



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO TECNOLÓGICO

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

CURSO ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Beatriz Cesa Rovaris

Jenipapo (*Genipa americana* L.) como corante azul natural

Florianópolis

2020

Beatriz Cesa Rovaris

Jenipapo (*Genipa americana* L.) como corante azul natural

Proposta de Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina apresentado como requisito para a obtenção do Título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Acácio Antonio F. Zielinski

Coorientador: Me. Laís Benvenuto

Florianópolis

2020

Beatriz Cesa Rovaris

Jenipapo (*Genipa americana* L.) como corante azul natural

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

Florianópolis, 30 de novembro de 2020.

Prof. Dr. João Borges Laurindo
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Acácio Antonio F. Zielinski
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

MSc. Laís Benvenutti
Coorientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa Dra. Patricia Poletto
Avaliadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr.. Pedro Henrique Santos
Avaliador(a)
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado aos meus pais e amigos.

AGRADECIMENTOS

À minha família que sempre me apoiou e me incentivou, não medindo esforços pela minha educação. Em especial, ao meu pai, que agora não está mais presente fisicamente conosco, mas, com certeza, estaria orgulhoso.

Agradeço aos professores que sempre estiveram dispostos a ajudar e contribuir para o aprendizado, em especial ao meu orientador, Acácio Antonio Ferreira Zielinski por todo suporte e auxílio durante a execução do trabalho.

À minha coorientadora, Laís Benvenuti, por todo auxílio, apoio e ensinamento no desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros do LATESC por todo suporte prestado, em especial à Mayara Kuasnei pela parceria de análises e aos bolsistas de Iniciação Científica, Guilherme Mulatinho Battisti e Thomas Starucka, por toda ajuda.

Aos membros da banca, Patrícia Poletto e Pedro Henrique Santos, pela disponibilidade.

Aos meus colegas de curso e amigos, que me incentivaram no desenvolvimento deste trabalho e ao longo de toda graduação.

A vocês, muito obrigada.

RESUMO

O Jenipapo (*Genipa americana* L.) é um fruto do jenipapeiro que tem origem na Amazônia. O fruto verde do jenipapo quando oxidado produz um corante azul solúvel em água e etanol. Isso ocorre, pois, os frutos verdes apresentam um iridóide glicosídeo incolor chamado de geniposídeo, o qual quando hidrolisado pela β -glucosidase, libera a genipina. Então, as aminas primárias reagem espontaneamente com a genipina, formando o pigmento azul. Desta forma, o jenipapo vem sendo estudado como uma alternativa de corante azul natural, possuindo também compostos bioativos. O objetivo deste trabalho foi otimizar a extração do corante azul com o uso de tecnologia assistida por ultrassom. Assim, diferentes condições de processos (temperatura, razão sólido:líquido e amplitude) foram avaliadas. Uma otimização multi-resposta foi realizada usando o potencial antioxidante avaliado pelo ensaio de FRAP, o teor de compostos fenólicos totais, e os parâmetros de cor b^* e C^* . As condições de 70 °C, amplitude de 65% e razão sólido:solvente 1:40 (g/v), além do tempo de 10 minutos foram definidas como as condições ótimas de extração. As condições ótimas de extração foram validadas externamente (a um nível de 90% confiança). Através da cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas quatorze componentes foram identificados. Além das propriedades de cor, o extrato de jenipapo apresentou potencial para inibir as enzimas lipase pancreática e α -amilase, mostrando-se uma alternativa para o tratamento antidiabetes e antiobesidade. Por fim, conclui-se que o fruto do jenipapeiro pode apresentar potencial como corante natural para aplicação em produtos alimentícios e farmacêuticos.

Palavras-chave: Genipina. Extração assistida por ultrassom. Corante. Antioxidantes.

ABSTRACT

Genipap (*Genipa americana* L.) is a fruit of Jenipapeiro that comes from the Amazon. The green fruit of genipap when oxidized produces a blue pigment soluble in water and ethanol. This occurs because green fruits have a colorless glycoside iridoid called geniposide, which when hydrolyzed by β -glucosidase, releases genipin. Then, the primary amines react spontaneously with genipin, forming the blue pigment. Thus, Genipap has been studied as an alternative to natural blue dye, also having bioactive compounds. The aim of this study was to optimize the extraction of the blue pigment using ultrasound-assisted technology. Then, different process conditions (temperature, solid:solvent ratio and amplitude) were evaluated. A multi-response optimization was performed using the antioxidant potential evaluated by the FRAP assay, the total phenolic content, and the color parameters b^* and C^* . The conditions of 70 °C, amplitude of 65% and solid: solvent ratio 1:40 (g/v), in addition to the time of 10 minutes were defined as the optimal extraction conditions. The optimal extraction conditions were validated externally (at a level of 90% confidence). Through liquid chromatography coupled to mass spectrometry fourteen components were identified. In addition to the color properties, genipap extract has the potential to inhibit pancreatic lipase and α -amylase enzymes, showing an alternative for the treatment of anti-diabetes and anti-obesity. Finally, it concludes that the genipap fruit may have potential as a natural dye for application in food and pharmaceutical products.

Keyword: Genipin. Ultrassound-assisted extraction. Pigment. Antoxiodants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fruto do Jenipapo verde.....	15
Figura 2 – Reação de formação do pigmento azul a partir do geniposídeo.....	17
Figura 3 – Fruto do Jenipapo oxidado.....	17
Figura 4 – Polpa e semente de jenipapo secas.....	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química dos frutos de jenipapo verde, ‘de vez’ e maduro...	16
Tabela 2 – Corantes naturais mais utilizadas e suas principais características.....	19
Tabela 3 – Corantes mais usados e sus possíveis riscos à saúde.....	20
Tabela 4 – Métodos tradicionais e emergentes de extração da genipina.....	22, 23
Tabela 5 – Planejamento fatorial Box-Behnken combinando as variáveis dependentes: temperatura (°C), amplitude (%) e razão soluto:solvente (g/mL).....	26
Tabela 6 – Resultados dos quinze ensaios de extração quanto a concentração de fenólicos totais (CFT), antioxidante (FRAP) por grama de amostra em base seca e parâmetros de cor.....	31
Tabela 7 – Valores preditos e observados para as variáveis respostas (FRAP, CFT, b* e C*) para validação externa com intervalo de 90% de confiança.....	35
Tabela 8 – Concentração do extrato obtido em condições otimizadas capazes de inibir 50% da atividade (IC50) das enzimas digestivas α -amilase e lipase.....	35

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	OBJETIVOS	14
1.1.1	Objetivo Geral	14
1.1.2	Objetivos específicos	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	Jenipapo (<i>Genipa americana</i> L.).....	15
2.1.1	Pigmento azul	16
2.2	Corantes.....	18
2.2.1	Extração do corante azul	20
2.2.2	Propriedades bioativas.....	23
2.3	CONSIDERAÇÕES	23
3	MATERIAS E MÉTODOS	25
3.1	MATERIAIS	25
3.2	MÉTODOS.....	25
3.3	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO.....	26
3.4	CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS.....	27
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	31
5	CONCLUSÃO	38
6	REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

Cada vez mais produtos naturais com propriedades funcionais tem atraído o interesse de indústrias e, então, aditivos sintéticos vêm sendo trocado por aditivos naturais, tudo isso para atingir um mercado de consumidores com hábitos alimentares mais saudáveis, os quais possuem maior interesse por esse tipo de produto (NEVES e MEIRELES, 2018).

Corantes são aditivos presentes em quase todos os produtos alimentícios deixando esses mais atrativos. Além disso, a cor, é um dos principais atributos dos alimentos, pois está relacionada com a aceitabilidade daquele produto pelo consumidor (NEVES e MEIRELES, 2018; BENTES, 2010).

No entanto, a inofensividade dos corantes sintéticos começou a ser questionada, uma vez que os corantes artificiais estão associados a alguns efeitos colaterais, como reações alérgicas, urticárias, asma e rinite, alguns apresentam também um potencial carcinogênico (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2007). Além disso, muitos corantes artificiais apresentam alto conteúdo de metais pesados, ultrapassando, muitas vezes, o limite exigido na legislação (LINDINO, et al., 2008).

Segundo Renhe et al. (2009), o uso de corante sintéticos na cor azul faz-se necessário pois, um dos grandes problemas da indústria alimentícia é encontrar uma fonte natural de corante com coloração azul. Logo, para satisfazer essa demanda de mercado, têm se estudado novas matérias-primas fontes de corantes naturais (BENTES, 2010).

Neste contexto, uma das fontes que vem sendo estudada é o Jenipapo (*Genipa americana L.*) pertencente à família Rubiceae. É uma espécie importante economicamente, tanto pela sua essência florestal, propriedades medicinais, quanto pela produção de alimentos (SOUZA, 2007). O Jenipapo, no estado verde de maturação, possui um composto chamado geniposídeo que, ao ser hidrolisado, libera a genipina a qual reagem com aminas primárias produzindo o pigmento de cor azul (BENTES, 2010). Esse fruto pode ser encontrado disperso por toda a América tropical, especialmente na região norte do Brasil, em lugares de antiga habitação indígenas (FIGUEIREDO et al., 1996). Antigamente, esses povos, utilizavam o fruto para fazer marcações na pele, pintura em peças de roupa, tecido de palha e utensílio domésticos (SILVA, LIMA e VIEITES, 1998).

Conforme Bentes (2010), o tempo e o curso dos testes de segurança além do lento processo de aprovação legal, são empecilhos para a rápida ascensão de novos pigmentos.

Além disso, para que os pigmentos naturais concorram de maneira justa com os sintéticos, ainda é necessário maiores investimentos em pesquisa com novas fontes e métodos de extração mais eficientes. No órgão regulatório dos Estados Unidos, o FDA (Food and Drug Administration), por exemplo, a quantidade de corantes naturais disponíveis comercialmente para alimentos e bebidas são limitados. O fato da maioria dos corantes naturais possuírem uma baixa estabilidade em diferentes valores de pH e desbotamento rápido da cor, levando a um brilho menos atraente contribuem para a dificuldade na aceitação pela legislação. Além disso, algumas fontes de corantes naturais podem afetar características organolépticas dos produtos. Sendo assim, não há muitas opções de corantes naturais disponíveis para aplicação e, para inserir novos produtos na legislação, é exigido longas avaliações toxicológicas, retardando o processo de aprovação regulatória (MEIJA et. al., 2020).

A extração assistida por ultrassom (UAE) é considerada uma tecnologia limpa e, segundo Veggi (2013), esse método vem sendo aplicado na extração de produtos naturais a partir da matriz vegetal, uma vez que ocorre o fenômeno de cavitação, conhecido por acelerar a liberação de compostos bioativos e intensificar a transferência de massa.

O presente trabalho teve como objetivo otimizar a extração do corante azul a partir do Jenipapo (*Genipa americana* L.) com o uso de tecnologia assistida por ultrassom.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Obter o corante azul a partir do Jenipapo (*Genipa americana* L.) usando extração assistida por ultrassom.

1.1.2 Objetivos específicos

Para que o objetivo geral seja alcançado, os seguintes objetivos específicos foram definidos:

- Extrair o corante azul pelo método de extração assistida por ultrassom;
- Otimizar as condições de extração por ultrassom, usando água como solvente;
- Identificar os principais compostos presentes no extrato otimizado;
- Caracterizar o extrato quanto as atividades bioativas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Jenipapo (*Genipa americana* L.)

O Jenipapo, um fruto do Jenipapeiro com origem na Amazônia, geralmente é encontrado em regiões com clima tropical úmido e subtropicais da América Latina (ANDRADE, 2016).

Figura 1 – Fruto do Jenipapo verde



Fonte: A autora.

Segundo Pacheco et al. (2014), esse fruto apresenta casca fina, bagas globosas e popa de coloração parda. O jenipapo pode ser utilizado em diversas preparações alimentícias, desde pães, compotas e sorvetes até em bebidas como licores e vinhos. A polpa do fruto apresenta baixa acidez, alto conteúdo de umidade, baixo percentual de proteína e lipídio, alto conteúdo de açúcares, teor de ferro regular, boa taxa de cálcio e fósforo, elevado conteúdo de taninos, traços de vitamina C e pectina (FIGUEIREDO et al., 1986a). A Tabela 1, apresenta a composição química do jenipapo em diversos estágios de maturação, verde, “de vez” – que é o ponto ideal para colheita e maduro.

Tabela 1 – Composição química dos frutos de jenipapo verde, ‘de vez’ e maduro.

Determinações	Estádio de maturação		
	Verde	‘de vez’	Maduro
pH	4,20	4,00	4,00
Acidez titulável total (% ácido cítrico)	0,93	0,98	0,94
Sólidos solúveis (°Brix)	14,00	20,00	20,00
Vitamina C (mg/100 g)	Traços	Traços	Traços
Taninos (mg/ 100 g)	609,55	280,00	254,55
Umidade (%)	74,67	74,14	74,81
Cinza (%)	1,02	0,86	0,85
Proteína (% N x 6,25)	0,74	0,62	0,68
Lipídios (%)	0,27	0,32	0,35
Fibra (%)	1,80	2,03	2,08
Glicídios redutores (%)	8,46	8,00	11,39
Glicídios não redutores (%)	5,27	7,23	4,33
Amido (%)	6,44	5,62	4,62
Pectina (mg/100 g)	Traços	Traços	Traços
Cálcio (mg Ca/100 g)	46,33	33,40	45,82
Ferro (mg Fe/100 g)	0,79	0,73	0,80
Fósforo (mg P₂O₅/100 g)	47,70	41,40	33,50

Fonte: Figueiredo et al. (1986a)

2.1.1 Pigmento azul

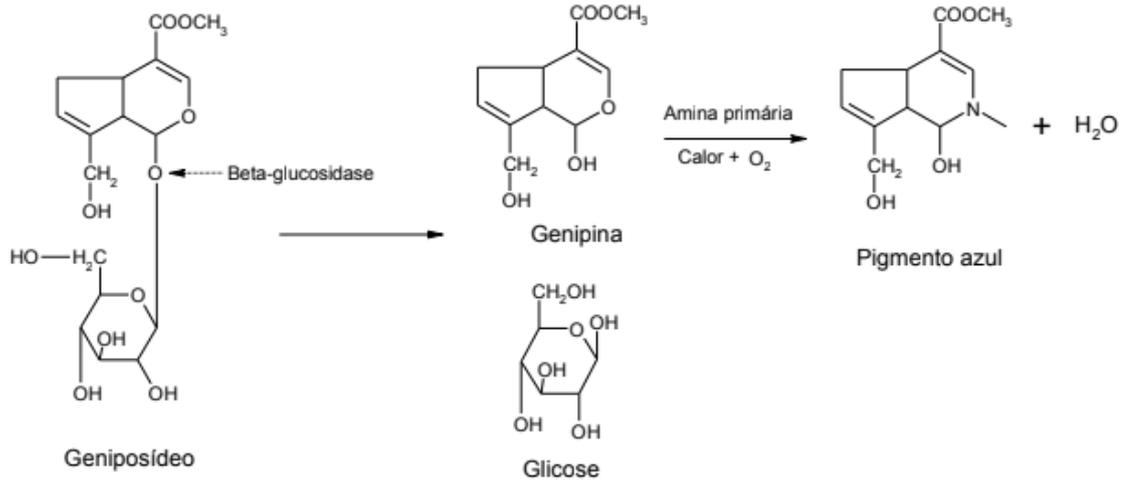
Segundo Penalber et al. (1996), o fruto verde do jenipapo quando oxidado produz um corante azul solúvel em água e etanol. Isso ocorre, pois, os frutos verdes apresentam um iridóide glicosídeo incolor chamado de geniposídeo (C₁₇H₂₄O₁₀). Ao ser hidrolisado pela β-glucosidase, esse composto libera a genipina (C₁₁H₁₄O₅), a qual é incolor (ANDRADE, 2016).

Para a formação do pigmento azul, a genipina precisa reagir com aminas primárias, como aminoácidos e proteínas (BENTES, 2010). Esse pigmento é descrito, por Touyama et al. (1994), como uma mistura de polímeros de alto peso molecular, a qual seria formada a partir da desidrogenação de vários pigmentos intermediários e da polimerização radical induzida pelo oxigênio.

Logo, para a formação do pigmento azul passa-se pela formação de intermediários amarelos, os quais são precursores de outros compostos vermelho-amarronzados. Então, as

aminas primárias irão reagir espontaneamente com a genipina, formando o pigmento azul. Sendo o oxigênio indispensável para essa reação acontecer (TOUYAMA et al., 1994).

Figura 2 – Reação de formação do pigmento azul a partir do geniposídeo



Fonte: Bentes (2010)

Segundo Paik et al. (2001), a estabilidade do pigmento azul não parece seguir uma cinética de primeira ordem. Relata, também, que esse pigmento se difere da maioria pois apresenta estabilidade elevada a variações de pH, temperatura e intensidade luminosa.

Figura 3 – Fruto do Jenipapo oxidado



Fonte: A autora.

2.2 Corantes

O que desperta interesse no consumidor ao comprar um alimento, determinando se o produto é atraente ou não, muitas vezes é a cor, seguido pelo aroma. Porém, essas características presentes nos alimentos são muito sensíveis, principalmente a ao calor, ao oxigênio, luz e acidez (ANDRADE, 2016).

Segundo a resolução nº 44 de 1997 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos, do Ministério da Saúde, corantes são qualquer substância ou mistura de substâncias que possuem a propriedade de conferir ou intensificar a coloração de alimentos.

Os corantes podem ser classificados como: orgânico natural, orgânico sintético, artificial, orgânico sintético idêntico ao natural, inorgânico e caramelo (CNNPA, 1977).

Por lei, no Brasil, é permitido o uso de doze corantes atualmente, tanto de origem sintética como de origem natural. Porém, por apresentarem menores custos de produção e maior estabilidade, os corantes sintéticos são mais utilizados (ANASTÁCIO et al., 2016). Além disso, esses corantes oferecem uma vasta gama de cores, proporcionando diversas tonalidades do espectro visível de cor (CONSTANT, STRINGHETA e SANDI, 2002). Segundo Bentes (2010), os corantes sintéticos podem ser agrupados em cinco classes principais: azo, triarilmetano, quinolina, xanteno e indigóide. Desses, a classe dos triarilmetanos, fornecem cores na faixa do verde ou azul.

No entanto, embora os corantes sintéticos possuam benefícios, estudos comprovam o surgimento de alguns efeitos colaterais quando estes são ingeridos, além disso, outro motivo de preocupação no uso de corantes artificiais é a quantidade de metais pesados presente pois, em alguns casos, ultrapassam o limite permitido na legislação (LINDINO et al., 2008).

Segundo Bechtold e Mussak (2009), os principais corantes naturais mais utilizados estão descritos na tabela abaixo.

Tabela 2 – Corantes naturais mais utilizadas e suas principais características.

Corantes	Atribuições
Urucum	Corantes hidrossolúveis à base de norbixina e lipossolúveis à base de bixina, extraídos das sementes de <i>Bixa orellena</i> L.
Clorofila	Pigmento vegetal mais abundante encontrado na natureza, existe em todas as plantas verdes e em muitas algas.
Carmim de cochonilha	Extraído do extrato seco advindo do estômago de fêmeas do inseto <i>Coccus cactis</i> , de cor vermelho-violeta, com ótima estabilidade ao calor, pH e oxidação.
Páprica	Extraído da páprica doce, corante oleoresina, de cor vermelho-alaranjado, contendo principalmente capsorrubina e a capsantina.
Curcumina	Extraído de rizomas da <i>Curcuma longa</i> L. ou açafrão brasileiro, de cor amarelo-alaranjada.
Antocianinas	Grande grupo de pigmentos hidrossolúveis responsáveis pela maioria das frutas vermelhas: batata roxa, açaí, mangostão entre outros.
Betalaínas	Extraído principalmente da beterraba roxa, de coloração vermelho-vinho intensa, encontrado também na Pitaya vermelha.
Azul de genipina	Extraído do fruto da Gardênia (<i>Gardenia jasminoides</i>) e do fruto verde de jenipapo (<i>Genipa americana</i> L.) de coloração azul marinho.

Fonte: Bechtold e Mussak (2019)

Com o aumento da tendência mundial pelo consumo de alimentos naturais, e também devido as propriedades funcionais, os corantes naturais vêm ganhando mais notoriedade e, embora apresentem algumas desvantagens, têm sido utilizados por anos e sem indícios de danos à saúde (CONSTANT, STRINGHETA e SANDI, 2002).

Renhe et al. (2009), relata que um dos grandes problemas na indústria é encontrar uma fonte natural de corante azul e, por esse motivo, faz-se tanto o uso de corantes artificiais. Segundo Andrade (2016), aproximadamente 20% dos indivíduos são alérgicos ao corante sintético azóico, muitas vezes sintetizado a partir do carvão mineral, e alguns estudos relacionam os corantes azo com quadro de doenças.

Os corantes sintéticos azul brilhante, azul patente V e o verde rápido FCF, fazem parte da categoria dos trenilmetanos. Eles são muito utilizados em bebidas isotônicas, gelatinas, balas, chicletes. Porém, esses corantes azuis são proibidos nos Estados Unidos (BORBA, 2017).

Tabela 3 – Corantes mais usados e sus possíveis riscos à saúde

Corante	Aplicações	Reações adversas
Amarelo Crepúsculo	Cereais, balas, caramelos, coberturas, xaropes, laticínios, gomas de mascar.	A tinta azoiza causa alergia, urticaria, angioedema e gástricos.
Azul Brillhante	Laticínios, balas, cereais, queijos, recheios, gelatinas, licores, refrescos.	Podem causar hiperatividade em crianças e eczema e asma. Contém 57 mg de iodo por grama de produto, pode causar aumento de hormônios tireoidiano no sangue, em níveis para causar hipertireoidismo.
Vermelho Eritrosina	Pós para gelatinas, Laticínios, refrescos, geleias, etc.	Pode causar náuseas, vômitos, hipertensão, alergia e problemas respiratórios.
Indigotina	Gomas de mascar, iogurtes, balas, caramelos, bebidas, etc.	Reações alérgicas em pessoas sensíveis a aspirina e asmáticos. Causa insônia em crianças e afecção da flora gastrointestinal.
Amarelo Tartazina	Laticínios, licores, fermentados, produtos de cereais, frutas, iogurtes, etc.	

Fonte: Netto (2009)

Dessa forma, a obtenção do corante azul de genipina pode ser uma alternativa viável para substituição dos sintéticos.

2.2.1 Extração do corante azul

O processo de secagem previamente a extração faz com que os compostos de interesse fiquem concentrados na matriz seca, agrega mais valor no mercado, ajuda na conservação e estabilização de algumas propriedades. Além disso, o produto seco possui atividade de água reduzida, resultando numa menor proliferação microbológica (ANDRADE et al., 2017).

Conforme Penalber et al. (1996), o envoltório polposo e as sementes dos frutos verdes do Jenipapo, segundo testes preliminares, manifestam uma fração maior de intensidade de cor, logo era a melhor escolha para realização do processo de extração.

Segundo ensaios preliminares conduzidos por Nazaré et al. (1996) o extrato do endocarpo do fruto verde, utilizando hidróxido de sódio como solvente a 0,1%, resulta em

uma coloração azul-anil, diferente da extração realizada com frutos maduros, que apresentam uma coloração amarelo cristalino.

Penalber et al. (1996) em seu estudo, no processo de extração do fruto verde utilizou como solventes água e etanol, separadamente, resultando em diferentes colorações. Sendo que essa mudança na coloração acelerava com temperaturas maiores a 80 °C, os extratos apresentaram desde a coloração azul intensa passando a negro gradativamente. Renhe et al. (2009) também utilizou em seus ensaios de extração água e solução aquosa de etanol como solvente no processo com pH previamente ajustado e na proporção de 1:2, uma parte de fruto e duas de solvente. Com essas análises obtiveram as melhores condições de extração que foi com pH 4, temperatura ótima para as soluções de etanol de 75 °C e para a água a melhor extração foi obtida a 55 °C.

Andrade et al. (2017) em seus experimentos, constatou que temperaturas muito altas promovem um efeito indesejável na concentração do corante azul obtido da genipina devido a sua instabilidade térmica que, por ser um corante natural, já era esperada. Porém, Cho et al. (2006), relata que o pigmento azul possui elevada estabilidade a variações de pH, temperatura e intensidade luminosa quando comparado a outros corantes naturais. Paik et al. (2001), relata que o pigmento azul não parece seguir uma cinética de primeira ordem.

O pigmento azul da genipina, que é uma mistura de polímeros de alto peso molecular, é solúvel em água e em soluções hidroalcólicas, como etanol e metanol, aumento a solubilidade com o aumento na concentração de água na solução, porém, é insolúvel em solventes orgânicos (apolares) (TOUYAMA, et al., 1994).

Bentes (2010), realizou o processo de extração do corante azul do jenipapo em um extrator sólido-encamisado, acoplado ao um banho termostático de circulação e a um sistema de resfriamento, utilizando também uma bomba de ar para oxigenar a solução, uma vez que a formação do pigmento azul é induzida por oxigênio.

Tabela 4 – Métodos tradicionais e emergentes de extração da genipina

Métodos tradicionais	Características	Referências
Soxhlet	<p>Requer uma pequena quantidade de matéria-prima; Baixo custo; Maior quantidade de solvente; Alta entrada de energia; Muito tempo para extração completa; Uso de solventes tóxicos; Presença de solvente residual no extrato.</p>	Azmir et al. (2013); Luque de Castro e Priego-Capote(2010)
Maceração	<p>Baixo custo; Fácil manuseio; Maior quantidade de solventes; Muito tempo para extração; Uso de solventes tóxicos. Alta entrada de energia; Baixo custo; Fácil manuseio; Muito tempo para extração;</p>	Duval et al. (2016)
Hidrodestilação	<p>Uso limitado para compostos termicamente instáveis; Presença de solvente residual no extrato; Hidrólise parcial de compostos sensíveis à água.</p>	Chemat, Vian, e Cravotto (2012); Zhao e Zhang(2014)
Métodos Emergentes		
Extração Líquido Pressurizado (PLE)	<p>Grandes intervalos de temperatura (313 – 473 K) pressão (3.5 a 35 MPa); Maior difusão e transferência de massa entre o soluto e solvente; Método seletivo; Requer uma pequena quantidade de solvente; Tempo curto para extração; Fácil manuseio; Solvente verde.</p>	Gadkari e Balaraman (2015); Osorio-Tobón e Meireles (2013)
Extração fluido supercrítico (SFE)	<p>Pressões e temperaturas acima dos pontos críticos de um composto ou mistura; Método seletivo; Maior transferência de massa e difusão entre o soluto e solvente; Tempo curto para extração; Solvente verde.</p>	Sharif et al. (2014); Zobot, Moraes e Meireles (2014)

Extração assistida por ultrassom	Ferramenta ponderosa para acelerar processos analíticos; Aumento do rendimento de extração; Combinação de pressão, calor e turbulência para acelerar a transferência de massa; Tempo curto; Alta reprodutibilidade; Baixo consumo de solvente; Simplicidade operacional; Alta pureza do produto final.	Gadkari e Balaraman (2015); Chemat et al. (2017); Vardanega, Santos e Meireles (2014)
---	---	---

Fonte: Neves e Meireles (2018)

2.2.2 Propriedades bioativas

Antioxidantes são compostos capazes de proteger o sistema biológico contra efeitos maléficos de processos que podem provocar oxidação excessiva. Esses, também podem atuar como sinalizadores celulares, ativando enzimas que expulsam as espécies reativas de oxigênios. O consumo desses compostos tem como objetivo proteger contra danos oxidativos e complicações inflamatórias (OMENA, 2012).

Os antioxidantes polifenólicos possuem propriedades relacionadas a diminuição da incidência de certos cânceres, prevenção de doenças cardiovasculares e prevenção de danos ao DNA (OMENA, 2012).

Nos vegetais, os principais antioxidantes são as vitaminas C e E, os carotenoides e os compostos fenólicos. Esses compostos estão amplamente disseminados na natureza e fazem parte da composição da grande maioria das plantas. Possuem propriedades fisiológicas como antialérgico, anti-inflamatórios, antimicrobiano, antioxidante, antitrombóticos, cardioprotetores e efeitos vasodilatadores (VEGGI, 2013).

O extrato obtido do jenipapo possui alguns efeitos farmacológicos, como atividade contra danos oxidativo e inibição de tumores. Além disso, alguns autores chamam atenção para as propriedades biológicas da genipina, capaz de atuar como um antimicrobiano e agente anti-inflamatório, anticâncer, antidiabético, além de possuir propriedades antioxidante (NEVES e MEIRELES, 2018).

2.3 CONSIDERAÇÕES

Em virtude da crescente demanda do mercado consumidor por aditivos naturais, e os empecilhos colocado pelos órgãos nacionais de fiscalização em relação a utilização de

corantes artificiais em alimentos, aumenta a importância deste e de outros estudos que buscam alternativas naturais.

O Brasil apresenta uma grande diversidade de fauna e flora, especialmente na área da região amazônica, a qual pode se tornar um potencial fornecedor de matéria-prima para produção de corantes, assegurando a biodiversidade da floresta.

O jenipapo, fruto encontrado com frequência na região norte do Brasil, é uma importante matéria-prima podendo ser utilizada para elaboração de sucos, doces, geléias, licores e compotas. Além disso, surge como uma potencial fonte de corante azul natural para aplicações diversificadas. Uma vez que, além de seu extrato liberar o pigmento, também possui propriedades bioativas e potenciais propriedades medicinais.

Os compostos bioativos encontrados no extrato visam agregar valor ao produto então, para uso em alimentos, especialmente, deve-se considerar o solvente a ser utilizado. Junto a isso, busca-se estudos para otimização do processo de extração.

Diante disso, o presente trabalho busca avaliar e otimizar o método de extração assistida por ultrassom, propondo melhores condições de processo.

3 MATERIAS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Foram usados neste experimento frutos verde de Jenipapo. Os reagentes Folin-Ciocalteu, carbonato de sódio (20%); TPTZ (2, 4, 6-Tri (2-piridil)-s-triazina); DPPH (2, 2-difenil-2-picrilhidrazil) e Trolox padrão (6-hidroxi-2, 5, 7, 8-ácido tetrametilcromano-2-carboxílico). DNS (3,5-dinitrosalicílico); solução de amido 0,5%; solução enzimática da α -amilase preparada em tampão fosfato; solução de lipase pancreática PPL em tampão Tris-HCl e *p*-nitrophenol-butyrate.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Preparação da matéria-prima

O fruto utilizado foi colhido do jenipapeiro (*Genipa americana* L.), que se encontra dentro das dependências da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Estes passaram por uma lavagem e sanitização (hipoclorito de sódio 200 ppm). Então, toda a casca foi removida junto com o mesocarpo sobrando assim, o envoltório polposo contendo as sementes. O envoltório contendo as sementes foi cortado objetivando aumentar a área de contato das partes visto que, em seguida, estas porções foram colocadas em uma estufa com temperatura de 60 °C por 24h. Na sequência, o fruto seco foi processado em um moinho de facas (Marconi, Modelo MA340, SP, Brasil) e o diâmetro das partículas foi padronizado entre 0,091 e 0,059 cm por peneiramento. Então, o fruto seco processado foi utilizado para o experimento de extração e aplicação.

Figura 4 – Polpa e semente de jenipapo secas



Fonte: A autora.

3.2.2 Extração assistida por ultrassom (EAU)

Primeiramente, 0,5 g da amostra foi acondicionada em uma célula encamisada para controle da temperatura, a qual foi preenchida com o solvente, água destilada. A mistura foi sonicada por meio de uma sonda (Eco-Sonic, SP, BR) durante o período fixo de 10 min. Com a finalidade de otimizar as condições de extração (temperatura, amplitude e razão soluto:solvente), foi utilizado um planejamento fatorial Box-Behnken (Tabela 3). Foram realizadas um total de quinze extrações nas temperaturas de 30, 50 e 70 °C, com amplitude de 165, 330 e 495 W e razões soluto:solvente de 1:20, 1:30 e 1:40 g/mL.

Os extratos obtidos passaram por uma centrífuga (Quimis, Modelo Q222T, SP, Brasil) por 10 minutos a 9030 xg, afim de separar todo o conteúdo sólido ainda presente na amostra. Em seguida, o extrato líquido foi vertido em balões de 50 mL, onde foi ajustado o volume de todas as amostras.

Tabela 5 – Planejamento fatorial Box-Behnken combinando as variáveis dependentes: temperatura (°C), amplitude (%) e razão soluto:solvente (g/mL)

Amostra	T (°C)	Amplitude (%)	Razão
1	50	30	20
2	30	60	40
3	50	90	40
4	30	90	30
5	70	90	30
6	30	30	30
7	30	60	20
8	50	60	30
9	50	60	30
10	50	60	30
11	70	30	30
12	50	30	40
13	50	90	20
14	70	60	40
15	70	60	20

Fonte: A autora.

3.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO

Com o intuito de avaliar os parâmetros de extração e otimizar o processo de extração do corante azul foi utilizado o modelo (BOX e BEHNKEN, 1960). Foram avaliados, em três

níveis, os efeitos das variáveis independentes do tempo (min), x1, temperatura de extração, x2, amplitude, x3 razão soluto:solvente. Os quinze experimentos foram realizados de maneira aleatória, orientados para analisar o padrão de resposta e estabelecer modelos para extração do corante azul em solução aquosa.

As condições de extração foram otimizadas por superfície de resposta (RSM) ligado com análise de regressão linear múltipla por meio de uma equação polinomial de segunda ordem (BRUNS, SCARMINO e BARROS NETO, 2006).

$$y = \beta_0 - \sum_{i=1}^3 \beta_i x_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} x_{ii} + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} x_{ij} \quad (1)$$

Onde, y é a resposta predita, β_0 , β_i , β_{ii} e β_{ij} são os coeficientes de regressão para interceptar, linear, quadrático e interação entre os termos, respectivamente, e x_i e x_j são as variáveis independentes. A significância estatística das variáveis foi verificada pelo teste ANOVA e o modelo foi reajustado para incluir apenas as variáveis significativas ($p < 0,05$). As condições ideais foram determinadas pela função de desejabilidade (DERRINGER e SUICH, 1980). A validação externa do modelo proposto foi realizada pela repetição da extração nas condições ótimas.

3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS

3.4.1 Análise de cor

Para a análise da cor 300 μ L da amostra extraída foram colocadas em uma microplaca de 96 poços, em seguida, fez-se uma leitura da absorbância, na faixa de 400 a 700 nm, de cada alíquota em uma multileitora (Tecan, Modelo Infinite M200, ZH, Suíça).

Após a leitura, os resultados obtidos foram analisados em um software (colorbyspectra), onde ele compara os resultados em cada comprimento de onda com a escala CIELAB, gerando os valores de h, L*, a*, b* e C* para cada amostra. Esse novo espaço de cores tridimensional chamado de CIELAB é uma transformação não linear de valores de estímulo CIE XYZ e cada cor é definida por suas coordenadas nos eixos L*, a* e b*. Já os parâmetros C* e h são calculados a partir dos primeiros, e junto com L* esses dois parâmetros são coordenadas cilíndricas e nos fornecem atributos quantitativos e qualitativos da cor, o croma (C*) fornece informações sobre a vivacidade de uma cor, enquanto o hue (h) nos informa a tonalidade da cor (MAGARIÑO e SANJOSÉ, 2003; SANT'ANNA et al., 2013).

3.4.2 Compostos fenólicos totais (CFT)

Para a determinação do teor de compostos fenólicos totais utilizou-se o reagente Folin-Ciocalteu, seguindo a metodologia descrita por Singleton e Rossi (1965). Antes de fazer a análise as amostras foram diluídas em água destilada na proporção 1:2. Em uma microplaca transferiu-se 240 µL de água destilada, 15 µL da amostra diluída e 15 µL do reagente Folin-Ciocalteu. Após três minutos, adicionou-se 30 µL de carbonato de sódio (20%). Após duas horas realizou-se a leitura da absorbância (765 nm) por espectrofotometria em multileitora.

A leitura realizada foi comparada com a curva de calibração do ácido gálico (TPC = 384,4 x absorbância, $R^2 = 0,99$) e os resultados foram expressos como miligramas de equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de amostra (mg EAG/g).

3.4.3 Avaliação da atividade antioxidante

Para determinar o potencial antioxidante do extrato contendo o corante azul, foi usado a metodologia proposta por Benzie e Strain (1996). Nesse método a determinação da atividade antioxidante ocorre por meio da capacidade de redução no ferro. Primeiramente, foi preparado o reagente FRAP. Então, foi adicionado 10 µL da amostra previamente diluída (1:2, v/v) na microplaca e em seguida 290 µL do reagente FRAP. Foi deixado em repouso por 30 minutos e, em seguida, foi realizada a leitura da absorbância (593 nm).

Os resultados obtidos foram calculados por meio da curva padrão de TROLOX e expressos em micromol equivalentes ao trolox (µmol ET/L).

3.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIDIABÉTICO E ANTI OBESIDADE *IN VITRO*

O extrato obtido em condições otimizadas foi avaliado quanto ao seu potencial antidiabético e antiobesidade por meio de ensaios avaliando a capacidade de inibir a atividade de enzimas digestivas como a α -amilase e lipase.

3.5.1.1 Inibição da α -amilase

Para este ensaio, foi utilizado a metodologia descrita por Ali et al. (2006), onde, em um tubo de ensaio, foram misturados 40µL de amostra, 150 µL de água, 400µL do substrato (solução de amido 0,5%) e 200 µL da solução enzimática 0,5 mg/mL preparada em tampão

fosfato (pH 6,8). A mistura foi incubada à 25 °C por 15 min. Após o período, a reação foi encerrada por meio da adição de 400µL de reagente DNS (3,5-dinitrosalicílico) seguido de incubação a 90° C por 15 minutos. A % de inibição foi calculada de acordo com a Equação 1.

$$\% \text{ de inibição} = \left[1 - \left(\frac{C-D}{A-B} \right) \right] \cdot 100$$

(2)

A = absorbância do controle (com enzima e sem amostra)

B = absorbância do branco do controle (sem enzima e sem amostra)

C = absorbância da reação (com enzima e amostra)

D = absorbância do branco da reação (sem enzima e com amostra)

A partir da % de inibição calculada para o conjunto de diluições seriadas do extrato (4 a 20 mg/mL), a concentração necessária para inibir 50% da atividade enzimática (IC50) foi estimada tendo seu resultado expresso em mg/mL.

3.5.1.2 Inibição da Lipase Pancreática

Utilizando a metodologia de Zhang et al. (2020), foi possível fazer a análise de inibição da Lipase Pancreática. Em microplacas, foi adicionado 50 µL de amostra e 50 µL da solução de lipase pancreática PPL (1mg/mL) em tampão Tris-HCl pH 8. Após o período de incubação à 37° C por 10 min., foi adicionado 50 µL do substrato *p*-nitrophenol-butyrate (*p*NPB, 2mg/mL) As microplacas foram novamente incubadas à 37 °C por 20 minutos e a liberação do *p*-nitrofenol pode ser calculada por meio da leitura da absorbância a 405, conforme a Equação 1.

3.5.2 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos em média ± desvio padrão. Para o tratamento dos dados utilizou-se a análise de variância (ANOVA) e aplicado o teste de médias de Fisher.

3.6 CROMATOGRAFIA

O extrato obtido no ponto ótimo (seção 3.3) foi filtrado em membranas de PTFE de 0,2 µm (Whatman, Merck, Alemanha) e 5 µL foram injetados no sistema UPLC (Waters Co.,

Milford, MA, EUA). A análise UPLC foi realizada com a coluna Acquity UPLC BEH (150 x 2,1 mm, 1,7 μm ; Waters) em um sistema Waters Acquity UPLC.

A temperatura da coluna foi fixada em 40 °C. O sistema de eluição de gradiente binário consistiu em 0,1% de ácido fórmico em água (A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (B), com gradiente linear de 2 a 95% B (0-15min), com uma taxa de fluxo de 0,4 mL min⁻¹.

O perfil dos compostos foi obtido em um espectrômetro de massa Xevo Q-TOF (Waters) com interface de ionização por electrospray (ESI) operando no modo de ionização negativa na faixa de 110-1980 Da com tempo de varredura de 0,1. O gás de dessolvatação foi o nitrogênio fixado em 350 °C com taxa de fluxo de 500 L.h⁻¹. As tensões capilar e cone foram ajustadas para 2,6kV e 0,5V, respectivamente. A precisão da massa e reprodutibilidade foram mantidas pela infusão de massa de bloqueio (leucina-encefalina, 0,2 ng μL^{-1} ; [M-H]^{-ion} em m/z 555,2771) e atribuições de fórmula molecular foram obtidas pelo software MassLynx 4.1 (Waters Corporation). A identificação dos compostos orgânicos foi realizada considerando os respectivos valores m/z, perfil de fragmentação e relatos da literatura.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1.1 Otimização da extração

Os valores médios das variáveis respostas avaliadas (FRAP, CFT, b* e C*) quinze experimentos foram realizados em diferentes condições de temperatura, amplitude e razão soluto:solvente foram apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Resultados dos quinze ensaios de extração quanto a concentração de fenólicos totais (CFT), antioxidante (FRAP) por grama de amostra em base seca e parâmetros de cor.

Ensaio	CFT (mg AGE/g)	FRAP (μ mol TE/g)	Cielab b*	Cielab C*	Cor
1	18,77 ^{fg} \pm 1,18	17,88 ^{bdc} \pm 1,63	-7,20 ^d \pm 0,06	11,37 ^a \pm 0,07	
2	15,71 ^{cde} \pm 3,90	23,10 ^d \pm 2,07	-5,71 ^f \pm 0,06	6,57 ⁱ \pm 0,09	
3	22,10 ^{gh} \pm 0,07	14,90 ^{abc} \pm 2,61	-5,49 ^g \pm 0,11	9,49 ^d \pm 0,23	
4	17,94 ^{cd} \pm 4,09	25,49 ^{cd} \pm 2,05	-7,34 ^c \pm 0,07	9,73 ^c \pm 0,15	
5	16,13 ^{ef} \pm 2,49	21,17 ^d \pm 0,70	-5,65 ^f \pm 0,10	10,33 ^b \pm 0,11	
6	18,22 ^b \pm 1,95	31,10 ^{cd} \pm 1,07	-7,49 ^b \pm 0,05	9,24 ^e \pm 0,03	
7	18,64 ^{ef} \pm 3,22	21,44 ^{acd} \pm 0,92	-5,70 ^f \pm 0,08	9,68 ^c \pm 0,15	
8	20,60 ^a \pm 3,03	34,94 ^{abcd} \pm 3,98	-8,08 ^a \pm 0,06	9,71 ^c \pm 0,11	
9	23,94 ^h \pm 5,93	13,19 ^a \pm 2,15	-6,03 ^e \pm 0,12	7,06 ^h \pm 0,08	
10	21,97 ^{gh} \pm 3,05	15,21 ^{abc} \pm 1,68	-4,34 ⁱ \pm 0,04	6,51 ⁱ \pm 0,12	
11	20,37 ^{de} \pm 2,06	21,98 ^{abcd} \pm 1,34	-5,37 ^h \pm 0,07	7,65 ^g \pm 0,09	
12	19,83 ^{ef} \pm 2,99	20,17 ^{abcd} \pm 0,51	-6,10 ^e \pm 0,62	8,56 ^f \pm 0,08	
13	22,26 ^{cde} \pm 0,67	23,12 ^{abc} \pm 2,39	-3,79 ^j \pm 0,02	5,05 ^h \pm 0,15	
14	21,46 ^{ef} \pm 2,24	20,94 ^{abc} \pm 1,92	-3,77 ^j \pm 0,04	5,35 ^j \pm 0,14	
15	23,38 ^c \pm 1,50	26,46 ^{ab} \pm 4,46	-3,71 ^j \pm 0,05	5,33 ^j \pm 0,11	

Nota - mg AGE: miligramas de ácido gálico equivalente, mg TE: miligramas de Trolox equivalente, ^{abc}: letras diferentes indicam diferença significativa entre amostras na mesma coluna, p < 0,05.

Fonte: A autora.

Avaliando os resultados obtidos na tabela 6, percebe-se que houve diferença entre os experimentos, ou seja, as variáveis avaliadas influenciaram no processo.

Compostos fenólicos totais (CFT)

Segundo Bentes (2014), os compostos fenólicos são relativamente termoestáveis e não possuem uma redução significativa de recuperação quando extraído a temperaturas altas, como a 100 °C.

A concentração de CFT dos extratos variou significativamente (p<0,05) entre 15,71 e 23,94 mg EAG/g. Chaves et al. (2019), em suas análises químicas da polpa e semente de jenipapo, obteve resultados de compostos fenólicos de 91,05 \pm 1,91 mg EAG/100g para polpa

verde e de $166,80 \pm 2,00$ EAG/100g para semente verde. Assim como Chaves, Pacheco et al. (2014), encontrou valor de 176,30 mg EAG/100g. A diferença de valores obtidas pode ser resultado do tipo de solvente utilizado durante a extração, uma vez que o solvente utilizado e o método de extração podem resultar em diferentes valores (CHAVES et al., 2019).

A análise de regressão múltipla para a variável resposta CFT (Equação 1) apresentou um modelo significativo ($p < 0,001$) que explicou 91% da variação dos dados ($R^2_{aj} = 0,87$). A variável temperatura (x_1) apresentou o maior efeito sobre a concentração de CFT nos extratos, apresentando efeito quadrático positivo. Ou seja, o aumento da temperatura favorece a recuperação dos compostos fenólicos da matriz até um certo ponto e, a partir daí, o rendimento diminui. O aumento da temperatura aumenta as propriedades de dessorção e solubilidade do solvente e, ao mesmo tempo, decresce a viscosidade, favorecendo a extração dos compostos. No entanto, o aumento da temperatura deve ser controlado uma vez que pode causar a degradação dos compostos termolábeis. Além disso, o aumento da temperatura eleva a pressão de vapor do solvente e com isso, há a hipótese de que o gradiente de pressão de dentro e fora das bolhas de cavitação geradas pela sonda ultrassônica é reduzido. Ou seja, embora o número de bolhas seja maior, elas implodem com menos intensidade, causando menos danos à matriz (MORELES et al., 2020). Além da temperatura, a amplitude (x_2) e efeitos de interação ($x_1^2 \cdot x_2$, $x_1^2 \cdot x_3$ e $x_2 x_3$) apresentaram efeitos sobre o teor de TPC nos extratos.

$$CFT = 22,7486 + 3,48 x_1^2 - 0,18 x_2 + 4,5846 x_1^2 \cdot x_2 + 2,00 x_1^2 \cdot x_3 + 1,3670 x_2 \cdot x_3$$

(3)

Potencial antioxidante (FRAP)

Chaves et. al. (2019) encontrou, em seus experimentos, valores de atividade antioxidante de $20,80 \pm 1,79$ % para a polpa verde e, para semente verde $53,76 \pm 1,56$ %. Assim como ele, Ribeiro et. al. (2016), encontrou valores de 58 a 65%, sendo que nesse, não houve separação da polpa e da semente. Sendo que esses utilizaram o método da redução do radical livre 1,1 difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), para o cálculo do potencial antioxidante.

Neves et al., (2017) realizou a extração do corante azul por líquido pressurizado empregando etanol como solvente, utilizando o endocarpo e as sementes, obteve valores para FRAP em duas temperaturas diferentes de extração (50 e 80 °C), os resultados encontrados estão na faixa de $2,5 \pm 0,2$ a $4,6 \pm 0,3$ ($\mu\text{mol TE/gRM}$) para a menor temperatura e $4,9 \pm 0,4$

a $5,2 \pm 0,3$ ($\mu\text{mol TE/gRM}$), para a maior temperatura. E, utilizando apenas o endocarpo, Neves et. al., (2017), obteve valores mais próximos ao encontrado neste trabalho. Para as temperaturas de 50 e 80 °C, encontraram valores entre $11,4 \pm 0,4$ a $14,6 \pm 1$ e $11,6 \pm 0,5$ a $26,5 \pm 1$, respectivamente.

A análise de regressão múltipla para a variável resposta FRAP (Equação 3) apresentou um modelo significativo ($p < 0,01$) que explicou 92% da variação dos dados ($R^2_{aj} = 0,89$). A variável temperatura (x_1) apresentou o maior efeito sobre a concentração de FRAP nos extratos, apresentando efeito quadrático positivo. Assim como nos compostos fenólicos totais, o aumento da temperatura favorece a recuperação dos compostos antioxidantes da matriz até um certo ponto. Portanto, dependendo da forma como o composto está presente na matriz e como atua, o aquecimento, pode resultar em um aumento da atividade antioxidante (FARIA, 2019).

Para análise do potencial antioxidante, a interação entre os parâmetros não teve efeito sob os resultados (Equação 4).

$$FRAP = 23,46 + 4,90 x_1 + 3,36 x_1^2 - 6,16x_2 + 2,23 x_3$$

(4)

Avaliação da cor obtida

Os parâmetros de cor mais significativos neste trabalho foram o b^* e o C^* . Chaves et al. (2019) obtiveram resultados de b^* de $11,34 \pm 1,12$ para a polpa verde e, para a semente verde de $0,18 \pm 0,18$. Para o parâmetro C^* , eles encontraram $11,35 \pm 1,12$ para polpa verde e, para a semente verde $0,26 \pm 0,18$. Neves (2017) atingiu os seguintes valores, para b^* à 80 °C foi de $-0,3 \pm 0,07$, para C^* $0,58 \pm 0,08$.

A diferença de resultados pode ser devido ao processo de extração utilizando, assim como o solvente e, também, por conta de que, neste trabalho, utilizou-se a polpa e a semente juntas.

O parâmetro C^* define a intensidade da cor, valores próximos de zero indicam cores neutras (branco e/ou cinza) (MCGUIRE, 1992). Logo, neste trabalho, percebe-se que a cor se aproxima mais do zero, sendo assim, a coloração obtida está mais próxima de um tom acinzentado. O valor negativo presente no parâmetro b^* nos indica que está próximo da cor azul.

$$Cielab\ b^* = -3,761,05\ x_1 - 1,97\ x_1^2 - 0,71\ x_2^2 + 0,99\ x_3^2 - 0,83\ x_1 \cdot x_2 - 0,96\ x_1 \cdot x_2^2$$

(5)

$$Cielab\ C^* = 5,24 - 0,70\ x_1 + 3,16\ x_1^2 + 0,87\ x_2^2 + 1,32\ x_3^2 + 1,25\ x_1x_2$$

(6)

É possível notar que, a temperatura teve um efeito positivo na extração, sendo assim, quanto maior era a temperatura, maior foi a extração, impactando nos valores de CFT, FRAP e b^* . Esse efeito pode ser explicado pois, o aumento da temperatura do solvente eleva a capacidade de solubilização devido à diminuição da viscosidade e da tensão superficial. O mesmo é observado para a potência, que está diretamente relacionada a temperatura, ou seja, o aumento da amplitude, resulta também no aumento da temperatura. No entanto, quando chega num ponto limite, o rendimento decai (CHAN et al., 2011; ROUTRAY e ORSAT, 2012). Lee et al. (2003), observou que o aumento da temperatura aumenta o rendimento de extração do corante, destacando que a maior temperatura, por ele testada (90 °C), apresentou maior rendimento. Em contrapartida, Cho et al. (2006), concluíram que, a temperatura mais adequada para a extração na faixa testada, entre 25 e 75 °C, era a de 55 °C.

Validação externa

A partir dos modelos propostos foi realizado a otimização multi-resposta com CFT, FRAP, b^* e C^* , e o ponto ótimo foi obtido por meio da função “desejabilidade”. Portanto, o ponto ótimo para CFT, FRAP, b^* e C^* por EAU foi a Temperatura +1 (70° C), Amplitude + 1,666 (65%) e Razão +1 (1:40 m/v).

Por fim, uma validação externa foi realizada (tabela 7), repetindo o experimento com os valores do ponto ótimo. Os valores observados no experimento estão condizentes com os valores preditos, em um nível de 90% de confiança. Portanto, os modelos matemáticos propostos foram capazes de descrever corretamente o processo de extração.

Tabela 7 – Valores preditos e observados para as variáveis respostas (FRAP, CFT, b* e C*) para validação externa com intervalo de 90% de confiança.

Variáveis resposta	Valores			Observado
	Predito	- 90% de confiança	+ 90% de confiança	
FRAP (umolTE/g)	36,95	30,49	43,11	40,67 ± 3,36
CFT (mgGAE/g)	20,17	15,55	24,80	25,32 ± 1,04
Cielab b*	-8,23	-8,96	-7,49	-7,56 ± 0,13
Cilab C*	7,54	9,64	11,71	8,77 ± 0,14

Fonte: A autora.

4.1.2 Potencial antidiabético e antiobesidade

4.1.3 Inibição da α -amilase

Uma abordagem terapêutica para o tratamento de diabetes é diminuir a hiperglicemia pós-prandial. Isso é feito retardando a absorção de glicose por meio da inibição de enzimas hidrolizantes de carboidratos no trato digestivo (ALI, HOUGHTON e SOUMYNATH, 2006).

O resultado presente na tabela 8 nos mostra 50% da inibição na concentração de 9,10 mg/mL. Justino et. al., (2020) fez análises de inibição da α -amilase no extrato da polpa da fruta de *Eugenia dysenterica* e nenhum extrato foi capaz de inibir > 40% da atividade a 10 mg/mL. A acarbose, que é utilizado como padrão por ser um composto utilizado no medicamento, inibiu a enzima a 10 mg/mL.

Ou seja, o valor encontrado nos experimentos realizados neste trabalho de inibição da α -amilase, está similar ao valor padrão inibido pela acarbose, mostrando-se uma potencial alternativa natural para o tratamento dessa doença.

Tabela 8 – Concentração do extrato obtido em condições otimizadas capazes de inibir 50% da atividade (IC50) das enzimas digestivas α -amilase e lipase.

	IC 50	
	Média	DP
α -amilase (mg/ml)	9,106	0,165
Lipase (μ g/ml)	128,900	6,6133

Fonte: A autora.

4.1.4 Inibição da Lipase pancreática

Uma abordagem para tratamentos de redução de peso é inibir a digestão e a absorção de triglicerídeos, inibindo a lipase pancreática. A existência de flavonóides nas plantas que realizam inibição podem ser responsáveis por essa inibição (SOUZA et. al., 2012).

Chamnasilpa et al., (2020), avaliou a inibição da lipase pancreática em extratos de antocianina, o qual é um pigmento natural também extraído de plantas. Os valores encontrados por eles em sua pesquisa, variam entre $90,6 \pm 0,4$ e $181,7 \pm 0,8$ ($\mu\text{g/mL}$). Embora não seja a mesma fonte, os valores neste trabalho para inibição da lipase pancreática (tabela 8) é similar aos encontrados por Chamnasilpa et. al., (2020), sendo, também, uma potencial alternativa para o tratamento da obesidade.

4.1.5 Compostos obtidos pela cromatografia

Quatorze compostos foram separados do extrato por UPLC-QTOF-MS/MS, que são identificados por sua massa exata e pelo padrão de fragmentação. Entre eles, o ácido galacturônico no pico 1 - um açúcar ácido proveniente da oxidação de galactose, que é o principal componente da pectina (GERSCHENSON, 2017)

O pico 2 apresentou taxa de massa para carga (m/z) valor de 389,1074 para a molécula desprotonada ($[M - H]^-$) ($\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{O}_{11}^-$). No espectro MS/MS, esse pico produziu fragmentos de íons em m/z 227,0583 ($\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_6^-$), correspondente a uma perda de molécula de glicose, e em m/z 209,0539 ($\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_5^-$), por perdas de uma glicose + moléculas de água. Além disso, os fragmentos de íons em m/z 183,0660 ($\text{C}_9\text{H}_{11}\text{O}_4^-$) e 165,0534 ($\text{C}_9\text{H}_9\text{O}_3^-$) provavelmente correspondem à perda de CO_2 (44 Da) de íons m/z 227,0583 e 209,0539, respectivamente. De acordo com esses íons característicos, o pico 2 corresponde ao ácido deacetylasperulosidic, que é um iridoide identificado em outras plantas pertencentes à família Rubiaceae (FU et al., 2014; ZHOU et al., 2010).

Ambos os picos 3 e 6 apresentaram o $[M - H]^-$ íon em m/z 373.1135 ($\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{O}_{10}^-$), no entanto, diferem nos tamanhos dos fragmentos de íon. No pico 3, o fragmento principal é um íon m/z 193,0535 enquanto o pico 6, em 211,0590. Quando um grupo OH está em C-8 ou o carbono diretamente ligado ao C-8, a perda de oxigênio é difícil durante a fragmentação, resultando em uma perda neutra de 162 Da, que ocorreu no pico 6. Na ausência desse grupo em C-8, geralmente, a perda é de 180 Da. Com base na estrutura molecular desses iridoides e tamanho de íon, os picos 3 e 4 correspondem a compostos já identificados em jenipapo,

Gardosídeo e Ácido geniposídico, respectivamente (BENTES; MERCADANTE, 2014 e FU et. al., 2017).

O pico 5 mostrou $[M - H]^-$ íon em m/z 391.1240 e três íons de fragmento com as mesmas características apresentadas no iridoide identificado em fruto de jenipapo por Bentes e Mercadante (2014). Esses consideraram a perda de hexose (162 Da) em íon m/z 229,0705, CO_2 (44 Da) em 185.0826 e água (18 Da) em 167.0675. O pico 9, com $[M - H]^-$ íon a m/z 449.1301, foi identificado provisoriamente como Gardenoside, de acordo com Fu et. al., (2014). Gardenoside é um iridoide relatado anteriormente relatado em fruto jenipapo (BENTES; MERCADANTE, 2014 e NUMA et. al., 2020). O pico 12, com $[M - H]^-$ íon a m/z 549.1819, forma molecular $C_{23}H_{33}O_{15}^-$ e fragmentos de íons em m/z 225.0751 e 207.0679 correspondem a Genipin Gentiobioside (FU et. al., 2014). Esse iridoide já foi relatado na fruta jenipapo e também é um dos conteúdos importantes da atividade anti-câncer presente na *Gardênia jasminoides*, outra plantada família Rubiaceae (BENTES; MERCADANTE, 2014 e CHEN et. al., 2017). Geniposide, o principal iridoide detectado na fruta do jenipapo verde, foi identificado no pico 14, que apresentou $[M - H]^-$ íon em m/z 387.1293 ($C_{17}H_{23}O_{10}^-$) (BENTES; MERCADANTE, 2014).

Os picos 4 e 8 foram identificados provisoriamente como iridoides já relatados nas folhas de Jenipapo. O pico 4 apresentou $[M - H]^-$ íon a m/z 375.1291 ($C_{16}H_{12}O_{10}^-$) e um íon fragmento em m/z 273.1150 correspondente ao composto conhecido como Asytonasioside D. Considerando que no pico 8 o $[M - H]^-$ íon a m/z 375.1291 ($C_{16}H_{12}O_{10}^-$) e fragmentos íons em m/z 213.0696, 169.0448 e 125,0547 eram compatíveis com ácido logânico (SILVA et. al., 2018).

Em ordem, o pico 11 foi identificado provisoriamente como Ixoroside, um iridoide ainda não relatado no extrato de Jenipapo. Este composto apresentou $[M - H]^-$ íon a m/z 405.1415 e um íon fragmentado em m/z 197,0798 devido a uma perda de molécula de glicose (FU et. al., 2014). Além disso, foi identificado um composto desconhecido com $[M - H]^-$ íon em m/z 433.1337 ($C_{18}H_{25}O_{12}^-$).

5 CONCLUSÃO

Através dos experimentos realizados, pode-se perceber a eficácia na extração do corante azul presente no jenipapo. Foi possível otimizar as condições de extração do método de extração assistida por ultrassom de forma que a obtenção da coloração azul, o potencial antioxidante e os compostos fenólicos fossem maximizados. Além disso, foi possível verificar que, além da obtenção de um corante natural, o extrato obtido possui conteúdo de compostos fenólicos, potencial antioxidante, compostos com atividade anticâncer e potencial atividade anti-diabetes.

Por fim, o corante obtido, utilizando água como solvente, além de não gerar resíduos, pode ser aplicado em diversos segmentos, inclusive na alimentação. Deixando como sugestão para próximos trabalhos, explorar a aplicação desse corante extraído do jenipapo e avaliar a sua estabilidade.

6 REFERÊNCIAS

ALI, H.; HOUGHTON, P. J.; SOUMYANATH, A. α -Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. **J. Ethnopharmacol.** v. 107, p. 449–455. 2006.

ANASTÁCIO, L. B.; OLIVEIRA, D. A.; DELMASCHIO, C. R.; ANTUNES, L. M. G.; CHEQUER, F. M. D. Corantes Alimentícios Amarantho, Eritrosina B e Tartazina, e seus possíveis Efeitos Maléficos à Saúde Humana. **Journal of Applied Pharmaceutical Sciences.** p. 16-30, 2016.

ANDRADE, E.L.; NASCIMENTO, R. A.; COSTA, C. M. L.; FARIA, L. J. G. Otimização experimental do processo de obtenção do corante azul de Jenipapo em leite de jorro. In: XXXVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE SISTEMAS PARTICULADOS. 2017. Maringá. Universidade Federal do Pará, Faculdade de Engenharia Química, 2017.

ANDRADE, Elisangela Lima. **Obtenção de corante azul em pó de Jenipapo: Análise experimental dos processos de oxidação induzida e leite de jorro.** Tese (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Engenharia de Recursos Naturais da Amazônia. Universidade Federal do Pará. 2016.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada – **RDC nº 265**, de 22 de setembro de 2005. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/legis> Acessado em: 25 nov. 2019.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada – **RDC nº 387**, de 05 de agosto de 1999. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/legis> Acessado em: 25 nov. 2019.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada – **RDC nº 45**, de 02 de novembro de 2010. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/legis> Acessado em: 25 nov. 2019.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada – **RDC nº 44**, de 17 de agosto de 2009. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/legis> Acessado em: 25 nov. 2019.

BARIK, S. K.; RUSSELL, W. R.; MOAR, K. M.; CRUICKSHANK, M.; SCOBIE, L.; DUNCAN, G.; HOGGARD, N. The anthocyanins in black currants regulate postprandial hyperglycaemia primarily by inhibiting α -glucosidase while other phenolics modulate salivary α -amylase, glucose uptake and sugar transporters. **J. Nutr. Biochem.** v.78, p. 108325, 2020.

BECHTOLD, T.; MUSSAK, R. **Handbook of Natural Colorants.** Austria: Wiley, 2009.

BENTES, Ádria de Sousa. **Avaliação do potencial de obtenção de pigmento azul a partir de frutos de Jenipapo (*Genipa Americana* L.) verdes.** Tese (Doutorado em Engenharia de Recursos Naturais) – Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Pará. 2010.

BENTES, Ádria de Sousa. **Compostos bioativos de Jenipapo, Laranja e Manga: composição e desenvolvimento de métodos de extração**. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. 2014.

BENTES, A. D. S.; MERCADANTE, A. Z. Influence of stage of ripeness on the composition of iridoids and phenolic compounds in genipap (*Genipa americana* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 62, p. 10800-10808. 2014.

BENTES, A. S.; SOUZA, V. H.; AMAYNA-FARFAN, J.; LOPES, A. S.; FARIA, L. J. G. Influence of the composition of unripe genipap (*Genipa americana* L.) fruit on the formation of blue pigment. **J Food Sci Technol**. p. 3919-3924, 2015.

BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. Some new three level designs for the study of quantitative variables. **Technometrics**. v. 2(4), p. 455-475, 1960.

BRAUCH, J.E.; ZAPATA-PORRAS, S.P.; BUCHWEITZ, M.; ASCHOFF, J.K.; CARLE, R. Jagua blue derived from *Genipa americana* L. fruit: A natural alternative to commonly used blue food colorants?. **Food Research International**. p. 391-398, 2016.

BRUNS, R. E.; SCARMINO, I. S.; BARROS NETO, B. Statistical desing. **Chemometrics**. v. 2, c. 4. 2006.

CHAMNANSILPA, N.; AKSORNCHU, P.; ADISAKWATTANA, S.; THILAVECH, T.; MAKYNEN, K.; DAHLAN, W.; NGAMUKOTE, S. Anthocyanin-rich fraction from Thai berries interferes with the key steps of lipid digestion and cholesterol absorption. **Heliyon**. v. 6. 2020.

CHAN, C. H.; YUSOFF, R.; NGOH, G. C.; KUNG, F. W. L. Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. **Journal of Chromatography A**. 2011, p. 6212-6225.

CHAVES, R. M.; KWIATKOWSKI, A.; PEREIRA, Q. D.; POPOLIN, A.; NOVAES, T. A. C. Avaliações físico-químicas e capacidade antioxidantes em frutos de jenipapo em estágio de desenvolvimento verde e maduro. **Agrarian Academic Journal**. 2019, v. 2, n. 2.

CHEN, S. C.; ZHAO, X. Y. E. K.; QIAN, J.; SHI, Y. H.; WANG, R. Anticancer effects of *Gardenia jasminoides* in HepG2 human hepatoma cells. **Biomedical Research**. v. 28, p. 716-726. 2017.

CHO, Y. J.; KIM, S. Y.; KIM, J.; CHOE, E. K.; KIN, S. I.; SHIN, H. J. One-step enzymatic synthesis of blue pigment from geniposide for fabric dyeing. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**. Seoul, v. 11, p. 230-234, 2006.

CNNPA. COMISSÃO NACIONAL E PADRÕES PARA ALIMENTOS. **Resolução nº 44** de 1997. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/RESOLUCAO_CNNPA_44_1977.pdf/b8d43a0d-5c1b-4be1-ba69-67f69cf55446> Acessado em: 25 nov. 2019.

CONSTANT, P. B. L.; STRINGHETA, P. C.; SANDI, D. **Corantes Alimentícios**. Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, v. 20, n. 2, p. 203-220, 2002.

DAMODARAN S, PARKIN KL, FENNEMA OR (2007) Fennema's food chemistry, 4th edn. CRC Press, Boca Raton de Souza VR, Pereira PAP, Queiroz F, Borges SV, Carneiro JDS (2012) **Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits**. Food Chem 134:381–386, 2012.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality Technology**. v. 2, p. 214-219, 1980.

DUTCOSKY, S. D. **Análise sensorial de alimentos**. 4 ed. rev. e ampl., Curitiba, PR, Ed. Champagnat, 2013, 531 p.

FARIA, T. S. **Avaliação do efeito do processo de secagem do extrato de jenipapo (*Genipa americana* L.)**. Tese (Mestrando em Engenharia de Alimentos) – Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Uberlândia. Patos de Minas, MG. 2019.

FONTOURA, L. M.; CORREA, A. F.; VICENTE, J.; MELEIRO, C. H. A.; FORALOSSO, F. B. Formulação de balas enriquecidas com ferro, cálcio, beta-caroteno, licopeno e vitamina C. **Acta Tecnológica**. p. 36-43, 2013.

FIGUEIREDO, R. W.; MAIA, G. A.; HOLANDA, L. F. F.; MONTEIRO, J. C. S. Características Físicas e químicas do Jenipapo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 21, n. 4, p. 421-428, 1986.

FU, Z.; XUE, R.; LI, Z.; CHEN, M.; SUN, Z., HU, Y., HUANG, C. Fragmentation patterns study of iridoid glycosides in Fructus Gardeniae by HPLC-Q/TOF-MS/MS. **Biomedical Chromatography**. v. 28. p. 1795-1807. 2014.

GERSCHEINSON, L. N. The production of galacturonic acid enriched fractions and their functionality. **Food Hydrocolloids**. v. 68, p. 23-30. 2017.

JACKSON, E.B.; LESS, R. **Sugar confectionery and chocolate manufacture**. 3rd ed. London: Chapman & Hall, 1992. 379 p.

JUSTINO, A. B.; MOURA, F. R. B.; FRANCO, R. R.; ESPINDOLA, F. S. α -Glucosidase and non-enzymatic glycation inhibitory potential of *Eugenia dysenterica* fruit pulp extracts. **Food Bioscience**. v. 35. 2020.

KIN, D. H.; LEE, H. J.; OH, Y. J.; KIM, M. J.; KIM, S. H.; JEONG, T. S.; BAEK, N. I. Iridoid Glycosides Isolated from *Oldenlandia diffusa* Inhibit LDL-Oxidation. **Arch Pharm Res**. v. 2, n. 10, p. 1156-1160, 2005.

LEE, S. W.; LIM, J. M.; BHOO, S. H.; PAIK, Y. S.; HAHN, T. R. Colorimetric determination of amino acids using genipin from *Gardenia jasminoides*. **Analytica Chimica Acta**. Amsterdam, v. 480, p. 267-274, 2003.

LINDINO, C. A.; GONÇALVES Jr, A. C.; SCHREINER, G. G. O.; SCHREINER, J. S.; FARINA, L. O. Determinação de metais em corantes alimentícios artificiais. **Acta Scientiarum - Technology**, v. 30, n. 1, p. 93–98, 2008.

MA, D. L.; CHEN, M.; SU, C. C.; WEST, B. J. In vivo Antioxidant Activity of Deacetylasperulosidic Acid in Noni. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**. v. 2013, 2013.

MAGARIÑO, S. P.; SANJOSÉ, M. L. G. Application of absorbance values used in wineries for estimating CIELAB parameters in red wines. **Food Chemistry**. v. 81, p. 301-306, 2003.

MEIJA, E. G.; ZHANG, Q.; PENTA, K.; EROGLU, A.; LILA, M. A. The colors of health: chemistry, bioactivity, and market demand for colorful foods and natural food sources of colorants. **Annual Review of Food Science and Technology**. v. 11, p. 45-82, 2020.

MCGUIRE, R. G. Reporting of objective color measurements. **Hortscience**. 1992, v. 27, p. 1254-1255.

MOURA, F. A. **Propriedades físico-químicas e efeito prebiótico de pectina hidrolisada obtida de resíduos agroindustriais**. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Maria, RS. 2015.

MOURA, S. C. S. R.; BERLING, C. L.; GARCIA, A. O.; QUEIROZ, M. B.; ALVIM, I. D.; HUBINGER, M. D. Release of anthocyanins from the hibiscus extract encapsulated by ionic gelation and application of microparticles in jelly candy. **Food Research International**. P. 542-552, 2019.

MIRANDA, J.S.; COSTA, B. V.; OLIVEIRA, I. V.; LIMA, D. C. N.; MARTINS, E. M. F.; JÚNIOR, B. R. C. L.; BENEVENUTO, W. C. A. N.; QUEIROZ, I. C.; SILVA, R. R.; MARTINS, M.L. Probiotic jelly candies enriched with native Atlantic Forest fruits and *Bacillus coagulans* GBI-30 6086. **LWT – Food Science and Technology**. 2020.

NERI, I. A. N.; PESSOA, M. G.; ARRUDA, H. S.; PEREIRA, G. A.; PAULINO, B. N.; ANGELONI, C. F. F.; PASTORES, G. M. Genipap (*Genipa americana* L.) fruit extract as a source of antioxidant and antiproliferative iridoids. **Food Research International**. v. 134, p. 109252.

NEVES, G. N.; MEIRELES, M. A. A. Genipap: A new perspective on natural colorants for the food industry. **Food and Public Health**. p. 21-33, 2018.

NEVES, G. N.; TARONE, A. G.; TOSI, M. M.; JÚNIOR, M. R. M.; MEIRELES, M. A. A. Extraction of bioactive compounds from genipap (*Genipa americana* L.) by pressurized ethanol: Iridoids, phenolic content and antioxidant activity. **Food Research International**. v. 102, p. 595-604, 2017.

OMENA, C. M. B. **Atividade antioxidante e anticolinesterase dos extratos etanólicos dos frutos: Siriguela *Spondia purpúrea* Linnaeus; Uambu *Spondia tuberosa* Arruda; Jenipapo *Genipa americana* Linnaeus e Mangaba *Hancornia speciosa* Gomes**. Tese (Doutorado em Ciências) – Curso de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Universidade Federal de Alagoas. Maceió, AL. 2012.

OTÁLORA, M. C.; BARBOSA, H. J.; PERILLA, J. E.; OSORIO, C.; NAZARENO, M. A. Encapsulated betalains (*Opuntia ficus-indica*) as natural colorants. Case study: Gummy candies. **LWT – Food Science and Technology**. p. 222-227, 2019.

PACHECO, P.; PAZ, J. G.; SILVA, C. O.; PASCOAL, G. B. Composição centesimal, compostos bioativos e parâmetros físico-químicos do jenipapo (*Genipa americana* L.) *in natura*. **Demetra**. p. 1041-1054, 2014.

PAIK, Y. S.; LEE, C. M.; CHO, M. H.; HAHN, T.R. Physical stability of the blue pigments formed from geniposide of gardenia fruits: effects of pH, temperature and light. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Easton, v. 49, p.430–432, 2001.

PENALBER, T. J. A.; SADALA, M. A. C.; CASTRO, M. S.; FARIA, L. J. G. Ensaios, extração e aplicação de corantes do fruto jenipapeiro (*Genipa americana* L.). **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v.2, p.129-135, 1996.

RENHE; I. R. T.; STRINGHETA, P. C.; SILVA, F. F.; OLIVEIRA, T. V. Obtenção de corante natural azul extraído de frutos de jenipapo. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.44, n.6, p.649-652, jun., 2009.

RIBEIRO, J. S.; ANDRADE, G. A. V.; DONATO, L. B.; LOBO, N. Q. S.; TAPIA, D. M. T.; ZANUTO, M. E.; SILVA, M. V. Caracterização química da farinha de jenipapo (*Genipa americana* L.): curva de secagem e estabilidade dos carotenoides totais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 25, 2016, Gramado – RS. **Anais...**, Gramado – RS: SBCTA, 2016, p. 1-6.

RODRÍGUEZ, A. M. R.; CONXITA, S.; SUSANA, V.; GALLARDO, S. G. F; ESQUIVEL, J. C. C.; JIMÉNEZ, L. L. Immobilization of Pectinesterase in Genipin-Crosslinked Chitosan Membrane for Low Methoxyl Production. **Appl Biochem Biotechnol**. v. 174, p. 2941-2950, 2014.

ROUTRAY, W.; ORSAT, V. Microwave-assisted extraction of flavonoids: a review. **Food and Bioprocess Technology**. 2012, p. 409-424.

SANT'ANNA V.; GURAK, P. D.; MARCZAK, L. D. F.; TESSARO, I. C. Tracking bioactive compounds with colour changes in foods – A review. **Dyes and Pigments**. V. 98, p. 601-608, 2013.

SILVA, A. P.; LIMA, C. L. C.; VIEITES, R. L. Caracterização Química e Física do Jenipapo (*Genipa americana* L.) Armazenado. **Scientia Agricola**. v. 55, n. 1, 1998.

SILVA, L. M. P.; ALVES, J. S. F.; SIQUEIRA, E. M. S.; NETO, A. M. S.; ABREU, L. S.; TAVARES, J. F.; ZUCOLOTTI, S. M. Isolation and identification of the five novel flavonoids from *genipa americana* leaves. **Melcules**. v. 23. P. 1-13. 2018.

SOLER, M.P.; QUEIROZ, M.B.; FADINI, A.L. Industrialização de balas e confeitos de goma. **Instituto de Tecnologia de Alimentos**, p.8-9,18-19, Campinas, 1996.

SOUZA, C. N. **Características físicas, físico-químicas e químicas de três tipos de jenipapos (*Genipa americana* L.)**. Tese (Mestrado em Produção Vegetal). Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA. 2007.

SOUZA, S. P.; PEREIRA, L. L. S.; SOUZA, A. A.; SANTOS, C.D. Seleção de extratos brutos de plantas com atividade antiobesidade. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 14. 2012.

TOUYAMA, R.; TAKEDA, Y.; INOUE, K.; KAWAMURA, I.; YATSUZUKA, M.; IKUMOTO, T.; SHINGU, T.; YOKOI, T.; INOUE, H. Studies on the blue pigments produced from Genipin and Methylamine. I. structures of the brownish-red pigments, intermediates leading to the blue pigments. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.42, p.668-673, 1994.

TOVAR, M. E. M.; RAMÍREZ, E. G. R.; MONTOYA, J. A. S. Modeling and optimization of the parameters affecting extraction of the chan seed mucilage (*Hyptis suaveolens* (L.) Poit) by mechanical agitation (MA) and ultrasound-assisted extraction (UAE) in a multiple variables system. **Food and Bioproducts Processing**. v. 120, p. 166-178, 2020.

VEGGI, P. C. **Obtenção de compostos fenólicos de plantas brasileiras via tecnologia supercrítica utilizando cossolventes e extração assistida por ultrassom**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 2013.

ZHANG, H.; XIAO, Q.; WU, X.; WEI, X.; QIN, X. Pancreatic lipase and cholesterol esterase inhibitory effect of *Camellia nitidissima* Chi flower extracts in vitro and in vivo. **Food Biosci.** v. 37, p. 100682. 2020

ZHOU, T.; LIU, H.; WEN, J.; FRAN, G.; CHAI, Y.; WU, Y. Fragmentation study of iridoid glycosides including epimers by liquid chromatography-diode array detection/ electrospray ionization mass spectrometry and its application in metabolic fingerprint analysis of *Gardenia jasminoides* Ellis. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**. v. 24, p. 2520-2528. 2010.