



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

HÁLISSEON LUCAS RIBEIRO

**EFEITO ESTABILIZANTE DE MONTMORILONITA SOBRE
ANTOCIANINAS DE ACEROLA: APLICAÇÃO EM SUCO CLARIFICADO E
FILMES COMESTÍVEIS**

FORTALEZA

2016

HÁLISSON LUCAS RIBEIRO

**EFEITO ESTABILIZANTE DE MONTMORILONITA SOBRE
ANTOCIANINAS DE ACEROLA: APLICAÇÃO EM SUCO CLARIFICADO E
FILMES COMESTÍVEIS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química. Área de Concentração: Processos Químicos.

Orientadora: Prof. Dra. Henriette Monteiro Cordeiro de Azeredo.

Co-orientador: Prof. Dr. Men de sá Moreira de Souza Filho.

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R369e Ribeiro, Hálisson Lucas.
EFEITO ESTABILIZANTE DE MONTMORILONITA SOBRE ANTOCIANINAS DE ACEROLA:
APLICAÇÃO EM SUCO CLARIFICADO E FILMES COMESTÍVEIS / Hálisson Lucas Ribeiro. – 2016.
80 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2016.

Orientação: Profa. Dra. Henriette Monteiro Cordeiro de Azeredo.

Coorientação: Prof. Dr. Men de sá Moreira de Souza Filho.

1. Malpighia emarginata. 2. Pigmentos naturais. 3. Silicatos. I. Título.

CDD 660

HÁLISSON LUCAS RIBEIRO

**EFEITO ESTABILIZANTE DE MONTMORILONITA SOBRE
ANTOCIANINAS DE ACEROLA: APLICAÇÃO EM SUCO CLARIFICADO E
FILMES COMESTÍVEIS**

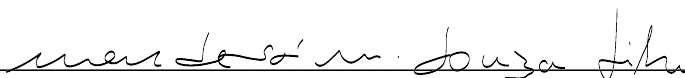
Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química. Área de Concentração: Processos Químicos.

Aprovado em: 29 / 08 / 2016 .


BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Henriette Monteiro Cordeiro de Azeredo (Orientadora)
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa



Prof. Dr. Men de Sá Moreira de Souza Filho (Co-orientador)
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa



Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. Edy Sousa de Brito
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa

Dedico este trabalho àqueles
que depositaram confiança e
esperanças em mim.

AGRADECIMENTOS

À DEUS POR TUDO.

À Família pelo alicerce construído e valores ensinados.

À Amanda, minha amiga e parceira na vida, por todo o tempo que estamos juntos, se fazendo presente em todos os momentos da minha vida, sempre me incentivando e acreditando no meu potencial, T. A.

À Embrapa Agroindústria Tropical, pelo apoio estrutural e financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UFC, à Capes pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

À Henriette M. C. Azeredo, pelo incentivo, orientação desde a graduação, compreensão e apoio nos momentos mais difíceis.

Ao Men de sá, pela orientação, incentivo, conversar e momentos de descontração sempre deixando os dias bem mais leves.

Ao Edy Sousa de Brito, pela ajuda nas análises e por tirar todas minhas dúvidas.

À Lilian Chayn, pelo apoio no laboratório.

À amiga Ana Vitória, pelos momentos de “terapia em grupo” e mais uma etapa que passamos juntos.

À todos os colegas do Laboratório de Tecnologia de Biomassas por todos os momentos vividos.

RESUMO

As antocianinas são os flavonoides de maior distribuição no reino vegetal, sendo responsáveis por diversas cores das plantas, como azul, vermelho e laranja. As antocianinas da acerola (*Malpighia emarginata* DC) são muito suscetíveis a degradação durante o processamento e estocagem, que resulta em alteração da coloração vermelha característica para uma cor amarelada ou marrom no produto final, diminuindo seu apelo comercial, daí a importância de se utilizarem técnicas para estabilizar as antocianinas nos produtos derivados de acerola. A estabilidade das antocianinas pode ser melhorada através da copigmentação, fenômeno no qual o pigmento e um composto (orgânico ou inorgânico) formam associações moleculares que promovem intensificação e/ou estabilização da cor. Recentemente, tem-se estudado o emprego de nano-adsorventes na copigmentação. Dentre essa classe de materiais, destaca-se o emprego de argilas esmectitas, como a montmorilonita (MMT), cujos efeitos sobre a estabilização de antocianinas foram reportados em alguns estudos prévios. A MMT é geralmente usada como fase de reforço, melhorando as propriedades mecânicas e de barreira de materiais poliméricos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a estabilização de antocianinas por MMT em suco clarificado de acerola (SCA) e filmes comestíveis à base de gelatina adicionados de suco de acerola. A adição de MMT promoveu uma complexação das antocianinas presentes no SCA, com conseqüente intensificação da cor vermelha dos sucos e a estabilização dos parâmetros de cor em função do pH e do tempo de estocagem. A espectrometria de massa indicou adsorção da antocianina pela MMT. Nos filmes comestíveis de gelatina com suco de acerola, a adição de 6,4% de MMT (em relação a gelatina) promoveu um aumento de cerca de 30% na resistência à tração e uma redução de 44% da permeabilidade ao vapor de água. Além disso, a adição de MMT aos filmes promoveu uma redução na luminosidade (L^*) e uma intensificação e estabilização da cor vermelha.

Palavras-chave: Acerola, Montmorilonita, Filmes comestíveis.

ABSTRACT

Anthocyanins are the most widely distributed flavonoids in plants, being responsible for colors ranging from blue to red-orange. The anthocyanins from acerolas (*Malpighia emarginata DC*) are very prone to degradation upon processing and storage, resulting in changes in their characteristic red color to a yellowish or brownish color ((DE ROSSO; MERCADANTE, 2007), decreasing the commercial appeal of the final products. Thus, it is important to use techniques to stabilize anthocyanins in acerola products. Anthocyanin stability may be improved by copigmentation, in which the pigment and a second compound (copigment, organic or inorganic) form molecular associations which promote color intensification and/or stabilization. The use of nanoadsorbents for copigmentation has been studied recently. Among those, the montmorillonite-type clays (MMT) should be mentioned, whose effects on anthocyanin stabilization have been reported. MMT is commonly used as a reinforcement phase for polymeric materials, improving their mechanical and barrier properties. The objective of the present study was to evaluate the anthocyanin stabilization by MMT on acerola clarified juice and edible gelatin films containing acerola juice. The MMT addition promoted complexation of anthocyanins in acerola juice, with concomitant intensification of the red color and stabilization of the color parameters as functions of pH and storage time. Mass spectrometry indicated anthocyanin adsorption by MMT. The addition of 6.4% MMT (on a gelatin weight basis) to the films resulted in 30% increasing on tensile strength and 44% decreasing on water vapor permeability. Moreover, MMT promoted reduction in color lightness (L^*) and intensification in red color.

Keywords: Acerola, Montmorillonite, Edible films.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - ESTRUTURA DAS PRINCIPAIS ANTOCIANINAS PRESENTES NA ACEROLA. 1 CIANIDINA-3-A-O-RAMNOSÍDEO, 2 PELARGONIDINA-A-O-RAMNOSÍDEO. FIGURA ADAPTADA DE HANAMURA, HAGIWARA E KAWAGISHI (2005)	9
FIGURA 2 - ESTRUTURA BÁSICA DOS COMPOSTOS FENÓLICOS. FIGURA ADAPTADA DE DAMODARAN, PARKIN E FENNEMA (2010)	11
FIGURA 3 - CÁTION FLAVYLIUM. R ₁ E R ₂ = -H, -OH OU -OCH ₃ , R ₃ = -GLICOSIL, R ₄ = -H OU - GLICOSIL. FIGURA ADAPTADA DE DAMODARAN, PARKIN E FENNEMA (2010). 11	
FIGURA 4 - ANTOCIANIDINAS MAIS COMUNS EM ALIMENTOS. FIGURA ADAPTADA DE REIN, M. (2005).....	12
FIGURA 5 - PRINCIPAIS FORMAS DE EQUILÍBRIO DE ANTOCIANINA EXISTENTES EM MEIO AQUOSO. FIGURA ADAPTADA DE REIN, M. (2005).....	14
FIGURA 6 - ESTRUTURA DA MONTMORILONITA. (FONTE: PAIVA ET AL.,2008).....	16
FIGURA 7 - TIPOS DE COMPÓSITOS FORMADOS ENTRE POLÍMEROS E ARGILAS. ADAPTADO DE ALEXANDRE & DUBOIS, (2000).	18
FIGURA 8 - CAMINHO TORTUOSO DE UM PERMEANTE EM UM NANOCOMPÓSITO POLÍMERO- ARGILA. ADAPTADO DE ADAME & BEALL,(2009).....	19
FIGURA 9 - QUANTIFICAÇÃO DE CIANIDINA-3-GLICOSÍDEO NO SOBRENADANTE RESULTANTE DA CENTRIFUGAÇÃO DO SUCO CLARIFICADO. VALORES SEGUIDOS DA MESMA LETRA NÃO DIFEREM SIGNIFICATIVAMENTE (TUKEY, P<0,05)	35
FIGURA 10 - MUDANÇAS NOS PARÂMETROS DE COR (A) L*/L*0 (B) A*/A*0 E (C) B*/B*0 DOS DE ACEROLA ADICIONADOS DE MMT.	39
FIGURA 11 - MUDANÇAS NO PARÂMETRO ΔE* (DIFERENÇA TOTAL DE COR) DURANTE O ARMAZENAMENTO.	40
FIGURA 12 - FOTOS DOS SUCOS DE ACEROLA SCA (0% DE MMT), SCAM2 (2% DE MMT), SCAM4 (4% DE MMT) E SCAM6 (6% DE MMT).	41
FIGURA 12 - FOTOS DOS SUCOS DE ACEROLA SCA (0% DE MMT) E SCAM4 (4% DE MMT) LOGO APÓS AJUSTE DO PH.	43
FIGURA 14 - CROMATOGRAMA DO PERFIL DE ANTOCIANINAS DO SUCO CLARIFICADO DE ACEROLA(SCA) E DA ANTOCIANINA EXTRAÍDA(AE) DO TRATAMENTO SCAM6.	46
FIGURA 15 - ESPECTRO DE MASSA SEQUENCIAL (MS-MS) DA CIANIDINA-3RAMNOSÍDEO (PICO 1) E PERLAGONDINA-3-RAMOSÍDEO (PICO 2).....	47

FIGURA 16 - CURVAS DE TG(A) E DTG(B) DA MMT E DOS PRECIPITADOS DOS SCA ADICIONADOS DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MMT.	49
FIGURA 17 - DIFRATOGRAMA DO MMT PURO E PRECIPITADOS DOS SUCOS.....	52
FIGURA 18 - ESPECTRO DE FTIR DA MMT, SCA, SCAM2, SCAM4 E SCAM6.	53
FIGURA 19 - CURVAS DE TG(A) E DTG(B) DOS FILMES DE GELATINA E SCA ADICIONADOS DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MMT.	58
FIGURA 20 - DIFRATOGRAMA DO MMT PURO, GELATINA EM PÓ, FILME DE GELATINA COM SCA, FILME DE GELATINA COM SCA ADICIONADO DE 3,8% DE MMT E FILME DE GELATINA COM SCA ADICIONADO DE 6,4% DE MMT.	60
FIGURA 21 - MUDANÇAS NOS PARÂMETROS DE COR (A) L^*/L^*_0 (B) A^*/A^*_0 E (C) B^*/B^*_0 DOS SUCOS CLARIFICADOS DE ACEROLA ADICIONADOS DE MMT.....	62
FIGURA 22 - FOTOGRAFIAS DOS FILMES DE GELATINA DURANTE ARMAZENAMENTO	63
FIGURA 23 - IMAGENS OBTIDAS POR MEV DA SUPERFÍCIE DOS TRATAMENTOS 0%, 3,84% E 6,4% DE MMT.	65
FIGURA 24 - IMAGENS OBTIDAS POR MEV DA SECÇÃO TRANSVERSAL OBTIDA VIA CRIOFATURA DOS TRATAMENTOS 0%, 3,84% E 6,4% DE MMT.	66
FIGURA 2 - ESPECTRO DE FTIR ENTRE 1000 E 1800 cm^{-1} PARA A MMT PURA E FILMES DE GELATINA.....	68

SUMÁRIO

1	Revisão bibliográfica	9
1.1	Acerola: aspectos gerais	9
1.2	Antocianinas.....	10
1.3	Montmorilonita	15
1.4	Filmes comestíveis de frutas	20
2	Objetivos.....	24
2.1	Objetivo geral.....	24
2.2	Objetivos específicos	24
3	Materiais e métodos	25
3.1	Estabilização de antocianinas de suco clarificado de acerola por MMT	25
3.1.1	Materiais	25
3.1.2	Obtenção de suco clarificado de acerola e adição de MMT	25
3.1.3	Tratamentos – Adição de MMT ao suco clarificado de acerola (SCA).....	25
3.1.4	Determinações no suco clarificado de acerola.....	26
3.1.4.1	Quantificação de antocianinas no suco clarificado adicionado de MMT.....	26
3.1.4.2	Estabilidade de cor dos sucos clarificados	26
3.1.4.3	Cor do suco clarificado com 4% de MMT em diferentes valores de pH	27
3.1.4.4	Identificação das antocianinas via cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) e Espectrometria de massas	28
3.1.5	Caracterização dos precipitados dos tratamentos SCAM2, SCAM4 e SCAM6. 28	
3.1.5.1	Análise termogravimétrica (TGA).....	28
3.1.5.2	Difração de Raio-X (DRX).....	29
3.1.5.3	Espectrofotometria no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	29
3.2	Filmes de gelatina contendo suco de acerola e MMT	29
3.2.1	Preparo dos filmes de gelatina	29
3.2.2	Determinações nos filmes	31
3.2.2.1	Espessuras.....	31
3.2.2.2	Ensaio mecânicos	31
3.2.2.3	Permeabilidade ao vapor de água (PVA)	31
3.2.2.4	Opacidade	31
3.2.2.5	Análise Termogravimétrica (TGA)	32
3.2.2.6	Difração de Raios-X (DRX)	32
3.2.2.7	Estudo de estabilidade de cor	32

3.2.2.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	33
3.2.2.9 Espectrofotometria no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	33
3.3 Análise Estatística	33
4 Resultados e discussão.....	34
4.1 Estabilização de antocianinas de suco clarificado de acerola por MMT	34
4.1.1 Quantificação de antocianinas	34
4.1.2 Estabilidade de cor dos sucos clarificados com o tempo de estocagem	36
4.1.3 Cor do suco clarificado com 4% de MMT em diferentes valores de pH.....	42
4.1.4 Identificação das antocianinas via cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) acoplado a espectrômetro de massas	45
4.1.5 Caracterização dos precipitados dos tratamentos SCAM2, SCAM4 e SCAM6. 48	
4.1.5.1 Análise termogravimétrica (TGA).....	48
4.1.5.2 Difração de Raio-X (DRX).....	51
4.1.5.3 Espectrofotometria no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	52
4.2 Filmes de gelatina contendo suco de acerola e MMT.....	54
4.2.1 Ensaio mecânicos	54
4.2.2 Permeabilidade ao vapor de água (PVA).....	55
4.2.3 Opacidade	56
4.2.4 Análise Termogravimétrica (TGA)	57
4.2.5 Difração de Raios-X (DRX)	59
4.2.6 Estudo de estabilidade de cor.....	61
4.2.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	64
4.2.8 Espectrofotometria no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	67
5 Conclusão.....	69
Referências	70

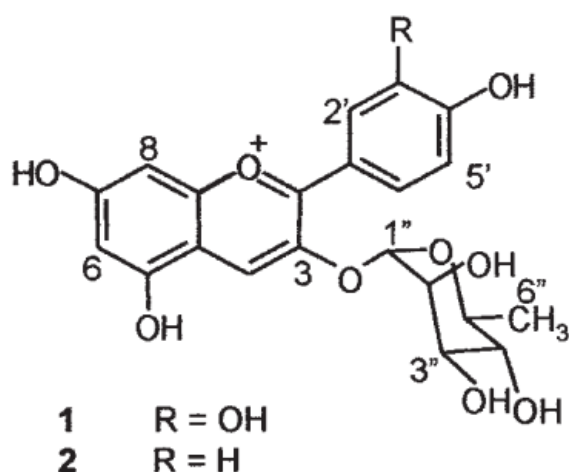
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Acerola: aspectos gerais

A acerola é um fruto da família das *Malpighiaceae* cuja denominação científica é *Malpighia emarginata* DC. Também conhecida como cereja das Antilhas ou cereja de Barbados, este fruto é nativo das Ilhas do Caribe, América Central e Norte da América do sul (RITZINGER; RITZINGER, 2011) e pode ser encontrado nos Estados Unidos da América, México, Cuba, Costa Rica, Colômbia, Suriname, Venezuela e Brasil (RODRIGUES-AMAYA, 2012), sendo este último o maior produtor e consumidor de acerola no mundo (CARVALHO et al., 2000), tendo produzido 24.451 toneladas de acerola em 2006, sendo 18.174 toneladas oriundas do Nordeste (IBGE, 2006).

A cor da casca de acerolas maduras pode variar de vermelho-amarelada a vermelho-púrpura, e a polpa pode variar do amarelo ao vermelho (RITZINGER; RITZINGER, 2011). Esta cor vermelha da acerola decorre da presença de antocianinas no fruto (LIMA et al., 2002), sendo as principais representantes desta classe a cianidina-3-ramnosídeo e a pelargonidina-3-ramnosídeo (Figura 1) (DE BRITO et al., 2007; DELVA, 2012; HANAMURA; HAGIWARA; KAWAGISHI, 2005; VERA DE ROSSO et al., 2008).

Figura 1 - Estrutura das principais antocianinas presentes na acerola. 1 cianidina-3- α -O-ramnosídeo, 2 pelargonidina- α -O-ramnosídeo...



Os principais produtos derivados do processamento da acerola são a polpa pasteurizada congelada e o suco pasteurizado, mas a fruta também pode ser encontrada

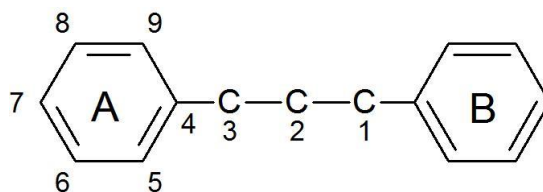
na forma liofilizada ou como néctar e geleia. (RITZINGER; RITZINGER, 2011; RODRIGUES-AMAYA, 2012).

As antocianinas da acerola são muito instáveis, e sua degradação durante o processamento e o período de estocagem reduz a coloração vermelha característica (DE ROSSO; MERCADANTE, 2007), resultando em uma cor amarela ou marrom no produto final, diminuindo seu apelo comercial, pois o consumidor espera que a cor seja próxima à do fruto *in natura*. Lima *et al.* (2002) verificaram uma redução na concentração de antocianina de polpas de acerola armazenadas sob congelamento. O mesmo grupo (LIMA *et al.*, 2003) também avaliou a concentração de antocianinas em polpas de acerola de 12 cultivares diferentes armazenadas sob congelamento, verificando uma redução de 3,4% a 23,6% após 180 dias de armazenamento (-18°C). Maia *et al.* (2007) verificaram que a pasteurização de suco de acerola (90°C/1 min) promoveu uma redução na concentração final de antocianinas, bem como uma mudança na cor final do produto. Torna-se de suma importância utilizar técnicas para melhorar a estabilidade das antocianinas nos produtos derivados de acerola, visando a melhoria da aparência e assim aumentar o consumo.

1.2 Antocianinas

As antocianinas pertencem ao subgrupo flavonoide dos compostos fenólicos, e são um dos grupos de pigmentos de maior distribuição no reino vegetal. São responsáveis por diversas cores das plantas, como azul, roxo, violeta, magenta, vermelho e laranja (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Estas moléculas pertencem ao grupo de compostos fenólicos, com estrutura composta por dois anéis aromáticos ligados por uma unidade C₃ (anel pirano) e um esqueleto carbônico C₆C₃C₆ (Figura 2) (DELGADO-VARGAS; JIMÉNEZ; PAREDES-LÓPEZ, 2000).

Figura 2 - Estrutura básica dos compostos fenólicos.



As antocianinas são substitutos glicosilados (poli-hidroxi e/ou poli-metoxi) do sal 2-fenilbenzopirona (sal *flavylium*), conforme a Figura 3 (DELGADO-VARGAS; JIMÉNEZ; PAREDES-LÓPEZ, 2000). A principal parte da estrutura das antocianinas (a aglicona) é uma antocianidina, a qual contém ligações duplas conjugadas responsáveis pela absorção da luz no comprimento de onda de 500 nm, fazendo com que a cor vermelha seja perceptível aos olhos humanos (REIN, 2005).

Há uma enorme variedade de antocianidinas presente na natureza, porém aquelas que costumam ocorrer em alimentos são pelargonidina, cianidina, peonidina, delfinidina, malvidina e petunidina (Figura 4) (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; REIN, 2005) que se diferenciam pelo número de grupos hidroxila e metoxila ligadas ao anel B do cátion *flavylium*.

Figura 3 - Cátion Flavylium. R_1 e $R_2 = -H, -OH$ ou $-OCH_3$, $R_3 = -glicosil$, $R_4 = -H$ ou $-glicosil$.)

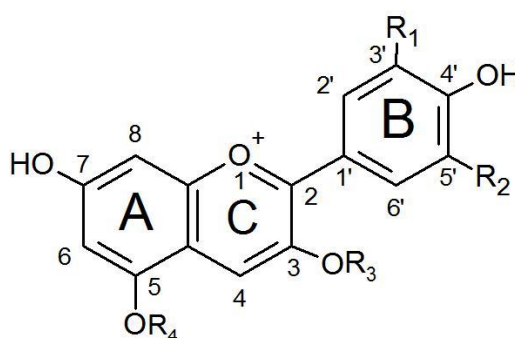
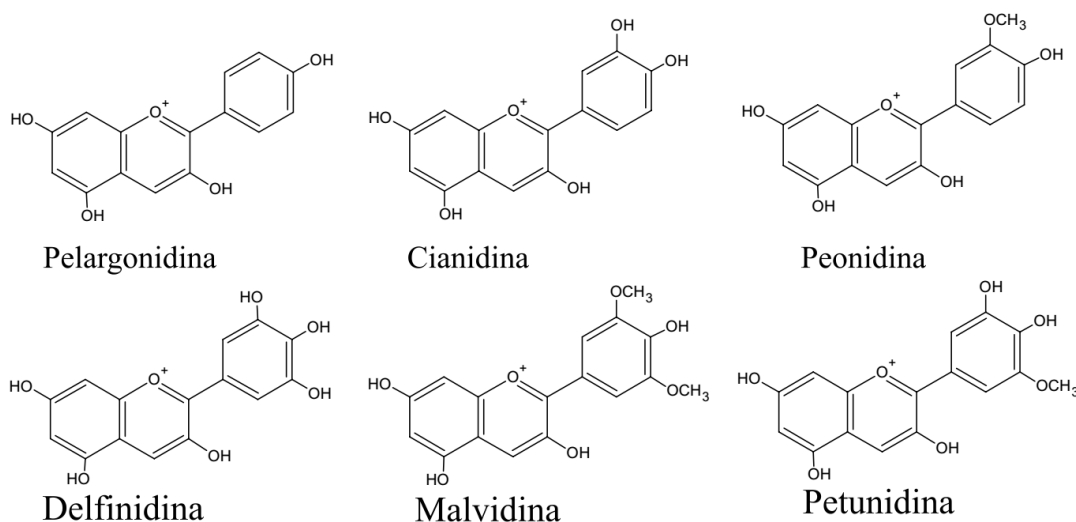


Figura 4 - Antocianidinas mais comuns em alimentos. Figura adaptada de Rein, M. (2005)



As antocianinas são pigmentos muito instáveis, podendo sofrer alterações durante o processamento e estocagem dos alimentos. A estabilidade da cor das antocianinas é afetada diretamente pelo pH, temperatura, concentração e estrutura das antocianinas, oxigênio, luz, e enzimas presentes no alimento (REIN, 2005). Outro interferente na estabilidade das antocianinas é a presença de alta concentração de ácido ascórbico no meio, que acelera o processo de degradação das antocianinas, possivelmente por sua condensação no carbono 4 da estrutura das antocianinas (DE ROSSO; MERCADANTE, 2007). Considerando que a acerola é uma excelente fonte de ácido ascórbico (MEZADRI et al., 2008; VENDRAMINI; TRUGO, 2000), este é o principal causador da instabilidade das antocianinas presentes (DE ROSSO; MERCADANTE, 2007).

O aumento da metilação nas antocianinas é diretamente proporcional à sua estabilidade, enquanto que o aumento da hidroxilação diminui a estabilidade. Logo, a cor dos alimentos que contêm antocianinas do tipo pelargonidina, cianidina ou delfinidina, como as acerolas, são mais instáveis que os alimentos que contêm antocianinas do tipo petunidina ou malvidina (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). As antocianinas comumente encontradas nas acerolas são as cianidina-3-ramnosídeo e pelargonidina-3-ramnosídeo (DE BRITO et al., 2007; DELVA; SCHNEIDER, 2013; VERA DE ROSSO et al., 2008), antocianinas sem grupos metoxila na estrutura principal ligadas a um monossacarídeo. O aumento do número de grupamentos hidroxila nas estruturas de antocianinas tende a aumentar a cor azulada, enquanto que o aumento de

grupamento metoxila tendem a aumentar a cor vermelha das antocianinas (DELGADO-VARGAS; JIMÉNEZ; PAREDES-LÓPEZ, 2000).

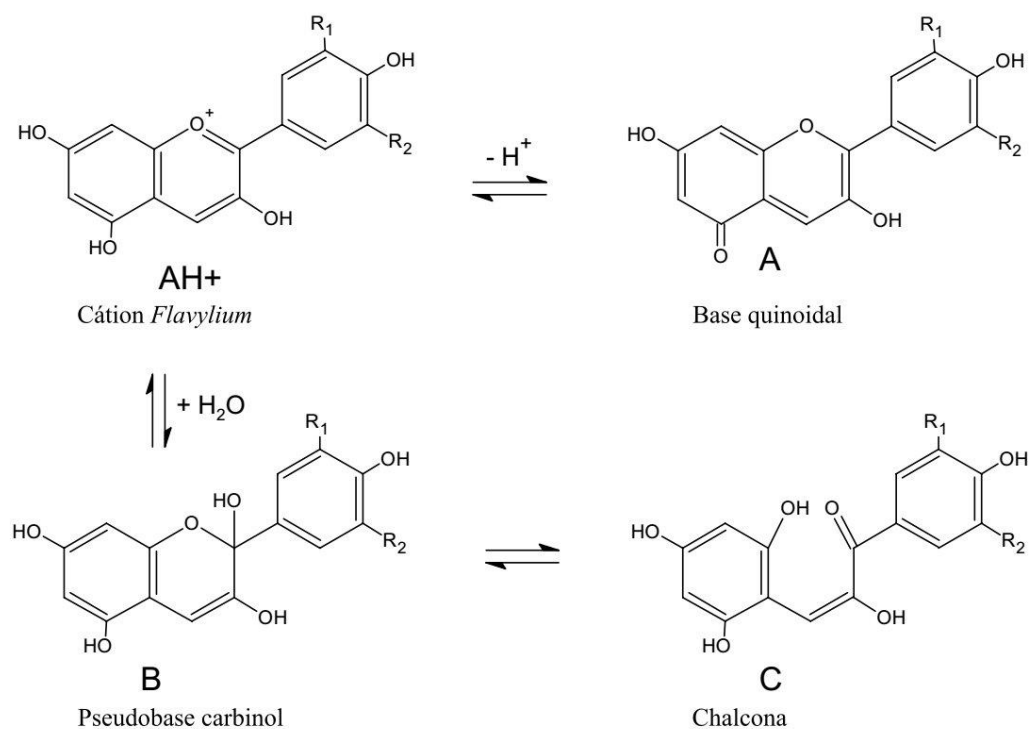
O tipo de açúcar ligado à aglicona também influencia a estabilidade das antocianinas (DELVA, 2012). Bronnum-Hansen e Flink (1985) observaram que antocianinas de sabugueiro que continham dissacarídeos eram mais estáveis que as que continham monossacarídeos. Os açúcares mais frequentemente encontrados ligados às antocianinas são glicose, ramnose, xilose, galactose e frutose (DELGADO-VARGAS; JIMÉNEZ; PAREDES-LÓPEZ, 2000; REIN, 2005).

O pH do meio tende a interferir na estabilidade e intensidade da cor das antocianinas. Cabrita, Fossen e Andersen (2000) avaliaram a cor, estabilidade e intensidade das seis antocianidina-3-glicosídeo mais comuns (pelargonidina-3-glicosídeo, cianidina-3-glicosídeo, peonidina-3-glicosídeo, delphinidina-3-glicosídeo, petunidina-3-glicosídeo e malvidina-3-glicosídeo) e verificaram uma mudança significativa nestes parâmetros no intervalo de pH 1-12, porém a maior intensificação e estabilidade da cor vermelha ocorre no intervalo de pH 1-3. As antocianinas são mais estáveis em condições ácidas, provavelmente, devido a uma redução na velocidade de hidrólise do radical 3-glicosil (MAZZA; BROUILLARD, 1987). Este aumento na estabilidade também está diretamente relacionado à posição em que o glicosil está ligado à estrutura da aglicona, sendo que glicosilação C-3 produz antocianinas mais estáveis que as glicosilações nas posições 5, 7 e 4' (LEON, 1931 *apud* REIN, 2005). Além disso, a natureza iônica das antocianinas permite que a molécula mude a conformação de sua estrutura de acordo com o pH do meio, resultando em cores diferentes (BROUILLARD, 1982; REIN, 2005).

As antocianinas podem ser encontradas sob quatro formas estruturais, dependendo do pH: base quinoidal azul (A), cátion *flavylium* vermelho (AH^+), pseudobase carbinol incolor (B) e chalcona incolor (C), conforme a Figura 5. O cátion *flavylium* é a espécie predominante nos meios muito ácidos, e o aumento do pH promove a redução da concentração do cátion *flavylium* e conseqüentemente a intensidade da cor, através do ataque nucleofílico da água, formando a pseudobase carbinol incolor. A dupla ligação entre os anéis aromáticos A e B é desfeita no carbinol, logo a luz visível não é mais absorvida. Em valores mais elevados do pH, o cátion *flavylium* tende a perder prótons de forma rápida, formando a base quinoidal azul. Com a continuação da elevação do pH, a

forma carbinol é transformada em chalcona incolor, devido à abertura do anel (BROUILLARD, 1982).

Figura 5 - Principais formas de equilíbrio de antocianina existentes em meio aquoso.



A estabilidade das antocianinas pode ser melhorada através da chamada copigmentação, que é um fenômeno no qual o pigmento e um segundo composto (copigmento, que pode ser inorgânico ou orgânico) formam associações moleculares ou complexos, geralmente resultando em uma mudança ou aumento da intensidade da cor (BOULTON, 2001).

Os copigmentos são sistemas ricos em elétrons π que são capazes de se associar com os íons *flavylium*, que são bastante pobres em elétrons. Esta associação protege a posição 2 do íon *flavylium* do ataque nucleofílico da água, reduzindo a concentração de carbinol no meio, fazendo com que a solução permaneça colorida (BAKOWSKA; KUCHARSKA; OSZMIAŃSKI, 2003; CASTANEDA-OVANDO et al., 2009; MATSUFUJI et al., 2003; MAZZA; BROUILLARD, 1987). A associação antocianina-copigmento ocorre via processo de autoassociação, relacionado com forças hidrofóbicas, prevenindo o ataque nucleofílico da água e consequente perda de cor (MAZZA;

BROUILLARD, 1987). O copigmento sozinho é geralmente incolor, mas, quando adicionado a uma solução de antocianina, aumenta consideravelmente a cor da solução. Um copigmento pode ser um flavonoide, alcaloide, aminoácido, ácido orgânico, polissacarídeo, nucleotídeo, metal, e auto associação de antocianinas (CASTANEDA-OVANDO et al., 2009).

A associação de antocianinas e copigmentos resulta em efeito hiperacrômico (ΔA) e deslocamento batocrômico ($\Delta \lambda$). O efeito hiperacrômico está relacionado com o aumento da intensidade da cor, devido ao aumento da absorbância pelos compostos, enquanto que o deslocamento batocrômico está relacionado com a mudança de tonalidade devida a uma mudança na absorção da luz na faixa de espectro visível de um comprimento de onda menor para um maior, com conseqüente mudança de cor, indo (no caso de antocianinas) de laranja/vermelho para roxo/azul (BAKOWSKA; KUCHARSKA; OSZMIAŃSKI, 2003; CASTANEDA-OVANDO et al., 2009; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

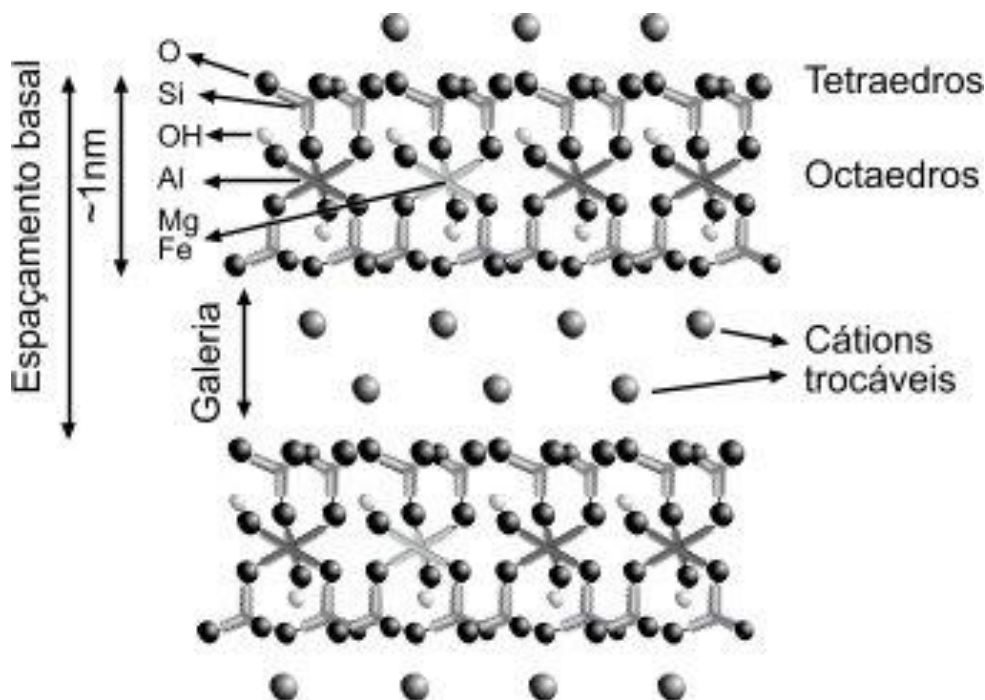
Recentemente, têm-se estudado vários nano-adsorventes que são capazes de interagir com polifenóis ou outras moléculas semelhantes (GOLBASHY et al., 2016). Estes nano-adsorventes podem ser utilizados em sistemas de carreadores de fármacos (BAEK; CHOY; CHOI, 2012; GOLBASHY et al., 2016; SAHA et al., 2016; SARMAH et al., 2015; TEIXEIRA-NETO et al., 2012), extração de pigmentos (LIMA et al., 2007) e para estabilização de antocianinas (KOHNO et al., 2007, 2009; TEIXEIRA-NETO et al., 2012). Dentre essa classe de materiais, destaca-se o emprego de argilas esmectitas para estabilização de antocianinas, sendo um de seus representantes a montmorilonita.

1.3 Montmorilonita

Uma das argilas mais estudadas como adsorvente é a montmorilonita (MMT) (Figura 6), um aluminossilicato 2:1 do grupo das esmectitas, constituído de uma placa octaédrica de hidróxido de alumínio entre duas camadas tetraédricas de sílica (WEISS; TAKHISTOV; MCCLEMENTS, 2006). Existe um forte campo eletrostático no espaço interlamelar, devido às cargas presentes permanentemente nas camadas destas argilas (KOHNO et al., 2008). O desbalanço da superfície negativa é compensado por cátions de troca, conferindo à argila a propriedade de troca catiônica (geralmente Na^+ , Ca^{2+} , K^+

dentre outros). Estas trocas catiônicas também rendem às argilas um caráter hidrofílico (GOLBASHY et al., 2016).

Figura 6 - Estrutura da montmorilonita. (Fonte: Paiva et al., 2008).



O processo de adsorção de pigmentos catiônicos ocorre instantaneamente, onde os cátions orgânicos substituem os cátions de troca presente no espaço interlamelar, formando complexos de argila e pigmento (PENTRÁK et al., 2012). Esta substituição também favorece a interação antocianina-MMT, visto que as antocianinas possuem um caráter catiônico, que favorece a interação com os grupamentos alumínio-oxigênio da MMT (LIMA et al., 2007).

Lima *et al.* (2007) avaliaram o caráter adsorvente de diferentes materiais inorgânicos, dentre eles a montmorilonita, sobre antocianinas oriundas da flor da Jamaica, e verificaram que a MMT foi capaz de adsorver as antocianinas, retendo a cor vermelha característica.

Kohno *et al.* (2007) observaram a estabilização de um cátion *flavylium* sintético por intercalação com MMT, por simples homogeneização de uma solução aquosa de

flavylium com MMT. O pigmento foi estabilizado por efeito do campo eletrostático entre as lamelas da argila, e o efeito estérico inibiu as reações de hidratação ou isomerização das antocianinas. Com isso, a estabilidade térmica, química e fotoestabilidade do pigmento foram melhoradas. Posteriormente, o mesmo grupo (KOHNO et al., 2009) confirmou o efeito da MMT em adsorver e estabilizar antocianinas. Os autores observaram que antocianina intercalada em MMT teve estabilidade melhorada contra o efeito de luz visível, e manteve sua cor original a valores de pH de até 11. O grupo atribuiu a melhora da estabilidade das antocianinas às interações eletrostáticas e à supressão do ataque de íons de oxigênio e hidroxila à antocianina contida no espaço interlamelar da montmorilonita.

A MMT atua portanto, como um copigmento, melhorando a estabilidade de antocianinas, devido ao efeito de impedimento estérico juntamente com efeito eletrostático (MAZZA; BROUILLARD, 1987).

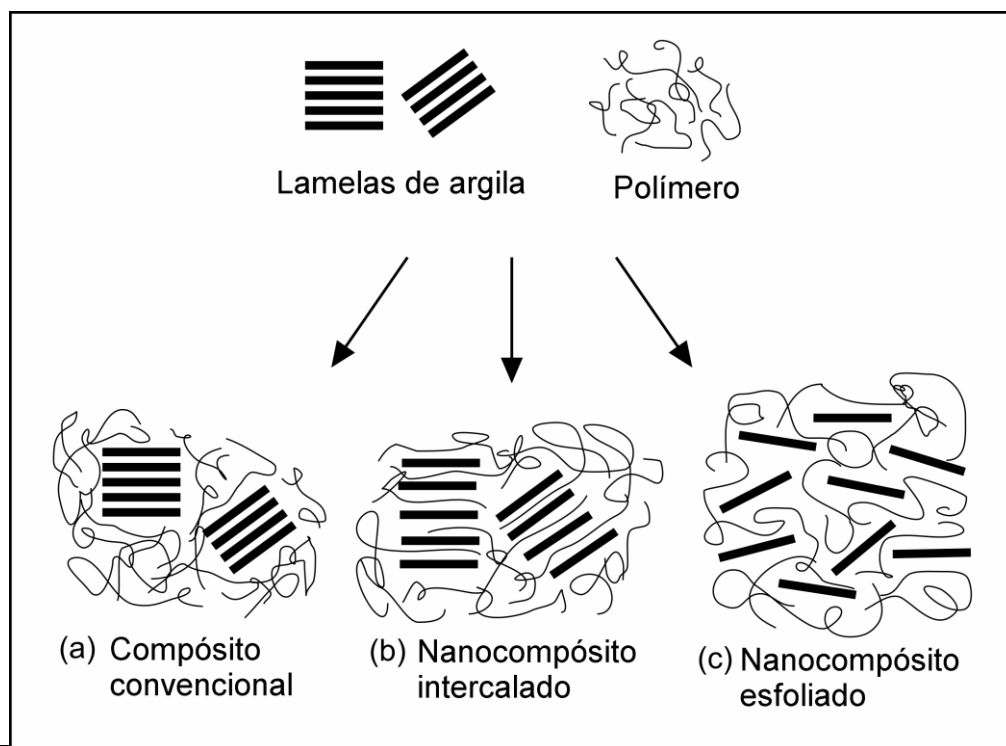
Embora a MMT seja explorada neste trabalho como estabilizante de antocianinas, seu uso mais comum é como reforço em materiais poliméricos, através da obtenção de nanocompósitos. Compósitos poliméricos são misturas de polímeros com outros compostos, orgânicos ou inorgânicos, geralmente com o propósito de reforçar o material. Quando um agente de reforço tem pelo menos uma dimensão na escala nanométrica (1-100 nm), o compósito formado é chamado de nanocompósito. Os agentes de reforço podem ter diferentes geometrias, podendo ter 3 (nanoesferas), 2 (nanotubos e nanofibras) ou apenas 1 dimensão nanométrica (nanoplacas). As nanoargilas são nanoplacas, já que possuem espessura nanométrica sendo as espessuras de placas (na ordem de 1 nm) e comprimento entre 200-300nm (ALEXANDRE; DUBOIS, 2000; KASIRGA; ORAL; CANER, 2012).

Uma dispersão uniforme de agentes de reforço nanométricos resulta em uma grande área interfacial entre o agente de reforço e a matriz, reduzindo a mobilidade molecular e alterando as propriedades mecânicas e térmicas do material.

O conceito de nanocompósitos polímero-argila surgiu ao final da década de 1980, mas apenas ao final da década de 1990 começaram a surgir trabalhos de pesquisa relacionados a aplicações desses nanocompósitos para embalagem (SUDIP et al., 2006). As argilas geralmente usadas em nanocompósitos são silicatos que consistem em camadas

bidimensionais, com poucos nanômetros de espessura e comprimento de até vários micrômetros. Os compósitos polímero-argila podem ser basicamente de três tipos (Figura 7): microcompósitos (compósitos convencionais), em que as lamelas de argila ficam aglomeradas na matriz, resultando em pobres propriedades óticas (alta opacidade) e um efeito de reforço não muito eficiente; nanocompósitos intercalados, formados pela penetração de cadeias poliméricas entre as lamelas da argila, resultando em uma estrutura de camadas alternadas polímero-argila; e nanocompósitos esfoliados, em que as camadas de argila se delaminam e ficam dispersas aleatoriamente na matriz (ALEXANDRE & DUBOIS, 2000). Os nanocompósitos esfoliados apresentam geralmente as melhores propriedades físicas, graças à alta interação entre os componentes (Figura 7) (ADAME; BEALL, 2009; ALEXANDRE et al., 2009).

Figura 7 - Tipos de compósitos formados entre polímeros e argilas. Adaptado de Alexandre & Dubois, (2000).

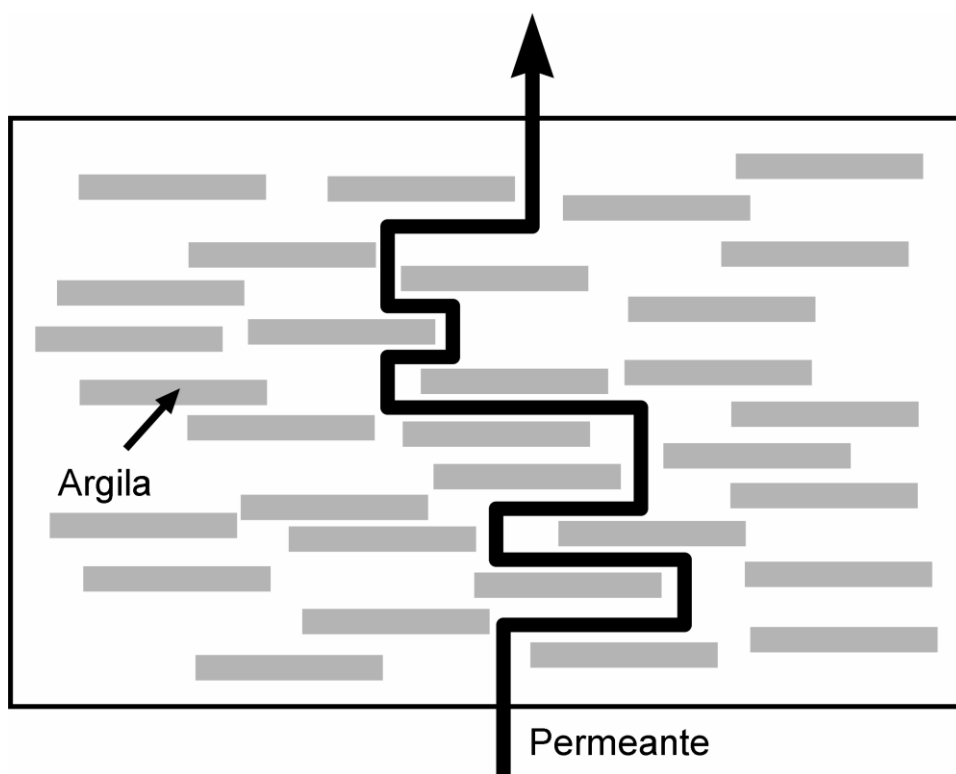


A presença de argilas em nanocompósitos com polímeros tem sido associada a um efeito de tortuosidade do caminho a ser percorrido por permeantes (Figura 8), resultando

em diminuição das taxas de permeação, o que se traduz em excelentes propriedades de barreira (CHOUDALAKIS; GOTSIS, 2009).

Vários estudos relacionam a adição de nanoargilas, em especial a MMT, com ganho em resistência à tração e diminuição da permeabilidade ao vapor de água pelo material (CORONADO JORGE et al., 2015; FLAKER et al., 2015; NAGARAJAN et al., 2014a; OLIVEIRA et al., 2016).

Figura 8 - Caminho tortuoso de um permeante em um nanocompósito polímero-argila. Adaptado de Adame & Beall, (2009).



Frequentemente, utiliza-se a montmorilonita como reforço de filmes à base de proteínas, devido às interações eletrostáticas das regiões positivas das proteínas e a superfície negativa das lamelas, bem como ligações de hidrogênio entre os grupos NH da proteína e os Si-O da montmorilonita (FLAKER et al., 2015). Estas interações favorecem as propriedades de filmes nanoreforçados com MMT. Além do ganho das propriedades mecânicas há relatos na literatura do aumento da estabilidade térmica de filmes adicionados de MMT (MARTUCCI; RUSECKAITE, 2010).

Em suma, a MMT possui duas propriedades interessantes, que foram exploradas neste trabalho: a capacidade de adsorver antocianinas promovendo sua estabilização, e a capacidade de reforço de polímeros. A combinação de tais características pode ser explorada, por exemplo, para melhorar o desempenho físico e a estabilidade de cor de filmes comestíveis à base de acerola.

1.4 Filmes comestíveis de frutas

Filmes comestíveis à base de polpas de fruta têm sido cada vez mais estudados devido a possibilidade de combinar a capacidade de formar películas dos biopolímeros com a cor e o sabor dos pigmentos e compostos voláteis das frutas (ANDRADE; FERREIRA; GONÇALVES, 2016; AZEREDO et al., 2009, 2012a, 2016). Este materiais são desenvolvidos para atuar como uma barreira entre o alimento e o meio ambiente, no entanto este tipo de material pode ter aplicações como folhas para sushi, fitas de frutas ou revestimento colorido para algumas aplicações específicas (AZEREDO; WALDRON, 2016). Os filmes à base de frutas ou hortaliças tendem a ter baixa permeabilidade a oxigênio, alta permeabilidade à vapor de água e propriedades mecânicas aceitáveis, tornando-se uma fonte alternativa para a produção de filmes comestíveis (ANDRADE; FERREIRA; GONÇALVES, 2016).

As propriedades dos filmes comestíveis são diretamente dependentes da matriz polimérica utilizada como matéria-prima. Alguns trabalhos com filmes de frutas utilizam os próprios componentes das polpas como matrizes dos filmes. As polpas de frutas são ricas em polissacarídeos, principalmente pectina e celulose (McHUGH; HUXSOLL; KROCHTA, 1996; SOTHORNVIT; RODSAMRAN, 2008). McHugh, Huxsoll e Krochta (1996) obtiveram filmes comestíveis de frutas utilizando como matérias-primas polpas de pêsego, pera, damasco e maçã com boa propriedade de barreira ao oxigênio, porém com alta permeabilidade ao vapor de água. Sothornvit e Rodsamran (2008) também obtiveram filmes comestíveis utilizando somente polpa de manga como principal constituinte para revestimento de manga minimamente processada, porém os filmes apresentaram alta permeabilidade ao vapor de água e baixa resistência a tração e alongação. Andrade, Ferreira e Gonçalves (2016) obtiveram filmes comestíveis a partir

de farinha de resíduos de frutas e vegetais com o intuito de promover o aproveitamento de resíduos oriundos da indústria.

Uma vertente na pesquisa de filmes comestíveis à base de frutas ou hortaliças é a adição de biopolímeros como matriz adicional, para ajudar na formação dos filmes. Proteínas e polissacarídeos resultam em filmes com boas propriedades mecânicas e sensoriais, são eficazes barreiras a compostos voláteis e gases de baixo peso molecular, tais como oxigênio e dióxido de carbono, apesar de serem sensíveis à umidade, devido à natureza hidrofílica destes componentes (ANDRADE; FERREIRA; GONÇALVES, 2016; DEBEAUFORT et al., 2000; YANG; PAULSON, 2000). Ascheri *et al.* (2012) avaliaram o efeito da variação de concentração de polpa de acerola liofilizada em filmes de amido de mandioca, obtendo filmes com coloração alaranjada e uma alta permeabilidade a vapor de água em filmes com até 60% de polpa de acerola liofilizada. Wang *et al.* (2011) avaliaram o efeito da adição de diferentes matrizes poliméricas (amido de milho, carboximetilcelulose e gelatina) nas propriedades mecânicas de filmes de polpa de cenoura, verificando uma melhora na resistência à tração nos filmes adicionados de biopolímeros, possibilitando a obtenção de um material que poderia ser utilizado como embalagem ou revestimento de diversos tipos de alimentos.

Uma forma de melhorar as propriedades físicas dos filmes comestíveis à base de polpas de frutas é através da adição de nanoreforço. Martelli *et al.* (2013) obtiveram filmes comestíveis de polpa de bananas maduras adicionados de baixas concentrações de pectina e plastificante, além de avaliarem o efeito da adição de nano quitosana nos filmes, verificando uma redução da permeabilidade ao vapor de água. Azeredo *et al.* (2009) avaliaram o efeito da adição de nanofibras de celulose em filmes de polpa de manga, e verificaram um aumento na resistência à tração e uma redução na permeabilidade ao vapor de água. Azeredo *et al.* (2012b) também avaliaram o efeito da adição de nanocelulose de duas fontes diferentes em filme de alginato de sódio e polpa de acerola, e verificaram uma melhora nas propriedades físicas do filme. O mesmo grupo (AZEREDO et al., 2012a) avaliou o efeito da adição de nanocelulose e montmorilonita em revestimento de alginato de sódio e polpa de acerola, verificando que a adição dos nanoreforços ajudaram a aumentar a vida de prateleira das acerolas, além de uma retenção da cor vermelha da polpa de acerola promovida pela adição de MMT. A Tabela 1 traz um resumo de um apanhado de trabalhos que utilizam polpa de frutas ou hortaliças em sua composição, seja para formar filmes ou revestimentos.

Nesse contexto, ressalta-se o emprego de materiais adsorventes que atuam como nanoreforço para incremento nas propriedades físicas e de barreira, além da retenção de cor dos filmes comestíveis à base de frutas com o intuito de torná-los produtos mais eficazes e atrativos para o consumo.

Tabela 1 - Quadro resumo de trabalhos contendo fruta/legume como principal constituinte dos filmes comestíveis

Tipo	Produto de fruta/hortaliças	Matriz polimérica adicionada	Plastificante	Obs.	Referência
Filmes	Polpa de pêssego, pera, damasco ou maçã	-	-	Reticulação com cloreto de cálcio	(McHUGH; HUXSOLL; KROCHTA, 1996)
Filme	Suco de uva	Amido	-	-	(KAYA; MASKAN, 2003)
Filme	Polpa de maçã	Pectina	Glicerol	Óleos essenciais	(ROJAS-GRA et al., 2006)
Filme	Polpa de manga	-	-	-	(SOTHORNVIT; RODSAMRAN, 2008)
Filme	Polpa de manga	-	-	Nano fibras de celulose	(AZEREDO et al., 2009)
Filme	Polpa de cenoura	Amido de milho/carboxilmetil-celulose / gelatina	Glicerol	-	(WANG et al., 2011)
Revestimento	Polpa de acerola	Alginato de sódio	Xarope de milho	Nano fibras de celulose / montmorilonita	(AZEREDO et al., 2012a)
Filme	Polpa de acerola	Alginato de sódio	Xarope de milho	Nano fibras de celulose	(AZEREDO et al., 2012b)
Filme	Polpa de acerola	Amido de mandioca	-	-	(FARIAS et al., 2012)
Filme	Polpa de banana	Pectina	Glicerol	Nano quitosana	(MARTELLI et al., 2013)
Filme	Polpa de açaí	Pectina	Glicerol	Óleo essencial de tomilho / compostos polifenóis da casca da maçã	(ESPITIA et al., 2014)

Filme	Polpa de mamão	Hidroxipropil metilcelulose	-	Nano quitosana	(LOREVICE; MOURA; MATTOSO, 2014)
Filme	Polpa de mamão	Pectina	-	Cinamaldeído	(OTONI et al., 2014)
Filme	Suco de romã	Pectina	Glicerol	Reticulação com ácido cítrico	(AZEREDO et al., 2016)
Filme	Farinha de resíduo de frutas e vegetais	-	-	-	(ANDRADE; FERREIRA; GONÇALVES, 2016)

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos de incorporação de MMT sobre as propriedades físicas e de cor de suco clarificado de acerola e filmes de gelatina contendo suco clarificado de acerola.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos da adição de diferentes concentrações de montmorilonita (MMT) sobre a estabilidade de cor de suco clarificado de acerola (SCA) ao longo da estocagem;
- Avaliar o efeito da adição de MMT sobre a estabilidade de cor de suco de acerola clarificado em diferentes valores de pH;
- Caracterizar as antocianinas da acerola complexadas pela MMT;
- Avaliar o efeito da adição de MMT sobre as propriedades mecânicas, permeabilidade ao vapor de água, opacidade, estabilidade térmica e estabilidade de cor durante armazenamento de filmes de gelatina contendo suco clarificado de acerola.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Estabilização de antocianinas de suco clarificado de acerola por MMT

3.1.1 *Materiais*

As polpas congeladas de acerola (*Malpighia emarginata*) da marca Pomar da Polpa, todas do mesmo lote de fabricação, foram adquiridas em mercado local e armazenadas em câmara frigorífica a -18 °C até a sua utilização.

A montmorilonita (MMT) usada foi cedida pela empresa FLOW CHEMICAL Ltda. (São Paulo, SP), com a seguinte composição química: SiO₂, 66.0%; Fe₂O₃, 3.0%; CaO, 1.0%; TiO₂, 0.8%; Al₂O₃, 19.5%; MgO, 5.0%; Na₂O, 3.0%; K₂O, 0.1%.

3.1.2 *Obtenção de suco clarificado de acerola e adição de MMT*

As polpas foram previamente descongeladas em câmara de resfriamento (4 ± 1 °C). Após total descongelamento, as amostras foram homogeneizadas em Ultra-Turrax T50 (IKA) a 8000 rpm por 10 minutos e ultracentrifugadas em dois ciclos de 26400g por 15 minutos a 20 °C (Hitachi Modelo CR22GIII). O sobrenadante (suco clarificado de acerola, com teor de sólidos solúveis totais de 5,8%) foi filtrado em sistema a vácuo com papel de filtro de 28µm, e o precipitado foi descartado. As amostras foram armazenadas em garrafas de polipropileno em câmara de congelamento (-18 °C).

3.1.3 *Tratamentos – Adição de MMT ao suco clarificado de acerola (SCA).*

Neste estudo foram avaliadas as concentrações de 0, 2, 4 e 6% (m/m, com base no teor de sólidos solúveis totais do SCA) de MMT adicionada ao SCA. Os tratamentos foram denominados SCA, SCAM2, SCAM4 e SCAM6, respectivamente. As amostras foram produzidas pela adição de MMT ao SCA (em triplicata para cada concentração de MMT) e mantidas sob agitação magnética (660 rpm) por 1 h, protegidas da luz. Decorrido este período, o suco foi homogeneizado em Ultra-Turrax T25 a 10000 rpm por 5 minutos.

3.1.4 Determinações no suco clarificado de acerola

3.1.4.1 Quantificação de antocianinas no suco clarificado adicionado de MMT

Como uma estimativa indireta do grau de retenção das antocianinas pela MMT, os sucos clarificados de acerola com MMT (SCAM) e sem MMT (SCA) foram ultracentrifugados (26400g, 15 minutos e 4 °C) e submetidos à quantificação das antocianinas no sobrenadante (ou seja, das antocianinas não retidas pela MMT). A quantificação foi feita segundo a metodologia do pH único descrita por Fuleki e Francis (1968). Uma alíquota de 1 ml do SCAM foi transferida para balão volumétrico de 10 ml, que foi completado com solução de etanol 95% / HCl 1,5N (85:15), permanecendo em repouso durante 1 h no escuro antes da leitura da absorbância em espectrofotômetro (Varian, modelo Cary 50) no comprimento de onda de 535 nm. Os precipitados foram lavados com água deionizada, ultracentrifugados (dois ciclos de 26400g, 15 minutos e 4 °C). Em seguida foram acondicionados em dessecador contendo sílica gel por 1 semana em temperatura ambiente (24°C) e armazenados em microtubos cônicos em temperatura ambiente (24°C) abrigados da luz para análise posterior.

O cálculo do teor de antocianinas totais por 100g de suco clarificado foi obtido de acordo com a Equação 1.

$$AntT = \frac{A \times MM \times FD \times 1000}{\epsilon \times 1} \quad (1)$$

A: Absorbância;

MM: massa molar (449,2 g/mol para a cianidina-3-glicosídeo);

FD: fator de diluição;

ϵ : coeficiente de extinção (26900 l.mol⁻¹.cm⁻¹ para a cianidina-3-glicosídeo).

3.1.4.2 Estabilidade de cor dos sucos clarificados

Os SCAM com diferentes teores de MMT foram adicionados de 0,1% (m/v) de sorbato de potássio, sob agitação magnética por 15 minutos, e acondicionados em câmara fria (4 ± 1 °C) por um período de 60 dias.

A cor das amostras de suco foi determinada com o auxílio de colorímetro (Konica Minolta modelo CR-400), com triplicata de leitura para cada repetição. O equipamento foi calibrado em superfície padrão branca. Foi utilizado o espaço de cor CIELab, onde a cor é expressa em função de L^* , a^* e b^* . O L^* define a luminosidade do material analisado e varia do preto ($L^* = 0$) ao branco ($L^* = 100$), enquanto que os valores de a^* e b^* representam a cromaticidade, do verde ($a^* = -60$) ao vermelho ($a^* = 60$) e de azul ($b^* = -60$) a amarelo ($b^* = 60$). A colorimetria foi avaliada por um período de 60 dias com o intuito de quantificar o efeito do MMT sob as antocianinas presentes no SCA. A diferença total de cor (ΔE^*) (GORDILLO et al., 2012a) foi calculada de acordo com a Equação 2, onde ΔL^* , Δa^* e Δb^* são as diferenças entre os parâmetros de cor correspondente de cada amostra e os observados no início do armazenamento (dia 0) e o respectivo valor no dia cada concentração avaliada.

$$\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad (2)$$

Para se avaliar a tendência de variação dos parâmetros L^* , a^* e b^* calculou-se a razão (L^*/L^*_0 , a^*/a^*_0 e b^*/b^*_0) em relação aos valores iniciais observados (L^*_0 , a^*_0 e b^*_0), plotando em relação do tempo de armazenamento observado. Todas as amostras foram elaboradas em pH natural do suco de 3,4.

3.1.4.3 Cor do suco clarificado com 4% de MMT em diferentes valores de pH

Foi avaliada a estabilidade de cor dos sucos clarificados à variação do pH via colorimetria. As amostras foram preparadas conforme métodos descritos anteriormente. O pH das amostras foi ajustado com o auxílio de soluções de HCl (0,1M ou 1M) e NaOH (0,1M ou 1M) para os valores de 1, 3, 5, 7, 9, 11 e 13. Após o ajuste de cada pH, foi realizada a colorimetria do suco. A diferença total de cor (ΔE^*) foi calculada de acordo com a Equação 2, onde ΔL^* , Δa^* e Δb^* são as diferenças entre os parâmetros de cor para os tratamentos SCA e SCAM4, para cada valor de pH avaliado.

3.1.4.4 Identificação das antocianinas via cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) e Espectrometria de massas

Foi realizada análise cromatográfica do SCA e do precipitado resultante do tratamento SCAM6. Uma massa de 10 mg do precipitado foi ressuspensa em metanol acidificado (1 ml de metanol e 0,05 ml de HCl 6N) e homogeneizado com auxílio de vórtex e centrifugado (microcentrífuga HT, modelo CM-610) para remoção do material particulado em suspensão. Foi analisado o líquido sobrenadante, denominado AE. As amostras foram filtradas em membranas de teflon Millipore® com poros de 0,22 µm antes da análise.

A análise foi realizada em um sistema Acquity UPLC (Waters), acoplado a um sistema de Quadrupolo / Tempo de Voo (QtoF, Waters). As corridas cromatográficas foram realizadas em uma coluna Waters Acquity UPLC BEH (150 x 2,1 mm, 1,7 µm), temperatura fixa de 40 °C, fluxo de 0,4 ml / min e volume de injeção de 5 µl. As fases móveis utilizadas foram: 0,1% de ácido fórmico em água deionizada (A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (B), sendo esta com gradiente de variação de 2% a 95% (15 min).

O modo ESI+ foi adquirido na faixa de 110-1180 Da, temperatura da fonte fixa de 120 °C, temperatura de dessolvatação 350 °C, fluxo do gás dessolvatação de 500 l / h e voltagem do capilar de 3,2 kV. Leucina encefalina foi utilizada como lock mass. O modo de aquisição foi MS^E. O instrumento foi controlado pelo software Masslynx 4.1 (Waters Corporation).

3.1.5 Caracterização dos precipitados dos tratamentos SCAM2, SCAM4 e SCAM6

3.1.5.1 Análise termogravimétrica (TGA)

As análises termogravimétricas da MMT e dos precipitados obtidos dos tratamentos dos sucos SCAM (2, 4 e 6 %) foram realizadas em um analisador térmico (Perkin Elmer modelo STA 600), sob taxa de aquecimento de 10°C/min, de 20 a 900°C, sob atmosfera de ar sintético com fluxo de 50 ml/min. Foram utilizados, em média, 15 mg para cada análise de TGA.

3.1.5.2 Difração de Raio-X (DRX)

Foram analisados os precipitados das amostras SCAM2, SCAM4, SCAM6 e do MMT puro. Os difratogramas de Raio-X foram obtidos em difratômetro Rigaku gerador de raios-X de 2kW (modelo DMAXB), empregando-se tubo de cobre (Cu) com radiação $K\alpha$ 1,54 Å com intervalo angular 2θ de 3 a 30° e passo de 0,02°s⁻¹. O espaçamento entre as placas do MMT foram calculados de acordo com a Lei de Bragg (Equação 3).

$$d = \frac{\lambda}{2 \sin \theta} \quad (3)$$

Onde d é a distância calculada entre as lamelas do MMT; λ é o comprimento de onda da radiação ($\lambda=1,54$ Å) e θ é o ângulo de difração.

3.1.5.3 Espectrofotometria no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros vibracionais foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro infravermelho (Shimadzu IR Spectrophotometer modelo 8300), com número de onda variando de 4000 cm⁻¹ a 400 cm⁻¹. As amostras foram diluídas em KBr, prensadas em pastilhas e posteriormente analisadas.

3.2 Filmes de gelatina contendo suco de acerola e MMT

Para a elaboração dos filmes foi utilizada gelatina bovina tipo B com Bloom de 226g, cedida pela PB Leiner Brasil. Utilizou-se xarope de glicose de milho (Du Porto Indústria Alimentícia LTDA – 80% de carboidratos) como plastificante fazendo-se a correção pela composição de carboidratos.

3.2.1 Preparo dos filmes de gelatina

Filmes à base de gelatina com suco de acerola clarificado foram formulados com diferentes concentrações de MMT, a fim de avaliar os efeitos da MMT tanto sobre a estabilidade de cor quanto sobre as propriedades físicas dos filmes.

Os filmes foram preparados utilizando a técnica de *casting* seguindo a proporção de 1:10 (gelatina/SCA, m/v). As diferentes concentrações do MMT foram calculadas com base na quantidade de sólidos solúveis presentes no SCA utilizado na formulação das

soluções filmogênicas. As concentrações da MMT avaliadas foram 0, 2, 4, 6, 8 e 10% (m/m) com base no teor de sólidos totais solúveis do suco, o que correspondeu, respectivamente, às seguintes concentrações com base na massa seca de gelatina (matriz polimérica dos filmes): 0; 1,28; 2,56; 3,84; 5,12 e 6,40 % (m/m). Os filmes foram representados como F0, F2, F4, F6, F8 e F10, com base em suas concentrações de MMT (base sólidos solúveis do suco).

O SCA (250 mL) foi adicionado ao MMT e mantido sob agitação magnética (660 rpm) por 30 min para uma hidratação inicial da argila. Em seguida, levou-se a mistura a um sonicador (marca Unique modelo DES500) em frequência ultrassônica de 20 kHz e potência de 500 W por dois ciclos de 5 minutos com um intervalo de 5 minutos entre os ciclos. À solução foi adicionada a gelatina (25 g) e mantida sob agitação magnética (660 rpm) por 30 minutos para a hidratação da gelatina. Após o período de hidratação, a solução foi mantida a 50°C por 30 minutos sob agitação magnética (660 rpm). Após a solubilização da gelatina, o xarope de glicose (50% m/m com base na gelatina) foi adicionado, e a dispersão foi mantida sob agitação magnética (660 rpm) por 30 minutos. A dispersão filmogênica foi homogeneizada em Ultra-Turrax (IKA T25) a 10000 rpm por 15 minutos. Após a homogeneização, a dispersão filmogênica foi sonicada novamente por 5 minutos. A solução passou por degaseificação em bomba de vácuo (D.V.P. modelo RC.8D) até total remoção das bolhas presentes. A dispersão filmogênica obtida foi vertida sobre placa de vidro (30 x 30 cm) coberta por superfície de poliéster (Mylar®), puxada com o auxílio de uma barra de alumínio à espessura de 1 mm, e mantida a 24 °C por 24 horas para secagem do filme. Após secagem, os filmes foram armazenados em local protegido da luz e temperatura controlada de 24 °C.

3.2.2 *Determinações nos filmes*

3.2.2.1 *Espessuras*

As espessuras dos filmes foram determinadas com o auxílio de um medidor de espessura de camadas de revestimento (marca AKROM modelo KR1250), sendo realizadas 8 medidas para os corpos de prova dos ensaios mecânicos e 5 medidas para as amostras de análise de permeabilidade ao vapor de água e opacidade.

3.2.2.2 *Ensaio mecânicos*

Os corpos de prova foram cortados em prensa estampadora com molde nas dimensões 125 mm x 12,5 mm, acondicionados de acordo com a norma D882-01 (ASTM, 2000), sendo mantidos por 48h em ambiente com temperatura e umidade relativa controladas ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $50\pm 5\%$). As propriedades mecânicas dos filmes avaliadas foram: resistência à tração, alongação na ruptura e módulo de elasticidade (módulo Young) baseadas na norma D882-00 (ASTM, 2000). Os ensaios foram realizados em máquina universal de ensaio mecânico (EMIC modelo DL-3000) com célula de carga 10N, espaçamento entre garras de 100 mm e velocidade de tração de $12,5 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$.

3.2.2.3 *Permeabilidade ao vapor de água (PVA)*

A metodologia de permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi modificada a partir do método E96-10 (ASTM, 2010) para cinco amostras circulares (30 mm de diâmetro). Os filmes foram fixados individualmente às células de permeação de acrílico (2,4 cm de diâmetro e 1 cm de altura) contendo 2 ml de água destilada. As células foram armazenadas em dessecador por 24 horas a 24°C . Foram realizadas 8 pesagens das células de permeação ao longo de 24 horas.

3.2.2.4 *Opacidade*

A opacidade dos filmes foi medida através da avaliação da absorção de luz pelos filmes via espectrofotômetro UV-VIS (Shimadzu com módulo para amostras sólidas ISR-

2200). Foi realizada uma varredura de absorvância na região do visível (800 a 400 nm). A opacidade foi calculada com base na área do gráfico obtido (calculada pelo método trapezoidal) dividida pela espessura dos filmes, sendo expressa em $A.nm.mm^{-1}$. A análise foi realizada em triplicata para cada tratamento.

3.2.2.5 *Análise Termogravimétrica (TGA)*

Foram realizadas análises termogravimétricas dos tratamentos SCA, SCAM2, F8 e F10 em um analisador térmico (Perkin Elmer modelo STA 600), sob taxa de aquecimento de $10^{\circ}C/min$, de 20 a $700^{\circ}C$, sob atmosfera de ar sintético com fluxo de 50 ml/min. Foram utilizados, em média, 15 mg para cada análise de TGA.

3.2.2.6 *Difração de Raios-X (DRX)*

Os difratogramas de Raios-X foram obtidos em difratômetro Rigaku gerador de raios-X de 2kW (modelo DMAXB), empregando-se tubo de cobre (Cu) com radiação $K\alpha$ 1,54 Å com intervalo angular 2θ de 3 a 35° e passo de $0,02^{\circ}s^{-1}$. Foram analisados os filmes SCA, SCAM6 e F10.

3.2.2.7 *Estudo de estabilidade de cor*

Para a colorimetria dos filmes, as amostras foram preparadas conforme metodologia anteriormente descrita adicionando-se 0,1% (m/v) de sorbato de potássio às amostras e mantendo-as sob agitação magnética por 15 minutos antes da etapa de degaseificação. Foram vertidos 25 ml da dispersão filmogênica em placa de Petri (90mm de diâmetro), para obtenção de uma camada de maior espessura, para minimizar a interferência da cor do fundo. As dispersões foram acondicionadas em sala escura por 72 horas a $24^{\circ}C$ até secagem total.

A cor foi determinada com o auxílio de colorímetro (Konica Minolta modelo CR-400), com quintuplicata de leitura para cada placa de Petri. O equipamento foi calibrado em superfície padrão branca. Foi utilizado o espaço de cor CIELab. As leituras foram

realizadas diariamente por um período de 8 dias e uma última leitura com 18 dias de armazenamento.

3.2.2.8 *Microscopia eletrônica de varredura (MEV)*

As amostras de filme para microscopia eletrônica de varredura foram congeladas em nitrogênio líquido, fraturadas e secas em dessecador com sílica gel por 2 semanas. As amostras foram depositadas sobre suportes de alumínio e metalizadas com ouro. Os grids foram visualizados em microscópio eletrônico de varredura Tescan Vega 3, sob voltagem de aceleração de 30KV no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Embrapa Agroindústria Tropical. Foram obtido imagens da superfície e da secção transversal dos filmes.

3.2.2.9 *Espectrofotometria no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)*

Os espectros vibracionais foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro Infravermelho (Perkin Elmer, FT-IR / NIR FRONTIER). Foi utilizado o acessório Pike Technologies ATR, modelo MIRacle com cristal ZnSe e resolução de 4 cm^{-1} de 4000 a 550 cm^{-1} .

3.3 Análise Estatística

Foi realizado análise de variância e teste para comparação de médias ($P < 0,05$) para avaliar se houveram diferenças significativas com o aumento da concentração de MMT nos sucos e filmes. Utilizou-se o programa Minitab, versão 15.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

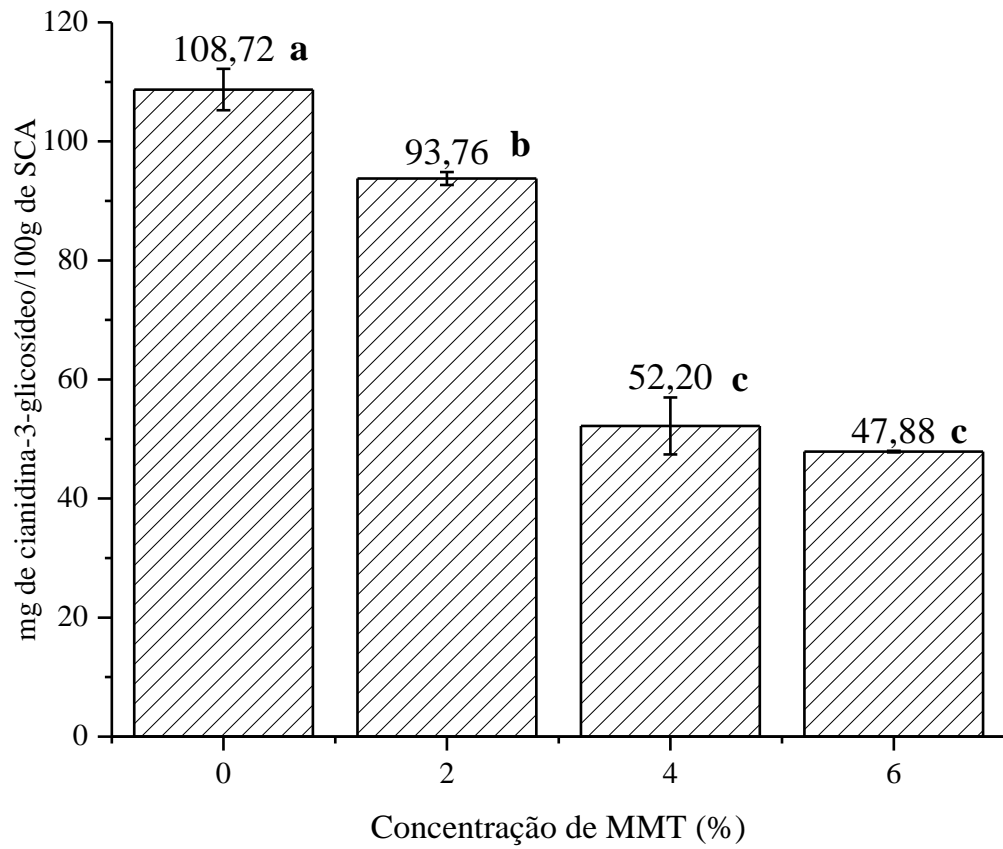
4.1 Estabilização de antocianinas de suco clarificado de acerola por MMT

4.1.1 *Quantificação de antocianinas*

As concentrações de antocianinas presentes no suco clarificado (sem MMT) ou no sobrenadante resultante da centrifugação do suco (para tratamentos com MMT) estão apresentadas na Figura 9. Foi quantificada uma concentração de $108,72 \pm 6$ (mg de cianidina-3-glicosídeo/100g de suco) no tratamento controle (0% de MMT). A adição de 2, 4 e 6% de MMT promoveu uma redução significativa na concentração de antocianina presente no sobrenadante dos sucos adicionados de argila em relação ao grupo controle ($93,76 \pm 1,88$; $52,19 \pm 8,29$ e $47,87 \pm 0,24$ mg de cianidina-3-glicosídeo/100g de suco clarificado respectivamente). Não houve diferença significativa entre os sucos adicionados de 4 e 6% de argila. A aplicação de MMT nas concentrações 2, 4 e 6% promoveu uma remoção de aproximadamente 14, 52 e 56%, respectivamente, da concentração inicial de antocianinas presentes em SCA.

A redução na concentração de antocianina no sobrenadante indica uma retenção das antocianinas pela MMT. Segundo Lima et al. (2007), as antocianinas podem ser intercaladas entre as lamelas de MMT, visto que possuem um caráter catiônico que favorecem a interação com os grupamentos alumínio-oxigênio da MMT (LIMA et al., 2007). Kohno *et al.* (2008) justificam a interação de antocianinas e MMT devido ao desbalanço de cargas na superfície negativa da MMT. Os cátions orgânicos substituem os cátions de troca presente nas galerias, formando agregados de argila e pigmento (PENTRÁK et al., 2012).

Figura 9 - Quantificação de cianidina-3-glicosídeo no sobrenadante resultante da centrifugação do suco clarificado. Valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente (Tukey, $P < 0,05$)



4.1.2 Estabilidade de cor dos sucos clarificados com o tempo de estocagem

As mudanças de cor no suco de acerola podem estar relacionadas a diversos fatores, como tipo de antocianina, concentração, presença de compostos fenólicos, presença de copigmentos, dentre outros.

Através da razão da luminosidade em relação ao valor inicial observado, pode-se observar na Figura 10.A que a luminosidade das amostras SCA e SCAM2 tende a aumentar durante o período de armazenamento. Os valores iniciais de L^* dos tratamentos SCA e SCAM2 foram de $55,57 \pm 0,79$ e $37,96 \pm 0,16$, respectivamente, e os finais, $61,75 \pm 1,51$ e $41,69 \pm 0,82$. O aumento da luminosidade está relacionado com o aumento da concentração de compostos incolores na solução (GORDILLO et al., 2012b). Já os tratamentos SCAM4 e SCAM6 apresentaram uma luminosidade relativamente constante ao longo do período de estocagem. Os valores iniciais de L^* dos tratamentos SCAM4 e SCAM6 foram de $32,98 \pm 0,14$ e $31,50 \pm 0,1$, respectivamente, e os finais, $33,05 \pm 0,42$ e $31,00 \pm 0,18$.

A adição de MMT aos sucos clarificados de acerola promoveu um aumento de aproximadamente 70% da cor vermelha dos sucos. Lima *et al.* (2007) observaram que a MMT captura a cor vermelha de antocianinas da flor da Jamaica. A MMT, além de estabilizar as antocianinas, tem a capacidade de promover uma intensificação da cor vermelha (KOHNO et al., 2009), causando efeito hipercrômico. Pode-se observar na Figura 10.B que o tratamento SCA, sem MMT, e o tratamento SCAM2, menor concentração de MMT avaliada, apresentaram uma redução da cor vermelha dos sucos durante o armazenamento. Os valores iniciais de a^* dos tratamentos SCA e SCAM2 foram de $23,64 \pm 0,47$ e $34,06 \pm 0,32$, respectivamente, terminando com $8,01 \pm 2,34$ e $29,38 \pm 0,7$. A cor vermelha do tratamento SCA reduziu 1,9 vezes, enquanto que SCAM2 reduziu 1,15 vezes, podendo-se observar que a adição de MMT, mesmo na menor concentração avaliada, promoveu uma melhora da estabilidade da cor vermelha dos SCA. Já os tratamentos SCAM4 e SCAM6 mantiveram a^* praticamente sem variação durante o armazenamento. Os valores iniciais de a^* dos tratamentos SCAM4 e SCAM6 iniciaram em $32,01 \pm 0,19$ e $31,01 \pm 0,51$, respectivamente, terminando com $34,51 \pm 0,32$ e $32,52 \pm 0,32$.

Os valores de b^* (Figura 10.C) de todos os tratamentos tenderam a aumentar durante o armazenamento, porém o maior aumento ocorreu para os tratamentos SCA e SCAM2. Os valores iniciais de b^* dos tratamentos SCA e SCAM2 iniciaram em $29,39 \pm 0,78$ e $18,74 \pm 0,37$, respectivamente, terminando com $38,83 \pm 1,33$ e $25,29 \pm 0,68$. A cor amarela dos tratamentos SCA e SCAM2 aumentaram, aproximadamente, 25% durante o armazenamento. Os valores iniciais de b^* dos tratamentos SCAM4 e SCAM6 iniciaram em $14,17 \pm 0,21$ e $12,46 \pm 0,18$, respectivamente, terminando com $16,72 \pm 0,63$ e $13,59 \pm 0,35$. A cor amarela dos tratamentos SCAM4 e SCAM6 aumentou, aproximadamente, 18% e 9%, respectivamente, durante o armazenamento. Os valores de b^* observados podem ser relacionados com as altas concentrações de carotenoides presentes nas acerolas (DE ROSSO; MERCADANTE, 2007).

Uma diferença total de cor $\Delta E^*=1$ é o suficiente para ser percebida a olho humano (DE ROSSO; MERCADANTE, 2007; GONNET, 1998). A diferença total de cor, apresentado na Figura 11, foi maior no tratamento SCA seguida do tratamento SCAM2, provavelmente devido à concentração de antocianinas ainda presentes no sobrenadante que não foram adsorvidas pela MMT. Os valores iniciais de diferença total de cor dos tratamentos SCA, SCAM2, SCAM4 e SCAM6 foram: $6,49 \pm 0,42$; $1,32 \pm 0,2$; $1,04 \pm 0,41$ e $0,84 \pm 0,18$. Após o período de 60 dias de armazenamento os valores finais de diferença total de cor dos tratamentos SCA, SCAM2, SCAM4 e SCAM6 foram: $19,37 \pm 1,97$; $8,77 \pm 2,69$; $3,66 \pm 1,25$ e $2,06 \pm 1,33$. Foi possível observar uma diferença total de cor em todos os tratamentos avaliados, sendo a maior variação no tratamento SCA. A adição de MMT, mesmo na menor concentração avaliada, reduziu a variação de cor durante o armazenamento.

De Rosso e Mercadante (2007) avaliaram a estabilidade de extratos de acerola, observando uma redução de 2,8 vezes do valor de a^* e 2,3 vezes do valor de b^* em um período de 50 dias. Os mesmos autores correlacionaram esta redução com a alta concentração de ácido ascórbico nas acerolas através da condensação do ácido ascórbico no carbono 4 das antocianinas.

A estabilidade da cor dos sucos adicionados de MMT está associada com a interação eletrostática do pigmento com a superfície da MMT (AZEREDO et al., 2012a; KOHNO et al., 2009; TEIXEIRA-NETO et al., 2012). A intercalação da antocianina entre

as lamelas da argila acabam formando uma proteção estérica contra o efeito da luz e do oxigênio (KOHNO et al., 2008) causando uma estabilização do pigmento.

Na Figura 12 podem-se acompanhar as alterações nas cores dos sucos ao longo do tempo de armazenamento, evidenciando as alterações sofridas pelo grupo controle e a manutenção da cor com a adição da MMT.

Figura 10 - Mudanças nos parâmetros de cor (A) L^*/L^*_0 (B) a^*/a^*_0 e (C) b^*/b^*_0 dos de acerola adicionados de MMT.

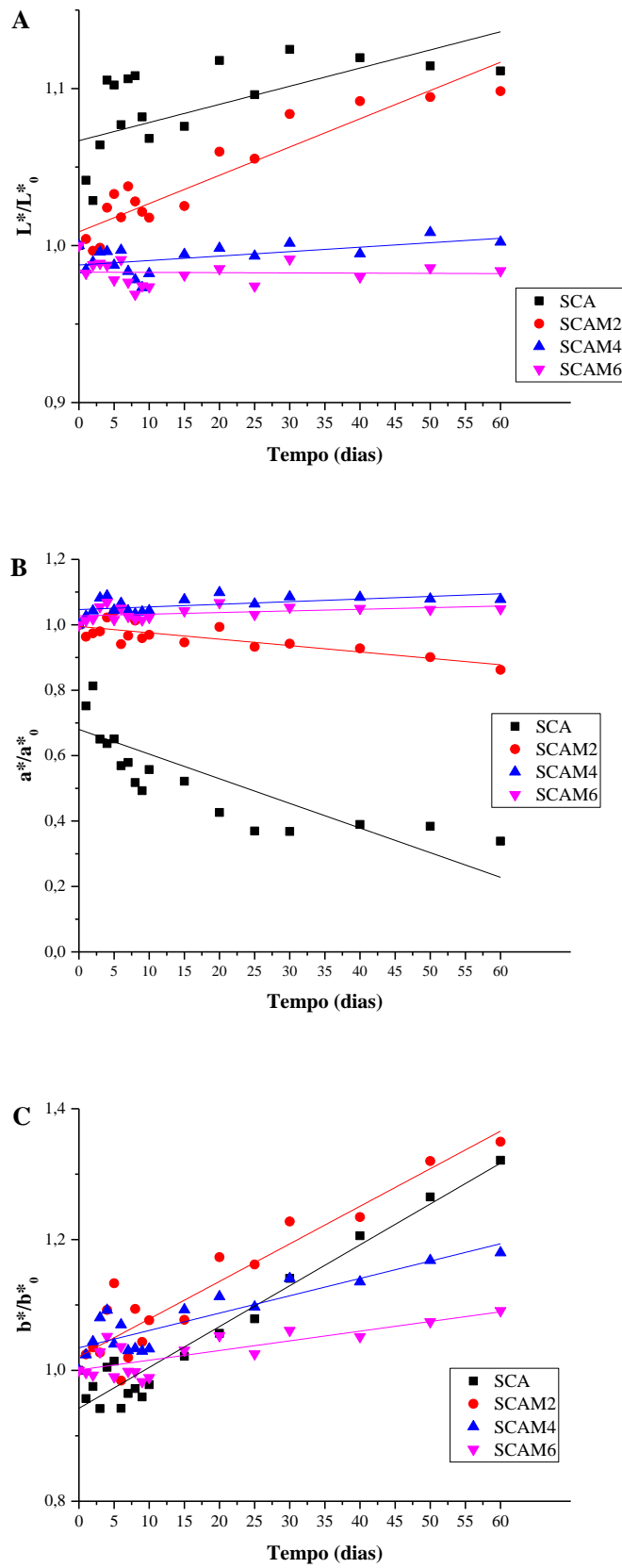


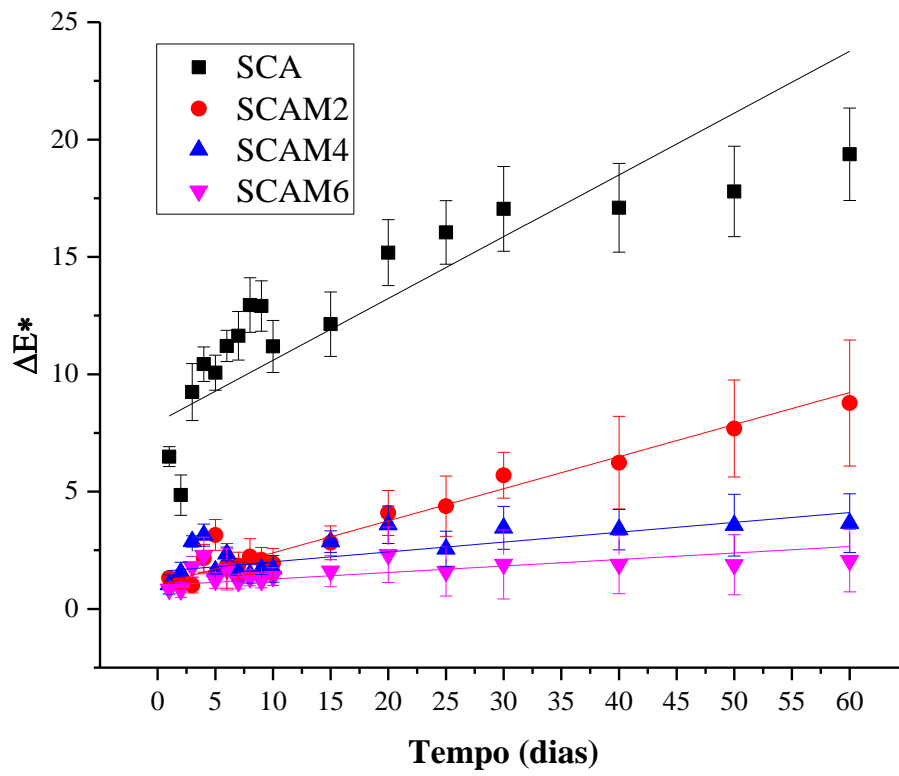
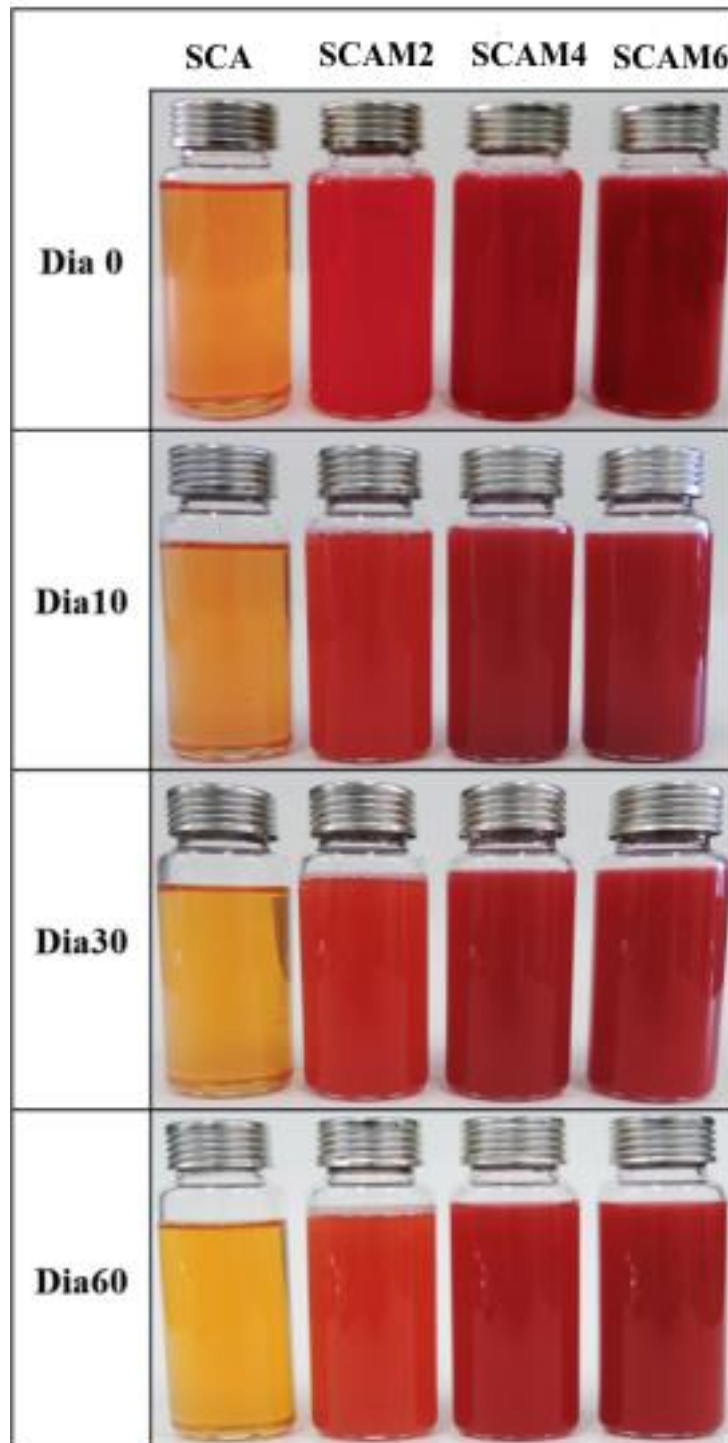
Figura 111 - Mudanças no parâmetro ΔE^* (diferença total de cor) durante o armazenamento.

Figura 122 - Fotos dos sucos de acerola SCA (0% de MMT), SCAM2 (2% de MMT), SCAM4 (4% de MMT) e SCAM6 (6% de MMT).



4.1.3 Cor do suco clarificado com 4% de MMT em diferentes valores de pH

Os resultados da colorimetria do SCA e do SCAM4 em pH diferentes estão na Tabela 2. O aumento do pH em SCA promoveu uma redução da luminosidade (L^*) e da cor vermelha e aumento da cor azul provavelmente, devido ao surgimento de compostos incolores na solução e surgimento de bases quinoidais em solução.

A adição de MMT promoveu uma estabilização dos parâmetros de cor para valores de pH menores que 5, possibilitando uma menor variação da cor. Como pode ser observado na Figura 13, entre pH 1,0 e 5,0, ocorreu uma ligeira diminuição de tons azul na cor do tratamento SCA. A adição de MMT aos sucos de acerola tenderam a diminuir os valores de L^* e b^* . O fato de o suco sem adição de MMT possuir uma cor mais escura e azulada que os sucos adicionados da argila demonstram o efeito positivo desta sobre a estabilização das antocianinas.

Heredia *et al.* (2012c) avaliaram o efeito estabilizador de compostos fenólicos (catequina, epicatequina e ácido cafeico) sobre antocianinas de casca de uva em diferentes pH, verificando o efeito protetor em soluções com pH menor que 3. Kohno *et al.* (2009) avaliaram o efeito estabilizador de MMT em antocianinas comercial de casca de uva, verificando que a MMT promoveu um aumento na estabilidade das antocianinas em ambientes devido à complexação da MMT com as antocianinas.

As maiores diferenças de cor (ΔE^*) foram obtidas em pH menores que 5, confirmando a estabilização colorimétrica do cátion *Flavylium* pela adição de MMT em pH mais ácido. Os resultados obtidos corroboram com trabalhos encontrados na literatura.

Figura 133 - Fotos dos sucos de acerola SCA (0% de MMT) e SCAM4 (4% de MMT) logo após ajuste do pH.

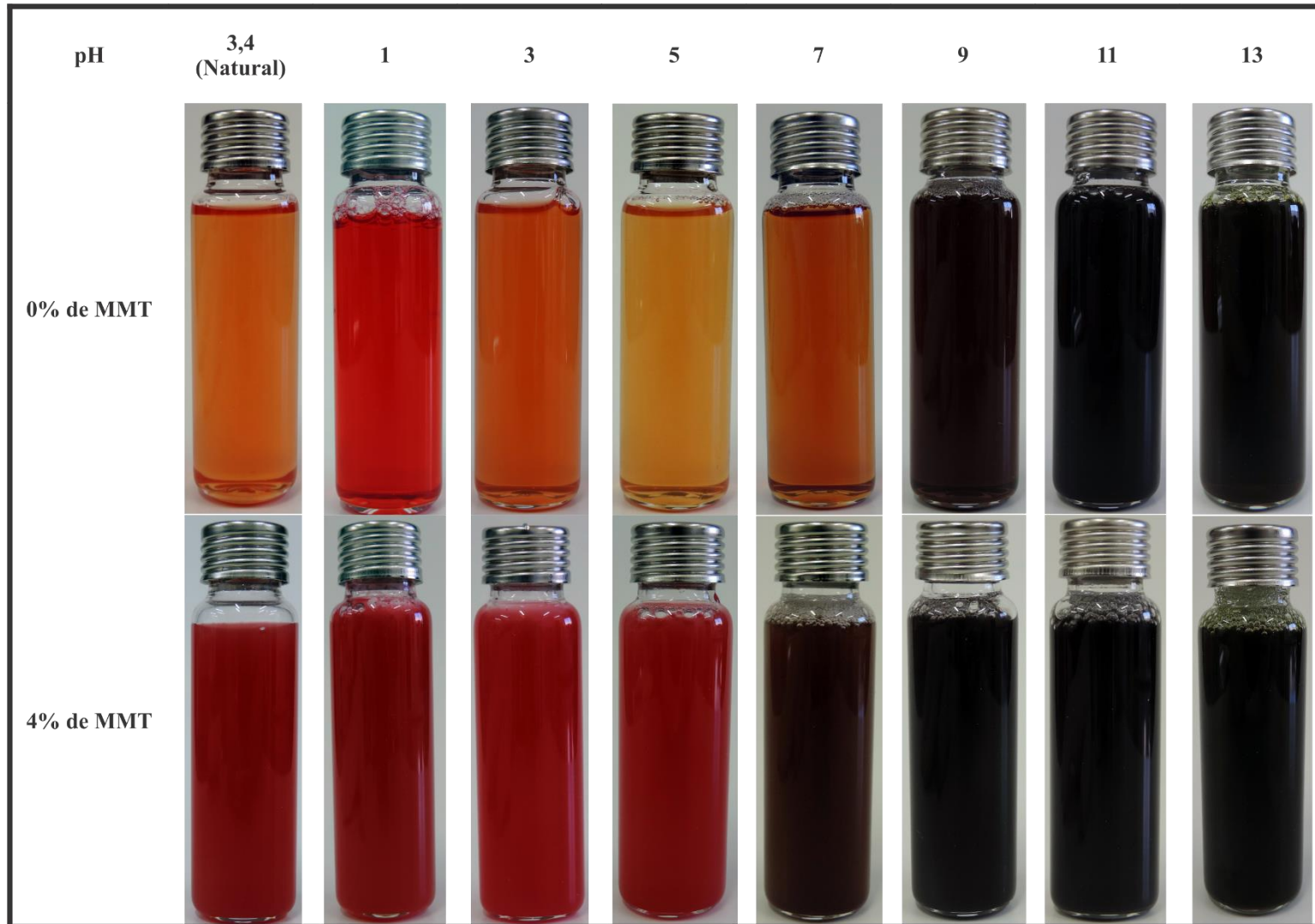


Tabela 2 - Influência da variação do pH em suco clarificado de acerola com 4% de MMT (SCAM4) nos parâmetros de cor (L^* , a^* , b^* e ΔE^*) para cada valor de pH avaliado.

Parâmetros	Tratamentos	pH Natural (3,4)	pH1	pH3	pH5	pH7	pH9	pH11	pH13
L^*	SCA	59,21 ± 0,12 a	44,65 ± 0,2 a	56,10 ± 0,15 a	61,98 ± 0,25 a	53,20 ± 0,08 a	28,33 ± 1,56 a	22,60 ± 0,11	23,38 ± 0,17
	SCAM4	35,34 ± 0,20 b	31,95 ± 0,28 b	34,44 ± 0,13 b	35,08 ± 0,1 b	29,65 ± 0,3 b	23,24 ± 0,18 b	22,56 ± 0,17	23,31 ± 0,3
a^*	SCA	18,89 ± 0,1 a	44,89 ± 0,3 a	24,84 ± 0,25 a	9,98 ± 0,15 a	16,31 ± 0,17 a	21,68 ± 0,52 a	7,75 ± 0,12 a	7,21 ± 0,05 a
	SCAM4	33,93 ± 0,59 b	33,98 ± 0,3 b	34,29 ± 0,09 b	32,22 ± 0,16 b	13,75 ± 0,2 b	7,20 ± 0,5 b	4,24 ± 0,14 b	2,95 ± 0,21 b
b^*	SCA	32,12 ± 0,13 a	40,07 ± 0,53 a	33,87 ± 0,37 a	31,41 ± 0,36 a	34,98 ± 0,25 a	8,49 ± 2,25 a	-0,71 ± 0,04 a	0,65 ± 0,07 a
	SCAM4	17,58 ± 0,43 b	15,38 ± 0,19 b	17,19 ± 0,17 b	16,66 ± 0,05 b	7,02 ± 0,26 b	-0,25 ± 0,14 b	-0,81 ± 0,04 b	0,24 ± 0,18 b
ΔE^*	SCAM4 x SCA	31,75 ± 0,19	29,83 ± 0,7	28,93 ± 0,11	37,90 ± 0,28	36,64 ± 0,25	17,78 ± 1,61	3,52 ± 0,02	4,29 ± 0,24

4.1.4 Identificação das antocianinas via cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) acoplado a espectrômetro de massas

Conhecer a estrutura das antocianinas presentes em SCA ajuda a compreender alguns fatores que interferem na estabilidade da cor dos produtos derivados da acerola. A quantidade de grupos hidroxilas e metoxila está diretamente ligada à estabilidade, intensidade e cor das antocianinas, assim como a quantidade e tipo de glicosídeo ligado às antocianinas, já que um aumento no número de glicosídeo tende a aumentar a estabilidade de antocianinas (BRØNNUM-HANSEN; FLINK, 1985).

A MMT adicionada aos sucos adsorveu parte das antocianinas presentes no meio, formando um complexado de MMT-antocianina. A Figura 14 apresenta os cromatogramas de SCA e das antocianinas extraídas do complexado MMT-antocianina (EA), sendo possível observar a obtenção de 2 picos bem definidos, indicando a adsorção seletiva de compostos presentes em SCA. Estes compostos foram caracterizados via espectrometria de massas sendo possível sua caracterização através do íon molecular ($[M]^+$) e dos fragmentos (MS-MS) produzidos (Figura 15 e Tabela 3).

De Brito *et al.* (2007) identificaram e quantificaram antocianinas presentes em algumas frutas tropicais, dentre estas duas variedades de acerola, via HPLC-ESI-MS/MS. Foi identificada a cianidina-3-ramnosídeo e pelargonidina-3-ramnosídeo como as antocianinas presentes nas variedades de acerola (Acerola cv. roxinha e acerola clone II47/1) avaliadas.

Mercadante *et al.* (2008) determinaram as antocianinas de acerola via HPLC-PDA-MS/MS e identificaram 4 picos característicos para as antocianinas cianidina-3-ramnosídeo, pelargonidina-3-ramnosídeo e agliconas livres cianidina e pelargonidina. Os autores relacionaram a perda de $[M-146]^+$ a uma molécula desoxihexose (ramnosídeo).

As diferenças de massa dos íons moleculares e dos íons produtos do MS-MS foram utilizadas para identificar as possíveis substituições no esqueleto aglicona. O íon molecular do Pico 1 encontrado foi m/z 433 e o íon fragmento após MS-MS m/z 287 indicando uma cianidina, já o íon molecular do Pico 2 encontrado foi m/z 417 e o íon fragmento após MS-MS m/z 271 indicando uma pelargonidina. Ambas são resultados da perda de uma deoxyhexose $[M-146]^+$. Após análise dos espectros MS-MS foi possível

identificar os picos 1 e 2 como as antocianinas cianidina-3-ramnosídeo e pelargonidina-3-ramnosídeo, respectivamente.

Figura 144 - Cromatograma do suco clarificado de acerola(SCA) e da Antocianina extraída(AE) do tratamento SCAM6.

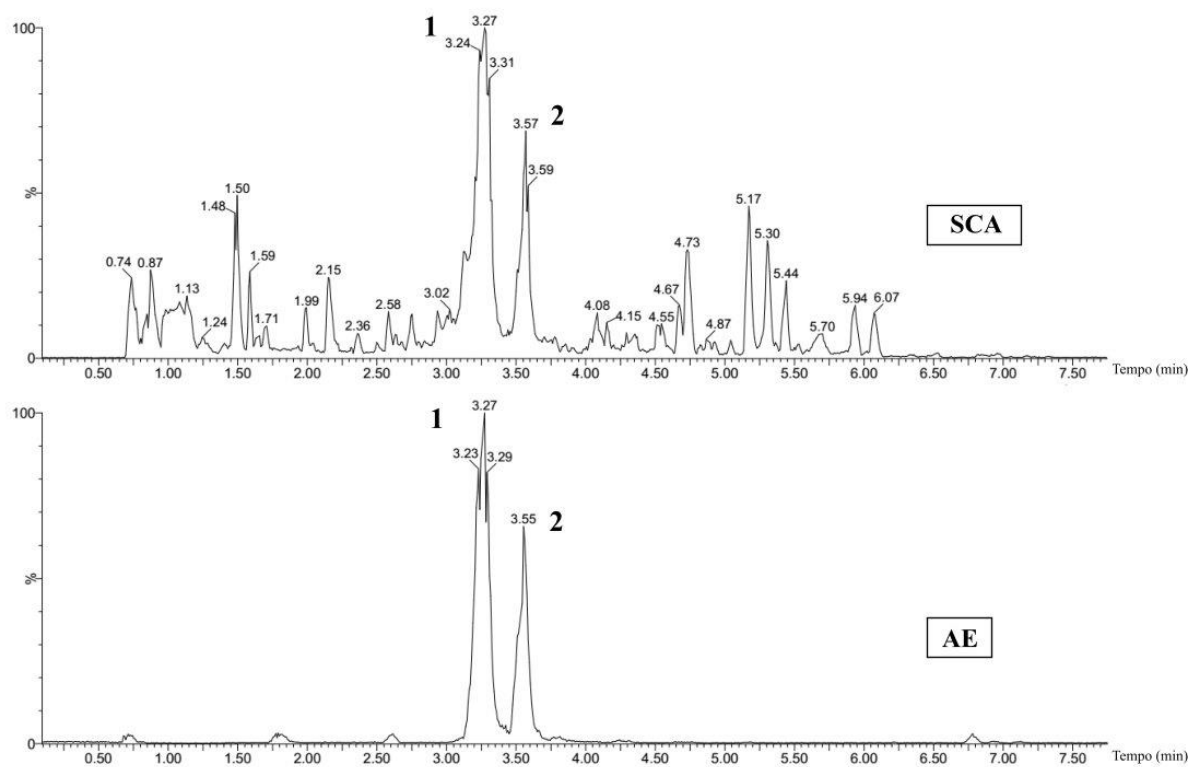


Figura 155 - Espectro de massa Sequencial (MS-MS) da cianidina-3-ramnosídeo (Pico 1) e perlagondina-3-ramosídeo (Pico 2).

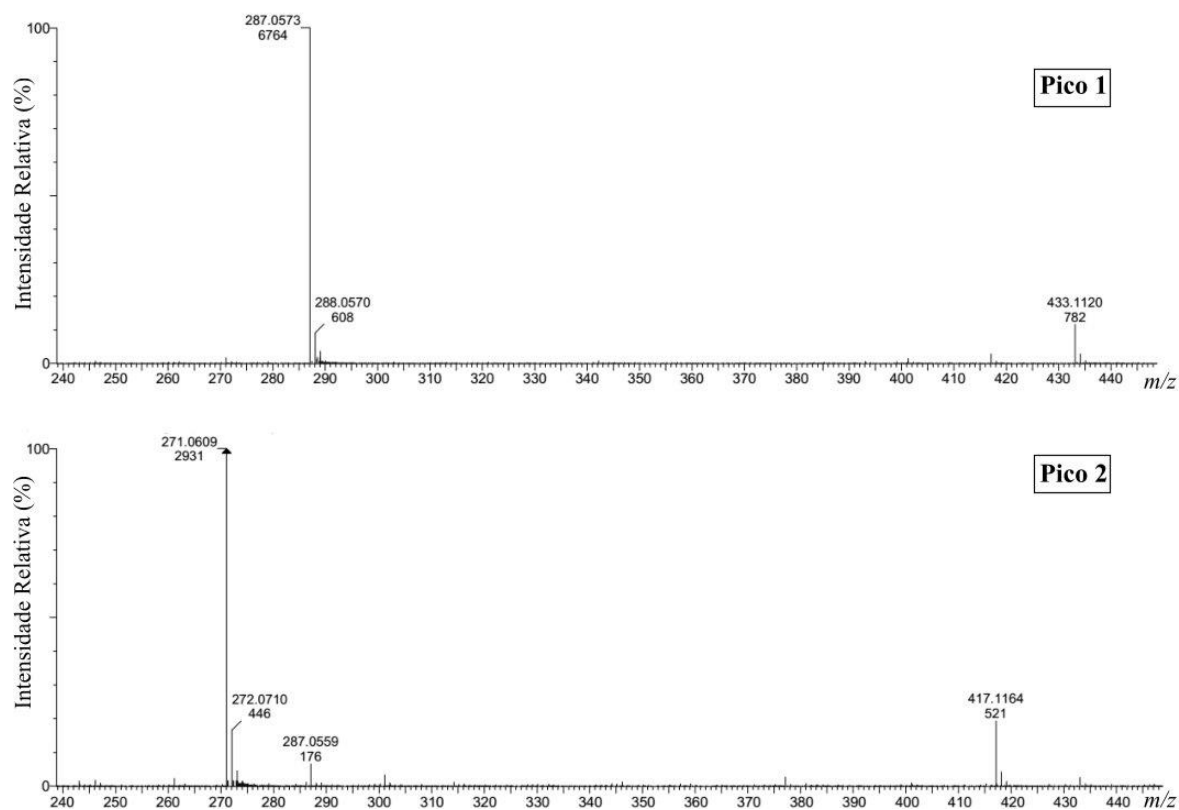


Tabela 3 - Identificação das antocianinas presente no suco clarificado de acerola (SCA). Onde t_R é o tempo de retenção, $[M]^+$ íon molecular, MS/MS íon produto, m/z a razão massa carga.

Pico	t_R (min)	$[M]^+$ (m/z)	MS/MS (m/z)	Antocianina
1	3,24	433	287	Cianidina-3-ramnosídeo
2	3,54	417	271	Pelargonidina-3-ramnosídeo

4.1.5 Caracterização dos precipitados dos tratamentos SCAM2, SCAM4 e SCAM6

4.1.5.1 Análise termogravimétrica (TGA)

As Figuras 16 (a) e (b) trazem as curvas termogravimétricas e sua primeira derivada, respectivamente. As derivadas das curvas termogravimétricas revelam a existência de 3 eventos (Tabela 4) para a MMT pura e 4 eventos para os precipitados obtidos. Os eventos até 150°C estão relacionados com a perda de água adsorvida entre as camadas da MMT (BAEK; CHOY; CHOI, 2012), e as perdas de massa entre 200°C e 611°C estão relacionadas com a decomposição das antocianinas complexadas entre as camadas da MMT, sendo este resultado compatível com os dados obtidos em análise de cromatografia acoplada à espectrometria de massas. A perda de massa em altas temperaturas está relacionada com a queima de material orgânico preso entre as lamelas da argila (GOLBASHY et al., 2016).

Figura 166 - Curvas de TG(a) e DTG(b) da MMT e dos precipitados dos SCA adicionados de diferentes concentrações de MMT.

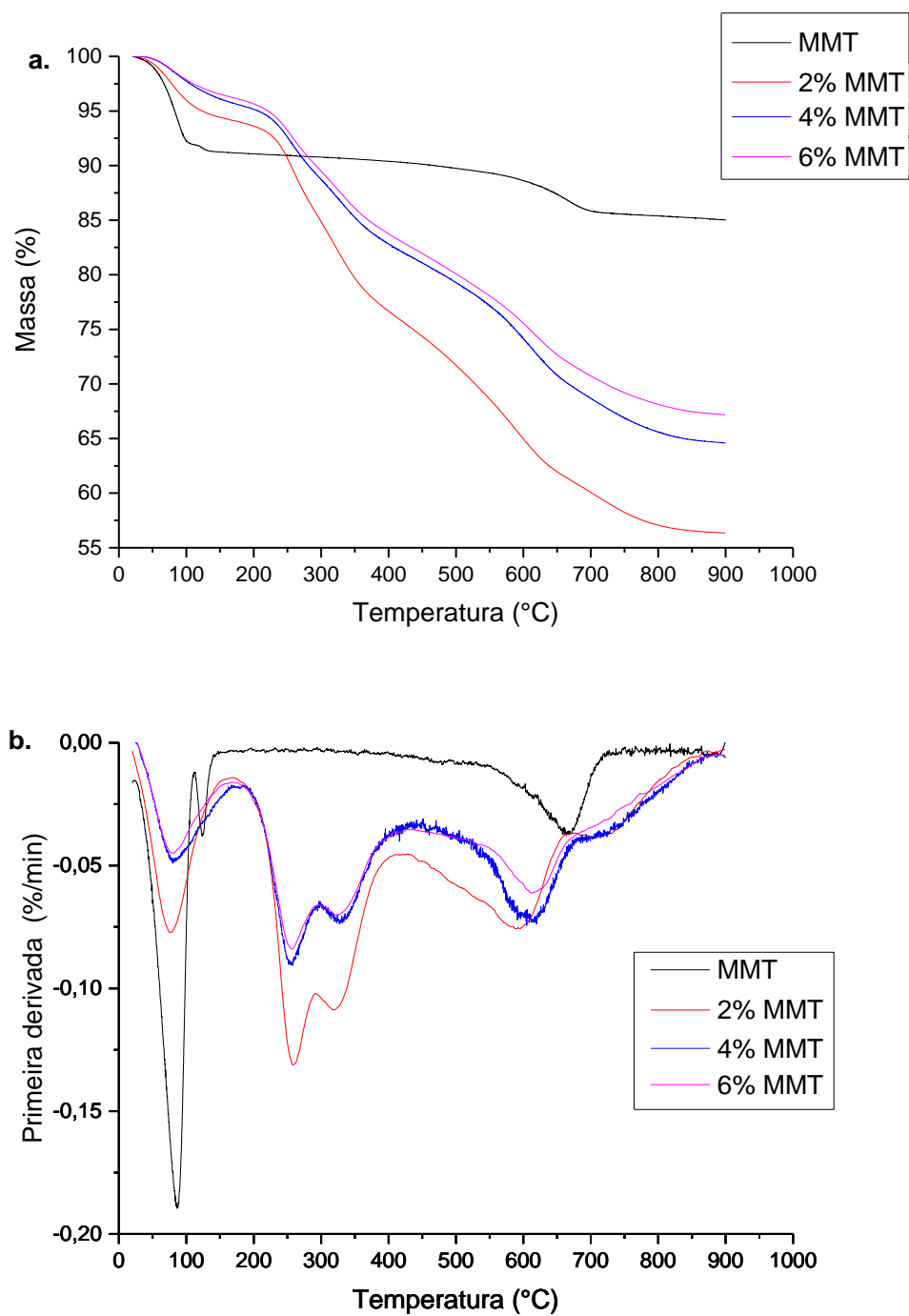


Tabela 4 - Eventos durante análise termogravimétrica. M: perda de massa (%); Tonset: temperatura de início do evento térmico (°C); T_{máx}: temperatura máxima durante o evento (°C).

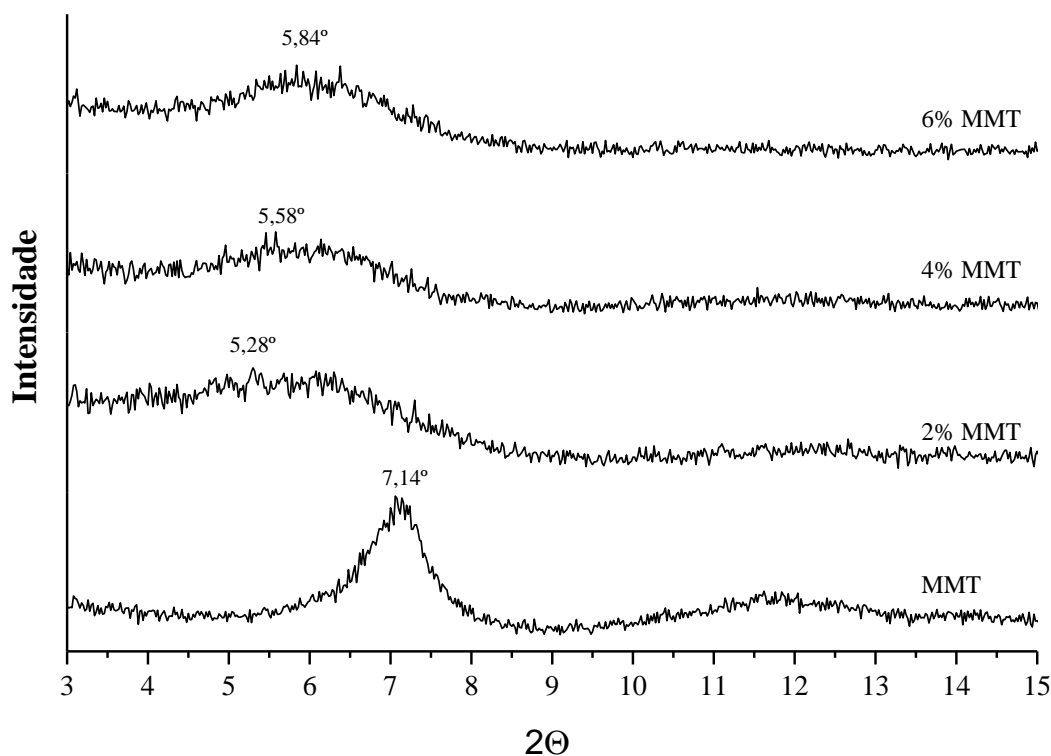
Amostra	1º Evento			2º Evento			3º Evento			4º Evento		
	M	T _{onset}	T _{máx}	M	T _{onset}	T _{máx}	M	T _{onset}	T _{máx}	M	T _{onset}	T _{máx}
MMT	7,71	49,46	77,07	0,55	114,35	117,01	3,51	615,78	665,88	-	-	-
2% MMT	5,86	42,28	70,03	8,46	225,00	256,81	8,64	302,93	313,78	14,49	508,82	586,96
4% MMT	4,18	45,73	73,26	6,20	219,94	247,78	5,77	309,70	323,38	10,57	554,47	608,03
6% MMT	3,55	46,38	72,32	6,07	218,25	249,36	1,54	309,28	319,36	6,20	574,87	611,17

4.1.5.2 Difração de Raio-X (DRX)

A Figura 17 apresenta os difratogramas da MMT e dos precipitados obtidos dos SCAM. O difratograma da MMT pura exibe um pico acentuado em $2\theta = 7,14^\circ$, que é o pico de difração característico ao espaçamento basal d_{001} das argilas montmorilonita. Segundo a lei Bragg esse espaçamento basal d_{001} da argila MMT apresenta valor de 12,4 Å, que está de acordo com valores encontrados por outros autores (AHMAD et al., 2012; ECHEVERRIA, EISENBERG, & MAURI, 2014; MARTUCCI & RUSECKAITE, 2010; MARTUCCI, VÁZQUEZ, & RUSECKAITE, 2007a e XU et al., 2006). Os precipitados dos SCA com 2, 4 e 6 % de MMT apresentaram um espaçamento basal de 16,7 Å, 15,8 Å e 15,1 Å, respectivamente. Teixeira *et al.* (2012) obtiveram complexados de MMT e diferentes concentrações de extrato de *Euterpe oleracea Mart.* (Açaí), verificando um aumento do espaço basal d_{001} da MMT de 13 Å para 27 Å devido a intercalação de moléculas de antocianinas entre as camadas da MMT.

O deslocamento do pico para ângulos menores indica o aumento do espaçamento entre as lamelas (BAEK; CHOY; CHOI, 2012), que, por sua vez, indica que houve intercalação de compostos entre as lamelas de argila, o que (em conjunto com os demais resultados), corrobora a intercalação das antocianinas entre as lamelas, como descrito por Kohno e colaboradores (2009).

Figura 177 - Difratoograma do MMT puro e precipitados dos sucos.



4.1.5.3 Espectrofotometria no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

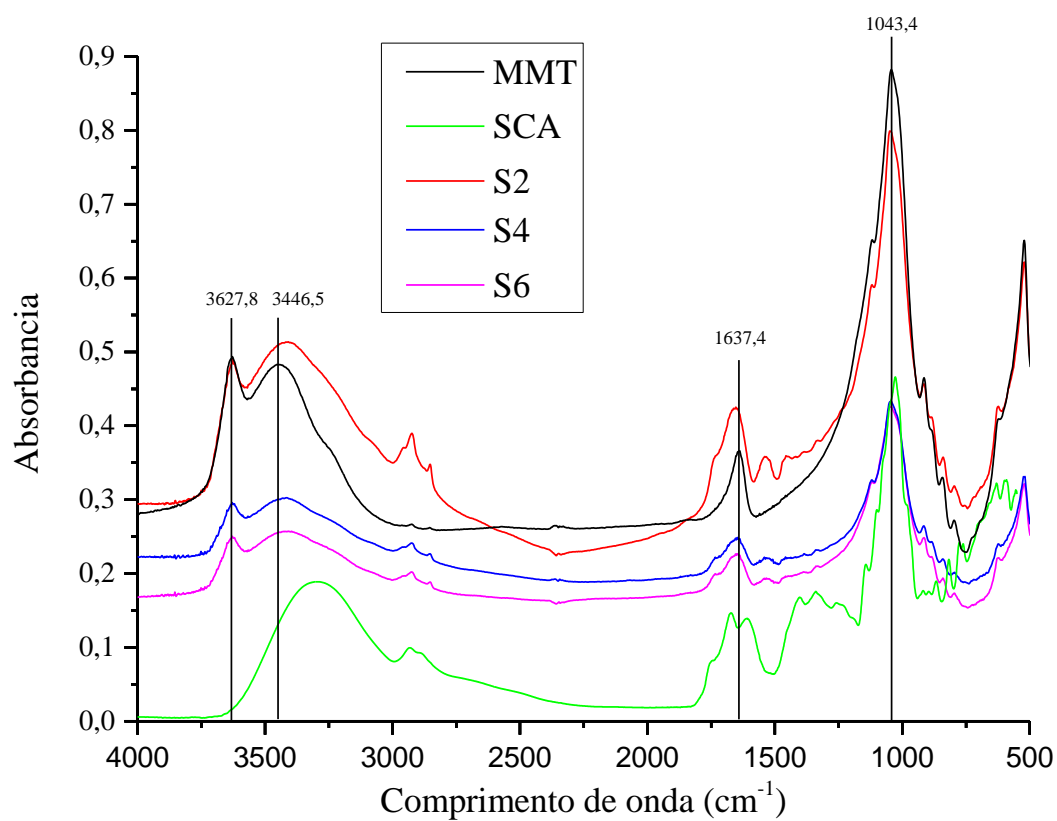
A figura 18 mostra os espectros de FTIR dos precipitados de MMT obtidos. As bandas de absorção nas regiões de $3627,8\text{ cm}^{-1}$ correspondem às bandas de estiramento e deformações angulares dos grupos Si-OH, Al-OH e O-H das placas tetraédrica e octaédrica da MMT (GOLBASHY et al., 2016; KASIRGA; ORAL; CANER, 2012). Foi observado uma forte banda de absorção entorno da região $1043,4\text{ cm}^{-1}$, referente ao estiramento Si-O da MMT.

Golbashy *et al.* (2016) avaliaram complexação de MMT com extrato de polifenóis de romã. Os autores correlacionaram a ausência da banda 3443 e 3627 cm^{-1} no complexo MMT-romã como indicativo de formação de pontes de hidrogênio entre a porção OH dos polifenóis com Al-O da MMT, já que este intervalo está relacionado com o estiramento H-O-H e a deformação angular da água com o estiramento O-H dos fenóis.

Pode-se verificar que à medida que se aumentou a concentração de MMT houve uma redução da absorção na região $3627,8$ e $3446,5\text{ cm}^{-1}$, evidenciando uma provável

formação de pontes de hidrogênio entre a MMT e as antocianinas de SCA formando um complexo MMT-antocianinas.

Figura 188 - Espectro de FTIR da MMT, SCA, SCAM2, SCAM4 e SCAM6.



4.2 Filmes de gelatina contendo suco de acerola e MMT

4.2.1 Ensaio mecânicos

Os resultados das propriedades mecânicas dos filmes incorporados com MMT são apresentados na Tabela 5. É possível observar uma tendência no comportamento dos filmes em relação a resistência à tração (RT), ocorrendo um incremento da resistência à medida que se aumenta a concentração de MMT adicionada aos filmes. Houve um aumento significativo em RT a partir da adição de 3,84% de MMT aos filmes. A adição de 6,4% de MMT promoveu a maior resistência à tração em relação ao controle, promovendo um aumento de aproximadamente 29% de sua resistência. As concentrações de 1,28 e 2,56% de MMT não causaram mudanças significativas, na resistência à tração, em relação ao filme controle. Estudos anteriores (BAE et al., 2009; CORONADO JORGE et al., 2015) apresentaram valores semelhantes para resistência à tração em filmes de gelatina adicionados de MMT. Apesar do aumento da resistência mecânica dos filmes, não foram observadas diferenças significativas na elongação, indicando que o aumento de resistência não comprometeu a capacidade de elongação na ruptura dos compósitos.

Há uma tendência ao aumento do módulo elástico à medida que aumenta a concentração de MMT nos filmes, consequentemente causando um aumento da rigidez dos mesmos. É possível observar uma mudança significativa no módulo elástico a partir da adição de 2,56% de MMT aos filmes. Coronado Jorge e seus colaboradores (2015) e Rao (2007) também observaram que o módulo elástico tende a aumentar com o incremento da concentração de argila adicionada aos filmes. A interação entre gelatina e MMT ocorre principalmente através de interações eletrostáticas entre os grupos NH_3^+ dos aminoácidos da gelatina e a superfície das lamelas da MMT (XU et al., 2006).

Em linhas gerais, os resultados dos ensaios mecânicos indicam que a adição de pelo menos 3,84% de argila proporcionou a obtenção de filmes com maior resistência à tração e mais rígidos, no entanto mantendo a mesma elongação que o tratamento controle. A forte interação interfacial entre a MMT e a gelatina proporciona uma melhor transferência de carga entre a matriz de gelatina e o nanoreforço MMT sem que ocorra uma ruptura entre a interface gelatina-MMT mediante deformação à tração (NAGARAJAN et al., 2014b).

Tabela 5 - Respostas experimentais dos filmes (RT, ER, ME, PVA e OP) em função do teor de MMT.

Respostas		Concentrações de MMT (% m/m, base gelatina)					
		0	1,28	2,56	3,84	5,12	6,4
RT (MPa)	Média	25,90	28,78	27,76	30,63	30,84	33,42
	Grupo*	C	BC	BC	AB	AB	A
	DP	0,99	2,35	3,08	2,33	2,00	1,26
	CV (%)	3,81	8,18	11,08	7,62	6,49	3,79
ER (%)	Média	13,90	13,22	12,70	12,29	12,49	12,28
	Grupo*	-	-	-	-	-	-
	DP	1,77	2,33	1,81	1,69	1,69	1,41
	CV	12,76	17,65	14,24	13,72	13,53	11,46
ME (MPa)	Média	1062,9	1162,5	1261,8	1199,9	1243,2	1322,7
	Grupo*	C	BC	AB	AB	AB	A
	DP	49,9	77,0	137,5	108,8	58,7	84,0
	CV	4,70	6,62	10,90	9,07	4,72	6,35
PVA (g.mm.kPa ⁻¹ .h ⁻¹ .m ⁻²)	Média	2,29	2,40	1,83	2,09	1,95	1,28
	Grupo*	AB	A	C	ABC	BC	D
	DP	0,45	0,19	0,16	0,03	0,07	0,07
	CV	19,60	7,99	9,03	1,40	3,70	5,42
OP (A.nm/mm)	Média	287,61	413,1	419,32	458,82	541,51	945,00
	Grupo*	C	BC	BC	BC	B	A
	DP	11,44	27,40	5,06	13,29	3,05	197,0
	CV	3,98	6,64	1,21	2,90	0,56	20,86

*Grupo da média segundo Tukey: Médias sem letras em comum são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Ausência da definição de grupos significa que a variação entre os tratamentos não foi significativa. DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação. RT: resistência à tração; ER: alongação na ruptura; ME: módulo de elasticidade; PVA: permeabilidade ao vapor de água; OP: opacidade.

4.2.2 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

Os valores de PVA dos filmes nas diferentes concentrações de MMT adicionadas estão mostrados na Tabela 5. A incorporação de argila aos filmes promoveu uma redução na permeabilidade ao vapor de água a partir da adição de 2,56% de MMT, no entanto o filme com concentração de 6,4% de MMT apresentou o menor valor de PVA observado durante a análise promovendo uma redução de 44% da permeabilidade ao vapor de água em relação ao tratamento controle (sem MMT). O aumento da propriedade de barreira ao vapor de água de filmes nanocompósitos ocorre devido a dispersão das camadas de silicatos na matriz polimérica, fazendo com que o vapor de água percorra um trajeto mais longo e tortuoso através da matriz polimérica durante o processo de difusão (NAGARAJAN et al., 2014a).

4.2.3 Opacidade

Os resultados apresentados na Tabela 5 apontaram uma tendência ao aumento da opacidade dos filmes com o aumento da concentração de argila adicionada, provavelmente devido à diferença de índices de refração entre os componentes do filme. O tratamento controle apresentou uma opacidade natural ($287,6 \pm 11,44 \text{ A.nm.mm}^{-1}$) elevada, possivelmente devido à cor natural do SCA utilizado nas formulações. Os tratamentos com concentrações de argila entre 2,56% e 5,12% não apresentaram diferença significativa entre si, o que indica que estas concentrações não apresentaram mudança no quesito transparência dos filmes. O filme adicionado de 6,4% de MMT apresentou uma opacidade de $944,8 \pm 197,11 \text{ A.nm.mm}^{-1}$, apresentando diferença significativa quando comparado com os demais tratamentos.

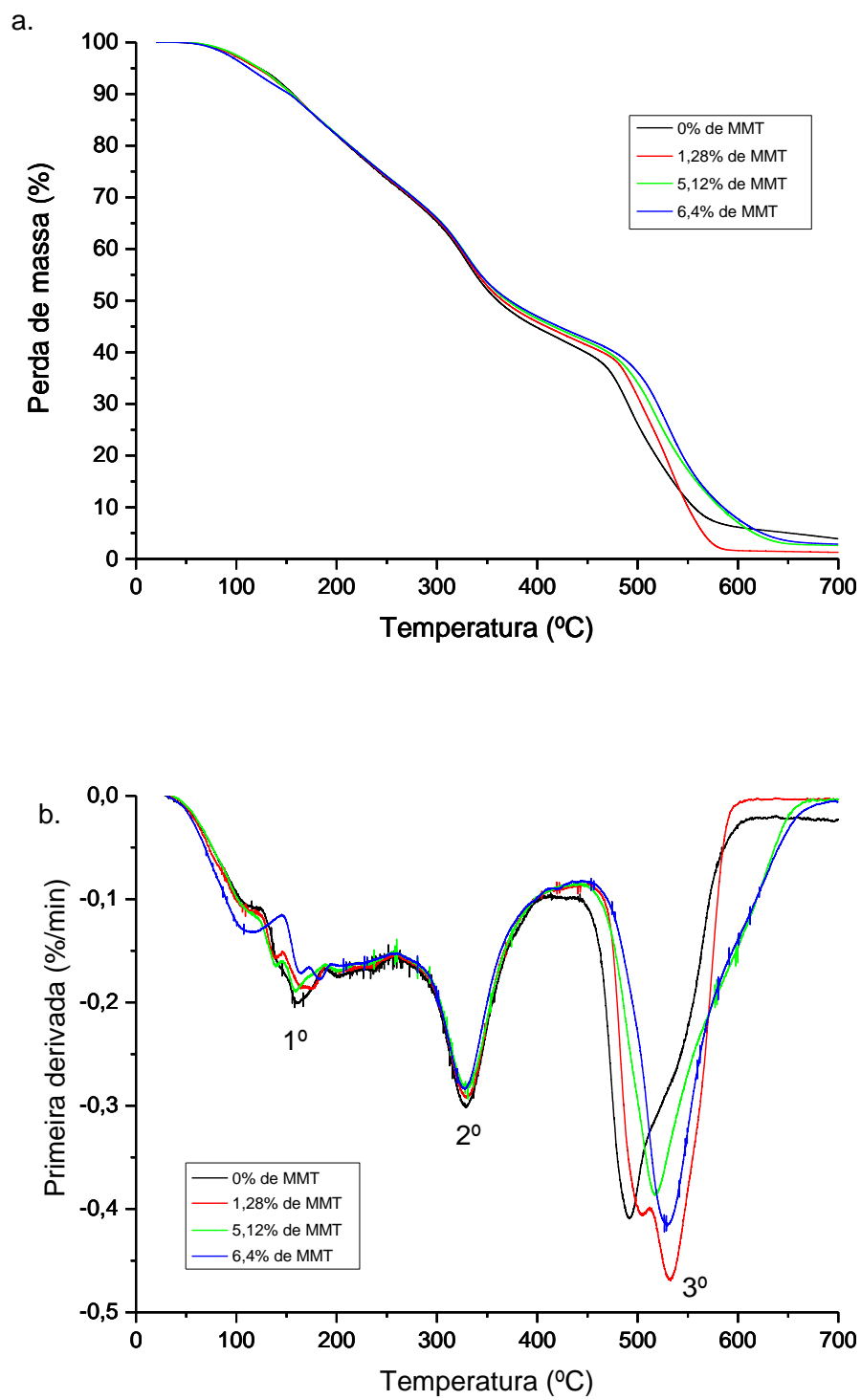
A opacidade está associada à transmissão de luz visível pelos filmes. Quanto maior a opacidade, menor a transmissão de luz visível, ou seja, menor a transparência. A transparência é uma característica desejável quando se deseja obter filmes comestíveis, ou utilizá-los como embalagens de alimentos de forma geral, por isso, para essa aplicação, é vantajoso que os reforços utilizados no filme não aumentem sua opacidade (SANTOS, 2012). Por outro lado, uma maior opacidade implica em melhor barreira à luz visível, que poderia proporcionar melhor estabilidade a alimentos suscetíveis a oxidação.

Nagarajan *et al.* (2014b) avaliaram a opacidade de filme de gelatina adicionado de diferentes concentrações de MMT e reportaram uma redução na transmitância da luz como aumento da concentração de MMT nos filmes. Os autores atribuíram a redução da transmitância destes filmes a um provável efeito de espalhamento de luz causado pela nanoargila distribuída através da rede de proteína.

4.2.4 Análise Termogravimétrica (TGA)

As curvas termogravimétricas e as respectivas derivadas dos filmes de gelatina e SCA adicionados de diferentes concentrações de MMT encontram-se nas Figuras 19 (a) e (b). Os filmes apresentaram três eventos de perda de massa, sendo 2º e o 3º evento os principais. O 1º (70 – 200°C) está relacionado com a perda de moléculas de baixa massa molecular, como a antocianina presente no SCA e a glicose utilizada como plastificante nos filmes assim como a água adsorvida nos filmes (AHMAD et al., 2012; MARTUCCI; VÁZQUEZ; RUSECKAITE, 2007b). O 2º evento (250 - 400°C) refere-se a degradação inicial da gelatina e de polissacarídeos presentes no suco (AHMAD et al., 2012; CRUZ, 2014; LUECHA; SOZER; KOKINI, 2010; MARTUCCI; VÁZQUEZ; RUSECKAITE, 2007b; NAGARAJAN et al., 2014a). Já o 3º (460 - 650°C) está relacionado aos grupos hidroxilas presentes em diferentes regiões da estrutura do MMT (XU et al., 2006).

Figura 19 - Curvas de TG(a) e DTG(b) dos filmes de gelatina e SCA adicionados de diferentes concentrações de MMT.



4.2.5 Difração de Raios-X (DRX)

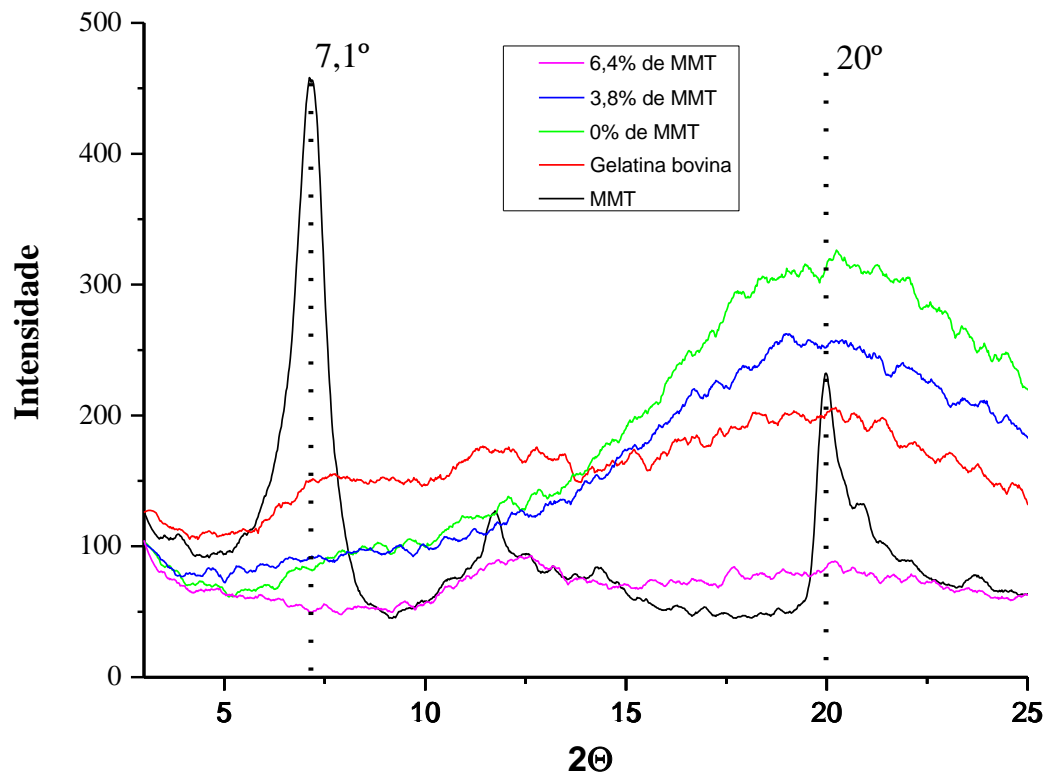
Os difratogramas da MMT, gelatina bovina, filme de gelatina 0% MMT, filme de gelatina adicionado de 3,8% de MMT e filme de gelatina adicionado de 6,4% de MMT estão na Figura 20. O difratograma do MMT puro exibe um pico acentuado em $2\theta = 7,1^\circ$, que é o pico de difração característico ao espaçamento basal d_{001} das argilas montmorilonita que de acordo com a lei de Bragg apresenta um espaçamento de 12,4 Å ou 1,24 nm corroborando com valores encontrados por outros trabalhos (AHMAD et al., 2012; ECHEVERRIA; EISENBERG; MAURI, 2014; JORGE et al., 2015; MARTUCCI; RUSECKAITE, 2010; MARTUCCI; VÁZQUEZ; RUSECKAITE, 2007a; XU et al., 2006).

Segundo estudos anteriores (CORONADO JORGE et al., 2015 e YAKIMETS et al., 2007), a gelatina bovina apresenta um difratograma característico de material semicristalino com um pico em $2\theta = 7^\circ$, atribuído à estrutura de tripla hélice e uma banda larga em $2\theta = 20^\circ$, característica de fase amorfa. Os filmes de gelatina, adicionados ou não de MMT, apresentaram uma característica de material amorfo (banda larga em $2\theta = 20^\circ$).

A interação entre a matriz polimérica e a MMT promove um aumento do espaço interlamelar com um conseqüente deslocamento do pico característico d_{001} para ângulos menores, no entanto se o espaçamento interlamelar além de um valor limite fica impossibilitado de visualizar o pico característico do plano d_{001} (COELHO, 2008).

O pico característico do MMT ($2\theta = 7^\circ$) foi encoberto nos difratogramas dos filmes adicionados de MMT, o que indica um provável efeito de esfoliação das camadas da argila (XU et al., 2006; ZENG et al., 2010; ZHENG et al., 2002). Os dados obtidos na difração de Raio-x corroboram para a compreensão dos resultados observados nos ensaios mecânicos e de permeabilidade ao vapor de água.

Figura 20 - Difratoograma do MMT puro, gelatina em pó, filme de gelatina com SCA, filme de gelatina com SCA adicionado de 3,8% de MMT e filme de gelatina com SCA adicionado de 6,4% de MMT.



4.2.6 *Estudo de estabilidade de cor*

A Figura 21 apresenta a razão (L^*/L^*_0 , a^*/a^*_0 e b^*/b^*_0) em relação aos valores iniciais observados (L^*_0 , a^*_0 e b^*_0), plotando em relação do tempo de armazenamento. Através desta razão é possível acompanhar a variação dos parâmetros ao longo do período de estocagem. Durante o período de armazenado houve um escurecimento em todos os tratamentos avaliados.

Da mesma forma como observado no SCA adicionado de MMT, adição da argila aos filmes de gelatina e SCA promoveu uma intensificação da cor vermelha dos filmes, deslocando o parâmetro a^* para o lado positivo do eixo. Kohno e colaboradores (2009) atribuem o efeito de intensificação da cor vermelha a um efeito de copigmentação e tal efeito ocorre entre as lamelas da argila e a antocianina presente no SCA. Azeredo e colaboradores (2012) também observaram o efeito de copigmentação do MMT com antocianinas naturalmente presentes em polpas de acerola. Os filmes adicionados de MMT mantiveram a cor vermelha durante todo o período de armazenamento, enquanto que a cor vermelha do controle (0% de MMT) aumentou relativamente, apesar do baixo valor observado no início. Esse fenômeno pode ser atribuído à estabilização da cor devido à interação eletrostática entre o corante e a superfície da argila, ocorrendo uma intercalação de pigmento e conseqüentemente uma proteção maior aos efeitos da luz e do oxigênio (KOHNO et al., 2009). Após o segundo dia de armazenamento houve um aumento na cor amarela ($+b^*$) dos filmes, sendo mais intenso para o tratamento controle. Durante o armazenamento os filmes adicionados de MMT apresentaram uma tendência de redução da cor amarela.

Na Figura 22 podem-se observar as mudanças das cores dos filmes durante o armazenamento. A adição de argila possibilitou a manutenção da cor dos filmes, mantendo por mais tempo a tonalidade vermelha.

Figura 21 - Mudanças nos parâmetros de cor (A) L^*/L^*_0 (B) a^*/a^*_0 e (C) b^*/b^*_0 dos sucos clarificados de acerola adicionados de MMT

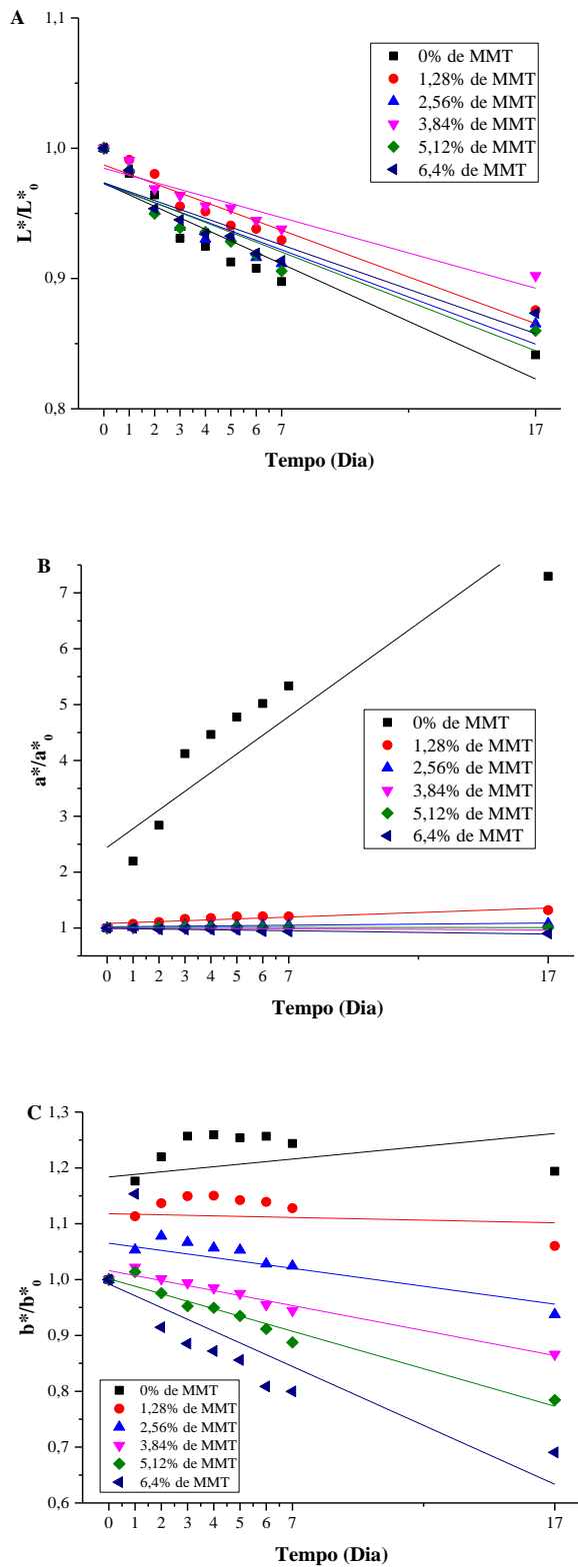
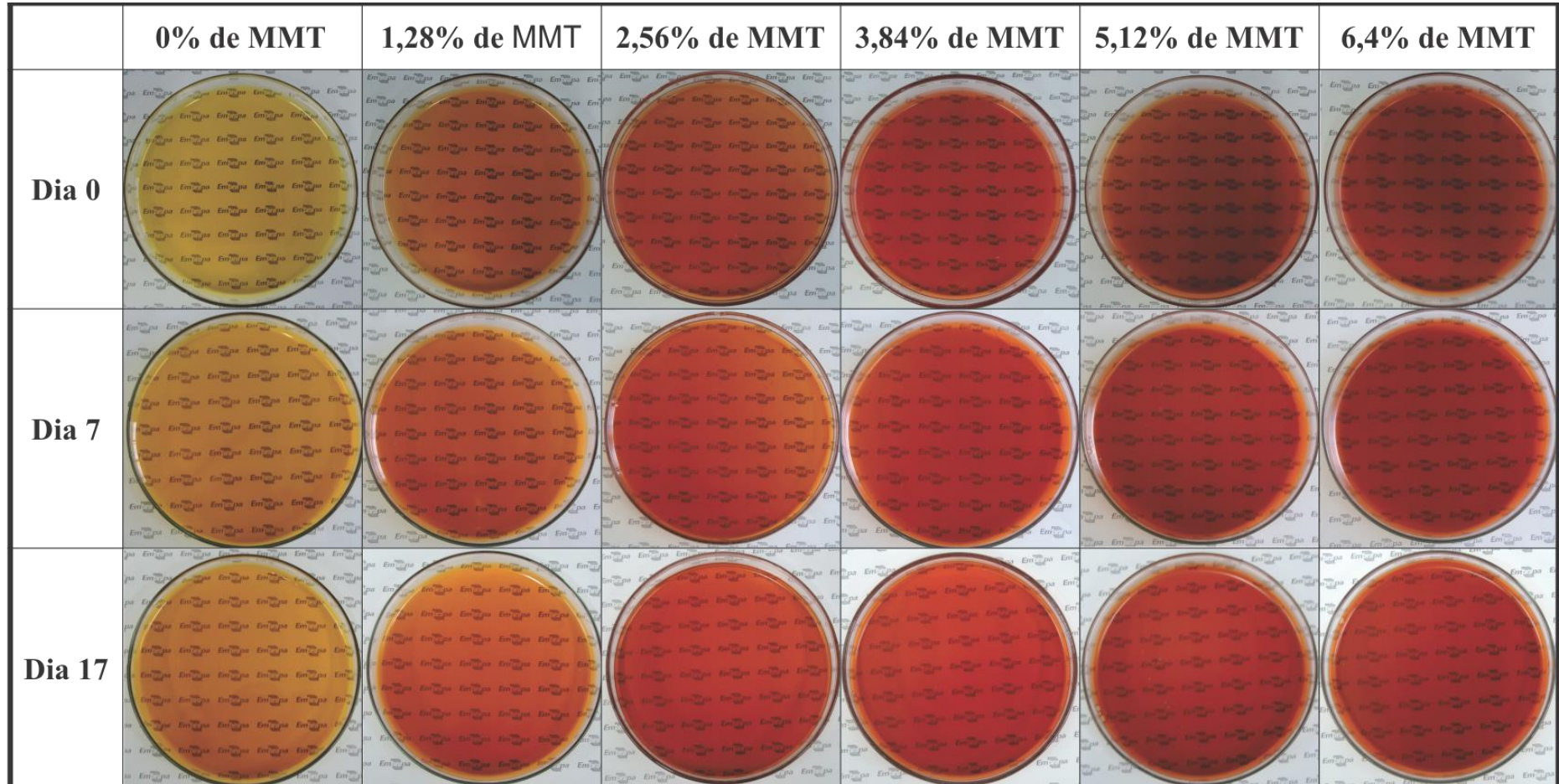


Figura 22 - Fotografias dos filmes de gelatina durante armazenamento



4.2.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens de MEV dos tratamentos 0%, 3,84% e 6,4% de MMT estão apresentadas nas Figuras 23 e 24, superfície e secção transversal respectivamente. O filme controle (0% de MMT) apresentou uma superfície sem a presença de aglomerados de gelatina. É possível observar estruturas de poros na superfície do filme controle, no entanto não foi possível observar o mesmo na secção transversal. A formação de poros pode estar relacionada com a presença de ar na solução filmogênica e uma etapa de degaseificação ineficiente.

Nota-se a presença de aglomerados nos filmes adicionados de MMT apesar da análise de DRX indicar um efeito de esfoliação. A presença de aglomerados pode indicar uma possível presença de tactóides dispersos no material. Estes aglomerados estão relacionados com a não dispersão total do reforço e possível aglomeração do MMT durante o processamento dos filmes. A região transversal dos filmes adicionados de MMT apresentam microestruturas rugosas, aumentando com a concentração. Essa característica tende a gerar pontos de tensão, comprometendo a eficiência mecânica dos filmes e de PVA.

Figura 223 - Imagens obtidas por MEV da superfície dos tratamentos 0%, 3,84% e 6,4% de MMT.

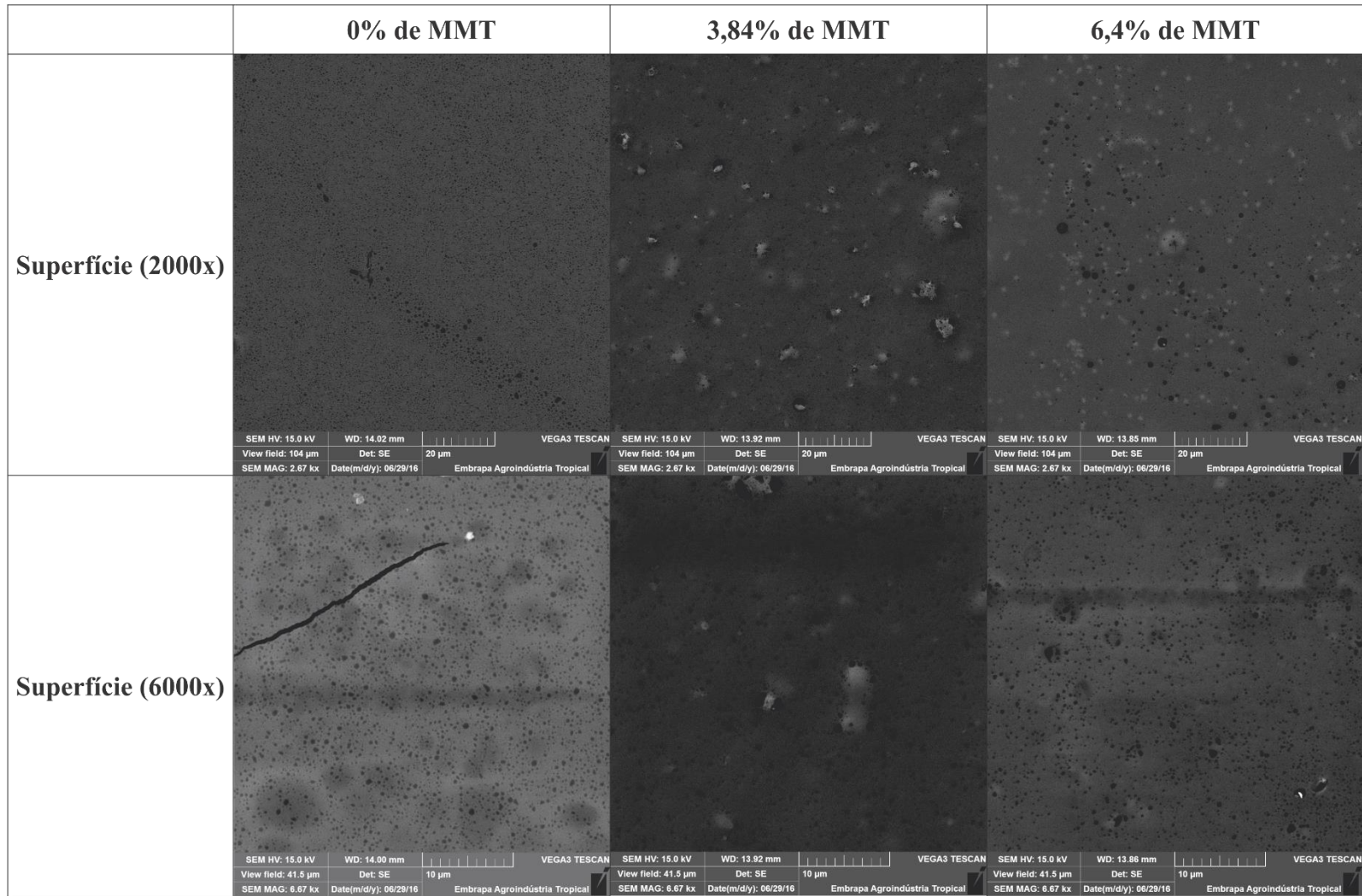
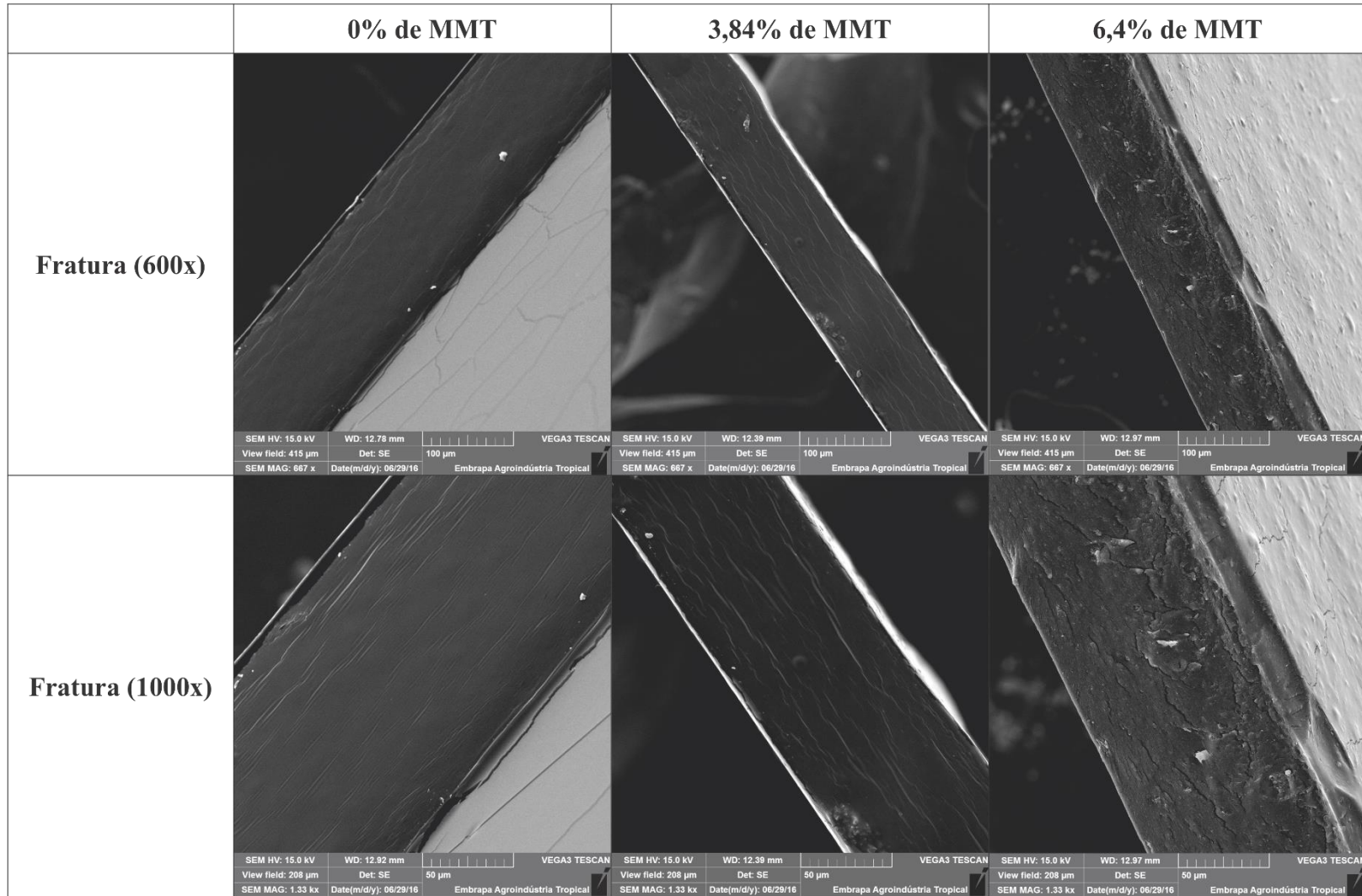


Figura 234 - Imagens obtidas por MEV da secção transversal obtida via criofratura dos tratamentos 0%, 3,84% e 6,4% de MMT.

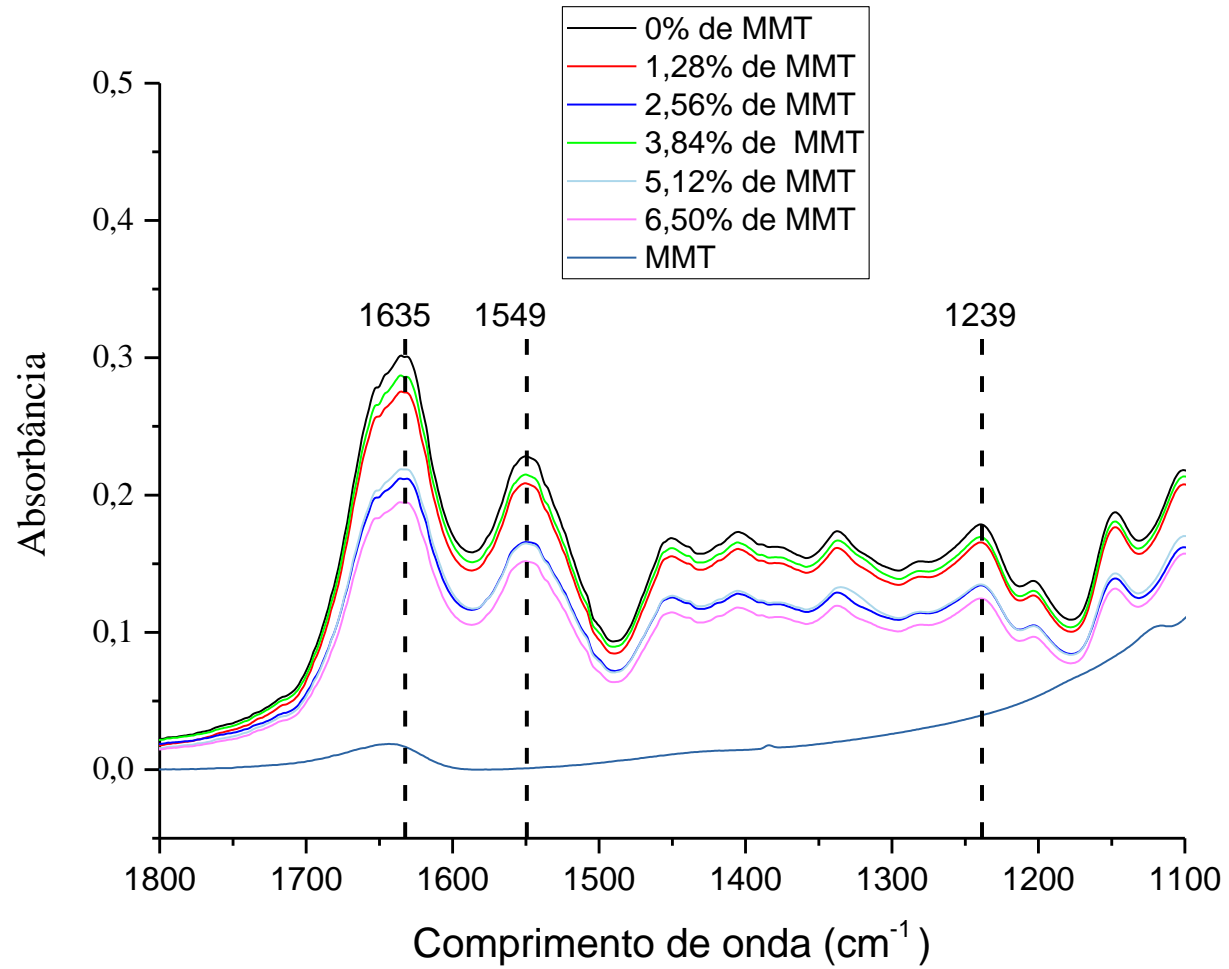


4.2.8 Espectrofotometria no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A figura 25 representa o espectro de FTIR dos filmes de gelatina e SCA adicionados de diferentes concentrações de MMT na região relacionada às amidas (1800 – 1100 cm^{-1}) (KONG; YU, 2007; MARTUCCI; RUSECKAITE, 2010). As bandas 1635 cm^{-1} , 1549 cm^{-1} e 1239 cm^{-1} são associadas às amida I, amida II e amida III respectivamente.

A absorção relacionada a banda da amida I decorre predominantemente da vibração do estiramento da C=O das amidas da proteína, enquanto que a absorção da amida II é composto por vibração do estiramento de C-N e pela vibração da deformação de N-H. Já a absorção da amida III é composta por componente do estiramento de C-N, deformações de N-H resultantes de ligações amida, e vibrações de grupo CH₂ da cadeia principal da glicina e cadeia lateral da prolina (MARTUCCI; RUSECKAITE, 2010; SIONKOWSKA et al., 2004). Com a adição de MMT aos filmes de gelatina e SCA há uma tendência na redução da absorção nas regiões relacionadas às amidas corroborando com estudo realizado por Martucci e Ruseckaite (2010) que avaliaram a interação de gelatina bovina e Na⁺-montmorilonita. Esta redução está relacionada possivelmente com o enfraquecimento das interações de hidrogênio devido a redução das distâncias entre os grupos silicatos.

Figura 245 - Espectro de FTIR entre 1000 e 1800 cm^{-1} para a MMT pura e filmes de gelatina



5 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos no presente estudo com suco clarificado de acerola (SCA) e os filmes comestíveis, pode-se concluir:

- Todas as concentrações avaliadas adsorveram parte das antocianinas presentes no SCA, sendo que as concentrações 4% e 6% foram as mais efetivas;
- A adição de MMT ao SCA promoveu uma intensificação da cor vermelha (efeito hiperacrômico) e estabilização da cor em todas concentrações avaliadas;
- A adição de MMT promoveu uma estabilização dos parâmetros de cor do SCA para valores de pH menores que 5;
- Os cromatogramas do SCA e dos compostos extraídos do complexo MMT-antocianina indicam a adsorção seletiva para as antocianinas Cianidina-3-ramnosídeo e Pelargonidina-3-ramnosídeo;
- Nos filmes de gelatina com SCA, a adição de MMT promoveu um incremento nas propriedades mecânicas e uma redução na permeabilidade ao vapor de água, principalmente na maior concentração avaliada (6,4%);
- A adição de MMT aos filmes de gelatina e SCA promoveu uma intensificação e estabilização da cor vermelha dos filmes durante o período observado.

REFERÊNCIAS

- ADAME, D.; BEALL, G. W. Direct measurement of the constrained polymer region in polyamide/clay nanocomposites and the implications for gas diffusion. **Applied Clay Science**, v. 42, n. 3–4, p. 545–552, 2009.
- AHMAD, M. et al. Physico-mechanical and antimicrobial properties of gelatin film from the skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils. **Food Hydrocolloids**, v. 28, n. 1, p. 189–199, 2012.
- ALEXANDRE, B. et al. Water barrier properties of polyamide 12/montmorillonite nanocomposite membranes: Structure and volume fraction effects. **Journal of Membrane Science**, v. 328, n. 1–2, p. 186–204, 2009.
- ALEXANDRE, M.; DUBOIS, P. Polymer-layered silicate nanocomposites: preparation, properties and uses of a new class of materials. **Materials Science and Engineering**, v. 28, n. March, p. 1–63, 2000.
- ANDRADE, R. M. S.; FERREIRA, M. S. L.; GONÇALVES, É. C. B. A. Development and Characterization of Edible Films Based on Fruit and Vegetable Residues. **Journal of Food Science**, v. 81, n. 2, p. E412–E418, 2016.
- ASTM. Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. In: **Annual book of American standards testing methods standard**. Philadelphia: American Society for Testing and Materials, 2000.
- ASTM. Standard test methods for water vapour transmission of materials. Designation: E96-10. In: **Annual book of American standards testing methods standard**. Philadelphia: American Society for Testing and Materials, 2010. p. 1043–1054.
- AZEREDO, H. M. C. et al. Nanocomposite Edible Films from Mango Puree Reinforced with Cellulose Nanofibers. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 5, p. N31–N35, jun. 2009.
- AZEREDO, H. M. C. et al. Nanoreinforced alginate – acerola puree coatings on acerola fruits. v. 113, p. 505–510, 2012a.
- AZEREDO, H. M. C. et al. Edible films from alginate-acerola puree reinforced with cellulose whiskers. **LWT - Food Science and Technology**, v. 46, n. 1, p. 294–297, 2012b.
- AZEREDO, H. M. C. et al. Development of pectin films with pomegranate juice and citric acid. **Food Chemistry**, v. 198, p. 101–106, 2016.
- AZEREDO, H. M. C.; WALDRON, K. W. Crosslinking in polysaccharide and protein films and coatings for food contact - A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 52, p. 109–122, 2016.
- BAE, H. J. et al. Effect of clay content, homogenization RPM, pH, and ultrasonication on mechanical and barrier properties of fish gelatin/montmorillonite nanocomposite films. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 6, p. 1179–1186, 2009.

BAEK, M.; CHOY, J. H.; CHOI, S. J. Montmorillonite intercalated with glutathione for antioxidant delivery: Synthesis, characterization, and bioavailability evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 425, n. 1–2, p. 29–34, 2012.

BAKOWSKA, A.; KUCHARSKA, A. Z.; OSZMIANŚKI, J. The effects of heating, UV irradiation, and storage on stability of the anthocyanin-polyphenol copigment complex. **Food Chemistry**, v. 81, n. 3, p. 349–355, 2003.

BOULTON, R. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 52, n. 2, p. 67–87, 2001.

BRØNNUM-HANSEN, K.; FLINK, J. M. Anthocyanin colourants from elderberry (*Sambucus nigra* L.). 3. Storage stability of the freeze dried product. **Journal of Food Technology**, v. 20, n. 6, p. 725–733, 1985.

BROUILLARD, R. Chemical Structure of Anthocyanins. In: MARKAKIS, P. (Ed.). . **Anthocyanins as Food Colors**. New York: ACADEMIC PRESS, 1982.

CABRITA, L.; FOSSEN, T.; ANDERSEN, Ø. M. Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions. **Food Chemistry**, v. 68, n. 1, p. 101–107, jan. 2000.

CARVALHO, R. DE A. et al. Análise econômica da produção de acerola no município de Tomé - Açu, Pará. **Embrapa Amazônia Oriental. Documentos**, 49, p. 21, 2000.

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

CHOUDALAKIS, G.; GOTSIS, A. D. Permeability of polymer/clay nanocomposites: A review. **European Polymer Journal**, v. 45, n. 4, p. 967–984, 2009.

COELHO, C. P. D. **Obtenção e caracterização de nanocompósitos de poliestireno e argilas esmectíticas**. [s.l.] Escola Politécnica da Universidade de São Paul, 2008.

CORONADO JORGE, M. F. et al. Biodegradable films based on gelatin and montmorillonite produced by spreading. **International Journal of Polymer Science**, v. 2015, 2015.

CRUZ, M. R. **FILMES DE GELATINA E GALACTOMANANA INCORPORADOS COM NANOCELULOSE DE FIBRA DE ALGAROA (*Prosopis juliflora*)**. [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2014.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. Tradução Adriano Brandelli. 4. ed. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

DE BRITO, E. S. et al. Anthocyanins Present in Selected Tropical Fruits: Acerola, Jambolão, Jussara, and Guajiru. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 23, p. 9389–9394, nov. 2007.

DE ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z. The high ascorbic acid content is the main cause of the low stability of anthocyanin extracts from acerola. **Food Chemistry**, v. 103, n. 3, p. 935–943, 2007.

DEBEAUFORT, F. et al. Lipid hydrophobicity and physical state effects on the properties of bilayer edible films. **Journal of Membrane Science**, v. 180, n. 1, p. 47–55, 2000.

DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A. R.; PAREDES-LÓPEZ, O. **Natural Pigments : Carotenoids , Anthocyanins , and Betalains — Characteristics , Biosynthesis , Processing , and Stability**. [s.l.: s.n.]. v. 40

DELVA, L. **Acerola (Malpighia emarginata DC): phenolic profiling, antioxidant capacity, antimicrobial property, toxicological screening, and color stability**. [s.l.] University of Florida, 2012.

DELVA, L.; SCHNEIDER, R. G. Acerola (*Malpighia emarginata* DC): Production, Postharvest Handling, Nutrition, and Biological Activity. **Food Reviews International**, v. 29, n. 2, p. 107–126, 2013.

ECHEVERRIA, I.; EISENBERG, P.; MAURI, A. N. Nanocomposites films based on soy proteins and montmorillonite processed by casting. **Journal of Membrane Science**, v. 449, p. 15–26, 2014.

ESPITIA, P. J. P. et al. Physical and antibacterial properties of açai edible films formulated with thyme essential oil and apple skin polyphenols. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 5, 2014.

FARIAS, M. G. et al. Caracterização físico-química de filmes comestíveis de amido adicionado de acerola (*Malpighia emarginata* D.C.). **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 546–552, 2012.

FLAKER, C. H. C. et al. Gelatin-based nanocomposite films: A study on montmorillonite dispersion methods and concentration. **Journal of Food Engineering**, v. 167, p. 65–70, dez. 2015.

FULEKI, T.; FRANCIS, F. J. Quantative methods for analysis. 1. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries. **Journal of Food Science**, v. 33, p. 72–77, 1968.

GOLBASHY, M. et al. Synthesis the Montmorillonite- Pomegranate (*Punica granatum* L.) Peel Polyphenols Nanostructure as a Drug Delivery Vehicle. **Biomedical and Pharmacology Journal**, v. 9, n. 1, p. 385–392, 30 abr. 2016.

GONNET, J.-F. Colour effects of co-pigmentation of anthocyanins revisited—1. A colorimetric definition using the CIELAB scale. **Food Chemistry**, v. 63, n. 3, p. 409–415, 1998.

GORDILLO, B. et al. Comprehensive colorimetric study of anthocyanic

copigmentation in model solutions. Effects of pH and molar ratio. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 11, p. 2896–2905, 2012a.

GORDILLO, B. et al. Comprehensive colorimetric study of anthocyanic copigmentation in model solutions. Effects of pH and molar ratio. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 11, p. 2896–2905, 2012b.

GORDILLO, B. et al. Comprehensive colorimetric study of anthocyanic copigmentation in model solutions. Effects of pH and molar ratio. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 11, p. 2896–2905, 2012c.

HANAMURA, T.; HAGIWARA, T.; KAWAGISHI, H. Structural and functional characterization of polyphenols isolated from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 69, n. 2, p. 280–286, 2005.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - Censo Agropecuário**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 25 jul. 2016.

JORGE, M. F. C. et al. Biodegradable Films Based on Gelatin and Montmorillonite Produced by Spreading. **International Journal of Polymer Science**, v. In Press, 2015.

KASIRGA, Y.; ORAL, A.; CANER, C. Preparation and characterization of chitosan/montmorillonite-K10 nanocomposites films for food packaging applications. **Polymer Composites**, v. 33, n. 11, p. 1874–1882, nov. 2012.

KAYA, S.; MASKAN, A. Water vapor permeability of pestil (a fruit leather) made from boiled grape juice with starch. **Journal of Food Engineering**, v. 57, n. 3, p. 295–299, 2003.

KOHNO, Y. et al. Stabilization of Flavylium Dyes by Incorporation in the Clay Interlayer. **J. Jpn. Soc. Colour Mater.**, v. 80, p. 6–12, 2007.

KOHNO, Y. et al. Enhancement of the photostability of flavylium dye adsorbed on mesoporous silicate. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 116, n. 1–3, p. 70–76, dez. 2008.

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

KONG, J.; YU, S. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures Protein FTIR Data Analysis and Band Assignment. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 39, n. 8, p. 549–559, 2007.

LIMA, V. L. A. G. DE et al. Polpa Congelada De Acerola : Efeito Da Temperatura Sobre Os Teores De Antocianinas E Flavonóis Totais. **Revista brasileira fruticultura**, v. 24, n. 3, p. 669–670, 2002.

LIMA, V. L. A. G. DE et al. Avaliação Do Teor De Antocianinas Em Polpa De Acerola Congelada Proveniente De Frutos De 12 Diferentes Aceroleiras (*Malpighia Emarginata* D.C). **Ciência, Tecnologia e Alimentos**, v. 23, n. 1, p. 101–103, 2003.

- LIMA, E. et al. **Capturing natural chromophores on natural and synthetic aluminosilicates**. [s.l.] Elsevier B.V., 2007. v. 170
- LOREVICE, M. V.; MOURA, M. R. DE; MATTOSO, L. H. C. Nanocompósito de polpa de mamão e nanopartículas de quitosana para aplicação em embalagem. **Química Nova**, v. 37, n. 6, p. 931–936, 2014.
- LUECHA, J.; SOZER, N.; KOKINI, J. L. Synthesis and properties of corn zein/montmorillonite nanocomposite films. **Journal of Materials Science**, v. 45, n. 13, p. 3529–3537, 2010.
- MAIA, G. A. et al. Efeito do processamento sobre componentes do suco de acerola. **Ciênci. Tecnol. Aliment.**, v. 27, n. 1, p. 130–134, 2007.
- MARTELLI, M. R. et al. Effect of Chitosan Nanoparticles and Pectin Content on Mechanical Properties and Water Vapor Permeability of Banana Puree Films. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 1, 2013.
- MARTUCCI, J. F.; RUSECKAITE, R. A. Biodegradable bovine gelatin/Na-montmorillonite nanocomposite films. Structure, barrier and dynamic mechanical properties. **Polymer-Plastics Technology and Engineering**, v. 49, n. 6, p. 581–588, 2010.
- MARTUCCI, J. F.; VÁZQUEZ, A.; RUSECKAITE, R. A. Nanocomposites based on gelatin and montmorillonite. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 89, n. 1, p. 117–122, 2007a.
- MARTUCCI, J. F.; VÁZQUEZ, A.; RUSECKAITE, R. A. NANOCOMPOSITES BASED ON GELATIN AND MONTMORILLONITE Morphological and thermal studies. **Jornal os thermal analysis and calorimetry**, v. 89, n. 1, p. 117–122, 2007b.
- MATSUFUJI, H. et al. Identification of reaction products of acylated anthocyanins from red radish with peroxy radicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 3157–3161, 2003.
- MAZZA, G.; BROUILLARD, R. Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. **Food Chemistry**, v. 25, n. 3, p. 207–225, 1987.
- MCHUGH, T. H.; HUXSOLL, C. C.; KROCHTA, J. M. Permeability properties of fruit puree edible films. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 1, p. 88- 91 ST- Permeability properties of fruit puree, 1996.
- MEZADRI, T. et al. Antioxidant compounds and antioxidant activity in acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruits and derivatives. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 4, p. 282–290, 2008.
- NAGARAJAN, M. et al. Properties of Bio-nanocomposite Films from Tilapia Skin Gelatin as Affected by Different Nanoclays and Homogenising Conditions. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 11, p. 3269–3281, 2014a.

- NAGARAJAN, M. et al. Characteristics of bio-nanocomposite films from tilapia skin gelatin incorporated with hydrophilic and hydrophobic nanoclays. **Journal of Food Engineering**, v. 143, p. 195–204, dez. 2014b.
- OLIVEIRA, T. Í. S. et al. Pomegranate peel pectin films as affected by montmorillonite. **Food Chemistry**, v. 198, p. 107–112, 2016.
- OTONI, C. G. et al. Antimicrobial and physical-mechanical properties of pectin/papaya puree/cinnamaldehyde nanoemulsion edible composite films. **Food Hydrocolloids**, v. 41, p. 188–194, dez. 2014.
- PAIVA, L. B. DE; MORALES, A. R.; DÍAZ, F. R. V. Argilas organofílicas: características, metodologias de preparação, compostos de intercalação e técnicas de caracterização. **Cerâmica**, v. 54, n. 330, p. 213–226, 2008.
- PENTRÁK, M. et al. Changes in layer charge of clay minerals upon acid treatment as obtained from their interactions with methylene blue. **Applied Clay Science**, v. 55, p. 100–107, 2012.
- RAO, Y. Gelatin-clay nanocomposites of improved properties. **Polymer**, v. 48, n. 18, p. 5369–5375, 2007.
- REIN, M. **Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins**. [s.l.] University of Helsinki Department, 2005.
- RITZINGER, R.; RITZINGER, C. H. S. P. **Acerola: aspectos gerais da cultura Cultivo Tropical de fruteiras** Belo Horizonte Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, , 2011.
- RODRIGUES-AMAYA, D. B. Acerola, Cashew Apple, Cherimoya and Pitanga. In: SIDDIQ, M. (Ed.). **Tropical and subtropical fruits : postharvest physiology, processing and packaging**. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc., 2012.
- ROJAS-GRA, M. A. et al. Mechanical , Barrier , and Antimicrobial Properties of Apple Puree Edible Films Containing Plant Essential Oils Mechanical , Barrier , and Antimicrobial Properties of Apple Puree Edible Films Containing Plant Essential Oils. p. 9262–9267, 2006.
- SAHA, N. R. et al. Studies on methylcellulose/pectin/montmorillonite nanocomposite films and their application possibilities. **Carbohydrate polymers**, v. 136, p. 1218–27, 20 jan. 2016.
- SANTOS, T. M. DOS. **Influência de nanocristais de celulose sobre as propriedades de filmes de gelatina de resíduos de tilápia**. [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2012.
- SARMAH, M. et al. Study on crosslinked gelatin–montmorillonite nanoparticles for controlled drug delivery applications. **Journal of Materials Science**, v. 50, n. 22, p. 7303–7313, 2015.

- SIONKOWSKA, A. et al. Molecular interactions in collagen and chitosan blends. **Biomaterials**, v. 25, n. 5, p. 795–801, fev. 2004.
- SOTHORNVIT, R.; RODSAMRAN, P. Effect of a mango film on quality of whole and minimally processed mangoes. **Postharvest Biology and Technology**, v. 47, n. 3, p. 407–415, 2008.
- SUDIP, R. et al. The Potencial Use of Polymer-Clay Nanocomposites in Food Packaging. **International Journal of Food Engineering**, v. 2, n. 4, p. 1–11, 2006.
- TEIXEIRA-NETO, Â. A. et al. Hybrid materials based on smectite clays and nutraceutical anthocyanins from the Açaí fruit. **European Journal of Inorganic Chemistry**, n. 32, p. 5411–5420, 2012.
- VENDRAMINI, A. L.; TRUGO, L. C. Chemical composition of acerola fruit (*Malpighia puniceifolia* L.) at three stages of maturity. **Food Chemistry**, v. 71, n. 2, p. 195–198, 2000.
- VERA DE ROSSO, V. et al. Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) and açai (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC-PDA-MS/MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 4, p. 291–299, 2008.
- WANG, X. et al. Barrier and mechanical properties of carrot puree films. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, n. 2, p. 149–156, 2011.
- WEISS, J.; TAKHISTOV, P.; MCCLEMENTS, D. J. Functional materials in food nanotechnology. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 9, p. 107–116, 2006.
- XU, S. W. et al. Interaction of functional groups of gelatin and montmorillonite in nanocomposite. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 101, n. 3, p. 1556–1561, 2006.
- YAKIMETS, I. et al. Effect of water content on the structural reorganization and elastic properties of biopolymer films: A comparative study. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 5, p. 1710–1722, 2007.
- YANG, L.; PAULSON, A. T. Effects of lipids on mechanical and moisture barrier properties of edible gellan film. **Food Research International**, v. 33, n. 7, p. 571–578, 2000.
- ZENG, S. et al. Original article: Optimisation of extraction conditions and characteristics of skin gelatin from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **International Journal of Food Science & Technology**, v. 45, n. 9, p. 1807–1813, 19 set. 2010.
- ZHENG, J. P. et al. Gelatin/montmorillonite hybrid nanocomposite. I. Preparation and properties. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 86, n. 5, p. 1189–1194, 2002.