-glicosídeo e malvidina 3,5-diglicosídeo. Cinco das seis principais antocianinas identificadas estavam na forma de

3,5-diglicosídeo, a delphinidina foi a única antocianina identificada na forma de 3-glicosídeo. Carvalho *et al.* (11) identificou 9 antocianinas nos frutos frescos e desidratados e no suco de jambolão com altas razões molares das três antocianidinas tri-substituídas no anel B (delphinidina 3,5-diglicosídeo, petunidina 3,5-diglicosídeo e malvidina 3,5-diglicosídeo) representando 93-95% do conteúdo total de antocianina.

Os cromatogramas (Figura 11) dos extratos estudados no comprimento de onda de 520 nm mostram os picos correspondentes às antocianinas identificadas como também mostram picos significativos nos tempos de retenção em torno de 8,1 e 9,8 min que não puderam ser identificados devido à falta de padrões.

**Figura 11:** Cromatogramas dos extratos EC- extração convencional (A), EE- extração exhaustiva (B) e EAU- extração assistida por ultrassom (C) em 520 nm.





Com o auxílio de dados da literatura (111, 112) pode-se concluir que os picos em torno de 8,1 e 9,8 min devem corresponder à delphinidina 3,5-diglicosídeo e à petunidina 3,5-diglicosídeo. Portanto, há uma limitação quanto às conclusões referentes ao perfil qualitativo e quantitativos dos métodos de extração no que tange as antocianinas, pois compostos possivelmente presentes em altas concentrações não foram analisados.

Além das antocianinas, outros compostos do grupo dos flavonoides foram identificados. Os flavonóis quercetina 3-glicosídeo, rutina (quercetina 3-rutinosídeo) e kaempferol 3-glicosídeos foram encontrados em todos os extratos, enquanto a aglicona de miricetina foi identificada somente no extrato EAU. Tavares *et al.* (11) identificaram um total de nove glicosídeos de flavonóis (miricetina, laricitrina e siringetina) nas partes comestíveis de jambolão e não encontraram picos correspondentes a agliconas livres, com predominância de miricetina 3-O-glicosídeo na casca (64,40%).

Taninos condensados (procianidina B1 e B2) foram os compostos presentes em maiores quantidades além das antocianinas. Os extratos apresentaram teores de procianidina B2, cujos teores diferiram significativamente entre EE e EAU, e entre EE e EC, mas a diferença não foi significativa entre EC e EAU. Os extratos EE e EAU apresentaram também em seu perfil procianidina B1 em menores quantidades. Monômeros de flavan-3-ol (catequina e epicatequina) também foram identificados em todos os extratos. Procianidina B2 [epicatequina-(4 $\beta$ -8)-epicatequina] (C<sub>30</sub>H<sub>26</sub>O<sub>12</sub>, PB2) é o isômero majoritário das procianidinas, consistindo de duas moléculas de (-)-epicatequina conectadas por uma ligação entre as posições 4' e 8' em um  $\beta$ - configuração. PB2 tem boa solubilidade em água e em solventes orgânicos, incluindo DMSO, metanol e etanol.

Este composto é comumente encontrado em frutas como maçãs, peras, uvas e pêssegos, em grãos de soja preta e cacau, bem como folhas de chá (*Theaceae*), e tem sido associado a propriedades bioativas, incluindo ação antioxidante (117).

Os principais ácidos fenólicos identificados nos extratos foram os ácidos caftárico, gálico, cafeico e clorogênico. Os ácidos fenólicos constituem cerca de um terço dos fenóis consumidos na dieta e são amplamente encontrados em frutas e vegetais e são divididos em dois subgrupos, os hidroxibenzóicos, que incluem os ácidos gálico e siríngico, e os hidroxicinâmicos (AHCs), representados principalmente pelos ácidos cafeico, ferúlico, cumárico e sinápico. AHCs são encontrados em várias formas conjugadas, incluindo amidas, ésteres (principalmente ésteres de hidroxíácidos, como ácido tartárico e derivados de açúcar) e açúcares. Os derivados do ácido cafeico são um grupo de compostos derivados da esterificação do ácido cafeico com ácidos orgânicos, como o ácido quínico, que forma o ácido clorogênico, ácido glucárico, formando ácido cafeoilglucárico e mais frequentemente com ácido tartárico, formando ácido chicórico, ácido caftárico e ácido coutarico (118).

Os extratos de jambolão avaliados apresentaram teores significativos de ácido caftárico, forma derivativa do ácido cafeico, em quantidades comparáveis e até superiores aos demais ácidos fenólicos identificados. Liu *et al.* (119) mostraram em seus estudos que os ácidos caftárico e cafeico derivados do ácido chicórico apresentaram a capacidade de inibir significativamente os radicais DPPH, OH e ABTS e tinham forte capacidade de reduzir o ferro de maneira dependente da concentração.

A análise de HPLC dos extratos traz resultados importantes que corroboram para a hipótese de que diferentes métodos de extração influenciam nos rendimentos e na seletividade dos compostos fenólicos extraídos. De maneira geral, todos os métodos estudados apresentaram boa seletividade para a obtenção de altos teores de antocianinas, com destaque para a extração exaustiva (EE) que apresentou altos rendimentos de compostos fenólicos por levar a extração até o esgotamento da amostra. Além disso, compostos pertencentes a diversos grupos de fenólicos também foram identificados nos extratos. O extrato obtido pela tecnologia de ultrassom apresentou bons rendimentos para todos os compostos fenólicos avaliados, em que pode-se observar que os teores de EAU não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) dos teores obtidos no extrato EC, e de alguns

compostos do extrato EE.

Os resultados supracitados evidenciaram a eficiência da tecnologia de ultrassom em produzir extratos com bons rendimentos de compostos bioativos, boa qualidade de antocianinas e alta atividade antioxidante, sem emprego de altas temperaturas ou longos períodos de extração, gerando economia de tempo e energia para os processos extrativos. Portanto, o extrato EAU foi escolhido para continuidade do trabalho com o desenvolvimento de encapsulados.

### 5.3. ENCAPSULAÇÃO DO EXTRATO RICO EM ANTOCIANINAS E OUTROS POLIFENÓIS POR NANOPRECIPITAÇÃO

#### 5.3.1. Eficiência de Encapsulação (EE%)

A Tabela 4 apresenta os resultados de EE% para AMT e CFT das formulações baseadas em WPC e WPI sintetizadas por meio da precipitação em diferentes proporções de acetona. Não houve diferença significativa entre as EE% CFT para ambos os agentes encapsulantes estudados. No entanto, para AMT, a EE% da formulação EWPC70 foi significativamente menor que EWPC100 e EWPC50, comportamento este observado para as mesmas formulações baseadas em WPI, mostrando a influência da composição da fase antissolvente sobre a EE% das antocianinas dos sistemas.

**Tabela 4.** Resultados de Eficiência de Encapsulação (EE%) para antocianinas monoméricas totais (AMT) e compostos fenólicos totais (CFT) dos encapsulados baseados em pectina e proteína concentrada do soro do leite (EWPC) ou proteína isolada do soro do leite (EWPI) precipitados em diferentes composições de fase antissolvente.

Código da amostra	EE% AMT	EE% CFT	Código da amostra	EE% AMT	EE% CFT
EWPC100	56,89 (1,29) <sup>aA</sup>	82,39 (1,59) <sup>aA</sup>	EWPI100	35,24 (1,24) <sup>aB</sup>	84,61 (1,64) <sup>aA</sup>
EWPC70	24,33 (5,35) <sup>bA</sup>	82,44 (1,22) <sup>aA</sup>	EWPI70	26,79 (1,06) <sup>bA</sup>	84,65 (1,26) <sup>aA</sup>
EWPC50	48,65 (1,74) <sup>aA</sup>	73,81 (6,72) <sup>aA</sup>	EWPI50	36,33 (2,76) <sup>aB</sup>	75,80 (6,91) <sup>aA</sup>

Valor médio (desvio padrão). Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam médias que não diferiram entre si (Tukey,  $p \leq 0,05$ ). Letras maiúsculas iguais na mesma linha indicam médias que não diferiram entre si (Tukey,  $p \leq 0,05$ ). Legenda: EWPC100 - encapsulado em pectina e proteína do soro do leite concentrada precipitado em acetona absoluta; EWPC70 - encapsulado em pectina e

proteína do soro do leite concentrada precipitado em acetona 70% v/v; EWPC50 - encapsulado em pectina e proteína do soro do leite concentrada precipitado em acetona 50% v/v; EWPI100 - encapsulado em pectina e proteína do soro do leite isolada precipitado em acetona absoluta; EWPI70 - encapsulado em pectina e proteína do soro do leite isolada precipitado em acetona 70% v/v; e EWPI50 - encapsulado em proteína do soro do leite isolada precipitado em acetona 50% v/v.

Calliari *et al.* (80) nanoencapsularam um extrato de *Hibiscus sabdariffa* rico em polifenóis, utilizando zeína como agente encapsulante, pela técnica de nanoprecipitação e alcançaram uma EE% de 89%. Gali *et al.* (120) também utilizaram o método de nanoprecipitação para produzir nanopartículas a base de zeína e goma arábica contendo um extrato de *Ruta chalepensis L.* rico em rutina, um flavonoide, e obteve EE% de 69,9%. Ambos os trabalhos citados apresentaram resultados similares aos observados no presente estudo, utilizando o mesmo método da diferença entre o teor de compostos fenólicos adicionados e o teor de compostos não encapsulados encontrados no sobrenadante para o cálculo da EE%.

Na técnica de nanoprecipitação, a fase antissolvente é composta por solventes que promovem a precipitação das partículas e, sendo estas produzidas a base de proteínas, reagentes como etanol, acetona ou mesmo água são utilizados. Tendo em vista a utilização do produto obtido como potencial ingrediente alimentar, a escolha do solvente seguiu de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 466, de 10 de fevereiro de 2021 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (121), que estabelece os coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso na produção de alimentos e ingredientes na função de solventes de extração e processamento, que cita que a acetona e etanol são autorizado para todos os usos na produção de alimentos e ingredientes, sem limites máximos de resíduos, sendo assim reconhecidamente seguros. No entanto, estes mesmos solventes são utilizados para a extração de antocianinas em diferentes proporções, devido à alta afinidade entre estes compostos. Diante disso, o presente estudo buscou avaliar a influência de diferentes proporções de acetona na fase antissolvente, com o intuito de reduzir a perda desses pigmentos para o meio durante o processo de encapsulação. Nota-se, portanto, que as maiores perdas de antocianinas para o meio antissolvente ocorreu na composição de acetona 70% v/v, apesar desse efeito não refletir no teor de compostos fenólicos encapsulados.

Do ponto de vista da eficiência, a nanoencapsulação de antocianinas

ainda demanda mais pesquisas, visto que diversos estudos têm relatado eficiências de encapsulação abaixo de 80%, variando de 49% a 77% (16, 57, 77, 84, 85, 86). Escobar-Puentes *et al.* (84), utilizaram a técnica de nanoprecipitação para produzir nanopartículas a base de amido de milho contendo antocianinas de *Ardisia compressa*, e alcançou resultados de EE% de 52% para as partículas produzidas com amido de milho tradicional e 49% para partículas produzidas com amilopectina.

Considerando que o tipo de agente encapsulante e a composição da fase antissolvente não influenciaram na EE% de CFT, e visando a aplicação futura das partículas produzidas no presente estudo como corante natural em alimentos, deu-se preferência por prosseguir com os encapsulados que apresentaram as melhores eficiências de encapsulação de antocianinas. Neste caso, as demais caracterizações das partículas foram realizadas nos encapsulados EWPC100, EWPC50, EWPI100 e EWPI50.

### **5.3.2. Caracterização das partículas**

#### **5.3.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

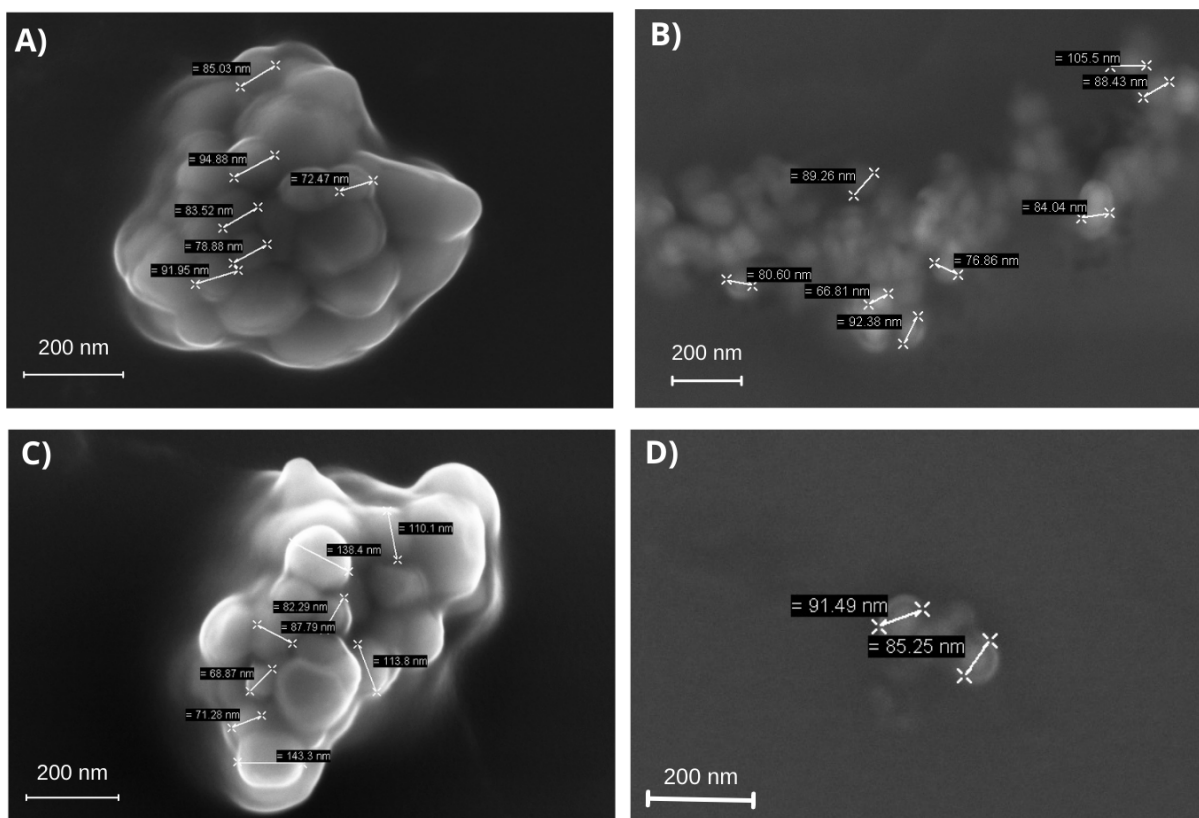
A Figura 12 mostra as imagens de MEV obtidas para as formulações estudadas. É possível observar que, de maneira geral, as partículas foram formadas, apresentando formato circular e superfície lisa, sem rachaduras ou depressões.

Os encapsulados EWPC100 e EWPI100 encontram-se em pequenos aglomerados, com tamanhos físicos na faixa de 72 a 95 nm para os sistemas sintetizados com a proteína concentrada, e de 69 a 143 nm para os sistemas a base de proteína isolada.

O EWPC50 apresenta grandes aglomerados de partículas de tamanhos em torno de 100 nm, e essa tendência a aglomeração provavelmente se deve ao aumento das forças de atração e redução das forças de repulsão entre as moléculas devido ao tamanho nanométrico (94). Para as partículas EWPI50 foram observados pequenos aglomerados, com tamanhos abaixo de 100 nm.

Uma morfologia homogênea é essencial para a estabilidade das nanopartículas, e pode influenciar o tempo de armazenamento quando aplicado em formulações alimentícias, como também pode afetar a absorção celular devido à interação entre a superfície das nanopartículas e o epitélio, influenciando os efeitos biológicos (16).

**Figura 12.** Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura obtidas para cada as formulações estudadas: A) EWPC100 numa magnitude de 80.000 X; B) EWPC50 numa magnitude de 50.000 X; C) EWPI100 numa magnitude de 80.000 X; D) EWPI50 numa magnitude de 50.000 X



EWPC100 - encapsulado em pectina e proteína do soro do leite concentrada precipitado em acetona absoluta; EWPC50 - encapsulado em pectina e proteína do soro do leite concentrada precipitado em acetona 50% v/v; EWPI100 - encapsulado em pectina e proteína do soro do leite isolada precipitado em acetona absoluta; e EWPI50 - encapsulado em pectina e proteína do soro do leite isolada precipitado em acetona 50% v/v.

### 5.3.2.2. Tamanho de Partícula e Índice de Polidispersão (PDI) por DLS

Os resultados das análises de diâmetro de partícula (nm) e PDI das partículas produzidas estão apresentados na Tabela 5 abaixo.

**Tabela 5.** Valores de diâmetro de partícula (nm) e PDI para os sistemas sintetizados.

Código da amostra	Diâmetro de partícula (nm)	PDI
EWPC100	116 (29,50)	0,001

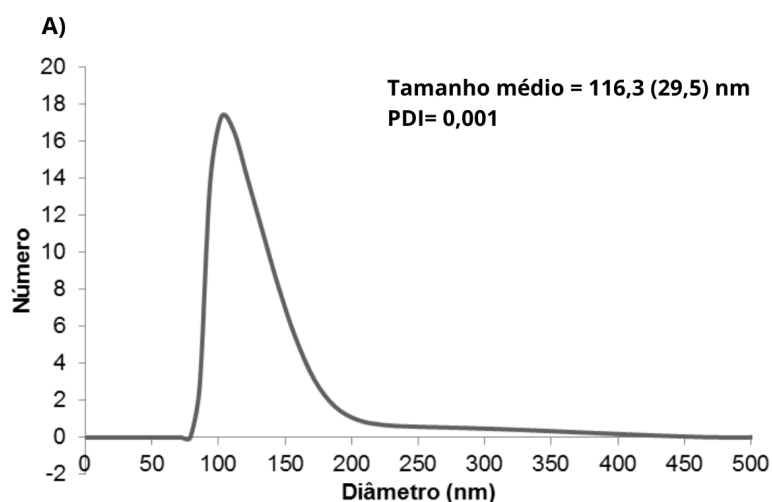
EWPC50	111 (23,40)	0,001
EWPI100	82 (10,80)	0,00
EWPI50	107 (33,90)	0,002

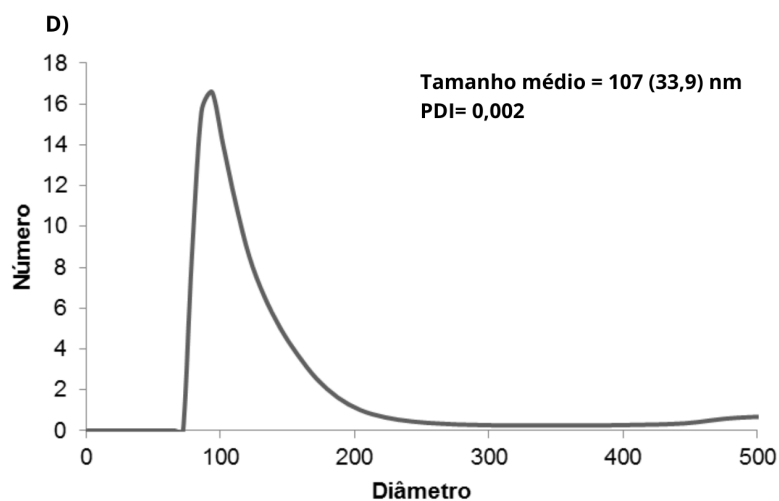
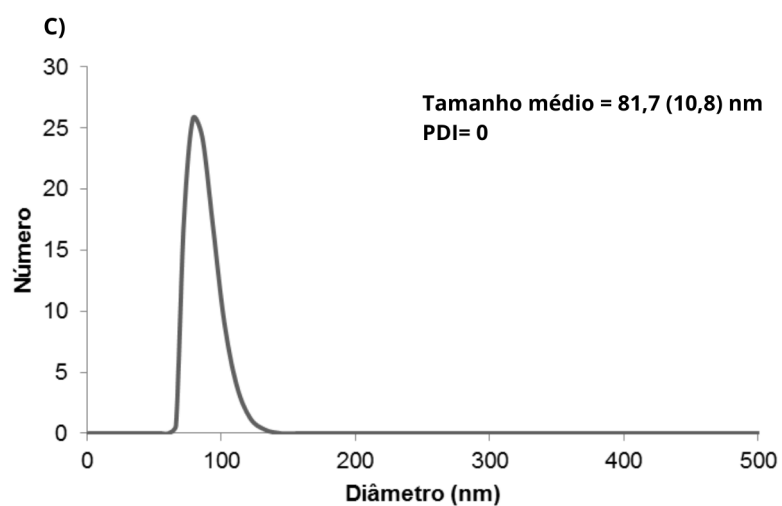
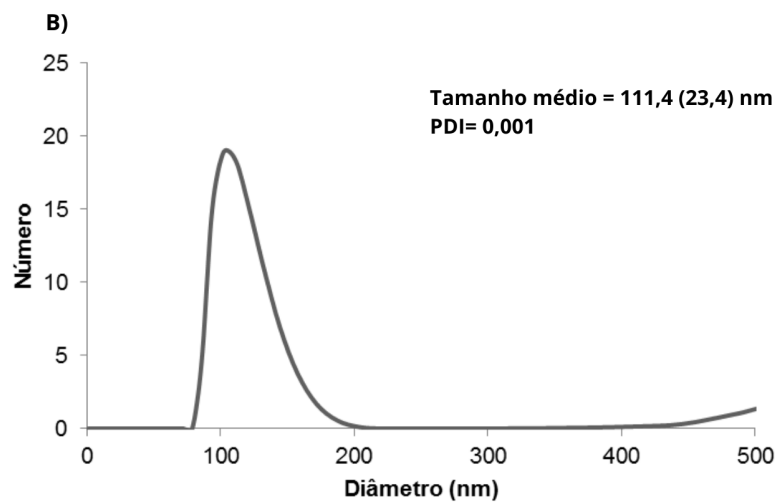
Resultados de diâmetro de partícula expressos em Valor médio  $\pm$  desvio padrão. n=3

EWPC100 - encapsulado em pectina e proteína do soro do leite concentrada precipitado em acetona absoluta; EWPC50 - encapsulado em pectina e proteína do soro do leite concentrada precipitado em acetona 50% v/v; EWPI100 - encapsulado em pectina e proteína do soro do leite isolada precipitado em acetona absoluta; e EWPI50 - encapsulado em pectina e proteína do soro do leite isolada precipitado em acetona 50% v/v.

A análise do tamanho de partícula é fundamental no desenvolvimento de sistemas de produção de nanopartículas, pois o tamanho influencia diretamente os parâmetros físicos e as funcionalidades que as partículas podem vir a adquirir ou potencializar na escala nano. As distribuições de diâmetros e os índices de polidispersão para os sistemas EWPC100, EWPC50, EWPI100 e EWPI50 são apresentados na Figura 13. Os tamanhos médios das partículas produzidas ficaram em torno de 100 nm, além disso é possível notar que os baixos valores de PDI indicam que os sistemas avaliados são monodispersos, com distribuição de tamanhos bastante homogênea. Ademais, constatou-se que os diâmetros obtidos foram semelhantes aos tamanhos físicos observados por meio da análise de MEV.

**Figura 13:** Distribuição de diâmetros e os índices de polidispersão para os sistemas EWPC100 (A), EWPC50 (B), EWPI100 (C) e EWPI50 (D).





EWPC100 - encapsulado em pectina e proteína do soro do leite concentrada precipitado em acetona absoluta; EWPC50 - encapsulado em pectina e proteína do soro do leite concentrada precipitado em acetona 50% v/v; EWPI100 - encapsulado em pectina e proteína do soro do leite isolada precipitado em acetona Absoluta; e EWPI50 - encapsulado em pectina e proteína do soro do leite isolada em acetona 50% v/v.

Estudos recentes que utilizaram os mesmos materiais de parede para produção de nanopartículas contendo compostos bioativos chegaram a resultados de tamanho de partícula comparáveis aos encontrados para os sistemas estudados. Rosales *et al.* (16) nanoencapsularam antocianinas de amora preta por 'self-assembling' utilizando pectina e lisozima, obtendo tamanhos de 198,5 nm e PDI de 0,18. Rashid *et al.* (21) encapsularam um extrato de casca de romã rico em compostos fenólicos em proteína do soro de leite isolada e maltodextrina, utilizando Tween 80 como surfactante, pela técnica de ultrasonicação para reduzir o tamanho das partículas, obtendo tamanhos de 218,8 nm e PDI de 0,15. Safarpour, Kenari & Farmani (122) encapsularam um extrato rico em compostos fenólicos de *Salvia officinalis* L. em proteína de soro de leite isolada e goma de sementes de *Lepidium perfoliatum* pelo método de emulsificação água/óleo/água, utilizando Tween 80 como surfactante, obtendo partículas com faixa de tamanhos de 217 a 270 nm.

É importante também destacar o efeito do método de encapsulação por nanoprecipitação para a obtenção de partículas contendo compostos fenólicos na escala nano. Huang *et al.* (123) nanoencapsularam resveratrol em pectina e zeína e obtiveram um diâmetro médio de partícula de 120 nm em pH 7,0. Calliari *et al.* (80) produziram nanopartículas contendo extrato de *Hibiscus sabdariffa* rico em compostos fenólicos tendo zeína como material de parede, obtendo partículas com 176 nm de tamanho e PDI de 0,18. Gali *et al.* (120) produziram nanopartículas a base de zeína e goma arábica contendo um extrato de *Ruta chalepensis* L. rico em rutina, um flavonóide, e obteve partículas de tamanhos na faixa de 80 a 170 nm.

A nanoencapsulação de compostos fenólicos tem demonstrado grande potencial para proteção, manutenção e/ou potencialização das propriedades funcionais, principalmente a atividade antioxidante, a bioacessibilidade e a biodisponibilidade, que são influenciadas pelos compostos ligados à sua estrutura. As interações entre os compostos fenólicos e a pectina têm sido estudadas na preservação das propriedades e estabilização da estrutura molecular destes compostos, protegendo da degradação e preservando sua ação antioxidante (124).

Além disso, a escolha de utilizar proteínas de soro do leite em combinação com a pectina para a síntese das nanopartículas se deu pela funcionalidade das proteínas de atuarem como tensoativos. Ao interagir com diferentes materiais, as proteínas sofrem mudanças conformacionais de forma a permitir um maior número de interações químicas favoráveis, estabilizando o

complexo através de interações eletrostáticas, reduzindo a tensão superficial do sistema. Sendo assim, ao optar pela combinação de biopolímeros, as proteínas do soro de leite atuaram como material de parede e surfactante, permitindo a formação de nanopartículas esféricas de superfície lisa (94), conforme observado nas imagens obtidas por MEV.

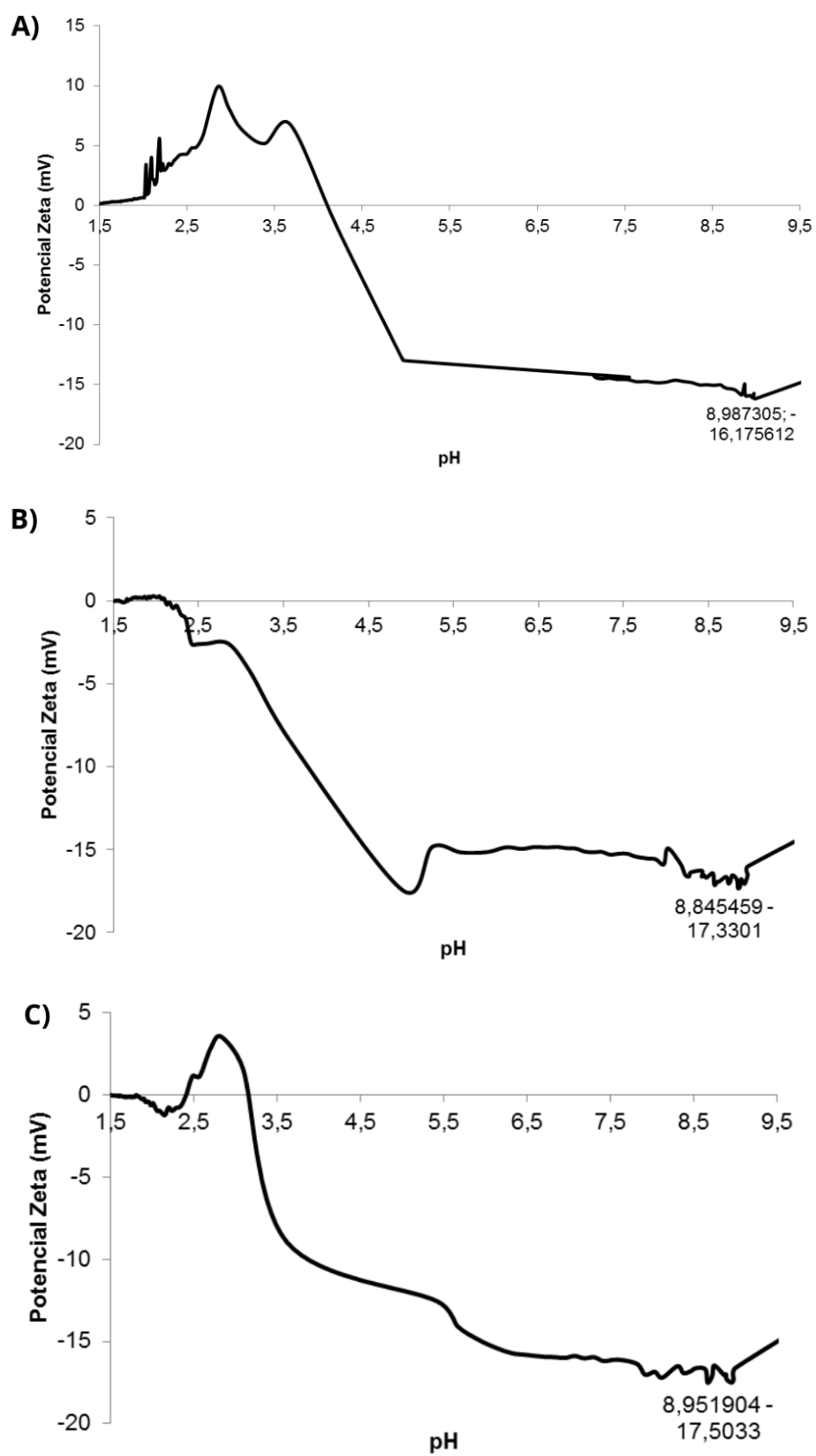
#### 5.3.2.3. Potencial Zeta ( $\zeta$ )

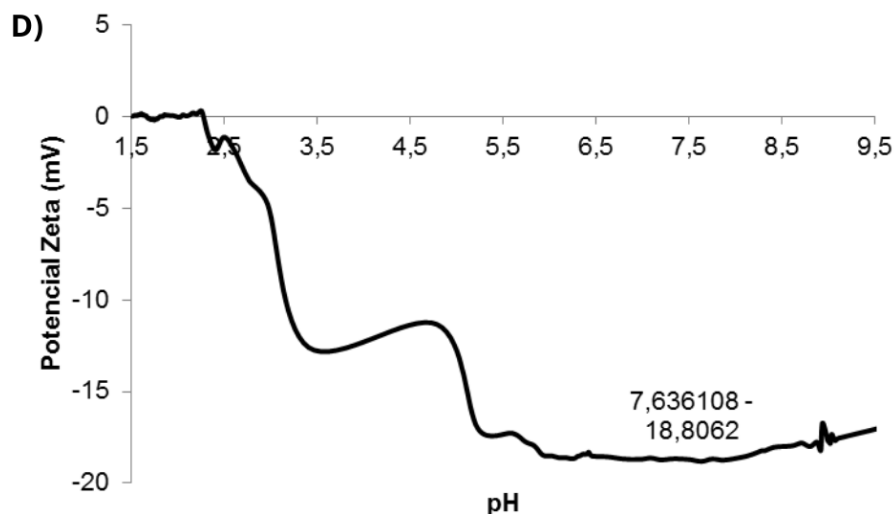
Para promover a síntese das partículas e encapsulação dos ativos, são necessárias interações eletrostáticas entre os materiais presentes no sistema, cujos resultados podem ser avaliados por meio da determinação do potencial Zeta (PZ). Potencial Zeta é um termo científico para o potencial eletrocinético de sistemas particulados e a medição do potencial  $\zeta$  é a maneira mais simples e direta de caracterizar a carga superficial de partículas (125). Esta técnica fornece informações sobre a estabilidade da solução, resultante das forças atrativas e repulsivas entre as partículas, que possuem diferentes cargas superficiais. As diretrizes classificam as dispersões de nanopartículas com valores PZ de  $\pm 0-10$  mV,  $\pm 10-20$  mV e  $\pm 20-30$  mV e  $> \pm 30$  mV como altamente instáveis, relativamente estáveis, moderadamente estáveis e altamente estáveis, respectivamente (126).

O pH é talvez o parâmetro que mais influencia as medições de potencial  $\zeta$ , especialmente em dispersões aquosas, o que o torna relevante quando considera-se a aplicação das partículas em formulações alimentícias e farmacêuticas. O potencial  $\zeta$  varia com o pH e torna-se mais positivo e negativo em magnitude com pH ácido e básico, respectivamente (126).

Neste estudo, foram geradas curvas de titulação de potencial  $\zeta$  em função do pH para cada uma das formulações estudadas (Figura 14), o que ajudou a determinar o ponto isoelétrico (pI), fator extremamente importante a ser avaliado pois os sistemas de partículas perdem estabilidade e aglomeram/floculam quando o pH está próximo do pI.

**Figura 14.** Curvas de potencial  $\zeta$  em função do pH para cada as formulações estudadas: A) EWPC100; B) EWPC50; C) EWPI100; D) EWPI50.





EWPC100 - encapsulado em pectina e proteína do soro do leite concentrada precipitado em acetona absoluta; EWPC50 - encapsulado em pectina e proteína do soro do leite concentrada precipitado em acetona 50% v/v; EWPI100 - encapsulado em pectina e proteína do soro do leite isolada precipitado em acetona absoluta; e EWPI50 - encapsulado em pectina e proteína do soro do leite isolada precipitado em acetona 50% v/v.

Analisando as curvas de potencial Zeta acima, observa-se que os sistemas apresentam alta instabilidade em pH ácido, em que os potenciais  $\zeta$  chegam ao valor de zero nas faixas de pH entre 2,0 e 4,0. Em todas as curvas é possível identificar um ponto de inflexão em pH próximo de 5,0 - 5,5 que corresponde à faixa de pH do ponto isoelétrico das proteínas do soro do leite. A partir do ponto de inflexão, o potencial  $\zeta$  passa a assumir valores mais altos indicando a faixa de pH onde os sistemas apresentam maior estabilidade, ou seja, na faixa de pH fora do  $pI$  das proteínas utilizadas.

Para EWPC100, o valor mais alto de potencial  $\zeta$  foi de -16,18 mV no  $pH \approx 9$ , EWPC50 foi -17,33 mV em  $pH = 8,85$ , EWPI100 foi -17,5 mV em  $pH = 8,95$  e EWPI50 foi -18,80 mV em  $pH = 7,64$ , valores que classificam os sistemas avaliados como relativamente estáveis. Apesar de os melhores valores de potencial Zeta ocorrerem em pH mais elevado, as curvas permanecem quase constantes a partir do  $pH \approx 6,0$  onde os sistemas entram numa zona de relativa estabilidade, indicando a faixa de pH mais adequada a ser considerada para as aplicações dos sistemas avaliados.

De maneira semelhante, Ghasemi et al. (127) avaliaram o efeito do pH sobre o potencial Zeta de nanocomplexos de proteína de soro do leite concentrada e pectina contendo óleo de casca de laranja produzidos por ultrasonicação e

utilizando Tween 80 como agente emulsificante, e observaram que o potencial  $\zeta$  nos valores de pH de 3,0, 6,0 e 9,0 foram +1,7, -19,0 e -30,3 mV, respectivamente. Resultado que seguiu uma tendência muito parecida com a que foi observada no presente estudo. Os autores argumentam que em pH = 3,0, abaixo do ponto isoelétrico (pI) das proteínas, os biopolímeros se neutralizam e a carga resultante fica muito próxima de zero (+1,7 mV).

Em um sistema binário polissacarídeo-proteína, a pectina aniônica é capaz de se complexar com as proteínas do soro do leite por meio de interações eletrostáticas como resultado de cargas opostas entre os grupos carboxila da pectina ( $\text{COO}^-$ ) e os grupos amino da proteína ( $\text{NH}_3^+$ ). No entanto, essas interações dependem fortemente do pH do meio, pois a proteína é anfotérica, enquanto a pectina pode perder suas cargas negativas em pH abaixo de seu valor de pKa, em torno de pH= 3,5, formando ácidos carboxílicos protonados ( $\text{COOH}$ ) (128). Enquanto o pH aumenta, observa-se um aumento dos valores de potencial Zeta. Isso pode ocorrer devido ao excesso de ácidos carboxílicos da pectina não ligados nas nanopartículas, em que a desprotonação causada pelo aumento do pH (especialmente em pH de 4 a 10) supera a protonação das proteínas, levando a valores negativos do potencial Zeta. Consequentemente, ocorre repulsão eletrostática entre as nanopartículas, evitando assim a sedimentação e floculação. Além disso, acredita-se que em pH 6,0 - 7,0 as nanopartículas seriam mais estáveis devido à menor variação no potencial Zeta, faixa a partir da qual os valores se tornam praticamente constantes (16).

Durante os experimentos foi observado que o pH da dispersão dos encapsulados, diretamente em água destilada, ficava em torno de 5,0. Valor este que se encontra na faixa de instabilidade das partículas, o que gerava floculação e agregação dos sistemas em solução. A característica levemente acídica das partículas quando dispersas diretamente em água destilada é advinda, provavelmente, do processo de encapsulação das partículas. Considerando que o extrato de jambolão liofilizado e a pectina, quando em solução, apresentaram valores de pH em torno de 3,0 e ao serem adicionados à solução contendo as proteínas de soro do leite atingiam pH próximos a 4,0, faixa de pH em que ocorreu o processo de encapsulação. Os resultados de estabilidade obtidos através da análise de potencial Zeta foram determinantes para que as demais análises de caracterização fossem feitas de forma mais apropriada, justificando a utilização do

tampão fosfato pH=7,0 para a determinação de tamanho de partícula por DLS e atividade antioxidante.

#### 5.3.2.4. Espectroscopia Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR (Figura 15) mostram os resultados para Tween 80, agentes encapsulantes, extrato bruto de jambolão e os encapsulados obtidos (EWPC100, EWPC50, EWPI100 e EWPI50).

Para o tensoativo Tween 80, foi observada a presença das bandas em torno de 2919 e 2865  $\text{cm}^{-1}$  indicando o estiramento das ligações C—H do grupo metileno, e em 1461  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde ao dobramento das ligações C—H deste mesmo grupo. Além disso, a banda em 1097  $\text{cm}^{-1}$  é associada ao estiramento das ligações C—O—C (129).

No espectro da pectina é possível destacar a banda na região de 3251  $\text{cm}^{-1}$ , que reflete as interações entre os grupos O—H dos ácidos carboxílicos, e a banda na região de 1015 e 1103  $\text{cm}^{-1}$  correspondendo ao estiramento da ligação C—O dos ácidos galacturônicos que constituem a pectina (130).

Para a proteína do soro do leite isolada, a presença de bandas características na região 3278  $\text{cm}^{-1}$  diz respeito à absorção dos grupos N—H das aminas e amidas das proteínas, em WPC essa banda surge em 3270  $\text{cm}^{-1}$ . A banda 1392  $\text{cm}^{-1}$  corresponde ao alongamento da ligação C—O, 1627  $\text{cm}^{-1}$  à amida I, e 1515  $\text{cm}^{-1}$  ao dobramento de N—H e alongamento C—N da amida II. E para a proteína do soro do leite concentrada, as bandas de absorção para as amidas I e II, respectivamente, foram observadas em 1631  $\text{cm}^{-1}$  e 1519  $\text{cm}^{-1}$  (131).

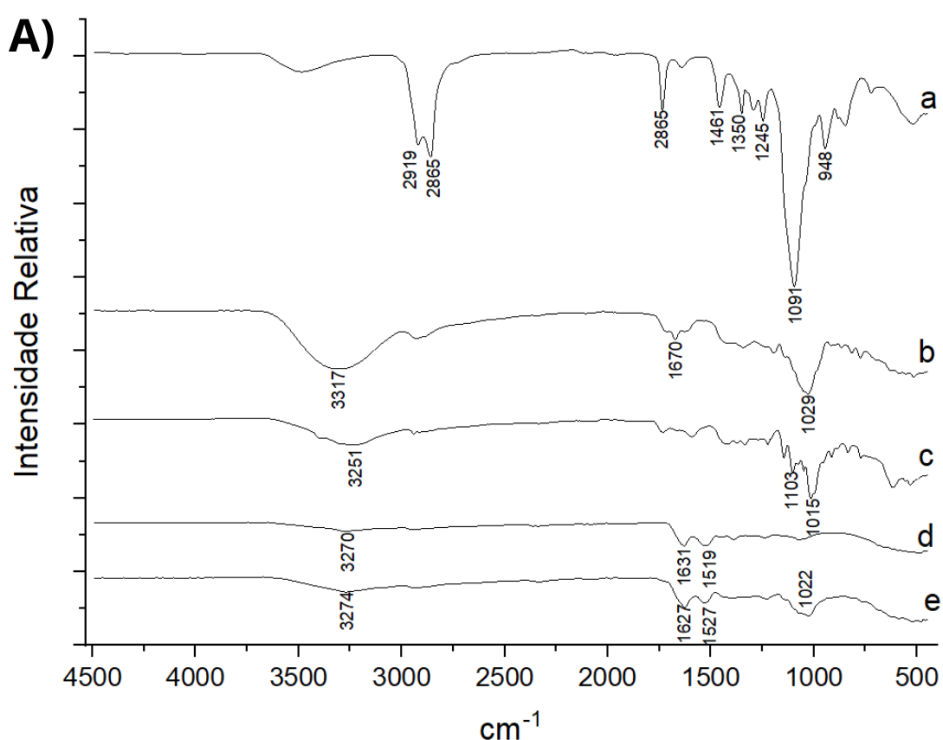
No espectro do extrato rico em polifenóis do jambolão, podem ser identificadas as bandas associadas às interações entre os grupos O—H dos ácidos carboxílicos (3317  $\text{cm}^{-1}$ ), cuja suavidade e largura está associada a materiais ricos em antocianinas. Em 1029  $\text{cm}^{-1}$  pode ser observada a banda que pode estar associada ao estiramento da ligação C—O do grupo funcional dos fenóis, e aos dobramentos de C—H nas cadeias carbônicas de antocianinas e de outros compostos fenólicos (132).

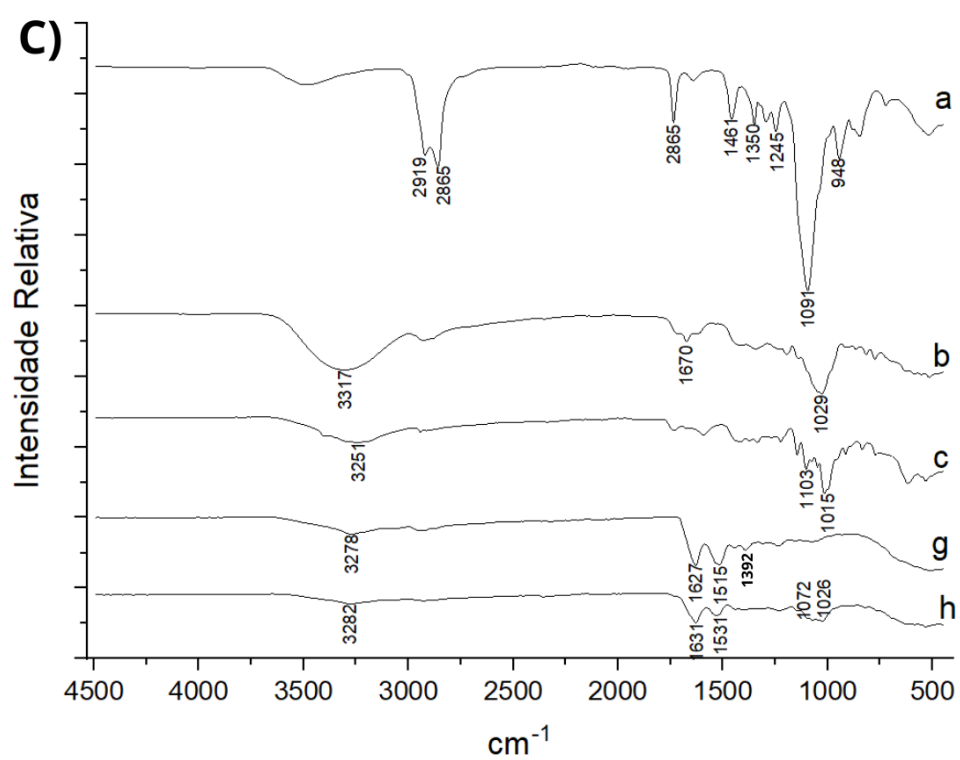
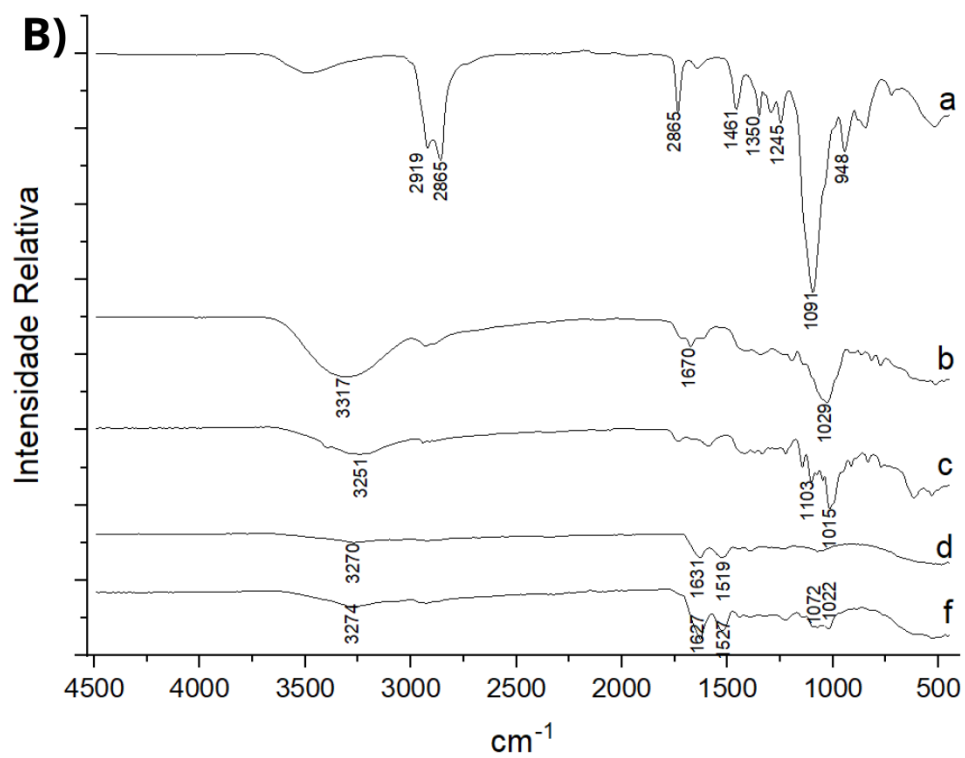
A análise dos espectros de infravermelho dos encapsulados mostrou que todos os materiais sintetizados retiveram o perfil característico das proteínas utilizadas como material de parede, indicando que as proteínas recobrem o exterior das partículas, porém com certos deslocamentos causados pelas interações com os

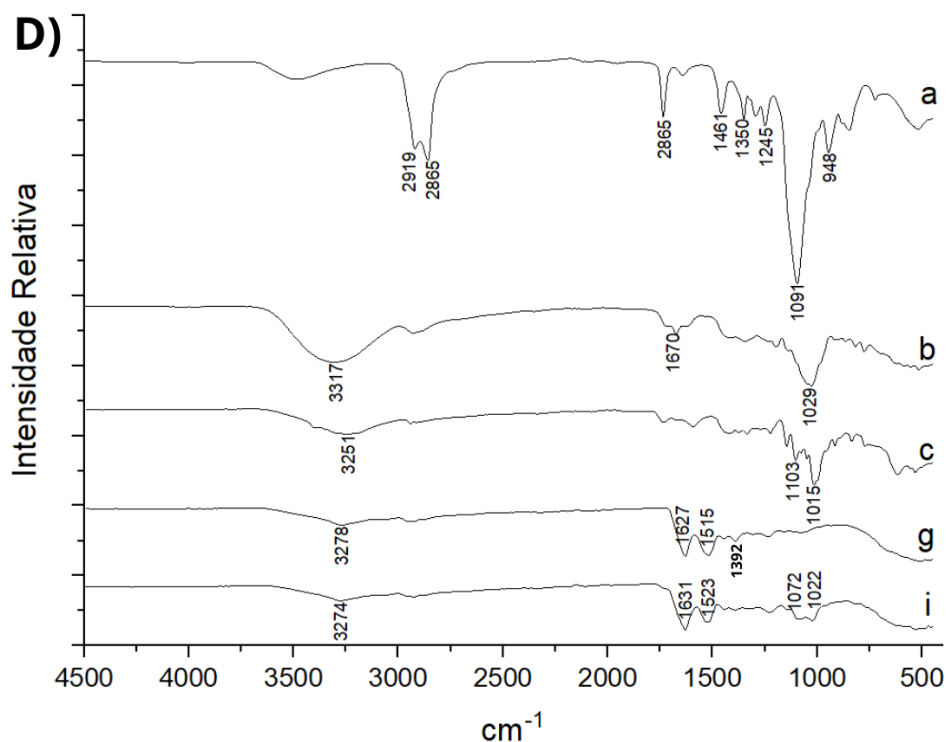
outros materiais presentes nos sistemas. As bandas de absorção para as amidas I e II, respectivamente, foram observadas em EWPC100 e EWPC50 em 1627 e 1527  $\text{cm}^{-1}$ , em EWPI100 em 1631 e 1531  $\text{cm}^{-1}$  e em EWPI50 em 1631 e 1523  $\text{cm}^{-1}$ .

Foi identificada a formação de novas bandas nos espectros dos materiais sintetizados, nas regiões de 1072 a 1022  $\text{cm}^{-1}$  em EWPC100, EWPC50 e EWPI50 e em 1072 e 1026  $\text{cm}^{-1}$  para EWPI100. O surgimento destas bandas indica a presença de novas interações químicas entre as proteínas, o extrato e a pectina, mostrando que o método de nanoprecipitação foi eficiente na encapsulação do extrato de jambolão rico em compostos fenólicos em nanopartículas de proteínas de soro do leite e pectina.

**Figura 15:** Espectros de infravermelho por transformada de Fourier dos diferentes pós encapsulados, obtidos pela técnica de nanoprecipitação sendo A) EWPC100, B) EWPC50, C) EWPI100 e C) EWPI50.







a) Tween 80, b) Extrato bruto, c) Pectina, d) proteína do soro do leite concentrada,; e) EWPC100-encapsulado em pectina e proteína do soro do leite concentrada precipitado em acetona absoluta,; f) EWPC50- encapsulado em pectina e proteína do soro do leite concentrada precipitado em acetona 50% v/v,; g) proteína do soro do leite isolada, h) EWPI100- encapsulado em pectina e proteína do soro do leite isolada precipitado em acetona absoluta, i) EWPI50- encapsulado em pectina e proteína do soro do leite concentrada isolada precipitado em acetona 50% v/v.

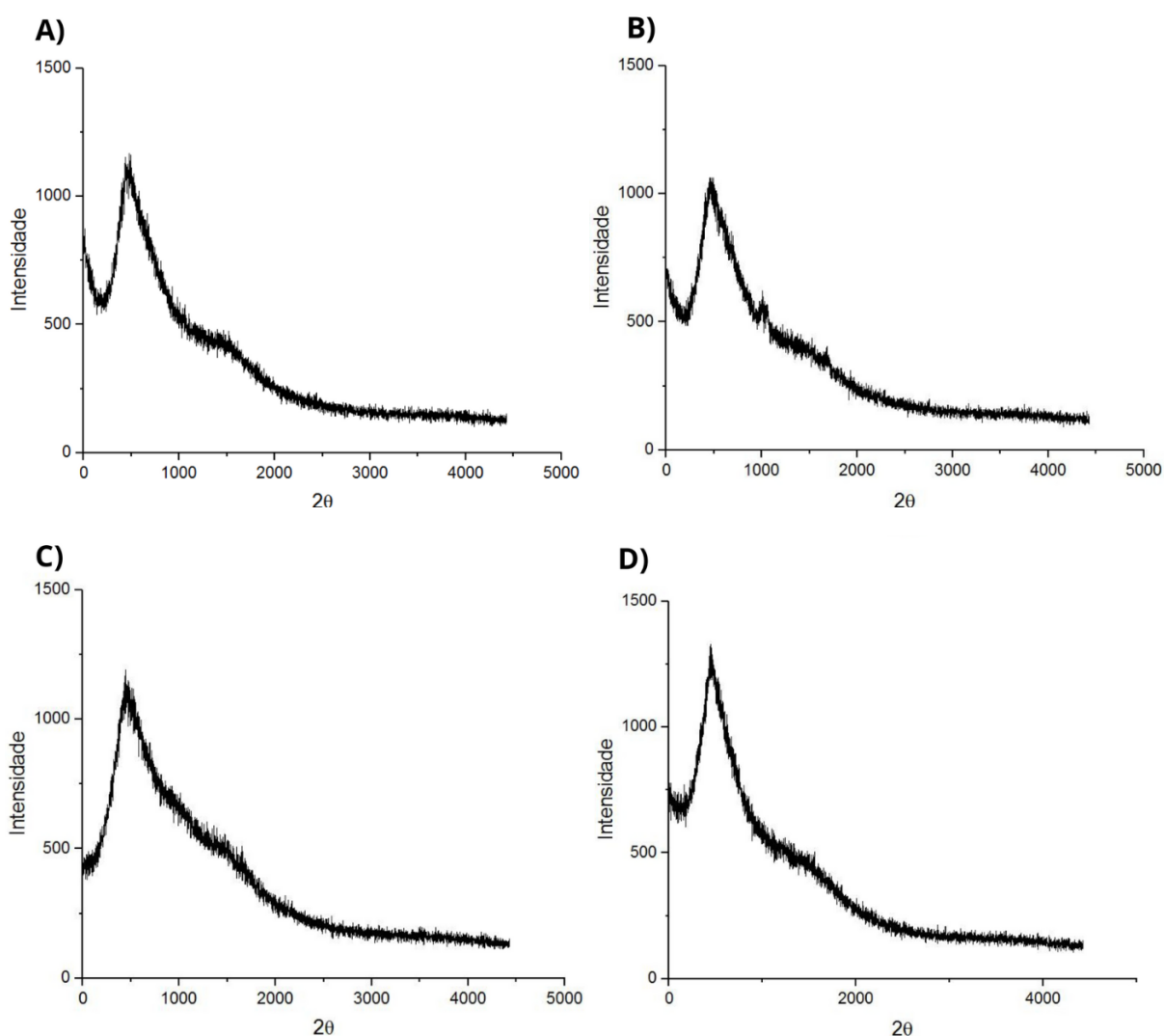
### 5.3.2.5. Difração de raio X

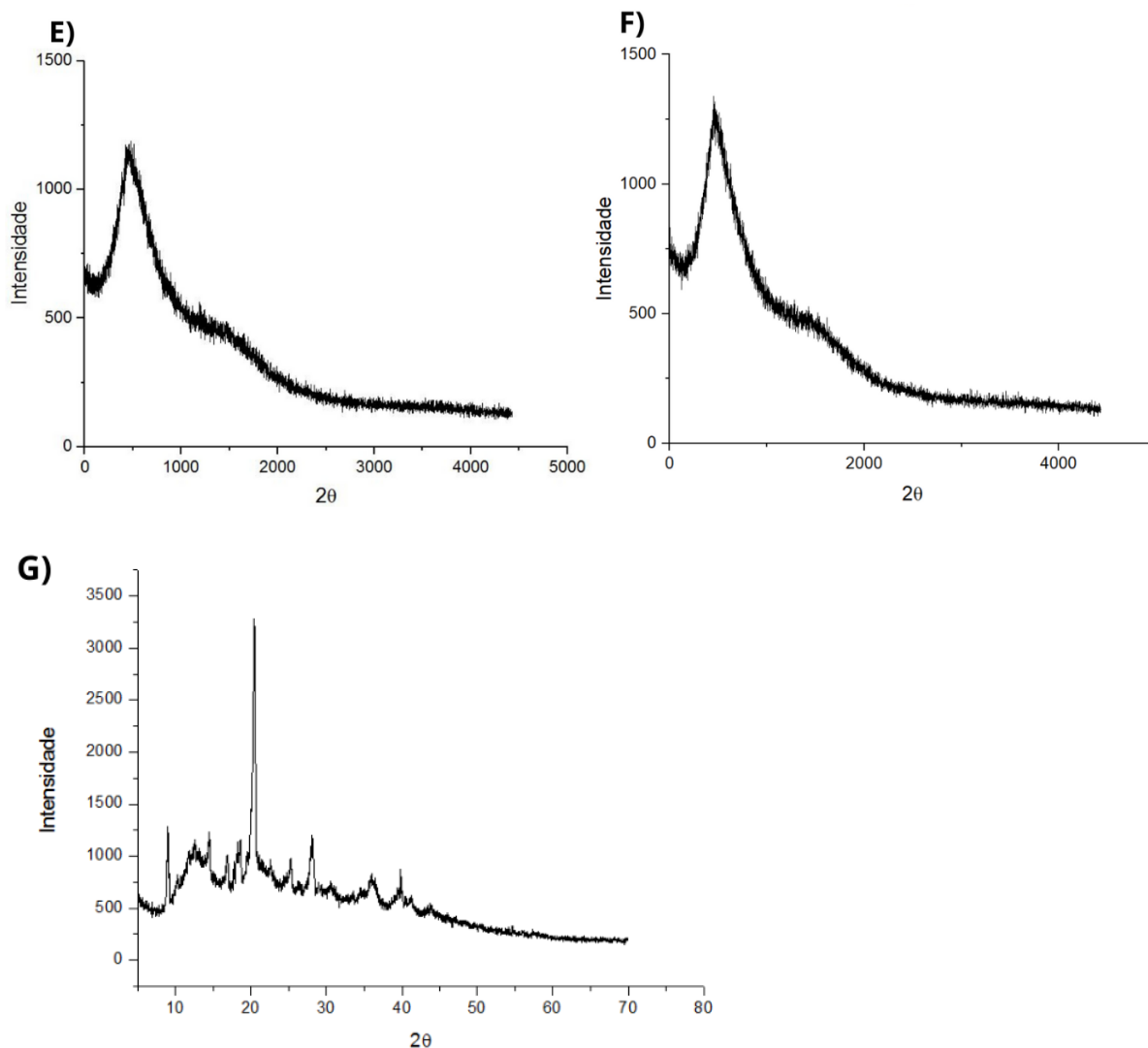
A análise de difração de raio X é utilizada no estudo da estrutura (cristalina ou amorfa) de materiais encapsulados e de matrizes poliméricas (60). A Figura 16 apresenta os difratogramas para as proteínas utilizadas como materiais de parede e os encapsulados obtidos. É possível observar que os encapsulados preservaram o mesmo padrão e estrutura amorfa observada nos difratogramas das proteínas do soro do leite utilizadas, o que mostra a predominância de estruturas com cadeias moleculares desorganizadas.

Ao avaliar o difratogramas da pectina (Figura 15G), pode-se concluir que esta apresenta estrutura semi-cristalina, em função da presença de picos definidos e mais intensos em sinais em  $2\theta$  de  $\sim 10^\circ$ ,  $20^\circ$   $30^\circ$ . No entanto, tal comportamento não foi observado nos materiais encapsulados, o que corrobora com os achados do FTIR que sugerem que as partículas estão recobertas pelas proteínas, apresentando perfis nos difratogramas praticamente idênticos.

Cabe ressaltar que, para esta análise, a estrutura do extrato ou dos compostos a serem encapsulados também pode ser observada por DRX de forma a avaliar se houve interação química entre os compostos bioativos e os demais materiais presentes no sistema após a encapsulação. Todavia, o extrato de jambolão liofilizado utilizado neste estudo, por ser altamente higroscópico, não pôde ser avaliado em função desta característica.

**Figura 16:** Difrátogramas de raio X dos agentes encapsulantes A) WPC, B) WPI e dos encapsulados C) EWPC100, D) EWPI100, E) EWPC50, F) EWPI50 e G) PEC.





Legenda: A) WPC- proteína do soro do leite concentrada; B) WPI- proteína do soro do leite isolada; C) EWPC100- encapsulado em pectina e proteína do soro do leite concentrada precipitado em acetona absoluta; D) EWPI100- encapsulado em pectina e proteína do soro do leite isolada precipitado em acetona a Absoluta; E) EWPC50- encapsulado em pectina e proteína do soro do leite concentrada precipitado em acetona 50% v/v; F) EWPI50- encapsulado em pectina e proteína do soro do leite concentrada isolada precipitado em acetona 50% v/v; G) PEC- Pectina.

### 5.3.3. Atividade Antioxidante *in vitro* das partículas

A partir do resultado referente ao teor de compostos fenólicos totais do EYL (0,04426 mg CFT/ mg EYL) e considerando que foram utilizados 2,2 g deste extrato em cada sistema de encapsulação, foram adicionados inicialmente aos sistemas 97,38 mg CFT. Na sequência, a determinação da eficiência de encapsulação foi realizada para cada sistema a partir da determinação de CFT (EE% CFT). Neste sentido, foi possível estabelecer a quantidade em miligrama de

encapsulado liofilizado que apresentaria, como o EAJ, 0,04426 mg CFT, conforme mostra a Tabela 6. Essa quantidade de cada sistema de partículas liofilizadas foi utilizada, então, para determinação da atividade antioxidante.

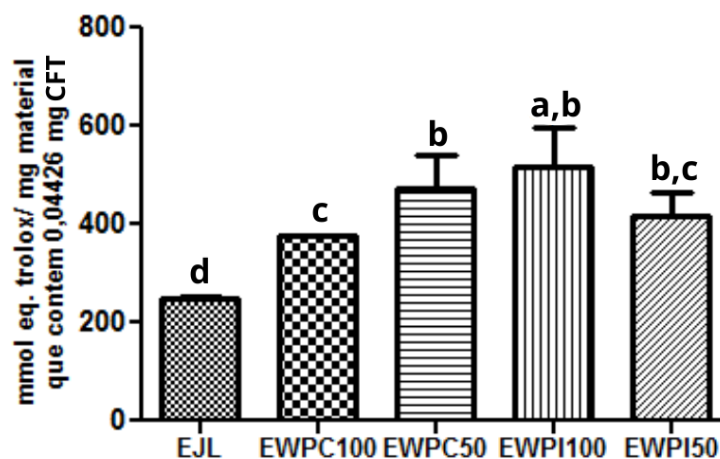
**Tabela 6:** Quantidade em mg dos encapsulados que contém 0,04426 mg CFT.

<b>Código da amostra</b>	<b>Rendimento final (g)</b>	<b>EE% CFT</b>	<b>Conc. CFT (mg CFT/ mg encaps.)</b>	<b>Qtde. encaps. (mg) contém 0,04426 mg CFT</b>
EWPC100	1,4759	82,39 (1,59)	0,054	0,82
EWPC50	1,5170	73,81 (6,72)	0,047	0,94
EWPI100	2,2301	84,61 (1,64)	0,037	1,19
EWPI50	1,4859	75,80 (6,91)	0,05	0,89

Legenda: EWPC100 - encapsulado em pectina e proteína do soro do leite concentrada precipitado em acetona absoluta; EWPC50 - encapsulado em pectina e proteína do soro do leite concentrada precipitado em acetona 50% v/v; EWPI100 - encapsulado em pectina e proteína do soro do leite isolada precipitado em acetona absoluta; e EWPI50 - encapsulado em pectina e proteína do soro do leite isolada precipitado em acetona 50% v/v.

Inicialmente, a atividade antioxidante do extrato de jambolão liofilizado (EJL) foi determinada, obtendo-se um valor de 246,81 (2,76)  $\mu\text{mol Eq. Trolox/mg}$  de EJL. Os resultados da atividade antioxidante das partículas, mostrados na Figura 17 abaixo, para EWPC100 [375,36 (0,89)  $\mu\text{mol eq. de trolox/ 0,82 mg}$ ], EWPC50 [472,62 (27,68)  $\mu\text{mol eq. de trolox/ 0,94 mg}$ ], EWPI100 [518,31 (30,96)  $\mu\text{mol eq. de trolox/ 1,19 mg}$ ] e EWPI50 [417,14 (19,62)  $\mu\text{mol eq. de trolox/ 0,89 mg}$ ] mostram que a atividade antioxidante de todos os sistemas de partículas foi significativamente maior que a atividade antioxidante do EJL para o mesmo teor de CFT (0,04426 mg FT). Sendo a atividade antioxidante desses compostos fenólicos potencializada em 52,08% em EWPC100, 91,49% em EWPC50, 110% em EWPI100 e 69,01% em EWPI50.

**Figura 17.** Atividade antioxidante do extrato de jambolão liofilizado em comparação com os sistemas de partículas fabricados.



Letras iguais na mesma linha indicam médias que não diferiram entre si (Tukey,  $p \leq 0,05$ ). E JL- Extrato de Jambolão liofilizado; EWPC100- encapsulado em pectina e proteína do soro do leite concentrada precipitado em acetona absoluta; EWPC50- encapsulado em pectina e proteína do soro do leite concentrada precipitado em acetona 50% v/v; EWPI100- encapsulado em pectina e proteína do soro do leite isolada precipitado em acetona absoluta; e EWPI50- encapsulado em pectina e proteína do soro do leite isolada precipitado em acetona 50% v/v.

Dentre os sistemas estudados, o valor da atividade antioxidante de EWPI100 não diferiu significativamente de EWPC50, mas foi significativamente ( $p < 0,05$ ) mais alto que os valores observados para EWPC100 e EWPI50, que também não diferiram significativamente entre si, assim como EWPC50 e EWPI50. Resultado que indica que o sistema EWPI100 e EWPC50 se destacaram entre os sistemas quanto a potencialização da atividade antioxidante dos compostos fenólicos do jambolão.

Esses resultados comprovam que o processo de encapsulação dos compostos fenólicos, em especial antocianinas, do jambolão utilizando pectina e as proteínas do soro do leite concentrada e isolada, pelo método de nanoprecipitação, não só preservou a atividade antioxidante dos compostos encapsulados como também potencializou esta atividade. Salientando que a atividade antioxidante está relacionada a propriedades bioativas atribuídas aos compostos fenólicos encontrados no jambolão e seus benefícios para a saúde humana (3). A potencialização da atividade antioxidante das nanopartículas contendo compostos fenólicos de jambolão com relação ao extrato bruto representa um resultado promissor e pode representar economia de matéria-prima, tendo em vista que

menores quantidades de extrato presente nas partículas vão ser necessárias para atingir resultados equivalentes ou superiores aos obtidos para o extrato não encapsulado.

A nanoencapsulação de compostos bioativos tem sido estudada para a proteção, manutenção ou potencialização da atividade antioxidante de compostos bioativos. Salah *et al.* (77), encapsularam antocianinas de framboesa em nanopartículas de  $\beta$ -lactoglobulina pelo método de dessolvatação e ultrasonicação e observaram uma relação direta entre a concentração de antocianinas nas partículas e o aumento da atividade antioxidante, que chegou a valores de 82,51% de captura do radical DPPH, porém este estudo não fez a avaliação da atividade antioxidante das antocianinas não encapsuladas para efeito de comparação. Já Kenari & Razavi (107) produziram nanoemulsões (tamanhos de partícula de 76,5 a 99,3 nm) contendo extrato de flores de *Bougainvillea spectabilis*, fonte de compostos fenólicos e antocianinas, goma de sementes de *Urtica dioica* como materiais de parede e Tween 80 como surfactante, e observaram que o extrato encapsulado apresentou valores de atividade antioxidante superiores ao extrato bruto, avaliada pelos testes de DPPH e FRAP. Resultados semelhantes foram apresentados por Soleymanfallah *et al.* (132) ao encapsular um extrato aquoso de uvas em nanopartículas de quitosana e tripolifosfato.

A potencialização da atividade antioxidante observadas no presente estudo e na literatura citada pode ser associada ao aumento da superfície de contato proporcionada pelos pequenos tamanhos obtidos através da nanoencapsulação, que possibilita um maior número de interações químicas, estabiliza os compostos ativos, aumentando a dispersibilidade, a bioacessibilidade e a biodisponibilidade dos compostos encapsulados (93). Estudos futuros poderão esclarecer os mecanismos envolvidos nos achados do presente trabalho.

O material da parede usado também pode afetar as propriedades antioxidantes das partículas produzidas. Dependendo da capacidade dos materiais de parede de doar elétrons e hidrogênios, eles podem participar e favorecer reações antioxidantes (133). Ao encapsular naringenina, um composto fenólico do grupo dos flavonoides com alta atividade antioxidante, em nanopartículas (140 nm) de proteína de soro de leite isolada, Yin *et al.* (134) observaram um efeito antioxidante sinérgico entre as atividades da proteína e do flavonoide. Os autores reportaram que as proteínas do soro de leite, compostas por  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbumina e

albumina bovina sérica, podem apresentar atividade antioxidante. A  $\beta$ -lactoglobulina contém cinco cisteínas, que são convertidas em duas pontes dissulfeto intramoleculares e um grupo tiol (-SH) livre, e a capacidade de eliminação de radicais livres destas proteínas é relacionada principalmente ao grupamento tiol. Já a atividade antioxidante dos compostos fenólicos é atribuída aos grupos hidroxilas ligados aos anéis de fenol de suas estruturas. No presente estudo, os resultados de caracterização das partículas (FTIR e DRX) demonstraram que as partículas mantiveram principalmente o perfil estrutural das proteínas utilizadas como agentes encapsulantes, o que pode contribuir para o aumento do potencial antioxidante observado. Além disso, a ampliação da superfície de contato promovida pela nanoencapsulação, a estabilização e consequente redução da agregação das nanopartículas no pH 7,0 aumentam a exposição dos grupos funcionais favorecendo as interações e, conseqüentemente, melhorando a atividade antioxidante.

A potencialização da atividade antioxidante das partículas reforçam a escolha da nanoprecipitação para a encapsulação de antocianinas e outros compostos fenólicos de jambolão, o qual demonstrou ser um excelente método para a produção de sistemas de nanocarreadores, com destaque para os sistemas EWPC50 e EWPI100, que apresentaram ótimas características físico-químicas e estruturais, além de alta atividade antioxidante, potencializada em 91,49 e 110% com relação ao extrato bruto, respectivamente, propriedade que está diretamente relacionada com vários benefícios à saúde humana. Avaliações futuras irão investigar qual destes sistemas reúne as melhores características para aplicação como aditivo antioxidante e corante em alimentos e nutracêuticos, além de avaliação em estudos pré-clínicos (modelo animal). As proteínas do soro do leite e a pectina utilizadas como materiais de parede são biopolímeros naturais de alto valor biológico e com diversas aplicações tecnológicas, especialmente na indústria de alimentos. Isto posto, os sistemas de nanopartículas produzidos e caracterizados pelo presente estudo apresentam alto potencial de desenvolvimento de futuros estudos que avaliem a estabilidade, biodisponibilidade e a segurança das partículas, visando ampliar suas possibilidades de aplicação.

Os resultados apresentados neste trabalho trazem alternativas viáveis e econômicas para o aproveitamento do jambolão, que é reconhecidamente uma fonte rica em compostos bioativos benéficos para a saúde humana, porém muito pouco explorada comercialmente quando comparada a outras frutas tropicais. Os

compostos fenólicos do jambolão possuem ótimas propriedades antioxidantes, e a extração destes compostos é uma estratégia para inclusão desses compostos em alimentos e para a produção de produtos com alto valor agregado. A tecnologia de ultrassom utilizada para a obtenção do extrato estudado neste trabalho é considerada um método de extração “verde”, mais eficiente em termos de tempo e consumo de energia, além de possibilitar a eliminação do uso de solventes orgânicos considerados perigosos para a saúde humana e para o meio-ambiente. Além disso, este trabalho trouxe a proposta de um método simples e econômico com aplicação de nanotecnologia para a produção de partículas contendo compostos fenólicos de jambolão a base de biopolímeros naturais, que apresentaram ótima atividade antioxidante e um grande potencial de aplicação em alimentos e em estudos que avaliem suas funcionalidades biológicas.

## 6. CONCLUSÕES

Este estudo avaliou o efeito de diferentes métodos de extração (convencional - EC, exaustiva- EE e assistida por ultrassom- EAU), sobre o rendimento de compostos fenólicos totais (CFT) e antocianinas de jambolão. Os resultados obtidos demonstram que a extração de CFT é favorecida pela melhora de solubilidade gerada pelo emprego de temperatura da EC, enquanto que para as antocianinas, a quebra da parede celular pela EAU se mostrou mais benéfica.

A identificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos apontou a presença de pelo menos 13 compostos, principalmente as antocianinas malvidina 3,5-diglicosídeo, delphinidina 3-galactosídeo e cianidina 3,5-diglicosídeo, procianidina B2 e ácidos fenólicos caftárico, gálico, cafeico e clorogênico. O extrato EAU foi escolhido para sequencial processo de encapsulação por se mostrar um método vantajoso pela economia de tempo, além de apresentar um ótimo potencial antioxidante e corante.

A técnica de nanoprecipitação, aliada à combinação de diferentes agentes encapsulantes e à precipitação em diferentes composições de fases antissolvente, demonstrou ser eficiente na encapsulação dos compostos interesse, obtendo partículas na escala nano com características físico-químicas satisfatórias e com potencial antioxidante potencializado, o que pode proteger e otimizar a aplicação destes compostos em produtos alimentícios.

## 7. TRAJETÓRIA ACADÊMICA

As principais contribuições desta dissertação foi propor um método de processamento do jambolão, para a obtenção de produtos com alto valor econômico e tecnológico agregado, os extratos e os encapsulados, a partir de um fruto muito pouco explorado comercialmente. As tecnologias utilizadas para a obtenção do extrato e das partículas são consideradas simples, econômicas e sustentáveis, eficientes em termos de tempo e consumo de energia, além de utilizar solventes e ingredientes seguros para aplicação em alimentos para consumo humano. Os produtos deste trabalho apresentaram ótima atividade antioxidante e um grande potencial de aplicação em alimentos e em estudos que avaliem suas funcionalidades biológicas.

O desenvolvimento deste trabalho começou no ano de 2021, com a participação e apresentação de artigo nas reuniões científicas quinzenais no projeto de extensão “Nutrisbioativos”. Neste mesmo ano, o trabalho “Extraction of polyphenols from Jambolan fruit (*Syzygium cumini* L.): Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional methods” foi apresentado no formato pôster no 14º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos (SLACA) e participei do Congresso Interdisciplinar em Saúde como avaliadora de trabalhos, e como autora do trabalho “Composição centesimal e teor de antocianinas do Jambolão (*Syzygium cumini*)”. Atuei como colaboradora nos projetos de pesquisa “Empoderamento da sociobiodiversidade regional por meio da determinação do valor nutricional e bioativo de Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC)” e “Processamento, composição centesimal e atividade antioxidante da casca da manga e do jambolão”.

No primeiro semestre de 2022, foi cumprido estágio em docência no módulo prático da disciplina de Bioquímica de Alimentos do curso de graduação em Nutrição, em que atuei nas aulas práticas com os experimentos de “Determinação de proteínas em alimentos”, “Fraudes em leite” e “Modificação de pigmentos sob diferentes condições”. Participei como co-orientadora e membro da banca de TCC da aluna Ana Karolinne do Nascimento Silva intitulado “Composição centesimal e extração de compostos bioativos do Jambolão (*Syzygium cumini*)”, além de atuar como colaboradora nos projetos de pesquisa “Caracterização química, nutricional e funcionalidade de frutos da biodiversidade

brasileira: Guajiru (*Chrysobalanus icaco*) e Goiti (*Licania tomentosa*).” e “Perfil químico, funcionalidade e aplicação tecnológica de compostos bioativos de fontes vegetais subutilizadas: estudos de bioprospecção e valorização da sociobiodiversidade”.

No segundo semestre de 2022, foi feita a apresentação dos resumos “Effect of the adjustment of formulation parameters on the encapsulation efficiency of pectin particles loaded with anthocyanin-rich extract from *Syzygium cumini* L.” e “Comparison between conventional and advanced methods of extraction on the polyphenol content and antioxidant activity of jambolan fruits (*Syzygium cumini* L.)” e participei do 2nd International Congress on Bioactive Compounds (ICBC 2022), que aconteceu de 9 a 10 de novembro/ 2022, na UNICAMP. Foram publicados os resumos expandidos “Efeito de métodos convencionais e avançados de extração no teor e atividade antioxidante de polifenóis de jambolão (*Syzygium Cumini* (L.))” e “Avaliação do efeito de diferentes condições de tempo e potência na extração assistida por microondas (EAM) de compostos bioativos do jambolão (*Syzygium cumini* (L.))” nos “Anais do 28º Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos - CBCTA – 2022 ISBN: 978-65-5465-011-3” e participei do 28º Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos que aconteceu de 22 a 25 de novembro/2022, com carga horária de 31 horas. Ainda em 2022, participei como co-orientadora e membro da banca de TCC da Thaíza Rodrigues de Souza intitulado “Impacto do processamento no teor de bioativos da Monguba (*Pachira Aquatica* Aubl.): O cacau - selvagem entre as Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC)”.

Em 2023, o resumo “Encapsulation of phenolic-rich extract from jambolan by nanoprecipitation technique” foi submetido e aceito para apresentação no formato pôster no XXI B-Materials Research Society Meeting que vai acontecer em Maceió-AL em outubro deste ano. Participei como co-orientadora e membro na banca de TCC da aluna Maíra Heloisa de Carvalho Lima com o trabalho “Avaliação do efeito de diferentes condições de tempo e potência na extração assistida por microondas de compostos bioativos do jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels).

Todas estas experiências foram valiosas para o aperfeiçoamento e amadurecimento da minha prática profissional enquanto técnica de laboratório servidora da universidade, e enquanto pesquisadora da área de alimentos. A

participação como colaboradora em diversos projetos de pesquisa estreitou minha relação com os alunos e professores do Departamento de Nutrição, e as habilidades adquiridas durante o desenvolvimento de meu projeto de dissertação agregou e possibilitou que eu participasse mais ativamente destes projetos. Enquanto técnica de laboratório, eu tenho acompanhado a realização do módulo prático da disciplina de Bioquímica de Alimentos há vários anos, o que me ajudou muito na participação como estagiária em docência no módulo experimental da disciplina, no entanto, foi a primeira vez em que eu planejei, organizei e conduzi os experimentos com as turmas, e isso agregou novas habilidades que serão muito importantes em minha trajetória enquanto profissional da educação desta universidade.

## **FINANCIAMENTO**

Este trabalho obteve suporte financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## REFERÊNCIAS

1. SeTIC-UFSC. Jambolão [Internet]. Horto Didático de Plantas Medicinais do HU/CCS. 2020 [cited 2023 Apr 12]. Available from: <https://hortodidatico.ufsc.br/jambolao/>
2. Soares AC, Pereira NR. Secagem da polpa de jambolão (*Syzygium cumini*) em secador de leite de jorro: efeito da clara de ovo como agente carreador de secagem na qualidade do produto. *Brazilian Journal of Food Technology*. 2020;23.
3. Kumar S, Sharma S, Kumar V, Sharma A, Kaur R, Saini R. Jamun (*Syzygium cumini* (L.) Skeels): The conventional underutilized multifunctional plant-an exotic gleam into its food and functional significance. *Industrial Crops and Products*. 2023 Jan 1;191:115873–3.
4. Aziz A, Banerjee S. Phytochemical Screening and Antibacterial Activity study of *Syzygium cumini* (Myrtaceae) Seed Extracts. *Pharmatutor*. 2018 Apr 1;6(4):70.
5. Qamar M, Akhtar S, Ismail T, Wahid M, Abbas MW, Mubarak MS, et al. Phytochemical Profile, Biological Properties, and Food Applications of the Medicinal Plant *Syzygium cumini*. *Foods*. 2022 Jan 28;11(3):378.
6. Sharma V, Heer A, Kour N, Sharma A, Singh SK. Karonda and Jamun seeds' in vitro anticancer efficacy. *Indian Journal of Traditional Knowledge*. 2019 Jul 16;18(3):573–8.
7. Sari AN, Januardi J, Diningrat DS. Effect of Ethanol Extract of Jamblang Aceh (*Syzygium cumini*) in Diabetic Mice (*Mus musculus*) and Its Potential As Anti-Diabetic Agent. *Elkawnie*. 2020 Jun 30;6(1):37.
8. Rathod M, Rakholiya K, Kaneria M. Effects of Extraction Techniques on Phytochemical Analysis and Antioxidant Activity of *Syzygium Cumini* (L.) Skeels Seeds. *SSRN Electronic Journal*. 2020;
9. Montakarn Thongsom, Lanchakon Chanudom, Jitbanjong Tangpong. Co-treatment Effect of *Syzygium cumini* (L.) Skeels on Indomethacin Induced Gastric Ulcer on Mice Model. *Walailak Journal of Science and Technology (WJST)*. 2019 Dec

1;16(3):193–206.

10. de Sousa Sabino LB, de Brito ES, da Silva Júnior IJ. Jambolan— *Syzygium jambolanum*. *Exotic Fruits* [Internet]. 2018 [cited 2019 Sep 26];251–6. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128031384000320>
11. Tavares IM de C, Lago-Vanzela ES, Rebello LPG, Ramos AM, Gómez-Alonso S, García-Romero E, et al. Comprehensive study of the phenolic composition of the edible parts of jambolan fruit (*Syzygium cumini* (L.) Skeels). *Food Research International*. 2016 Apr;82:1–13.
12. Alara OR, Abdurahman NH, Ukaegbu CI. Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science*. 2021;4:200–14.
13. Sharif N, Khoshnoudi-Nia S, Jafari SM. Nano/microencapsulation of anthocyanins; a systematic review and meta-analysis. *Food Research International*. 2020 Jun;132:109077.
14. Sabino LB de S, Filho EGA, Fernandes FAN, de Brito ES, Júnior IJ da S. Optimization of pressurized liquid extraction and ultrasound methods for recovery of anthocyanins present in jambolan fruit (*Syzygium cumini* L.). *Food and Bioproducts Processing*. 2021 May;127:77–89.
15. Lefebvre T, Destandau E, Lesellier E. Selective extraction of bioactive compounds from plants using recent extraction techniques: A review. *Journal of Chromatography A*. 2021 Jan;1635:461770.
16. Rosales O, Silva, Felipe Rebello Lourenço, Aymoto M, João Paulo Fabi. Nanoencapsulation of anthocyanins from blackberry (*Rubus* spp.) through pectin and lysozyme self-assembling. *Food Hydrocolloids*. 2021 May 1;114:106563–3.
17. Abdin M, Salama MA, Gawad RMA, Fathi MA, Alnadari F. Two-Steps of Gelation System Enhanced the Stability of *Syzygium cumini* Anthocyanins by Encapsulation with Sodium Alginate, Maltodextrin, Chitosan and Gum Arabic. *Journal of Polymers and the Environment*. 2021 Apr 12;29(11):3679–92.
18. Rodriguez-Amaya DB. Update on natural food pigments - A mini-review on

carotenoids, anthocyanins, and betalains. *Food Research International*. 2018 May;

19. Pisoschi AM, Pop A, Cimpeanu C, Turcuş V, Predoi G, Iordache F.

Nanoencapsulation techniques for compounds and products with antioxidant and antimicrobial activity - A critical view. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2018 Sep;157:1326–45.

20. Daniel W, Silvani Verruck, Alcilene Rodrigues Monteiro, Germán Ayala Valencia.

The mechanism, biopolymers and active compounds for the production of nanoparticles by anti-solvent precipitation: A review. *Food Research International*. 2023 Mar 1;168:112728–8.

21. Rashid R, Sajad Ahmad Wani, Manzoor S, F.A. Masoodi, Altaf A.

Nanoencapsulation of pomegranate peel extract using maltodextrin and whey protein isolate. Characterisation, release behaviour and antioxidant potential during simulated invitro digestion. *Food bioscience*. 2022 Dec 1;50:102135–5.

22. Wang LS, Stoner GD. Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Letters [Internet]*. 2008 Oct;269(2):281–90. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2582525/>

23. do Nascimento-Silva NRR, Bastos RP, da Silva FA. Jambolan (*Syzygium cumini* (L.) Skeels): A review on its nutrients, bioactive compounds and health benefits.

*Journal of Food Composition and Analysis*. 2022 Jun;109:104491.

24. Coelho EM, de Azevêdo LC, Corrêa LC, Bordignon-Luiz MT, Lima M dos S.

Phenolic Profile, Organic Acids and Antioxidant Activity of Frozen Pulp and Juice of the Jambolan (*Syzygium Cumini*). *Journal of Food Biochemistry [Internet]*. 2015 Nov 9;40(2):211–9. Available from:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jfbc.12209>

25. AO E, El-Nashar HA. Technological and Nutritional Aspects of Incorporating Jamun (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) Fruit Extract into Yoghurt. *Journal of Food Research*. 2022 Jan 21;11(1):28.

26. Dantas DS, da Silva Gomes L, Costa Gonçalves LS, Correia JO, Silva GM da,

Rocha de Queiroga AP, et al. Lactose hydrolysis implications on dairy beverages with

autochthonous *Limosilactobacillus mucosae* and *Syzygium cumini* pulp. *LWT*. 2022 Feb;155:112963.

27. Putri EBP, Rozaki RD. A comparative assessment of chemical characteristics of goat's milk yoghurt after the addition of *Syzygium cumini* L. *Bali Medical Journal*. 2022 Aug 3;11(2):692–6.

28. Regina A, Renan Campos Chisté, Pena S. Stability of ascorbic acid and anthocyanins of jambolan ( *Syzygium cumini* ) and camu-camu ( *Myrciaria dubia* ) juice blend during pasteurisation and storage at room temperature. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2022 Mar 2;46(5).

29. Nadeem M, Tehreem S, Ranjha MMAN, Ahmad A, Din A, Mueen Ud Din G, et al. Probing of ultrasonic assisted pasteurization (UAP) effects on physicochemical profile and storage stability of jambul (*Syzygium cumini* L.) squash. *International Journal of Food Properties*. 2022 Mar 29;25(1):661–72.

30. Poses Mussi L, Pereira N. *Food Technol., Campinas*, v. 25, e2021096, 2022 | [https:// Brazilian Journal of Food Technology](https://Brazilian Journal of Food Technology). [cited 2023 Mar 2];25:2021096.

Available from:

<https://www.scielo.br/j/bjft/a/nvvmT6crrf9JGFLk5XPRNSx/?format=pdf&lang=en>

31. Kaur N, Aggarwal P. Development and characterisation of packing, microstructural, physico- and phytochemical attributes of potential functional jamun ( *Syzygium cumini* L.) pomace powder for direct compression: high antioxidant nutraceutical tablets. *International Journal of Food Science & Technology*. 2022 Jul 4;

32. Iasnaia Maria de Carvalho T, Nogueira TYK, Mauro MA, Gómez-Alonso S, Gomes E, Da-Silva R, et al. Dehydration of jambolan [*Syzygium cumini* (L.)] juice during foam mat drying: Quantitative and qualitative changes of the phenolic compounds. *Food Research International*. 2017 Dec;102:32–42.

33. Kaur I, Arun Dev Sharma, Mrinal Samtiya, Pereira-Caro G, Rodríguez-Solana R, Tejpal Dhewa, et al. Potential of bioactive compounds derived from underutilized fruit-bearing plants: a comprehensive review. *European Food Research and Technology*. 2022 Nov 29;249(3):553–72.

34. Brunoro M, Carla. Alimentos Funcionais: Componentes Bioativos e Efeitos Fisiológicos. Editora Rubio; 2016.
35. Bhat A, Li L, Mangali S, Kour N, Dasari D, Ghatage T, et al. Syzygium cumini (jamun) fruit-extracted phytochemicals exert anti-proliferative effect on ovarian cancer cells. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. 2021;0(0):0.
36. Bhanuprakash V, Hosamani M, Balamurugan V, Gandhale P, Naresh R, Swarup D, et al. In vitro antiviral activity of plant extracts on goatpox virus replication. *Indian Journal of Experimental Biology* [Internet]. 2008 Feb 1 [cited 2023 Apr 23];46(2):120–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18335810/>
37. Sousa M de M, Lima RMT de, Lima A de, Reis AC, Cavalcante AA de CM, Sattler JAG, et al. Antioxidant action and enzyme activity modulation by bioaccessible polyphenols from jambolan (*Syzygium cumini* (L.) Skeels). *Food Chemistry*. 2021 Nov;363:130353.
38. Halim A, Kawser Alam Kanan, Nahar T, Md. Jiaur Rahman, Khondoker Shahin Ahmed, Hossain H, et al. Metabolic profiling of phenolics of the extracts from the various parts of blackberry plant (*Syzygium cumini* L.) and their antioxidant activities. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*. 2022 Jul 1;167:113813–3.
39. Dias R, Oliveira H, Fernandes I, Simal-Gandara J, Perez-Gregorio R. Recent advances in extracting phenolic compounds from food and their use in disease prevention and as cosmetics. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2020 Apr 27;61(7):1130–51.
40. Sahreh Shabani, Zahra Rabiei, Hossein Amini-Khoei. Exploring the multifaceted neuroprotective actions of gallic acid: a review. *International journal of food properties* [Internet]. 2020 [cited 2022 Nov 8];23(1):736–52. Available from: <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/7226306>
41. Wadhwa K, Kadian V, Puri V, Bhardwaj BY, Sharma A, Pahwa R, et al. New insights into quercetin nanoformulations for topical delivery. *Phytomedicine Plus*. 2022 May;2(2):100257.
42. Kaczmarek B. Tannic Acid with Antiviral and Antibacterial Activity as A Promising

Component of Biomaterials—A Minireview. *Materials* [Internet]. 2020 Jul 20;13(14). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7412100/>

43. Garavand F, Jalai-Jivan M, Assadpour E, Jafari SM. Encapsulation of phenolic compounds within nano/microemulsion systems: A review. *Food Chemistry*. 2021 Dec;364:130376.

44. Lee J, Durst RW, Wrolstad RE, Eisele T, Giusti MM, Hach J, et al. Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. 2005 Sep 1;88(5):1269–78.

45. Singh B, Singh JP, Kaur A, Singh N. Insights into the phenolic compounds present in jambolan (*Syzygium cumini*) along with their health-promoting effects. *International Journal of Food Science & Technology*. 2018 Jun 3;53(11):2431–47.

46. Sinopoli A, Calogero G, Bartolotta A. Computational aspects of anthocyanidins and anthocyanins: A review. *Food Chemistry*. 2019 Nov;297:124898.

47. Qin Y, Liu Y, Yong H, Liu J, Zhang X, Liu J. Preparation and characterization of active and intelligent packaging films based on cassava starch and anthocyanins from *Lycium ruthenicum* Murr. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019 Aug;134:80–90.

48. Chen BH, Stephen Inbaraj B. Nanoemulsion and Nanoliposome Based Strategies for Improving Anthocyanin Stability and Bioavailability. *Nutrients*. 2019 May 10;11(5):1052.

49. Stanquevis R. Otimização de obtenção de um extrato aquoso de milho roxo (*Zea mays* L.) rico em antocianinas e perfil de degradação. 2013 Oct 23;

50. do Carmo Brito B de N, da Silva Pena R, Santos Lopes A, Campos Chisté R. Anthocyanins of Jambolão (*Syzygium cumini*): Extraction and pH-Dependent Color Changes. *Journal of Food Science*. 2017 Aug 23;82(10):2286–90.

51. Yang M, I. Koo S, O. Song W, K. Chun O. Food Matrix Affecting Anthocyanin Bioavailability: Review. *Current Medicinal Chemistry*. 2011 Jan 1;18(2):291–300.

52. Simas Frauches N, Montenegro J, Amaral T, Abreu JP, Laiber G, Junior J, et al. Antiproliferative Activity on Human Colon Adenocarcinoma Cells and In Vitro Antioxidant Effect of Anthocyanin-Rich Extracts from Peels of Species of the Myrtaceae Family. *Molecules*. 2021 Jan 22;26(3):564.
53. Oteiza PI, Cremonini E, Fraga CG. Anthocyanin actions at the gastrointestinal tract: Relevance to their health benefits. *Molecular Aspects of Medicine* [Internet]. 2023 Feb 1 [cited 2023 Feb 15];89:101156. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0098299722001017?via%3Dihub>
54. Sun M, Li D, Hua M, Miao X, Su Y, Chi Y, et al. Analysis of the alleviating effect of black bean peel anthocyanins on type 2 diabetes based on gut microbiota and serum metabolome. *Journal of Functional Foods*. 2023 Mar 1;102:105456–6.
55. Peng Y, Yan Y, Wan P, Dong W, Huang K, Ran L, et al. Effects of long-term intake of anthocyanins from *Lycium ruthenicum* Murray on the organism health and gut microbiota in vivo. *Food Research International*. 2020 Apr 1;130:108952–2.
56. Tarone AG, Cazarin CBB, Marostica Junior MR. Anthocyanins: New techniques and challenges in microencapsulation. *Food Research International*. 2020 Jul;133:109092.
57. He J, Giusti MM. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annual review of food science and technology* [Internet]. 2010;1:163–87. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22129334>
58. Kumar M, Dahuja A, Tiwari S, Punia S, Tak Y, Amarowicz R, et al. Recent trends in extraction of plant bioactives using green technologies: A review. *Food Chemistry*. 2021 Aug;353:129431.
59. Yoon Hlaine Barani, Zhang M, Gao B. Effect of thermal and ultrasonic pretreatment on enzyme inactivation, color, phenolics and flavonoids contents of infrared freeze-dried rose flower. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2021 Apr 1;15(2):995–1004.
60. Chebrolu KK, Patil BS, Jifon JL. Optimization of flavanones extraction by modulating differential solvent densities and centrifuge temperatures. *Talanta*. 2011

Jul 15;85(1):353–62.

61. Gadioli Tarone A, Keven Silva E, Dias de Freitas Queiroz Barros H, Baú Betim Cazarin C, Roberto Marostica Junior M. High-intensity ultrasound-assisted recovery of anthocyanins from jaboticaba by-products using green solvents: Effects of ultrasound intensity and solvent composition on the extraction of phenolic compounds. *Food Research International*. 2021 Feb;140:110048.

62. Chemat F, Rombaut N, Sicaire AG, Meullemiestre A, Fabiano-Tixier AS, Abert-Vian M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2017 Jan;34:540–60.

63. Maxime Beaudor, Vauchel P, Pradal D, Abdulhadi Aljawish, Phalip V. Comparing the efficiency of extracting antioxidant polyphenols from spent coffee grounds using an innovative ultrasound-assisted extraction equipment versus conventional method. *Chemical Engineering and Processing*. 2023 Mar 1;188:109358–8.

64. Dranca F, Oroian M. Optimization of ultrasound-assisted extraction of total monomeric anthocyanin (TMA) and total phenolic content (TPC) from eggplant (*Solanum melongena* L.) peel. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2016 Jul;31:637–46.

65. More PR, Arya SS. Intensification of bio-actives extraction from pomegranate peel using pulsed ultrasound: Effect of factors, correlation, optimization and antioxidant bioactivities. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2021 Apr;72:105423.

66. Pinela J, Prieto MA, Pereira E, Jabeur I, Barreiro MF, Barros L, et al. Optimization of heat- and ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* calyces for natural food colorants. *Food Chemistry*. 2019 Mar;275:309–21.

67. Joye IJ, McClements DJ. Production of nanoparticles by anti-solvent precipitation for use in food systems. *Trends in Food Science & Technology*. 2013 Dec;34(2):109–23.

68. Hashem Andishmand, Sodeif Azadmard-Damirchi, Hamed Hamishekar, Torbati M, Mohammad Rafi Kharazmi, Savage GP, et al. Nano-delivery systems for encapsulation of phenolic compounds from pomegranate peel. *Advances in Colloid*

and Interface Science. 2023 Jan 1;311:102833–3.

69. Flores FP, Singh RK, Kong F. Anthocyanin extraction, microencapsulation, and release properties during in vitro digestion. *Food Reviews International*. 2015 Apr 29;32(1):46–67.

70. Sahani S, Sharma YC. Advancements in applications of nanotechnology in global food industry. *Food Chemistry*. 2020 Oct;128318.

71. Joye IJ, McClements DJ. Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2014 Oct;19(5):417–27.

72. Bušić A, Komes D, Belščak-Cvitanović A, Vojvodić Cebin A, Špoljarić I, Mršić G, et al. The Potential of Combined Emulsification and Spray Drying Techniques for Encapsulation of Polyphenols from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Leaves. *Food Technology and Biotechnology*. 2018;56(4).

73. Bamba B, Shi J, Tranchant C, Xue S, Forney C, Lim LT, et al. Coencapsulation of Polyphenols and Anthocyanins from Blueberry Pomace by Double Emulsion Stabilized by Whey Proteins: Effect of Homogenization Parameters. *Molecules*. 2018 Oct 2;23(10):2525.

74. Nazareth MS, Shreelakshmi SV, Rao PJ, Shetty NP. Micro and nanoemulsions of *Carissa spinarum* fruit polyphenols, enhances anthocyanin stability and anti-quorum sensing activity: Comparison of degradation kinetics. *Food Chemistry* [Internet]. 2021 Oct 15 [cited 2023 Feb 11];359:129876. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33940472/>

75. Homayouni Rad A, Ebrahimi B, Gharehbeglou P. Influence of polymeric complexes on the stability and releasing behavior of phenol-loaded nano-emulsions: Modeling and optimization. *Journal of Molecular Liquids*. 2022 Mar;349:118089.

76. Sun Y, Chi J, Ye X, Wang S, Liang J, Yue P, et al. Nanoliposomes as delivery system for anthocyanins: Physicochemical characterization, cellular uptake, and antioxidant properties. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*. 2021 Mar 1;139:110554–4.

77. Salah M, Mansour M, Zogona D, Xu X. Nanoencapsulation of anthocyanins-loaded  $\beta$ -lactoglobulin nanoparticles: Characterization, stability, and bioavailability *in vitro*. *Food Research International*. 2020 Nov;137:109635.
78. Jeong SJ, Lee, Hyeon Yong Lee. Nanoencapsulation of synergistic antioxidant fruit and vegetable concentrates and their stability during *in vitro* digestion. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2020 Feb 1;100(3):1056–63.
79. Lima F, de D, Barbosa J, Juliani Buchveitz Pires, Tatiane Jéssica Siebeneichler, Dianini Hüttner Kringel, et al. Encapsulation of Anthocyanic Extract of Jambolan (*Syzygium cumini* (L.)) in Zein Sub-micron Fibers Produced by Electrospinning. *Food Biophysics*. 2022 Aug 12;18(1):133–47.
80. Calliari CM, Campardelli R, Pettinato M, Perego P. Encapsulation of Hibiscus sabdariffa Extract into Zein Nanoparticles. *Chemical Engineering & Technology*. 2020 Aug 31;43(10):2062–72.
81. Seid Reza Falsafi, Asli Can Karaca, Deng L, Wang Y, Li H, Askari G, et al. Insights into whey protein-based carriers for targeted delivery and controlled release of bioactive components. *Food Hydrocolloids*. 2022 Jul 1;133:108002–2.
82. Kong F, Kang S, Zhang J, Jiang L, Liu Y, Yang M, et al. The non-covalent interactions between whey protein and various food functional ingredients. *Food Chemistry*. 2022 Nov;394:133455.
83. Rosales O, João Paulo Fabi. Pectin-based nanoencapsulation strategy to improve the bioavailability of bioactive compounds. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023 Feb 1;229:11–21.
84. Escobar-Puentes AA, García-Gurrola A, Rincón S, Zepeda A, Martínez-Bustos F. Effect of amylose/amylopectin content and succinylation on properties of corn starch nanoparticles as encapsulants of anthocyanins. *Carbohydrate Polymers*. 2020 Aug 20;250:116972–2.
85. Wang M, Li L, Wan M, Lin YW, Tong Y, Cui Y, et al. Preparing, optimising, and evaluating chitosan nanocapsules to improve the stability of anthocyanins from *Aronia melanocarpa*. *RSC Advances*. 2021 Jan 1;11(1):210–8.

86. Yao L, Xu J, Zhang L, Liu L, Zhang L. Nanoencapsulation of anthocyanin by an amphiphilic peptide for stability enhancement. *Food Hydrocolloids* [Internet]. 2021 Sep 1;118:106741. Available from: [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X21001570?casa\\_token=JQDf1BizXXQAAAAA:fQU4Ro8vz5TAls4cmA9z86Kdx\\_tvRbm-qjdaSnPcQecJEIaC1i6u4woSXJwda10uKUpMiLy85LA](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X21001570?casa_token=JQDf1BizXXQAAAAA:fQU4Ro8vz5TAls4cmA9z86Kdx_tvRbm-qjdaSnPcQecJEIaC1i6u4woSXJwda10uKUpMiLy85LA)
87. Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 1995.
88. Atwater WO. The potential energy of food. *The chemistry of food III Century Magazine*. 1887;34:397–405.
89. Horwitz W, Latimer GW. *Official methods of analysis of AOAC International*. 18th ed. Gaithersburg, Md.: AOAC International Gaithersburg, Md.; 2005.
90. Tantratian S, Krusong W, Siriwetwut O. Combination of *Syzygium cumini* (L) Skeels seed extract with acetic acid to control *Escherichia coli* on mint (*Mentha cordifolia* opiz.) leaves. *LWT*. 2022 Jul;164:113619.
91. Swain T, Hillis WE. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I.—The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1959 Jan;10(1):63–8.
92. Rufino M do SM, Alves RE, de Brito ES, Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto F, Mancini-Filho J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*. 2010 Aug;121(4):996–1002.
93. Morais N de S, Passos TS, Ramos GR, Ferreira VAF, Moreira SMG, Chaves Filho GP, et al. Nanoencapsulation of buriti oil (*Mauritia flexuosa* L.f.) in porcine gelatin enhances the antioxidant potential and improves the effect on the antibiotic activity modulation. Nguyen TD, editor. *PLOS ONE*. 2022 Mar 18;17(3):e0265649.
94. De Queiroz JLC, De Araújo Costa RO, Rodrigues Matias LL, De Medeiros AF, Teixeira Gomes AF, Santos Pais TD, et al. Chitosan-whey protein nanoparticles improve encapsulation efficiency and stability of a trypsin inhibitor isolated from *Tamarindus indica* L. *Food Hydrocolloids*. 2018 Nov;84:247–56.

95. Alessandra Soares Vital, Barbosa F, Susilene E, Jerônimo M, Sônia Duque Paciulli. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO QUÍMICA E COMPOSTOS BIOATIVOS EM POLPA DE JAMBOLÃO (*Syzygium cumini*). *Prática e Pesquisa em Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2020 Feb 10;22–32.
96. T. Barcia M, B. Pertuzatti P, C. Jacques A, T. Godoy H, Zambiazzi R. Bioactive Compounds, Antioxidant Activity and Percent Composition of Jambolão Fruits (*Syzygium cumini*). *The Natural Products Journal*. 2012 May 1;2(2):129–38.
97. Ebrahimi P, Mihaylova D, Marangon CM, Grigoletto L, Lante A. Impact of Sample Pretreatment and Extraction Methods on the Bioactive Compounds of Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) Leaves. *Molecules* [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2023 May 12];27(22):8110. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/22/8110>
98. Amanda Muniz Oliveira, Viganó J, Vitor Lacerda Sanches, Martínez J. Extraction of potential bioactive compounds from industrial Tahiti lime (*Citrus latifolia* Tan.) by-product using pressurized liquids and ultrasound-assisted extraction. *Food Research International*. 2022 Jul 1;157:111381–1.
99. Ligia Mara Gonzaga, Severino, Souto R, Romero M. Medidas de distribuição do tamanho de partícula combinado com os dados do peneiramento convencional / Particle size distribution measurements combined with conventional screening data. *Brazilian Journal of Development*. 2021 May 25;7(5):52259–71.
100. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. FARMACOPEIA BRASILEIRA Agência Nacional de Vigilância Sanitária -Anvisa 6ª EDIÇÃO K [Internet]. 2019. Available from: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira/VOLUM E1FB6at2Erratappdfcomcapa.pdf>
101. Alsaud N, Farid M. Insight into the Influence of Grinding on the Extraction Efficiency of Selected Bioactive Compounds from Various Plant Leaves. *Applied Sciences* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2021 Dec 14];10(18):6362. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-3417/10/18/6362/htm>
102. Jovanović AA, Đorđević VB, Zdunić GM, Pljevljakušić DS, Šavikin KP, Gođevac DM, et al. Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus*

serpyllum L. herb using maceration, heat- and ultrasound-assisted techniques. Separation and Purification Technology. 2017 May;179:369–80.

103. Maxime Beaudor, Vauchel P, Pradal D, Abdulhadi Aljawish, Phalip V. Comparing the efficiency of extracting antioxidant polyphenols from spent coffee grounds using an innovative ultrasound-assisted extraction equipment versus conventional method. Chemical Engineering and Processing. 2023 Mar 1;188:109358–8.

104. Xue H, Tan J, Li Q, Tang J, Cai X. Optimization Ultrasound-Assisted Deep Eutectic Solvent Extraction of Anthocyanins from Raspberry Using Response Surface Methodology Coupled with Genetic Algorithm. Foods [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2020 Dec 23];9(10):1409. Available from: <https://www.mdpi.com/2304-8158/9/10/1409>

105. Backes E, Pereira C, Barros L, Prieto MA, Genena AK, Barreiro MF, et al. Recovery of bioactive anthocyanin pigments from *Ficus carica* L. peel by heat, microwave, and ultrasound based extraction techniques. Food Research International. 2018 Nov;113:197–209.

106. Turker D, Dogan M. Ultrasound-assisted natural deep eutectic solvent extraction of anthocyanin from black carrots: Optimization, cytotoxicity, in-vitro bioavailability and stability. Food and Bioproducts Processing. 2022 Jan 1;132:99–113.

107. Kenari RE, Razavi R. Encapsulation of bougainvillea (*Bougainvillea spectabilis*) flower extract in *Urtica dioica* L. seed gum: Characterization, antioxidant/antimicrobial properties, and in vitro digestion. Food Science & Nutrition. 2022 Jun 23;

108. Virgen-Carrillo CA, Valdés Miramontes EH, Fonseca Hernández D, Luna-Vital DA, Mojica L. West Mexico Berries Modulate  $\alpha$ -Amylase,  $\alpha$ -Glucosidase and Pancreatic Lipase Using In Vitro and In Silico Approaches. Pharmaceuticals [Internet]. 2022 Sep 1 [cited 2023 Feb 9];15(9):1081. Available from: <https://www.mdpi.com/1424-8247/15/9/1081>

109. Huang W, Zhang H, Liu W, Li C. Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. Journal of Zhejiang University SCIENCE B [Internet]. 2012 Jan 27;13(2):94–102. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3274736/>

110. Yuan Y, Zheng S, Zeng L, Deng Z, Zhang B, Li H. The Phenolic Compounds, Metabolites, and Antioxidant Activity of Propolis Extracted by Ultrasound-Assisted Method. *Journal of Food Science*. 2019 Nov 21;84(12):3850–65.
111. Lestario LN, Howard LR, Brownmiller C, Stebbins NB, Liyanage R, Lay JO. Changes in polyphenolics during maturation of Java plum (*Syzygium cumini* Lam.). *Food Research International* [Internet]. 2017 Oct 1;100:385–91. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996917301722>
112. de Brito ES, de Araújo MCP, Alves RE, Carkeet C, Clevidence BA, Novotny JA. Anthocyanins Present in Selected Tropical Fruits: Acerola, Jambolão, Jussara, and Guajiru. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007 Nov;55(23):9389–94.
113. Faria AF, Marques MC, Mercadante AZ. Identification of bioactive compounds from jambolão (*Syzygium cumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions. *Food Chemistry*. 2011 Jun;126(4):1571–8.
114. VEIGAS J, NARAYAN M, LAXMAN P, NEELWARNE B. Chemical nature, stability and bioefficacies of anthocyanins from fruit peel of *syzygium cumini* Skeels. *Food Chemistry*. 2007;105(2):619–27.
115. Santiago MCPA, Gouvêa ACMS, Peixoto FM, Borguini RG, Godoy RLO, Pacheco S, et al. Characterization of jamelão (*Syzygium cumini*(L.) Skeels) fruit peel powder for use as natural colorant. *Fruits*. 2015 Nov 5;71(1):3–8.
116. Koop BL, Knapp MA, Di Luccio M, Pinto VZ, Tormen L, Valencia GA, 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 Jan 30;76(1):90–7.
117. Chen J, Zhong K, Jing Y, Liu S, Qin S, Peng F, et al. Procyanidin B2: A promising multi-functional food-derived pigment for human diseases. *Food Chemistry*. 2023 Sep 1;420:136101–1.
118. Vendramin V, Viel A, Vincenzi S. Caftaric Acid Isolation from Unripe Grape: A

“Green” Alternative for Hydroxycinnamic Acids Recovery. *Molecules*. 2021 Feb 21;26(4):1148.

119. Liu Q, Liu F, Zhang L, Niu Y, Liu Z, Liu X. Comparison of chicoric acid, and its metabolites caffeic acid and caftaric acid: In vitro protection of biological macromolecules and inflammatory responses in BV2 microglial cells. *Food Science and Human Wellness*. 2017 Dec;6(4):155–66.

120. Gali L, Bedjou F, Ferrari G, Donsì F. Formulation and characterization of zein/gum arabic nanoparticles for the encapsulation of a rutin-rich extract from *Ruta chalepensis* L. *Food Chemistry*. 2022 Jan;367:129982.

121. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 466, DE 10 DE FEVEREIRO DE 2021 [Internet]. 2021 Feb [cited 2023 Jul 25]. Available from: [http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/5918056/RDC\\_466\\_2021\\_COMP.pdf/9b6e0905-5198-4d53-8ecb-09fd14237bd8](http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/5918056/RDC_466_2021_COMP.pdf/9b6e0905-5198-4d53-8ecb-09fd14237bd8)

122. Safarpour B, Kenari RE, Farmani J. Evaluation of antioxidant properties of nanoencapsulated sage ( *Salvia officinalis* L.) extract in biopolymer coating based on whey protein isolate and Qodumeh Shahri ( *Lepidium perfoliatum* ) seed gum to increase the oxidative stability of sunflower oil. *Food Science & Nutrition*. 2022 Dec 12;

123. Huang X, Liu Y, Zou Y, Liang X, Peng Y, McClements DJ, et al. Encapsulation of resveratrol in zein/pectin core-shell nanoparticles: Stability, bioaccessibility, and antioxidant capacity after simulated gastrointestinal digestion. *Food Hydrocolloids* [Internet]. 2019 Aug 1;93:261–9. Available from: [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X18323993?casa\\_token=I J22vePmWUMAAAAA:k4wRGBGcM0-k5GKaJNBhcyX4jaC9VHv6nGWY6bv8XC\\_oA X6D62jvvFw8UilPZOVf4js7sH\\_t](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X18323993?casa_token=I J22vePmWUMAAAAA:k4wRGBGcM0-k5GKaJNBhcyX4jaC9VHv6nGWY6bv8XC_oA X6D62jvvFw8UilPZOVf4js7sH_t)

124. Rosales O, João Paulo Fabi. Valorization of polyphenolic compounds from food industry by-products for application in polysaccharide-based nanoparticles. *Frontiers in Nutrition*. 2023 May 24;10.

125. Honary S, Zahir F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug

Delivery Systems - A Review (Part 1). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* [Internet]. 2013;12(2). Available from: <http://www.bioline.org.br/pdf?pr13040>

126. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*. 2016 Aug;235:337–51.

127. Ghasemi S, Jafari SM, Assadpour E, Khomeiri M. Production of pectin-whey protein nano-complexes as carriers of orange peel oil. *Carbohydrate Polymers*. 2017 Dec;177:369–77.

128. Salleh N, Goh KKT, Waterland MR, Huffman LM, Weeks M, Matia-Merino L. Complexation of Anthocyanin-Bound Blackcurrant Pectin and Whey Protein: Effect of pH and Heat Treatment. *Molecules* [Internet]. 2022 Jul 1 [cited 2022 Oct 7];27(13):4202–N.PAG. Available from: <https://web.p.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=1&sid=e69d2ad5-58ef-48e2-a07b-cbf107ee36bd%40redis>

129. Roy Choudhury S, Mandal A, Chakravorty D, Gopal M, Goswami A. Evaluation of physicochemical properties, and antimicrobial efficacy of monoclinic sulfur-nanocolloid. *Journal of Nanoparticle Research*. 2013 Mar 31;15(4).

130. Nurhazwani Salleh, Kelvin K.T. Goh, Waterland MR, Huffman LM, Weeks M, Matia-Merino L. The influence of anthocyanins in pectin-whey protein complexation using a natural pigmented blackcurrant pectin. *Food Hydrocolloids*. 2023 Mar 1;140:108672–2.

131. Medeiros AK de, Gomes C, Louize M, Freitas L, Medeiros I, Dayanne Lopes Porto, et al. Nanoencapsulation improved water solubility and color stability of carotenoids extracted from Cantaloupe melon (*Cucumis melo* L.). *Food Chemistry*. 2019 Jan 1;270:562–72.

132. Soleymanfallah S, Khoshkhoo Z, Hosseini SE, Azizi MH. Preparation, physical properties, and evaluation of antioxidant capacity of aqueous grape extract loaded in chitosan-TPP nanoparticles. *Food Science & Nutrition*. 2022 Aug 24;10(10):3272–81.

133. Maqsoudlou A, Assadpour E, Mohebodini H, Jafari SM. The influence of

nanodelivery systems on the antioxidant activity of natural bioactive compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2020 Dec 28;62(12):3208–31.

134. Yin X, Fu Xiaojun, Cheng H, Wusigale, Liang L.  $\alpha$ -Tocopherol and naringenin in whey protein isolate particles: Partition, antioxidant activity, stability and bioaccessibility. 2020 Sep 1;106:105895–5.