



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

Jaine Oliveira

**SORO ÁCIDO: DE RESÍDUO INDUSTRIAL AO USO COMO SOLVENTE  
ALTERNATIVO PARA A EXTRAÇÃO DE ANTOCIANINAS**

Florianópolis - SC

2022

Jaine Oliveira

**SORO ÁCIDO: DE RESÍDUO INDUSTRIAL AO USO COMO SOLVENTE  
ALTERNATIVO PARA A EXTRAÇÃO DE ANTOCIANINAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação  
em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de  
Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em  
Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Acácio Antonio Ferreira Zielinski

Coorientadora: Profa. Dra. Rúbia Carvalho Gomes  
Corrêa

Florianópolis - SC

2022

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

Oliveira, Jaine

Soro ácido: de residuo industrial ao uso como solvente alternativo para a extração de antocianinas / Jaine Oliveira ; orientador, Acácio Antonio Ferreira Zielinski , coorientadora, Rúbia Carvalho Gomes Corrêa, 2022.  
131 p.

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

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. Extração verde. 3. Solvente de base biológica. 4. Indústria Leiteira. 5. Repolho roxo . I. Ferreira Zielinski , Acácio Antonio. II. Carvalho Gomes Corrêa, Rúbia . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Jaine Oliveira

**SORO ÁCIDO: DE RESÍDUO INDUSTRIAL AO USO COMO SOLVENTE  
ALTERNATIVO PARA A EXTRAÇÃO DE ANTOCIANINAS**

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

Prof. Dr. Acácio Antonio Ferreira Zielinski – presidente – UFSC

Profa. Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira – membro interno – UFSC

Profa. Dra. Rosane Marina Peralta – membro externo – UEM

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

---

Profa. Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação

---

Prof. Dr. Acácio Antônio Ferreira Zielinski,  
Orientador

Florianópolis, 2022.

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a Deus por toda a força que colocou em meu coração, tendo até aqui me sustentado. Aos meus pais, Márcia e Francisco, que nunca cessaram esforços para me dar o melhor que podiam, sempre me apoiando e regozijando-se de minhas conquistas, e as minhas maravilhosas irmãs Josiane e Aline, que sempre me motivaram. Obrigada pelo amor incondicional.

Que sorte a minha!

Cruzaram em minha vida pessoas realmente excelentes, muitos deles me ensinaram o que sabiam de um modo absolutamente generoso, por isso, meus sinceros agradecimentos.

À esta Universidade e todos os seus colaboradores, e em especial aos que participaram da minha jornada acadêmica. Ao Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica (LATESC), pela estrutura fornecida.

Ao meu Orientador Professor Dr. Acácio Antonio Ferreira Zielinski, pela oportunidade, pois foi ele quem possibilitou a realização desse projeto, agradeço principalmente pela paciência, confiança e todos os conhecimentos transmitidos.

À minha Coorientadora Professora Dra. Rúbia Carvalho Gomes Corrêa, pela parceria, serenidade e todo o apoio e oportunidades de produção científica.

À professora Dra. Lillian Barros e a toda equipe do Centro de Investigação de Montanha (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança, Portugal, pela parceria e contribuição para realização desse estudo.

À minha querida Amiga e Mentora, Dra. Laís Benvenutti que me acolheu, nessa nova etapa, além, de toda a gentileza, boa vontade e entusiasmo com a qual me auxiliou e orientou durante a produção do presente trabalho.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa e apoio financeiro para realização do trabalho.

E por fim, mas não menos importantes, aos amigos que conquistei durante esta etapa que agora finalizo, pois eles fizeram meus dias mais leves e ajudaram a amenizar a saudade de casa, obrigada meus queridos, Equipe - (LATESC)

## RESUMO

A consciência ambiental dos consumidores está se expandindo e as metas da Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável incluem a utilização eficiente dos recursos naturais e a gestão ambientalmente amigável de substâncias químicas e todos os resíduos ao longo de seu ciclo de vida. Um grande corpo de evidências aqui apresentadas mostra que subprodutos e resíduos agroindustriais de alimentos são fontes sustentáveis para obtenção de compostos bioativos de alto valor para a indústria, dentro dos conceitos de *upcycling* e economia circular. No entanto, para tornar os subprodutos alimentares e os resíduos viáveis como fonte sustentável de compostos bioativos, é imperativa a seleção e otimização de abordagens de extração ecologicamente corretas que permitam a recuperação das moléculas alvo. Neste contexto, o objetivo geral deste estudo foi avaliar o soro ácido como um solvente alternativo, para a extração de antocianinas de folhas de repolho roxo descartadas. Diferentes métodos de extração foram testados empregando o soro ácido em comparação com o solvente convencional etanol acidificado: Extração por Agitação e Aquecimento (EAA), Extração Assistida por Ultrassom (UAE) e Extração por Líquido Pressurizado (PLE). O método PLE (T = 80 °C; t = 15 min; vazão = 3mL/min) permitiu os maiores valores de compostos fenólicos totais (1236,47 g EAG/100g) e atividade antioxidante *in vitro*, DPPH (14639,31 μmol ET/100g) e ABTS (14006,49 μmol ET/100g) para os extratos, em relação aos outros métodos (UAE e EAA), além dos maiores teores de antocianinas (293,37 mg C3G/100g). Entre as antocianinas identificadas, a cianidina-3-*O*-(feruloil)-soforosídeo-5-*O*-glicosídeo (949 m/z) (3,68 mg/g) foi a majoritária. No entanto, os ensaios de atividade antioxidante baseados em células indicaram fraca atividade para ambos os extratos (EA e SA). As amostras não apresentaram efeitos citotóxicos em células saudáveis de rim de macaco, o que indica a ausência de toxicidade nestas formulações bioativas, sendo de extrema importância para aplicações industriais nas áreas alimentícia e farmacológica. Ainda, para o extrato PLE, foi performedo um estudo de estabilidade de compostos bioativos pela concentração a baixa temperatura. A crioc concentração proporcionou aumento na concentração de antocianinas com eficiência de 67 % em dois ciclos de processo. O microencapsulamento das antocianinas foi feito pela estabilização do extrato concentrado seguida de secagem por liofilização. Maltodextrina DE:20 foi usada para o microencapsulamento, com a confirmação via microscopia eletrônica de varredura e fluorescência, as quais permitiram verificar a morfologia das microcápsulas e a localização dos compostos. Os estudos da estabilidade indicaram que as antocianinas obtidas pela extração com soro de leite ácido apresentaram maior estabilidade em pH 3,5 e temperatura de 60 °C. Além disso, a maltodextrina demonstrou efeito protetor ao extrato, proporcionando aumento na energia de ativação. A partir das análises colorimétricas, foi observado que os pós microencapsulados apresentaram a cor roxa. A aplicação do corante natural na formulação de marshmallow foi bem-sucedida, com ótimos efeitos na coloração e melhora das propriedades de dureza e mastigabilidade. O produto alimentício apresentou propriedades química satisfatórias. Tomados em conjunto, os resultados sugerem que as microcápsulas produzidas com extrato rico em antocianinas de repolho roxo constituem uma alternativa de corantes naturais.

**Palavras-chave:** Extração verde, solvente de base biológica, Indústria Leiteira, Repolho roxo.

## ABSTRACT

Environmental awareness among consumers has been rising, and the 2030 Agenda for Sustainable Development includes effective use of natural resources, and environmentally responsible management of chemicals, and all waste throughout its life cycle, among other objectives. The evidence presented here demonstrates that agro-industrial residues are sustainable sources of high-value bioactive compounds for the industry, in accordance with the concepts of an upcycling and circular economy. However, in order for these raw materials to be viable as a sustainable source of bioactive, environmentally sound extraction methods that allow for the recovery and sustainability of the target molecules are required. The aim of this study was to evaluate acid whey as an alternative solvent for the extraction of anthocyanins from discarded red cabbage leaves. Different extraction techniques using the acid serum in comparison to the common solvent (acidified ethanol) were tested: Heating and Stirring Extraction (HSE), Ultrasound-Assisted Extraction (UAE), and Pressurized Liquid Extraction (PLE). The PLE method ( $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $t = 15\text{ min}$ ; flow rate =  $3\text{ mL/min}$ ) expressed the highest values of total phenolic compounds ( $1236.47\text{ g EAG/100g}$ ) and in vitro antioxidant activity, DPPH ( $14639.31\text{ }\mu\text{mol ET/100 g}$ ) and ABTS ( $14006.49\text{ }\mu\text{mol ET/100 g}$ ) for the extracts, in relation to the other methods (UAE and HSE), also the higher levels of anthocyanins ( $293.37\text{ mg C3G/100g}$ ). The majority of the anthocyanins found in red cabbage residue extracts were cyanidin-3-O-(feruloyl)-sophoroside-5-O-glycoside ( $949\text{ m/z}$ ) ( $3.68\text{ mg/g}$ ). However, cell-based antioxidant activity assays indicated weak activity for both extracts (EA and EAW). The samples had no cytotoxic effects on monkey kidney cells, indicating the absence of toxicity in these bioactive formulations, which is critical for industrial applications in the food and pharmacological fields. A stability study of bioactive compounds in low concentration at temperature was also performed on the PLE extract. In two process cycles, cryoconcentration increased anthocyanin concentration with a 67% efficiency. The microencapsulation of anthocyanins was accomplished by first stabilizing the concentrated extract and then drying by lyophilization. Maltodextrin DE:20 was used for encapsulation, with scanning electron microscopy and fluorescence confirming the morphology of the microcapsules and the location of the compounds. Stability studies revealed that anthocyanins extracted with acid whey were more stable at pH 3.5 and a temperature of  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Furthermore, maltodextrin provided a protective effect to the extract by increasing activation energy. The microencapsulated powders had a purple hue, according to the colorimetric analysis. Natural dye was used successfully in marshmallow formulation, with significant effects on coloring as well as hardness and chewability improvements. The food product's chemical properties were satisfactory. Taken together, the findings suggest that anthocyanin-rich red cabbage extract microcapsules could be used as an alternative to natural dyes.

**Keywords:** Green extraction, bio-based solvent, Dairy Industry, Red cabbage

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 — Polimento da hortaliça Repolho Roxo e casacas residuais .....	26
Figura 2 — (a) Estrutura das antocianinas; (b) Efeito do pH na estrutura e cor das antocianinas .....	36
Figura 3 — Soro de leite ácido.....	46
Figura 4 — Folhas residuais de Repolho Roxo e preparado da farinha .....	47
Figura 5 — Cinética de extração para os métodos PLE e UAE .....	48
Figura 6 — Extração por agitação e aquecimento: (a) Amostras em banho termostático e (b) equipamento .....	50
Figura 7 — Extração assistido por ultrassom: (a) célula de extração e (b) sonda de sonicação .....	51
Figura 8 — Extração por Líquido Pressurizado: (a) Unidade de Extração <i>homemade</i> do LATESC/UFSC e (b) representação esquemática do módulo PLE .....	52
Figura 9 — Manta de poliestireno (a) e Tubo de falcon contendo o extrato (b).....	83
Figura 10 — Procedimento experimental dos ciclos de crioconcentração do extrato....	84
Figura 11 — Concentração de maltodextrina utilizada .....	86
Figura 12 — Concentrações testadas para a microencapsulação .....	91
Figura 13 — Micrografia dos extratos em pó microencapsulados por liofilização .....	95
Figura 14 — Micrografias de Fluorescência dos extratos em pó .....	96
Figura 15 — Fluxograma de processo do confeito marshmallow.....	102
Figura 16 — Estabilidade térmica das antocianinas em pH 3,5 (A, B e C) e em pH 5,5 (D, E e F) .....	109
Figura 17 — Uso de antocianinas em pó em marshmallow .....	122

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 — Condições de extração de antocianina .....	38
Tabela 2 — Parâmetros de processos utilizados para a extração com diferentes métodos .....	49
Tabela 3 — Caracterização do soro de leite ácido .....	61
Tabela 4 — Caracterização química do extrato e comparação entre os métodos de extração.....	61
Tabela 5 — Identificação e quantificação por LC-MS de compostos de antocianinas presentes em extratos de repolho roxo .....	67
Tabela 6 — Análise da atividade antioxidante pelos métodos baseados em célula e químicos .....	70
Tabela 7 — Avaliação da capacidade antimicrobiana dos extratos de antocianinas das folhas de repolho EA .....	73
Tabela 8 — Avaliação da capacidade antimicrobiana dos extratos de antocianinas das folhas de repolho roxo SA .....	75
Tabela 9 — Avaliação do potencial antifúngico dos extratos de antocianinas das folhas de repolho roxo.....	76
Tabela 10 — Potenciais anti-proliferativos e anti-inflamatório dos extratos.....	77
Tabela 11 — Ciclos da crioconcentração e parâmetros calculados.....	89
Tabela 12 — Parâmetros de cor dos extratos de repolho roxo microencapsulados .....	93
Tabela 13 — Formulação desenvolvida para o confeito marshmallow .....	101
Tabela 14 — Parâmetros cinéticos de estabilidade térmica em pH 3,5 .....	107
Tabela 15 — Parâmetros cinéticos de estabilidade térmica em pH 5,5 .....	108
Tabela 16 — Caracterização Física e Química do Marshmallow .....	125

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- Abs:** Absorbância
- ABTS:** 2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolína6-ácido sulfônico)
- AGS:** adenocarcinoma gástrico
- AMR:** Antocianinas monoméricas recuperadas
- AMT:** Antocianinas monoméricas totais
- ANOVA:** Análise de variância
- C3G:** Cianidina-3-glicosídeo
- CaCo2:** adenocarcinoma de cólon
- CFT:** Compostos fenólicos totais
- DE:** Dextrose equivalente
- DPPH:** Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila
- DSC:** Calorimetria diferencial exploratória (*Differential scanning calorimetry*)
- EAA:** Extração por agitação e aquecimento
- EAG:** Equivalente ao Ácido Gálico
- EA:** extrato obtido com etanol acidificado
- SA:** extrato em pó (extração solvente soro de leite ácido)
- ET:** Equivalente de trolox
- FRAP:** Poder antioxidante de redução do ferro (*Ferric-Reducing Antioxidant Power*)
- GEA:** Equivalente ácido gálico
- HPLC:** Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*)
- IC<sub>50</sub>:** Concentração média inibitória
- MCF-7:** adenocarcinoma da mama
- MEA:** microcápsula 10% maltodextrina (extração solvente etanol acidificado)
- MSA:** microcápsula 10% maltodextrina (extração solvente soro de leite ácido)
- OxHLIA:** Ensaio de inibição da hemólise oxidativa
- pH:** Potencial hidrogeniônico
- PLE:** Extração por líquido pressurizado
- VERO:** linha não-tumoral células do rim de macaco verde africano
- RAW 246.7:** linha celular semelhante a macrófagos de camundongo
- TBARS:** Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
- Trolox:** 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico
- UAE:** Extração assistida por ultrassom.

## SUMÁRIO

<b>DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO .....</b>	<b>17</b>
<b>FLUXOGRAMA DE SEQUÊNCIA METODOLÓGICA DA DISSERTAÇÃO ...</b>	<b>18</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>22</b>
Objetivo geral.....	22
Objetivos específicos.....	22
<b>CAPITULO 1 Revisão da Literatura .....</b>	<b>23</b>
<b>1.1 RECURSOS SUBUTILIZADOS.....</b>	<b>24</b>
1.1.1 Repolho Roxo.....	25
1.1.2 Soro de Leite .....	26
<b>1.2 SOLVENTES DE BASE BIOLÓGICA.....</b>	<b>28</b>
<b>1.3 TECNOLOGIAS ALTERNATIVAS DE EXTRAÇÃO E</b>	
<b>CONCENTRAÇÃO.....</b>	<b>32</b>
1.3.1 Extração assistida por ultrassom (UAE) .....	32
1.3.2 Extração com líquido pressurizado (PLE) .....	33
1.3.3 Crioconcentração.....	34
<b>1.4 ANTOCIANINAS .....</b>	<b>35</b>
1.4.1 Antocianinas do Repolho Roxo .....	39
<b>1.5 APLICAÇÃO DAS ANTOCIANINAS COMO CORANTES</b>	
<b>NATURAIS.....</b>	<b>39</b>
1.5.1 Microencapsulação de Compostos Bioativos.....	40
<b>1.6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>42</b>
<b>CAPITULO 2 Extração de Antocianinas de Folhas Residuais de Repolho Roxo com</b>	
<b>o Solvente Soro Ácido: Um Estudo Comparativo entre Métodos Emergentes e</b>	
<b>Tradicionais.....</b>	<b>43</b>
<b>2.1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>44</b>
<b>2.2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>46</b>
2.2.1 Obtenção e tratamento do soro de leite ácido .....	46
2.2.2 Preparo e tratamento das folhas de repolho roxo .....	47
2.2.3 Preparo dos Solventes .....	47
2.2.4 Extração dos compostos bioativos das folhas de repolho roxo .....	48
2.2.5 Caracterização dos extratos.....	52
2.2.6 Avaliação do potencial antioxidante dos extratos .....	54
2.2.7 Identificação e Quantificação dos compostos fenólicos por LC-DAD-	
ESI/MSn.....	58
2.2.8 Análises Estatísticas .....	59
<b>2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>60</b>
2.3.1 Caracterização do soro de leite ácido .....	60
2.3.2 Comparação entre os métodos de extração e solvente .....	61
2.3.3 Caracterização das antocianinas dos extratos de repolho roxo .....	64
2.3.4 Atividade antioxidante dos extratos .....	69
2.3.5 Atividade antibacteriana e antifúngica .....	72
2.3.6 Atividade anti-inflamatória e anti-proliferativa .....	76

2.4	<b>CONCLUSÃO</b> .....	78
<b>CAPÍTULO 3 Produção de Microcápsulas de Antocianinas Extraídas de Folhas Residuais de Repolho Roxo Usando Soro Ácido como Solvente: um Processo Integrado a Baixas Temperaturas (Crioconcentração-Liofilização).....</b>		
3.1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	80
3.2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	82
3.2.1	Extração das antocianinas .....	82
3.2.2	Concentração dos extratos de antocianinas .....	82
3.2.3	Microencapsulação dos extratos ricos antocianinas.....	85
3.2.4	Caracterização dos extratos em pó .....	86
3.2.5	Análises estatísticas.....	87
3.3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	88
3.3.1	Crioconcentração dos extratos de antocianinas.....	88
3.3.2	Microencapsulação dos extratos ricos antocianinas.....	90
3.3.3	Determinação dos parâmetros de cor .....	91
3.3.4	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	94
3.3.5	Microscopia de Fluorescência .....	95
3.4	<b>CONCLUSÃO</b> .....	97
<b>CAPITULO 4 Antocianinas da Casca do Repolho Roxo em pó: Estudo da Estabilidade e seu uso como Corante Natural .....</b>		
4.1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	99
4.2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	100
4.2.1	Estabilidade dos extratos bioativos .....	100
4.2.2	Avaliação do efeito do pH e da temperatura a .....	100
4.2.3	Desenvolvimento do produto e aplicação do extrato .....	101
4.2.4	Caracterização química e física do marshmallow .....	103
4.3	<b>RESULTADOS E DISSCUSSÕES</b> .....	104
4.3.1	Estabilidade das antocianinas com e sem microencapsulação obtidas das folhas de repolho roxo.....	104
4.3.2	Antocianinas do repolho roxo como corante natural em confeitos.....	122
4.4	<b>CONCLUSÃO</b> .....	126
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>		
<b>TRABALHOS FUTUROS.....</b>		
<b>REFERÊNCIAS .....</b>		
		130

**DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO****SORO ÁCIDO: DE RESÍDUO INDUSTRIAL AO USO COMO SOLVENTE ALTERNATIVO PARA A EXTRAÇÃO DE ANTOCIANINAS****POR QUÊ?**

O aumento insustentável na geração de resíduos agroindustriais, que vão desde resíduos de frutas e vegetais até o soro de leite ácido, provoca um sério problema ambiental. Desta forma torna-se necessário investigar métodos para minimizar esses danos e atribuir valor a esses subprodutos, como, a extração de compostos bioativos através do uso de tecnologias limpas e sustentáveis tem resultado em excelentes alternativas.

**QUEM JÁ FEZ?**

- Não foi encontrado na literatura uma proposta de processo de extração de antocianinas com o soro de leite ácido como solvente em condições de alta pressão;
- Poucos trabalhos estudaram a aplicação de solvente de base biológica derivado de matérias-primas residuais.

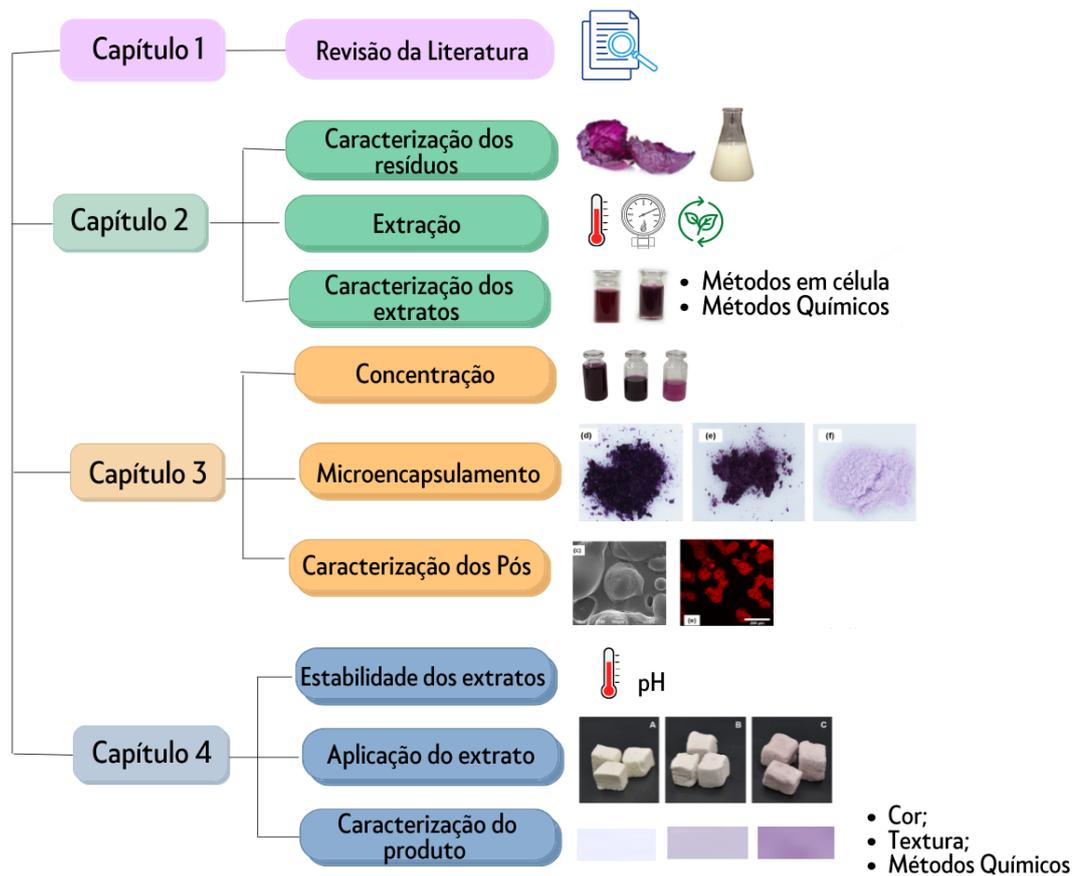
**HIPÓTESES:**

- Perspectivas em obter extratos de resíduos agroindústrias, ricos em antocianinas, utilizando o soro de leite ácido como solvente alternativo;
- O extrato proveniente dessa extração detém de Potencial biológico;
- Possibilidade de a matriz biológica do soro de leite ácido proteger e/ou atribuir maior estabilidade aos compostos extraídos;
- Perspectivas de ampliar a aplicabilidade do extrato em sistemas alimentícios.

**COMO FAZER?**

- Estudar diferentes processos de extração com o soro de leite ácido a fim de conhecer o comportamento dele como solvente e as condições para maior recuperação dos compostos alvo;
- Efetuar a comparação entre os diferentes métodos de extração: Extração por Líquido Pressurizado (PLE), Extração assistida por ultrassom (UAE) e Extração por Aquecimento e Agitação (EAA), avaliando o teor de antocianinas, compostos fenólicos e antioxidantes presentes no extrato;
- Verificar a estabilidade ao pH e diferentes temperaturas;
- Realizar a crioconcentração e a microencapsulação do extrato e caracterizar o pó microencapsulado.

## FLUXOGRAMA DE SEQUÊNCIA METODOLÓGICA DA DISSERTAÇÃO



## INTRODUÇÃO

A consciência ambiental dos consumidores está se expandindo e as metas da Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável incluem a utilização eficiente dos recursos naturais e a gestão ambientalmente amigável de produtos químicos e todos os resíduos ao longo de seu ciclo de vida. Um grande corpo de evidências mostra que subprodutos e resíduos agroindustriais de alimentos são fontes sustentáveis para obtenção de compostos bioativos de alto valor para a indústria, dentro dos conceitos de *upcycling* e economia circular (TEIXEIRA et al., 2021; BENVENUTTI, ZIELINSKI e FERREIRA, 2022; TORRES et al., 2022).

Os “resíduos agroindustriais” são comumente designados como o subproduto produzido no último estágio do ciclo e podem ser classificados em sólidos alimentares os quais incluem as tortas residuais dos processos, cascas e sementes, já a fração líquida são denominadas como efluentes, esses por sua vez são gerados devido ao grande volume de água com alto teor de matéria orgânica (FAO, 2019; ZAN et al., 2022; TSERMOULA et al., 2021).

Dentre os efluentes gerados pelas indústrias alimentícias o soro de leite ácido apresenta forte impacto ambiental devido a sua elevada DBO (31.900 a 62.400 mg/L) (MENCHIK et al., 2019). Convencionalmente, o soro de leite ácido é subaproveitado, visto que apresenta elevada acidez (pH 4,0-4,5) e alto teor de minerais, o que dificulta seu beneficiamento. Além disso, um grande desafio na viabilidade industrial do aproveitamento de resíduos lácteos é em decorrência ao elevado custo empregado aos processos de separação, visto que a maior parte destas tecnologias ainda é de capital intensivo, fator limitante do seu crescimento comercial (AWASTHI et al., 2022). Assim, a produção do soro ácido, gera sobrecarga para as indústrias de laticínios, que ainda não desenvolveu uma abordagem sustentável para reciclar esse biorresíduo (AWASTHI et al., 2022). Todavia, para tornar os resíduos viáveis como fonte sustentável de bioativos, é imperativa a seleção e otimização de abordagens de extração ecologicamente corretas que permitam a recuperação e sustentabilidade das moléculas alvo (CÂMARA et al., 2020; REGUENGO et al., 2021).

A gestão sustentável dos resíduos alimentares é uma questão global com alta prioridade que visa melhorar a segurança alimentar e conservar os recursos naturais e ecossistemas. Com a valorização dos resíduos, os recursos são aproveitados, recuperados e renovados, o que agrega valor ao processo, contrapondo os padrões de produção lineares. Nesses aspectos conceitos como geração zero de resíduos, *upcycling*, economia circular e

biorrefinaria se destacam (SARKAR, et al., 2022). Estes conceitos atendem os “Objetivos para o Desenvolvimento Sustentável” (ODS) proposto pela Organização das Nações Unidas (ONU) em 2015. A ODS12 preconiza o consumo e produção sustentável e evidencia a necessidade da valorização dos resíduos agroindustriais (CHEN et al., 2020). Neste sentido, os polifenóis são especialmente valorizados devido à sua opulência em resíduos à base de plantas e ao interesse do mercado por suas capacidades biológicas (por exemplo, propriedade antioxidante natural) como parte de formulações de medicamentos, nutracêuticas e cosméticas (GIL-MARTÍN et al., 2022).

A classe flavonoides, a qual inclui as antocianinas, se destaca por diversas bioatividades extensamente reportadas na literatura, como efeitos contra doenças cardiovasculares (DONG et al., 2022), propriedades antiobesidade, antidiabéticas (LEE et al., 2022), além de potenciais antimicrobianos (GARCIA et al., 2019), fúngicos (CORRÊA et al., 2019) e antioxidantes (DANGLES e FENGER, 2018; TENA, MARTÍN e ASUERO, 2020; FILAFERRO et al., 2022). Para mais, estes compostos possuem pigmentação natural, exibindo cores vermelha, violeta e azul. Por essa razão, as antocianinas podem ser aplicadas como corantes naturais (TENA, MARTÍN e ASUERO, 2020; MACHADO et al., 2022).

Dentre as fontes naturais de obtenção de antocianinas destaca-se o repolho roxo (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* F. *rubra*), as folhas dessa hortaliça são comumente descartadas, sendo consideradas um resíduo da etapa de polimento do pós-colheita. O repolho roxo ostenta uma composição bastante complexa com propriedades únicas (PRATAS, 2019; MANSOUR, MOUSTAFA E ABDELKHALIK, 2021). Ainda um conjunto de evidências científicas enfatizam que o consumo da hortaliça tem impactos positivos na saúde. Além disso, os extratos de antocianinas de repolho roxo têm demonstrado atividades anti-inflamatórias e anticancerígenas em diversos modelos experimentais (NEVES, SILVA, MEIRELES, 2019; PATRAS et al., 2019; MACHADO et al., 2022).

Tradicionalmente, o isolamento de compostos fenólicos de fontes naturais tem sido feito utilizando solventes orgânicos como o metanol e etanol. No entanto, devido a toxicidade e poluente, o uso desses solventes orgânicos é fortemente desencorajado nas indústrias alimentícias, cosméticas e farmacêuticas (PALOS-HERNANDEZ et al., 2022).

Dentre os métodos de extrações referidos como convencionais a extração por aquecimento e agitação é amplamente elucidada na literatura e largamente empregada nas indústrias de processos. Porém, alternativas promissoras como a tecnologia assistida por

Ultrassom e métodos de extração de alta pressão exibem-se vantajosos, justamente por se tratarem de tecnologias limpas, arrojadas e com eminente potencial de extração (TEIXEIRA et., 2021; BENVENUTTI, ZIELINSKI e FERREIRA, 2022; TORRES et al., 2022).

A qualidade do extrato e potencial biológico dependem do método de obtenção, solvente e condições de processo, assim como também, as características da matriz de extração (HESSEL et al., 2022). Desta forma, associado às técnicas sustentáveis se faz necessário incrementar pesquisas em busca de substituir solventes voláteis por sistemas de solventes biocompatíveis, mais verdes e menos tóxicos, tais como os solventes de base biológica, solventes eutéticos profundos, tensoativo e líquidos iônicos (MIYASHITA et al., 2020).

Na busca por abordagens sustentáveis para a valorização do soro de leite ácido, a aplicação dele como um solvente de base biológica surge como uma possibilidade. Visto que o soro é um subproduto da indústria leiteira ainda sem uma aplicação comercial estabelecida, e que o seu descarte sem o devido tratamento, causa impactos ambientais extensos em todo o país. Esta proposta visa unir o ciclo de beneficiamento de dois resíduos o soro ácido e as folhas residuais do repolho roxo os quais são abundantes e pouco explorados em nosso país, desenvolvendo uma potencial forma de obtenção de produtos naturais, sustentáveis e de grande valor agregado para a indústria e sociedade.

## OBJETIVOS

### Objetivo geral

*Avaliar* o uso de soro ácido como solvente alternativo para a extração de antocianinas de folhas residuais de Repolho Roxo.

### Objetivos específicos

- *Empregar* tecnologias alternativas de extração como o método assistido por ultrassom (UAE) e a extração por líquido pressurizado (PLE) em comparação ao método tradicional de extração por aquecimento e agitação (AAE);
  - *Investigar* o melhor método para extração das antocianinas;
  - *Caracterizar* os compostos bioativos presentes nos extratos;
  - *Determinar* o potencial biológicos dos extratos;
  - *Analisar* a estabilidade dos extratos em diferentes pH e temperaturas;
  - *Concentrar* o extrato rico em antocianinas por crioconcentração assistida por centrifugação;
- *Promover* a estabilização das antocianinas por microencapsulação através do método de liofilização;
- *Avaliar* a aplicação do extrato microencapsulado de antocianinas como corante natural.

## **CAPITULO 1**

### **Revisão da Literatura**

## 1.1 RECURSOS SUBUTILIZADOS

Dentre os grandes produtores de resíduos orgânicos destacam-se as agroindústrias. O material orgânico gerado no final da cadeia do processamento é dito como “desperdício” enquanto toda a matéria alimentar que deixa a cadeia de abastecimento alimentar nas fases de produção, pós-colheita e processamento são considerados como “perdas” (ZAN et al., 2022).

Desta forma o termo “resíduo” é comumente referido como o subproduto sem valor que emerge na fase final do ciclo. Estima-se que quase um terço dos alimentos produzidos é perdido ou desperdiçado em todo o mundo (cerca de 1,3 bilhões de toneladas anualmente), desta fração 0,5 bilhões de toneladas são provenientes do processamento de origem vegetal, ocupando cerca de 44 % do total de resíduos sólidos em todo o mundo (FAO, 2019; ZAN et al., 2022).

A fração líquida é denominada como efluente e é oriunda do elevado volume de água residual do processamento, o qual apresenta excessivos teores de matéria orgânica. No setor alimentício os laticínios e frigoríficos lideram esse ranking, estando entre as indústrias mais poluentes e geradoras de efluentes devido ao seu alto consumo de água (TSERMOULA et al., 2021).

A geração em larga escala de resíduos sólidos e líquidos acarreta em problemas sociais, econômicos e principalmente ambientais, minando a sustentabilidade do nosso planeta. As rotas de descarte convencionais destas matérias-primas residuais, quando empregadas, são via os métodos físico-químicos, biológicos, bem como, descarte em aterros e a incineração (AWASTHI et al., 2022).

Contudo, os tratamentos convencionais como os métodos físico-químicos, biológicos e biotecnológicos, apresentam como desvantagens o alto custo dos reagentes e a remoção limitada da Demanda Química de Oxigênio (DQO) e Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO). Além da formação de quantidades significativas de lodo durante a biodegradação aeróbia e gases de efeito estufa, o que em larga escala acaba se tornando uma desvantagem. Desta forma cresce a conscientização, motivando estratégias para a valorização a fim de minimizar o consumo de recursos.

Com a valorização dos resíduos, os recursos são utilizados, recuperados e renovados, o que agrega valor ao processo, contrapondo os padrões de produção lineares. Conceitos como geração zero de resíduos, *upcycling*, economia circular e biorrefinaria se destacam, pois englobam os três pilares da sustentabilidade: meio ambiente, sociedade e economia (SARKAR et al., 2022).

A implementação desses conceitos se instaura em uma ampla gama de processos industriais, como produção de energia, biocombustíveis e materiais, assim como também na extração de produtos naturais os quais serão posteriormente utilizados como ingredientes, suplementos alimentares e compostos bioativos (GIL-MARTÍN et al., 2022).

Muitos compostos valiosos dos quais exibem propriedades bioativas e são capazes de impactar positivamente na saúde humana podem ser obtidos através de resíduos agroindustriais. Portanto, as vias para a obtenção e valorização dessas matérias-primas devem ter seu potencial explorados.

### **1.1.1 Repolho Roxo**

O Repolho Roxo (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* F. *rubra*) é uma das hortaliças mais cultivadas em todo o mundo devido à sua alta abundância e baixo custo de produção (ZANONI et al., 2020). Com o beneficiamento do repolho, etapa de polimento da hortaliça é realizado a remoção das folhas superficiais onde o material comestível é eliminado para melhorar o aspecto do alimento e aumentar a aceitabilidade do consumidor Figura 1. Ainda conforme relatado por Patras, (2019), os resíduos frescos de repolho roxo podem ser oriundos do processamento industrial, constituídos por folhas danificadas misturadas com os talos da hortaliça. Os resíduos produzidos durante seu processamento, podem atingir até 40-50 % do total de material colhido (LANTE et al., 2011, ZANONI et al., 2020).

O Repolho Roxo é rico em antocianinas, pigmentos que podem ser utilizadas como corantes em diversos produtos (PRATAS, 2019; NEVES, SILVA, MEIRELES, 2019). Ainda conforme esses autores, os corantes oriundos desta hortaliça apresentam boa estabilidade de cor durante o armazenamento refrigerado tanto em misturas de bebidas secas quanto reconstituídas e possuem maior estabilidade ao armazenamento e ao calor do que aqueles extraídos de uvas ou berries.

Desta forma, a valorização de resíduos do Repolho Roxo pode apresentar uma alternativa para desenvolver diferentes sistemas de coloração, assim como também, expressar bioatividades valiosas.

Figura 1 — Polimento da hortaliça Repolho Roxo e casacas residuais



Fonte: Autor, (2022).

### 1.1.2 Soro de Leite

Conforme publicado pela Embrapa no anuário de leite (EMBRAPA, 2021), a produção mundial de leite em 2020 foi estimada em 532,3 milhões de toneladas. O Brasil ocupa a sexta posição nesse ranking, uma vez que a disponibilidade de leite no Brasil aumentou 2,8 %, com volume de 734,08 milhões de litros superior a 2019. Deste volume total, cerca de 8,746 bilhões de litros foram absorvidos para a produção de queijos.

A produção industrial de queijos, assim como também a de uma ampla variedade de outros produtos lácteos como iogurtes e caseinatos, produz um subproduto conhecido como soro do leite. O soro é tido como o resíduo líquido majoritário gerado a partir da precipitação da caseína, sendo composto por componentes solúveis, incluindo lactose, sais minerais e proteínas globulares (TSERMOULA et al., 2021).

A composição do soro variar dependendo do tipo de produto, composição da matriz do leite e processamento, sendo o mesmo classificado em dois tipos: **soro de leite doce** e **soro de leite ácido**.

Convencionalmente, o soro de leite doce, é o subproduto da produção de queijos maturados produzidos via coalho ou coagulação enzimática, com pH em torno de 6 a 7 (ROCHA-MENDOZA et al., 2021). Este coproduto tem alto teor de proteínas, fato que amplia a sua utilização e justifica o mercado bem estruturado, com um portfólio de

produtos de alto valor gerados pela proteína isolada (*Whey protein*) e a separação da lactose. O whey pode ser facilmente inserido em formulações alimentícias e aplicado como cobertura de revestimento e agente encapsulante (TSERMOULA et al., 2021).

Se por um lado o soro de leite doce tem valorização e aplicação em massa, em outra vertente o soro de leite ácido é muito subexplorado. Um dos motivos são as medidas adotadas para o processamento, que não favorecem o aproveitamento desse recurso.

O soro ácido é o subproduto da produção de queijos via coagulação ácida, assim como também, da produção de requeijão, ricota, iogurte grego e outros produtos. Seu processamento envolve tanto a atividade de lactobacilos por meio de fermentação ou adição de ácidos orgânicos, como ácidos cítrico, acético e láctico, ou ácidos minerais, como ácido clorídrico ou sulfúrico (LIEVORE et al., 2015).

Por essa razão, esse tipo de soro apresenta pH ácido em torno de (4,0 - 4,5), e altos teores de minerais, parâmetros que influenciam na percepção sensorial e inviabilizam sua adição em formulações alimentícias. Além disso, existem objeções tecnológicas, pois os constituintes minerais presentes no soro ácido dificultam que o soro seja pulverizado, pois a maior parte da lactose é convertida em sua estrutura cristalina e o alto teor de fosfato de cálcio resulta em incrustação nos equipamentos (BYLUND, 2015).

Nos aspectos ambientais, o soro ácido necessita passar por um rigoroso tratamento de efluente devido a sua elevada DBO (31.900 a 62.400 mg/L). Assim, o tratamento é mandatório antes do descarte no meio ambiente sem efeitos dispendiosos nos ecossistemas circundantes (MENCHIK et al., 2019).

Em geral, o tratamento dos resíduos lácteos é feito de acordo com as normas e regulamentos adotados por cada país. Podendo essas estratégias ser categorizadas em rotas físico-químicas e biológicas por meio do sistema de tratamento de efluentes (AWASTHI et al., 2022).

Nos últimos anos, houve um aumento relevante na produção de iogurte grego e queijo cottage, o que alavancou a geração de soro ácido, causando sobrecarga para as indústrias de laticínios, a qual está em constante busca para desenvolver métodos inovadores para reciclar o soro ácido de maneira sustentável (TSERMOULA et al., 2021).

À vista disso, recomenda-se que as indústrias de laticínios usem seus resíduos lácteos para aplicações de digestão anaeróbica, para produzir hidrogênio e metano. Estes

resíduos também podem ser avaliados em produções biotecnológicas, como etanol, ácidos orgânicos, enzimas e proteínas unicelulares (GUIMARÃES, TEIXEIRA e DOMINGUES, 2010).

Embora a valorização dos fluxos de resíduos lácteos ofereça oportunidades promissoras para produzir bioenergia e bioprodutos, um grande gargalo para o aproveitamento de resíduos lácteos é o alto custo das tecnologias de separação, visto que a maioria dessas tecnologias é de capital intensivo e limita o crescimento comercial (AWASTHI et al., 2022).

Por fim, a valorização do soro ácido ainda é um desafio para a indústria de laticínios, sendo necessário esforços significativos para melhorar e desenvolver processos que permitam a viabilidade industrial desse resíduo (AWASTHI et al., 2022).

Neste sentido, a aplicação do soro de leite ácido como um solvente de base biológica atenderia à demanda da indústria sem que fosse necessária a implementação de tecnologias onerosas. O soro ácido apresenta requisitos para se tornar um bom solvente, pois além de elevada acidez (pH 4,0 - 4,5) apresenta baixo custo.

No entanto, estudos dedicados ao desenvolvimento de abordagens inovadoras para o seu aproveitamento de forma integrada, empregando processos sustentáveis e de baixo custo, ainda são escassos.

## **1.2 SOLVENTES DE BASE BIOLÓGICA**

Os solventes de base biológica são formados a partir de insumos naturais, sendo derivados de matérias-primas vegetais ou animais. Estes devem ser provenientes de fontes renováveis e oferecer uma alternativa aos recursos fósseis, utilizando processos químicos e físicos mais seguros para o meio ambiente e para o homem (HESSEL et al., 2022).

Normalmente, os processos de extração de vários bioativos utilizam uma ampla variedade de solventes, devido à polaridade desses compostos. Para a extração de antocianinas tradicionalmente emprega-se como solvente a água, etanol e metanol (MCGHIE; WALTON, 2007), além dos ácidos cítrico, acético e clorídrico, os quais são utilizados para a acidificação das soluções extratoras (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

A acidificação de um solvente é referenciada como um parâmetro importante, pois promove melhoria na capacidade de extração, auxiliando na ruptura da estrutura das

membranas dos tecidos vegetais (RODRIGUES et al., 2019; TEIXEIRA et al., 2021). Na extração de antocianinas, os pigmentos dissolvidos em ambiente mais ácido têm a estabilização do cátion flavílium, o que minimiza possíveis modificações na pigmentação (RODRIGUES et al., 2019; TEIXEIRA et al., 2021).

A fim de minimizar a toxicidade e poluição causada por solventes de origem petroquímica, pesquisadores têm tentado substituir solventes voláteis por sistemas de solventes biocompatíveis, mais verdes e menos tóxicos, solventes de base biológica, solventes eutéticos profundos (DES), tensoativo e líquidos iônicos (MIYASHITA et al., 2020).

Alguns estudos empregando solventes verdes como: a água, etanol acidificado e solventes eutéticos profundos, associados a tecnologias de extrações emergentes, demonstraram resultados promissores na obtenção de extratos ricos em antocianinas (PANIC' et al., 2019; TEIXEIRA et al., 2021; BENVENUTTI, ZIELINSKI e FERREIRA, 2022 e TÜRKER e DOĞAN, 2022; YİĞİT et al., 2022).

No entanto, apesar dos resultados satisfatórios, a aplicação desses solventes enfrenta alguns desafios, como: o alto custo na produção do DES, o custo energético para remoção do etanol e suas misturas sem que haja comprometimento na qualidade do extrato, visto que as antocianinas são compostos altamente instáveis, reativos e sujeitos à degradação. Desta forma, estudos para a prospecção de solventes verdes alternativos, renováveis, biodegradáveis e de baixo custo são do interesse de todos (CHEMAT et al., 2019).

Como alternativa para a valorização de resíduos e a necessidade de desenvolver solventes verdes, surge a proposta do soro de leite ácido como um solvente de base biológica. Esta ideia surgiu em decorrência de resultados positivos observados com o emprego de leite integral como solvente conforme reportado por Neves et al., (2020). A aplicação do leite como solvente viabilizou a extração de compostos bioativos da genipina, o composto extraído foi quimicamente estável durante o tempo de armazenamento de 96 horas e exibiu coloração azul intensa. Neves et al., (2019) empregaram o leite como carreador de curcumina e verificaram que este tinha o mesmo potencial para esta finalidade quando comparado aos agentes carreadores convencionais como a caseína isolada.

Vale ressaltar que as pesquisas supramencionadas atribuem benefícios, como o aumento da estabilidade dos extratos e elevado potencial carreador do solvente, aos constituintes do leite, em especial à camada lipídica proteica. Segundo Khanji et al., (2015), o leite é um sistema complexo composto por um conjunto de proteínas e ácidos graxos, podendo essa matriz ser considerada como uma emulsão de óleo em água capaz de carrear diversos compostos ativos ou funcionais.

Com base nas aplicações mencionadas, a proposta de implementar o soro ácido como um solvente de base biológica se fundamenta, visto que o soro é um subproduto do processamento do leite. Podendo desta forma viabilizar o aproveitamento de forma integrada do soro ácido e possibilitar uma alternativa de solvente com eminente potencial “verde”.

Conforme relatado por Hessel et al., (2022), um processo de extração para ser considerado “verde” ou amigo da natureza deve promover redução no impacto ambiental, segurança a saúde e redução de custos. Gałuszka, Migaszewski e Namieśnik, (2013), baseados nos estudos de Anastas e Zimmerman, (1998) e Anastas e Warner, (2003), propuseram 12 diretrizes para avaliar o quão verde é um determinado processo. Segundo os autores, visando a produção mais limpa e sustentável, os reagentes utilizados devem se enquadrar nas diretrizes apresentadas no Quadro 1.

Fazendo uma correlação destas com as características do soro de leite ácido, podemos verificar que o soro se enquadra em 7 das 12 orientações listadas, o que revela o seu potencial como solvente verde de base biológica para a recuperação de bioativos.

Quadro 1 — Correlação das Diretrizes da química verde com o Soro de Leite Ácido

<b>DIRETRIZES DA QUÍMICA VERDE</b>	<b>SORO DE LEITE ÁCIDO</b>
1. Técnicas analíticas diretas devem ser aplicadas para evitar o tratamento da amostra;	<i>Não há a necessidade de remover o solvente do extrato ✓</i>
2. O tamanho mínimo da amostra e o número mínimo de amostras são objetivo;	
3. As medições in situ devem ser realizadas;	
4. A integração de processos e operações analíticas economiza energia e reduz o uso de reagente;	<i>Não é preciso tratamento prévio ✓</i>
5. Métodos automatizados devem ser selecionados;	
6. A derivatização deve ser evitada;	
7. A geração de um grande volume de resíduos analíticos deve ser evitada e o gerenciamento adequado de resíduos analíticos deve ser fornecido;	<i>Utilização do soro reduz o impacto ambiental ✓</i>
8. Métodos multianalitos ou multiparâmetros são preferidos em relação aos métodos que usam um analito de cada vez;	
9. O uso de energia deve ser minimizado;	<i>Não há necessidade de pré-tratamento ✓</i>
10. Os reagentes obtidos de fonte renovável devem ser preferidos;	<i>Subproduto do Leite ✓</i>
11. Os reagentes tóxicos devem ser eliminados ou substituídos e;	<i>Substituição de solventes petroquímicos ✓</i>
12. A segurança do operador deve ser aumentada.	<i>Não é inflamável ✓</i>

Fonte: Anastas e Zimmerman, (1998); Anastas e Warner, (2003); Galuszka, Migaszewski e Namieśnik, (2013); Autor, (2022)

### 1.3 TECNOLOGIAS ALTERNATIVAS DE EXTRAÇÃO E CONCENTRAÇÃO

Associadas aos processos de extração considerados limpos, podem estar integradas algumas tecnologias como: micro-ondas, ultrassom, extração com fluidos subcríticos e supercríticos. Assim como tecnologias limpas para a concentração dos extratos, tais como membranas e a crioc Concentração. São métodos eficientes e com baixo consumo de solvente, que preservam a qualidade e atividades biológicas dos extratos (CHEMAT et al., 2019).

#### 1.3.1 Extração assistida por ultrassom (UAE)

A extração assistida por ultrassom, do inglês “*Ultrasound-Assisted Extraction*” (UAE), é uma tecnologia verde que apresenta potencial em extração de múltiplos compostos (ASHOKKUMAR, 2015). Dentre os mecanismos de propagação a transmissão por sonda se destaca por ser um método de aplicação direto. A sonda normalmente é conectada ao transdutor e imersa no recipiente de extração, ficando em contato direto com o solvente e matriz de extração. Os sistemas baseados em sondas, apresentam vantagens como menor necessidade de tempo e energia (TIWARI, 2015).

O modo de ação desta tecnologia consiste na propagação de ondas mecânicas as quais apresentam frequência (20-100 kHz). Essas ondas consistem em uma série de ciclos de compressão e expansão que podem se propagar através do meio líquido, induzindo o deslocamento das moléculas. Os ciclos de compressão exercem uma pressão positiva sobre as moléculas, pressionando-as umas contra as outras, enquanto que os ciclos de expansão exercem pressão negativa, separando-as e criando bolhas de cavitação (KUMAR, SRIVASTAV e SHARANAGAT, 2021; MAZZUTTI et al., 2017).

A cavitação é a força motriz para os efeitos da extração por ultrassom: as bolhas formadas crescem sucessivamente devido às variações de amplitude das ondas, propagando-se no sistema (MAZZUTTI et al., 2017; KUMAR, SRIVASTAV e SHARANAGAT, 2021; TEIXEIRA et al., 2021).

A implosão das bolhas promovidas pela cavitação na superfície da estrutura da parede celular, pode ocasionar danos como a erosão. Além disso, o colapso, entre as bolhas resulta na ruptura dos tecidos da matriz, facilitando o contato do solvente com os compostos de interesse, promovendo a liberação e possibilitando o aumento no

rendimento de extração devido a maior acessibilidade (PAN et al., 2012; KUMAR, SRIVASTAV e SHARANAGAT, 2021).

No entanto, níveis de potência muito elevados, principalmente quando aliados à elevação da temperatura, podem culminar em um efeito adverso e colapso violento. Neste cenário, pode acontecer a degradação de compostos bioativos, com consequente diminuição de atividades biológicas e rendimento de extração (PAN et al., 2012; MAZZUTTI et al., 2017).

### **1.3.2 Extração com líquido pressurizado (PLE)**

O método de extração com líquido pressurizado, em inglês “*Pressurized Liquid Extraction*” (PLE), é designado como uma tecnologia de extração verde economicamente sustentável e promissora, a qual têm ampla aplicabilidade.

Conforme Zielinski et al., (2021), as tecnologias de extração que empregam fluidos a alta pressão se destacam devido às condições de operação. O processo exige alta pressão e temperaturas, por curtos períodos de tempo.

Desse modo, à medida que, a temperatura prevalece acima do ponto de ebulição do solvente, a pressão deve ser suficiente para mantê-lo no estado subcrítico (ZIELINSKI et al., 2021). Por conseguinte, a alta pressão proporciona controle ao processo, podendo também, minimizar problemas relacionados a gases oclusos encontradas na matriz, que na maioria das vezes dificulta a interação entre o solvente e soluto. Sob essas condições aumenta-se a solubilidade e dessorção da matriz sólida, melhorando o desempenho da extração (ZIELINSKI et al., 2021).

Com o aumento da temperatura, ocorre a redução na viscosidade e tensão superficial do solvente (ELBOUGHDIRI, 2018), o que viabiliza a permeabilidade na matriz vegetal, expandido a superfície de contato e intensificando a transferência de massa (ZIELINSKI et al., 2021; ELBOUGHDIRI, 2018). No entanto, deve-se atentar-se ao controle da temperatura e tempo de processo, pois dependendo da matéria-prima podem acontecer a degradação de compostos termosensíveis (como a maior parte dos polifenóis) ou desenvolvimento de produtos indesejáveis (PLAZA et al., 2010).

Os mecanismos de operação para extração podem ocorrer em modo estático, dinâmico ou ainda pela combinação destes. Dentre estes meios, o método dinâmico exhibe maior eficiência pois permite que o solvente seja continuamente bombeado através da

amostra, evitando a saturação (ELBOUGHDIRI, 2018). Além disso, o método PLE apresenta automatização do processo e baixo consumo de solventes com custos e impactos ambientais reduzidos, superando as desvantagens dos métodos convencionais (TEIXEIRA et al., 2021).

### 1.3.3 Crioconcentração

A crioconcentração ou concentração por congelamento em blocos é uma tecnologia emergente baseada no congelamento-descongelamento de fluídos alimentícios. Devido a aplicação de baixas temperaturas essa técnica apresenta excelentes resultados. Como não ocorre a interface vapor/líquido, acontecem perdas mínimas de compostos termolábeis, de forma que a qualidade sensorial dos produtos concentrados é conservada, bem como os principais compostos bioativos (PETZOLD et al., 2016; DE LIZ et al., 2020).

O processo consiste em congelar completamente a solução, priorizando um congelamento lento com a formação de cristais de gelo com tamanhos maiores. Durante uma cristalização lenta, os cristais de gelo maiores formam-se em torno da estrutura da matriz e exercem ação mecânica sobre elas, podendo ocasionar o rompimento das membranas celulares (AIDER e DE HALLEUX, 2009).

Esse fato traz, em consequência, forte exsudação no descongelamento, permitindo que o bloco de gelo atue como uma matriz sólida, o que viabiliza a passagem de fluidos com altas concentrações de sólidos solúveis e, portanto, a concentração dos compostos de interesse (AIDER e DE HALLEUX, 2009).

O ponto de congelamento é reduzido em razão da presença dos solutos e a mobilidade das moléculas de água diminuem devido a maior viscosidade dos extratos (AIDER e DE HALLEUX, 2009; DE LIZ et al., 2020).

Nesta técnica segue-se o descongelamento parcial, realizado pelo método de degelo gravitacional assistido. A gravidade contribui para a separação de sólidos solúveis por difusão com massa e tempo de processo controlados (AIDER e DE HALLEUX, 2009). Mediante a separação gravitacional são obtidas duas fases: uma líquida e a outra sólida. A fase líquida possui maior concentração de soluto do que a solução inicial, enquanto a fase sólida é composta predominantemente por água pura com alguns solutos presos. Para maior eficiência na separação da fração de gelo da solução concentrada,

métodos complementares como vácuo ou a centrifugação são aplicados (PETZOLD et al., 2016).

A crioc concentração, além de apresentar vantagens como a eficiência de concentração, minimiza os efeitos adversos promovidos pelo emprego do calor, sendo considerada um método verde que requer menores custos energéticos, quando comparada a outras técnicas de concentração, como a evaporação (PETZOLD et al., 2016).

#### 1.4 ANTOCIANINAS

Aproximadamente 700 tipos antocianinas provenientes de fontes naturais já tiveram suas estruturas completamente descritas (FILAFERRO et al., 2022). Normalmente, as antocianinas são caracterizadas pelo núcleo básico flavílium (cátion 2-fenilbenzopirílio). A identidade desses compostos é assumida mediante ao arranjo estrutural, posição, natureza do açúcar ligado, variedade dos ácidos aromáticos ou alifáticos e ao número de grupos de hidroxila de metoxila presentes no esqueleto da aglicona (DANGLES e FENGER, 2018).

No entanto, apenas seis tipos delas são comumente encontrados na natureza: cianidina, delphinidina, pelargonidina, peonidina, petunidina e malvidina, cujas estruturas podem variar em substituição nas posições 3' e 5' (DANGLES e FENGER, 2018).

Quimicamente, as antocianinas podem ser definidas como heterosídeos de uma unidade aglicona (antocianidinas) ligadas a glicosídeos. Estas moléculas têm pesos entre 400 e 1200 (biomoléculas de tamanho médio) (TENA, MARTÍN e ASUERO, 2020). Suas estruturas são compostas por dois anéis aromáticos (A e B) ligados por três carbonos em um heterociclo oxigenado (C), Figura 2 (a).

As diferenças entre as antocianinas individuais estão relacionadas ao número de grupos funcionais, como as hidroxilas (OH) e metoxilas (-OCH<sub>3</sub>) ligadas ao anel aromático B, à natureza, ao número e posição dos açúcares ligados à molécula, bem como, à presença de ácidos alifáticos ou aromáticos ligados a esses açúcares (TENA, MARTÍN e ASUERO, 2020; FILAFERRO et al., 2022). A presença do oxigênio livre, resulta na elevada instabilidade destes pigmentos. Tanto a glicosilação quanto a acilação podem aumentar a estabilidade da antocianina (WU et al., 2017).

Outro fator importante na reatividade das antocianinas e sua atividade antioxidante é o pH. A natureza ácida se deve à conjugação das ligações duplas nos anéis

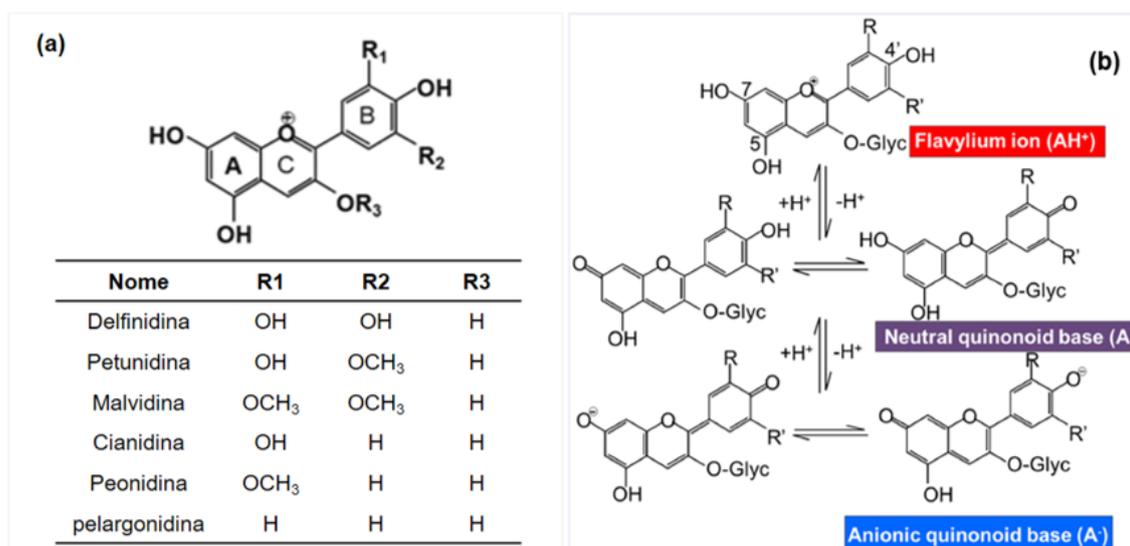
da estrutura principal e dos grupos hidroxila em C4', C5 e C7, respectivamente. O grupo hidroxila em C7 é o ácido mais forte. A desprotonação pode ser produzida em pH ácido  $\sim 4$  produzindo uma base quinonóide neutra estabilizada por tautomerização com o grupo hidroxila em C5 (TENA, MARTÍN e ASUERO, 2020; DANGLES e FENGER, 2018).

O grupo hidroxila em C4 também é suscetível a ser desprotonado em pH mais alto  $\sim 7$  produzindo a base aniônica. Se o nível de pH ainda estiver subindo para pH básico, superior a 8, a desprotonação é produzida no C5 produzindo a base dianiônica que pode levar ao ânion chalcona. Desta forma, o pH da solução controla as proporções de forma hidratada e isomérica protonada e desprotonada da antocianina, afetando sua reatividade Figura 2 (b) (TENA, MARTÍN e ASUERO, 2020).

Essas formas de antocianinas quando se conjugam com açúcares e ácidos orgânicos constituem uma variedade de antocianinas de cores diferentes. Suas cores podem variar desde a extremidade azul do espectro UV/Visível, quando o anel B possui mais grupos hidroxila, até a extremidade vermelha do espectro UV/Visível, quando o anel B possui mais grupos metoxila (TENA, MARTÍN e ASUERO, 2020).

Em solução aquosa são frequentemente encontradas na forma de uma mistura de equilíbrio: cátion flavílium (vermelho), base anidra quinoidal (azul), pseudo-base carbitol (incolor), e chalcona (incolor ou levemente amarela) (DANGLES e FENGER, 2018).

Figura 2 — (a) Estrutura das antocianinas; (b) Efeito do pH na estrutura e cor das antocianinas



Fonte: Tena, Martín e Asuero, (2020).

As antocianinas estão entre os principais compostos relacionados à grande capacidade de eliminação de radicais livres. Estudos em células, modelos animais e ensaios clínicos sugerem que as antocianinas oferecem benefícios à saúde em diferentes tipos de patologias, incluindo saúde ocular (NOMI, IWASAKI-KURASHIGE e MATSUMOTO, 2019), doenças cardiovasculares (CASSIDY et al., 2016; DONG et al., 2022), estão associadas à atividade antidiabetes e antiobesidade (LEE et al., 2022), atividades anticancerígenas, (WU et al., 2022), distúrbios neurodegenerativos (FILAFERRO et al., 2022; KIM et al., 2017). Além de apresentarem potencial antimicrobiano (GARCIA et al., 2019) e fúngico (CORRÊA et al., 2019). Tais propriedades terapêuticas são atribuídas principalmente às suas fortes propriedades antioxidantes (DANGLES e FENGER, 2018; TENA, MARTÍN e ASUERO, 2020; FILAFERRO et al., 2022).

As fontes naturais de compostos antociânicos incluem todos os tipos de frutas, vegetais, bagas, folhosas, grãos e raízes, normalmente de coloração escura nos tons avermelhados, roxos e preto. Além disso, a presença de antocianinas pode ser detectada em diferentes partes da planta, como caule, folhas e órgãos de armazenamento (FILAFERRO et al., 2022).

O método de extração e as condições em que a extração ocorre são fatores importantes e irão influenciar diretamente no rendimento dos compostos e qualidade dos extratos (HESSEL et al., 2022).

A Tabela 1 apresenta alguns estudos onde é possível verificar diferentes tecnologias empregadas e o efeito de alguns parâmetros de extração como a temperatura, vazão, potência e amplitude. Os quais, irão mudar conforme o método de extração, solvente empregado e a matriz fonte de obtenção.

Também é possível visualizar que diferentes tipos de antocianinas podem ser obtidos para diferentes matérias-primas, o que amplia as possibilidades de estudo acerca da identificação, quantificação e aplicação desses compostos tão intrigantes.

Tabela 1 — Condições de extração de antocianina

Solvente	Matéria-prima	Método de extração	Rendimento	Antocianina majoritária	Referencia
NADES 2:1 Cloreto de colina: ácido cítrico	Bagaço de uva	MAE (T = 80 °C; t = 10 min; P = 300 W)	1,77 (mg. dw <sup>-1</sup> )	Malvidina-3-O- monoglicosídeo	Panić et al., (2019)
Etanol com ácido cítrico (30:70 v/v)	Cascas de feijão Preto	PLE (T = 60 °C; t = 26 min; vazão de 4 mL/min)	4,83 (mg. C3GE g <sup>-1</sup> )	Delfinidina-3- glicosídeo	Teixeira et al., (2021)
DES de 47 % 1:2M (ChCl:Pro e ChCl:Ma)	Resíduos de jabuticaba	PLE (T = 90 °C; t = 12 min; vazão = 5,3 mL/min)	1,70 (mg C3GE/g dw)	Cianidina-3-O- glicosídeo	Benvenuti, Zielinski e Ferreira, (2022)
Cloreto de colina-ácido cítrico (1:1 mol/mol)	Cenouras pretas	UAE (A = 80 %; T = 30 °C; t = 20 min)	16,84 (mg.100 g <sup>-1</sup> )	Cianidina-3-O- glicosídeo	Türker e Doğan, (2022)
Metanol com ácido clorídrico (95:5 v/v)	Cereja doce	UAE (T = 25 °C; t = 1 h)	167,70 (mg Cy-gluE. g <sup>-1</sup> )	Cianidina-3-O- rutinosídeo	Filaferro et al., (2022)
Metanol:água (80:20 v/v)	Mirtilo	UAE (T = 15 °C; t = 30 min)	84,90 (mg. 100 g <sup>-1</sup> )	Malvidina-3-glicosídeo	Singh et al., (2022)
etanol-água (1:1)	Repolho Roxo	MAE (T = 40°C; t = 9,95 min; P = 442,42 W)	241,20 (mg C3GE. L <sup>-1</sup> )	Cianidina-3- diglicosídeo-5- glicosídeo	Yiğit et al., (2022)

PLE: extração com líquido pressurizado, UAE: extração assistida por ultrassom, MAE: extração assistida por micro-ondas.

Fonte: Autor, 2022.

### **1.4.1 Antocianinas do Repolho Roxo**

Dentre as fontes naturais de obtenção de antocianinas o repolho roxo (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra* apr), apresenta um perfil complexo de antocianinas, derivadas principalmente das cianidinas glicosiladas as quais podem ser mono ou di-aciladas com ácidos hidroxicinâmicos (WICZKOWSKI, SZAWARA-NOWAK e TOPOLSKA, 2013; MANSOUR et al., 2021). Conforme relatado por Patras, (2019) o repolho roxo apresenta composição majoritária de cianidina-3-diglicosídeo-5-glicosídeo altamente conjugado com açúcares (glicose e xilose) e grupos acil (cafeoil, p-cumaroil, feruloil, p-hidroxibenzoil, sinapoil e oxaloil).

As antocianinas aciladas possuem propriedades de fotoestabilidade e térmica melhoradas e podem ter maior capacidade antioxidante (WICZKOWSKI, SZAWARA-NOWAK e TOPOLSKA, 2013; MANSOUR et al., 2021). As propriedades únicas das antocianinas aciladas sugerem múltiplas aplicações comerciais. Ainda, ostentam uma composição bastante complexa com propriedades únicas, exibindo um amplo espectro de cores o qual é dependente do pH, fator este que despontam múltiplas aplicações comerciais (CHARRON et al.,2007; MANSOUR, MOUSTAFA E ABDELKHALIK, 2021 e WICZKOWSKI, SZAWARA-NOWAK e TOPOLSKA, 2013).

Além disso, os extratos de antocianinas do repolho roxo têm demonstrado atividades, antioxidantes (PATRAS et al., 2019; MACHADO et al., 2022), anti-inflamatórias e anticancerígenas (NEVES, SILVA, MEIRELES, 2019) em diversos modelos experimentais.

## **1.5 APLICAÇÃO DAS ANTOCIANINAS COMO CORANTES NATURAIS**

As antocianinas são pigmentos naturais que pode apresentar uma grande diversidade de cores e são classificadas como não tóxicas e podem ser utilizadas sem limitação quanto à quantidade em produtos alimentícios (TENA, MARTÍN, e ASUERO, 2020).

Esses pigmentos podem ser incorporados na indústria alimentícia alternativamente ao uso de corantes sintéticos. Além disso, as antocianinas podem exercer uma ampla variedade de atividades biológicas, o que desperta o grande interesse por esses compostos (FERNANDES et al., 2018).

Dentre as inúmeras possibilidades de utilização dos extratos de antocianinas em alimentos, alguns estudos como o de Patras, (2019) destacam que os extratos de antocianinas

oriundos do repolho roxo, aplicados como corante apresentam boa estabilidade de cor durante o armazenamento refrigerado tanto em misturas de bebidas secas quanto reconstituídas apresentando maior estabilidade ao armazenamento. Zimbru, Pădureț e Amariei, (2020), investigando a utilização dos extratos de antocianinas obtidas de frutos silvestres aplicados em produtos de confeitaria tipo marshmallow e evidenciaram excelentes aspectos de pigmentação do corante na formulação. Horincar et al., (2020) estudando a adição de compostos bioativos microencapsulados obtidos da casca de berinjela, observaram que houve melhora nos parâmetros de textura, sendo verificado a redução da firmeza da amostra de confeito de cobertura quando comparada ao corante sintético. Backes et al., (2020) investigando a aplicação de extratos de *Ficus carica L.* e *Prunus spinosa L.* como corantes alimentares à base de antocianinas em soluções de glacê e doces do tipo beijinhos destacou que além do efeito corante houve aumento quanto a maciez e mastigabilidade.

No entanto, o desenvolvimento de produtos com corantes naturais ainda é um grande desafio, visto que muitos destes compostos são degradados durante o processamento e armazenamento de alimentos devido à sua instabilidade química, sensibilidade à luz, oxigênio, condições de pH e à altas temperaturas (SIGURDSON, TANG, e GIUSTI, 2017; DANGLES e FENGER, 2018).

Desta forma, a indústria de alimentos busca alternativas para melhorar a estabilidade das antocianinas, para ampliar sua aplicação. Neste sentido, o aumento da estabilidade estrutural desses compostos é uma estratégia. Para tanto, o emprego de tecnologias que preservem a qualidade do extrato, como a crioconcentração e a microencapsulação, permitem que a cor das antocianinas possa ser estabilizada e fortalecida (MACHADO et al., 2022).

### **1.5.1 Microencapsulação de Compostos Bioativos**

A microencapsulação é uma técnica utilizada para revestir o material do núcleo com uma membrana, consiste em proteger os compostos através de uma fina camada protetora protegendo-a contra fatores extrínsecos o que viabiliza a aplicação em âmbito industrial (MACHADO et al., 2022). Sakulnarmrat, Wongsrikaew e Konczak (2021), ressalta que a microencapsulação de compostos naturais, além de promover a proteção aos extratos contra a oxidação, permite maior eficiência na solubilização, favorece a incorporação em sistemas alimentícios e promove maior durabilidade.

As técnicas de microencapsulação podem ser físicas como secagem por atomização, liofilização, precipitação com fluido supercrítico e evaporação de solvente, bem como físico-químicas, como a coacervação, lipossomas e geleificação iônica (TYAGI et al., 2011). Dentre esses métodos, a atomização em *spray-dryer* é um processo amplamente utilizado em diferentes setores da indústria e constitui uma tecnologia de grande relevância no processamento de alimentos desidratados, pois apresenta eficiência na microencapsulação e boa formação morfológica das microcápsulas (FERRO, MÜLLER e FERREIRA, 2020).

No entanto, apesar das vantagens atribuídas ao *spray-dry*, como já mencionado no tópico (1.1.2), os constituintes minerais presentes no soro de leite ácido dificultam a pulverização, uma vez que a maior parte da lactose é convertida em sua estrutura cristalina e o alto teor de fosfato de cálcio causa incrustação e danos nos equipamentos (BYLUND, 2015). Para melhor performance do processo, recomenda-se a concentração dos extratos, conforme relatado na sessão (1.3.3), a tecnologia de crioconcentração em blocos assistida por centrifugação é uma tecnologia emergente baseada no congelamento-descongelamento rápido (DE LIZ et al., 2020). A qual demonstra excelentes resultados, sendo capaz de preservar os compostos termolábeis pois minimiza os efeitos adversos promovido pelo emprego do calor (PETZOLD et al., 2016). A partir do extrato concentrado, a estabilização promovida por agentes encapsulantes é uma alternativa de fácil implementação e baixo custo. Dentre os polímeros utilizados a maltodextrina apresenta vantagens associadas ao baixo custo e facilidade operacional, além de demonstrar efetividade na preservação de compostos fenólicos, sendo amplamente utilizada para a obtenção de pós os quais podem ser produzidos pela remoção do meio de dispersão através da evaporação, congelamento ou resfriamento rápido (FERRO, MÜLLER e FERREIRA, 2020).

Desta forma, seguindo um processo integrado a baixas temperaturas, para a secagem de compostos bioativos o ideal seria realizar o emprego da liofilização. A liofilização é uma técnica valiosa para a secagem de materiais sensíveis a altas temperaturas, o qual proporciona produtos de qualidade superior aos pulverizados, pois opera sem oxigênio em temperaturas positivas (RÓŻYŁO, 2020). Alguns estudos com os de Souza, Gurak e Marczak, (2017), avaliaram o comportamento de maltodextrina, pectina e isolado de proteína de soja como carreadores na encapsulação de extrato rico em antocianinas de bagaço de jabuticaba obtido por liofilização e identificaram que a maltodextrina foi o melhor agente carreador na proteção das antocianinas com tempo de meia-vida de 226 dias e maior solubilidade. Estupiñan, Schwartz e

Garzón, (2011), concluíram que a adição de maltodextrina (DE:20) como agente carreador durante a liofilização de antocianinas atribui melhor estabilidade de cor de bebidas modelo isotônicas coloridas com Andes Berry, apresentando tempo de meia-vida 32 dias.

Assim, a microencapsulação de antocianinas torna-se uma alternativa para melhorar a estabilidade, protegendo esses compostos com auxílio de agentes encapsulantes e ampliando sua aplicabilidade. A microencapsulação de corantes naturais não só os protege contra a oxidação, mas também proporciona uma extensão de sua vida útil. Além disso, permite uma solubilização mais eficiente favorecendo sua incorporação em sistemas alimentares (HORINCAR et al., 2020).

## **1.6 CONCLUSÃO**

Os compostos bioativos em especial as antocianinas, apresentam diversos benefícios à saúde humana, além de funções tecnológicas, as quais irão variar conforme a fonte de obtenção, solvente e método de extração. Algumas tecnologias consideradas limpas como a extração assistida por ultrassom, tecnologias de fluidos de alta pressão e a crioc Concentração, têm sido empregadas com sucesso para recuperação e concentração desses compostos.

No entanto, associado a essas tecnologias se faz necessária a adoção de solventes que apresentem potencial verde, como alternativas aos solventes petroquímicos.

A proposta do soro de leite ácido como solvente é de fácil implementação, visto que o efluente fornecido pela indústria não carece de tratamentos prévios para futura utilização e também apresentam baixa volatilidade. Além disso, o soro ácido oferece custo acessível e a possibilidade de reutilização. Podendo ser um solvente promissor, abrindo caminho para a extração de antocianinas e outros compostos, sendo empregado para outras matrizes vegetais, difundindo sua aplicabilidade.

## **CAPITULO 2**

### **Extração de Antocianinas de Folhas Residuais de Repolho Roxo com o Solvente Soro Ácido: Um Estudo Comparativo entre Métodos Emergentes e Tradicionais**

## 2.1 INTRODUÇÃO

O aumento substancial de resíduos gerados pela indústria alimentícia é um dos desafios enfrentados pela sociedade, e vem sendo considerado um dos fatores cruciais para o desenvolvimento sustentável e econômico dos países. Com a valorização dos resíduos, os recursos são utilizados, recuperados e renovados, o que agrega valor ao processo, contrapondo os padrões de produção lineares (SARKAR et al., 2022).

Dentre os 17 “Objetivos para o Desenvolvimento Sustentável” (ODS) propostos pela ONU em 2015, pode-se destacar, em especial, consumo e produção sustentável (ODS12). Este objetivo demonstra uma imperiosa necessidade da valorização dos resíduos agroindustriais para a obtenção de diferentes produtos de interesse comercial (CHEN et al., 2020). A implementação desses conceitos se instaura em uma ampla gama de processos industriais, assim como também na extração de produtos naturais os quais serão posteriormente utilizados como ingredientes, suplementos alimentares e compostos bioativos (GIL-MARTÍN et al., 2022).

Muitos compostos valiosos dos quais exibem propriedades bioativas e são capazes de impactar positivamente na saúde humana podem ser obtidos através de resíduos agroindustriais. Portanto, as vias para a obtenção e valorização dessas matérias-primas devem ter seu potencial explorados. Neste sentido, os métodos PLE e UAE (já revisadas no Capítulo 1) estão sendo amplamente utilizados para a extração de compostos de produtos naturais. Estas duas tecnologias emergentes apresentam várias vantagens em relação aos métodos tradicionais de extração, tais como: menor tempo e elevado rendimento de extração. São métodos de simples de operação e apresentam baixo consumo de solventes (CHEMAT et al., 2019).

Tradicionalmente, o processamento do soro ácido resíduo proveniente dos laticínios é destinado para alimentação animal e estações de tratamento de efluentes e em alguns casos em empresas de maior capital se emprega a digestão anaeróbica, para produção de hidrogênio e metano e produções biotecnológicas, como etanol, ácidos orgânicos, enzimas e proteínas unicelulares (GUIMARÃES, TEIXEIRA e DOMINGUES, 2010). Entretanto, esse processo apresenta custos elevados, o que cria a demanda por alternativas totalmente verdes e economicamente sustentáveis para o tratamento e valorização deste material.

O soro de leite ácido, apresenta acidez elevada pelo alto teor de ácidos orgânicos, é considerado uma matéria-prima renovável, com baixa volatilidade e custo acessível.

Associado a isto, as abordagens verdes de extração aliadas a matrizes naturais prolíficas, podem resultar em produtos de interesse industrial (TORRES et al, 2022).

Dentre as fontes de pigmentos naturais, o repolho roxo (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* F. *rubra*), uma hortaliça frequentemente consumida e cultivada em todo o mundo, tem se destacado. O vegetal é rico em antocianinas, pigmentos que podem ser utilizadas como corantes em diversos produtos alimentícios. Além disso, o repolho é de fácil cultivo e relativamente acessível (PRATAS, 2019; NEVES, SILVA, MEIRELES, 2019). Corantes obtidos do repolho roxo já demonstraram boa estabilidade de cor durante o armazenamento refrigerado tanto em misturas de bebidas secas quanto reconstituídas, assim como maior estabilidade ao armazenamento e ao calor quando comparados a pigmentos extraídos de uvas ou arando (PATRAS et al., 2019; MACHADO et al. 2022).

As antocianinas são pigmentos vermelho-azulados que podem funcionar como indicadores de pH. Por este motivo, extratos de antocianinas de repolho roxo podem produzir uma ampla gama de cores induzidas por pH, o que é interessante e desafiador para a indústria.

Considerando o exposto, o objetivo desta etapa do estudo foi investigar o potencial do soro de leite ácido como solvente para a extração de antocianinas de folhas residuais de repolho roxo utilizando tecnologias limpas.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

As etapas de tratamento do solvente, preparo e tratamento da matriz vegetal, extração e caracterização química dos extratos obtidos foram realizadas no Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica (LATESC), em parceria com o Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Campus de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. Já a quantificação de antocianinas dos extratos e a investigação de suas potencialidades biológicas por métodos baseados em células foram análises feitas em parceria com o Centro de Investigação de Montanha (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança, *Campus* de Santa Apolónia, Bragança, Portugal.

### 2.2.1 Obtenção e tratamento do soro de leite ácido

O soro de leite ácido, proveniente da produção de queijos, foi gentilmente fornecido pelo laticínio Holandês (Biguaçu – SC). Para o desenvolvimento do projeto. Após a coleta, o soro foi encaminhado para as etapas de pasteurização, filtragem e caracterização (Figura 3). O material foi caracterizado quanto aos parâmetros pH, umidade, proteínas, cinzas, lipídios, sólidos solúveis e carboidratos totais.

Figura 3 — Soro de leite ácido



Fonte: Autor, (2022).

As análises físico-químicas foram realizadas de acordo com as metodologias da AOAC (2005). O teor de umidade foi determinado em estufa de circulação de ar a 105 °C até peso constante. A quantidade de nitrogênio foi definida pelo método de Kjeldahl, com fator de conversão para proteínas de 6,25. O conteúdo de cinzas foi estabelecido após calcinação em

mufla à 550 °C. A fração de lipídios foi determinado pelo Método de Soxhlet, utilizando como solvente o hexano, o conteúdo de sólidos solúveis totais foi quantificado através de refratômetro digital e expresso em °Brix, e por fim os teores de carboidratos totais foram estimados por diferença.

### 2.2.2 Preparo e tratamento das folhas de repolho roxo

As folhas residuais do repolho roxo foram oriundas da etapa de “polimento das hortaliças”, a qual comumente é feita após a colheita e antes da comercialização (Figura 4). O material, doado por produtores e comerciantes locais da região de Santa Catarina, passou por seleção e foi sanitizado e seco em estufa de circulação de ar a 60 °C. Após a secagem, as folhas foram moídas em moinho de facas (Marconi, Modelo MA340, SP, Brasil) e então peneiradas para padronizar o tamanho das partículas (entre 20 e 48 mesh). O teor de umidade da farinha obtida foi determinado em estufa de circulação de ar a 105 °C até peso constante.

Figura 4 — Folhas residuais de Repolho Roxo e preparado da farinha



Fonte: Autor, 2022.

### 2.2.3 Preparo dos Solventes

Para a extração de antocianinas das folhas residuais de repolho roxo, a utilização do Soro de Leite Ácido foi comparada com o uso de etanol acidificado com ácido cítrico, o qual é um solvente comumente utilizado para recuperação de antocianinas. O solvente etanol foi acidificado com ácido cítrico na proporção de (0,1 mol.L<sup>-1</sup> C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> em etanol 70:30 (v/v)) e apresentou um pH 1,5. Ao soro de Leite ácido, após as etapas de pasteurização, filtragem citadas

no tópico (2.2.1), foi realizado a correção do pH do produto de 5,2 para 4,5, via adição de ácido láctico, com intuito de padronizar esse solvente com o pH corriqueiramente encontrado para esse efluente na indústria láctea.

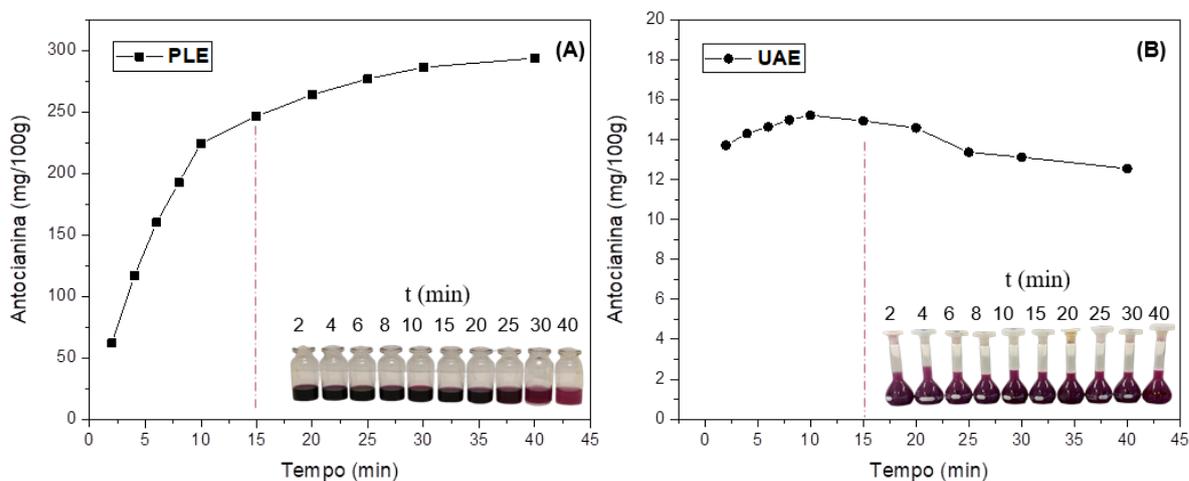
## 2.2.4 Extração dos compostos bioativos das folhas de repolho roxo

### 2.2.4.1 Cinética de extração

O tempo de extração foi determinado por uma cinética baseado no rendimento de antocianinas (mg/100g), os ensaios cinéticos foram conduzidos empregando as técnicas de extração assistida por ultrassom (UAE) e extração com líquido pressurizado (PLE) em temperatura de 60 °C utilizando o solvente convencional etanol foi acidificado com ácido cítrico na proporção de (0,1 mol.L<sup>-1</sup> C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> em etanol 70:30 (v/v)), vazão 3 mL/min para o método PLE Figura 5 (A) e Amplitude de 40 % para o método assistido por ultrassom Figura 5 (B).

Através desses estudos foi possível determinar o tempo de extração de 15 minutos para ambos os métodos, conforme indicado na Figura 5 (A e B).

Figura 5 — Cinética de extração para os métodos PLE e UAE



PLE: extração com líquido pressurizado, UAE: extração assistida por ultrassom; t: tempo de extração  
 Fonte: Autor, (2022).

### 2.2.4.2 Parâmetros de Processos

As extrações foram realizadas conforme indicado pela Tabela 2. Os parâmetros foram pré-estabelecidos com base em testes iniciais e estudos como o de Teixeira et al., (2021) e Benvenuti, Zielinski e Ferreira, (2022), com algumas modificações. A partir de testes prévios,

o tempo de extração estabelecido foi de 15 minutos para os três métodos investigados. Os extratos obtidos nesta etapa foram coletados e posteriormente avaliados, sendo identificados conforme o tipo de solvente extrator: extrato soro de leite ácido (SA) e extrato etanol acidificado (EA).

Tabela 2 — Parâmetros de processos utilizados para a extração com diferentes métodos

<b>Métodos de extração</b>	<b>Razão soluto/solvente (m/v)</b>	<b>Temperatura °C</b>	<b>Amplitude %</b>	<b>Vazão (mL/min)</b>	<b>Pressão (bar)</b>
<b>EAA</b>	1:20	80	-	-	-
<b>UAE</b>	1:20	80	40	-	-
<b>PLE</b>	1:10	80	-	3	100

EAA: extração por agitação e aquecimento, UAE: extração assistida por ultrassom e PLE: extração com líquido pressurizado.

Fonte: Autor, (2022).

#### 2.2.4.3 Extração por agitação e aquecimento (EAA)

A extração foi realizada em banho termostático (Microquímica, MQBTC99-20, Palhoça, Brasil), sob uma temperatura controlada de 80 °C, e proporção amostra-solvente de 1:20 (m/v). Em um frasco erlenmeyer, 1,0 g da farinha de repolho roxo foi solubilizada em 20 mL de solvente soro de leite ácido. Então, o frasco foi coberto com papel alumínio e aquecido (Figura 6) durante 15 min, tempo definido pela cinética de extração.

O mesmo processo e condições foram utilizados para o solvente convencional etanol:acidificado. Os extratos obtidos nessa etapa foram coletados e posteriormente avaliados.

Figura 6 — Extração por agitação e aquecimento: (a) Amostras em banho termostático e (b) equipamento



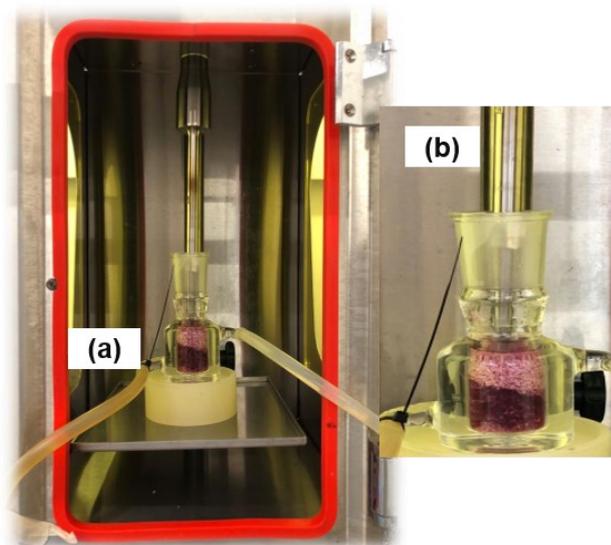
Fonte: Autor, (2022).

#### 2.2.4.4 Extração assistida por ultrassom (UAE)

Para a extração sólido-líquido assistida por ultrassom, 1,0 g da farinha do repolho roxo foi adicionada em 20 mL de solvente soro de leite ácido, razão amostra-solvente de 1:20 (m/v). Em seguida, a amostra foi transferida para a célula de extração em um equipamento ultrassônico (Ultronique QR 500, Ecosonics, Indaiatuba, Brasil). Uma sonda de titânio de 4 mm de diâmetro foi inserida na amostra, a 3 cm da superfície, como meio de transmissão de ondas a 40 % de amplitude conforme apresentado na Figura 7 (a) e (b).

A temperatura foi controlada com o auxílio de um banho térmico acoplado a célula de extração durante todo o experimento. Os parâmetros de tempo (min) e temperatura (°C) foram fixados em 15 e 80, respectivamente. Repetiu-se o processo sob as mesmas condições empregando o solvente convencional etanol acidificado. Os extratos obtidos nessa etapa foram coletados e posteriormente avaliados.

Figura 7 — Extração assistido por ultrassom: (a) célula de extração e (b) sonda de sonicação

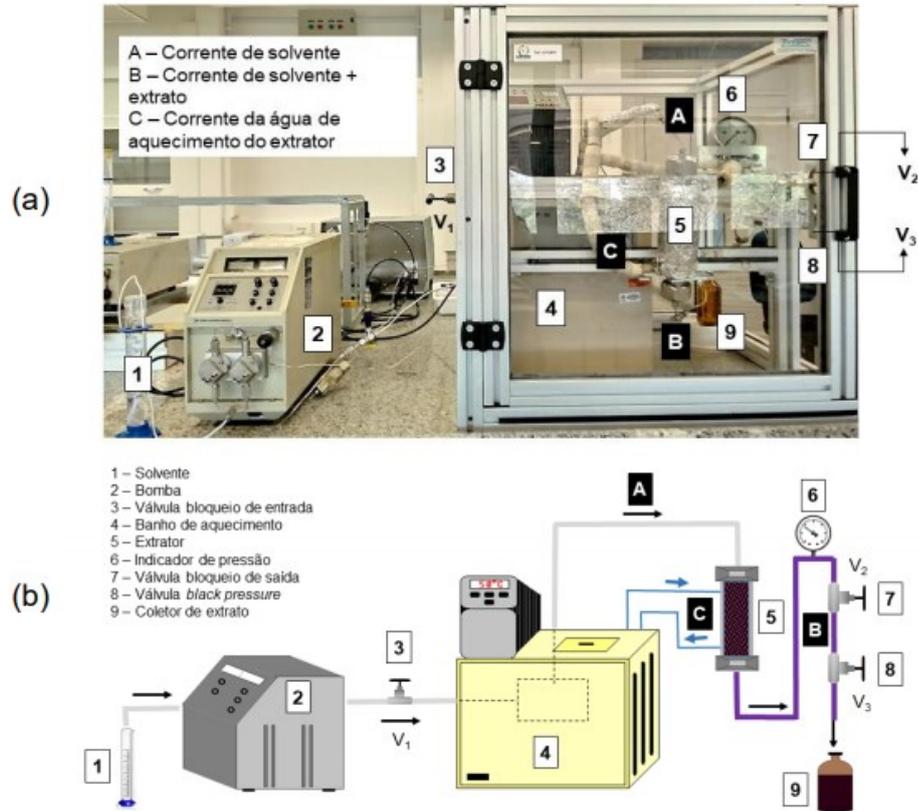


Fonte: Autor (2022).

#### 2.2.4.5 Extração com líquido pressurizado (PLE)

A extração com líquidos pressurizado (PLE) foi investigado sob pressão constante de (100 bar), vazão do solvente soro de leite ácido (3 mL/min) e temperatura de (80 °C). O tempo de extração foi determinado experimentalmente através da cinética de extração, totalizando 15 minutos. Os experimentos de extração foram realizados em modo dinâmico. Para os ensaios, 5 g de farinha de repolho roxo e 45 g de esferas de vidro foram homogeneizadas de modo a evitar que houvesse a formação de caminhos preferenciais. Os ensaios foram realizados em uma unidade de extração *homemade* (Figura 8), desenvolvida no Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica (LATESC/UFSC) (ANDRADE; TRIVELLIN; FERREIRA, 2017). O processo foi repetido sob as mesmas condições com o solvente convencional etanol acidificado. Os extratos foram coletados e posteriormente avaliados.

Figura 8 — Extração por Líquido Pressurizado: (a) Unidade de Extração *homemade* do LATESC/UFSC e (b) representação esquemática do módulo PLE



Fonte: Teixeira et al., (2021).

## 2.2.5 Caracterização dos extratos

A composição química dos extratos foi determinada através da quantificação de compostos fenólicos totais, antocianinas monoméricas totais e cor polimérica.

### 2.2.5.1 Determinação do teor de compostos fenólicos totais (CFT)

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado por análise colorimétrica utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, como descrito por Singleton e Rossi (1965). Em tubos eppendorf, 480  $\mu\text{L}$  de água destilada, 30  $\mu\text{L}$  de amostra diluída e 30  $\mu\text{L}$  de reagente de Folin-Ciocalteu foram adicionados. Após três minutos, 60  $\mu\text{L}$  de carbonato de sódio solução saturada a 20 %, foi acrescido a cada tubo, o qual foi agitado em vórtex. Os tubos foram então armazenados em ambiente escuro por 60 min, após uma hora, cerca de 300  $\mu\text{L}$  do conteúdo dos

tubos foram transferidos para as microplacas e realizado a leitura de absorvância no comprimento de onda de 720 nm, usando uma leitora de microplacas (Infinite M200, TECAN).

A leitura foi então comparada com uma curva de calibração de ácido gálico (CFT =  $0,0025x + 0,0116$ ;  $R^2 = 0,9926$ ) e os resultados expressos como miligramas de equivalentes de ácido gálico (EAG) por quilograma de amostra (g EAG/100g das folhas de repolho roxo).

#### 2.2.5.2 Determinação das antocianinas monoméricas totais (AMT) e porcentagem de cor polimérica

As antocianinas monoméricas totais, densidade da cor e cor polimérica foram determinadas pelo método de diferença de pH com algumas adaptações (GIUSTI; WROLSTAD, 2001). Primeiramente, duas soluções foram preparadas: uma solução tampão a pH 1,0 (0,025 mol/L de tampão cloreto de potássio, acidificado com HCl) e outro tampão pH 4,5 (0,4 mol/L de tampão acetato de sódio, acidificado com HCl). Então, 30  $\mu$ L do extrato foram transferidos para microplacas e 270  $\mu$ L do tampão correspondente (pH 1,0 e pH 4,5) foi adicionado e deixado equilibrar por 30 minutos. A absorvância foi medida a 520 e 700 nm, utilizando uma leitora de placas (Infinite M200, TECAN).

O cálculo das antocianinas monoméricas totais foi expresso em mg equivalente de cianidina-3-*O*-glicosídeo de acordo com a Equação 1.

$$AMT = \frac{(Abs*PM*FD*10^3)}{\epsilon * l} \quad (1)$$

Onde:

Abs = [(Abs 520 nm – Abs 700 nm) pH 1,0] – [(Abs 520 nm – Abs 700 nm) pH 4,5];

PM = peso molecular: 449,2 g.mol<sup>-1</sup> para cianidina-3-glicosídeo;

FD = fator de diluição estabelecido: 15;

l = tamanho do caminho que a luz percorre (espessura da cubeta) em cm;

10<sup>3</sup> = fator de conversão de g para mg e;

$\epsilon$  = coeficiente de extinção molar: 2690 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> para cianidina-3-glicosídeo.

Na determinação da densidade de cor e cor polimétrica, os extratos foram previamente diluídos com o auxílio da solução tampão de cloreto de potássio pH 1,0. Para a reação, 280  $\mu$ L de amostra foi acrescida de 20  $\mu$ L de solução de metabissulfito (0,9M) (fração branqueada), enquanto o controle foi preparado com 280  $\mu$ L de amostra e 20  $\mu$ L de água destilada. Após 30

min em repouso, a absorvância foi medida nos comprimentos de onda de 420, 520 e 700 nm, utilizando uma multileitora (Infinite M200, TECAN).

A densidade da cor da fração controle (DC), cor polimérica da fração branqueada (PC) e a porcentagem de cor polimérica foram calculadas através das equações 2, 3 e 4 respectivamente. Onde: DF é o fator de diluição utilizado.

$$DC = [(Abs_{420nm} - Abs_{700nm}) + (Abs_{520nm} - Abs_{700nm})] * DF \quad (2)$$

$$PC = [(Abs_{420nm} - Abs_{700nm}) + (Abs_{520nm} - Abs_{700nm})] * DF \quad (3)$$

$$\% \text{ Cor polimérica} = \left( \frac{PC}{DC} \right) * 100 \quad (4)$$

## 2.2.6 Avaliação do potencial antioxidante dos extratos

Para a avaliação da atividade antioxidante do extrato da casca do repolho roxo, cinco métodos foram empregados sendo: dois métodos baseados em células (i) inibição da hemólise oxidativa (OxHLIA); (ii) inibição da produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); além de três ensaios químicos tradicionais, (iii) redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH); (iv) redução do cátion 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS) e (v) poder de redução do íon férrico (FRAP).

### 2.2.6.1 Capacidade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP

A habilidade dos extratos na eliminação de radicais livres foi determinada com o ensaio de DPPH de acordo com o método de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), com pequenas adaptações. As amostras do extrato diluídas (50 µL) foram pipetadas em microplacas, em seguida adicionou-se 250 µL de uma solução metanólica de DPPH (300 µmol/L). A absorvância foi medida no comprimento de onda de 515 nm usando um leitor de microplacas (Infinite M200, TECAN). Após a solução ser deixada em repouso no escuro até a estabilização em 30 minutos. A porcentagem de inibição foi determinada através da equação 6. A absorvância obtida foi comparada com uma curva de calibração de Trolox ( $DPPH = 0,1378x - 6,83$ ;  $R^2 = 0,9953$ ) e os resultados foram expressos em µmol de equivalente de trolox (ET) (µmol ET/100g da casca de repolho roxo seca).

$$\text{Atividade antioxidante (\% inibição)} = \left[ 1 - \left( \frac{Abs \text{ amostra } 517 \text{ nm}}{Abs \text{ branco } 517 \text{ nm}} \right) \right] * 100 \quad (6)$$

O método de captura do Radical Livre ABTS foi realizado segundo Re et al., (1999), com pequenas modificações. Primeiramente, foram preparadas as soluções stock de ABTS (7 mmol/L) e persulfato de potássio (2,45 mmol/L). A solução de trabalho foi preparada pela mistura de 3 mL de cada solução (stock de ABTS e persulfato de potássio) a qual foi deixada reagindo durante 16 h, a temperatura ambiente (25°C), ao abrigo da luz. Então, a solução foi diluída pela mistura de 4,0 mL da solução do radical ABTS<sup>+</sup> para 200 mL de água destilada para obter uma absorbância de 734 nm. As amostras do extrato foram diluídas e alíquotas de 20 µL foram pipetadas em microplaca e acrescidas de 280 µL da solução de ABTS<sup>+</sup>. Após repouso no escuro durante 30 minutos (tempo de estabilização), a absorbância foi medida a 734 nm usando um leitor de microplacas (Infinite M200, TECAN). A absorbância obtida foi comparada com uma curva de calibração de Trolox (ABTS = 0,1125x + 4,9194; R<sup>2</sup> = 0,9896) e os resultados foram expressos em µmol de equivalente de trolox (ET) (µmol ET/100g da casca de repolho roxo seca).

O método de redução do ferro (FRAP) foi realizado como descrito por Benzie e Strain (1996), com modificações. Primeiramente, o reagente de FRAP foi preparado com: 60 mL de solução tampão de acetato de sódio 0,3 M; pH 3,6; 6 mL de solução de TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina) preparada com HCl [40 mM] e 6 mL de solução de cloreto férrico hexahidratado (FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O) em concentração 20 mM (10:1:1). Em microplacas foram adicionados 10 µL da amostras, 290 µL do reagente FRAP. A reação ocorreu em 30 min, em local livre de luz e a leitura foi realizada em absorbância de 593 nm utilizando uma leitora de microplaca (Infinite M200, TECAN). Para a quantificação da capacidade antioxidante, as absorbâncias foram comparadas com uma curva padrão de calibração de Trolox (FRAP = 0,0009x + 0,0083; R<sup>2</sup> = 0,9961) sendo os resultados expressos em µmol de equivalente de trolox (ET) (µmol ET/100g da casca de repolho roxo seca).

#### 2.2.6.2 OxHLIA e TBARS

Para o ensaio OxHLIA, os eritrócitos foram obtidos conforme descrito por Garcia et al., (2019). Em microplaca, 200 µL de eritrócitos em solução PBS foram misturados com 400 µL de extrato (em diferentes diluições). A solução de PBS foi utilizada como controle e para hemólise completa foi utilizada água. As microplacas foram então pré-incubadas a 37 °C por 10 min sob agitação. Os resultados foram expressos em concentração de extrato (µg/mL) necessário para atrasar a hemólise oxidativa de 50 % da população de eritrócitos (IC<sub>50</sub>), para

Δt de 60 min. A densidade óptica foi então medida a 690 nm a cada 10 minutos conforme descrito por Garcia et al., (2019).

A inibição da geração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi estimada conforme relatado por Corrêa et al., (2019). A intensidade da cor do ácido malondialdeído-tiobarbitúrico (MDA-TBA) foi medida a 532 nm. Os resultados foram calculados como taxa de inibição (%) da peroxidação lipídica, de acordo com a Equação 5, e expressos como valores de IC<sub>50</sub>.

$$\% \text{ Inibição} = [(A_{\text{Controle}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{controle}}] * 100 \quad (5)$$

### 2.2.6.3 Atividade anti-inflamatória

A atividade anti-inflamatória foi estimada de acordo com método estabelecido por Corrêa et al. (2015). Inicialmente, os extratos foram dissolvidos em água a 8 mg mL<sup>-1</sup> e, em seguida, outras diluições foram preparadas de 8 mg mL<sup>-1</sup> a 0,125 mg mL<sup>-1</sup>. A linha celular semelhante a macrófagos de camundongo RAW264.7 foi cultivada em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com 10 % de soro fetal bovino inativado pelo calor e glutamina a 37 °C, sob 5 % de CO<sub>2</sub>, em ar umidificado.

Para cada experimento, as células foram destacadas com um raspador de células. Sob a densidade celular experimental (5 × 10<sup>5</sup> células por mL), a proporção de células mortas foi inferior a 1 %, de acordo com os testes de exclusão do corante azul de Trypan. As células foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 150.000 células por poço e deixadas para aderir à placa durante 12 horas. Em seguida, as células foram tratadas com as diferentes concentrações de cada um dos extratos por 1 h. A droga Dexametasona (50 μM) foi usada como controle positivo.

A etapa seguinte foi a estimulação com lipopolissacarídeo LPS (1 μg mL<sup>-1</sup>) por 18 h. O efeito das amostras testadas na ausência de LPS também foi avaliado, a fim de observar se induziam alterações nos níveis basais de NO. Assim, nos controles negativos nenhum LPS foi adicionado. Ambos os extratos e LPS foram dissolvidos em DMEM suplementado. Para a determinação do óxido nítrico, foi utilizado o kit *Griess Reagent System* (Promega), que contém soluções de sulfanilamida, NED e nitrito. Cem microlitros de cada sobrenadante de cultura celular foram transferidos para a placa em duplicata e misturados com soluções de sulfanilamida e NED, por 5 a 10 minutos cada, em temperatura ambiente. O nitrito produzido foi determinado medindo a densidade óptica a 515 nm, em leitor de microplacas, e foi

comparado com a calibração padrão. Os resultados foram expressos em valores de  $GI_{50}$ , concentração da amostra que inibiu 50 % da produção de óxido nítrico.

#### 2.2.6.4 Atividade antiproliferativa

A avaliação da citotoxicidade dos extratos foi feita de acordo com o método estabelecido pelos autores (CORRÊA et al., 2017). Para o ensaio, os extratos ricos em antocianinas foram diluídos em água em diferentes concentrações (400 – 1,5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Quatro linhagens celulares humanas foram usadas: as linhas tumorais AGS (adenocarcinoma gástrico), CaCo2 (adenocarcinoma de cólon), e MCF-7 (adenocarcinoma da mama), além da linha não-tumoral VERO (células do rim de macaco verde africano).

As células utilizadas nos ensaios foram rotineiramente mantidas como culturas de células aderentes em meio RPMI-1640 contendo 10 % de soro fetal bovino inativado pelo calor (FBS) e glutamina 2 mM ou em meio DMEM suplementado com FBS 10 %, glutamina 2 mM, penicilina 100 mg por mL e estreptomicina 100 mg por mL, a 37 °C, em incubadora de ar umidificado contendo 5 % de  $\text{CO}_2$ . Cada linha de células foi plaqueada em uma densidade apropriada [ $1,0 \times 10^4$  células (10.000 células) por poço] em placas de 96 poços e deixadas para anexar por 24 h. As células foram então tratadas por 48 h com diferentes diluições de extrato. Após este período de incubação, as células aderentes foram fixadas pela adição de ácido triacético 10 % frio (100  $\mu\text{L}$ ) e incubadas por 60 min a 4 °C. As placas foram então lavadas com água desionizada e secas.

A solução de sulforodamina B (SRB) (0,1 % em ácido acético a 1 %, 100  $\mu\text{L}$ ) foi então adicionada a cada poço da placa e esta foi incubada por 30 min à temperatura ambiente. O SRB não ligado foi removido por lavagem com ácido acético a 1 %. As placas foram secas ao ar, o SRB ligado foi solubilizado com Tris 10 mM (200  $\mu\text{L}$ , pH 7,4) e a absorbância foi medida a 540 nm no leitor de microplacas mencionado acima. Os resultados foram expressos em valores de  $GI_{50}$ , concentração da amostra que inibiu 50 % do crescimento celular líquido. Para o controle negativo, as células foram cultivadas com o mesmo meio de cultura; entretanto, os volumes dos extratos foram substituídos por água (solvente carreador). A droga Elipticina foi usada como controle positivo.

#### 2.2.6.5 Avaliação do potencial antimicrobiano

A avaliação da atividade antibacteriana foi determinada utilizando o protocolo descrito

por Garcia et al., (2019). Foram avaliadas cinco bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*) e três bactérias Gram-positivas [*Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina (MRSA)].

A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração que inibe o crescimento bacteriano visível, o que é evidenciado pela mudança da coloração de amarelo para rosa. Em caso de viabilidade do microrganismo, foram realizadas microdiluições seguindo a metodologia sugerida por Kuete et al., (2011), com algumas modificações. A concentração bactericida mínima (CBM) também foi determinada nos extratos, sendo a concentração mais baixa que não permitiu desenvolvimento bacteriano, ou seja, a menor concentração necessária para matar a bactéria. Os antibióticos Estreptomicina, Meticilina e Ampicilina foram empregados como controles positivos.

A atividade antifúngica dos extratos contra *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus brasiliensis* foi testada conforme descrito por Corrêa et al., (2015). Os resultados foram expressos em (CIM/CFM, mg/mL). A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada por uma técnica de diluição em série. O extrato foi dissolvido em uma solução de DMSO a 5 % e acrescido ao meio caldo de malte com um inóculo fúngico. As microplacas foram incubadas por 72 horas a 28 °C. A concentração mais baixa sem crescimento visível foi definida como CFM, indicando 99,5 % de morte do inóculo original. A droga Cetoconazol foi utilizada como controle positivo.

### **2.2.7 Identificação e Quantificação dos compostos fenólicos por LC-DAD-ESI/MSn**

O perfil fenólico dos extratos das folhas de repolho roxo foi determinado por LC-DAD-ESI/MSn (Dionex Ultimate 3000 UHPLC, Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA). Os extratos liofilizados foram redissolvidos na concentração de 5 mg/mL com uma mistura etanol: água (40:60, v/v). As antocianinas individuais foram determinadas de acordo com a metodologia descrita por Gonçalves et al., (2017). A detecção foi realizada em DAD (520 nm) e em um espectrômetro de massa Linear Ion Trap LTQ XL (ThermoFinnigan, San Jose, CA, EUA) equipado com uma fonte ESI. Os compostos não antocianínicos foram separados e identificados conforme descrito por Bessada et al., (2016), e a detecção foi realizada em um DAD (280 e 370 nm).

A identificação dos compostos fenólicos (antocianinas e compostos não antociânicos) foi realizada utilizando compostos padrões, comparando seus tempos de retenção, espectros UV-vis e espectros de massa, bem como, comparação das informações obtidas com os dados disponíveis na literatura. Para cada padrão fenólico disponível foi construída com base no sinal UV. Para a quantificação das antocianinas, foi utilizado um padrão de cianidina-3-*O*- glicosídeo ( $y = 134578x - 3000000$ ,  $R^2 = 0,9986$ , limite de detecção = 9,94  $\mu\text{g} / \text{mL}$  e limite de quantificação = 30,13  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ). Para os compostos fenólicos identificados sem uma curva padrão comercial disponível, a quantificação foi realizada através da curva de calibração do padrão disponível mais semelhante.

### **2.2.8 Análises Estatísticas**

A análise de variância (ANOVA) e o Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) foram utilizados para comparação de médias pelo programa *Statistica* v. 13.5 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.3.1 Caracterização do soro de leite ácido

Os resultados referentes à caracterização do soro de leite ácido estão dispostos na Tabela 3. A composição centesimal do soro de leite ácido utilizado nesse estudo apresentou os seguintes valores:  $94,77 \pm 0,3$  % de umidade,  $0,0032 \pm 0,2$  g.L<sup>-1</sup> de resíduo mineral fixo (Cinza),  $0,0020 \pm 0,6$  g.L<sup>-1</sup> de gordura total (Soxhlet) e  $0,0056$  g.L<sup>-1</sup> de proteína (N  $\times$  6,25). Menchik et al., (2019), relataram a composição química do soro de leite ácido proveniente da produção de queijo cottage e esses dados apresentaram teores de umidade (93,8 %) e proteínas semelhantes ( $0,00505$  g. L<sup>-1</sup>), mas maior teor de cinzas ( $0,33$  mg. g<sup>-1</sup>) e menor teor de lipídios (0,01%) do que o presente estudo. A variação nas composições está relacionada principalmente a fatores como a proveniência do leite, tipo de processamento e tratamento térmico aplicado (ROCHA-MENDOZA.et al., 2021).

Quanto ao valor energético, o soro ácido apresentou uma composição predominante de carboidratos totais (5,22 %) e SSC (6,40 °Brix) (Tabela 3). Valores similares foram encontrados por Lievore et al., (2015) (4,90 % e 6,50 °Brix) para o soro ácido, que verificaram que os principais sólidos presentes no biomaterial foram a lactose, galactose e ácidos orgânicos, como os ácidos láctico e cítrico.

O pH do soro de leite utilizado neste trabalho foi de aproximadamente 5,2. Este valor foi superior ao obtido por Bylund, (2015), que reportou pH entre 4,3 e 4,6 para amostras de soro proveniente da produção de queijos. Rocha-Mendoza et al., (2021) encontrou valores mais baixos de pH para soro ácido proveniente de alguns produtos, tais como o iogurte tipo grego (4,21-4,58), queijo tipo cottage (4,35-4,41) e queijo *Petit Suisse* (4,37). Com o intuito de padronizar a acidez no material utilizado como solvente, foi realizada a correção do pH do produto de 5,2 para 4,5, via adição de ácido láctico. A intenção foi mimetizar a acidez corriqueiramente encontrada neste tipo de efluente.

Tabela 3 — Caracterização do soro de leite ácido

Parâmetros analisados	Soro de leite ácido
Umidade (%)	94,77 ± 0,003
Proteínas (g.L <sup>-1</sup> )	0,0056 ± 0,727
Lipídios (g.L <sup>-1</sup> )	0,0020 ± 0,657
Cinzas (g.L <sup>-1</sup> )	0,0032 ± 0,252
SSC (°Brix)	6,40±0,306
Carboidratos * (%)	5,22
pH	5,24 ± 0,025

Dados reportados como média ± desvio padrão. \*Obtidos pela diferença dos demais componentes.

Fonte: Autor, (2022).

### 2.3.2 Comparação entre os métodos de extração e solvente

Para investigar comparativamente a performance de diferentes abordagens de extração para a recuperação dos compostos bioativos provenientes dos resíduos do repolho roxo, foram analisados os seguintes processos: extração com líquido pressurizado (PLE), extração assistida por ultrassom (UAE) e extração por agitação e aquecimento (EAA), sendo avaliado o efeito do soro de leite ácido como solvente em comparação ao solvente convencional etanol acidificado com ácido cítrico.

Os resultados referentes ao teor de antocianinas monoméricas totais, antocianinas monoméricas recuperadas, porcentagem de cor polimérica e compostos fenólicos totais, para cada técnica de extração e solvente, estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 — Caracterização química do extrato e comparação entre os métodos de extração

Métodos de extração	Tipo de Solvente	AMT (mg C3G/100g)	% AMR	% Cor polimérica	CFT (g EAG/100g)
EAA	EA	159,15±0,560 <sup>f</sup>	40,52±0,553 <sup>d</sup>	51,88±0,433 <sup>a</sup>	413,34±3,240 <sup>e</sup>
	SA	183,98±1,479 <sup>d</sup>	41,86±0,535 <sup>d</sup>	49,89±0,376 <sup>b</sup>	362,75±2,955 <sup>f</sup>
UAE	EA	163,89±0,370 <sup>e</sup>	36,91±0,420 <sup>e</sup>	48,24±0,123 <sup>c</sup>	839,70±3,150 <sup>c</sup>
	SA	199,76±0,082 <sup>c</sup>	45,07±0,696 <sup>c</sup>	45,04±0,361 <sup>d</sup>	552,75±1,950 <sup>d</sup>

<b>PLE</b>	<b>EA</b>	202,81±0,428 <sup>b</sup>	47,83±0,488 <sup>b</sup>	43,60±0,926 <sup>e</sup>	1249,20±7,867 <sup>a</sup>
	<b>SA</b>	293,37±0,322 <sup>a</sup>	65,70±0,588 <sup>a</sup>	40,05±0,423 <sup>e</sup>	1236,47±3,210 <sup>b</sup>

Valores expressos por meio de média  $\pm$  desvio padrão (ANOVA seguido pelo teste Tukey, letras iguais significam não haver diferença significativa ( $p < 0,05$ )). EA: extrato obtido com etanol acidificado, SA: extrato obtido com soro ácido, EAA: extração por agitação e aquecimento, UAE: extração assistida por ultrassom, PLE: extração com líquido pressurizado, AMT: antocianinas monoméricas totais, %AMR: antocianinas recuperadas, C3G: cianidina-3-glicosídeo, CFT: compostos fenólicos totais, EAG: equivalente de ácido gálico, ET: equivalente de Trolox.

Fonte: Autor, (2022).

Por meio dos resultados apresentados na Tabela 4 é possível verificar a potencialidade da tecnologia PLE, a qual produziu os maiores rendimentos de extração de antocianinas monoméricas totais (202,81 e 293,37 mg C3G/100g) e compostos fenólicos totais (1249,20 e 1236,47 g EAG/100g), referentes ao extrato obtido com etanol acidificado e extrato obtido com soro ácido, respectivamente.

Uma performance superior da extração via PLE em relação a outros métodos para a recuperação antocianinas também foi verificada por Benvenuti, Zielinski e Ferreira, (2022), em sua pesquisa os autores obtiveram concentrações entre (9,51 a 29,40 mg C3G.g<sup>-1</sup>) para resíduos de jaboticaba obtidos por DES de 47 % 1:2M (ChCl:Pro e ChCl:Ma). Teixeira et al., (2021), ao investigarem a recuperação de antocianinas das cascas quebradas de feijão preto também verificaram maior eficiência para a PLE (4,83 mg C3G.g<sup>-1</sup>), em comparação com as extrações por banho de ultrassom (3,28 mg C3G.g<sup>-1</sup>) e maceração (1,72 mg C3G.g<sup>-1</sup>) obtidos por etanol acidificado com ácido cítrico (0,1 mol. L<sup>-1</sup> 30:70 (v/v)). As tecnologias de extração com líquido pressurizado se destacam devido as condições de operação: com o aumento da temperatura e pressão, a viscosidade e tensão superficial do solvente tendem a diminuir, otimizando a penetração do solvente na matriz vegetal, expandido a superfície de contato, e intensificando a transferência de massa (ZIELINSKI et al., 2021).

Interessantemente, os extratos obtidos via PLE apresentaram os menores valores de cor polimérica entre as amostras 40,05 % (SA) e 43,60 % (EA). A cor polimérica está relacionada com o índice de degradação do extrato, isto é, quanto maior for esse parâmetro, maior a degradação das antocianinas em outros compostos (JIANG et al., 2019). A manutenção dos compostos alvo nos extratos PLE também pode ter ocorrido pelas condições de operação do equipamento, pois se trata de um sistema fechado. Tena, Martín e Asuero, (2020) explicam que ambientes de alta pressão podem prevenir a degradação de compostos, já que na presença

de oxigênio ocorre a oxidação que tem por consequência a formação de compostos marrons (pigmentos de melanoidina).

Potenciais reações de oxidação podem ter influenciado no aumento da cor polimérica nos extratos obtidos por agitação e aquecimento (51,88 % EA e 49,89 % SA), e por extração assistida por ultrassom (48,24 % EA e 45,04 % SA), ambos processos realizados em sistemas abertos. Conforme descrito por Jiang et al., (2019), os valores atribuídos ao percentual de cor polimérica podem envolver a presença de antocianinas incolores, o pH, e a formação de pigmentos de melanoidina, as quais podem ser formados em altas temperaturas.

A polaridade do solvente é crucial para aumentar a solubilidade dos compostos fenólicos (CF). No presente estudo, os rendimentos de extração de CFT foram superiores para os métodos de PLE (13963,29 e 14639,31 g EAG/100g) e UAE (13930,99 e 13827,68 g EAG/100g), para os extratos SA e EA, respectivamente.

Conforme relatado por Setyaningsih et al., (2019) os CFs possuem alta polaridade e apresentam maior solubilidade em solventes polares, como água e metanol. Hosseini et al., (2016), relataram que a água recuperou mais polifenóis do repolho roxo do que o etanol (entre os solventes não acidificados testados). Por outro lado, Ghareaghajlou, Hallaj-Nezhadi e Ghasempour, (2021), verificaram que as misturas hidroetanólicas foram mais eficientes para a extração de polifenóis desta matriz. Setyaningsih et al., (2019) explica que CFs menos polares, incluindo flavonoides, podem ser extraídos mais facilmente usando etanol ou acetato de etila.

Além disso, a utilização de solventes com valores de pH baixos favorece o rompimento as membranas celulares, o que aumenta significativamente a liberação de CFs de baixo peso molecular, como os ácidos hidroxicinâmicos (DEL PILAR GARCIA-MENDOZA et al., 2017).

Desta forma, podemos deduzir que o soro ácido exibiu eficiência de extração equivalente à do solvente convencional, visto que proporcionou um rendimento de CFs semelhante ao obtido para os extratos EA.

Quanto ao rendimento de extração das antocianinas manométricas totais, expressas em equivalente de cianidina-3-glicosídeo (C3G), as extrações realizadas com o solvente soro de leite ácido através das técnicas de PLE (293,37 mg C3G/100g), UAE (199,76 mg C3G/100g) e EAA (183,98 mg C3G/100g), foram superiores aos valores de rendimento obtidos pelo solvente convencional, em todos os métodos.

O notório potencial do soro ácido como extrator de antocianinas se deve, pelo menos em parte, às características do solvente, tais como maiores proporções de água (94,77 %) e

acidez (pH 4,5), visto que em soluções de baixo pH o cátion flavílio formado permite que as antocianinas sejam altamente solúveis em água (FILAFERRO et al., 2022). Ainda, em uma combinação de solventes, a água com sua alta polaridade facilita a quebra do complexo material-soluto e, conseqüentemente, mais soluto é obtido do substrato (DEL PILAR GARCIA-MENDOZA et al., 2017). Patras, (2019) ao investigar o extrato hidroetanólico de resíduo de repolho roxo obtidos por maceração, observou concentrações de antocianinas inferiores (75,45 mg cianidina-3-glicosídeo/L). Já Yiğit et al., (2022), ao analisar o extrato de repolho roxo proveniente da MAE com uma mistura etanol-água, obteve resultados próximos aos aqui reportados (228,44 mg C3G/L).

Portanto, não somente o solvente, mas também as tecnologias empregadas, foram fatores decisivos para alcançar os maiores rendimentos de extração de antocianinas.

### 2.3.3 Caracterização das antocianinas dos extratos de repolho roxo

As antocianinas são substâncias caracterizadas por padrões complexos de hidroxilação, metoxilação, glicosilação e acilação (WU et al., 2017). Esses fatores estão ligados às espécies vegetais para formar um padrão característico de antocianinas. Conforme relatado por Charron et al., (2007), o repolho roxo apresenta um perfil complexo de antocianinas, as quais, são derivadas principalmente de cianidina-3-diglucosídeo-5-glicosídeo altamente conjugado com açúcares (glicose e xilose) e grupos de ácidos.

As antocianinas presentes nos extratos de repolho roxo foram identificadas e quantificadas por LC-MS, comparando seus respectivos tempos de retenção (RT, min), absorvância máxima ( $\lambda_{max}$ , nm) e fragmentos de massa de íons ( $MS^2$ ,  $m/z$ ), conforme mostrado na Tabela 5. Além disso, para a confirmação da tentativa de identificação dos compostos, foram utilizados dados obtidos de estudos anteriores encontrados na literatura.

No total, doze compostos de antocianina foram detectados e todos eles apresentaram um fragmento de massa iônica comum a 287  $m/z$  equivalente a uma cianidina aglicona. Além disso, cinco antocianinas aciladas e cinco diaciladas foram detectadas.

Os **Picos 1** ( $[M+H]^+$  em 773  $m/z$ ) e **2** ( $[M+H]^+$  em 611  $m/z$ ), indicaram a liberação de três e dois fragmentos de massa iônica em  $MS^2$ , nessa ordem, exibindo a perda sucessiva de porções de glucosídeos (162  $m/z$ ). Alguns estudos com repolho roxo identificaram provisoriamente esses compostos como cyanidin-3-*O*-sophoroside-5-*O*-glucoside e cyanidin-

3-*O*-glucoside-5-*O*-glucoside, respectivamente (CHARRON et al., 2007; MANSOUR et al., 2007; MANSOUR et al., 2021; WICZKOWSKI et al., 2013).

Os **picos 3, 4, 6, 7 e 9** mostraram uma acilação nas análises espectrométricas. O **pico 3** ( $[M+H]^+$  em 979 *m/z*) liberou três fragmentos de íons até 817 *m/z* ( $[M+H]-162$ ), 449 ( $[M+H]-162-162-206$ ) e 287 *m/z*, após uma perda da porção glucósideo. De acordo com a literatura, o fragmento de massa iônica 206 *m/z* pode ser correspondente a um ácido sinápico, portanto, este composto foi provisoriamente identificado como cyanidin-3-*O*-(sinapoyl)-sophoroside-5-*O*-glucoside (MANSOUR et al., 2021). Os **picos 4 e 7**, apresentaram o mesmo íon pseudomolecular  $[M+H]^+$  a 1141 *m/z*, indicando fragmentação de quatro unidades glucosídicas e uma unidade de ácido sinápico, e esses compostos foram identificados como cyanidin-3-*O*-(sinapoyl)-triglucoside-5-*O*-glucoside (WICZKOWSKI et al., 2013). O **pico 6** ( $[M+H]^+$  em 1111 *m/z*), revelou uma perda de uma unidade glucosídica a 949 *m/z* ( $[M+H]-162$ )<sup>+</sup>, seguida pela perda de outras duas unidades glucosídicas e uma de resíduo de ácido ferúlico (176 *m/z*) a 449 *m/z* ( $[M+H]-162-162-162-176$ )<sup>+</sup>, o descolamento de mais uma unidade de glucósideo revelou a presença de uma cianidina (287 *m/z*), portanto, esse pico foi provisoriamente identificado como cyanidin-3-*O*-(feruloyl)-triglucosides-5-*O*-glucoside (MANSOUR et al., 2021). O **pico 9** ( $[M+H]^+$  a 949 *m/z*), apresentou um comportamento de fragmentação na espectrometria de massas semelhante ao **pico 6**, exceto por ter em sua composição uma unidade glucosídica a menos. Na literatura, este composto foi identificado como cyanidin-3-*O*-(feruloyl)-sophoroside-5-*O*-glucoside (MANSOUR et al., 2021).

Os **picos 5, 8, 10, 11 e 12** foram provisoriamente identificados como antocianinas diaciladas. O **Pico 5** ( $[M+H]^+$  em 1081 *m/z*), liberou íons de fragmento de 919 ( $[M+H]-162$ ), a 449 *m/z* ( $[M+H]-162-162-146$ ), e a 287 *m/z* ( $[M+H]-162-162-162-146-162$ ), de acordo com outros autores, este composto pode conter resíduos de ácido cafeico e p-cumárico (162 e 147 *mu*, respectivamente), e foi identificado como cyanidin-3-*O*-(caffeoyl)(*p*-coumaroyl)-diglucoside-5-*O*-glucoside (MANSOUR et al., 2021). O **pico 8** ( $[M+H]^+$  a 1317 *m/z*) apresentou três fragmentos, a 1155 *m/z* ( $[M+H]-162$ ), a 449 *m/z* ( $[M+H]-162-162-176-206$ ), e 287 *m/z*. Este composto foi descrito como uma antocianina diacilada com ácido ferúlico (176 *mu*) e ácido sinápico (206 *mu*) e foi identificado como cyanidin-3-*O*-(feruloyl)(sinapoyl)-triglucoside-5-*O*-glucoside. O **Pico 10** ( $[M+H]^+$  a 1125 *m/z*), exibiu três íons de fragmento  $MS^2$ , a 963 *m/z* ( $[M+H]-162$ ), a 449 *m/z* ( $[M+H]-162-176-176$ ), e a 287 *m/z* ( $[M+H]-162-176-176-162$ ), a análise de massa por espectrometria sugere que este composto sofre dupla acilação

com o ácido ferúlico, sendo provisoriamente identificado como cyanidin-3-*O*-(feruloyl)(feruloyl)-diglucoside-5-*O*-glucoside (MANSOUR et al., 2021; WICZKOWSKI et al., 2013). O **pico 11** ([M+H]<sup>+</sup> a 1155 *m/z*), apresentou comportamento de fragmentação semelhante ao **pico 8**, porém, este composto liberou apenas três unidades de glucosídeos, por isso foi provisoriamente identificado como cyanidin-3-*O*-(feruloyl)(sinapoyl)-diglucoside-5-*O*-glucoside (MANSOUR et al., 2021; WICZKOWSKI et al., 2013), e, por fim, o **pico 12** ([M+H]<sup>+</sup> a 1185 *m/z*), apresentou três fragmentos de íons MS<sup>2</sup> a 1023 *m/z* ([M+H]<sup>+</sup>-162), a 449 *m/z* ([M+H]<sup>+</sup>-162-206-206), e a 287 *m/z* ([M+H]<sup>+</sup>-162-162-206-206-162), revelando uma cianidina aglicona após a perda de três unidades de glucosídeo e dois resíduos de ácido sinápico. Desta forma, este composto foi provisoriamente identificado como cyanidin-3-*O*-(sinapoyl)(sinapoyl)-diglucoside-5-*O*-glucoside (MANSOUR et al., 2021; WICZKOWSKI et al., 2013).

As antocianinas predominantes nos extratos das folhas do repolho roxo, para ambos os solventes, foram aciladas e diaciladas, sendo os grupos acilados na presença dos ácidos aromáticos foram os ácidos sinápico, ferúlico e *p*-cumárico (Tabelas 5). Para Zhao et al., (2017), essa conformação na estrutura é um aspecto positivo, pois os grupos de derivados acilados oferecem qualidades superiores, incluindo estabilidade contra diferentes fatores (pH, luz e temperatura). Ainda, a acilação da antocianina também afeta a expressão da cor e aumenta a estabilidade das antocianinas por meio da co-pigmentação intramolecular.

No presente estudo o composto Cyanidin-3-*O*-(feruloyl)-sophoroside-5-*O*-glucoside foi o componente majoritário dos extratos, seguida pela Cyanidin-3-*O*-(sinapoyl)(sinapoyl)-diglucoside-5-*O*-glucoside e Cyanidin-3-*O*-glucoside-5-*O*-glucoside, indicadas pelos picos (9, 12 e 2), respectivamente. Tal perfil é semelhante aos relatados por Mansour, Moustafa e Abdelkhalik, (2021) e Wiczowski, Szawara-Nowak e Topolska, (2013) ao investigarem extratos de repolho roxo, estes autores salientam que as diferenças relativas ao perfil em antocianinas podem resultar da diversidade varietal, a qual, por sua vez, é influenciada por aspectos edafoclimáticos como estação, condições climáticas e condições de cultivo.

Tabela 5 — Identificação e quantificação por LC-MS de compostos de antocianinas presentes em extratos de repolho roxo

<b>a) Identificação provisória de compostos de antocianina presentes nos extratos</b>					
<b>Pico</b>	<b>RT (min)</b>	<b><math>\lambda</math> max (nm)</b>	<b>[M+H]<sup>+</sup> (m/z)</b>	<b>MS<sup>2</sup> (m/z)</b>	<b>Identificação provisória</b>
1	20,43	511	773	611(51),449(32),287(100)	Cyanidin-3- <i>O</i> -sophoroside-5- <i>O</i> -glucoside
2	21,78	512	611	449(25),287(100)	Cyanidin-3- <i>O</i> -glucoside-5- <i>O</i> -glucoside
3	24,04	523	979	817(12),449(31),287(100)	Cyanidin-3- <i>O</i> -(sinapoyl)-sophoroside-5- <i>O</i> -glucoside
4	25,09	527	1141	979(18),449(13),287(100)	Cyanidin-3- <i>O</i> -(sinapoyl)-triglucoside-5- <i>O</i> -glucoside
5	29,32	522	1081	919(21),449(61),287(100)	Cyanidin-3- <i>O</i> -(caffeoyl)(p-coumaroyl)-diglucoside-5- <i>O</i> -glucoside
6	29,74	523	1111	949(11),449(32),287(100)	Cyanidin-3- <i>O</i> -(feruloyl)-triglucosides-5- <i>O</i> -glucoside
7	31,93	533	1141	979(21),449(15),287(100)	Cyanidin-3- <i>O</i> -(sinapoyl)-triglucoside-5- <i>O</i> -glucoside
8	32,96	534	1317	1155(16),449(22),287(100)	Cyanidin-3- <i>O</i> -(feruloyl)(sinapoyl)-triglucoside-5- <i>O</i> -glucoside
<b>9</b>	<b>36,89</b>	<b>522</b>	<b>949</b>	<b>757(32),449(6),287(100)</b>	<b>Cyanidin-3-<i>O</i>-(feruloyl)-sophoroside-5-<i>O</i>-glucoside</b>
10	39,01	534	1125	963(10),449(54),287(100)	Cyanidin-3- <i>O</i> -(feruloyl)(feruloyl)-diglucoside-5- <i>O</i> -glucoside
11	39,39	534	1155	993(16),449(9),287(100)	Cyanidin-3- <i>O</i> -(feruloyl)(sinapoyl)-diglucoside-5- <i>O</i> -glucoside
12	39,77	534	1185	1023(8),449(26),287(100)	Cyanidin-3- <i>O</i> -(sinapoyl)(sinapoyl)-diglucoside-5- <i>O</i> -glucoside

b) Quantificação dos compostos de antocianinas presentes nos extratos. Os valores são expressos em mg/g de extrato.

Tipo de extrato	EA			SA		
	Métodos de extração			Métodos de extração		
Pico	EAA	UAE	PLE	EAA	UAE	PLE
1	1,634±0,005 <sup>J</sup>	1,753±0,004 <sup>J</sup>	2,667±0,011 <sup>def</sup>	1,560±0,005 <sup>J</sup>	1,705±0,039 <sup>g</sup>	2,287±0,001 <sup>g</sup>
2	2,127±0,011 <sup>c</sup>	2,247±0,021 <sup>c</sup>	3,068±0,013 <sup>bc</sup>	1,781±0,008 <sup>c</sup>	1,905±0,046 <sup>c</sup>	2,539±0,016 <sup>c</sup>
3	1,585±0,002 <sup>k</sup>	1,731±0,011 <sup>k</sup>	2,635±0,001 <sup>fe</sup>	1,546±0,001 <sup>k</sup>	1,689±0,043 <sup>fg</sup>	2,266±0,001 <sup>l</sup>
4	1,955±0,007 <sup>e</sup>	2,072±0,008 <sup>d</sup>	2,811±0,002 <sup>de</sup>	1,706±0,008 <sup>e</sup>	1,842±0,041 <sup>de</sup>	2,476±0,031 <sup>e</sup>
5	1,808±0,002 <sup>h</sup>	1,931±0,009 <sup>g</sup>	2,823±0,010 <sup>cde</sup>	1,640±0,002 <sup>g</sup>	1,781±0,038 <sup>def</sup>	2,434±0,014 <sup>g</sup>
6	1,906±0,006 <sup>g</sup>	2,074±0,006 <sup>d</sup>	2,908±0,008 <sup>bcd</sup>	1,703±0,005 <sup>f</sup>	1,841±0,043 <sup>de</sup>	2,453±0,002 <sup>f</sup>
7	1,807±0,004 <sup>h</sup>	1,872±0,005 <sup>h</sup>	2,752±0,010 <sup>def</sup>	1,613±0,003 <sup>h</sup>	1,778±0,039 <sup>def</sup>	2,378±0,003 <sup>i</sup>
8	2,031±0,004 <sup>d</sup>	2,042±0,005 <sup>e</sup>	2,857±0,024 <sup>cde</sup>	1,732±0,010 <sup>d</sup>	1,891±0,045 <sup>d</sup>	2,504±0,011 <sup>d</sup>
<b>9</b>	<b>4,421±0,053<sup>a</sup></b>	<b>4,480±0,049<sup>a</sup></b>	<b>4,594±0,063<sup>a</sup></b>	<b>2,764±0,028<sup>a</sup></b>	<b>3,026±0,052<sup>a</sup></b>	<b>3,681±0,074<sup>a</sup></b>
10	1,748±0,004 <sup>i</sup>	1,818±0,008 <sup>i</sup>	2,690±0,008 <sup>f</sup>	1,565±0,001 <sup>i</sup>	1,721±0,041 <sup>efg</sup>	2,325±0,004 <sup>j</sup>
11	1,929±0,007 <sup>f</sup>	2,013±0,004 <sup>f</sup>	2,781±0,008 <sup>de</sup>	1,640±0,004 <sup>g</sup>	1,811±0,044 <sup>def</sup>	2,423±0,004 <sup>h</sup>
12	2,729±0,032 <sup>b</sup>	2,783±0,030 <sup>b</sup>	3,123±0,012 <sup>b</sup>	1,927±0,009 <sup>b</sup>	2,148±0,048 <sup>b</sup>	2,737±0,005 <sup>b</sup>
<b>Antocianinas totais</b>	<b>25,679±0,135</b>	<b>26,818±0,061</b>	<b>35,709±0,170</b>	<b>21,178±0,086</b>	<b>23,137±0,519</b>	<b>30,503±0,165</b>

Valores expressos por meio de média ± desvio padrão (ANOVA seguido pelo teste Tukey, letras iguais significam não haver diferença significativa ( $p < 0,05$ ), RT: tempo de retenção,  $\lambda_{max}$ : absorvância máxima, MS<sup>2</sup>: fragmentos de massa de íons, EA: extrato obtido com etanol acidificado, SA: extrato obtido com soro ácido, EAA: extração por agitação e aquecimento, UAE: extração assistida por ultrassom e PLE: extração com líquido pressurizado.

Fonte: Autor, (2022).

### 2.3.4 Atividade antioxidante dos extratos

Existem vários métodos para avaliar a atividade antioxidante de um extrato. Os mais populares são métodos químicos baseados na eliminação de radicais livres. No entanto, métodos baseado em células, os quais apresentam efeito semelhante aos sistemas *in vivo*, estão sendo adotados por grupos em todo o mundo (PRIETO e VÁSQUEZ, 2014).

A atividade antioxidante dos extratos investigadas pelos métodos *in vitro* DPPH, ABTS e FRAP (Tabela 6), indicam que todos os extratos apresentam capacidade antioxidante. No entanto, os extratos provenientes PLE demonstraram capacidades antioxidantes superiores nos ensaios DPPH (14639,31 e 3963,29  $\mu\text{mol ET}/100\text{g}$ ) e ABTS (14006,49 e 12865,3  $\mu\text{mol ET}/100\text{g}$ ). Estes valores são similares aos relatados por Patras, (2019) em seu estudo da atividade antioxidante de extratos hidroetanólico de resíduos de repolho roxo pelo método ABTS (6321 a 14337  $\mu\text{mol TE}/\text{L}$ ), e por Yiğit et al., (2022) que verificaram a atividade de repolho roxo pelo método de DPPH (141,13 a 369,37  $\text{mmol TE}/\text{kg}$ ).

Por outro lado, os sistemas OxHlia e TBARS, apresentaram atividade antioxidante relevante para o método de extração por agitação e aquecimento EAA.

O ensaio OxHLIA induz a hemólise eritrocitária por duas vias em sistemas aquosos: i) pela ação de radicais hidrofílicos gerados a partir da decomposição térmica do APPH (2,20-azobis (2-metilpropionamidina), que atacam a membrana eritrocitária; e ii) por radicais lipofílicos gerados pela oxidação da membrana eritrocitária. Assim, os resultados do ensaio OxHLIA são expressos como a concentração de extrato necessária para inibir 50 % da hemólise por 60 minutos (IC50 (60 min)). Já o método TBARS apresenta mecanismo de ação pela inibição da produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, mimetizando condições dos sistemas *in vivo* (PRIETO e VÁSQUEZ, 2014).

Tabela 6 — Análise da atividade antioxidante pelos métodos baseados em célula e químicos

Métodos de extração	Tipo de Solvente	Métodos baseados em células		Métodos químicos		
		OxHLIA (IC <sub>50</sub> ; µg/mL) Δt = 60 min	TBARS (IC <sub>50</sub> ; µg/mL)	ABTS (µmol ET/100g)	DPPH (µmol ET/100g)	FRAP (µmol ET/100g)
EAA	EA	8±1 <sup>g</sup>	116±0,3 <sup>f</sup>	8585,93±5,042 <sup>f</sup>	9060,10±1,174 <sup>f</sup>	7708,96±8,312 <sup>d</sup>
	SA	9±1 <sup>f</sup>	120±6 <sup>e</sup>	10611,98±4,562 <sup>d</sup>	9197,49±8,866 <sup>e</sup>	7666,25±8,861 <sup>e</sup>
UAE	EA	18,71±0,09 <sup>e</sup>	161±9 <sup>c</sup>	10057,51±6,722 <sup>e</sup>	13827,68±1,143 <sup>d</sup>	7203,08±6,192 <sup>f</sup>
	SA	115±7 <sup>c</sup>	250±4 <sup>a</sup>	11625,35±5,274 <sup>c</sup>	13930,99±4,901 <sup>c</sup>	9080,00±5,684 <sup>b</sup>
PLE	EA	223±13 <sup>b</sup>	153±9 <sup>d</sup>	12865,32±16,432 <sup>b</sup>	14639,31±9,693 <sup>a</sup>	9273,70±4,372 <sup>a</sup>
	SA	477±13 <sup>a</sup>	204±9 <sup>b</sup>	14006,49±6,241 <sup>a</sup>	13963,29±5,919 <sup>b</sup>	8284,89±9,421 <sup>c</sup>
Trolox	-	21,8±0,2 <sup>d</sup>	5.8±0,6 <sup>g</sup>	-	-	-

Valores expressos por meio de média ± desvio padrão (ANOVA seguido pelo teste Tukey, letras iguais significam não haver diferença significativa (p < 0,05). EA: extrato obtido com etanol acidificado, SA: extrato obtido soro ácido, EAA: extração por agitação e aquecimento, UAE: extração assistida por ultrassom, PLE: extração com líquido pressurizado, OxHLIA: Ensaio de inibição da hemólise oxidativa, TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, DPPH: Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila, ABTS: 2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina6-ácido sulfônico, FRAP: Poder antioxidante de redução do ferro (Ferric-Reducing Antioxidant Power), Trolox: 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico e ET: equivalente de Trolox.

Fonte: Autor, (2022).

Garcia et al., (2019) explicam que os extratos vegetais podem ser classificados, dependendo de seus valores de  $IC_{50}$ , em altamente ativos ( $IC_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$ ); moderadamente ativos ( $50 < IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ ); fracamente ativos ( $100 < IC_{50} < 200 \mu\text{g/mL}$ ), ou até mesmo inativos caso ( $IC_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$ ).

Desta forma, com base nos parâmetros proposto por Garcia et al., (2019), podemos rotular a capacidade antioxidante verificada pelo método TBARS sendo menos expressivas, apresentando valores de  $IC_{50}$  entre (116 e 250  $\mu\text{g/mL}$ ), o que nos permite classifica-los como sendo fracamente ativos ou inativos para ambas as tecnologias e solventes. Da mesma forma, pelo método OxHLIA os extratos provenientes da extração com líquido pressurizado (PLE) demonstraram ser inativos com valores ( $IC_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$ ).

Os extratos provenientes da extração assistida por ultrassom (UAE), por outro lado, indicaram atividade antioxidante pelo método OxHLIA, sendo classificados como fracamente ativo (115  $\mu\text{g/mL}$  SA) e altamente ativo (18,71  $\mu\text{g/mL}$  EA).

A alta atividade antioxidante pelo método OxHLIA, também foi verificada nos extratos obtidos pela técnica de extração por aquecimento e agitação (EAA), em ambos os solventes os extratos exibiram-se altamente ativos (8 e 9  $\mu\text{g/mL}$ ). Além disso esses resultados superaram estatisticamente ( $p < 0,05$ ), o controle positivo (Trolox 21,8  $\text{g/mL}$ ), indicando excelente potencial antioxidante. Contudo, é preciso mencionar que as técnicas convencionais de extração são métodos demorados e que utilizam grandes quantidades de solventes, além de envolverem elevado consumo energético.

A comparação dos resultados de potencial antioxidante verificados para a técnica convencional (EAA) e os métodos emergentes testados sugere que o emprego das tecnologias PLE e UAE indicam uma redução da atividade antioxidante dos extratos. Conforme já relatado nesse estudo, a tecnologia PLE promove a ruptura da matriz vegetal. Plaza et al., (2010) relataram que pressões e temperaturas elevadas podem promover perdas da bioatividade de alguns compostos, ainda que forneçam melhores resultados em termos de rendimento de extração. Celli et al., (2016), em seu trabalho sobre a recuperação de antocianinas de mirtilo Lowbush usando UAE, enfatizou que o ultrassom facilita a liberação de compostos em decorrência da cavitação e que promove fissuras na parede vegetal da célula. Pan et al., (2012) analisou o potencial antioxidante da casca de romã, e verificou que o rendimento de antocianinas aumentou conforme o aumento da potência do ultrassom; no entanto, a atividade antioxidante também diminuiu consideravelmente.

Neste sentido, é possível supor que os mecanismos que beneficiaram o aumento de rendimento de extração, ocasionando esses rompimentos na estrutura vegetal, também possam ter acarretado em danos na estrutura química dos compostos antioxidantes.

### 2.3.5 Atividade antibacteriana e antifúngica

Em relação à atividade antimicrobiana, os valores referentes à concentração inibitória mínima (CIM) do extrato da casca de repolho roxo contra cinco bactérias Gram-negativas e três Gram-positivas são apresentados nas Tabela 7 e 8.

Todos os extratos testados apresentaram ação inibitória contra as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas testadas. Os extratos provenientes da extração com etanol acidificado foram mais ativos contra bactérias Gram-positivas do que contra bactérias Gram-negativas. Comportamento semelhante foi observada por Garcia et al. (2019), ao explorar a atividade antibacteriana de um extrato antociânico obtido dos resíduos da fruta Juçara (*Euterpe edulis* Martius).

Conforme descrito por Corrêa et al., (2019), os extratos naturais podem ser classificados conforme a sua concentração inibitória mínima (CIM) em inibidores fortes (CIM abaixo de  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ), inibidores moderados (CIM entre  $0,6$  e  $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e inibidores fracos (CIM acima de  $1,6 \text{ mg mL}^{-1}$ ). No entanto, embora os extratos de repolho roxo tenham apresentado inibição microbiana, estes podem ser considerados como inibidores fracos do crescimento bacteriano. A mesma tendência foi observada para a atividade antifúngica (Tabela 9), onde todos extratos também apresentaram atividade inibitória fraca.

Mansour, Moustafa e Abdelkhalik, (2021), ao investigar a atividade antimicrobiana de antocianinas e flavonóis de repolho roxo, reportou efeitos moderados contra dois tipos de culturas *Aspergillus niger* e *Candida albicans*, e nenhum efeito contra *Pseudomonas aeruginosa*.

Todavia, não podemos esquecer que as cepas de bactérias e fungos aplicadas neste estudo são cepas multirresistentes isoladas clinicamente, as quais apresentam um perfil de resistência muito superior às cepas licenciadas de padrão ATCC.

Tabela 7 — Avaliação da capacidade antimicrobiana dos extratos de antocianinas das folhas de repolho EA

Tipo de extrato	Métodos de extração						Controle Positivos					
	EAA		UAE		PLE		Estreptomicina 1mg/mL		Meticilina 1mg/mL		Ampicilina 20mg/mL	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<b>Gram-negative bacteria</b>												
<i>Escherichia coli</i>	10	>10	5	>10	10	>10	0.007	0.007	n.t.	n.t.	0.15	0.15
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	>10	10	>10	10	>10	0.01	0.01	n.t.	n.t.	0.15	0.15
<i>Morganella morganii</i>	10	>10	10	>10	5	>10	0.06	0.06	n.t.	n.t.	0.63	0.63
<i>Proteus mirabilis</i>	10	>10	10	>10	10	>10	0.007	0.007	n.t.	n.t.	0.15	0.15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	>10	10	>10	10	>10	0.007	0.007	n.t.	n.t.	0.15	0.15
<b>Gram-positive bacteria</b>												
<i>Enterococcus faecalis</i>	10	>10	10	>10	10	>10	0.007	0.007	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>Listeria monocytogenes</i>	10	>10	5	>10	5	>10	0.007	0.007	n.t.	n.t.	0.15	0.15
MRSA	2.5	>10	2.5	>10	5	>10	0.007	0.007	0.007	0.007	0.15	0.15

EA: extrato obtido com etanol acidificado, EAA: extração por agitação e aquecimento, UAE: extração assistida por ultrassom e PLE: extração com líquido pressurizado, MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à metilina, CIM: concentração inibitória mínima, CBM: concentração bactericida mínima, nt: não testado.

Fonte: Autor, (2022).



Tabela 8 — Avaliação da capacidade antimicrobiana dos extratos de antocianinas das folhas de repolho roxo SA

Tipos de Extrato	Métodos de extração						Controle Positivos					
	EAA		UAE		PLE		Estreptomicina 1mg/mL		Meticilina 1mg/mL		Ampicilina 20mg/mL	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<b>Gram-negative bacteria</b>												
<i>Escherichia coli</i>	10	>10	10	>10	10	>10	0.007	0.007	n.t.	n.t.	0.15	0.15
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	>10	>10	>10	>10	>10	0.01	0.01	n.t.	n.t.	0.15	0.15
<i>Morganella morganii</i>	10	>10	10	>10	10	>10	0.06	0.06	n.t.	n.t.	0.63	0.63
<i>Proteus mirabilis</i>	10	>10	10	>10	10	>10	0.007	0.007	n.t.	n.t.	0.15	0.15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	>10	10	>10	10	>10	0.007	0.007	n.t.	n.t.	0.15	0.15
<b>Gram-positive bacteria</b>												
<i>Enterococcus faecalis</i>	5	>10	5	>10	5	>10	0.007	0.007	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>Listeria monocytogenes</i>	10	>10	10	>10	10	>10	0.007	0.007	n.t.	n.t.	0.15	0.15
MRSA	2.5	>10	2.5	>10	5	>10	0.007	0.007	0.007	0.007	0.15	0.15

SA: extrato obtido com soro ácido, EAA: extração por agitação e aquecimento, UAE: extração assistida por ultrassom e PLE: extração com líquido pressurizado, MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina, CIM: concentração inibitória mínima, CBM: concentração bactericida mínima, nt: não testado.

Fonte: Autor, (2022).

Tabela 9 — Avaliação do potencial antifúngico dos extratos de antocianinas das folhas de repolho roxo

Tipos de extrato	Métodos de extração	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>
		<i>brasiliensis</i>	<i>fumigatus</i>
EAA	EA	10/>10	>10/>10
	SA	10/>10	10/>10
UAE	EA	10/>10	>10/>10
	SA	10/>10	10/>10
PLE	EA	>10/10	10/>10
	SA	5/>10	10/>10
<b>Ketoconazole</b>	-	0.06/0.125	0.5/1

EA: extrato obtido com etanol acidificado, SA: extrato obtido com soro de leite ácido, EAA: extração por agitação e aquecimento, UAE: extração assistida por ultrassom e PLE: extração com líquido pressurizado.

Fonte: Autor, (2022).

### 2.3.6 Atividade anti-inflamatória e anti-proliferativa

Os resultados referentes aos efeitos antiproliferativos dos extratos das folhas residuais de repolho roxo, avaliado quanto a inibição do crescimento de quatro linhagens de células tumorais humanas (AGS, CaCo2, MCF-7 e VERO) estão apresentados na Tabela 10, expressos como concentrações que promoveram 50 % da inibição do crescimento celular ( $GI_{50}$ ). No aspecto geral, tanto os extratos EA quanto os SA não apresentaram atividade antiproliferativa contra as linhagens tumorais testadas (valor  $GI_{50}$  > 400  $\mu\text{g/mL}$ ). Da mesma forma, os extratos não apresentaram atividade anti-inflamatória na linha RAW 246.7 testada.

Entretanto, os extratos também não revelaram toxicidade, o que é um resultado extremamente positivo no que se refere ao seu potencial aplicação em matrizes alimentícias. Contudo, testes *in vivo* complementares ainda são necessários para comprovação da ausência de toxicidade e determinação de doses seguras.

Tabela 10 — Potenciais antiproliferativos e anti-inflamatório dos extratos

	EA			SA			Controles	
	EAA	UAE	PLE	EAA	UAE	PLE	Elipticina ( $\mu\text{g/mL}$ )	Dexametasona ( $\mu\text{g/mL}$ )
<b>AGS (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	>400	>400	>400	>400	>400	>400	1,23 $\pm$ 0,03	-
<b>CaCo2 (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	>400	>400	>400	>400	>400	>400	1,21 $\pm$ 0,02	-
<b>MCF-7 (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	>400	>400	>400	>400	>400	>400	1,02 $\pm$ 0,02	-
<b>VERO (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	>400	>400	>400	>400	>400	>400	1,41 $\pm$ 0,06	-
<b>RAW 246.7 (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	>400	>400	>400	>400	>400	>400	-	6,3 $\pm$ 0,4

EA: extrato obtido com etanol acidificado, SA: extrato obtido com soro ácido, EAA: extração por agitação e aquecimento, UAE: extração assistida por ultrassom, PLE: extração com líquido pressurizado, AGS: adenocarcinoma gástrico, CaCo2: adenocarcinoma de cólon, MCF-7: adenocarcinoma, além da linha não-tumoral VERO (células do rim de macaco verde africano) e RAW 246.7: linha celular semelhante a macrófagos de camundongo.

Fonte: Autor, (2022)

## 2.4 CONCLUSÃO

O soro ácido como solvente associado às tecnologias limpas de extração testadas é uma possibilidade promissora capaz de promover redução no impacto ambiental e oferecer extratos naturais de qualidade, visto que seu desempenho como solvente para a extração de antocianinas foi superior a mistura de etanol e ácido cítrico. Um total de 12 antocianinas foi identificado nestas bioformulações, sendo a cyanidin-3-*O*-(feruloyl)-sophoroside-5-*O*-glucoside o composto majoritário em todas as amostras.

Embora os extratos não tenham apresentado atividades antioxidante expressivas pelos métodos baseados em célula, nem potenciais anti-inflamatório e antiproliferativo, é importante destacar que os mesmos não apresentaram citotoxicidade, o que favorece a aplicação industrial em alimentos, fármacos e cosméticos. Além disso, a identificação de grupos acilados que favorecem a copigmentação e estabilidade sugere que os extratos têm grande potencial como corantes naturais.

Assim, levando em conta os resultados de antocianinas, os extratos obtidos com etanol acidificado (EA) e extratos obtidos com soro ácido (SA) extraídos pelo método PLE foram selecionados para dar sequência ao estudo. As avaliações de **concentração**, **microencapsulação** e **estabilidade** destes extratos, serão descritas nos Capítulos **III** e **IV**.

### **CAPÍTULO 3**

**Produção de Microcápsulas de Antocianinas Extraídas de Folhas Residuais de Repolho Roxo Usando Soro Ácido como Solvente: um Processo Integrado a Baixas Temperaturas (Crioconcentração-Liofilização)**

### 3.1 INTRODUÇÃO

As antocianinas são caracterizadas conforme o número de grupos funcionais, como as hidroxilas (OH) e metoxilas (-OCH<sub>3</sub>), bem como, a presença de ácidos alifáticos ou aromáticos ligados a açúcares. Além disso, a presença do oxigênio livre, resulta na elevada instabilidade destes pigmentos (FILAFERRO et al., 2022). Em razão a conformação estrutural da molécula, existem inúmeros fatores físicos e químicos que podem ter um impacto negativo na sua estabilidade, tornando-as mais susceptíveis a degradação devido a diversos fatores como por exemplo: aumento de temperatura, exposição a luz, oxigênio, pH e íons metálicos (TENA, MARTÍN e ASUERO, 2020).

Nesse sentido, maneiras de contornar esse problema é promovendo o aumento da estabilidade estrutural desses compostos empregando tecnologias para preservar o extrato como a criocôncêntração e a microencapsulação.

A microencapsulação consiste em proteger os compostos, formando uma fina camada protetora, viabilizando a aplicação em âmbito industrial (MACHADO et al., 2022). Para melhor performance do processo, recomenda-se a concentração dos extratos. Conforme revisado no (capítulo 1), a tecnologia de criocôncêntração em blocos assistida por centrifugação é uma tecnologia emergente baseada no congelamento-descongelamento rápido (DE LIZ et al., 2020). A qual apresenta excelentes resultados devido a aplicação de baixas temperaturas e ausência de oxigênio (PETZOLD et al., 2016). A partir do concentrado a estabilização, promovida por agentes carreadores é uma alternativa de fácil implementação e baixo custo. Dentre os polímeros utilizados como agentes encapsulantes, a maltodextrina apresenta vantagens associadas ao baixo custo e facilidade operacional, além de demonstrar efetividade na preservação de compostos fenólicos (FERRO, MÜLLER e FERREIRA, 2020).

Dentre as técnicas empregadas para a microencapsulação podemos destacar a secagem por atomização e a liofilização (TYAGI et al., 2011). A atomização em spray-dry é um processo amplamente utilizado em diferentes setores da indústria e constitui uma tecnologia de grande relevância no processamento de alimentos desidratados (FERRO, MÜLLER e FERREIRA, 2020).

A microencapsulação, por spray-dry de extrato rico em antocianinas de repolho roxo já foi relatada por Machado et al., (2022) utilizando, goma arábica e maltodextrina como agentes carreadores.

No entanto, nesse estudo a extração de antocianinas das casas de repolho roxo é obtida através da extração com o soro de leite ácido (processo descrito no Capítulo 2). Os constituintes minerais presentes no soro de leite ácido, dificulta que o soro seja pulverizado, pois a maior parte da lactose é convertida em sua estrutura cristalina e o alto teor de fosfato de cálcio resulta em problemas tecnológicos como em incrustação e danos nos equipamentos, inviabilizando o uso desse método (BYLUND, 2015).

Nesses aspectos, promover a microencapsulação através da secagem por liofilização é uma excelente opção. Uma vez que, a liofilização é uma técnica valiosa para a secagem de materiais sensíveis a altas temperaturas, proporcionando produtos de qualidade superior aos pulverizados, pois opera sem oxigênio em temperaturas ( $>0$  °C) (RÓŻYŁO, 2020).

Portanto, este capítulo teve como objetivo promover a produção de microcápsulas de antocianinas extraídas das folhas resíduas do repolho roxo utilizando o soro ácido como solvente empregando um processo integrado a baixas temperaturas crioconcentração-liofilização.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Extração das antocianinas

Os extratos de antocianinas das folhas residuais do repolho roxo foram obtidos pelo método de extração com líquido pressurizado PLE (descrito no capítulo 2). Os extratos obtidos empregando os solventes: Soro de leite ácido (SA) e a mistura de etanol: ácido cítrico (EA), foram submetidos a uma etapa de concentração.

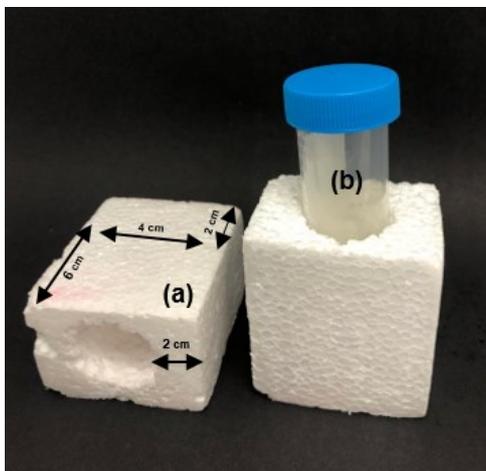
Para o extrato obtido a partir da extração com solvente convencional (EA) foi necessário promover a remoção do solvente via evaporação em rotaevaporador rotativo a vácuo a 40 °C (FISATOM 801, São Paulo, Brasil).

### 3.2.2 Concentração dos extratos de antocianinas

Os extratos (SA e EA), foram submetidos a técnica de crioconcentração em blocos assistida por centrifugação, conforme proposto Petzold et al., (2016).

Para tal, o aparato (tubo Falcon de 50 mL) foi revestido com uma manta protetora de poliestireno Figura 9 (a) e (b), para auxiliar o congelamento, desta forma foi possível que a transferência de calor durante o processo ocorresse principalmente em uma única direção, viabilizando o congelamento de forma lenta.

Figura 9 — Manta de poliestireno (a) e Tubo de falcon contendo o extrato (b)



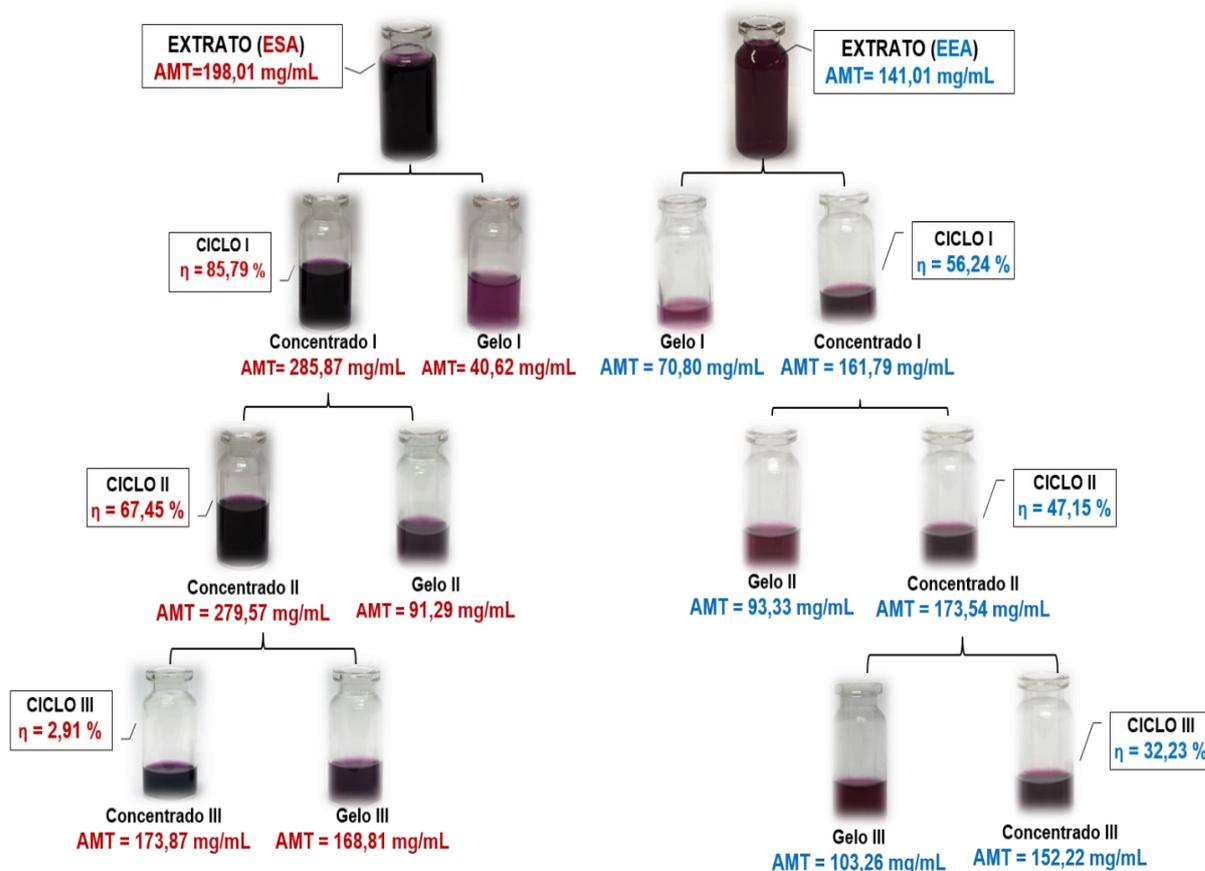
Fonte: Autor, (2022).

Então, em cada tubo foram acrescidos 15 mL do extrato de antocianina, em seguida as amostras foram submetidas ao congelamento em freezer estático a  $-20 \pm 2$  °C por 12 h. Dado o tempo de congelamento, as amostras congeladas foram removidas do congelador e rapidamente transferidas para uma centrífuga (centrífuga Quimis, modelo Q222T, Aparelho Científico LTDA, Brasil) operada por 15 min a 4515 x g para forçar a separação de solutos das amostras congeladas, obtendo duas frações: concentrado e gelo.

A fração de extrato concentrada foi novamente dividida em tubos Falcon com 15 mL e outra vez congelada a  $-20 \pm 2$  °C por 12 h. Este procedimento repetiu-se em 3 ciclos, conforme pode ser visualizado na Figura 10.

A concentração de antocianinas presentes em cada fração do extrato (concentrado e gelo descongelado) foram determinadas conforme descrito nos itens (2.2.4.2) e o processo e as medições foram realizados em triplicata.

Figura 10 — Procedimento experimental dos ciclos de crioconcentração do extrato



SA: extrato obtido com soro ácido, EA: extrato obtido com etanol acidificado, AMT: antocianinas monoméricas totais, n: eficiência de concentração.

Fonte: Autor, (2022).

Para cada etapa da concentração foram realizados cálculos de porcentagem de concentrado Pc (%) e eficiência de concentração n (%), de acordo com as Equações 7 e 8.

$$Pc(\%) = \frac{W_i^0 - W_i^f}{W_i^0} * 100 \quad (7)$$

Onde:  $W_i^0$  e  $W_i^f$  são os correspondentes ao peso inicial e final da fração congelada.

$$n(\%) = \frac{c_c - c_i}{c_c} * 100 \quad (8)$$

Onde:  $C_c$  e  $C_i$  são as concentrações de antocianinas monoméricas totais na solução concentrada e na fração gelo, respectivamente.

Para realizar essa validação dos resultados experimentais obtidos, realizou um balanço de massa de cada ciclo de crioconcentração. Esses valores foram obtidos utilizando as equações 9 e 10.

$$W_e = \frac{m_{\text{gelo}}}{m_{\text{inicial}}} \quad (9)$$

$$W_p = \frac{C_c - C_0}{C_c - C_f} \quad (10)$$

Onde:  $C_0$  é a concentração inicial de sólidos;  $C_f$  é concentração final de sólidos;  $W_e$  valor experimental e  $W_p$  é o valor previsto. A qualidade do ajuste entre os valores experimentais ( $W_e$ ) e previsto ( $W_p$ ) para  $N$  pontos experimentais de cada ciclo de crioconcentração foi testada pela raiz quadrada média (RMS) da seguinte forma Equação 11:

$$\text{RMS (\%)} = 100 \sqrt{\frac{\sum [(W_e - W_p) / W_e]^2}{N}} \quad (11)$$

### 3.2.3 Microencapsulação dos extratos ricos antocianinas

A microencapsulação dos extratos de antocianinas concentrados, foi realizado conforme descrito por Estupiñan, Schwartz e Garzón, (2011), empregando como agente encapsulante a maltodextrina com grau de dextrose equivalente DE:20 utilizando uma relação de 3g de maltodextrina para 100 mL de extrato de antocianina na concentração de (20 mg C3G.g<sup>-1</sup>).

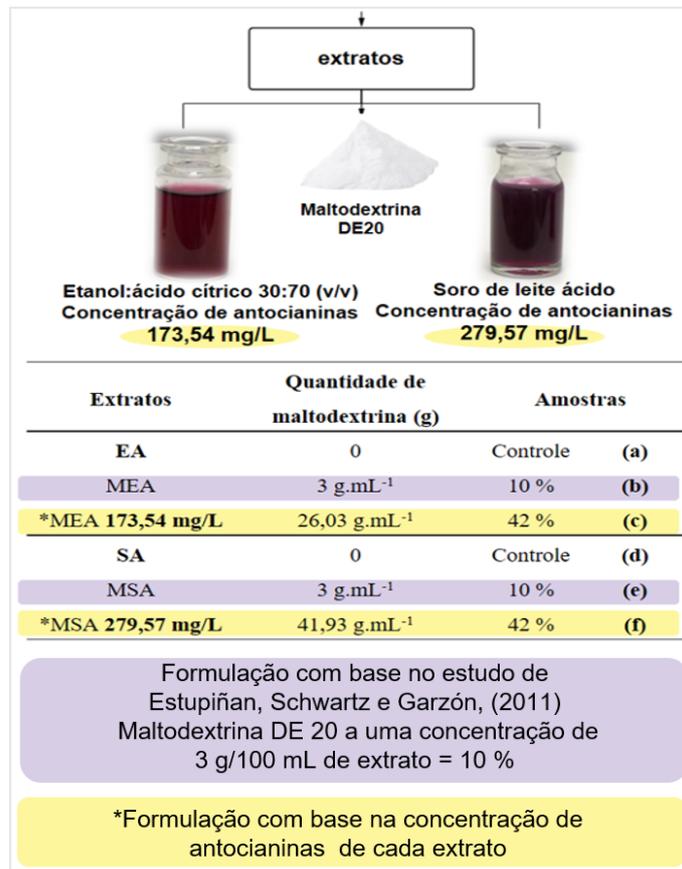
Com base no estudo mencionado acima a relação utilizada de maltodextrina foi calculada e definida com base na concentração de antocianina presente em cada um dos extratos (EA e SA). A concentração de antocianinas foi determinada conforme o item (2.2.4.2). Tendo referência o teor de antocianinas dos extratos, foram testadas duas concentrações de maltodextrina, apresentadas na Figura 11.

A maltodextrina foi dissolvida aos extratos concentrados, durante 30 minutos sob agitação constante em temperatura ambiente e posteriormente encaminhados diretamente para a liofilização (Liotop L 101, São Carlos, Brasil).

Após a liofilização os extratos em pó foram armazenados sob o abrigo de luz e mantidos em dessecador até a execução das análises. Uma amostra controle foi preparada

utilizando o mesmo procedimento descrito acima, porém sem a adição da maltodextrina DE:20.

Figura 11 — Concentração de maltodextrina utilizada



(a) EA: extrato obtido com etanol acidificado, (b) MEA: microcápsula com 10% maltodextrina (extrato obtido com etanol acidificado), (c) \*MEA: microcápsula com 42% maltodextrina (extrato obtido com etanol acidificado), (d) SA: extrato obtido com soro ácido, (e): MSA microcápsula com 10% maltodextrina (extrato obtido com soro ácido) e (f) \*MSA: microcápsula com 42% maltodextrina (extrato obtido com soro ácido).

Fonte: Autor, (2022).

### 3.2.4 Caracterização dos extratos em pó

#### 3.2.4.1 Determinação das propriedades da cor

Os pós desenvolvidos, foram fotografados com uma câmera fotográfica colorida com resolução de 4496 × 3000 pixels projetada em uma cabine de fundo claro equipada com luzes branca (Padrão de Iluminação D65). As imagens digitais foram tratadas utilizando o Software ImageJ (Instituto Nacional de Saúde, Bethesda, MD, EUA), sendo convertidas do espaço de cor representado pelos valores R, G e B para a escala CIE L\*

$a^*$   $b^*$ . Esse método é representado pelo sistema de coordenadas retangulares, onde o  $L^*$  (luminosidade) varia do preto (0) ao branco (100); a coordenada cromática  $a^*$  é definida como a transição do verde ( $- a^*$ ) para o vermelho ( $+ a^*$ ) e a coordenada  $b^*$ , representa a intensidade do azul ( $- b^*$ ) para o amarelo ( $+ b^*$ ). Os valores  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  das amostras foram medidos e cromaticidade ( $C^*$ ) e o ângulo de matiz ( $h^\circ$ ) foram calculados através das equações 12 e 13.

$$h^\circ = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (12)$$

$$C^* = \sqrt{(\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (13)$$

#### 3.2.4.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise por MEV (JEOL JSM 6390 L V, Musashino, Akishima, Japão), foi realizada no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil), com o aparelho operado a 5 kV, com ampliação até 300x. Antes da digitalização, um revestimento por pulverização das amostras foi completado com uma fina camada de ouro.

#### 3.2.4.3 Microscopia Confocal de Varredura a Laser

A Microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) foi utilizada para avaliar a distribuição da antocianina nos componentes da matriz. As amostras foram examinadas por MCVL (Leica TCS SP5, Alemanha). Imagens de 8 bits usando quatro detectores de sinais fluorescentes e um detector de transmissão de imagens de campo claro foram coletadas em objetiva de 20x (HCX PL APO CS 1,40 OIL UV) e uma banda de emissão em 606 nm quando excitado em 543 nm. O Software Leica Application Suite (LAS AF) foi utilizado para controlar a fluorescência do microscópio e posterior análise das imagens. O software ImageJ foi utilizado para edição e adição das escalas.

### 3.2.5 Análises estatísticas

A análise estatística para esta etapa do processo elucidada no capítulo III, foram realizadas seguindo a seção 2.2.7.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1 Crioconcentração dos extratos de antocianinas

Os extratos de antocianinas das folhas residuais de repolho roxo obtidos por PLE através das extrações empregando os solventes etanol acidificado com ácido cítrico (EA) e soro ácido (SA), foram submetidos ao método de crioconcentração. A crioconcentração é uma técnica promissora para concentração de compostos valiosos e apresenta como principais vantagens, a preservação das características funcionais e nutricionais dos extratos, reduzindo custos de transporte e armazenamento (GALAVERNA et al., 2008).

A eficiência ( $\eta$ ) alcançada pelo processo de crioconcentração assistida por centrifugação foi satisfatória nas primeiras etapas de crioconcentração. A porcentagem de concentrado (PC) aumentou progressivamente a cada ciclo de crioconcentração (Tabela 11).

A melhor eficiência de concentração atribuída ao extrato obtido por soro ácido (SA) pode estar associada a característica deste solvente. O soro ácido possui em sua composição majoritariamente água, assim como alto teor de sólidos. Moléculas, como sais, açúcares, ácidos orgânicos entre outros solutos, influenciam diretamente no aumento da concentração, beneficiando o congelamento (DE LIZ et al., 2020). No entanto, é possível verificar que a eficiência de concentração dos extratos é reduzida na tentativa de promover um terceiro ciclo (32,2 % EA e 2,9 % SA). Segundo Petzold et al., (2015) quanto maior a concentração de solutos no concentrado, maior será a viscosidade o que dificulta remover somente a água nas próximas etapas.

Os valores de RMS (5,48 e 5,38 %) encontrados no segundo ciclo de crioconcentração, foram próximos ao estudo realizado por Petzold et al., (2016), que investigaram a crioconcentração assistida a vácuo aplicada ao vinho, tendo bons ajustes para os valores RMS os quais oscilaram entre (6,8 a 9,5 %) respectivamente.

Em contrapartida os extratos submetidos a um terceiro ciclo de crioconcentração além de apresentarem baixa eficiência de concentração, foram considerados carregados com um erro muito grande para serem aceitos. De acordo com o estudo de

Lewicki, (2000) considera-se como um bom ajuste valores de RMS inferiores a 25 %. Comprovando a inviabilidade de realizar um terceiro ciclo.

O processo de crioconcentração desenvolvido sugere um processo simples e de fácil implementação. Além de preservar a qualidade do extrato o produto concentrado obtido pode ser utilizado para enriquecer produtos alimentícios (JASTER et al., 2018).

Uma alternativa para aplicação em alimentos é o uso de extratos concentrados ricos em antocianinas como corantes naturais, tendo potencial para aumentar os níveis de antioxidantes fenólicos, melhorando características sensoriais, bem como, a cor e qualidade nutricional.

Desta forma prosseguiu a pesquisa realizando a **microencapsulação** com os extratos concentrados apenas com dois ciclos.

Tabela 11 — Ciclos da crioconcentração e parâmetros calculados

Tipo de Extrato	ciclos da criocon.	AMT concentrado (mg/L)	AMT Gelo (mg/L)	Pc %	$\eta$ %	We (g/g)	Wp (g/g)	RMS %
EA	Extrato	141,02±1,7 <sup>g</sup>	-	-	-	-	-	-
	I	161,79±3,5 <sup>e</sup>	70,80±2,0 <sup>e</sup>	27,83	56,24	0,25	0,23	4,01
	II	173,54±2,1 <sup>d</sup>	93,33±3,2 <sup>c</sup>	45,39	47,15	0,27	0,40	5,38
	III	152,22±6,6 <sup>f</sup>	103,26±0,1 <sup>b</sup>	44,80	32,23	0,39	0,23	26,88
SA	Extrato	198,01±0,3 <sup>c</sup>	-	-	-	-	-	-
	I	285,87±1,4 <sup>a</sup>	40,62±0,3 <sup>f</sup>	46,23	85,79	0,41	0,38	5,01
	II	279,57±0,4 <sup>b</sup>	91,29±0,5 <sup>d</sup>	69,91	67,45	0,35	0,46	5,48
	III	173,87±4,5 <sup>d</sup>	168,81±0,9 <sup>a</sup>	49,32	2,91	0,46	4,56	146,87

Valores expressos por meio de média  $\pm$  desvio padrão (ANOVA seguido pelo teste Tukey, letras iguais significam não haver diferença significativa ( $p < 0,05$ ).; AMTconcentrado.: concentração de antocianinas monoméricas totais no extrato concentrado, AMTgelo: concentração de antocianinas monoméricas totais na fração de gelo, Pc: Porcentagem da concentração de extrato,  $\eta$ : Eficiência de concentração, We: valor experimental, Wp: valor previsto e RSM: raiz quadrada média.

Fonte: Autor, (2022).

### 3.3.2 Microencapsulação dos extratos ricos antocianinas

A microencapsulação é uma técnica utilizada para revestir o material do núcleo com uma membrana, protegendo-a contra fatores extrínsecos. Sakulnarmrat, Wongsrikaew e Konczak (2021), ressaltam que a microencapsulação de compostos naturais, além de promover a proteção aos extratos contra a oxidação, permite maior eficiência na solubilização, favorece a incorporação em sistemas alimentícios e promove maior durabilidade.

Depois da crioconcentração a microencapsulação dos extratos foi desenvolvida (Figura 12). As antocianinas em pós, microencapsuladas ou não, visualmente apresentaram boa aparência e homogeneidade na coloração. É possível observar uma maior intensidade desse pigmento para os extratos naturais (controle) do que as microencapsuladas com maltodextrina. Embora tenha sido observado essa redução na pigmentação após a microencapsulação. É importante ressaltar que a incorporação da maltodextrina têm sido amplamente utilizadas como agente encapsulante e apresenta propriedades de interesse para a aplicação industrial como: alta solubilidade em água, baixa viscosidade e baixo teor de açúcar, sendo corriqueiramente utilizada como ingrediente na indústria alimentícia (BALLESTEROS et al., 2017).

Sakulnarmrat, Wongsrikaew e Konczak, (2021), encapsularam o extrato rico em antocianinas de repolho roxo empregando maltodextrina de dextrose equivalente (DE:20) e goma arábica e evidenciaram que a eficiência de encapsulamento (98,85 %) foi superior para a maltodextrina. Souza, Gurak e Marczak, (2017), avaliaram o comportamento de maltodextrina, pectina e isolado de proteína de soja como carreadores na encapsulação de extrato rico em antocianinas de bagaço de jabuticaba obtido por liofilização identificaram que a maltodextrina foi o melhor agente carreador na proteção das antocianinas com tempo de meia-vida de 226 dias e maior solubilidade. Estupiñan, Schwartz e Garzón, (2011), concluíram que a adição de maltodextrina (DE:20) como agente carreador durante a liofilização de antocianinas atribui melhor estabilidade de cor de bebidas modelo isotônicas coloridas com Andes Berry, apresentando tempo de meia-vida 32 dias.

Figura 12 — Concentrações testadas para a microencapsulação

Extrato sem microencapsular	Concentração de maltodextrina (%)	
	controle	10 %
(a)	(b)	(c)
(d)	(e)	(f)

(a) EA: extrato obtido com etanol acidificado, (b) MEA: microcápsula 10% maltodextrina (extrato obtido com etanol acidificado), (c) \*MEA: microcápsula 42% maltodextrina (extrato obtido com etanol acidificado), (d) SA extrato obtido com soro ácido, (e) MSA: microcápsula 10% maltodextrina (extrato obtido com soro ácido) e (f) \*MSA: microcápsula 42% maltodextrina (extrato obtido com soro ácido).

Fonte: Autor, (2022).

### 3.3.3 Determinação dos parâmetros de cor

A caracterização da cor e seus respectivos parâmetros foram calculados e caracterizado por colorimetria e estão apresentados na Tabela 12. Classificados de acordo com o solvente de extração sendo: sendo analisado as extrações com o solvente etanol acidificado amostras {(a) (b) e (c)} e soro de leite ácido as mostras {(d), (e) e (f)}.

Os extratos obtidos pelo soro ácido, foram comparados aos óbitos pela mistura do etanol acidificado com ácido cítrico e apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). De modo geral conforme o agente encapsulante foi incorporado pode-se observar um aumento no parâmetro de luminosidade ( $L^*$ ) para ambos os extratos.

O mesmo efeito foi observado por Machado et al., (2022), indicando que a luminosidade é influenciada pela razão utilizada do agente encapsulante e pela sua cor inicial. Sendo o aumento desse parâmetro, decorrente da característica da própria maltodextrina, a qual, apresenta conformação de um pó de cor branco.

Os valores obtidos com relação aos parâmetros referentes ao espectro de cores, apresenta para  $a^*$ , componente de cor que varia de verde (negativo) a vermelho (positivo), esses resultados (Tabela 12), sugerem que ambos os extratos possuem tendência à coloração vermelha em especial as amostras (a), (b) e (c), as quais, apresentaram maiores valores para este parâmetro. Resultado este que já se era esperado, uma vez que estes extratos foram obtidos pela mistura do solvente etanol e ácido cítrico.

Conforme sugerido por Patras, (2019), os extratos obtidos com ácidos orgânicos possuem o pH mais baixo e exibem uma cor avermelhada, pois contêm concentrações aumentadas de cátion flavílio. Ainda segundo esse mesmo autor as antocianinas exibem-se em diferentes estruturas conforme o pH e, conseqüentemente, exibem cores diferentes. As principais formas são: cátion flavílio (vermelho), pseudobase carbinol (incolor), base quinonoidal (violeta), base quinonoidal aniônica (azul) e chalcona (incolor).

Quanto ao parâmetro  $b^*$ , que está relacionado à variação do amarelo (positivo) ao azul (negativo), observou-se que ambos os extratos tentem ao azul, uma vez que apresentaram valores negativos para este parâmetro. Sendo mais acentuado para as amostras (d), (e) e (f), provenientes da extração com o soro de leite ácido.

Como já mencionado, a coloração das antocianinas pode variar conforme o pH do extrato, embora o soro seja ácido pH (4,5), a acidez da mistura de etanol com ácido cítrico se sobressai, apresentando pH em torno de (1,5). O que explica essa variação na expressão de cores. A exemplo disso, a combinação entre as cores azul e vermelho expressa tons de roxo. Conforme relatado por Neves, Silva e Meireles, (2021) a cor roxa é considerada na gama de tons entre azul e vermelho (como antocianinas e espirulina) e não é tradicionalmente definido no espectro de luz visível.

Ainda, em pH 1-3, o cátion flavílio é predominante; em pH 3-4 e 4-5 há misturas de 4 formas: pseudobase carbinol, cátion flavilium, chalcona, base quinonoidal em diferentes proporções; em pH 5-6, mistura de 3 formas: base quinoidal, pseudobase carbinol e chalcona; em pH 6-7, a base quinoidal é predominante; a pH > 7, as antocianinas são degradadas (PATRAS, 2019).

A cromaticidade ( $C^*$ ) indica a intensidade da cor dos produtos, portanto nesse quesito, os extratos naturais amostras (a) e (d), corresponderam à maior concentração de cor, com predominância de cor intensa. Os estudos de Mojica, Berhow e Gonzalez de Mejia (2017) e Benvenuti, Zielinski e Ferreira, (2022), evidenciaram que a maior concentração de antocianinas, de amostras ricas em antocianinas foram responsáveis pelo aumento do parâmetro  $C^*$ , bem como os parâmetros  $a^*$  e  $b^*$ .

Por ângulo de matiz ( $h^\circ$ ), o maior  $h^\circ$ , e menor  $C^*$  as amostras permaneceram indicadas na tonalidade roxa tendo redução dessa intensidade, conforme a adição da maltodextrina e corroboram com o relatado por De Souza (2015), indicando que a cor do extrato encapsulado influenciará e predominará na partícula, neste caso apresentando as tonalidades roxas. Desse modo, podem às microcápsulas, representar uma potencial utilização como um corante natural na indústria alimentícia.

Tabela 12 — Parâmetros de cor dos extratos de repolho roxo microencapsulados

Tipo de extrato	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$h^\circ$	$C^*$
 (a)	17,13±0,17 <sup>d</sup>	28,99±0,11 <sup>a</sup>	-19,93±0,19 <sup>e</sup>	322,89±0,37 <sup>c</sup>	35,20±0,03 <sup>a</sup>
 (b)	36,88±0,16 <sup>c</sup>	20,37±0,05 <sup>c</sup>	-10,05±0,03 <sup>a</sup>	328,55±0,55 <sup>b</sup>	22,72±0,49 <sup>d</sup>
 (c)	63,85±0,35 <sup>a</sup>	12,65±0,08 <sup>d</sup>	-14,15±0,22 <sup>c</sup>	334,38±0,14 <sup>a</sup>	19,00±0,10 <sup>e</sup>
 (d)	5,37±0,04 <sup>f</sup>	20,26±0,08 <sup>c</sup>	-24,82±0,23 <sup>f</sup>	308,83±0,41 <sup>e</sup>	32,04±0,23 <sup>b</sup>
 (e)	11,80±0,31 <sup>e</sup>	21,53±0,26 <sup>b</sup>	-18,38±0,21 <sup>d</sup>	319,49±0,60 <sup>d</sup>	28,39±0,15 <sup>c</sup>
 (f)	63,40±0,26 <sup>b</sup>	10,71±0,10 <sup>e</sup>	-13,30±0,08 <sup>b</sup>	329,59±0,61 <sup>b</sup>	17,02±0,51 <sup>f</sup>

Valores expressos por meio de média ± desvio padrão (ANOVA seguido pelo teste Tukey, letras iguais significam não haver diferença significativa ( $p < 0,05$ ). (a) EA: extrato obtido com etanol acidificado, (b) MEA: microcápsula 10% maltodextrina (extrato obtido com etanol acidificado), (c) \*MEA: microcápsula 42% maltodextrina (extrato obtido com etanol acidificado), (d) SA extrato obtido com soro ácido, (e) MSA: microcápsula 10% maltodextrina (extrato obtido com soro ácido) e (f) \*MSA: microcápsula 42% maltodextrina (extrato obtido com soro ácido),  $L^*$ : luminosidade,  $a^*$ : componente de cor verde/vermelho,  $b^*$ : componente de cor azul/amarelo,  $C^*$ : cromaticidade e  $h^\circ$ : ângulo de matriz.

Fonte: Autor, (2022).

### 3.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Através da análise de microscópica eletrônica de varredura (MEV) foi possível verificar que a morfologia das antocianinas microencapsuladas em maltodextrina por liofilização (Figura 13).

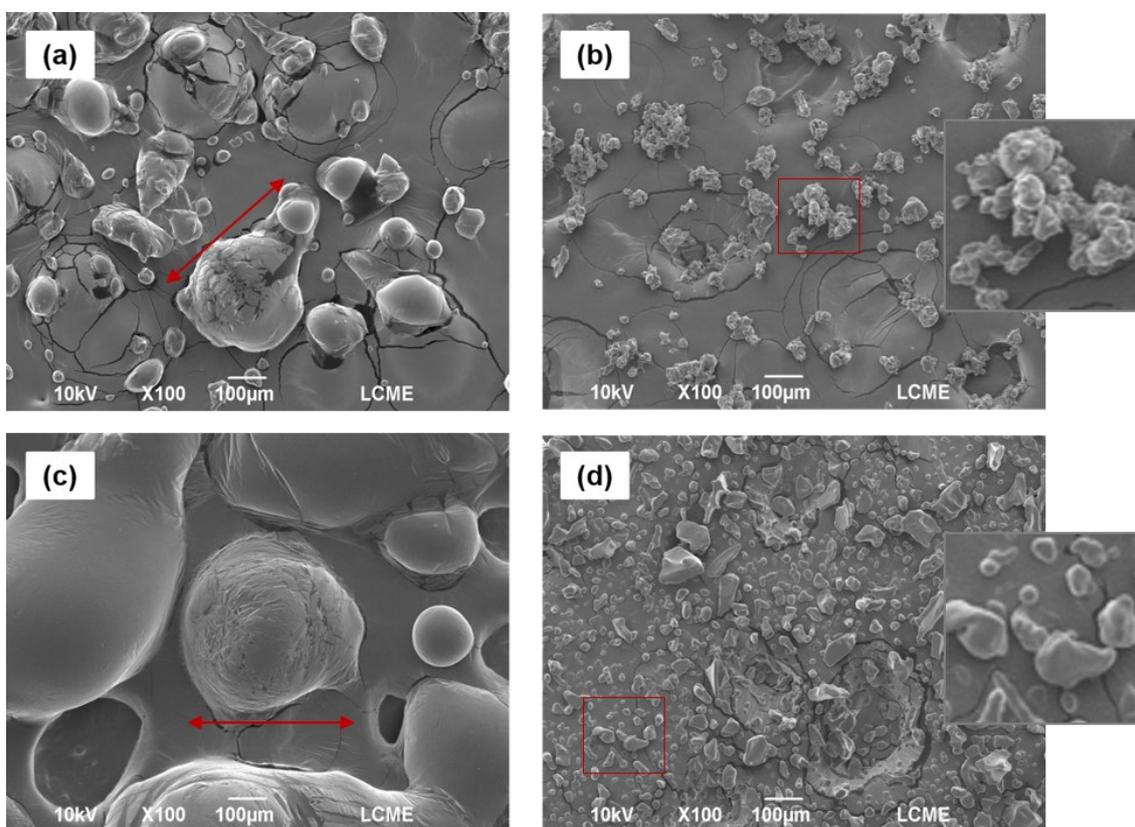
De modo geral, as partículas apresentaram formas irregulares, caracterizadas pela presença dos aglomerados e superfície lisa e enrugadas. Nota-se que ao passo que se aumentou a concentração de maltodextrina de 10 % Figura 13 (A e C), para 42 % Figura 13 (B e D), houve a formação de aglomerados com proporções reduzidas.

As microcápsulas podem apresentar diferentes tamanhos e formas, de acordo com o material de revestimento escolhido e as condições de processamento.

Celli et al., (2016) explica que a presença de micropartículas com morfologia não esférica pode ocorrer em processos de secagem a baixa temperatura e as depressões que aparecem na superfície das micropartículas são formadas devido ao encolhimento durante a secagem e resfriamento. Ainda, o formato das partículas, pode influenciar as propriedades de armazenamento, manuseio, transporte e retenção de bioativos (JANISZEWSKA-TURAK et al., 2017). Segundo Machado et al., (2022), as presenças de elevados teores de sólidos podem ocasionar no aumento da aderência entre as partículas e a presença de um carreador polissacarídeo pode atuar como plastificante para reduzir o encolhimento irregular do pó do extrato durante o processo de secagem (XU et al., 2018).

Neste estudo, a morfologia dos pós liofilizados foi semelhante à observada para pós liofilizados de antocianinas de mirtilos lowbush (CELLI et al., 2016) e bagaço de jabuticaba (SOUZA, GURAK e MARCZAK, 2017).

Figura 13 — Micrografia dos extratos em pó microencapsulados por liofilização



(a) MEA: microcápsula 10% maltodextrina (extrato obtido com etanol acidificado), (b) \*MEA: microcápsula 42% maltodextrina (extrato obtido com etanol acidificado), (c) MSA: microcápsula 10% maltodextrina (extrato obtido com soro ácido) e (d) \*MSA: microcápsula 42% maltodextrina (extrato obtido com soro ácido).

Fonte: Autor, (2022).

### 3.3.5 Microscopia de Fluorescência

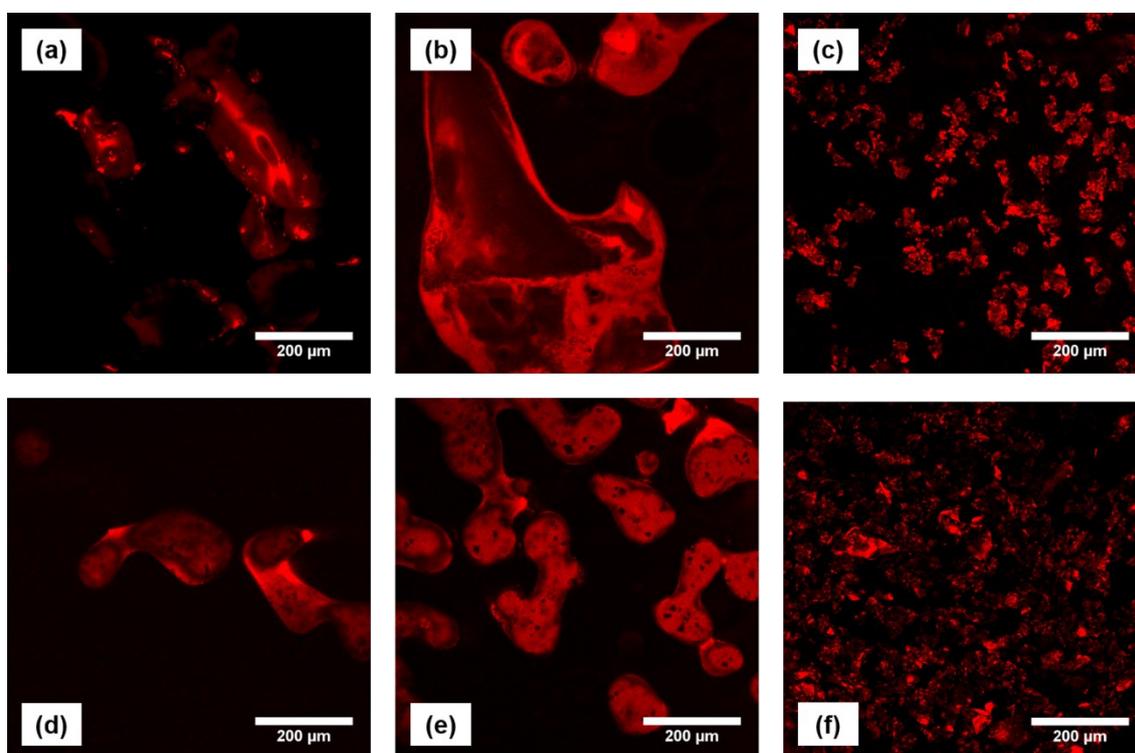
A microscopia de fluorescência permite verificar a localização de compostos que apresentem fluorescência permitindo avaliar o processo de microencapsulação (DRABENT, PLISZKA e OLSZEWSKA, 1999). Os extratos de antocianinas da casca de repolho roxo apresentaram capacidade de autofluorescência atribuída aos compostos fenólicos, em especial para as antocianinas revelando fluorescências no comprimento de onda de (543 nm), conforme demonstra na Figura 14 (a) e (b), referente ao pó do extrato puro (sem maltodextrina).

As antocianinas indicaram distribuição em toda a estrutura da partícula, confirmando a aderência e o microencapsulamento desses pigmentos e a medida em que

o agente encapsulante foi incorporado ao extrato. As amostras apresentaram diferenças consideráveis no tamanho das partículas, Figura 14 (c) e (f). Além disso, as imagens obtidas por microscopia confocal podem ser correlacionadas com a estruturas morfológicas obtidas por microscopia eletrônica de varredura (Figura 13).

A capacidade de autofluorescência exibida pelas antocianinas microencapsuladas no comprimento de onda de excitação máximo fixado em 543 nm, também foi observado por Liao et al., (2021) estudando o comportamento de liberação de antocianinas de mirtilo encapsuladas por caseína micelar e proteína de soro de leite no processo de digestão *in vitro* e Da Silva et al., (2016) analisando micropartículas secas por pulverização contendo antocianinas de extrato de jussara.

Figura 14 — Micrografias de Fluorescência dos extratos em pó



(a) EA: extrato obtido com etanol acidificado, (b) MEA: microcápsula 10% maltodextrina (extrato obtido com etanol acidificado), (c) \*MEA: microcápsula 42% maltodextrina (extrato obtido com etanol acidificado), (d) SA extrato obtido com soro ácido, (e) MSA: microcápsula 10% maltodextrina (extrato obtido com soro ácido) e (f) \*MSA: microcápsula 42% maltodextrina (extrato obtido com soro ácido).

Fonte: Autor, (2022).

### 3.4 CONCLUSÃO

O método proposto de concentração do extrato via congelamento assistido por centrifugação foi suficiente para preservar os níveis de antocianinas do extrato de casca de repolho roxo, sendo um método simples e de baixo custo para concentração do extrato, que pode ser facilmente implementado, permitindo o uso desta tecnologia em aplicações promissoras. Quanto a microencapsulação, os pós desenvolvidos apresentaram o composto de antocianinas aderidos a sua estrutura e excelentes espectros de pigmentação indicando tons lilás e roxos e intensidade no parâmetro cromaticidade (C\*).

Os extratos de antocianina de folhas de repolho roxo microencapsulados podem ser um excelente corante natural para complementar e enriquecer alimentos a fim de melhorar as propriedades sensoriais e nutricionais.

Desta forma, optou-se em prosseguir a pesquisa estudando a **estabilidade e aplicação** dos extratos como um corante natural, utilizando as amostras que indicaram maior pigmentação sendo elas o grupo controle (a) e (d) (sem adição de maltodextrina) e as amostras (b) e (e), com concentração intermediária de agente encapsulante 10 % de ambos os extratos EA e SA.

## **CAPITULO 4**

### **Antocianinas da Casca do Repolho Roxo em pó: Estudo da Estabilidade e seu uso como Corante Natural**

## 4.1 INTRODUÇÃO

Com a prática de hábitos alimentares mais saudáveis, aumenta-se o consumo e a demanda por produtos desenvolvidos pela adição de corantes naturais em substituição aos sintéticos, assim como também, o crescente interesse em alimentos de rótulo limpo “*clean label*” (HESSEL et al., 2022). Os alimentos de rótulo limpo têm sido preferidos pelos consumidores em virtude de os ingredientes do produto estarem claramente indicados na embalagem, mas se estes não estiverem disponíveis, os consumidores escolherão alimentos contendo aditivos naturais em detrimento dos artificiais (BACKES et al., 2020). Dentre as indústrias alimentícias o setor de produtos de confeitaria possui uma ampla variedade de produtos dos quais muitos requerem o emprego de corantes. Esses produtos atraem a atenção de consumidores, devido à sua textura, aparência, coloração e sabores únicos. No entanto, paralelamente às mudanças nas tendências e preferências dos consumidores, há uma demanda significativa por produtos com conteúdo mais natural, isentos de componentes sintéticos, com menos calorias e ingredientes ativos para a saúde (GUNES et al., 2022).

Os corantes alimentícios naturais, são de interesse crescente, pois além da pigmentação podem apresentar efeitos positivos adicionais em suas propriedades (RÓŻYŁO, 2020), devido as antocianinas indicarem uma ampla gama de cores, esses compostos têm sido tradicionalmente usados como corantes alimentícios. Entretanto, a cor e a estabilidade desses pigmentos são influenciadas principalmente por efeitos do pH, luz e temperatura (LIU et al., 2021).

O repolho roxo é uma fonte promissora de antocianinas para coloração de alimentos, pois suas antocianinas são únicas em serem coloridas em uma faixa de pH muito ampla, não se limitando apenas a alimentos ácidos, como também pode ser estendido a produtos neutros (pH 1-8) (ZHAO et al., 2017).

Desta forma, podem fornecer uma alternativa natural aos corantes sintéticos. Sendo necessário investigar os efeitos da aplicação desses pigmentos em produtos alimentícios, bem como, suas características físico-químicas como o estudo da estabilidade em diferentes meios e temperaturas. Portanto, este capítulo, teve como objetivo avaliar a **estabilidade** das antocianinas em pós, além de verificar a sua **aplicabilidade** em sistema alimentício modelo do tipo marshmallow.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo da estabilidade, desenvolvimento do produto e a caracterização, foram desenvolvidas no Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica (LATESC), da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Campus de Florianópolis.

### 4.2.1 Estabilidade dos extratos bioativos

O estudo da estabilidade do pigmento de antocianinas foi realizado investigando o efeito do pH do meio e temperatura, sendo avaliado de acordo com os métodos de Pedro et al., (2016), com modificações. Para a realização de ambas as análises, os extratos de antocianinas em pó (controle) e (microencapsulado), foram diluídos em solução tampão de citrato de sódio (pH 3,5) e em solução tampão de fosfato (pH 5,5) na concentração de (0,6 e 1 g.mL<sup>-1</sup>), respectivamente. Desta forma foi possível verificar a estabilidade das antocianinas em diferentes meios (pH 3,5) e no (pH 5,5) correspondente ao do produto escolhido para aplicação do extrato (marshmallow).

### 4.2.2 Avaliação do efeito do pH e da temperatura a

Para avaliar o efeito do pH e temperatura na estabilidade dos extratos 2 mL da solução aquosa de antocianinas (0,6 e 1 mg.mL<sup>-1</sup>) previamente diluída em solução tampão de citrato de sódio (pH 3,5), foi transferidas para tubos de ensaio. Os tubos foram fechados e submetidos ao aquecimento em banho termostático sob diferentes temperaturas (60, 80 e 100 °C) nos tempos (0, 15, 30, 45, 75, 115, 175 e 235 min).

Dado os respectivos tempos, as amostras foram removidas do banho termostático e resfriadas em banho de gelo até atingir temperatura ambiente. Para cada temperatura, então foi realizada a quantificação de antocianinas monoméricas totais conforme descrito no item (2.2.4.2). Repetiu-se o mesmo procedimento com as amostras diluídas em solução tampão de fosfato (pH 5,5).

As análises foram feitas em triplicata e, a partir desses dados, o percentual de retenção de cor (% r), constante da taxa de degradação de antocianinas (k), tempo de meia-vida (t<sup>1/2</sup>) e a energia de ativação (EA) foram calculadas usando as Equações 13, 14, 15 e 16 respectivamente.

$$\%r = \left( \frac{Abs_t}{Abs_0} \right) * 100 \quad (13)$$

$$rt = r_0 * e^{(-kt)} \quad (14)$$

$$t^{\frac{1}{2}} = \ln \frac{2}{k} \quad (15)$$

$$\ln k = \frac{-EA}{RT} + \ln A \quad (16)$$

Onde:  $Abs_t$  é a absorvância no tempo  $t$ ;  $Abs_0$  é a absorvância inicial;  $A$  é o fator de frequência em  $s^{-1}$ ;  $R$  é a constante dos gases ideais ( $8,31447 \text{ J.K}^{-1}\text{mol}^{-1}$ ) e  $T$  é a temperatura absoluta (K).

### 4.2.3 Desenvolvimento do produto e aplicação do extrato

A base do marshmallow foi produzida a partir dos ingredientes apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 — Formulação desenvolvida para o confeito marshmallow

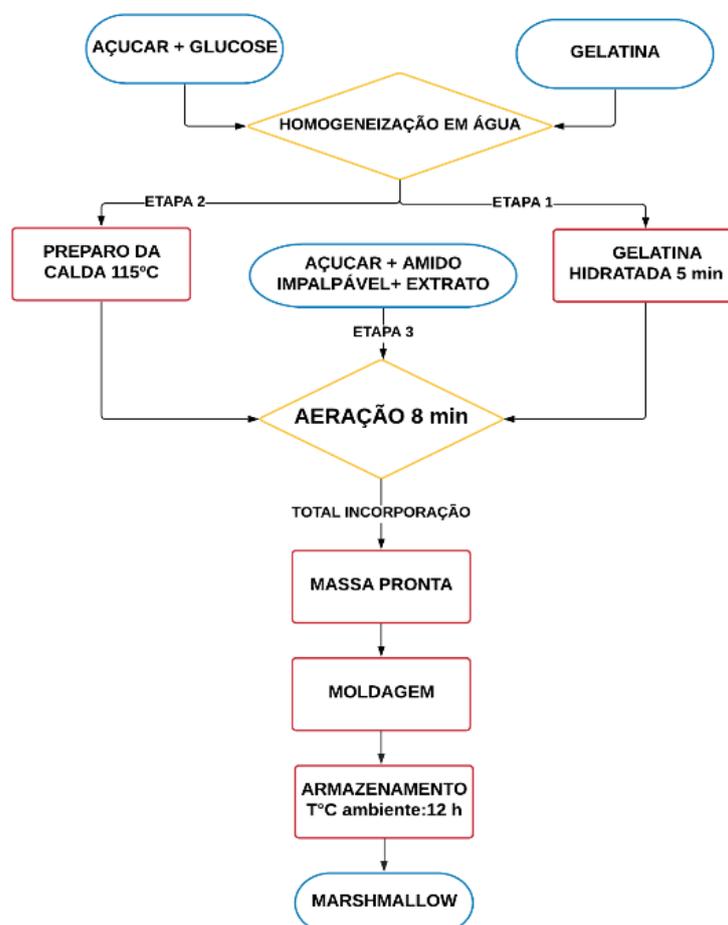
Ingredientes	Quantidade
Açúcar	173 g
Açúcar impalpável	43 g
Amido de milho	26,6 g
Glucose de milho	26,6 g
Gelatina incolor sem sabor	10,6 g
Água	44 mL
Extrato em pó de antocianina	4 g

Fonte: Autor, (2022).

Com a base pronta, foram preparadas três diferentes formulações de marshmallow: i) amostra (A) controle (sem adição de corante); ii) amostra (B) adicionada com o extrato microencapsulado (MSA10: microcápsula com 10% maltodextrina (extrato obtido com soro ácido)) e; iii) amostra (C) feita com o extrato sem microencapsular (SA: extrato obtido com soro ácido). A escolha do extrato foi feita através dos resultados obtidos no estudo da estabilidade, para essa aplicação foram escolhidos os extratos que apresentaram maior estabilidade.

Para o preparo do confeito seguiu-se o fluxograma de processo apresentado na Figura 15.

Figura 15 — Fluxograma de processo do confeito marshmallow



Fonte: Autor, (2022).

Conforme indicado no fluxograma as etapas 1, 2 e 3, correspondem a ordem de adição dos ingredientes. Os quais serão incorporados juntamente e submetidos a aeração em velocidade máxima da batedeira por 8 minutos. Os extratos em pó foram dissolvidos em uma fração de água de aproximadamente 5 mL e solubilizados à temperatura ambiente, em seguida acrescido a formulação com os demais ingredientes.

Após a aeração a massa do marshmallow foi transferida para um recipiente, permanecendo em repouso por 12 horas em temperatura ambiente. Após esse período a massa foi submetida ao corte em cubos de aproximadamente 3 cm de altura e 2 cm de largura.

#### 4.2.4 Caracterização química e física do marshmallow

A composição química dos marshmallows foram determinadas conforme descrito no Capítulo II, através da quantificação de compostos fenólicos totais (2.2.4.1) e antocianinas monoméricas totais (2.2.4.2).

Para a avaliação da atividade antioxidante dos marshmallows, dois métodos foram empregados sendo: (i) redução do cátion 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS) e (ii) poder de redução do íon férrico (FRAP), conforme o item (2.2.5.2). Para cada amostra de extrato foi calculada a atividade antioxidante pelo percentual de redução e os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  equivalente de trolox (ET) por g de material seco ( $\mu\text{mol ET}/100\text{g}$ ).

Para as análises de compostos fenólicos totais, antocianinas monoméricas totais e atividade antioxidante foi realizado uma extração por aquecimento e agitação com uma solução (etanol: água acidificada com ácido cítrico  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  30:70 (v/v) a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  por 30 minutos.

Os parâmetros de cor das amostras de marshmallow foram realizadas seguindo a secção (3.3.3).

As propriedades de textura das amostras foram determinadas usando um analisador de textura (TAHD plus Texture Analyser, Stable Micro Systems). Para a análise foi utilizada sonda P / 5 (5 mm de diâmetro) e aplicada compressão em 30 % da altura das amostras. As amostras foram condicionadas mantendo-as à temperatura ambiente antes da medição e a textura foi analisado.

As análises estatísticas para estas etapas, foram realizadas seguindo a secção (2.2.7).

## 4.3 RESULTADOS E DISSCUSSÕES

### 4.3.1 Estabilidade das antocianinas com e sem microencapsulação obtidas das folhas de repolho roxo

A estabilidade das antocianinas monoméricas é definida como a incapacidade dos cátions flavílio em se transformar em formas incolores de pseudobases de carbinol e chalconas. A formação da chalcona pode ser considerada o estágio primário para a degradação das antocianinas e são influenciadas por vários fatores, como pH, temperatura, enzimas, luz, oxigênio e ácido ascórbico (GHAREAGHAJLOU, HALLAJ-NEZHADI e GHASEMPOUR, 2021).

Nesse estudo a maior estabilidade térmica das antocianinas em pó das folhas de repolho roxo, foi verificada a 60 °C em meio mais ácido pH 3,5 para todos os tratamentos (Tabelas 14 e 15) e Figura 16.

Pode-se observar que a estabilidade do extrato variou nos diferentes tampões de pH (3,5 e 5,5), a intensidade da acidez de um alimento é expressa pelo seu valor de pH. Devido as formulações e composição diferente das matérias-primas alimentares, o valor de pH dos alimentos tende a ser diferente, portanto, as condições de estabilidade no armazenamento e processamento térmico não são as mesmas.

O pH mais baixo (pH 3,5) em que as antocianinas foram adicionadas (Tabela 14), proporcionou os melhores parâmetros cinéticos, a constante da taxa de degradação de antocianinas ( $k$ ) variou de  $5,31 \times 10^{-3}$  a  $3,48 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ , resultando em um tempo de meia vida  $t(1/2)$  de 106,31 a 1990,31 min e energia de ativação ( $E_a$ ) de 41,887 a 62,638 kJ/mol. Estes valores foram superiores ao meio menos ácido pH 5,5 (Tabela 15) onde os extratos apresentaram maiores  $k$  ( $8,57 \times 10^{-4}$  a  $5,31 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ), menores  $t(1/2)$  (106,28 a 809,17 min) e menores  $E_a$  (37,250 a 40,806 kJ/mol). Segundo Del Pilar Garcia-Mendoza et al., (2017), valores elevados de energia de ativação sugerem que os compostos possuem boa estabilidade em relação à temperatura, pois, quanto maior a energia de ativação, mais lenta será a reação de degradação das antocianinas.

O melhor efeito da estabilidade das antocianinas das folhas de repolho roxo também foi relatado por outros autores. Walkowiak-Tomczak e Czapski (2007), evidenciaram que as antocianinas do repolho roxo demonstraram a maior estabilidade em pH ( $\leq 3,0$ ) e pHs acima

desse valor resultaram em maior degradação das antocianinas. Ekici et al., (2014) comparado o efeito do pH na estabilidade de antocianinas do repolho roxo, observaram maior estabilidade para as amostras em  $\text{pH} \leq 3$ , ainda em soluções de baixo pH, o cátion flavílio formado permite que a antocianina seja altamente solúvel em água, devendo também se atentar ao parâmetro de temperatura do sistema, uma vez que essa variável influencia diretamente na estabilidade das antocianinas.

O aumento da temperatura proporcionou uma maior degradação, com maiores valores para a constante cinética de primeira ordem (k), como consequência acarretou na redução do tempo de meia-vida e na energia de ativação (Ea). Nesse estudo as maiores taxas de degradação foram observadas a 100 °C entre as amostras e dentro da faixa estudada.

As altas temperaturas favorecem as reações de hidrólise, convertendo chalconas (estrutura incolor da antocianina) em precipitados marrons, comumente observados como o produto final da degradação das antocianinas (DEL PILAR GARCIA-MENDOZA et al., 2017). A estrutura chalcona da antocianina é formada pelo aumento da temperatura para 60 °C, resultando em baixa estabilidade e desbotamento da cor das antocianinas (LIU et al., 2018).

Ekici et al., (2014) compararam o efeito da temperatura na estabilidade de antocianinas da casca da uva, cenoura preta e repolho roxo, observaram que o tratamento térmico a 70 °C acarretou em perdas de antocianina a níveis de 11,82, 9,36 e 2,57 %, respectivamente, e correlaciona esta alta estabilidade térmica das antocianinas do repolho roxo sendo atribuída às suas composições aciladas.

A composição das antocianinas do repolho roxo é complexa, devido à glicosilação da antocianidina (cianidina) com dois açúcares diferentes e acilação com vários ácidos aromáticos. O extrato de repolho roxo obtido nesse estudo apresentou predominância de grupos acilados e diacilados, sendo as estruturas dominantes as cianidina-3-O-(feruloil)-soforosídeo-5-O-glicosídeo, seguida da cianidina-3-O-(sinapoil)(sinapoil)-diglucosídeo-5-O-glicosídeo, acilados com ácido sinápico e ácido ferúlico. De acordo com Zhao et al., (2017) as estruturas acil, apresentam maior estabilidade através dos fenômenos de copigmentação intramolecular reduzindo a probabilidade de ataque nucleofílico da água e impedindo a hidrólise do cátion flavílio vermelho para a base carbinol incolor, permitindo a formação de bases quinoídes azuis e roxas. No entanto, apesar da acilação, a estabilidade térmica e de cor das antocianinas depende do pH do meio, temperatura, luz, oxigênio, enzimas e íons metálicos (LIU et al., 2018).

Desta forma, priorizando a conservação destes compostos o uso de polímeros é empregado com intuito de promover a proteção e conseqüentemente aumentar a estabilidade, é interessante notar que os extratos microencapsulados com (10 % de maltodextrina), apresentaram maior energia de ativação em ambos os meios pH 3,5 (61,923 e 62,638  $\text{kJ mol}^{-1}$ ); e pH 5,5 (40,806 e 39,031  $\text{kJ mol}^{-1}$ ) em comparação aos extratos naturais (sem maltodextrina), (47,076 e 51,112  $\text{kJ mol}^{-1}$ ) e (38,475 e 37,250  $\text{kJ mol}^{-1}$ ) analisando os extratos (EA e SA) respectivamente.

Sakulnarmrat, Wongsrikaew e Konczak (2021) relataram que a microencapsulação de extrato por misturas de maltodextrina e goma arábica (20:80) por secagem em tambor, constatou na redução da degradação das antocianinas incorporadas em um alimento modelo, sobremesa tailandesa nativa 'Aluar'. Kulchenko et al., (2017) indicaram que a encapsulação por maltodextrina usando a técnica de liofilização evitou a perda de antocianinas durante mais de 6 meses de armazenamento refrigerado. Ghareaghajlou, Hallaj-Nezhadi e Ghasempour, (2021), promoveram a encapsulação de extrato rico em antocianinas de repolho roxo em sistema nanolipossomal baseado na técnica de liofilização de solução monofásica e relataram que as cápsulas foram mais estáveis a 4°C durante 21 dias de armazenamento.

Outro aspecto relevante foi a comparação entre os extratos EA e SA, sugerindo que além da maltodextrina o solvente também demonstrou efeito protetor ao extrato. Visto que os extratos oriundos da extração com solvente soro de leite ácido (SA) apresentou maior estabilidade ao efeito da temperatura (60, 80 e 100°C) nos diferentes meios (pH 3,5 e 5,5).

Em especial no pH 5,5 (Tabela 15), fica evidente o efeito protetor do solvente soro ácido. Os extratos obtidos com o soro ácido (SA) sem microencapsular demonstraram ser superiores ao (MEA 10 %) correspondente as microcápsulas com 10 % maltodextrina (extrato obtido com etanol acidificado), apresentando tempo de meia vida na faixa de (163,48 a 696,03 min) superiores a faixa encontrada para o MEA10 (130,54 a 587,41 min).

Nesse sentido, pode-se hipotetizar que o soro de leite ácido apresentou um certo efeito protetor ao extrato, possivelmente em decorrência aos seus constituintes como por exemplo as proteínas. Desta forma, optou-se em prosseguir a pesquisa estudando a **aplicação dos extratos** como um corante natural, utilizando os extratos que indicaram maior estabilidade sendo elas o grupo controle SA (sem adição de maltodextrina) e MSA10 (microcápsula 10% maltodextrina) ambos provenientes da extração com solvente soro ácido.

Tabela 14 — Parâmetros cinéticos de estabilidade térmica em pH 3,5

T °C	Parâmetros	EA	MEA 10 %	SA	MSA 10 %
60	k (min <sup>-1</sup> )	1,04×10 <sup>-3</sup>	5,87×10 <sup>-4</sup>	5,88×10 <sup>-4</sup>	3,48×10 <sup>-4</sup>
	R <sup>2</sup>	0,802	0,841	0,837	0,897
	t <sup>1/2</sup> (min)	666,49	1179,85	1179,03	1990,31
	% r	79,80	88,99	82,41	93,35
80	k (min <sup>-1</sup> )	1,90×10 <sup>-3</sup>	1,59x10 <sup>-3</sup>	1,77×10 <sup>-3</sup>	1,36×10 <sup>-3</sup>
	R <sup>2</sup>	0,885	0,979	0,953	0,941
	t <sup>1/2</sup> (min)	364,81	435,94	391,61	509,67
	% r	67,49	69,96	69,36	74,20
100	k (min <sup>-1</sup> )	5,31×10 <sup>-3</sup>	3,97×10 <sup>-3</sup>	4,24×10 <sup>-3</sup>	3,92×10 <sup>-3</sup>
	R <sup>2</sup>	0,962	0,828	0,828	0,948
	t <sup>1/2</sup> (min)	130,54	175,24	163,48	176,82
	% r	33,78	32,22	46,40	40,05
<b>Ea (kJ/mol)</b>		41,877	61,923	51,112	62,638

EA: extrato obtido com etanol acidificado, MEA10: microcápsula com 10% maltodextrina (extrato obtido com etanol acidificado), SA: extrato obtido com soro ácido, MSA10 microcápsula com 10% maltodextrina (extrato obtido com soro ácido), k: constante da taxa de degradação de antocianinas, R<sup>2</sup>: coeficiente de regressão, t<sup>1/2</sup>: tempo de meia-vida, r: percentual de retenção de cor e Ea: energia de ativação.

Fonte: Autora, (2022).

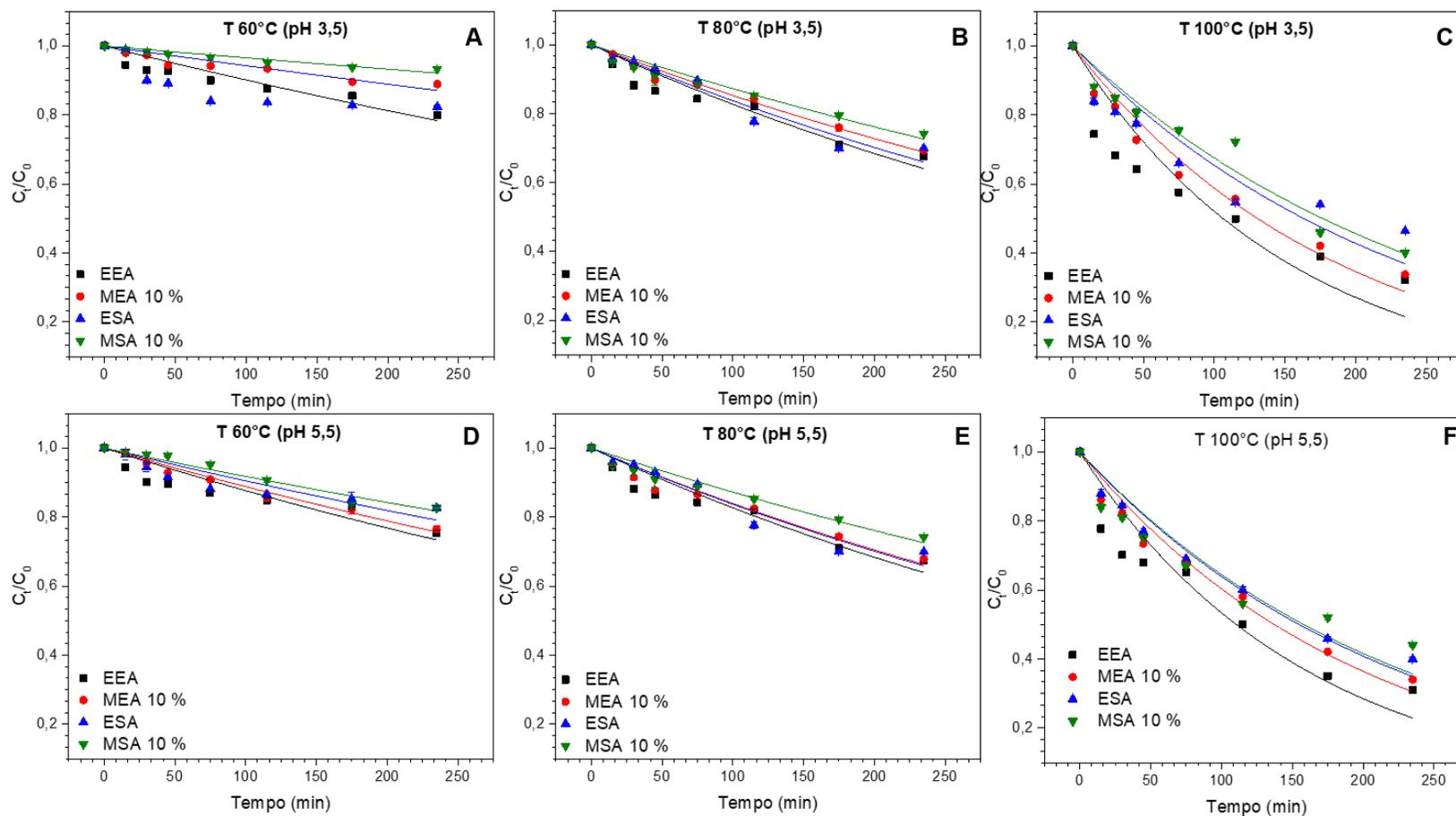
Tabela 15 — Parâmetros cinéticos de estabilidade térmica em pH 5,5

T °C	Parâmetros	EA	MEA 10%	SA	MSA 10%
60	k (min <sup>-1</sup> )	1,32x10 <sup>-3</sup>	1,18x10 <sup>-3</sup>	9,96x10 <sup>-4</sup>	8,57x10 <sup>-4</sup>
	R <sup>2</sup>	0,742	0,976	0,759	0,963
	t <sup>1/2</sup> (min)	525,11	587,41	696,03	809,17
	% r	84,21	84,79	79,23	79,69
80	k (min <sup>-1</sup> )	1,90x10 <sup>-3</sup>	1,75x10 <sup>-3</sup>	1,77x10 <sup>-3</sup>	1,36x10 <sup>-3</sup>
	R <sup>2</sup>	0,886	0,946	0,952	0,940
	t <sup>1/2</sup> (min)	364,81	396,08	391,61	509,67
	% r	67,50	67,93	74,20	69,97
100	k (min <sup>-1</sup> )	6,52x10 <sup>-3</sup>	5,31x10 <sup>-3</sup>	4,243x10 <sup>-3</sup>	3,93x10 <sup>-3</sup>
	R <sup>2</sup>	0,769	0,961	0,945	0,829
	t <sup>1/2</sup> (min)	106,28	130,54	163,48	176,37
	% r	32,19	33,72	39,94	46,35
<b>Ea (kJ/mol)</b>		38,475	40,806	37,250	39,031

EA: extrato obtido com etanol acidificado; MEA: microcápsula com 10% maltodextrina (extrato obtido com etanol acidificado), SA: extrato obtido com soro ácido, MSA: microcápsula com 10% maltodextrina (extrato obtido com soro ácido), k: constante da taxa de degradação de antocianinas, R<sup>2</sup>: coeficiente de regressão, t<sup>1/2</sup>: tempo de meia-vida, r: percentual de retenção de cor e Ea: energia de ativação.

Fonte: Autora, (2022).

Figura 16 — Estabilidade térmica das antocianinas em pH 3,5 (A, B e C) e em pH 5,5 (D, E e F)



EA: extrato obtido com etanol acidificado; MEA: microcápsula com 10% maltodextrina (extrato obtido com etanol acidificado), SA: extrato obtido com soro ácido, MSA: microcápsula com 10% maltodextrina (extrato obtido com soro ácido). Fonte: Autor, (2022).

### 4.3.2 Antocianinas do repolho roxo como corante natural em confeitos

As antocianinas da casca de repolho roxo em pó extraídas via PLE com o solvente soro de leite ácido, foram incorporadas a formulação de marshmallows para avaliar a capacidade de coloração e o potencial antioxidante em um sistema modelo alimentício. (Figura 17).

Figura 17 — Uso de antocianinas em pó em marshmallow



A: amostra controle (sem corante), B: amostra MSA (microcápsula 10% maltodextrina (extração solvente soro de leite ácido) e C: amostra SA extrato em pó (extração solvente soro de leite ácido) (sem maltodextrina).

Fonte: Autor, (2022).

Os marshmallows desenvolvidos foram avaliados quanto ao pH, teor de antocianinas monoméricas totais, compostos fenólicos totais, capacidade antioxidante in vitro, propriedades de textura e cor, as quais estão apresentadas na Tabela 16.

O pH das amostras (A, B e C) ficaram em torno de 5,5. Ambas as amostras apresentaram capacidade antioxidante, não havendo diferença ( $p < 0,05$ ) para o método ABTS. Os teores de AMT para as amostras (C) extrato natural 21,34 mg C3G/100g, foram superiores aos extratos (B) microencapsulados 10,27 mg C3G/100g. O menor teor de AMT para as amostras (B), pode estar relacionado à influência exercida na interação de matrizes poliméricas (maltodextrina) e a gelatina componente que está presente na formulação. Segundo Teixeira et al., (2021) a interação das cadeias de polímeros e proteínas com os polifenóis dificulta a liberação de compostos fenólicos totais e flavonoides em soluções aquosas durante a extração.

A textura é um fator importante para determinar a qualidade dos produtos. A análise de textura foi realizada quanto aos parâmetros de coesividade, mastigabilidade, dureza e elasticidade (Tabela 16).

Os confeitos aerados como os marshmallows são produtos nos quais o ar fica aprisionado e distribuído em pequenas bolhas por toda a matriz alimentar. Por consequência, os parâmetros de textura são amplamente afetados pelo teor de ar incorporado a massa no processo de fabricação (ZIMBRU, PĂDUREȚ e AMARIEI, 2020).

Os valores de dureza, mastigabilidade e coesividade das amostras de marshmallows diminuíram com a incorporação dos extratos ricos em antocianinas de repolho roxo ( $p < 0,05$ ). Nesse estudo a coesividade foi determinada na faixa de (49,60 - 75,50 %), dureza (2,12 - 9,43 N) e mastigabilidade (1,56 - 5,70 N). Valores de textura dentro dessa faixa também foram relatados por Zimbru, Pădureț e Amariei, (2020), coesividade (26,45 - 39,82 %), dureza (1,52-3,48 N) e mastigabilidade (0,22 - 1,31 N) investigando utilização do extrato de berrys nos produtos de confeitaria tipo marsmallow.

Foi possível observar a redução gradual dos parâmetros de dureza e mastigabilidade na ordem das amostras ( $A > B > C$ ), conforme foi adicionado o extrato de antocianina da casaca de repolho roxo (microencapsulado e sem microencapsular).

Similar ao estudo, Horincar et al., (2020) estudando a adição de compostos bioativos microencapsulados obtidos da casca de berinjela, observaram que houve uma redução da firmeza da amostra de confeito de cobertura quando comparada ao corante sintético. Backes et al., (2020) investigando a aplicação de extratos de *Ficus carica L.* e *Prunus spinosa L.* como corantes alimentares à base de antocianinas em soluções de glacê e doces do tipo beijinhos destacou que além do efeito corante houve aumento quanto a maciez e mastigabilidade.

Além disso, Segundo De Roos, (2003) em produtos de confeitaria como gomas, geleias e marshmallows, a maciez afeta a aceitabilidade do consumidor, pois, produtos com maior maciez facilita a ruptura e conseqüentemente a ingestão. No âmbito industrial, o controle da textura se faz necessário, pois o endurecimento do produto é visto como um problema tecnológico em decorrência ao estado vítreo ou na formação de gel de gelatina causado pela cristalização do açúcar, sendo um fator indesejável e uma das principais causas de deterioração em produtos de confeitaria (TAN e LIM, 2008).

Quanto aos resultados de elasticidade esses dados mostraram que o valor da elasticidade de todas as amostras foi superior a 60 %. Segundo Sadahira et al., (2016) o parâmetro da elasticidade está relacionado ao aumento do overrun, que remete a quantidade de ar incorporado, ocasionando na formação de espumas de textura adequada. Além disso, Zimbru, Pădureț e Amariei, (2020) explica que o emprego de gelatina nas formulações de marshmallow fornece espuma estável com alta elasticidade e texturas viscoelásticas.

Portanto os extratos ricos de antocianinas das folhas de repolho roxo exerceram efeito positivo sob a formulação, promovendo a melhora desses importantes parâmetros quando comparados as amostras controle (sem extrato).

A cor é um dos principais parâmetros de qualidade dos produtos alimentícios, o que impulsiona a aceitação dos alimentos pelos consumidores. Visualmente é perceptível que as amostras apresentaram coloração que remete a tons lilás e roxo (Figura 17), e os cálculos para esses parâmetros estão apresentados na Tabela 16.

Assim como os extratos em pós, as amostras de marshmallows apresentaram parâmetros de  $a^*$  positivos, dentro do espectro de cor vermelha, e parâmetros negativos para  $b^*$ , correspondente ao espectro azul, bem como, redução da luminosidade ( $L^*$ ) conforme o extrato foi incorporado. Conforme Ghareaghajlou, Hallaj-Nezhadi e Ghasempour, (2021) as antocianinas formam quatro estruturas diferentes as quais estão em equilíbrio entre si em soluções aquosas em ampla gama de cores: em pH 1-3, o cátion flavílio (vermelho) é predominante; em pH 3-4 e 4-5 há misturas de 4 formas: pseudobase carbinol, cátion flavilium, chalcona, base quinonoidal em diferentes proporções (violeta a azul); em pH 6-7, mistura de 3 formas: base quinoidal, pseudobase carbinol e chalcona (formas incolores); e; a  $pH > 7$ , as antocianinas são degradadas (PATRAS, 2019).

Assim, a variação de cor da solução é consequência de uma ou mais configurações de antocianinas obtidas por mudanças de pH do meio. Vale lembrar que o pH do produto desenvolvido ficou em torno de ( $\sim 5,5$ ) o que explica a expressão de cores indicando tonalidade no aspecto lilás e roxo.

As amostras (B) desenvolvidas com o pó microencapsulado, apresentaram menor pigmentação quando comparadas as amostras (C) desenvolvidas com o extrato controle (sem maltodextrina), indicando que não houve interação do extrato com os

demais constituintes presentes na formulação. Além disso, as amostras (C) apresentaram maior cromaticidade ( $C^*$ ), o que indica a maior intensidade da cor dos produtos. Segundo Mojica, Berhow e Gonzalez de Mejia (2017) o aumento da cromaticidade pode estar relacionado a maior concentração de antocianinas. De fato, nesse estudo a amostra (C) expressou maior concentração de antocianinas corroborando com essa afirmativa.

Desta forma ambos os extratos de antocianinas das folhas de repolho obtidos via PLE através da extração com o soro de leite ácido (microencapsulados e sem microencapsular) demonstraram ser um bom corante alimentar natural, tanto nos aspectos de pigmentação quanto promovendo a melhora significativa nos parâmetros de textura do marshmallow desenvolvido.

Todavia a aplicação de pigmentos de fontes naturais como as antocianinas é um processo desafiador e depende de mais estudos tanto na caracterização do pó quanto na aplicação em produtos alimentícios, pois outros fatores (extrínsecos e intrínsecos) podem influenciar no comportamento dessas amostras durante o processamento e principalmente no armazenamento.

Tabela 16 — Caracterização Física e Química do Marshmallow

Análises	Amostras de marshmallow		
	A	B	C
pH	5,7±0,1 <sup>a</sup>	5,5±0,1 <sup>a</sup>	5,5±0,1 <sup>a</sup>
AMT (mg C3G/100g)	-	10,27±0,2 <sup>b</sup>	21,34±0,3 <sup>a</sup>
CFT (g EAG/100g)	-	38,57±0,07 <sup>a</sup>	29,05±0,04 <sup>b</sup>
<b>Atividade antioxidante</b>			
ABTS (µmol ET/100g)	-	5,13±0,02 <sup>a</sup>	5,89±0,07 <sup>a</sup>
FRAP (µmol ET/100g)	-	5,11±0,04 <sup>b</sup>	7,71±0,02 <sup>a</sup>
<b>Textura</b>			
Coabilidade (%)	75,50±0,016 <sup>a</sup>	59,90±0,007 <sup>b</sup>	49,60±0,024 <sup>c</sup>
Mastigabilidade (N)	5,70±1,02 <sup>a</sup>	2,96±0,501 <sup>b</sup>	1,56±6,724 <sup>c</sup>
Dureza (N)	9,43±1,07 <sup>a</sup>	7,86±0,891 <sup>b</sup>	2,12±1,901 <sup>c</sup>
Elasticidade (%)	74,28±0,97 <sup>b</sup>	64,92±1,90 <sup>c</sup>	83,15±1,08 <sup>a</sup>
<b>Cor</b>			
L*	80,02±0,2 <sup>a</sup>	77,06±0,04 <sup>b</sup>	60,61±0,1 <sup>c</sup>

a*	2,07±0,02 <sup>c</sup>	7,86±0,2 <sup>b</sup>	19,45±0,1 <sup>a</sup>
b*	6,62±0,03 <sup>a</sup>	-11,63±0,04 <sup>b</sup>	-21,85±0,07 <sup>c</sup>
°h	72,09±0,3 <sup>c</sup>	311,37±0,10 <sup>a</sup>	304,04±0,30 <sup>b</sup>
C*	6,93±0,02 <sup>c</sup>	14,03±0,02 <sup>b</sup>	29,25±0,40 <sup>a</sup>

Valores expressos por meio de média ± desvio padrão (teste t, letras iguais significam não haver diferença significativa ( $p < 0,05$ )). AMT: antocianinas monoméricas totais, C3G: cianidina-3-glicosídeo, CFT: compostos fenólicos totais, EAG: equivalente de ácido gálico, ET: equivalente de Trolox, A: amostra controle (sem corante), B: amostra com MSA10 (microcápsula 10% maltodextrina (extrato obtido com soro ácido) e C: amostra com SA extrato obtido com soro ácido) (sem maltodextrina)), L\*: luminosidade, a\*: componente de cor verde/vermelho, b\*: componente de cor azul/amarelo, C\*: cromaticidade e h°: ângulo de matriz.

Fonte: Autor, (2022).

#### 4.4 CONCLUSÃO

Os estudos da estabilidade dos extratos indicaram que as antocianinas da casca do repolho roxo obtida pela extração com solvente soro de leite ácido, apresentaram maior estabilidade em meio mais ácido (pH 3,5) e temperaturas de 60 °C.

A interação entre os extratos e o agente encapsulante foi benéfica, pois aparentemente o uso da maltodextrina atribui maior proteção térmica aos extratos. Além da maltodextrina o solvente soro ácido também demonstrou o mesmo efeito protetor aos extratos indicando maior estabilidade a 60°C e em pH (5,5).

As antocianinas em pó incorporadas em marshmallows, demonstraram potencial de aplicação como corante natural. Os corantes apresentaram espectros de pigmentação de tons lilás e roxos. Além disso, houve melhora significativa nos parâmetros de textura após a incorporação dos extratos (com e sem maltodextrina) e apresentaram propriedades químicas satisfatórias.

Desta forma os corantes produzidos com extrato rico em antocianinas de repolho roxo extraídos via PLE com soro de leite ácido podem ser uma abordagem promissora para uso como corante alimentar natural.

#### CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização do soro ácido como solvente é uma possibilidade promissora capaz de promover uma redução do resíduo gerado (efluente) e oferecer extratos naturais de

qualidade, visto que sua capacidade como solvente foi superior a mistura de etanol acidificado. O soro ácido como solvente para a extração de antocianinas, associado às tecnologias limpas de extração testadas resultou em extratos superiores ao da mistura de etanol e ácido cítrico. Um total de 12 antocianinas foram identificadas nestas bioformulações, sendo a cyanidin-3-*O*-(feruloyl)-sophoroside-5-*O*-glucoside o composto majoritário em todas as amostras.

Embora os extratos não tenham apresentado atividades antioxidante expressivas pelos métodos baseados em célula, nem potenciais anti-inflamatório e anti-proliferativo, é importante destacar que os mesmos não apresentaram citotoxicidade, o que favorece a aplicação industrial em alimentos, fármacos e cosméticos. Além disso, a identificação de grupos acilados que favorecem a copigmentação e estabilidade sugere que os extratos têm grande potencial como corantes naturais.

O método proposto de concentração do extrato via congelamento assistido por centrifugação foi suficiente para preservar os níveis de antocianinas do extrato de casca de repolho roxo. Em termos de microencapsulação, os pós desenvolvidos demonstraram excelentes espectros de pigmentação indicando tonalidades nos espectros de cor púrpura, bem como, intensidade no parâmetro cromaticidade.

Os estudos da estabilidade dos extratos de antocianinas de casca de repolho roxo, indicaram que os todos os extratos foram mais estáveis em meio mais ácido com pH de 3,5 e temperatura de 60 °C. A interação entre os extratos e o agente encapsulante foi vantajosa, pois o uso da maltodextrina parece conferir maior proteção térmica aos extratos. Além da maltodextrina o solvente soro ácido também demonstrou o mesmo efeito protetor aos extratos.

As antocianinas em pó incorporadas em marshmallows, demonstraram potencial de aplicação como corante natural, indicando ótimo aspecto de pigmentação além de promover melhora significativa nos parâmetros de dureza e mastigabilidade do produto.

Desta forma os corantes produzidos com extrato rico em antocianinas de repolho roxo extraídos via PLE com soro de leite ácido podem ser uma abordagem promissora para uso como corante alimentar natural.

No entanto a aplicação de pigmentos de fontes naturais como as antocianinas é um processo desafiador e depende de mais estudos tanto na caracterização do pó quanto na aplicação em produtos alimentícios, pois outros fatores (extrínsecos e intrínsecos)

podem influenciar no comportamento dessas amostras durante o processamento e armazenamento.

Ademais, a proposta de utilização do soro ácido como solvente é de simples implementação, pois o efluente fornecido pela indústria não necessita de tratamento prévio para uso futuro, apresenta custo acessível, baixa volatilidade e é oriundo de fonte renovável. Podendo ser um solvente promissor, abrindo caminho para a extração de antocianinas e outros constituintes, sendo empregado para outras matrizes vegetais, difundido sua aplicabilidade.

## **TRABALHOS FUTUROS**

A utilização do soro de leite ácido como solvente, abre portas para um mundo de possibilidades. A partir dos resultados positivos para extração de antocianinas é interessante aprimorar estudos quanto ao potencial de extração do soro ácido, pois os mecanismos por trás desse novo solvente, até então são desconhecidos.

Desta forma, pretende-se:

- Estudar o perfil e características de soros provenientes de diferentes unidades processadoras;
- Otimizar a extração de antocianinas de outras fontes vegetais e verificar a capacidade e afinidade do novo solvente quanto a extração de outros compostos;
- Testar a obtenção diferentes corantes naturais;
- Averiguar os meios que viabilizaram a extração e os fatores que podem ter atribuído efeito de proteção térmica aos extratos;
- Estudar o efeito de diferentes agentes carreadores e testar outras tecnologias de secagem e encapsulamento dos extratos;
- Aprofundar a caracterização do pó desenvolvido quanto à: Morfologia, Tamanho da partícula e Potencial zeta;
- Cinéticas e Isotermas de Adsorção de Umidade;
- Eficiência de Encapsulamento;
- Capacidade de Retenção de Água (CRA) e óleo (CRO);
- Caracterização de grupos funcionais por infravermelho (FTIR); Termogravimetria (TG) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC);

- Digestão simulada in vitro;
- Investigar a fundo a aplicação dos pós: verificando as propriedades funcionais na aplicação no produto, observar a interação do extrato com os ingredientes da formulação;
- Testar a aplicação dos extratos em sistemas lácteos;
- Analisar a biodisponibilidade e digestibilidade no produto;
- Estudar a estabilidade dos extratos nos produtos e vida de prateleira;

Realizar testes sensoriais e analisar o perfil de aceitabilidade dos consumidores quanto a aplicação do corante natural.

Com a ampliação desse projeto espera-se gerar informações científicas e técnicas referentes a utilização do soro de leite ácido como solvente, promovendo a produção de produtos de alto valor agregado a partir da extração empregando resíduos agroindústrias. Os resultados obtidos servirão como base para a indústria e estudos futuros relacionados à utilização destes subprodutos.

## REFERÊNCIAS

- AIDER, M., & DE HALLEUX, D. Cryoconcentration technology in the bio-food industry: Principles and applications. **LWT-Food Science and Technology**, v. 42, n. 3, p. 679-685, 2009.
- ANASTAS, P. T.; WARNER, J. C. Principles of green chemistry. **Green Chemistry: Theory and Practice**, v. 29, 1998.
- ANASTAS, Paul T.; ZIMMERMAN, Julie B. **Peer reviewed: Design Through the 12 Principles of Green Engineering**. 2003.
- ANDRADE, K. S.; TRIVELLIN, G.; FERREIRA, S. R. S. Piperine-rich extracts obtained by high pressure methods. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 128, n. March, p. 370–377, 2017.
- AOAC - Official methods of analysis from the Association of Official Analytical Chemists International Arlington. **AOAC International**, 2005.
- ASHOKKUMAR, M. Applications of ultrasound in food and bioprocessing. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 25, p. 17-23, 2015.
- AWASTHI, M. K., PAUL, A., KUMAR, V., SAR, T., KUMAR, D., SARSAIYA, S., e TAHERZADEH, M. J. Recent trends and developments on integrated biochemical conversion process for valorization of dairy waste to value added bioproducts: A review. **Bioresource Technology**, 344, 126193. 2022.
- BACKES, E., LEICHTWEIS, M. G., PEREIRA, C., CAROCHO, M., BARREIRA, J. C., GENENA, A. K., ... e FERREIRA, I. C. (2020). Ficus carica L. and Prunus spinosa L. extracts as new anthocyanin-based food colorants: A thorough study in confectionery products. **Food Chemistry**, 333, 127457. 2020.
- BALLESTEROS, L. F., RAMIREZ, M. J., ORREGO, C. E., TEIXEIRA, J. A., & MUSSATTO, S. I. Encapsulation of antioxidant phenolic compounds extracted from spent coffee grounds by freeze-drying and spray-drying using different coating materials. **Food Chemistry**, v. 237, p. 623–631, 2017.
- BENVENUTTI, L.; ZIELINSKI, A. A. F.; FERREIRA, S. R. S. Pressurized aqueous solutions of deep eutectic solvent (DES): A green emergent extraction of anthocyanins from a Brazilian berry processing by-product. **Food Chemistry: X**, v. 13, p. 100236, 2022.
- BENZIE, I. F., & STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.
- BESSADA, S. M., BARREIRA, J. C., BARROS, L., FERREIRA, I. C., e OLIVEIRA, M. B. P. Phenolic profile and antioxidant activity of Coleostephus myconis (L.) Rchb. f.: An underexploited and highly disseminated species. **Industrial Crops and Products**, 89, 45-51. 2016.

- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25– 30, 1995.
- BYLUND, G. **Dairy Processing Handbook**. Tetra Pak Processing Systems AB, 2003.
- CÂMARA, J. S., ALBUQUERQUE, B. R., AGUIAR, J., CORRÊA, R. C., GONÇALVES, J. L., GRANATO, D., ... & FERREIRA, I. C. Food bioactive compounds and emerging techniques for their extraction: Polyphenols as a case study. **Foods**, v. 10, n. 1, p. 37, 2020.
- CASSIDY, A., BERTOIA, M., CHIUVE, S., FLINT, A., FORMAN, J., & RIMM, E. B. Habitual intake of anthocyanins and flavanones and risk of cardiovascular disease in men. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 104(3), 587-594. 2016.
- CASTAÑEDA-OVANDO, A., GALÁN-VIDAL, C. A., PACHECO-HERNÁNDEZ, M. D. L., RODRÍGUEZ, J. A., & PÁEZ-HERNÁNDEZ, M. E. Evaluación del contenido de metales y su efecto en la estabilidad de antocianinas Metal content evaluation and its effect on the stability of anthocyanins. **CyTA-Journal of Food**, 7(3), 225-232. 2009.
- CELLI, G. B., DIBAZAR, R., GHANEM, A., e BROOKS, M. S. L. Degradation kinetics of anthocyanins in freeze-dried microencapsulates from lowbush blueberries (*Vaccinium angustifolium* Aiton) and prediction of shelf-life. **Drying Technology**, 34(10), 1175-1184. 2016.
- CHARRON, C. S., CLEVIDENCE, B. A., BRITZ, S. J., e NOVOTNY, J. A. Effect of dose size on bioavailability of acylated and nonacylated anthocyanins from red cabbage (*Brassica oleracea* L. Var. capitata). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55(13), 5354-5362. 2007.
- CHEMAT, F., ABERT-VIAN, M., FABIANO-TIXIER, A. S., STRUBE, J., UHLENBROCK, L., GUNJEVIC, V., e CRAVOTTO, G. Green extraction of natural products. Origins, current status, and future challenges. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 118, 248-263. 2019.
- CHEN, T. L., KIM, H., PAN, S. Y., TSENG, P. C., LIN, Y. P., & CHIANG, P. C. Implementation of green chemistry principles in circular economy system towards sustainable development goals: Challenges and perspectives. **Science of the Total Environment**, 716, 136998. 2020.
- CORRÊA, R. C. G., DE SOUZA, A. H. P., CALHELHA, R. C., BARROS, L., GLAMOCLIJ, J., SOKOVIC, M. & FERREIRA, I. C. Bioactive formulations prepared from fruiting bodies and submerged culture mycelia of the Brazilian edible mushroom *Pleurotus ostreatoroseus* Singer. **Food & Function**, 6(7), 2155-2164. 2015.
- CORRÊA, R. C. G., GARCIA, J. A. A., CORREA, V. G., VIEIRA, T. F., BRACHT, A., & PERALTA, R. M. Pigments and vitamins from plants as functional ingredients: Current trends and perspectives. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 90, p. 259-303, 2019.

CORRÊA, R. C., HAMINIUK, C. W., BARROS, L., DIAS, M. I., CALHELHA, R. C., KATO, C. G., ... & FERREIRA, I. C. Stability and biological activity of Merlot (*Vitis vinifera*) grape pomace phytochemicals after simulated in vitro gastrointestinal digestion and colonic fermentation. **Journal of Functional Foods**, 36, 410-417. 2017.

DA SILVA CARVALHO, A. G., DA COSTA MACHADO, M. T., DA SILVA, V. M., SARTORATTO, A., RODRIGUES, R. A. F., & HUBINGER, M. D. Physical properties and morphology of spray dried microparticles containing anthocyanins of jussara (*Euterpe edulis Martius*) extract. **Powder Technology**, 294, 421-428. 2016.

DANGLES, O.; FENGER, J. The chemical reactivity of anthocyanins and its consequences in food science and nutrition. **Molecules**, v. 23, n. 8, p. 1970, 2018.

DE LIZ, G. R., VERRUCK, S., CANELLA, M. H. M., DANTAS, A., GARCIA, S. G., MARAN, B. M., & PRUDENCIO, E. S. Stability of bifidobacteria entrapped in goat's whey freeze concentrate and inulin as wall materials and powder properties. **Food Research International**, 127, 108752. 2020.

DE ROOS, Kris B. Effect of texture and microstructure on flavour retention and release. **International Dairy Journal**, v. 13, n. 8, p. 593-605, 2003.

DE SOUZA, V. B., THOMAZINI, M., DE CARVALHO BALIEIRO, J. C., FÁVARO-TRINDADE, C. S. Effect of spray drying on the physicochemical properties and color stability of the powdered pigment obtained from vinification byproducts of the Bordo grape (*Vitis labrusca*). **Food and Bioproducts Processing**, v. 93, n. November, p. 39-50, jan. 2015.

DEL PILAR GARCIA-MENDOZA, M., ESPINOSA-PARDO, F. A., BASEGGIO, A. M., BARBERO, G. F., JUNIOR, M. R. M., ROSTAGNO, M. A., & MARTÍNEZ, J. Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from juçara (*Euterpe edulis Mart.*) residues using pressurized liquids and supercritical fluids. **The Journal of Supercritical Fluids**, 119, 9-16. 2017.

DONG, Y., WU, X., HAN, L., BIAN, J., HE, C., EL-OMAR, E. & WANG, M. The Potential Roles of Dietary Anthocyanins in Inhibiting Vascular Endothelial Cell Senescence and Preventing Cardiovascular Diseases. **Nutrients**, v. 14, n. 14, p. 2836, 2022.

DRABENT, R.; PLISZKA, B.; OLSZEWSKA, T. Fluorescence properties of plant anthocyanin pigments. I. Fluorescence of anthocyanins in *Brassica oleracea* L. extracts. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 50, n. 1, p. 53-58, 1999.

EKICI, L., SIMSEK, Z., OZTURK, I., SAGDIC, O., & YETIM, H. Effects of temperature, time, and pH on the stability of anthocyanin extracts: Prediction of total anthocyanin content using nonlinear models. **Food Analytical Methods**, 7(6), 1328-1336. 2014.

ELBOUGHDIRI, N. Effect of time, solvent-solid ratio, ethanol concentration and temperature on extraction yield of phenolic compounds from olive leaves. **Engineering, Technology & Applied Science Research**, v. 8, n. 2, p. 2805-2808, 2018.

EMPRSA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Anuário Leite 2021**. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/224371/1/Anuario-Leite-2021.pdf>. Acesso em: 13 fev. 2022.

ESTUPIÑAN, D. C.; SCHWARTZ, S. J.; GARZÓN, G. A. Antioxidant activity, total phenolics content, anthocyanin, and color stability of isotonic model beverages colored with Andes berry (*Rubus glaucus* Benth) anthocyanin powder. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 1, p. S26-S34, 2011.

FAO., 2019. Overview of global dairy market developments in 2018. **Dairy Market Review**.

FERNANDES, A., ROCHA, M. A., SANTOS, L. M., BRÁS, J., OLIVEIRA, J., MATEUS, N., & DE FREITAS, V. Blackberry anthocyanins:  $\beta$ -Cyclodextrin fortification for thermal and gastrointestinal stabilization. **Food Chemistry**, 245, 426-431.2018.

FERRO, D. M.; MÜLLER, C. M. O.; FERREIRA, S. R. S. Photostability and characterization of spray-dried maltodextrin powders loaded with *Sida rhombifolia* extract. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 27, p. 101716, 2020.

FILAFERRO, M., CODELUPPI, A., BRIGHENTI, V., CIMURRI, F., GONZÁLEZ-PARAMÁS, A. M., SANTOS-BUELGA, C. & VITALE, G. Disclosing the Antioxidant and Neuroprotective Activity of an Anthocyanin-Rich Extract from Sweet Cherry (*Prunus avium* L.) Using in Vitro and in Vivo Models. **Antioxidants**, 11(2), 21. 2022.

GALAVERNA, G., DI SILVESTRO, G., CASSANO, A., SFORZA, S., DOSSENA, A., DRIOLI, E., & MARCHELLI, R. (2008). A new integrated membrane process for the production of concentrated blood orange juice: Effect on bioactive compounds and antioxidant activity. **Food chemistry**, 106(3), 1021-1030. 2008.

GAŁUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIEŚNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 50, p. 78-84, 2013.

GARCIA, J. A., CORRÊA, R. C., BARROS, L., PEREIRA, C., ABREU, R. M., ALVES, M. J., & FERREIRA, I. C. Chemical composition and biological activities of Juçara (*Euterpe edulis* Martius) fruit by-products, a promising underexploited source of high-added value compounds. **Journal of Functional Foods**, v. 55, p. 325-332, 2019.

GHAREAGHAJLOU N, HALLAJ-NEZHADI S, GHASEMPOUR Z. Red cabbage anthocyanins: Stability, extraction, biological activities and applications in food systems. **Food Chemistry**. 2021 Dec 15; 365:130482. 2021.

GIL-MARTÍN, E., FORBES-HERNÁNDEZ, T., ALEJANDRO, R., CIANCIOSI, D., GIAMPIERI, F., & BATTINO, M. Influence of the extraction method on the recovery of bioactive phenolic compounds from food industry by-products. **Food Chemistry**, p. 131918, 2021.

- GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, v. 00, n. 1, p. F1.2.1-F1.2.13, 27 abr. 2001.
- GONÇALVES, G. A., SOARES, A. A., CORREA, R. C., BARROS, L., HAMINIUK, C. W., PERALTA, R. M., ... & BRACHT, A. Merlot grape pomace hydroalcoholic extract improves the oxidative and inflammatory states of rats with adjuvant-induced arthritis. **Journal of Functional Foods**, 33, 408-418. 2017.
- GUIMARÃES, P. M., TEIXEIRA, J. A., & DOMINGUES, L. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. **Biotechnology advances**, v. 28, n. 3, p. 375-384, 2010.
- GUNES, R., PALABIYIK, I., KONAR, N., & TOKER, O. S. Soft confectionery products: Quality parameters, interactions with processing and ingredients. **Food Chemistry**, 132735.2022.
- HESSEL, V., TRAN, N. N., ASRAMI, M. R., TRAN, Q. D., LONG, N. V. D., ESCRIBÀ-GELONCH, M., SUNDMACHER, K. Sustainability of green solvents—review and perspective. **Green Chemistry**. 2022.
- HORINCAR, G., ENACHI, E., BARBU, V., ANDRONOIU, D. G., RÂPEANU, G., STÂNCIUC, N., & APRODU, I. Value-added pastry cream enriched with microencapsulated bioactive compounds from eggplant (*Solanum melongena* L.) peel. **Antioxidants**, 9(4), 351. 2020.
- HOSSEINI, S., GHARACHORLOO, M., GHIASSI-TARZI, B., & GHAVAMI, M. Evaluation the organic acids ability for extraction of anthocyanins and phenolic compounds from different sources and their degradation kinetics during cold storage. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, 66(4). 2016.
- JANISZEWSKA-TURAK, E., DELLAROSA, N., TYLEWICZ, U., LAGHI, L., ROMANI, S., DALLA ROSA, M., & WITROWA-RAJCHERT, D. The influence of carrier material on some physical and structural properties of carrot juice microcapsules. **Food Chemistry**, v. 236, p. 134–141, dez. 2017.
- JASTER, H., AREND, G.D., REZZADORI, K., CHAVES, V.C., REGINATTO, F.H. AND PETRUS, J.C.C., 2018. Enhancement of antioxidant activity and physicochemical properties of yogurt enriched with concentrated strawberry pulp obtained by block freeze concentration. **Food Research International**, 104, pp.119-125. 2018.
- JIANG, T., MAO, Y., SUI, L., YANG, N., LI, S., ZHU, Z., & HE, Y. Degradation of anthocyanins and polymeric color formation during heat treatment of purple sweet potato extract at different pH. **Food Chemistry**, 274, 460-470. 2019.
- KHANJI, A. N., MICHAUX, F., JASNIEWSKI, J., PETIT, J., LAHIMER, E., CHERIF, M., ... & BANON, S. Structure and gelation properties of casein micelles doped with curcumin under acidic conditions. **Food & Function**, 6(12), 3624-3633.2015.
- KIM, M. J., REHMAN, S. U., AMIN, F. U., & KIM, M. O. Enhanced neuroprotection of anthocyanin-loaded PEG-gold nanoparticles against A $\beta$ 1-42-induced

neuroinflammation and neurodegeneration via the NF-KB/JNK/GSK3 $\beta$  signaling pathway. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 13(8), 2533-2544. 2017.

KUETE, V., KAMGA, J., SANDJO, L. P., NGAMENI, B., POUMALE, H. M., AMBASSA, P., & NGADJUI, B. T. Antimicrobial activities of the methanol extract, fractions and compounds from *Ficus polita* Vahl. (Moraceae). *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11(1), 1-6. 2011.

KULCHENKO, Y. Y., DEINEKA, V. I., DEINEKA, L. A., & BLINOVA, I. P. Obtaining red cabbage anthocyanin colored encapsulated forms by the method of freeze-drying. *Fine Chemical Technologies*, 12(6), 32-38. 2017.

KUMAR, K., SRIVASTAV, S., & SHARANAGAT, V. S. Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 70, 105325. 2021.

LANTE, A., NARDI, T., ZOCCA, F., GIACOMINI, A., & CORICH, V. Evaluation of red chicory extract as a natural antioxidant by pure lipid oxidation and yeast oxidative stress response as model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, n. 10, p. 5318-5324, 2011.

LASTA, H. F. B., LENTZ, L., RODRIGUES, L. G. G., MEZZOMO, N., VITALI, L., & FERREIRA, S. R. S. Pressurized liquid extraction applied for the recovery of phenolic compounds from beetroot waste. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21, 101353. 2019.

LEE, H. J., LEE, D. Y., CHUN, Y. S., KIM, J. K., LEE, J. O., KU, S. K., & SHIM, S. M. Effects of blue honeysuckle containing anthocyanin on anti-diabetic hypoglycemia and hyperlipidemia in ob/ob mice. *Journal of Functional Foods*, 89, 104959.2022.

LEWICKI, P. P. Raoult's law based food water sorption isotherm. *Journal of Food Engineering*, v. 43, n. 1, p. 31-40, 2000.

LIAO, M., MA, L., MIAO, S., HU, X., LIAO, X., CHEN, F., & JI, J. The in-vitro digestion behaviors of milk proteins acting as wall materials in spray-dried microparticles: Effects on the release of loaded blueberry anthocyanins. *Food Hydrocolloids*, v. 115, p. 106620, 2021.

LIEVORE, P., SIMÕES, D. R., SILVA, K. M., DRUNKLER, N. L., BARANA, A. C., NOGUEIRA, A., & DEMIATE, I. M. Chemical characterisation and application of acid whey in fermented milk. *Journal of Food Science and Technology*, 52(4), 2083-2092. 2015.

LIU, Y., FRIESEN, J. B., MCALPINE, J. B., LANKIN, D. C., CHEN, S. N., & PAULI, G. F. Natural deep eutectic solvents: properties, applications, and perspectives. *Journal of Natural Products*, 81(3), 679-690. 2018.

MACHADO, M. H., DA ROSA ALMEIDA, A., MACIEL, M. V. D. O. B., VITORINO, V. B., BAZZO, G. C., DA ROSA, C. G., BARRETO, P. L. M. Microencapsulation by spray drying of red cabbage anthocyanin-rich extract for the

production of a natural food colorant. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 102287. 2022.

MANSOUR, K. A., MOUSTAFA, S. F., & ABDELKHALIK, S. M. High-Resolution UPLC-MS Profiling of Anthocyanins and Flavonols of Red Cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *rubra* DC.) Cultivated in Egypt and Evaluation of Their Biological Activity. **Molecules**, 26(24), 7567. 2021.

MAZZUTTI, S., RIEHL, C. A., IBÁÑEZ, E., & FERREIRA, S. R. Green-based methods to obtain bioactive extracts from *Plantago major* and *Plantago lanceolata*. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 119, p. 211–220, 2017.

MCGHIE, T. K.; WALTON, M. C. The bioavailability and absorption of anthocyanins: Towards a better understanding. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 51, n. 6, p. 702–713, 2007.

MENCHIK, P., ZUBER, T., ZUBER, A., & MORARU, C. I. Composition of coproduct streams from dairy processing: Acid whey and milk permeate. **Journal of Dairy Science**, 102(5), 3978-3984. 2019.

MIYASHITA, K., BEPPU, F., HOSOKAWA, M., LIU, X., & WANG, S. Bioactive significance of fucoxanthin and its effective extraction. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 26, 101639. 2020.

MOJICA, L.; BERHOW, M.; GONZALEZ DE MEJIA, E. Black bean anthocyanin-rich extracts as food colorants: Physicochemical stability and antidiabetes potential. **Food Chemistry**, v. 229, p. 628–639, 15 ago. 2017.

NEVES, M. I. L., DESOBRY-BANON, S., PERRONE, I. T., DESOBRY, S., & PETIT, J. Encapsulation of curcumin in milk powders by spray-drying: Physicochemistry, rehydration properties, and stability during storage. **Powder Technology**, v. 345, p. 601-607, 2019.

NEVES, M. I. L., SILVA, E. K., & MEIRELES, M. A. A. Natural blue food colorants: Consumer acceptance, current alternatives, trends, challenges, and future strategies. **Trends in Food Science & Technology**, 112, 163-173.2021.

NEVES, M. I. L., STRIEDER, M. M., SILVA, E. K., & MEIRELES, M. A. A. Milk colloidal system as a reaction medium and carrier for the natural blue colorant obtained from the cross-linking between genipin and milk proteins. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 61, p. 102333, 2020.

NOMI, Y.; IWASAKI-KURASHIGE, K.; MATSUMOTO, H. Therapeutic effects of anthocyanins for vision and eye health. **Molecules**, v. 24, n. 18, p. 3311, 2019.

OTÁLORA, M. C., CARRIAZO, J. G., ITURRIAGA, L., NAZARENO, M. A., & OSORIO, C. Microencapsulation of betalains obtained from cactus fruit (*Opuntia ficus-indica*) by spray drying using cactus cladode mucilage and maltodextrin as encapsulating agents. **Food Chemistry**, 187, 174-181. 2015.

PALOS-HERNÁNDEZ, A., FERNÁNDEZ, M. Y. G., BURRIEZA, J. E., PÉREZ-IGLESIAS, J. L., & GONZÁLEZ-PARAMÁS, A. M. Obtaining green extracts rich in

phenolic compounds from underexploited food by-products using natural deep eutectic solvents. Opportunities and challenges. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 29, p. 100773, 2022.

PAN, Z., QU, W., MA, H., ATUNGULU, G. G., & MCHUGH, T. H. Continuous and pulsed ultrasound-assisted extractions of antioxidants from pomegranate peel. **Ultrasonics Sonochemistry**, 19(2), 365-372, 2012.

PANIĆ, M., GUNJEVIĆ, V., CRAVOTTO, G., & REDOVNIKVIĆ, I. R. Enabling technologies for the extraction of grape-pomace anthocyanins using natural deep eutectic solvents in up-to-half-litre batches extraction of grape-pomace anthocyanins using NADES. **Food Chemistry**, 300, 125185. 2019.

PATRAS, A. Stability and colour evaluation of red cabbage waste hydroethanolic extract in presence of different food additives or ingredients. **Food Chemistry**, v. 275, p. 539-548, 2019.

PEDRO, A. C., MOREIRA, F., GRANATO, D., & ROSSO, N. D. Extraction of bioactive compounds and free radical scavenging activity of purple basil (*Ocimum basilicum* L.) leaf extracts as affected by temperature and time. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, p. 1055-1068, 2016.

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

PETZOLD, G.; MORENO, J.; LASTRA, P.; ROJAS, K.; ORELLANA, P. Block freeze concentration assisted by centrifugation applied to blueberry and pineapple juices. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 30, p. 192-197, 2015.

PLAZA, M., AMIGO-BENAVENT, M., DEL CASTILLO, MD, IBÁÑEZ, E., & HERRERO, M. Neoformação de antioxidantes em sistemas modelo de glicação tratados sob condições subcríticas de extração de água. **Food Research International**, 43 (4), 1123-1129. 2010.

PRIETO, M. A.; VÁZQUEZ, José Antonio. A time-dose model to quantify the antioxidant responses of the oxidative hemolysis inhibition assay (OxHLIA) and its extension to evaluate other hemolytic effectors. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., & RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

REGUENGO, L. M., SALGAÇO, M. K., SIVIERI, K., & JÚNIOR, M. R. M. Agro-industrial by-products: valuable sources of bioactive compounds. **Food Research International**, p. 110871, 2021.

ROCHA-MENDOZA, D., KOSMERL, E., KRENTZ, A., ZHANG, L., BADIGER, S., MIYAGUSUKU-CRUZADO, G., GARCÍA-CANO, I. Invited review: Acid whey trends and health benefits. **Journal of Dairy Science**, 104(2), 1262-1275. 2021.

- RODRIGUES, L. G. G., MAZZUTTI, S., VITALI, L., MICKE, G. A., & FERREIRA, S. R. S. Recovery of bioactive phenolic compounds from papaya seeds agroindustrial residue using subcritical water extraction. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, p. 101367, 2019.
- RÓŻYŁO, R. Recent trends in methods used to obtain natural food colorants by freeze-drying. **Trends in Food Science & Technology**, v. 102, p. 39-50, 2020.
- SADAHIRA, M. S., RODRIGUES, M. I., AKHTAR, M., MURRAY, B. S., & NETTO, F. M. Effect of egg white protein-pectin electrostatic interactions in a high sugar content system on foaming and foam rheological properties. **Food Hydrocolloids**, 58, 1-10. 2016.
- SAKULNARMRAT, Karunrat; WONGSRIKAEW, Denchai; KONCZAK, Izabela. Microencapsulation of red cabbage anthocyanin-rich extract by drum drying technique. **LWT**, v. 137, p. 110473, 2021.
- SARKAR, B., DEBNATH, A., CHIU, A. S., & AHMED, W. Circular economy-driven two-stage supply chain management for nullifying waste. **Journal of Cleaner Production**, 130513. 2022.
- SETYANINGSIH, W., SAPUTRO, I. E., CARRERA, C. A., & PALMA, M. Optimisation of an ultrasound-assisted extraction method for the simultaneous determination of phenolics in rice grains. **Food Chemistry**, 288, 221-227.
- SHIYAN, S. H. A. U. M., HERLINA, H., & RIZKIKI SARI, L. Nephroprotective of anthocyanin pigments extract from red cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *Capitata* F. *rubra*) against gentamicin-captopril-induced nephrotoxicity in rats. **Asian J Pharm Clin Res**, 11(4), 432-436. 2018.
- SIGURDSON, G. T.; TANG, P.; GIUSTI, M. M. Natural colorants: Food colorants from natural sources. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 8, p. 261-280, 2017.
- SINGH, M. C., PROBST, Y., PRICE, W. E., & KELSO, C. Relative comparisons of extraction methods and solvent composition for Australian blueberry anthocyanins. **Journal of Food Composition and Analysis**, 105, 104232. 2022.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolic with phosphomolibdic acid reagent. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144– 158, 1965.
- SOUZA, A. C. P., GURAK, P. D., & MARCZAK, L. D. F. Maltodextrin, pectin and soy protein isolate as carrier agents in the encapsulation of anthocyanins-rich extract from jaboticaba pomace. **Food and Bioproducts Processing**, 102, 186-194. 2017.
- TAN, J. M.; LIM, M. H. Effects of gelatine type and concentration on the shelf-life stability and quality of marshmallows. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 43, n. 9, p. 1699-1704, 2008.
- TEIXEIRA, R. F., BENVENUTTI, L., BURIN, V. M., GOMES, T. M., FERREIRA, S. R. S., & ZIELINSKI, A. A. F. An eco-friendly pressure liquid extraction method to

- recover anthocyanins from broken black bean hulls. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 67, 102587. 2021.
- TENA, N.; MARTÍN, J.; ASUERO, A. G. State of the art of anthocyanins: Antioxidant activity, sources, bioavailability, and therapeutic effect in human health. **Antioxidants**, v. 9, n. 5, p. 451, 2020.
- TIWARI, B. K. Ultrasound: A clean, green extraction technology. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 100–109, 2015.
- TORRES, T. M. S., ÁLVAREZ-RIVERA, G., MAZZUTTI, S., SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, J. D., CIFUENTES, A., IBÁÑEZ, E., & FERREIRA, S. R. S. Neuroprotective potential of extracts from leaves of ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata*) recovered by clean compressed fluids. **The Journal of Supercritical Fluids**, 179, 105390. 2022.
- TSERMOULA, P., KHAKIMOV, B., NIELSEN, J. H., & ENGELSEN, S. B. WHEY-The waste-stream that became more valuable than the food product. **Trends in Food Science & Technology**, 118, 230-241, 2021.
- TÜRKER, D. A., & DOĞAN, 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.
- TYAGI, V. V., KAUSHIK, S. C., TYAGI, S. K., & AKIYAMA, T. Development of phase change materials based microencapsulated technology for buildings: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 15(2), 1373-1391. 2011.
- WALKOWIAK-TOMCZAK, D., & CZAPSKI, J. Colour changes of a preparation from red cabbage during storage in a model system. **Food Chemistry**, v. 104, n. 2, p. 709-714, 2007.
- WICZKOWSKI, W. SZAWARA-NOWAK, D. & TOPOLSKA, J. Red cabbage anthocyanins: Profile, isolation, identification, and antioxidant activity. **Food Research International**, 51(1), 303-309. 2013.
- WU, C. F., WU, C. Y., LIN, C. F., LIU, Y. W., LIN, T. C., LIAO, H. J., & CHANG, G. R. The anticancer effects of cyanidin 3-O-glucoside combined with 5-fluorouracil on lung large-cell carcinoma in nude mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 151, p. 113128, 2022.
- WU, Y., ZHOU, Q., CHEN, X. Y., LI, X., WANG, Y., & ZHANG, J. L. Comparison and screening of bioactive phenolic compounds in different blueberry cultivars: Evaluation of anti-oxidation and  $\alpha$ -glucosidase inhibition effect. **Food Research International**, 100, 312-324. 2017.
- XU, D., XU, Y., LIU, G., HOU, Z., YUAN, Y., WANG, S., CAO, Y. AND SUN, B. Effect of carrier agents on the physical properties and morphology of spray-dried *Monascus* pigment powder. **Lwt**, 98, pp.299-305. 2018.
- YIĞIT, Ü., TURABI YOLAÇANER, E., HAMZALIOĞLU, A., & GÖKMEN, V. Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins in red cabbage by

response surface methodology. **Journal of Food Processing and Preservation**, 46(1), e16120. 2022.

ZAN, F., IQBAL, A., LU, X., WU, X., & CHEN, G. "Food waste-wastewater-energy resource" nexus: Integrating food waste management with wastewater treatment towards urban sustainability. **Water Research**, 211, 118089. 2022.

ZANONI, F., PRIMITERRA, M., ANGELI, N., & ZOCCATELLI, G. A. Microencapsulation by spray-drying of polyphenols extracted from red chicory and red cabbage: Effects on stability and color properties. **Food Chemistry**, v. 307, p. 125535, 2020.

ZHAO, C. L., YU, Y. Q., CHEN, Z. J., WEN, G. S., WEI, F. G., ZHENG, Q., ... & XIAO, X. L. Stability-increasing effects of anthocyanin glycosyl acylation. **Food Chemistry**, 214, 119-128. 2017.

ZIELINSKI, A. A. F., DEL PILAR SANCHEZ-CAMARGO, A., BENVENUTTI, L., FERRO, D. M., DIAS, J. L., & FERREIRA, S. R. S. High-pressure fluid technologies: Recent approaches to the production of natural pigments for food and pharmaceutical applications. **Trends in Food Science & Technology**, 118, 850-869. 2021.

ZIMBRU, R. O.; PĂDUREȚ, S.; AMARIEI, S. Effect of aeration on physicochemical, color and texture characteristics of confectionery foams. **Ukrainian Food Journal**, v. 9, n. 1, p. 99-257, 2020.