

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E**  
**TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**TESE**

**OBTENÇÃO DE CORANTE NATURAL A PARTIR DE FLORES  
DE FEIJÃO BORBOLETA (*Clitoria Ternatea* L.) UTILIZANDO RESINAS  
MACROPOROSAS DE ADSORÇÃO E PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA**

**RENATA OLIVEIRA SANTOS**

**2021**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**OBTENÇÃO DE CORANTE NATURAL A PARTIR DE FLORES  
DE FEIJÃO BORBOLETA (*Clitoria Ternatea* L.) UTILIZANDO RESINAS  
MACROPOROSAS DE ADSORÇÃO E PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA**

**RENATA OLIVEIRA SANTOS**

*Sob orientação da professora*

**D.Sc. Maria Ivone Martins Jacintho Barbosa**

*e Co-orientação*

**D.Sc. Francisco Fabio Cavalcante Barros**

**D.Sc. Juarez Vicente**

Tese de doutorado submetido  
como requisito para o grau de **Doutora  
em Ciência e Tecnologia de Alimentos**,  
no Programa de Pós-Graduação em  
Ciência e Tecnologia de Alimentos, na  
área de concentração Tecnologia de  
Alimentos.

Seropédica, RJ  
Outubro de 2021

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S237o	<p>Santos, Renata Oliveira, 1988- OBTENÇÃO DE CORANTE NATURAL A PARTIR DE FLORES DE FEIJÃO BORBOLETA (Clitoria Ternatea L.) UTILIZANDO RESINAS MACROPOROSAS DE ADSORÇÃO E PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA / Renata Oliveira Santos. - Seropédica, RJ, 2021. 151 f.</p> <p>Orientadora: Maria Ivone Martins Jacintho Barbosa. Coorientador: Francisco Fabio Cavalcante Barros. Coorientador: Juarez Vicente. Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2021.</p> <p>1. Clitoria ternatea. 2. Corante natural. 3. Resina macroporosa. 4. Patenteabilidade. I. Barbosa, Maria Ivone Martins Jacintho, 1977-, orient. II. Barros, Francisco Fabio Cavalcante, 1979-, coorient. III. Vicente, Juarez , 1985-, coorient. IV Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. V. Título.</p>
-------	---

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



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS



TERMO Nº 1219/2021 - PPGCTA (12.28.01.00.00.00.41)

Nº do Protocolo: 23083.082409/2021-00

Seropédica-RJ, 16 de novembro de 2021.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**RENATA OLIVEIRA SANTOS**

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de doutora, no Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos.

Tese APROVADA EM 04/10/2021.

MARIA IVONE MARTINS JACINTHO BARBOSA, (Dra) (orientador) UFRRJ

NATHÁLIA DA ROCHA RODRIGUES (Dra) Universidade Estácio de Sá

SÉRGIO MEDEIROS PAULINO DE CARVALHO (Dr) INPI

JOÃO ANTONIO BELMINO DOS SANTOS (Dr) UFS

ROMULO CARDOSO VALADAO (Dr) UFRRJ

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020.

*Documento não acessível publicamente*

*(Assinado digitalmente em 16/11/2021 18:07)*  
MARIA IVONE MARTINS JACINTHO BARBOSA  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DTA (12.28.01.00.00.00.46)  
Matrícula: 1524368

*(Assinado digitalmente em 16/11/2021 14:56)*  
ROMULO CARDOSO VALADAO  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DTA (12.28.01.00.00.00.46)  
Matrícula: 3467131

*(Assinado digitalmente em 16/11/2021 15:16)*  
JOÃO ANTONIO BELMINO DOS SANTOS  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: 753.180.914-15

*(Assinado digitalmente em 17/11/2021 14:34)*  
NATHALIA DA ROCHA RODRIGUES  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: 121.022.637-54

*(Assinado digitalmente em 17/11/2021 15:02)*  
SERGIO MEDEIROS PAULINO DE CARVALHO  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: 458.541.147-04

## RESUMO

SANTOS, Renata Oliveira. **Obtenção de corante natural a partir de flores de feijão borboleta (*Clitoria Ternatea* L.) utilizando resinas macroporosas de adsorção e prospecção tecnológica.** 2021. 151 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2021.

As características sensoriais dos alimentos são grandes responsáveis pela aceitação dos produtos pelo consumidor, dentre elas a cor. Os corantes artificiais são utilizados há muito tempo pela indústria, entretanto os consumidores atualmente procuram por ingredientes naturais, com redução de aditivos sintéticos e com menor impacto ao meio ambiente. Nesse contexto, a substituição de corantes artificiais por pigmentos naturais é de particular interesse e vem ganhando grande relevância em muitas pesquisas e também pelo mercado consumidor que tem preferido consumir produtos *clean label*. Dentre os corantes naturais, destacam-se as antocianinas que além de suas cores vibrantes nos mais diferentes tons de vermelho, roxo e azul, possuem elevada solubilidade em água, um fator positivo para aplicação em diversos produtos, como em bebidas e sistemas aquosos. Os suplementos hidroeletrólíticos, mais conhecidos como isotônicos, são produtos formulados especialmente com o objetivo de repor a água e os sais minerais, além de atuarem como fonte de energia. Apesar desta categoria de bebidas ser associada a saudabilidade, por ter como principais consumidores os praticantes de esportes. Tradicionalmente, na coloração dos diferentes sabores de bebidas isotônicas têm utilizado os corantes sintéticos. Este trabalho teve como objetivo extrair um corante natural a partir das antocianinas presentes nas pétalas das flores de feijão borboleta (*Clitoria Ternatea* L.) e avaliar a estabilidade térmica desse pigmento em sistema-modelo isotônico, assim como a estabilidade digestiva *in vitro* dos compostos funcionais presente na bebida, além de estudar o processo de separação e purificação das antocianinas das pétalas de feijão borboleta utilizando resinas macroporosas, processo que se destaca pelo baixo custo e menor consumo de solvente. Para atingir o objetivo geral, a tese foi realizada em quatro capítulos, sendo um de revisão da literatura, e os demais capítulos de resultados, que abordaram a prospecção tecnológica sobre o tema, estudos de estabilidade das antocianinas em sistema-modelo de bebida isotônica e extração e purificação das antocianinas de flores de feijão borboleta utilizando resinas macroporosas. O presente estudo evidenciou que o crescimento dos depósitos de pedidos de patente, a respeito do uso de resinas macroporosas para extração e purificação de antocianinas, apresentou maior destaque depois do ano 2000 e que a China foi o principal país em número de depósitos de patente. O estudo observou-se que as amostras submetidas a 60 e 70 °C apresentaram maior estabilidade em comparação às amostras submetidas a 80 °C, a constante de degradação ( $k$ ) das antocianinas apresentou o maior valor ( $46,40 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ ) na amostra de solução tampão, sem adição de ácido ascórbico, submetida a 80 °C, enquanto que a amostra de isotônico, submetida a mesma temperatura, apresentou  $k$  de  $26,50 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ . O tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) na estabilidade do ácido ascórbico das amostras de isotônico apresentaram 95,87 min a 60 °C e 79,49 min em 80 °C, o que indica a influência da temperatura na estabilidade desses compostos. O estudo da bioacessibilidade *in vitro*, tanto do ácido ascórbico quanto das antocianinas das pétalas de feijão borboleta nos isotônicos, mostraram que ambos apresentaram maior estabilidade na fase gástrica e que a temperatura também influenciou a porcentagem bioacessível desses compostos ao final da fase intestinal, onde as amostras submetidas a 80 °C apresentaram 69,13% de degradação do ácido ascórbico e 59,00% de degradação das antocianinas. Das seis resinas macroporosas estudadas, a XAD7HP e a DAX8 foram selecionadas por apresentarem maior capacidade de adsorção, 248,55 mg/g e 228,84 mg/g, respectivamente, e também as melhores porcentagens de recuperação das antocianinas, 75,66% para resina DAX7HP e 52,64% para resina DAX8. Após a seleção das resinas foram realizados

estudos de cinética de adsorção, em que os resultados foram melhor ajustados ao modelo cinético de pseudo-segunda ordem, para as duas resinas; os modelos de Freundlich e Langmuir foram avaliados e os dados de isoterma para a resina XAD7HP melhor se ajustou ao modelo de Freundlich, e para a resina DAX8 o modelo que melhor se ajustou aos dados foi o de Langmuir.

**Palavras-chave:** *Clitoria ternatea*, corante natural, resina macroporosa, patenteabilidade.

## ABSTRACT

SANTOS, Renata Oliveira. **Obtaining natural dye from butterfly bean flowers (*Clitoria Ternatea* L.) using macroporous adsorption resins and technological prospecting.** 2021. 151 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2021.

The sensory characteristics of foods are largely responsible for the acceptance of products by the consumer, including color. Artificial colors have been used for a long time by the industry, however consumers are currently looking for more natural ingredients, with a reduction in synthetic additives and with less impact on the environment. In this context, the replacement of artificial dyes by natural pigments is of particular interest and has gained great relevance in many researches and also by the consumer market that has preferred to consume clean label products. Among the natural dyes, anthocyanins stand out which, in addition to their vibrant colors in the most different shades of red, purple and blue, have high solubility in water, a positive factor for application in various products, such as beverages and aqueous systems. Hydroelectrolytic supplements, better known as isotonic, are products specially formulated with the objective of replacing water and mineral salts, in addition to acting as a source of energy. Although this category of beverages is associated with healthiness, as its main consumers are sports practitioners. Traditionally, synthetic dyes have been used in the coloring of different flavors of isotonic drinks. This work aimed to extract a natural dye from the anthocyanins present in the petals of the butterfly bean (*Clitoria Ternatea* L.) flowers and to evaluate the thermal stability of this pigment in an isotonic model-system, as well as the in vitro digestive stability of the functional compounds present in the beverage, in addition to studying the process of separation and purification of anthocyanins from the petals of butterfly beans using macroporous resins, a process that stands out for its low cost and lower solvent consumption. To achieve the general objective, the thesis was carried out in four chapters, one of which was a literature review, and the other chapters of results, which addressed the technological prospecting on the subject, stability studies of anthocyanins in model-system of isotonic drink and extraction and purification of anthocyanins from butterfly bean flowers using macroporous resins. The present study showed that the growth of patent application filings, regarding the use of macroporous resins for the extraction and purification of anthocyanins, showed greater prominence after 2000 and that China was the main country in the number of patent filings. The study It was observed that the samples submitted to 60 and 70 °C showed greater stability compared to samples submitted to 80 °C, the degradation constant ( $k$ ) of anthocyanins had the highest value ( $46.40 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ ) in the buffer solution sample, without addition of ascorbic acid, submitted to 80 °C, while the isotonic sample, submitted to the same temperature, presented  $k$  of  $26.50 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ . The half-life time ( $t_{1/2}$ ) in ascorbic acid stability of isotonic samples showed 95.87 min at 60 °C and 79.49 min at 80 °C, which indicates the influence of temperature on the stability of these compounds. The study of in vitro bioaccessibility of both ascorbic acid and anthocyanins of butterfly bean petals in isotonic showed that both presented greater stability in the gastric phase and that temperature also influenced the bioaccessible percentage of these compounds at the end of the intestinal phase, where the samples submitted to 80 °C showed 69.13% degradation of ascorbic acid and 59.00% degradation of anthocyanins. Of the six macroporous resins studied, XAD7HP and DAX8 were

selected for having the highest adsorption capacity, 248.55 mg/g and 228.84 mg/g, respectively, and also the best recovery percentages of anthocyanins, 75.66% for DAX7HP resin and 52.64% for DAX8 resin. After the selection of resins, studies of adsorption kinetics were carried out, in which the results were better fitted to the pseudo-second order kinetic model, for the two resins; the Freundlich and Langmuir models were evaluated and the isotherm data for the XAD7HP resin best fit the Freundlich model, and for the DAX8 resin the model that best fit the data was the Langmuir model.

**Key Word:** *Clitoria ternatea*, natural dye, macroporous resin, patentability.



## ÍNDICE DE TABELAS

### Capítulo I

**Tabela 1:** Limite máximo de corantes sintéticos permitidos em bebidas. .... 11

**Tabela 2:** Levantamento dos principais corantes sintéticos utilizando em isotônicos comercializados no Brasil realizado 17/08/2021..... 13

**Tabela 3:** Estabilidade de antocianinas em sistemas-modelo de soft drinks e aquosos. .... 17

### Capítulo II

**Tabela 1:** Quantidade de famílias de patentes encontradas por CIP relacionada .....43

**Tabela 2:** Descrição das CIP's que mais se destacaram além das selecionadas para estratégia de busca .....47

**Tabela 3:** Algumas das famílias de patentes com tecnologias relevantes. ....49

### Capítulo III

**Table 1** – Degradation constants ( $k_{obs}$ ), half-life times ( $t_{1/2}$ ), activation energies ( $A_e$ ), determination coefficients ( $r^2$ ), p value (p), and average relative errors (E) for thermal degradation of monomeric anthocyanins and ascorbic acid. .... 65

### Capítulo IV

**Tabela 1:** Propriedades químicas e físicas das diferentes resinas macroporosas de adsorção/dessorção ..... 81

**Tabela 2:** Ajuste dos modelos de Langmuir e Freundlich nas resinas XAD7HP e DAX8 91

**Tabela 3:** Constantes dos modelos cinéticos de pseudo-primeira e pseudo-segunda ordem para as resinas XAD7HP e DAX8 no extrato de feijão borboleta..... 93

## ÍNDICE DE FIGURAS

### Capítulo I

**Figura 1:** Transformações estruturais em solução aquosa em função do pH..... 15

### Capítulo II

**Figura 1:** Evolução do número de família de patentes de classificação C07H 17/065 publicadas no mundo que estavam associadas aos termos de pesquisa..... 45

**Figura 2:** Evolução do número de família de patentes de classificação C07D 311/62 publicadas no mundo que estavam associadas aos termos de pesquisa..... 45

**Figura 3:** Evolução do número de família de patentes de classificação B01D publicadas no mundo que estavam associadas aos termos de pesquisa..... 46

**Figura 4:** CIP relacionadas com maior ocorrência. .... 48

### Capítulo III

**Figure 1** – Fitting capability of the first order model for experimental data of: (A) % of Monomeric anthocyanin (MA) degradation in different solutions (Isotonic, Buffer, and AA+Buffer); (B) % of Ascorbic acid (AA) degradation in an isotonic model system. .... 64

**Figure 2** – *In vitro* digestive stability of monomeric anthocyanins (MA) present in isotonic samples formulated with extract of butterfly pea flowers and heated at 60, 70, and 80 °C. Points with different letters indicate significant difference by the Tukey's test (5%). .... 67

**Figure 3** – *In vitro* digestive stability of ascorbic acid (AA) present in isotonic samples formulated with extract of butterfly pea flowers and heated at 60, 70, and 80 °C. Points with different letters indicate significant difference by the Tukey's test (5%). .... 68

### Capítulo IV

**Figura 1:** Metodologia de ativação das resinas ..... 80

**Figura 2:** Ensaio em diferentes valores de pH para capacidade de adsorção e capacidade de dessorção da resina XAD2 ..... 87

**Figura 3:** Ensaio em diferentes valores de pH para capacidade de adsorção e capacidade de dessorção da resina XAD4 ..... 87

**Figura 4:** Ensaio em diferentes valores de pH para capacidade de adsorção e capacidade de dessorção da resina XAD7HP ..... 88

**Figura 5:** Ensaio em diferentes valores de pH para capacidade de adsorção e capacidade de dessorção da resina DAX8 ..... 88

**Figura 6:** Ensaio em diferentes valores de pH para capacidade de adsorção e capacidade de dessorção da resina XAD1180N..... 89

<b>Figura 7:</b> Ensaio em diferentes valores de pH para capacidade de adsorção e capacidade de dessorção da resina XAD16 .....	89
<b>Figura 8:</b> Isotermas de adsorção das resinas XAD7HP e DAX8 baseadas nos modelos isotérmicos Langmuir e Freundlich.....	92
<b>Figura 9:</b> Cinética de adsorção utilizando resina macroporosa em extrato de feijão borboleta .....	94
<b>Figura 10:</b> Modelagem de dados cinéticos aplicando cinética de pseudo-primeira ordem na resina XAD7HP (A) e na resina DAX8 (B), e modelagem de dados cinética de pseudo-segunda ordem na resina XAD7HP (C) e na resina DAX8 (D) .....	95

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>1</b>
<b>OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>2</b>
Objetivos Específicos .....	2
<b>ORGANIZAÇÃO DA TESE .....</b>	<b>4</b>
<b>CAPÍTULO I   ANTOCIANINAS COMO ESTRATÉGIAS NA UTILIZAÇÃO DE CORANTES NATURAIS PARA O DESENVOLVIMENTO DE <i>SOFT DRINKS</i>.....</b>	<b>5</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>7</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>8</b>
<b>2. DESENVOLVIMENTO.....</b>	<b>9</b>
2.1. Corantes .....	9
2.2. Isotônicos.....	10
2.3. Uso de antocianinas na coloração de bebidas <i>soft drinks</i> .....	14
2.4. Estabilidade das antocianinas em sistema-modelo de <i>soft drinks</i> e aquosos.....	16
<b>3. CONCLUSÃO.....</b>	<b>28</b>
<b>4. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>29</b>
<b>CAPÍTULO II   TECNOLOGIAS PARA EXTRAÇÃO DE ANTOCIANINAS POR ADSORÇÃO EM RESINAS DESCRITAS EM PATENTES: DIAGNÓSTICO SOBRE AS ÁREAS RELEVANTES E TENDÊNCIAS.....</b>	<b>35</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>36</b>
<b>abstract .....</b>	<b>37</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>38</b>
<b>2. metodologia .....</b>	<b>40</b>
2.1. Estratégia de busca e recuperação dos documentos .....	40
2.2. Categorização dos documentos .....	43
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>43</b>
3.2. Distribuição temporal e CIP pesquisadas .....	44
3.3. CIPs relacionadas .....	47

3.4. Algumas patentes relevantes .....	48
<b>4. CONCLUSÃO.....</b>	<b>52</b>
<b>5. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>52</b>

**CAPÍTULO III    DEGRADATION KINETICS AND *IN VITRO* DIGESTIVE STABILITY OF SELECTED BIOACTIVE COMPOUNDS FROM A BEVERAGE FORMULATED WITH BUTTERFLY PEA FLOWERS.....55**

<b>ABSTRACT .....</b>	<b>56</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>57</b>
<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>58</b>
<b>2. MATERIALS AND METHODS.....</b>	<b>60</b>
2.1. Preparation of extracts .....	60
2.2. Thermal stability and degradation kinetics.....	60
2.3. Monomeric anthocyanin content, ascorbic acid content, and pH values.....	61
2.4. <i>In vitro</i> digestive stability of anthocyanins and ascorbic acid in isotonic model system .....	61
2.5. Statistical analysis.....	62
<b>3. RESULTS AND DISCUSSION.....</b>	<b>63</b>
<b>4. CONCLUSION .....</b>	<b>70</b>
<b>5. REFERENCES .....</b>	<b>71</b>

**CAPÍTULO IV    INFLUÊNCIA DO PH E DO TIPO DE RESINA MACROPOROSA NAS PROPRIEDADES DE ADSORÇÃO/DESORÇÃO E TERMODINÂMICAS NA SEPARAÇÃO DE ANTOCIANINAS DE *CLITORIA TERNATEA* L .....74**

<b>RESUMO.....</b>	<b>75</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>76</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>77</b>
<b>2. MATERIAIS E METODOS.....</b>	<b>79</b>
2.1. Materiais .....	79
2.2. Pré-tratamento das resinas .....	79
Fonte: Fabricante Amberlite®.....	81
2.3. Preparação das soluções tampão.....	81

2.4. Preparação dos extratos de feijão borboleta .....	82
2.5. Efeito do pH e do tipo de resina na adsorção/dessorção das antocianinas de extrato de flores feijão borboleta com resinas macroporosas .....	82
2.6. Quantificação do teor de antocianinas monoméricas .....	83
2.7. Isotermas de adsorção e termodinâmica .....	84
2.8. Cinéticas de adsorção .....	84
2.9. Análise estatística .....	85
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>86</b>
3.1. Efeito do pH e do tipo de resina na adsorção/dessorção das antocianinas de extrato de flores feijão borboleta com resinas macroporosas .....	86
3.2. Isotermas de adsorção e termodinâmica .....	90
3.3. Cinéticas de adsorção .....	94
<b>4. CONCLUSÃO.....</b>	<b>96</b>
<b>5. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>97</b>
<b>CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>102</b>
<b>APÊNDICE I GUIA BÁSICO PRIMEIROS PASSOS PARA PATENTEAR SUA INVENÇÃO .....</b>	<b>104</b>
<b>O QUE É UMA PATENTE? .....</b>	<b>106</b>
<b>CONVENÇÃO DA UNIÃO DE PARIS (CUP) .....</b>	<b>107</b>
<b>EXCEÇÕES .....</b>	<b>109</b>
<b>ESTRUTURA DE UMA PATENTE.....</b>	<b>111</b>
<b>COMPREENDA SUA INVENÇÃO .....</b>	<b>113</b>
<b>CRITÉRIOS DE PATENTEABILIDADE.....</b>	<b>119</b>
<b>BUSCA DE ANTERIORIDADES .....</b>	<b>123</b>
<b>COMPARAÇÃO DE DOCUMENTOS.....</b>	<b>130</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>133</b>
<b>APÊNDICE II EXAME TÉCNICO DE PATENTEABILIDADE APLICADO AO PRESENTE ESTUDO DE TESE.....</b>	<b>134</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>135</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>139</b>

## INTRODUÇÃO GERAL

A cor é um dos mais importantes atributos de qualidade em um alimento, exercendo enorme influência na aceitação dos produtos alimentícios. Os corantes são utilizados na indústria alimentícia há muitos anos, com a finalidade de colorir, manter e/ou intensificar a uniformidade do produto e restaurar possíveis perdas de coloração oriundas do armazenamento e processamento.

A substituição de corantes sintéticos por naturais vem ganhando relevância devido, à crescente demanda dos consumidores por produtos mais saudáveis, com reduzido teor de compostos sintéticos. Além disso, alguns dos corantes sintéticos disponíveis no mercado mundial são proibidos em alguns países devido à evidência de efeitos colaterais, como sinais de toxicidade em curto e longo prazo, incluindo possíveis efeitos carcinogênicos.

Nesse contexto, destaca-se a flor de feijão borboleta (*Clitoria ternatea* L.), uma planta pertencente à família *Fabaceae*, originária da Ásia tropical, cujas pétalas apresentam tons azuis a roxeados e brancos, devido à presença de antocianidinas como ternatina, preternatina, delphinidina, cianidina e malvidina.

Constituindo um dos maiores grupos de pigmentos hidrossolúveis, as antocianinas apresentam diferenças no número e na natureza de açúcares ligados à molécula, e na posição dessas ligações, o que acarreta em particularidades no processo de extração e separação de cada uma. A utilização de resinas macroporosas vem apresentando destaque dentre os processos mais utilizados e estudados para a separação e purificação de compostos fenólicos em vegetais, uma vez que existem diferentes tipos de resinas que podem ser utilizadas, o que apresenta vantagem para seleção de uma que apresente alta afinidade com o composto a ser adsorvido, agregando maior eficiência e produtividade no processo. A utilização de resinas macroporosas é uma técnica de baixo custo, fácil regeneração das resina e reduzido consumo de solvente, o que se torna um método de separação e extração com menor impacto ao meio ambiente.

As antocianinas representam um dos pigmentos naturais mais estudados, tanto pelo seu poder de coloração como pelos seus efeitos benéficos à saúde. Existem alguns relatos da utilização das flores de feijão borboleta em variadas atividades farmacológicas como antidepressiva, anticonvulsivante, anti-inflamatória, analgésica e contra infecções, vinculada a presença de antocianidinas como ternatina, preternatina, delphinidina, cianidina e malvidina, no entanto, ainda faltam mais pesquisas sobre as atividades biológicas para explicar e consolidar seu uso como corante natural alimentício.

Vinculado aos consumidores que procuram uma alimentação mais saudável e produtos com rótulos mais limpos, também conhecidos como *clean label*, está um grupo praticante de atividade física, grande consumidor de suplementos hidroeletrolíticos, conhecidos como isotônicos. As bebidas isotônicas repõem os eletrólitos, carboidratos e outros nutrientes perdidos através da transpiração após a prática de atividades esportivas, facilitando assim a reidratação. Esse tipo de produto é conhecido pelas suas cores vibrantes e atrativas aos consumidores, entretanto, em sua grande maioria esses produtos utilizam combinações de corantes sintéticos para a promoção da cor à essas bebidas.

Nesse contexto o estudo e a pesquisa para obtenção de corantes naturais apresenta grande relevância, pois atualmente muitos grupos de pigmentos naturais possuem dificuldade de aplicação em produtos alimentícios devido suas alterações de cor e estabilidade reduzida quando submetidos a processamentos térmicos, alterações de pH, luminosidade, e etc., o que promove a necessidade de desenvolvimento tecnológico e inovações para extração e aplicação de pigmentos naturais que possa substituir os corantes artificiais utilizados atualmente pelas indústrias.

A realização da prospecção tecnológica, que pode ser definida como um mapeamento de desenvolvimentos científicos e tecnológicos, é de suma importância pois tem capacidade de influenciar de forma significativa os avanços acadêmicos, industriais e econômicos. Nesse sentido foi realizado um levantamento bibliográfico nas bases de dados Scopus® - Elsevier B.V. em setembro de 2021, onde foi possível verificar que há apenas um trabalho, publicado em novembro de 2020, que realiza o estudo da estabilidade das antocianinas oriundas das pétalas de feijão borboleta como corante natural para aplicação em um sistema-modelo de bebida.

## **OBJETIVO GERAL**

O presente trabalho tem como objetivo extrair pigmento natural oriundo das pétalas de feijão borboleta, avaliar a estabilidade térmica desses compostos na formulação de bebidas isotônicas e realizar o estudo da separação e purificação desse corante utilizando resinas macroporosas.

### **Objetivos Específicos**

- ✓ Avaliar a prospecção tecnológica da utilização de resinas macroporosas para separação e purificação de antocianinas em base de dados patentária;



- ✓ Estudar os parâmetros cinéticos da degradação das antocianinas do pó de pétalas de feijão borboleta e do ácido ascórbico em sistemas-modelo de bebida isotônica;
- ✓ Verificar a digestibilidade *in vitro* das antocianinas do pó de pétalas de feijão borboleta e do ácido ascórbico em sistemas-modelo de bebida isotônica;
- ✓ Extrair e purificar as antocianinas presentes nas pétalas de feijão borboleta utilizando resina macroporosa de adsorção, avaliando os efeitos do pH e concentração para seleção das melhores resinas e aplicação de estudo dos parâmetros termodinâmicos e cinéticos na capacidade de adsorção.

## ORGANIZAÇÃO DA TESE

A Tese está organizada em quatro capítulos e dois apêndices, conforme a seguir:

No capítulo I está apresentada uma revisão da literatura acerca da utilização de antocianinas, de diferentes fontes, como corante em sistema-modelos de bebidas e aquosos, abordando as características tecnológicas para viabilidade da aplicação desses corantes naturais em diferentes produtos. O artigo de revisão está em preparação para ser enviado para revista *Current Nutrition & Food Science*.

No capítulo II são apresentados resultados sobre o levantamento tecnológico, utilizando bases de dados patentarias, acerca da aplicação de resinas macroporosas para extração e purificação de antocianinas, identificando quais países e centros de pesquisas utilizam e promovem avanços tecnológicos nessa área, utilizando propriedade industrial. O artigo com os resultados está sendo preparado para submissão na revista *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*.

No capítulo III foi realizado um estudo avaliou os efeitos da temperatura na estabilidade do ácido ascórbico, pH e antocianinas de pétalas de feijão borboleta, bem como a estabilidade digestiva *in vitro* do ácido ascórbico e antocianinas em sistemas modelo submetidos a 60, 70 e 80 °C. O artigo foi aceito para publicação na Revista *Ciência Rural*.

No capítulo IV foi estudado o comportamento da adsorção e recuperação das antocianinas oriundas das pétalas de feijão borboleta, em seis diferentes tipos de resinas macroporosas, avaliando a influência do pH, temperatura e concentração no processo de extração. As melhores resinas foram selecionadas para estudos de isotermas, termodinâmica e cinética de adsorção. O artigo com os resultados está sendo preparado para submissão na revista *Journal of Food Process Engineering*.

O apêndice I apresenta um produto técnico da Tese que é manual que aborda os primeiros passos para patentear uma invenção, trazendo de forma didática e em um vocabulário interativo as regras para patenteabilidade, considerando a legislação brasileira. O manual tem o objetivo de auxiliar no processo de requerimento de um pedido de patente e estimular o uso da proteção industrial como ferramenta de inovação.

O apêndice II apresenta a avaliação, baseado nos conceitos no apêndice I, da tecnologia utilizada e desenvolvida no presente trabalho de tese, em relação a possibilidade de patenteabilidade.

# CAPÍTULO I

## **ANTOCIANINAS COMO ESTRATÉGIAS NA UTILIZAÇÃO DE CORANTES NATURAIS PARA O DESENVOLVIMENTO DE SOFT DRINKS**

R.O. Santos<sup>1,2</sup>, L.M. Keller<sup>1</sup>, F.F.C. Barros<sup>2</sup>, J. Vicente<sup>1</sup>, M.I.M.J. Barbosa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), 23890-000, Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil.

<sup>2</sup>Divisão de Patentes de Tecnologia de Embalagem, Instituto Nacional de Propriedade Industrial, Rio de Janeiro, Brasil.

**Manuscrito em preparação para ser enviado para Current Nutrition & Food Science (Qualis B1 - Ciência de alimentos/Capes).**

## **RESUMO**

Essa revisão tem como objetivo avaliar o potencial de utilização de antocianinas como corantes naturais aplicados em bebidas e sistemas modelo aquosos, uma crescente tendência dos consumidores por produtos naturais, com redução de ingredientes sintéticos na formulação, e seus efeitos nas propriedades tecnológicas e sensoriais. No geral, os estudos têm mostrado resultados positivos, não apenas na intensidade da cor como também na estabilidade das antocianinas após processamento e armazenamento em bebidas. Entretanto estudos ainda são necessários para avaliar e melhorar a estabilidade das antocianinas, em diferentes tratamentos e associada a componentes que, através de interações químicas, reduzam a degradação das antocianinas, visando aumentar o espectro de aplicação dessas como corantes em alimentos e bebidas.

**Palavras-chave:** antocianina, cor, estabilidade, bebida

## **ABSTRACT**

This review aims to evaluate the potential use of anthocyanins as natural colorants applied in beverages and aqueous model systems, a growing consumer trend for natural products, with a reduction in synthetic ingredients in the formulation, and their effects on technological and sensory properties. Overall, studies have shown positive results, not only in color intensity but also in the stability of anthocyanins after processing and storage in beverages. However, studies are still needed to evaluate and improve the stability of anthocyanins, in different treatments and associated with components that, through chemical interactions, reduce the degradation of anthocyanins, aiming to increase the spectrum of application of these as dyes in food and beverages.

**Keywords:** anthocyanin, color, stability, beverage

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de corantes em produtos alimentícios ocorre, principalmente, pela grande importância que a cor representa em um alimento, essa característica sensorial determina previamente as expectativas em relação às demais características sensoriais e à qualidade do produto. Nesse contexto, os corantes artificiais, em comparação aos corantes naturais, apresentam algumas vantagens, visto que a maioria apresenta maior estabilidade a ação do calor, luz, oxigênio e pH, além da uniformidade na cor observada e custo de produção relativamente baixo (CONSTANT, STRINGHETA & SANDI, 2002). Entretanto, do ponto de vista toxicológico, os corantes artificiais vem apresentando indicativos negativos relacionados a saúde, como associação a problemas gástricos, alergias, problemas respiratórios, além de efeitos carcinogênicos (MARTINS *et al.*, 2016).

Com isso é possível verificar uma crescente preocupação e procura dos consumidores por produtos que apresentem em sua composição ingredientes naturais, com redução dos processos e formulações industrializadas. Essa nova tendência está relacionada a um consumo mais consciente, com a utilização de técnicas de processamentos que reduzam a degradação ambiental, como o caso das resinas macroporosas para extração e purificação de compostos vegetais (CHANDRASEKHAR, MADHUSUDHAN & RAGHAVARAO, 2012).

Produtos de origem orgânica, redução no uso de aditivos sintéticos, alimentos que possuam características funcionais e que não prejudiquem a vida útil ou a qualidade do alimento, são as premissas dos consumidores que procuram por esse tipo de produto (ZHAO *et al.*, 2020). Com isso as empresas têm apresentado interesse na busca por ingredientes alternativos para substituir os aditivos alimentares sintéticos usados atualmente, para uma transição segura e eficaz, o que, cada vez mais, estimula a pesquisa e inovação tecnológica nessa área, com o objetivo de aplicar tecnologia às fontes naturais de corantes para agregar maior estabilidade, reduzir o custo de extração e ampliar a área de aplicação desses pigmentos, além de gerar avanços tecnológico com a proteção das inovações por patentes (OLEGARIO & DOS SANTOS, 2014; SANTOS *et al.*, 2021).

Dessa forma, pesquisas vinculadas à substituição de corantes sintéticos e desenvolvimento de corantes naturais, oriundo de diversificadas fontes, vem ganhando relevância. As antocianinas, pertencentes ao grupo dos flavonoides, estão entre as substâncias, com poder colorante, mais estudadas. As antocianinas estão presentes em uma gama variada de flores, frutas e vegetais, conferindo uma larga escala de cores entre vermelho, púrpura e azul (CHEN *et al.*, 2018). Devido as suas características e propriedades, como boa solubilidade em

água e ação antioxidante, tem sido verificado estudos com a sua aplicação em diferentes tipos de alimentos e oriundos de diversas fontes de obtenção (CHUNG *et al.*, 2016; BARRETTO *et al.*, 2020).

O segmento de bebidas isotônicas tem apresentado crescimento, com a introdução de novos sabores e atendendo a demanda comercial de novos produtos, segundo o último levantamento da ABIR (Associação brasileira das indústrias de refrigerantes e de bebidas não alcoólicas) em 2019 o consumo foi de 0,58 litros por habitante, o que representa um volume crescente desde 2015. Essa tendência também pode ser explicada pela busca por produtos naturais, com formulações e aspectos funcionais, e que possam agregar em uma melhor qualidade de vida ao consumidor. Desse modo, a utilização das antocianinas como corante nas bebidas isotônicas apresenta uma nova perspectiva, agregando à bebida características nutricionais e funcionais, além de responder ao apelo por produtos naturais de um grupo de consumidores.

O objetivo desta revisão foi avaliar o potencial de utilização de antocianinas como pigmento em bebidas e sistemas modelo aquosos, verificando seus efeitos na viabilidade e diversificação tecnológica, além dos aspectos sensoriais.

## **2. DESENVOLVIMENTO**

### **2.1. Corantes**

A cor é uma propriedade sensorial de grande relevância em alimentos, muitos produtos alimentícios possuem coloração característica, o que influencia o consumidor na decisão de compra, levando-o a considerar a percepção da cor como atrelada à aparência, segurança, aceitabilidade, bem como de outras características sensoriais, como aroma, sabor e textura (CHANDRASEKHAR, MADHUSUDHAN & RAGHAVARAO, 2012; SIGURDSON, TANG & GIUSTI, 2017). Dentre as estratégias adotadas na indústria para o desenvolvimento de produtos processados, a utilização de corantes apresenta grande relevância.

Os corantes são uma classe de aditivos alimentares definidos como substâncias ou mistura de substâncias que têm a finalidade de conferir, intensificar ou padronizar a coloração dos produtos alimentícios (BRASIL, 1997). Segundo a Portaria n.º 540, de 27 de outubro de 1997, os aditivos alimentares são ingredientes adicionados intencionalmente aos alimentos sem propósito de nutrir (BRASIL, 1997), sendo assim, a função do corante nos alimentos é apenas colorir, manter e/ou intensificar a uniformidade do produto e restaurar possíveis perdas de coloração oriundas do armazenamento e processamento (ROCHA & REED, 2014; MARTINS

*et al.*, 2016). É tolerada a adição nos alimentos de no máximo três corantes, desde que a quantidade total não ultrapasse o máximo autorizado a cada um, assim como cada aditivo isoladamente não ultrapasse seu próprio limite (BRASIL, 1977).

Considera-se "corante orgânico natural" os corantes inócuos obtidos a partir de vegetal, ou eventualmente, de animal, cujo princípio corante tenha sido isolado com o emprego de processo tecnológico adequado (BRASIL, 1977).

No passado, os corantes artificiais eram os principais agentes de coloração dos produtos industrializados. Nos últimos anos, com base nos resultados de estudos toxicológicos, o uso dos aditivos sintéticos foi associado a intoxicações por chumbo, arsênico e mercúrio, aumento no risco de doenças como o câncer, o que resultou em uma busca significativa pela substituição dos corantes sintéticos pelos naturais (HERRERO, CIFUENTES & IBAÑEZ, 2006). Essa associação tem elevado a preocupação dos consumidores com os efeitos prejudiciais dos pigmentos sintéticos e corantes à saúde, incentivando as indústrias, proporcionar alimentos isentos de produtos químicos sintéticos, dando preferência aos ingredientes e tecnologias mais saudáveis e naturais (DUFOSSÉ, 2006).

## **2.2. Isotônicos**

Os suplementos hidroeletrólíticos, mais conhecidos como isotônicos, são produtos formulados especialmente com o objetivo de repor a água e os sais minerais, além de atuarem como fonte de energia. No Brasil, as bebidas isotônicas estão incluídas na resolução RDC nº 18/2010 (Regulamento que dispõe sobre alimentos para atletas e que o objetivo de estabelecer a classificação, a designação, os requisitos de composição e de rotulagem dos alimentos para atletas) e devem atender a alguns requisitos para que usem essa denominação.

A osmolalidade se refere ao número de partículas osmoticamente ativas de soluto presentes em um quilogramado solvente, o aumento das osmolalidade em uma solução é diretamente proporcional ao aumento da concentração de solutos na solução. Pode ser utilizada a expressão "isotônico" quando o produto apresentar osmolalidade entre 270 e 330 mOsm/kg água (BRASIL, 2010).

Na Tabela 1 é possível verificar os limites máximos dos corantes sintéticos permitidos às bebidas não alcoólicas gaseificadas e não gaseificadas e preparados líquidos segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).



**Tabela 1:** Limite máximo de corantes sintéticos permitidos em bebidas.

Corante	Código (INS)	Limite máximo (mg L <sup>-1</sup> )
Amaranto	123	50
Amarelo crepúsculo	110	100
Amarelo de quinoleína	104	100
Azorrubina	122	50
Azul brilhante	133	100
Azul de indigotina	132	100
Azul patente V	131	50
Eritrosina	127	10
Marrom HT	155	50
Negro brilhante BN	151	100
Ponceau 4R	124	50
Tartrazina	102	100
Verde rápido	143	50
Vermelho 40	129	100

**Fonte:** BRASIL (2007)

INS: sistema internacional de numeração Codex Alimentarius FAO/OMS

O consumo de bebidas isotônicas tem apresentado crescimento nos últimos anos, segundo o último levantamento realizado pela Associação brasileira das indústrias de refrigerantes e de bebidas não alcoólicas (ABIR), em 2019 o consumo foi de 0,58 litros por habitante, o que consolida um volume de crescimento desde 2015. O volume de produção no mercado brasileiro da bebida também apresenta crescimento, sendo em 2019 121,616 mil litros por habitante.

O maior consumo de bebidas isotônicas está direcionado ao público praticante de atividade física, uma vez que esse tipo de bebida é produzido com o intuito de repor eletrólitos, carboidratos e outros nutrientes perdidos através da transpiração pelos seus consumidores, após a prática de atividades esportivas, facilitando assim a reidratação (METTLER, RUSCH & COLOMBANI, 2006). Uma bebida isotônica deve possuir a mesma pressão osmótica que o sangue humano, o que permite que a bebida seja rapidamente absorvida após o consumo.

Arelado ao consumo por praticantes de atividade física, está um público cada vez mais preocupado com a saúde, o que reflete às bebidas isotônicas um crescente aumento em consumo, além da tendência de aumento da diversificação de sabores e tipos de bebidas

isotônicas. O consumo de bebidas isotônicas atingiu dimensões significativas ao longo das últimas duas décadas, estando constantemente presentes na dieta de diferentes grupos e faixas de consumidores (NAVARRO-PASCUAL-AHUIR *et al.*, 2016). A rápida expansão deste setor está principalmente relacionada a mudanças no estilo de vida dos consumidores.

Tradicionalmente, na coloração dos diferentes sabores de bebidas isotônicas têm sido utilizados corantes sintéticos. Esses aditivos proporcionam uma ampla gama de cores, tornando os produtos mais atrativos aos consumidores. No entanto, alguns corantes sintéticos apresentam potencial risco à saúde humana, principalmente quando consumidos em excesso (MINIOTI, SAKELLARIOU & THOMAIDIS, 2007). Deste modo a pesquisa e utilização de compostos naturais para a formulação desses produtos aponta uma tendência, pois além de responder ao forte apelo dos consumidores por produtos naturais, pode agregar valor nutricional ao produto.

A fabricação de bebidas isotônicas é, basicamente, uma questão de mistura de ingredientes. O sabor básico dos eletrólitos presentes na bebida é pouco agradável e a adição de flavorizantes é uma prática usual, assim como a adição de corantes. Existem alguns estudos sobre a incorporação de produtos naturais em bebidas isotônicas (GIRONES-VILAPLANA *et al.*, 2013) e desenvolvimento de patente também (HUTT & VERSTRATE, 2004). Uma outra denominação que abrange um número maior de bebidas, não apenas isotônicas, mas ainda dentro do mesmo segmento são os caracterizados como *soft drinks*. Segundo Azeredo *et al.*, 2016 *soft drinks* podem ser definidos como bebidas adicionadas de açúcares ou edulcorantes, corantes, conservantes, aromatizantes e acidulantes, podendo passar pelo processo de carbonatação ou não. Geralmente os *soft drinks* são produtos que apresentam pH ácido, consequência da adição de acidulantes e conservantes.

### **2.2.1. Principais corantes utilizados em isotônicos comercializados no Brasil**

Alguns dos corantes sintéticos utilizados nas principais bebidas isotônicas hoje comercialmente estão descritos na tabela 2. Em muitos rótulos desses produtos é possível observar a combinação de dois ou mais corantes sintéticos para encontrar a cor desejada pelas indústrias, sendo o amarelo crepúsculo e o azul brilhante os corantes utilizados com mais frequência (Tabela 2).

**Tabela 2:** Levantamento dos principais corantes sintéticos utilizados em isotônicos comercializados no Brasil realizado 17/08/2021.

<b>Corante</b>	<b>Produto</b>	<b>Cor associada</b>	<b>Marca</b>	<b>Referência</b>
Vermelho 40 e amarelo crepúsculo	Isotônico sabor morango-maracujá	Coral	Gatorade	<a href="https://www.ambev.com.br/marcas/isotonicos/gatorade/gatorade-morango-maracuja/">https://www.ambev.com.br/marcas/isotonicos/gatorade/gatorade-morango-maracuja/</a>
Amaranto, amarelo crepúsculo e azul brilhante	Isotônico sabor uva	Roxo	Gatorade	<a href="https://www.ambev.com.br/marcas/isotonicos/gatorade/gatorade-uva/">https://www.ambev.com.br/marcas/isotonicos/gatorade/gatorade-uva/</a>
Tartrazina e amarelo crepúsculo	Isotônico sabor laranja	Laranja	Gatorade	<a href="https://www.ambev.com.br/marcas/isotonicos/gatorade/gatorade-laranja/">https://www.ambev.com.br/marcas/isotonicos/gatorade/gatorade-laranja/</a>
Amaranto, amarelo crepúsculo e azul brilhante	Isotônico sabor maracujá	Amarelo	Gatorade	<a href="https://www.ambev.com.br/marcas/isotonicos/gatorade/gatorade-maracuja/">https://www.ambev.com.br/marcas/isotonicos/gatorade/gatorade-maracuja/</a>
Amarelo crepúsculo	Isotônico sabor tangerina	Laranja	Gatorade	<a href="https://www.ambev.com.br/marcas/isotonicos/gatorade/gatorade-tangerina/">https://www.ambev.com.br/marcas/isotonicos/gatorade/gatorade-tangerina/</a>
Azul brilhante	Isotônico blast mix frutas	Azul	Powerade	<a href="https://cocacola.com.br/producto/pawerade/">https://cocacola.com.br/producto/pawerade/</a>

Vermelho 40 e azul brilhante	Isotônico sabor uva	Roxo	Powerade	<a href="https://cocacolafemsa.com/pt-br/producto/pawerade/">https://coca- colafemsa.com/pt- br/producto/pawera de/</a>
------------------------------------	---------------------	------	----------	---

**Fonte:** A própria autora

Nesse contexto, é de importante relevância a busca e pesquisa por ingredientes e processamentos que atendam às expectativas dos consumidores, que buscam produtos com redução de componentes sintéticos em sua formulação e que atendam também aos critérios de qualidade sensoriais. Tradicionalmente, os diferentes sabores de bebidas isotônicas têm sido preparados utilizando-se corantes sintéticos, como mostra a tabela 2, o que evidencia a importância da pesquisa e utilização de compostos naturais, como as antocianinas, para a substituição dos corantes sintéticos na formulação desses produtos, que são uma importante fonte de hidratação e são selecionados pelo consumidor com base em seu sabor agradável, aparência e praticidade de uso (DE ROSSO & MERCADANTE, 2007).

### 2.3. Uso de antocianinas na coloração de bebidas soft drinks

Dentre os pigmentos naturais mais estudados na atualidade destacam-se as antocianinas, metabólitos secundários pertencentes ao grupo dos flavonóides, compostos fenólicos largamente distribuídos na natureza. As antocianinas são estruturalmente caracterizadas pela presença do íon flavílico, conformação contendo 15 átomos de carbono na forma -C6-C3-C6- (SHAHIDI & NACZK, 2003), formada por uma aglicona (antocianidina), complementada por uma ou mais unidades de açúcar e em muitos casos por grupos ácidos (THUY *et al.*, 2021).

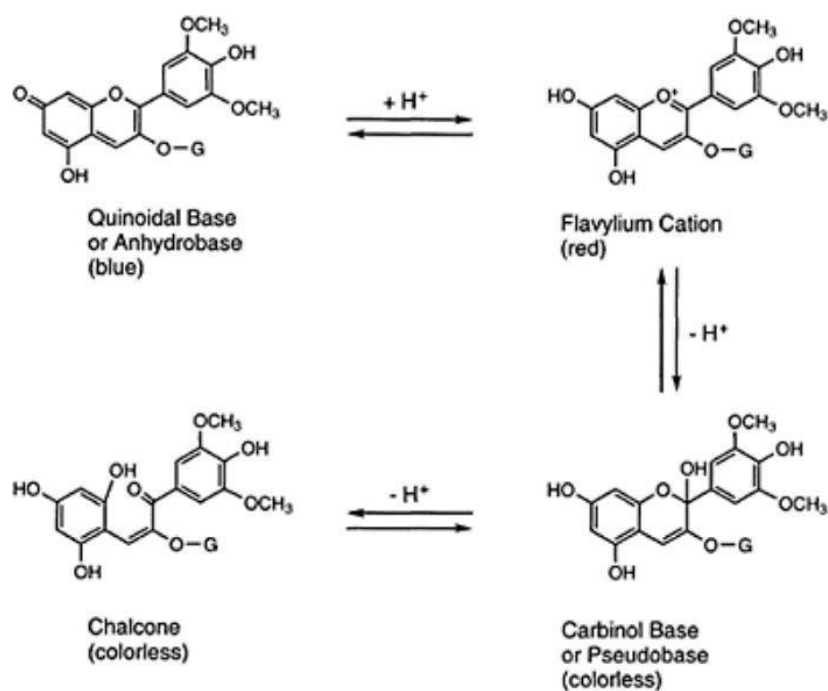
Uma das diferenças entre as antocianinas existentes está no número de grupos hidroxílicos na molécula, na natureza e no número de açúcares ligados à molécula e na posição dessas ligações, que conferem maior solubilidade e estabilidade a estes pigmentos (TANG & GIUSTI, 2018; SUN *et al.*, 2018; SHEN *et al.*, 2018). Ao contrário dos outros flavonóides, as antocianinas possuem regiões cromóforas que apresentam grande absorção na região visível do espectro, conferindo uma infinidade de cores que imprimem tonalidades que vão do vermelho ao violáceo e azul. O interesse nas antocianinas tem aumentado significativamente devido a suas cores atrativas, solubilidade em água e efeitos benéficos à saúde (CHEN *et al.*, 2018; SUN *et al.*, 2018). As frutas e vegetais que apresentam a coloração vermelha/azul são as mais importantes fontes de compostos fenólicos em dietas alimentares e muitos destes compostos

apresentam uma grande gama de efeitos biológicos, incluindo ações antimicrobiana, anti-inflamatória, vasodilatadora e antioxidantes (ACOSTA-ESTRADA, GUTIÉRREZ-URIBE & SERNA-SALDÍVAR, 2014).

Os antioxidantes são compostos que podem retardar a propagação em cadeia das reações de oxidação. A capacidade antioxidante de compostos fenólicos é principalmente devida a sua atuação como redutores, cedendo elétrons, os quais podem desempenhar um importante papel na neutralização de radicais livres (ZHENG & WANG, 2001). Diversos estudos têm demonstrado que o consumo regular de substâncias antioxidantes na dieta pode produzir uma ação protetora efetiva contra os processos oxidativos que naturalmente ocorrem no organismo (NARAYAN *et al.*, 1999; LI *et al.*, 2015; SHAHIDI & AMBIGAIPALAN, 2015; ESPÍN, GONZÁLEZ-SARRÍAS & TOMÁS-BARBERÁN, 2017; SHAHIDI & CHANDRASEKARA, 2017).

A principal desvantagem das antocianinas frente aos corantes sintéticos deve-se à facilidade na mudança na coloração decorrente de reações químicas, pois as antocianinas possuem grupos cromóforos que são bastante sensíveis às alterações de pH do meio. Devido à alta reatividade, as antocianinas facilmente se degradam, ocasionando a formação de compostos incolores ou de coloração marrom e produtos insolúveis (LOPES, 2002).

O isolamento da maioria das antocianinas tem mostrado que estas seguem um padrão geral de transformações estruturais em solução aquosa, em função do pH, o qual é apresentado na Figura 1.



**Figura 1:** Transformações estruturais em solução aquosa em função do pH.

**Fonte:** ARENAS, 2012.

A presença de um ou mais grupos acila na molécula de antocianina inibe a hidrólise do cátion *flavilium* (vermelho) e forma a base carbitol (incolor), permitindo a formação preferencial da base quinoidal (azul), resultando em pigmentos menos sensíveis às mudanças de pH (BRIDLE & TIMBERLAKE, 1997).

A copigmentação intermolecular entre antocianinas, juntamente com outros compostos, produz um aumento na intensidade da cor e um deslocamento no comprimento máximo de absorção, as antocianinas presentes em pétalas de flores estão sempre acompanhadas de flavonas incolores, que se apresentam como copigmentos, sendo essenciais para a expressão da cor e fornecendo estabilidade à antocianina (MARTYNENKO & CHEN, 2016).

Nesse contexto destaca-se o feijão borboleta (*Clitoria ternatea* L.) uma espécie de planta pertencente à família *Fabaceae*, leguminosa de raízes profundas, originária da Ásia tropical. Uma planta perene que apresenta flores de tons azuis a roxeados devido a concentração de antocianinas contida nas pétalas, sendo a delfinidina a principal antocianina responsável por esses tons característico dessa flor (CAMPBELL, PEARSON & MARBLE, 2019). TERAHARA *et al.* (1998) isolaram oito antocianinas em extrato de pétalas de feijão borboleta, sendo as ternatinas C1, C2, C3, C4, C5, D3 e preternatinas A3 e C4. Em recente estudo THUY *et al.* (2021) identificou cinco antocianinas no extrato da flor de feijão borboleta, sendo determinado que a cianidina-3-(*p*-coumaroil-glucosídeo) apresentou maior predominância com base em sua intensidade.

#### **2.4. Estabilidade das antocianinas em sistema-modelo de soft drinks e aquosos**

O crescente interesse na busca e pesquisa de corantes naturais para aplicação em alimentos é também decorrente da sensibilidade às condições de processamento e armazenamento que os corantes naturais apresentam. Normalmente, as antocianinas são ligadas a açúcares, o que proporciona maior estabilidade e solubilidade em água para a molécula (PASCUAL-TERESA, MORENO & GARCÍA-VIGUERA, 2010).

Na Tabela 3 estão apresentados alguns dos principais estudos sobre a estabilidade de antocianinas em sistema-modelo de *soft drinks* e aquosos.

**Tabela 3:** Estabilidade de antocianinas em sistemas-modelo de soft drinks e aquosos.

<b>Sistema modelo</b>	<b>Fonte antocianina</b>	<b>Condições</b>	<b>pH</b>	<b>Parâmetros cinéticos de degradação</b>	<b>Resultados principais</b>	<b>Referência</b>
Refrigerante isotônico	Açaí e acerola	Exposição à luz (850 lx) e ausência de luz	2,50	Cinética de degradação e $t_{1/2}$	Antocianina de acerola foi 82 vezes menos estável em comparação com a de açaí	De Rosso & Mercadante (2007)
Bebida isotônica	Andes berry	Adição de maltodextrina	2,60	Cinética de degradação e $t_{1/2}$	A adição de maltodextrina não apresentou atuação significativa na estabilidade da antocianina na amostra	Estupiñan, Schwartz & Garzón (2011)
<i>Soft drink</i>	Amora andina, açaí e cenoura preta	Efeito da temperatura (4, 20, 30 e 50 °C) no armazenamento (60 dias)	3,00	Cinética de degradação e $E_a$	As amostras de <i>soft drink</i> com antocianinas de cenoura preta apresentaram, em todas as temperaturas, maior estabilidade	Zozio, Pallet & Dornier (2011)

Bebida de açaí	Açaí	Tratamento térmico e armazenamento	-	Cinética de degradação, $t_{1/2}$ , $E_a$ e $Q_{10}$	As amostras da bebida armazenadas a 40 °C apresentaram uma degradação 15 vezes maior do que as amostras armazenadas a 0 °C	Albarici & Pessoa (2012)
Bebida	Jamelão	Copigmentadas com ácido sinápico, ácido caféico, ácido ferúlico e extrato polifenólico de alecrim e expostas à lux (4000 lux) e temperatura	3,00	Cinética de degradação e $t_{1/2}$	Antocianinas sem copigmentação apresentaram maior estabilidade no sistema-modelo de bebida	Sari <i>et al.</i> (2012)
Bebida isotônica	Bagas liofilizadas de maqui berry e açaí e spinheiro-negro.	Adição de suco de limão verna e ácido cítrico	2,35 a 2,88	-	Amostras com adição de limão apresentaram menor concentração de antocianinas durante armazenamento	Girones-Vilaplana <i>et al.</i> (2013)



Extratos concentrados de suco de muscadine	Muscadine ( <i>Vitis rotundifolia</i> )	Efeito da separação e purificação das antocianinas utilizando resina macroporosa	-	-	Os extratos concentrados apresentaram valores de antocianinas totais e fenólicos totais 38 e 42 vezes maiores, respectivamente, em comparação com o extrato sem tratamento com resina	Sandhu & Gu (2013)
Bebida isotônica e bebida aloe vera	Berinjela	Temperatura de refrigeração (4 °C) e ambiente (25 °C), extrato antociânico com microcápsula e sem microcápsula	-	-	Amostras com extrato sem microcapsulação apresentaram alteração de cor	Arrazola, Herazo & Alvis (2014)
Bebida	Cenoura roxa	Adição de goma arábica	3,00	Cinética de degradação e $t_{1/2}$	Adição de goma arábica favoreceu a estabilidades das antocianinas de	Chung <i>et al.</i> (2016)

					cenoura na amostra	
Soluções aquosas	Arroz negro	Tratamento térmico	-	-	Amostras com tratamento térmico apresentaram maior degradação da cor	Sui, Bary & Zhou (2016)
Água comercial carbonatada	Casca de uva Cabernet Sauvignon	Exposição à luz e ausência de luz	4,70 a 4,80	Cinética de degradação e $t_{1/2}$	Amostras submetidas à luz apresentaram maior degradação das antocianinas	Montibeller <i>et al.</i> (2018)
Sistema-modelo de bebida láctea	Juçara ( <i>Euterpe edulis</i> )	Microencapsluamento da antocianina de Juçara	3,86 a 4,29	-	O teor de antocianinas se manteve instável no período de 28 dias de armazenamento, em todas as amostras. Entretanto, as amostras acondicionadas em embalagens opacas apresentaram capacidade	Lima <i>et al.</i> (2019)

					antioxidade maior em comparação as amostras acondicionadas em embalagens transparentes.	
Extratos aquosos	<i>Clitoria Ternatea</i>	Exposição à luz, tratamento térmico e adição de FOS	3,60 e 5,40	Cinética de degradação, $t_{1/2}$ e $E_a$	Com o aumento da temperatura e exposição à luz, as amostras apresentaram maior valor de $k$ e redução do $t_{1/2}$ . Os valores de $E_a$ sugerem que em pH 3,6 as antocianinas apresentam estabilidade relativamente maior quando comparada aos extratos em pH 5,4	Escher <i>et al.</i> (2020)
Sistema-modelo de bebida contendo ácido áscórbico	Arroz negro	Adição de goma xantana, processamento térmico e exposição à luz	3,00	Cinética de degradação, $t_{1/2}$	A adição de goma xantana favoreceu a estabilidade das antocianinas de arroz	Zhao <i>et al.</i> (2020)

					negro nas amostras.	
<i>Soft drink</i>	Batata doce de polpa roxa e vermelha	Pasteurização	-	-	As antocianinas de batata doce de polpa roxa e vermelha apresentaram a mesma estabilidade quando comparadas ao corante comercial E163.	Sampaio <i>et al.</i> (2021)

De Rosso & Mercadante (2007) verificam que a adição de açúcares e sais teve um efeito negativo sobre a estabilidade das antocianinas de açaí e de acerola em sistemas modelo de refrigerante isotônico. A incidência de luz teve um efeito nocivo na estabilidade das antocianinas, no entanto, este efeito não foi estatisticamente significativo com a acerola ( $p > 0,05$ ). A estabilidade da antocianina de acerola foi 82 vezes menor que a do açaí, no sistema modelo de refrigerante isotônico, em ausência de luz. O  $t_{1/2}$  foi menor para as amostras submetidas a exposição à luz, em todos os sistemas modelo a degradação das antocianinas, tanto de acerola como de açaí, seguiu uma cinética de primeira ordem. A grande diferença de estabilidade de ambas as fontes de antocianina deve-se muito ao alto conteúdo de ácido ascórbico no extrato de acerola (1921 mg / 100 g), uma vez que não foi detectado ácido ascórbico no açaí.

Estupiñan, Schwartz & Garzón (2011) verificaram a coloração e a estabilidade das antocianinas oriundas de Andes berry na adição em sistema modelo de bebida isotônica, preparando ensaios com pó liofilizado de Andes berry, pó liofilizado de Andes berry com maltodextrina e vermelho nr 40 com e sem adição de maltodextrina. Após 70 dias os sistemas modelo de bebida isotônica com Andes berry e adição de maltodextrina, na ausência de luz, não apresentaram diferença de cor estatisticamente significativo ( $p > 0,05$ ) quando comparado ao sistema modelo utilizando vermelho nr 40 na presença de luz. Os autores também verificaram que a adição de maltodextrina aumentou a estabilidade dos fenólicos no período de armazenamento. A degradação das antocianinas oriundas de Andes berry seguiu o modelo cinético de primeira ordem, a maior estabilidade em  $t_{1/2}$  foi verificada para amostra adicionada de maltodextrina e armazenada sob ausência de luz (32 dias) e o menor  $t_{1/2}$  foi apresentado na amostra sem adição de maltodextrina e sob incidência de luz (11 dias).

Zozio, Pallet & Dornier (2011) monitoraram a degradação de antocianinas oriundas de amora andina, açaí e cenoura preta em *soft drinks* e acondicionaram as amostras em câmaras termostáticas submetidas a 4 °C, definida como temperatura controle, 20, 30 e 50 °C. A degradação das antocianinas no estudo seguiu uma cinética de primeira ordem, sendo que na temperatura controle de estocagem (4 °C) nenhuma amostra apresentou degradação das antocianinas. As taxas de velocidade de degradação ( $k$ ) apresentaram valores mais baixos, em todas as temperaturas, para as bebidas contendo antocianina de cenoura preta, o que evidencia uma maior estabilidade dessas antocianinas frente às outras bebidas com açaí

e amora andina. A  $E_a$  variou entre entorno de  $63 \text{ kJ.mol}^{-1}$ , para amostras contendo açaí e cenoura preta e  $91 \text{ kJ.mol}^{-1}$  para amostras contendo amora andina, os autores justificam uma melhor estabilidade dessas antocianinas em comparação com estudo anteriores devido a utilização de resinas de adsorção para purificação dos extratos, que possivelmente reduziu os solutos não fenólicos que podem auxiliar a degradação.

Albaraci & Pessoa (2012) estudaram a estabilidade das antocianinas de açaí, pasteurizados e sem passarem pelo processo de pauperização, adicionados a uma bebida de açaí, submetidos a três temperaturas diferentes no período de armazenamento. O  $t_{1/2}$  das amostras submetidas à pasteurização foi de 372,70 horas para as bebidas em temperatura  $0^\circ\text{C}$  de estocagem, 42,90 horas para as amostras submetidas a  $20^\circ\text{C}$  em armazenamento e 23,90 horas para as amostras em temperatura de  $40^\circ\text{C}$ , o que evidencia o efeito negativo da temperatura de armazenamento na estabilidade das antocianinas. O estudo apresentou um  $E_a$  de degradação da antocianina na matriz do açaí de  $49,24 \text{ kJ.mol}^{-1}$ , o quociente de temperatura (Q10) para as temperaturas mais altas de armazenamento (entre  $20$  e  $40^\circ\text{C}$ ) foi 2,2 vezes menor que a encontrada entre  $0$  e  $4^\circ\text{C}$ , o que indica a influência da temperatura para o processo. A degradação das antocianinas nas amostras submetidas à pasteurização seguiram uma cinética de degradação de primeira ordem, enquanto que as amostras que não foram submetidas a pasteurização seguiram uma cinética de degradação de segunda ordem, o que evidencia que a pasteurização pode auxiliar na estabilidade das antocianinas, os autores justificam esse fato pela redução de enzimas catalizadoras, que aumentam a taxa de degradação, nas amostras submetidas a pasteurização.

Sari *et al.* (2012) estudaram a estabilidade das antocianinas de jamelão, naturais e copigmentadas com ácido sinápico, ácido caféico, ácido ferúlico e extrato polifenólico de alecrim, em sistema modelo de bebidas com pH 3. As antocianinas naturais de jamelão apresentaram menor intensidade e saturação de cor quando comparadas às copigmentadas, durante a exposição à luz branca fluorescente e o armazenamento à temperatura ambiente e de refrigeração. Entretanto em processo de aquecimento de  $80$  e  $98^\circ\text{C}$  o sistema modelo de bebidas contendo as antocianinas naturais de jamelão apresentaram maior estabilidade à degradação quando comparadas às copigmentadas, apresentando valores de  $t_{1/2}$  maiores. Os autores justificam esse efeito ao fato que o calor pode causar degradação dos complexos de

copigmentação, devido as fracas forças hidrofóbicas na interação de copigmentação intermolecular.

O estudo de Girones-Vilaplana *et al.* (2013) verificou que o teor total de antocianinas apresentou redução no período de armazenamento de 70 dias em todas as amostras testadas, sendo estas reduções mais pronunciadas nas bebidas à base de limão em relação aos controles de ácido cítrico, sendo que as bebidas isotônicas formuladas com maqui berry apresentaram quantidade significativamente ( $p < 0,05$ ) maior do que o restante das amostras. As bebidas isotônicas controle (isotônico com ácido cítrico e isotônico sabor limão) apresentaram significativas alterações nos parâmetros de cor durante o armazenamento. As bebidas formuladas com maqui apresentaram maior intensidade de cor (croma), no entanto, este efeito não foi estatisticamente significativo ( $p > 0,05$ ) quando comparado com as bebidas isotônicas formuladas com espinheiro-negro e açaí.

Sandhu & Gu (2013) avaliaram a influência da purificação e separação de antocianinas no extrato concentrado de suco de muscadine (*Vitis rotundifolia*) utilizando resinas macroporosas. O estudo avaliou as características de adsorção e dessorção das antocianinas em cinco resinas (XAD-7HP, XAD-761, XAD-16N, XAD-1180 e FPX-66), sendo que as resinas FPX-66 e XAD-16N apresentaram as maiores capacidades de adsorção e liberação das antocianinas de muscadine, onde o extrato resinado apresentou altas concentrações de antocianinas livres, sem ligações com açúcares. A concentração de antocianinas totais e fenólicos totais no extrato resinado apresentaram valores 38 e 42 vezes maiores, respectivamente, quando comparado com o extrato sem o processamento com resina.

Arrazola, Herazo & Alvis (2014) estudaram a estabilidade da cor de antocianinas, oriundas de berinjela, em bebida isotônica e bebida aloe vera, em 4 °C e 25 °C e puderam verificar que em todas as amostras de bebidas a intensidade da cor (croma) foi menor quando estocados em temperatura ambiente, mostrando que a temperatura de armazenamento afetou significativamente ( $p < 0,05$ ) este parâmetro. As constantes de velocidade de degradação mostram que há uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) da bebida isotônica adicionada ao extrato microencapsulado de antocianinas nas diferentes temperaturas. Nas bebidas isotônicas com a adição do extrato antociânico sem microencapsulação, ocorreu uma

alteração de cor a partir de vermelho a violeta durante o armazenamento nas diferentes temperaturas.

Chung *et al.* (2016) avaliaram a adição de goma arábica em sistema modelo de bebidas na estabilização das antocianinas oriundas de cenoura roxa. A adição de goma arábica levou a uma maior estabilidade da antocianina de cenoura roxa na presença de ácido ascórbico, com a maior estabilidade medida a 1,50% de goma arábica. O mecanismo envolvido na estabilização da antocianina foi atribuído à interação entre as frações de antocianina e glicoproteína da goma arábica através da ligação de hidrogênio. O estudo verificou que a degradação da antocianina na presença de ácido ascórbico, armazenado a 40 °C e sob luminosidade, seguiu uma reação de primeira ordem e apresentou um  $t_{1/2}$  de 2,20 dias. A adição de goma arábica de 0,05% a 1,50% apresentou um aumento de  $t_{1/2}$  de 2,45 para 5,25 dias, o que indica que a adição da goma arábica, nessa concentração, aumentou a estabilidade das antocianinas.

Sui, Bary & Zhou (2016) verificaram a influência de tratamentos térmicos na estabilidade de antocianinas, oriundas de arroz negro, em soluções aquosas. O estudo relata que as alterações de cor da solução aquosa de antocianina durante o armazenamento ocorrem mais rapidamente com o aumento da temperatura de tratamento térmico, e a uma temperatura de 4 °C apresentando uma excelente estabilidade de cor, tanto para amostras tratadas termicamente quanto para amostras controle. A capacidade antioxidante das soluções aquosas de antocianina se manteve estáveis à temperatura de armazenamento de 4 e 25 °C, entretanto houve redução significativa ( $p < 0,05$ ) na capacidade antioxidante das soluções aquosas de antocianina submetidas a temperaturas mais altas.

Montibeller *et al.* (2018) estudaram a estabilidade das antocianinas oriundas das cascas de uva Cabernet Sauvignon e adicionada, como corante, em água comercial carbonatada. Os autores verificaram que a degradação das antocianinas seguiu uma cinética de degradação de primeira ordem e que as amostras armazenadas no escuro apresentaram  $t_{1/2}$  maior (15,05 dias) quando comparadas com as amostras de água carbonada com exposição à luz (4,47 dias). O estudo também verificou que os valores de pH das amostras de água carbonatada ao longo do armazenamento de 16 dias não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre as diferentes condições de luz.



Lima *et al.* (2019) estudaram a utilização de antocianinas microencapsuladas oriundas de Juçara (*Euterpe edulis*) em sistema-modelo de bebidas lácteas fermentadas e não fermentadas, acondicionadas em embalagens opacas e transparentes. Foi avaliado a estabilidade das antocianinas em 28 dias, armazenadas a  $10 \pm 2$  °C, e os autores verificaram que o tempo de armazenamento não influenciou na redução do teor de antocianinas em todas as amostras da bebida láctea, assim como a fermentação também não alterou a coloração ( $p < 0,05$ ). Embora a incidência de luz seja um fator que contribui para degradação das antocianinas, os autores puderam verificar que a microencapsulação conseguiu manter a estabilidade do pigmento, independente da embalagem de acondicionamento. No entanto a capacidade antioxidante apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as embalagens, o valor médio após armazenamento para bebida não fermentada e acondicionada em embalagem opaca foi  $565,00 \mu\text{M Trolox g}^{-1}$  enquanto que para o mesmo produto em embalagem transparente foi de  $373,00 \mu\text{M Trolox g}^{-1}$ .

Escher *et al.* (2020) avaliaram a estabilidade térmica dos extratos de antocianinas de feijão borboleta, com presença e ausência de frutooligossacarídeos (FOS), submetidos a temperatura de 60, 70, 80, 90 e 100 °C. Os autores verificaram que os extratos em pH 3,60 e 5,40 apresentaram estabilidade térmica, independente da presença de FOS, nas temperaturas de 60 e 70 °C durante seis horas, entretanto com o aumento da temperatura, todas as amostras apresentaram degradação das antocianinas. As amostras em pH 3,60 contendo 3,50 g FOS/100 mL tiveram uma redução de  $t_{1/2}$  de 31,90 horas a 80 °C para 4,80 horas quando submetidas a temperatura de 100 °C. O mesmo foi verificado na constante de degradação, que seguiu uma cinética de primeira ordem e apresentou valores maiores com o aumento da temperatura. O estudo concluiu que a reação de degradação das antocianinas presentes nos extratos de feijão borboleta foram relativamente menores em pH 3,60 quando comparado ao pH 5,40. Os valores de  $E_a$  em pH 3,60 para os extratos contendo 1,75 g FOS/100mL e 3,50 g FOS/100 mL foram 104,30 e 102,10 kJ / mol, respectivamente, enquanto em pH 5,40 os valores de  $E_a$  foram 99,50 kJ / mol para extratos contendo 1,75 g FOS/100mL e 99,30 kJ / mol para os extratos contendo 3,50 g FOS/100 mL. Além disso, o estudo mostrou que a exposição à luz desencadeou em um aumento na reação de fotodegradação das antocianinas presentes no extrato das pétalas de feijão borboleta e que a presença de FOS proporcionou um efeito protetor a essa degradação nas amostras em pH 5,40.

Zhao *et al.* (2020) estudaram a estabilidade das antocianinas de arroz negro, adicionadas de goma xantana, em um sistema modelo de bebidas contendo ácido ascórbico. As amostras com 0,25% de goma xantana (m/v) apresentaram maior proteção sobre as antocianinas de arroz negro em armazenamento, os resultados mostraram que sob uma intensidade de lux de 400 lx, a amostra controle (com ácido ascórbico e sem goma xantana) apresentou maior degradação de cor em comparação com as amostras contendo ácido ascórbico e adição de goma xantana (XG). Os autores também avaliaram a estabilidade térmica das antocianinas de arroz negro, submetendo as amostras a temperatura de 80, 90 e 100 °C, observando que a degradação das antocianinas seguiu uma cinética de primeira ordem em que  $k$  aumentou e  $t_{1/2}$  reduziu com o aumento da temperatura. Em todas as temperaturas  $k$  foi maior nas amostras controle ( $p > 0,05$ ) quando comparado às amostras XG. Em 80 °C a amostra controle apresentou  $t_{1/2}$  de 5 horas e a amostra XG 6,10 horas, enquanto que em 100 °C as amostras apresentaram  $t_{1/2}$  de 3,30 e 4,40 horas, respectivamente.

Sampaio *et al.* (2021) avaliou a estabilidade das antocianinas extraídas de batata doce de polpa roxa e vermelha para formulação de *soft drink* submetido a pasteurização a 70 °C por vinte minutos, e comparação à formulação de *soft drink* com corante E163 (controle). Os autores verificaram a estabilidade da cor nas formulações de *soft drink* em armazenamento por 30 dias, onde os resultados mostraram que nos sete primeiros dias, as três amostras apresentaram boa estabilidade nos parâmetros de cor avaliados. Ao final dos 30 dias, uma redução significativa nos valores de  $a^*$  (parâmetro de cor verde-vermelho) foi verificada nas três amostras, entretanto o estudo concluiu que a estabilidade das antocianinas de batata doce de polpa roxa e polpa vermelha para formulação de *soft drink* é semelhante ao corante comercial E163.

### 3. CONCLUSÃO

O sucesso no uso e aplicação de corantes naturais reside, além dos métodos e matérias primas selecionadas para extração, na realização de pesquisas e aplicações em diferentes processamentos e matrizes alimentares. Técnicas devem ser exploradas para que a estabilidade dos pigmentos naturais, extraídos das antocianinas e inseridos nos produtos aquosos, possa ser verificada em diversas condições de processamento e armazenamento utilizados atualmente em escala comercial e industrial. Resultando em novas opções para os

consumidores que estão, cada vez mais, buscando por produtos de composição mais natural, com redução de componentes sintéticos e que, além de satisfazer as necessidades nutricionais, auxiliam no bom funcionamento do organismo.

#### 4. REFERÊNCIAS

ABIR. Associação brasileira das indústrias de refrigerantes e de bebidas não alcoólicas. Isotônicos dados. Disponível em: <<https://abir.org.br/o-setor/dados/isotonicos/>>. Acesso em: 17 de jul. de 2021.

ACOSTA-ESTRADA, B. A., GUTIÉRREZ-URIBE, J. A. & SERNA-SALDÍVAR, S. O. Bound phenolics in foods, a review. **Food chemistry**, v. 152, p. 46- 55, 2014.

ALBARICI, T. R. e PESSOA, J. D. C. Effects of heat treatment and storage temperature on the use of açai drink by nutraceutical and beverage industries. **Food Science and Technology**, v. 32, n. 1, p. 9-14, 2012.

ARENAS, Z. & MARIA, A. **Filme biodegradável à base de fécula de mandioca como potencial indicador de mudança de pH**, p. 29, 2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

ARRAZOLA, G., HERAZO, I. & ALVIS, A. Microencapsulación de Antocianinas de Berenjena (*Solanum melongena* L.) mediante secado por aspersion y evaluación de la estabilidad de su color y capacidad antioxidante. **Información tecnológica**, v. 25, n. 3, p. 31-42, 2014.

BARRETTO, F. J. D. F. P., CLEMENTE, H. A., SANTANA, A. L. B. D., & VASCONCELO, M. A. D. S. Avaliação da estabilidade das antocianinas em iogurte elaborado com corante natural obtido da casca de *Solanum melongena* L. encapsulado e não encapsulado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 42, n. 3, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução n.º 44, 1977. Estabelece condições gerais de elaboração, classificação, apresentação, designação, composição e fatores essenciais de qualidade dos corantes empregados na produção de alimentos e bebidas e revoga as Resoluções 20/70 e 8/72. (Ementa elaborada pelo CD/MS). **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 fev. 1978.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n.º 05, de 15 de janeiro de 2007. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 17 jan. 2007.

BRASIL. Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Portaria n.º 540, de 27 de outubro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares – definições, classificação e emprego. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 28 out. 1997.

BRIDLE, P. & TIMBERLAKE, C. F. Anthocyanins as natural food colours – selected aspects. **Food Chemistry**, v.58, p.103-109, 1997.

CAMPBELL, S. M., PEARSON, B. & MARBLE, S. C. Butterfly Pea (*Clitoria ternatea*) Flower Extract (BPFE) and Its Use As a pH-Dependent Natural Colorant. **EDIS**, v. 2019, n. 2, 2019.

CHANDRASEKHAR, J., MADHUSUDHAN, M. C., & RAGHAVARAO, K. S. M. S. Extraction of anthocyanins from red cabbage and purification using adsorption. **Food and bioproducts processing**, v. 90, n. 4, p. 615-623, 2012.

CHEN, Y., HUNG, Y. C., CHEN, M., LIN, M. & LIN, H. Enhanced storability of blueberries by acidic electrolyzed oxidizing water application may mediated by regulating ROS metabolism. **Food Chemistry**, v. 270, p. 229-235, 2018.

CHUNG, C., ROJANASASITHARA, T., MUTILANGI, W. & MCCLEMENTS, D. J. Enhancement of colour stability of anthocyanins in model beverages by gum arabic addition. **Food chemistry**, v. 201, p. 14-22. 2016.

CONSTANT, P. B. L., STRINGHETA, P. C. & SANDI, D. Corantes alimentícios. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 20, n. 2, 2002.

DE ROSSO, V. V. & MERCADANTE, A. Z. Evaluation of colour and stability of anthocyanins from tropical fruits in an isotonic soft drink system. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 8(3), 347-352, 2007.

DUFOSSÉ, L. Microbial production of food grade pigments. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, p. 313-323, 2006.

ESCHER, G. B., WEN, M., ZHANG, L., ROSSO, N. D., & GRANATO, D. Phenolic composition by UHPLC-Q-TOF-MS/MS and stability of anthocyanins from *Clitoria ternatea* L.(butterfly pea) blue petals. **Food chemistry**, v. 331, p. 127341, 2020.

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

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

GIRONES-VILAPLANA, A., VILLANO, D., MORENO, D. A. & GARCÍA-VIGUERA, C. New isotonic drinks with antioxidant and biological capacities from berries (maqui, açai and blackthorn) and lemon juice. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 64, p. 897-906, 2013.

HERRERO, M., CIFUENTES, A. I. & IBAÑEZ, E. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. **Food chemistry**, v. 98, p. 136-148, 2006.

HUTT, L. & VERSTRATE, J. **Isotonic juice drink for children**. U.S. Patent n. 6,730,337, 4 maio 2004.

LI, Z., SUMMANEN, P. H., KOMORIYA, T., HENNING, S. M., LEE, R. P., CARLSON, E., HEBER, D. & FINEGOLD, S. M. Pomegranate ellagitannins stimulate growth of gut bacteria in vitro: Implications for prebiotic and metabolic effects. **Anaerobe**, v. 34, p. 164-168, 2015.

LIMA, E. M. F., MADALÃO, M. C. M., DOS SANTOS, W. C., BERNARDES, P. C., SARAIVA, S. H. & SILVA, P. I. Spray-dried microcapsules of anthocyanin-rich extracts from *Euterpe edulis* M. as an alternative for maintaining color and bioactive compounds in dairy beverages. **Journal of food science and technology**, v. 56, n. 9, p. 4147-4157, 2019.

LOPES, T. J. **Adsorção de antocianinas do repolho roxo em argilas**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 121 f., 2002.

MARTINS, N., RORIZ, C. L., MORALES, P., BARROS, L. & FERREIRA, I. C. Food colorants: Challenges, opportunities and current desires of agro-industries to ensure consumer expectations and regulatory practices. **Trends in Food Science & Technology**, v. 52, p. 1-15, 2016.

MARTYNENKO, A. & CHEN, Y. Degradation kinetics of total anthocyanins and formation of polymeric color in blueberry hydrothermodynamic (HTD) processing. **Journal of Food Engineering**, v.171, p.44-51, 2016.

METTLER, S., RUSCH, C. & COLOMBANI, P. C. Osmolality and pH of sport and other drinks available in Switzerland. **Schweizerische Zeitschrift für Sportmedizin und Sporttraumatologie**, v. 54, p. 92–95, 2006.

MINIOTI, K. S., SAKELLARIOU, C. F. & THOMAIDIS, N. S. Determination of 13 synthetic food colorants in water-soluble foods by reversed-phase high- performance liquid chromatography coupled with diode-array detector. **Analytica Chimica Acta**, v. 583, p. 103-110, 2007.

MONTIBELLER, M. J., DE LIMA MONTEIRO, P., TUPUNA-YEROVI, D. S., RIOS, A. D. O. & MANFROI, V. Stability assessment of anthocyanins obtained from skin grape applied in kefir and carbonated water as a natural colorant. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 42, n. 8, p. e13698, 2018.

NARAYAN, M. S., NAIDU, K. A., RAVISHANKAR, G. A., SRINIVAS, L. & VENKATARAMAN, L. V. Antioxidant effect of anthocyanin on enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)**, v. 60, p. 1-4, 1999.

NAVARRO-PASCUAL-AHUIR, M., LERMA-GARCÍA, M. J., SIMÓ-ALFONSO, E. F. & HERRERO-MARTÍNEZ, J. M. Determination of water-soluble vitamins in energy and sport drinks by micellar electrokinetic capillary chromatography. **Food Control**, v. 63, p. 110-116, 2016.

OLEGARIO, L. S. & DOS SANTOS, J. A. B. Prospecção tecnológica sobre o corante natural de urucum (*Bixa orellana* L.). **Cadernos de Prospecção**, v. 7, n. 4, p. 601, 2014.

PASCUAL-TERESA, D., MORENO, D. A. & GARCÍA-VIGUERA, C. Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: a review of current evidence. **International journal of molecular sciences**, v. 11, n. 4, p. 1679-1703, 2010.

ROCHA, D. S. & REED, E. Pigmentos Naturais em Alimentos e sua Importância para a Saúde. **Estudos**, v. 41, p. 76-85, 2014.

SAMPAIO, S. L., LONCHAMP, J., DIAS, M. I., LIDDLE, C., PETROPOULOS, S. A., GLAMOČLIJA, J., ... & BARROS, L. Anthocyanin-rich extracts from purple and red

potatoes as natural colourants: Bioactive properties, application in a soft drink formulation and sensory analysis. **Food Chemistry**, v. 342, p. 128526, 2021.

SANDHU, A. K. & GU, L. Adsorption/desorption characteristics and separation of anthocyanins from muscadine (*Vitis rotundifolia*) juice pomace by use of macroporous adsorbent resins. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 7, p. 1441-1448, 2013.

SANTOS, M. S. V., SANTOS, D. E. L., DA SILVEIRA MOREIRA, J. D. J., DA SILVA FLORÊNCIO, M. N. & DE OLIVEIRA JUNIOR, A. M. Prospecção tecnológica em bases de patentes com foco em corantes e pigmentos alimentícios obtidos de fontes naturais. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 3, p. e53810313603-e53810313603, 2021.

SARI, P., WIJAYA, C. H., SAJUTHI, D. & SUPRATMAN, U. Colour properties, stability, and free radical scavenging activity of jambolan (*syzygium cumini*) fruit anthocyanins in a beverage model system: Natural and copigmented anthocyanins. **Food Chemistry**, v.132, p.1908-1914, 2012.

SHAHIDI, F. & NACZK, M. **Phenolics in food and nutraceuticals**. CRC press, 2003.

SHAHIDI, F. & AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. **Journal of functional foods**, v. 18, p. 820-897, 2015.

SHAHIDI, F. & CHANDRASEKARA, A. Interaction of phenolics and their association with dietary fiber. **Dietary Fiber Functionality in Food and Nutraceuticals: From Plant to Gut**, p. 21-44, 2017.

SHEN, J., ZOU, Z., ZHANG, X., ZHOU, L., WANG, Y., FANG, W. & ZHU, X. Metabolic analyses reveal different mechanisms of leaf color change in two purple-leaf tea plant (*Camellia sinensis* L.) cultivars. **Horticulture research**, v. 5, p.7, 2018.

SIGURDSON, G. T., TANG, P. & GIUSTI, M. M. Natural colorants: Food colorants from natural sources. *Annual review of food science and technology*, v. 8, p. 261-280, 2017.

SUI, X., BARY, S. & ZHOU, W. Changes in the color, chemical stability and antioxidant capacity of thermally treated anthocyanin aqueous solution over storage. **Food chemistry**, v. 192, p. 516-524, 2016.

SUN, X. H., ZHOU, T. T., WEI, C. H., LAN, W. Q., ZHAO, Y., PAN, Y. J. & WU, V. C. Antibacterial effect and mechanism of anthocyanin rich Chinese wild blueberry extract on various foodborne pathogens. **Food Control**, v. 94, p. 155-161, 2018.

TANG, P. & GIUSTI, M. M. Black Goji as a Potential Source of Natural Color in a Wide pH Range. **Food Chemistry**, v. 269, p. 419-426, 2018.

TERAHARA, N., TOKI, K., SAITO, N., HONDA, T., MATSUI, T. & OSAJIMA, Y. Eight New Anthocyanins, Ternatins C1– C5 and D3 and Preternatins A3 and C4 from Young *Clitoria ternatea* Flowers. **Journal of natural products**, v. 61, n. 11, p. 1361-1367, 1998.

THUY, N. M., MINH, V. Q., BEN, T. C., THI NGUYEN, M. T., HA, H. T. N. & TAI, N. V. Identification of Anthocyanin Compounds in Butterfly Pea Flowers (*Clitoria ternatea* L.) by Ultra Performance Liquid Chromatography/Ultraviolet Coupled to Mass Spectrometry. **Molecules**, v. 26, n. 15, p. 4539, 2021.

ZHAO, L., PAN, F., MEHMOOD, A., ZHANG, Y., HAO, S., REHMAN, A. U., ... & WANG, Y. Protective effect and mechanism of action of xanthan gum on the color stability of black rice anthocyanins in model beverage systems. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 3800-3807, 2020.

ZHAO, S., MA, X., ZHENG, X., BAILEY, J., CHEN, J. & JIANG, Y. G. Clean-label backdoor attacks on video recognition models. **In Proceedings of the IEEE/CVF Conference on Computer Vision and Pattern Recognition**, pp. 14443-14452, 2020.

ZHENG, W. & WANG, S.Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **J. Agric. Food Chemistry**. Chicago: v. 49, p. 5165-5170, 2001.

ZOZIO, S., PALLET, D. & DORNIER, M. Evaluation of anthocyanin stability during storage of a coloured drink made from extracts of the Andean blackberry (*Rubus glaucus* Benth.), açai (*Euterpe oleracea* Mart.) and black carrot (*Daucus carota* L.). **Fruits**, v. 66, n. 3, p. 203-215, 2011.



## **CAPÍTULO II**

### **TECNOLOGIAS PARA EXTRAÇÃO DE ANTOCIANINAS POR ADSORÇÃO EM RESINAS DESCRITAS EM PATENTES: DIAGNÓSTICO SOBRE AS ÁREAS RELEVANTES E TENDÊNCIAS**

R.O. Santos<sup>1,2</sup>, F.F. Barros<sup>2</sup>, J. Vicente<sup>1</sup>, M.I.M.J. Barbosa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), 23890-000, Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil.

<sup>2</sup>Divisão de Patentes de Tecnologia de Embalagem, Instituto Nacional de Propriedade Industrial, Rio de Janeiro, Brasil.

**Manuscrito em preparação para ser enviado para revista Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture (Qualis A2 - Ciência de alimentos/Capes).**

## RESUMO

Esse trabalho tem como objetivo a realização de uma prospecção tecnológica para avaliar e entender a trajetória das tecnologias de extração e produção de corantes oriundos de antocianinas, além do papel das patentes nesse contexto tecnológico. Nesse estudo foram utilizados termos de buscas combinados com classificação as internacionais de patentes (CIP) para obtenção de resultados mais assertivos e objetivos, em que foi possível verificar um grande desenvolvimento dessas técnicas devido ao grande número de patentes depositadas. Foram encontradas 755 famílias de patentes por CIP relacionada, após estruturação da estratégia de busca, sendo a China o país com maior relevância nos pedidos depositados, o que indica que é o país com maior destaque em pesquisa e desenvolvimento na área. No Brasil, 4 dessas patentes foram depositadas e concedidas, todas possuindo uma empresa privada como depositante. Considerando o período aplicado, a CIP C07D 311/62 apresentou 401 famílias depositadas, e seu avanço em número de depósitos começa a ser mais expressivo no ano de 2004 com 15 famílias depositadas e chega em 2018 com 75 depósitos, o maior volume de depósito do período avaliado. No geral o interesse da pesquisa pelas empresas e universidades ainda é crescente, visto que a maior concentração de publicação dos pedidos ocorreu nos últimos anos, tendo como maior destaque o setor de alimentos, fármacos e químico.

**Palavras-chaves:** Patente, classificação as internacionais de patentes, corante, antocianina, prospecção tecnológica

## ABSTRACT

This work aims to carry out a technological prospection to evaluate and understand the trajectory of technologies for extraction and production of dyes from anthocyanins, in addition to the role of patents in this technological context. In this study, search terms combined with international patent classification (IPC) were used to obtain more assertive and objective results, in which it was possible to verify a great development of these techniques due to the large number of patents filed. A total of 755 patent families were found by related IPC, after structuring the search strategy, with China being the country with the greatest relevance in the applications filed, which indicates that it is the country with the greatest emphasis in research and development in the area. In Brazil, 4 of these patents have been filed and granted, all of which have a private company as applicant. Considering the period applied, IPC C07D 311/62 had 401 deposited families, and its advance in the number of deposits begins to be more expressive in 2004 with 15 deposited families and arrives in 2018 with 75 deposits, the largest deposit volume in the period evaluated. In general, the interest in research by companies and universities is still growing, as the highest concentration of publication of orders has occurred in recent years, with the food, pharmaceutical and chemical sector being the main focus.

**Keywords:** Patent, international patent classification, dye, anthocyanin, technological prospecting

## 1. INTRODUÇÃO

Dentre os pigmentos naturais mais estudados atualmente encontram-se as antocianinas, metabólitos secundários pertencentes ao grupo dos flavonóides. Esses compostos fenólicos são largamente distribuídos na natureza. O interesse nas antocianinas tem aumentado significativamente devido a suas cores atrativas, solubilidade em água e alegados benefícios à saúde (CHEN *et al.*, 2018; SUN *et al.*, 2018).

Os antioxidantes são compostos que podem retardar a propagação em cadeia das reações de oxidação. A atividade antioxidante de compostos fenólicos é decorrente em grande escala de sua atuação como redutores, cedendo elétrons, os quais podem desempenhar um importante papel na estabilização e consequente neutralização de radicais livres (ZHENG & WANG, 2001). Diversos estudos têm demonstrado que o consumo regular de substâncias antioxidantes pode produzir uma ação protetora efetiva contra os processos oxidativos que naturalmente ocorrem no organismo humano (LI *et al.*, 2018; SHAHIDI & AMBIGAIPALAN, 2015; ESPÍN, GONZÁLEZ-SARRÍAS & TOMÁS-BARBERÁN, 2017; SHAHIDI & CHANDRASEKARA, 2017). Dentre os benefícios à saúde decorrente dessa atividade biológica destacam-se propriedades anti-inflamatórias, proteção contra alguns tipos de câncer e doenças cardiovasculares, ações antimicrobiana, anti-inflamatória e vasodilatadora (ACOSTA-ESTRADA, GUTIÉRREZ-URIBE & SERNA-SALDÍVAR, 2014).

Nas últimas décadas, tanto do ponto de vista comercial quanto do acadêmico destacaram-se investimentos na pesquisa e desenvolvimento em recuperação de polifenóis, incluindo antocianinas oriundas de vegetais (TAO *et al.*, 2020). Essa purificação tem sido feita por meio de diversos processos, contudo a utilização de resinas macroporosas vem apresentando destaque dentre os processos mais utilizados e estudados para a separação e purificação de compostos fenólicos em vegetais, uma vez que os métodos de separação disponíveis na atualidade são caros, demorados e adequados apenas para a produção em pequena escala (YANG, ZHAO & LIN, 2016). Além disso, métodos como extração em água e extração em etanol assistida por ultra-som, que são métodos tradicionalmente utilizados para essas análises, podem formar compostos indesejados, devido a reações de Maillard nos açúcares livres e seus compostos de degradação presentes nos extratos de compostos

fenólicos, assim como uso de solventes orgânicos pode gerar resíduos químicos (CHENG, FANG & RUAN, 2015).

Resinas macroporosas são polímeros altamente reticulados, com grande área superficial e numerosos poros permanentes (SOTO *et al.*, 2017). O processo de separação utilizando essas resinas caracteriza-se pela transferência total ou parcial do soluto (adsorbato) para a superfície de um sólido (adsorvente) pelo deslocamento de elétrons envolvendo a atração por forças de van der Waals e/ou interações eletrostáticas (BURAN *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2018; WU *et al.*, 2018) e também da grande complexidade existente nas interações que ocorrem na interface sólido-líquido (TAO *et al.*, 2020; LIMWACHIRANON *et al.*, 2019).

Existem diferentes tipos de resinas macroporosas que podem ser usadas para a adsorção de compostos fenólicos. Esta seleção está diretamente relacionada à estrutura, polaridade, tamanho de partícula, porosidade, área superficial do adsorvente e a fatores externos, como temperatura, pH e compostos concorrentes. Grande parte da sua eficiência está relacionada às suas excelentes propriedades de adsorção, baixo consumo de solvente, boa seletividade e baixo custo (CHANG *et al.*, 2012). Assim o uso de resinas macroporosas surge como uma promissora alternativa para separação de compostos fenólicos, como as antocianinas.

Tendo em vista o desenvolvimento e disseminação tecnológicos, o sistema de patentes promove a industrialização local, permitindo que sejam identificadas tecnologias passíveis de exploração no território nacional, estimula o desenvolvimento, visto que o titular da patente deve revelar suficientemente todos os passos da invenção no documento de patente, permitindo à sociedade o livre acesso ao conhecimento. A divulgação do conteúdo presente na patente atua como um catalisador da prática criativa e inventiva, capaz de auxiliar o avanço tecnológico. As patentes visam assegurar que uma invenção tenha um titular reconhecido, conferindo a esse titular ou licenciado o direito exclusivo de explorar e de impedir que terceiros façam a exploração, por um determinado tempo e no território onde a patente foi concedida. Cada país, orientado pela legislação local, tem o poder de decidir sobre a patenteabilidade de uma invenção em seu território (HAASE, DE ARAÚJO & DIAS, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi realizar uma prospecção tecnológica, para identificar e caracterizar como o mercado está atuando frente a essa tecnologia de extração, purificação e utilização desses compostos orgânicos, verificar a tendência e diversificação tecnológica, além de avaliar os mais relevantes focos e núcleos de pesquisas e identificar possíveis oportunidades.

## 2. METODOLOGIA

Este trabalho foi desenvolvido em três etapas, sendo a primeira a definição de estratégia de busca e recuperação de documentos, a segunda a categorização dos documentos e a terceira sendo a realização da análise dos dados.

### 2.1. Estratégia de busca e recuperação dos documentos

Para a estratégia de busca nas bases de patentes, foram definidos: i) o período de monitoramento; ii) Seleção das Classificações Internacionais de Patentes (CIP) que correspondam à tecnologia em questão; iii) As bases de dados, iii) Durante a recuperação dos documentos foram usados termos de busca para obtenção de resultado mais acurado.

#### 2.1.1. Período de monitoramento

Foram escolhidas as patentes publicadas entre 01/01/1919 e 31/12/2018. A seleção foi realizada de forma a: i) cobrir anos inteiros de forma a serem evitadas distorções pelo uso de dados anuais incompletos e ii) um período total superior a uma década onde o final seria o último ano de dados consolidados, para que se possibilitasse uma análise de evolução tecnológica em um prazo mais significativo.

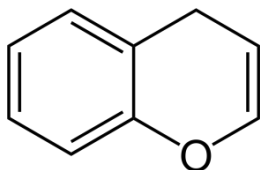
#### 2.1.2. Determinação das CIP

Foram selecionadas classificações ligadas à categoria de compostos pesquisados, no caso, as antocianinas:

CIP	Descrição
C07H 17/065	Compostos contendo radicais heterocíclicos diretamente ligados a heteroátomos de radicais sacarídeos

	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Radicais heterocíclicos contendo apenas átomos de oxigênio como heteroátomos do anel</li> <li>••Radicais de benzopirano</li> <li>•••Benzo [b] piranos</li> </ul>
C07D 311/62	<p>Compostos heterocíclicos, contendo anéis de seis membros tendo um átomo de oxigênio como o único heteroátomo do anel</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>•condensados com outros anéis condensados em orto ou em peri com anéis carbocíclicos ou com sistemas de anéis carbocíclicos.</li> <li>••Benzo [b] piranos não hidrogenados no anel carbocíclico</li> <li>•••com outros que não átomos de oxigênio ou de enxofre nas posições 2 ou 4</li> <li>••••com radicais arila ligados na posição 2</li> <li>•••••com átomos de oxigênio diretamente ligados na posição 3, p. ex. antocianidinas</li> </ul>

As classificações C07H 17/065 e C07D 311/62 foram escolhidas por representarem a descrição das moléculas das antocianinas.



Foram selecionadas classificações ligadas ao processo de purificação:

CIP	Descrição
B01D	<p>Processo de separação envolvendo o tratamento de um líquido com sorventes sólidos; Aparelhos para os mesmos</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>•Adsorção seletiva, p. ex. cromatografia</li> </ul>

### 2.1.3. Termos de busca

Adicionalmente, foram usadas palavras-chave e truncagens<sup>1</sup> com o objetivo de obter apenas patentes relacionadas aos compostos em questão em três categorias relacionadas abaixo:

#### Antocianinas

- Pyrylium
- Flavylum
- Anthocyani\*

#### Purificação

- Adsor\*
- Resin\*

#### Adsorção

- Purif\*
- Extrac\*

Assim, os termos foram organizados na seguinte combinação:

(Pyrylium OR Flavylum OR Anthocyani\*) AND (Adsor\* OR Resin\*) AND (Purif\* OR Extrac\*)

### 2.1.4. Bases de dados e recuperação de documentos

Uma vez determinadas as classificações e termos de busca considerados neste estudo, foi realizada a busca em bases que cobrem pedidos depositados no mundo: Google Patents e Espacenet.

Foram recuperados os documentos de patente depositados mundialmente no período selecionado que contivessem os termos de busca e pelo menos uma das CIP selecionadas.

---

<sup>1</sup> O operador de truncagem permite ampliar a busca de termos além da raiz da palavra, com suas formas derivadas ou plurais. Um exemplo desses operadores é o asterisco (\*), que pode ser utilizado no início da palavra ou no final.

Ex.: Anthocyani\* (por meio da utilização do recurso da truncagem foi possível encontrar documentos com a escrita da palavra anthocyanins e anthocyanin).



## 2.2. Categorização dos documentos

Inicialmente, foi feita uma verificação de patentes redundantes em mais de uma pesquisa e organizados em função da prioridade unionista<sup>2</sup>.

As patentes recuperadas foram categorizadas quanto ao: i) ano de publicação; ii) países de origem; iii) depositantes; iv) CIP pesquisadas; e vii) CIP associadas.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Países de origem

Utilizando os termos de busca já mencionados e realizando combinações com as CIP pré-definidas, foi possível encontrar uma grande quantidade de famílias de patentes<sup>3</sup> relacionadas sobre o assunto, conforme tabela abaixo.

**Tabela 1:** Quantidade de famílias de patentes encontradas por CIP relacionada.

CIP	Ocorrência
C07H 17/065	170
C07D 311/62	401
B01D	184

Sendo o CIP combinado com os termos de busca (realizada pelos autores usando Google patents e Espacenet em março de 2021).

C07H 17/065 e C07D 311/62 apresentaram maior número de depósitos com prioridade chinesa, representando cerca de 73,68% e 75,15% das patentes depositadas, respectivamente. Essa predominância de depósitos não foi observada em B01D, onde a pulverização entre os países foi maior, encontrando patentes depositadas em 27 países diferentes, sendo os três com maiores depósitos Estados Unidos, China e Japão.

---

<sup>2</sup> A prioridade unionista estabelecida pelo Art. 4º da CUP (Convenção da União de Paris para Proteção da Propriedade Industrial) assegura que, no prazo de doze meses, a divulgação da Invenção, em decorrência do primeiro depósito de um pedido em um dos países signatários desse acordo, não prejudica o depósito posterior do pedido correspondente em nosso país (Art. 16 da LPI). Portanto, qualquer divulgação ocorrida entre a data de prioridade reivindicada e a data de depósito do pedido em nosso país não prejudica a novidade e atividade inventiva do pedido brasileiro.

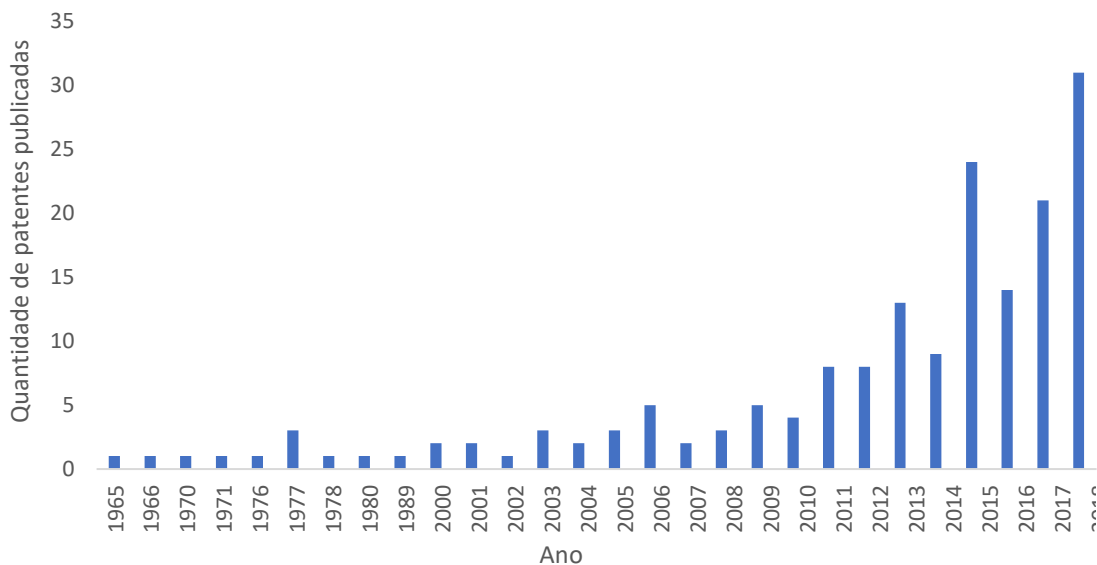
<sup>3</sup> Família de patentes define um grupo de invenções que estão relacionados entre si pela reivindicação de prioridade ou conjunto de prioridades, o que concede aos demais pedidos relacionados o direito da prioridade da data do primeiro depósito. A data de prioridade representa a data qual o estado da técnica será aplicado.

Essa alta concentração de depósitos na China está atrelada a uma grande representatividade e parceria nas universidades, onde 57,94% dos depósitos de CIP C07H 17/065 e 33,87% dos depósitos de CIP C07D 311/62 foram realizados por universidades e centros de pesquisas acadêmicos. Muitos estudos sugerem utilizar as universidades e institutos de pesquisas como importantes ferramentas impulsionadoras do desenvolvimento tecnológico, incentivando a interação entre universidade e indústria, o que ocorre em grandes economias como a China, podendo gerar relevantes contribuições para o desenvolvimento econômico de um país, potencializando principalmente o acompanhamento e aprendizado de novas tecnologias (NELSON & SAMPAT, 2001; MAZZOLENI & NELSON, 2007).

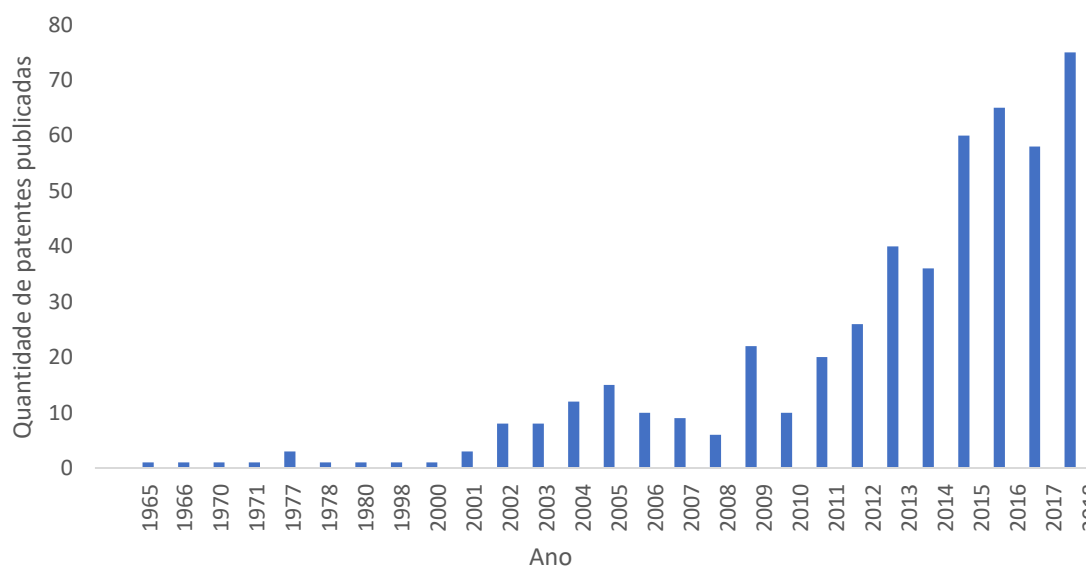
Com as informações coletadas após a realização da busca, dentre as 755 ocorrências de família de patentes, nenhum desses documentos teve o Brasil como prioridade, ou seja, nenhum deles foi originado a partir de depositantes brasileiros. Quatro dessas patentes selecionadas foram depositadas no Brasil e todos os quatro pedidos foram concedidos: A patente BR112015019381 depositada em 2017 pela Xyleco, uma empresa privada de pesquisa científica americana e teve sua concessão no Brasil em 2018; BR112013033532, depositada em 2016 e concedida em 2020, o pedido foi depositado no Brasil pela E & J Gallo Winery, uma vinícola da Califórnia; BR112013008411, depositada em 2016 pela The Queen's University of Belfast, na Irlanda do Norte e concedida no Brasil em 2019; e, finalmente, a patente BRPI0817885 depositada no Brasil em 2015 e concedida em 2019, o depósito foi realizado pela Lang Technologies, uma empresa australiana.

### **3.2. Distribuição temporal e CIP pesquisadas**

Levando em consideração o período selecionado para análise dos documentos publicados (01/01/1919 e 31/12/2018), as patentes encontradas vinculando os termos de busca já mencionados com a classificação CIP C07H 17/065 e C07D 311/62 começaram a surgir nos anos de 1960, como é mostrado nas figuras 1 e 2, ganhando aceleração em números de patentes publicadas a partir dos anos 2000.



**Figura 1:** Evolução do número de família de patentes de classificação C07H 17/065 publicadas no mundo que estavam associadas aos termos de pesquisa.

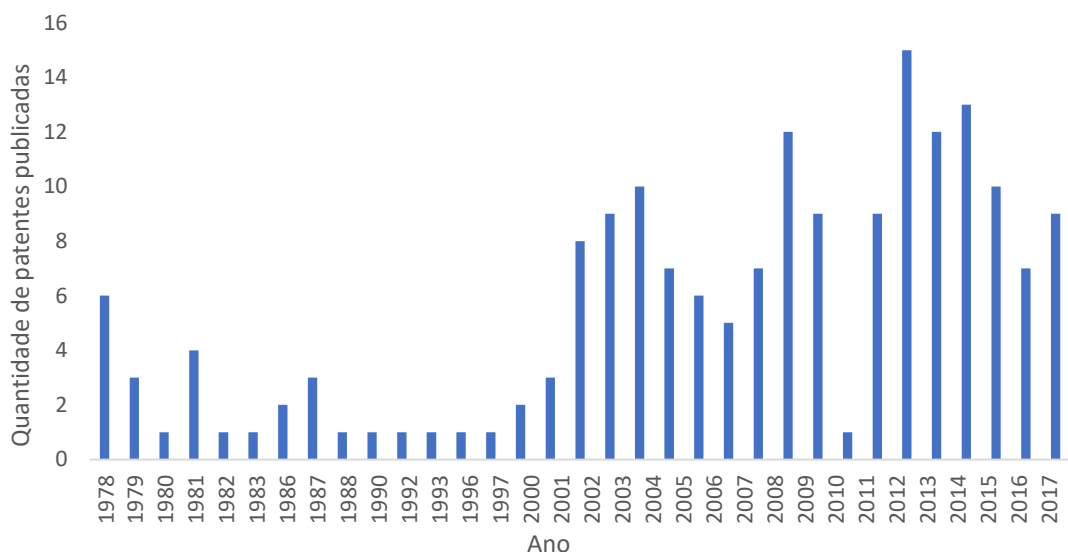


**Figura 2:** Evolução do número de família de patentes de classificação C07D 311/62 publicadas no mundo que estavam associadas aos termos de pesquisa.

A primeira patente encontrada nessa busca data de 1965 sendo o pedido de patente em questão o requerimento de um método de obtenção de glicosídeos oriundos de antocianinas de mirtilos e uma composição terapêutica formulada a partir desses glicosídeos. O pedido de patente foi depositado em oito países diferentes (Reino Unido, Bélgica, Suíça,

Alemanha, Espanha, França, Luxemburgo e Estados Unidos), o requerente era um laboratório francês que não teve a patente concedida em nenhum dos países.

Quando verificamos as patentes publicadas vinculando os termos de busca já mencionados com a classificação B01D, como mostra a figura 3, as primeiras publicações ocorreram mais tarde, em 1978.



**Figura 3:** Evolução do número de famílias de patentes de classificação B01D publicadas no mundo que estavam associadas aos termos de pesquisa.

Essa classificação está relacionada ao processo de separação utilizando resina e métodos de adsorção, o que pode justificar a diferença entre as épocas de publicação dos pedidos de patente, sugerindo que a utilização de resina para separação e purificação de antocianinas tenha apresentado um interesse na pesquisa e/ou utilização nas empresas em um período posterior. Com essa classificação foram publicados sete pedidos de patente em 1978, provenientes de duas famílias. Uma delas reivindicando um processo de remoção de polifenóis em bebidas vegetais utilizando polímeros em pó, requerida pela Sountory, uma grande empresa japonesa produtora de bebidas, publicada em 1978 no Reino Unido e em seis outros países (Canadá, Alemanha, França, Estados Unidos, Itália e Japão) nos anos seguintes. A outra família reivindicava um processo de purificação e obtenção de corantes, especialmente alimentícios, de soluções de antocianinas utilizando um adsorvente de óxido metálico revestido com uma fina película de polímero de estireno. O pedido de patente original foi requerido pela Rhône-Poulenc, uma companhia química farmacêutica francesa.

A partir desse pedido de patente francês foram depositadas em seis países diferentes em 1978 (Japão, França, Bélgica, Espanha, Holanda e Alemanha) e recebeu o deferimento em quatro deles.

Nesse contexto, pode-se avaliar a relevância e importância do estudo e desenvolvimento de técnicas de separação e extração das antocianinas, um tema que vem sendo abordado em patentes já em 1978 e segue de forma crescente durante os anos seguintes. Em 2018, nove patentes foram publicadas com a classificação B01D sendo que oito delas vieram de empresas do setor privado, o que mostra a constante busca por uma melhor eficiência e produção nas empresas para a aplicação de uma método e tecnologia de separação de antocianinas.

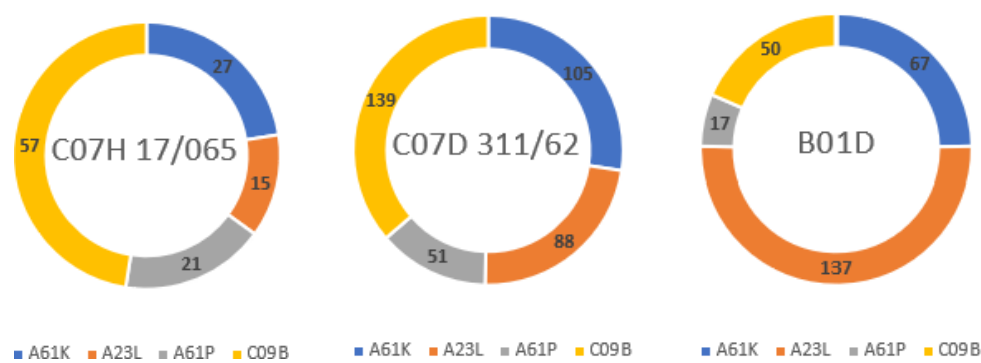
### 3.3. CIPs relacionadas

Além das CIP pesquisadas, foram verificadas também outras CIP que mais apareceram nos documentos recuperados nessa pesquisa, ou seja, dentre os documentos selecionados para realização deste estudo, quais outras classificações, além das definidas como termos de busca, mais se apareciam nessas patentes. As outras classificações que não eram alvos da busca, mas que ocorriam mais comumente são apresentadas na Tabela 2 e na figura 4.

**Tabela 2:** Descrição das CIP's que mais se destacaram além das selecionadas para estratégia de busca.

CIP associada	Descrição
A61K	<ul style="list-style-type: none"><li>• Ciência médica ou veterinária, higiene, preparações para fins médicos, preparações medicinais contendo ingredientes ativos orgânicos.</li></ul>
A23L	<ul style="list-style-type: none"><li>• Alimentos, produtos alimentícios ou bebidas não alcoólicas, sua preparação ou tratamento, por exemplo, cozimento, modificação de qualidades nutritivas, preservação de alimentos ou alimentos, em geral.</li></ul>

A61P	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Atividade terapêutica específica de compostos químicos ou preparações medicinais, anti-infecciosos, ou seja, antibióticos, anti-sépticos, quimioterápicos, agentes antibacterianos.</li> </ul>
C09B	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tintas, esmaltes, resinas naturais, adesivos, corantes orgânicos ou compostos relacionados com a produção de corantes.</li> </ul>



**Figura 4:** CIP relacionadas com maior ocorrência.

Número de classificações relacionadas é maior que o número total da base de dados pois uma mesma patente pode estar inserida em mais de uma classificação.

Assim, com essa análise foi possível verificar um significativo interesse na aplicação desses compostos, uso e desenvolvimento dessa tecnologia nas áreas química, farmacêutica e no setor de alimentos. São esses setores que detêm a maior quantidade de depósitos e desenvolvimento dos pedidos de patente nessa área, o que sugere que são eles os impulsionadores do crescimento e difusão dessa tecnologia.

### 3.4. Algumas patentes relevantes

Levando em consideração os resultados encontrados, foram selecionadas algumas patentes, como apresentado na tabela 3, que apresentam em comum a aplicação de resina em diferentes metodologias de extração e de diferentes fontes de antocianinas, em que como produto final apresentem um corante.

**Tabela 3:** Algumas das famílias de patentes com tecnologias relevantes.

	Família da patente	Título
01	JP2007145945(A) <sup>4</sup>	Método para produzir pigmento à base de antocianina.
02	CN105001284 (A) CN105001284 (B)	Método de extração de antocianina para farelo de trigo roxo primavera.
03	CN102659871 (A)	Método para extrair e refinar antocianina de arroz negro.
04	CN108558971 (A)	Método para preparar antocianina de Hibisco sabdariffa.
05	BRPI0817885 (A2) BRPI0817885 (B1) AR068852 (A1) AU2008310307 (A1) AU2008310307 (B2) CA2707644 (A1) CA2707644 (C) CL2008003029 (A1) CN101888889 (A) EP2212004 (A1) EP2212004 (A4) EP2212004 (B1) ES2545272 (T3) MX2010003906 (A) NZ585206 (A) US2010286376 (A1) US8735573 (B2) US2014343263 (A1)	Método para recuperar compostos bioativos.

<sup>4</sup> O *kind codes* são códigos que incluem letras e/ou número usado para distinguir o tipo de documento de patente e em qual etapa de processamento ele se encontra, além de também facilitar o armazenamento e a recuperação de tais documentos. O significado desses códigos é definido por cada escritório de propriedade industrial.

Ex: A - Publicação do pedido de patente como depositado, sem relatório de busca

B – Publicação da patente após concessão

O pedido de patente JP2007145945 publicado em 2007 são de requerentes japoneses e foi registrada apenas no Japão, onde o pedido não atendeu aos critérios de atividade inventiva, pois frente ao estado da técnica a metodologia de extração do pigmento a base de antocianina seria evidente e/ou óbvia para um técnico no assunto. O pedido de patente de invenção revela um método para produzir um pigmento à base de antocianina a partir de repolho roxo, batata roxa, milho roxo, rabanete vermelho, *perilla* vermelha, arroz vermelho e semelhantes, em que o pigmento é colocado em contato com sal para extração para potencializar a eficiência de extração. O extrato então é colocado em contato com uma resina porosa, a base de estireno-divinilbenzeno reticulado, para adsorver o pigmento. Após adsorção, a resina é colocada em contato com uma solução de álcool de 50 a 60% (v / v) para eluir o pigmento.

O pedido de patente CN105001284 registrado pela Shanxi Academia de Ciências Agrícolas, da província de Shanxi, publicado em 2015 e concedido em 2017, apenas na China, revela um método de extração de antocianina para farelo de trigo roxo com a finalidade de reduzir a taxa de degradação da antocianina do processo de extração. O farelo de trigo é adicionado a soluções de extração, em diferentes valores de pH, e então concentrado em 25% usando um evaporador rotatório. Com esse extrato então se inicia o processo de adsorção do pigmento usando resina macroporosa, seguida de dessorção da resina usando uma solução de etanol a 60% e concentração do eluente em 10% do eluente original usando uma membrana de nanofiltração.

O pedido de patente de invenção CN102659871 foi registrado apenas na China, sua publicação ocorreu em 2012 e o pedido não foi concedido. O documento revela um processo para extrair e refinar antocianina em arroz ou farelo de arroz negro, compreendendo a extração da matéria-prima por meio de solução aquosa ácida sob a manutenção da temperatura e filtragem. Após a obtenção do extrato, a solução é colocada em contato com uma resina macroporosa apolar ou fracamente polar para adsorção, seguida da etapa de dessorção à 50-70 °C usando uma solução aquosa de álcool.

O pedido de patente CN108558971 requerido pela Universidade de Fuzhou, na China e foi publicado em 2018 no país. O pedido não foi concedido, mas os inventores apresentaram



um método para extrair antocianina de *Hibiscus sabdariffa* incluindo o esmagamento dos cálices de hibisco, adição de solução pré-tratamento sob controle de temperatura e agitação seguida de coleta do líquido e separação do resíduo. Com o líquido se inicia a etapa de extração, com o uso de uma solução extratora e separação por membrana para remover impurezas. Em seguida, o extrato é submetido ao processo de adsorção e dessorção utilizando resina macroporosa para obtenção de antocianina caracterizada como de alta pureza pelos inventores.

A patente BRPI0817885, foi depositada pela empresa Australiana Lang Technologies PTY LTD em 11 países, no Brasil a publicação ocorreu em 2015 e em 2017 a patente foi concedida. O documento revela um processo para a purificação de limonóides a partir de frutas cítricas e antocianinas de maçãs, peras, uvas, bagas, frutas com caroço e frutas cítricas, constituído da etapa de contato do material vegetal com um solvente sob condições para a extração de pelo menos um composto bioativo solúvel em água e do contato do composto bioativo com uma resina de troca de íons sob condições que permitam interações iônicas entre o composto bioativo e a resina, de tal forma que o composto bioativo seja adsorvido na resina e em seguida eluído em uma solução compreendendo água e álcool.

Desse modo, podemos verificar que, mesmo com a utilização de diferentes fontes para obtenção e extração de antocianinas, a etapa de aplicação em resina se baseia em tecnologias semelhantes, com pequenas alterações, o que sugere uma técnica bem difundida e bastante utilizada mundialmente, tanto em empresas como em centros de pesquisas e universidades.

Nesse contexto, é possível identificar que há considerável número de possibilidades para que as indústrias e centros de pesquisa brasileiros possam desenvolver e aplicar essas tecnologias.

Essas oportunidades são evidenciadas pela verificação de dois pontos importantes. O primeiro é que além da ampla literatura científica (não explorada nesse artigo), há significativo volume na literatura patentária. Isso indica o real interesse econômico do tema, pois as patentes não são apenas documentos de teor técnicos, mas títulos de propriedade que indicam possibilidade de usos comerciais. Assim, esses dados podem servir de indicadores para o direcionamento das pesquisas a serem desenvolvidas. O segundo é que, como a maior parte dessas patentes não foi depositada no Brasil, essas tecnologias são consideradas de

domínio público em território brasileiro, o que significa que elas estão livres para operação uso não apenas do ponto de vista do desenvolvimento tecnológico, mas para uso comercial, se tornando uma oportunidade para as empresas brasileiras que queiram explorá-las.

#### **4. CONCLUSÃO**

Os resultados desse trabalho mostram que existe um significativo número de patentes nessa área e um interesse ainda crescente nessa tecnologia, visto a evolução do número de família de patentes. A China é o país com maior predominância de pesquisa e desenvolvimento na área, levando em consideração o maior número de depósito com prioridade no país além do expressivo número de depósitos realizados pelas universidades e centros de pesquisas, tendo como maior destaque o setor de alimentos, fármaco e químico. O Brasil apresenta uma oportunidade em potencial para a utilização e desenvolvimento tecnológico, visto que boa parte dessas patentes não foram depositadas no Brasil, o que se caracterizam como domínio público, podendo então serem exploradas e utilizadas no país.

#### **5. REFERÊNCIAS**

ACOSTA-ESTRADA, B. A., GUTIÉRREZ-URIBE, J. A. & SERNA-SALDÍVAR, S. O. Bound phenolics in foods, a review. *Food chemistry*, v. 152, 2014.

BURAN, T. J., SANDHU, A. K., LI, Z., ROCK, C. R., YANG, W. W. & GU, L. Adsorption/desorption characteristics and separation of anthocyanins and polyphenols from blueberries using macroporous adsorbent resins. *Journal of Food Engineering*, v. 128, 2014.

CHANG, X. L., WANG, D., CHEN, B. Y., FENG, Y. M., WEN, S. H. & ZHAN, P. Y. Adsorption and desorption properties of macroporous resins for anthocyanins from the calyx extract of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 60, 2012.

CHEN, Y., HUNG, Y. C., CHEN, M., LIN, M. & LIN, H. Enhanced storability of blueberries by acidic electrolyzed oxidizing water application may mediated by regulating ROS metabolism. *Food Chemistry*, v. 270, 2018.

CHENG, L., FANG, S. & RUAN, M. Influence of blanching pretreatment on the drying characteristics of cherry tomato and mathematical modeling. *International journal of food engineering*, v. 11, 2015.

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

HAASE, H., DE ARAÚJO, E. C. & DIAS, J. Inovações Vistas pelas Patentes: exigências frente às novas funções das universidades. *Revista Brasileira de Inovação*, v. 4, n. 2, p. 329-362, 2005.

LI, H., LIN, L., FENG, Y., ZHAO, M., LI, X., ZHU, Q. & XIAO, Z. Enrichment of antioxidants from soy sauce using macroporous resin and identification of 4-ethylguaiacol, catechol, daidzein, and 4-ethylphenol as key small molecule antioxidants in soy sauce. *Food chemistry*, v. 240, 2018.

LIMWACHIRANON, J., HUANG, H., Li, L., DUAN, Z. & LUO, Z. Recovery of lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) seedpod flavonoids using polar macroporous resins: The updated understanding on adsorption/desorption mechanisms and the involved intermolecular attractions and bonding. *Food chemistry*, v. 299, 2019.

MAZZOLENI, R. & NELSON, R. R. Public research institutions and economic catch-up. *Research policy*, v. 36, n. 10, p. 1512-1528, 2007.

NELSON, R. R. & SAMPAT, B. N. Making sense of institutions as a factor shaping economic performance. *Journal of economic behavior & organization*, v. 44, n. 1, p. 31-54, 2001.

OLIVEIRA, L. G. D., SUSTER, R., PINTO, A. C., RIBEIRO, N. M., & SILVA, R. B. D. Informação de patentes: ferramenta indispensável para a pesquisa e o desenvolvimento tecnológico. *Química nova*, v. 28, p. S36-40, 2005.

SHAHIDI, F. & AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *Journal of functional foods*, v. 18, 2015.

SHAHIDI, F. & CHANDRASEKARA, A. Interaction of phenolics and their association with dietary fiber. *Dietary Fiber Functionality in Food and Nutraceuticals: From Plant to Gut*, 2017.

SOTO, M. L.; MOURE, A.; DOMÍNGUEZ, H. & PARAJÓ, J. C. Batch and fixed bed column studies on phenolic adsorption from wine vinasses by polymeric resins. *Journal of Food Engineering*, v. 209, 2017.

SUN, X. H., ZHOU, T. T., WEI, C. H., LAN, W. Q., ZHAO, Y., PAN, Y. J. & WU, V. C. Antibacterial effect and mechanism of anthocyanin rich Chinese wild blueberry extract on various foodborne pathogens. *Food Control*, v. 94, 2018.

TAO, Y., WU, Y., HAN, Y., CHEMAT, F., LI, D. & SHOW, P. L. Insight into mass transfer during ultrasound-enhanced adsorption/desorption of blueberry anthocyanins on macroporous resins by numerical simulation considering ultrasonic influence on resin properties. *Chemical Engineering Journal*, v. 380, 2020.

WU, Y., HAN, Y., TAO, Y., FAN, S., CHU, D. T., YE, X. & XIE, G. Ultrasound assisted adsorption and desorption of blueberry anthocyanins using macroporous resins. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 48, p. 311-320, 2018.

YANG, Q., ZHAO, M. & LIN, L. Adsorption and desorption characteristics of adlay bran free phenolics on macroporous resins. *Food chemistry*, v. 194, 2016.

ZHENG, W. & WANG, S.Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agric. Food Chemistry*, v. 49, 2001.

## CAPÍTULO III

### **DEGRADATION KINETICS AND IN VITRO DIGESTIVE STABILITY OF SELECTED BIOACTIVE COMPOUNDS FROM A BEVERAGE FORMULATED WITH BUTTERFLY PEA FLOWERS**

R.O. Santos<sup>1</sup>, L.M. Keller<sup>2</sup>, V.S. De Oliveira<sup>1</sup>, C.A. Bucher<sup>3</sup>, J.L.B. Júnior<sup>1,2</sup>, J. Vicente<sup>1,2</sup>,  
M.I.M.J. Barbosa<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA), Universidade Federal Rural de Rio de Janeiro (UFRRJ), Rodovia BR 465, Km 7, Seropédica/RJ, 23897-000, Brasil. E-mail: re.oliveira.ufrj@gmail.com.br. Autor para correspondência.

<sup>2</sup>Departamento de Tecnologia de Alimentos, Instituto de Tecnologia-IT, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Rodovia BR 465, Km 7, Seropédica/RJ, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Fitotecnia, Instituto de Agronomia-IA, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Rodovia BR 465, Km 7, Seropédica/RJ, Brasil.

**Artigo aceito para publicação na Revista Ciência Rural (Qualis B2 -Ciência de  
alimentos/Capes)**

## ABSTRACT

This study evaluated the effects of temperature on the pH of extracts of ascorbic acid and anthocyanins from petals of butterfly pea, as well as their *in vitro* digestive stability in model systems at 60, 70, and 80 °C. The pH values significantly decreased with an increase in the temperature ( $p < 0.05$ ). The findings were similar for the degradation of anthocyanins and ascorbic acid, which followed first-order kinetics in all the systems. The samples heated at 80 °C presented the highest degradation rate ( $k_{obs}$ ), as well as higher percentages of degradation at the end of digestive stability *in vitro*.

**Key words:** thermal stability, anthocyanin, ascorbic acid, *Clitoria ternatea* L., digestive stability.

## RESUMO

Este estudo avaliou os efeitos da temperatura na estabilidade do ácido ascórbico, pH e antocianinas de pétalas de feijão borboleta, bem como a estabilidade digestiva *in vitro* do ácido ascórbico e antocianinas em sistemas modelo submetidos a 60, 70 e 80 °C. Os valores de pH diminuíram significativamente com o aumento da temperatura ( $p < 0.05$ ). O mesmo foi observado para a degradação de antocianinas e ácido ascórbico, que seguiram cinética de primeira ordem em todos os sistemas. As amostras aquecidas a 80 ° C apresentaram as maiores taxas de degradação ( $k_{obs}$ ), assim como maiores percentuais de degradação ao final da estabilidade digestiva *in vitro*.

**Palavras-chave:** estabilidade térmica, antocianina, ácido ascórbico, *Clitoria Ternatea* L., estabilidade digestiva.

## 1. INTRODUCTION

Anthocyanins are secondary metabolites that are widely distributed in nature; they are the most studied natural pigments. The interest in anthocyanins has increased significantly owing to their attractive color and water solubility, which highlight their important technological properties and beneficial health effects (PATRAS et al., 2010). Studies have linked the use of high temperatures to a reduction in anthocyanin content and the degradation of ascorbic acid (AA), indicating the importance of studying the stability of these two compounds, especially for industries where thermal processes and pH adjustments are commonly applied during production, which has an influence on the stability of anthocyanins and AA.

The butterfly pea flower (*Clitoria ternatea* L.), which belongs to the Fabaceae family, is native to tropical Asia. Its petals have blue to purple and white tones owing to the presence of anthocyanidins such as ternatin, preternatin, delphinidine, cyanidin, and malvidin (KUMAR et al., 2008). This variety of anthocyanins exhibits a protective effect against oxidative processes that naturally occur in living organisms; studies have also shown the beneficial effects of butterfly pea flower extracts, namely, their antihypertensive and anti-inflammatory properties, and the ability to reduce human LDL cholesterol levels (KUMAR et al., 2008).

Currently, a greater understanding regarding the mechanism of digestion of bioactive compounds found in food is required; this may contribute to and enhance the knowledge on the effects of these constituents on the human body. Digestive stability encompasses the nutrients that are not affected by the digestive process and can be properly observed in *in vitro* digestion of food systems. Although a wide range of anthocyanins originating from different sources has been extensively studied (PÉREZ-VICENTE et al., 2002; LEE et al., 2005; CHEN et al., 2020), information concerning the digestive and thermal stability of anthocyanins from butterfly pea is scarce; this is also the case for their applicability in isotonic beverages, which represents a potential area of research.

Traditionally, isotonic beverages are prepared using artificial colors; however, the substitution of synthetic dyes with natural ones has gained relevance owing to the growth in consumer demand for healthier products with low contents of synthetic substances. The main disadvantage of anthocyanins, compared with synthetic dyes, is their susceptibility to thermal degradation and pH modifications, which cause changes in the color and bioactivity of these



natural substances. The use of high temperatures is associated with a reduction in the content of anthocyanins, owing to their degradation upon heating, which consequently reduces pigment levels. pH changes are one of the main limiting aspects, since anthocyanins have chromophoric groups that are quite sensitive to pH alterations (JIANG et al., 2019). Hence, it is important to study the stability of anthocyanins, especially for industries where thermal processes and pH adjustments are commonly applied during production.

In this context, the aim of this study was to evaluate the thermal stability of AA and anthocyanins present in an isotonic beverage and some buffer solutions formulated with extracts of butterfly pea flower. Moreover, the *in vitro* digestive stability of both compounds in an isotonic model system formulated with extracts of butterfly pea flower was investigated.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Preparation of extracts

Samples of butterfly pea flowers (*C. ternatea* L.) were obtained from the Integrated Agroecological Production System (SIPA) located in Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil. They were dried in an air circulation oven at 45 °C for 5 h (KUMAR et al., 2008). Extract of butterfly pea flowers was prepared by mixing 2 g dried petals with 1 L distilled water, and the extract was used to formulate three model systems: (1) extract of butterfly pea flowers and phosphate/citrate buffer (Buffer), (2) extract of butterfly pea flowers and phosphate/citrate buffer containing AA (AA+Buffer), and (3) extract of butterfly pea flowers in an isotonic model (Isotonic). The buffer solution was used to minimize changes due to different treatment conditions. The composition (%/L) of the isotonic model was 0.2% extract of butterfly pea flowers, 0.09% sodium chloride, 0.07% potassium chloride, 4% sucrose, 0.028% citric acid, and 0.028% AA. The pH of the model systems was adjusted to 2.5.

### 2.2. Thermal stability and degradation kinetics

The thermal stability, degradation kinetics, and content of total monomeric anthocyanins (MA) and AA were evaluated using a scanning spectrophotometer (WUV-M51, WebLaborSP, Brazil). The samples were incubated, in a thermostated bath, at three different temperatures (60, 70, and 80 °C) for 180 min.

The degradation rate constant ( $k$ ) was determined using first order model (Equation 1) after linear regression analysis, which was used to determine the adequacy of the kinetic model.

$$C(\text{mg} \cdot 1000\text{g}^{-1})_t = C_0 \times \exp^{-k \times t} \quad (1)$$

where  $C_0$  is the initial anthocyanin content,  $C_t$  is the anthocyanin content after a period of heating at a given temperature, and  $k$  is the first-order rate constant. Half-life time ( $t_{1/2}$ ) was calculated using Equation 2 (DE ROSSO & MERCADANTE, 2007).

$$t_{\left(\frac{1}{2}\right)}(\text{min}) = \frac{-\ln(0.5)}{k} \quad (2)$$

To determine the effects of the temperature on the degradation kinetics of AA and MA, the constants obtained were adjusted using the Arrhenius equations (Equation 3) (HSU et al., 2012).

$$k = k_0 \times e^{\frac{-A_e}{RT}} \quad (3)$$

where  $A_e$  is the activation energy (kJ/mol),  $R$  is the universal gas constant (8.314 J/mol K),  $T$  is the absolute temperature (K), and  $k_0$  is the frequency factor ( $\text{min}^{-1}$ ).

The pH values and MA and AA contents were monitored at each temperature (60, 70, and 80 °C); an aliquot of each sample was collected every 15 min up to 180 min.

### **2.3. Monomeric anthocyanin content, ascorbic acid content, and pH values**

The MA content was quantified using the differential pH method described by LEE et al. (2005), with cyanidin 3-glucoside as reference, and the absorbance was measured at 520 and 700 nm. The AA content was measured at 265 nm, the wavelength at which AA exhibits maximum absorbance, using a scanning spectrophotometer (WUV-M51, WebLaborSP) (RUIZ et al., 2016). pH readings were performed using a digital pH meter (PHS-3E, Even, Brazil) by inserting the electrode directly into the samples.

### **2.4. In vitro digestive stability of anthocyanins and ascorbic acid in isotonic model system**

*In vitro* digestive stability was simulated in three stages: oral, gastric, and intestinal (MINEKUS et al., 2014). The isotonic model system was mixed with a simulated salivary fluid and the mixture was adjusted to pH 7.0. Then, the mixture was stirred at 95 rpm (Novatecnica, Chilled, Brazil) for 2 min at 37 °C. After the oral phase, the solution was mixed with 50 mL of simulated gastric fluid and the mixture was adjusted to pH 2.0. Then, the mixture was stirred at 95 rpm (Novatecnica, Chilled) for 2 h at 37 °C. After complete gastric digestion, 50 mL of simulated intestinal fluid was added to the mixture, which was adjusted to pH 7.0. Then, the mixture was stirred at 95 rpm (Novatecnica, Chilled) for 2 h at 37 °C. Aliquots of gastric and intestinal digestion fluids were taken every 15 min. The results were expressed as percentages of digestive stability, which refers to the percentage maintained after each step of *in vitro* digestion.

## 2.5. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Statistic<sup>®</sup> (Statsoft version 7.0) and XLSTAT 2016<sup>®</sup> software. All the analyses were carried out in triplicate, and the results were expressed as averages followed by standard deviations. The differences between groups were evaluated using variance analysis and the Tukey test. A 5% significance level was considered ( $p < 0.05$ ), and the average relative error (E) was used to evaluate the fitting model, calculated using Equation 4 (BARBOSA JÚNIOR et al., 2013).

$$E = \frac{1}{(N-1)} \sum_{i=1}^N \left| \frac{Y - \bar{Y}}{Y} \right| \quad (4)$$

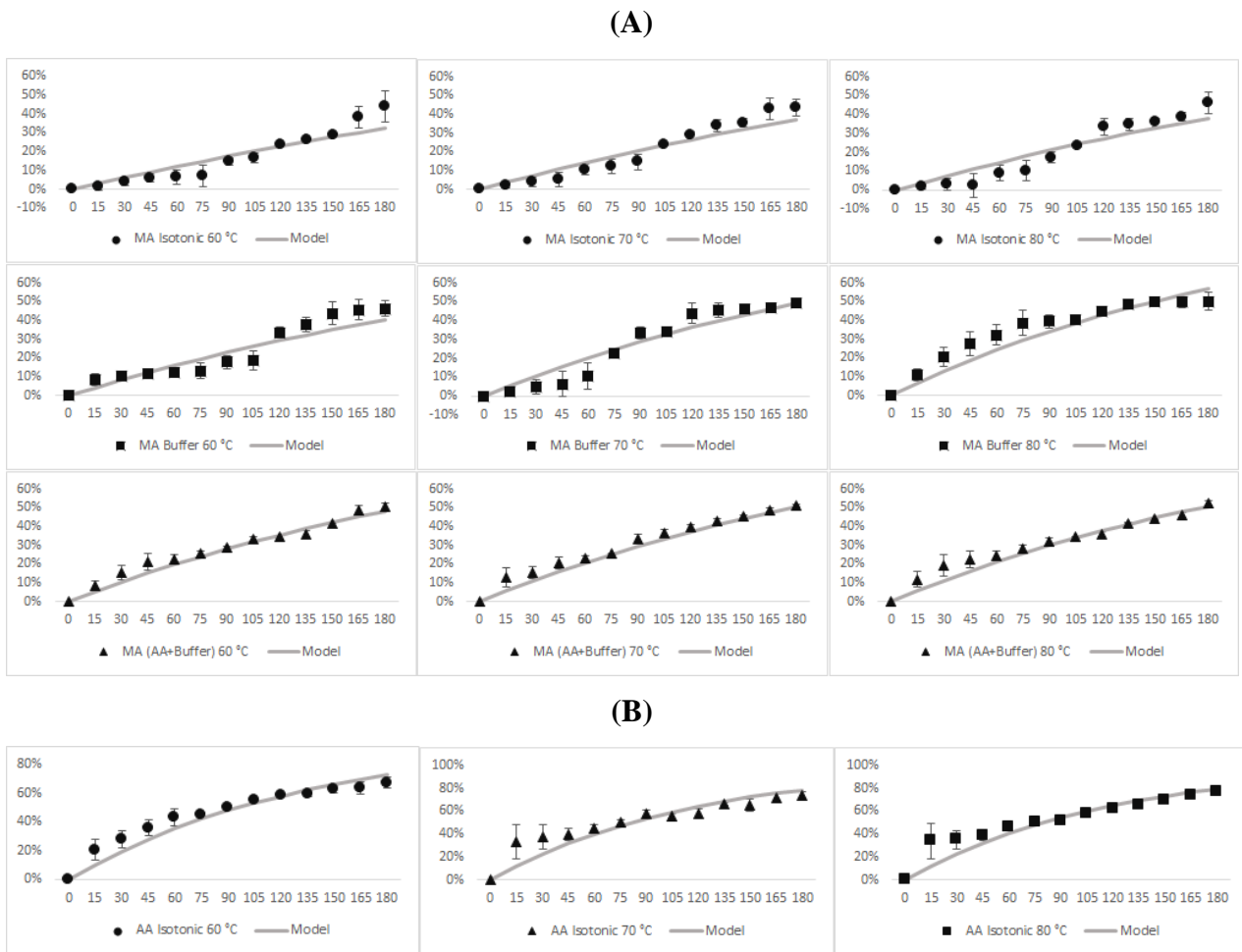
where E is the average relative error, N is the number of experimental points, Y is the experimental value, and  $\bar{Y}$  is the predicted value.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

Heating affected the pH values of samples prepared with extract of butterfly pea flowers in an isotonic model (Isotonic), phosphate/citrate buffer (Buffer), and phosphate/citrate buffer containing AA (AA+Buffer) ( $p < 0.05$ ); the pH decreased with an increase in the temperature.

Similar findings were reported by GIRONÉS-VILAPLANA et al. (2016) for an isotonic drink made of lemon juice (*Citrus limon* (L.) Burm. f.) and maqui berry (*Aristotelia chilensis*). This trend can be due to the strong influence of pH on chemical structures and reactions, which can accelerate or attenuate molecular interactions. Heating can result in higher degrees of water dissociation in products containing water as the main constituent, such as isotonic beverages. Therefore, it can affect the pH value as it changes the hydrogen and hydroxyl ion concentrations (JIANG et al., 2019).

The degradation of MA (Figure 1A) and AA (Figure 1B) followed first-order kinetics at all the evaluated temperatures, in agreement with the results of previous studies carried out with model systems containing extracts of acai and acerola in isotonic drinks (DE ROSSO & MERCADANTE, 2007) and juice of Urmu mulberry (*Morus nigra* L.) (KARA & ERÇELEBI, 2013). These authors claim that the stability of anthocyanins depends on the temperature and pH associated with the chemical structure and co-pigmentation. Intermolecular co-pigmentation between anthocyanins, together with other compounds, produces an increase in color intensity and a shift in the maximum absorption length; the anthocyanins present in flower petals are accompanied by colorless flavones, which are co-pigments, and essential for color expression and anthocyanin stability (PATRAS et al., 2010). As expected, the highest degradation of MA occurred in the treatment at 80 °C for all the three model systems (Figure 1A); the AA+Buffer system showed the highest rate of degradation at the end of 180 min at the three temperatures.



**Figure 1** – Fitting capability of the first order model for experimental data of: (A) % of Monomeric anthocyanin (MA) degradation in different solutions (Isotonic, Buffer, and AA+Buffer); (B) % of Ascorbic acid (AA) degradation in an isotonic model system.

Kinetic models of AA have been described for alcoholic beverages (HSU et al., 2012) and tomato juice (ORDÓÑEZ-SANTOS & MARTÍNEZ-GIRÓN, 2020). In the present study, the thermal degradation of AA was more pronounced during the first 15 min at all temperatures; the formulation subjected to 80 °C showed the highest percentage of degradation of AA. After 15 min, the rate of AA degradation gradually decreased (Figure 1B). This may have been associated with the level of dissolved oxygen—which accelerates the degradation of AA—present at the beginning of the thermal process (QIU et al., 2018). The food matrix in which AA is inserted also has an influence on its stability; the molecular mobility of oxygen increases with a decrease in the viscosity of the product, as in the case of

the model systems of the present study, thus increasing the degradation rates. Table 1 presents the parameters obtained from experimental data linear regression of the model system degradation kinetics, the values of the determination coefficients, and the relative mean deviations for MA and AA. All samples presented determination coefficient close to 1.0, showing that the predicted models values for MA and AA presented a good correlation with the experimental data.

**Table 1** – Degradation constants ( $k_{obs}$ ), half-life times ( $t_{1/2}$ ), activation energies ( $A_e$ ), determination coefficients ( $r^2$ ), p value (p), and average relative errors (E) for thermal degradation of monomeric anthocyanins and ascorbic acid.

Model system	Component	Temperature (°C)	$k_{obs} \times 10^{-4}$ (min <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (min)	$r^2$	$p \times 10^{-10}$	$A_e$ (kJ/mol)	E (%)
Isotonic	AA	60	72.30	95.87	0.955	0.61	9.22	1.05
		70	85.00	81.55	0.905	59.60		1.23
		80	87.20	79.49	0.934	13.76		1.05
Isotonic	MA	60	21.70	319.4	0.946	15.01	9.69	3.82
		70	25.70	269.7	0.970	0.34		3.02
		80	26.50	261.6	0.955	5.36		5.58
Buffer	MA	60	28.80	240.7	0.955	1.70	23.33	1.88
		70	37.60	184.3	0.963	1.41		3.58
		80	46.40	149.4	0.918	3.89		1.31
AA + Buffer	MA	60	36.40	190.4	0.980	0.00	4.00	0.97
		70	38.90	178.2	0.978	0.00		0.98
		80	39.30	176.4	0.961	0.05		0.07

MA = monomeric anthocyanins; AA = ascorbic acid;  $k_{obs}$  = degradation constant;  $t_{1/2}$  = half-life time;  $A_e$  = activation energy;  $r^2$  = determination coefficient; p = p value; E = average relative error.

As indicated in Table 1, the degradation constant ( $k_{obs}$ ) and the half-life time ( $t_{1/2}$ ) of MA and AA were affected by heating in all the model systems. An increase in the temperature increased the values of the degradation constants and decreased the half-life time (Table 1), highlighting the effects of heating on the stability of the bioactive compounds. The degradation constant determined at 80 °C for MA was approximately 1.2 and 1.6 times higher than those at 60 °C for the isotonic model system and the buffer, respectively (Table 1). An increase in the values of  $k_{obs}$  was also reported by KARA & ERÇELEBI (2013) for

anthocyanins from Urmu mulberry juice (*M. nigra* L.), in addition to a reduction in the values of the half-life. MARTYNENKO & CHEN (2016) investigated the thermal degradation of anthocyanins from blueberry upon hydrothermodynamic (HTD) processing at 70, 80, 87.5, 95, and 105 °C for 0 and 400 min. The values of  $k$  increased with the temperature (0.002 min<sup>-1</sup> at 70 °C and 0.0179 min<sup>-1</sup> at 105 °C), whereas the half-life time decreased (346.6 min at 70 °C and 38.7 min at 105 °C); the results of the present study followed a similar trend.

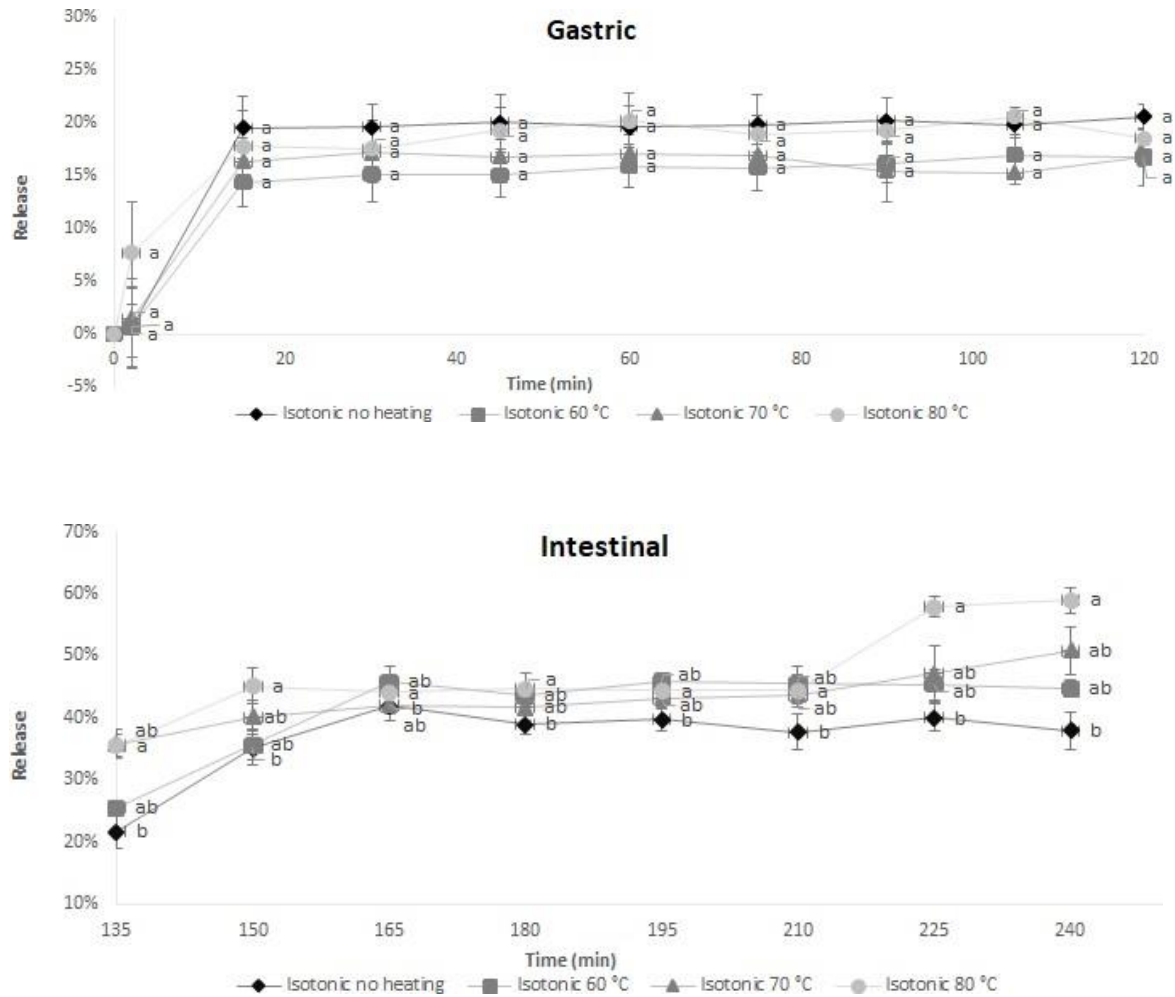
The degradation constant determined at 80 °C for AA was approximately 1.2 and 1.1 times higher than those at 60 °C for the isotonic model system and the buffer, respectively (Table 1). The influence of the temperature on the stability of AA has been described by ORDÓÑEZ-SANTOS & MARTÍNEZ-GIRÓN (2020) with regard to tomato juice (*Solanum betaceum* Cav.); they also reported that the values of  $k$  increased upon heating, whereas the half-life time decreased.

The degradation of MA was more pronounced in samples containing the buffer solution than in the isotonic model system during all heating treatments (Table 1), suggesting that the presence of sugars and salts may favor pigment stability (DE ROSSO & MERCADANTE, 2007). The highest degradation was observed when the buffer solution was heated at 80 °C, for which the degradation constant ( $k_{\text{obs}}$ ) was 1.8 times higher than that determined for the isotonic model system (80 °C) (Table 1).

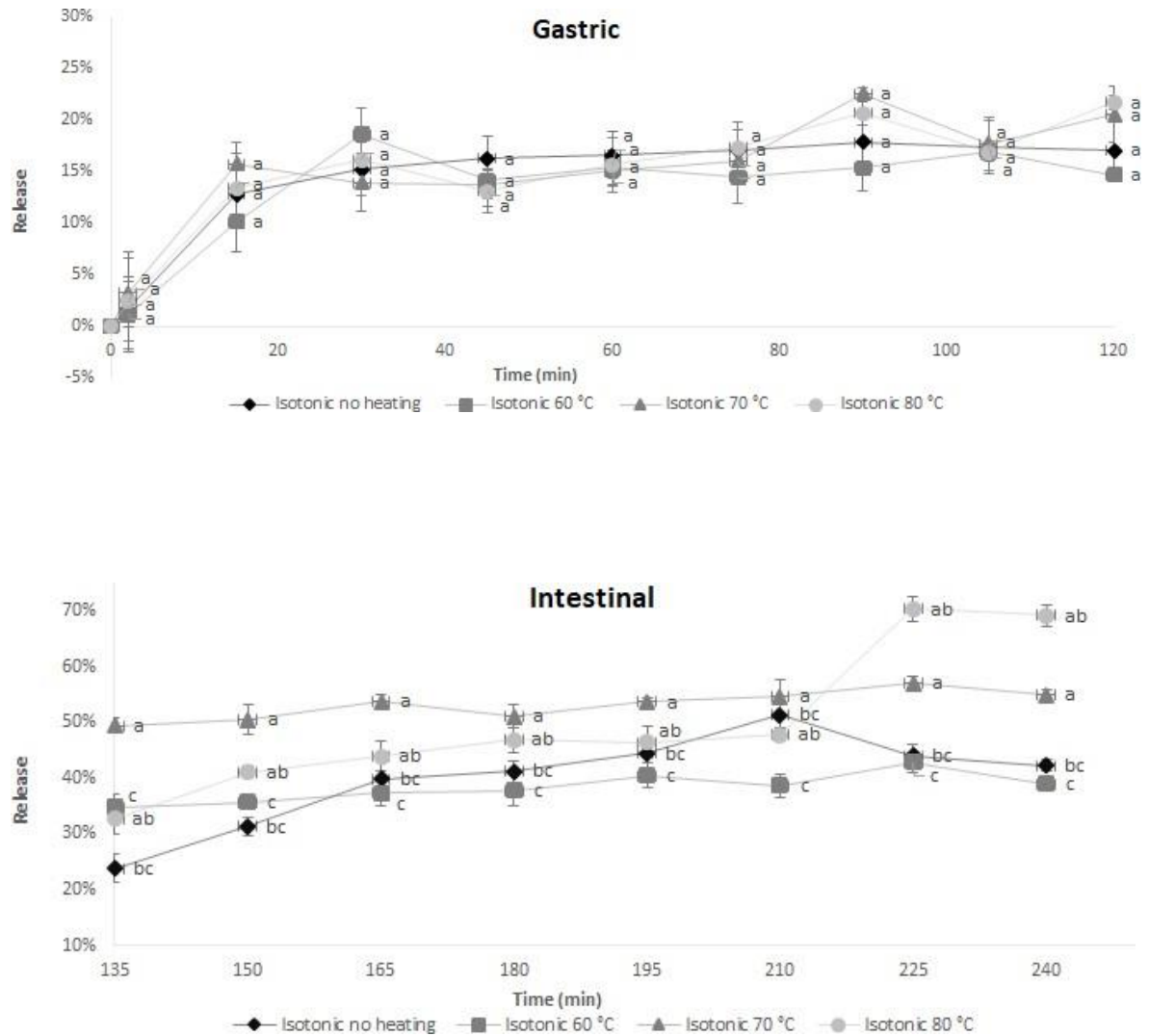
AA stability was also affected by the composition of the medium at all temperatures. The values obtained for the degradation constant ( $k_{\text{obs}}$ ) were approximately 2 times higher than those of the samples containing the buffer solution (Table 1).

Higher values of activation energy ( $A_e$ ) are linked to a greater influence of the temperature on the degradation of the studied compound (KARA & ERÇELEBI, 2013). Variation in the values of  $A_e$  may be related to the different contents of soluble solids in the medium, and possible differences in composition between isotonic samples and those containing the buffer solution.





**Figure 2** – *In vitro* digestive stability of monomeric anthocyanins (MA) present in isotonic samples formulated with extract of butterfly pea flowers and heated at 60, 70, and 80 °C. Points with different letters indicate significant difference by the Tukey's test (5%).



**Figure 3** – *In vitro* digestive stability of ascorbic acid (AA) present in isotonic samples formulated with extract of butterfly pea flowers and heated at 60, 70, and 80 °C. Points with different letters indicate significant difference by the Tukey's test (5%).

The digestive stability percentages of MA and AA in the isotonic samples formulated with the extract of butterfly pea flowers heated at 60, 70, and 80 °C are shown in Figures 2 and 3, respectively. The temperature negatively influenced the digestive stability percentage of anthocyanins after *in vitro* digestion; this was mainly attributed to their thermal degradation. The control sample (not heated) and the sample incubated at 60 °C showed the highest digestive stability percentages of MA and AA at the end of *in vitro* digestion, whereas the isotonic sample incubated at 80 °C showed the lowest percentages.

At the end of intestinal digestion (240 min), the control sample presented a digestive stability percentage of MA of 62%, whereas the isotonic system heated at 60 °C showed a stability percentage of 55%. Lower percentages were determined for samples heated at 70 (49%) and 80 °C (41%). Greater stability of anthocyanins was observed during the gastric phase, in which there were losses of 19.84% (control), 16.81% (60 °C), 16.76% (70 °C), and 18.58% (80 °C). The lower retention during the gastric phase in comparison with that during intestinal digestion indicates the higher stability of anthocyanins in acidic media, wherein the predominant species is the flavylium cation (CHEN et al., 2020). The digestive stability percentages determined at the end of *in vitro* digestion for AA reduced as follows: 60.98% (60 °C) > 57.70% (control) > 45.06% (70 °C) > 31.63% (80 °C), showing difference significant between the samples ( $p < 0.05$ ) (Figure 3). Additionally, a decrease in the loss of AA was also noticed at the end of gastric digestion (120 min), which is in agreement with the results of previous studies (PÉREZ-VICENTE et al., 2002).

PÉREZ-VICENTE et al. (2002) studied the *in vitro* digestive stability of AA in pomegranate juice and reported a loss of 29% after gastric digestion; such AA losses may be due to changes in the pH value and the presence of oxygen during gastrointestinal digestion.

#### **4. CONCLUSION**

The overall results of this study showed that the degradation of anthocyanins and ascorbic acid in samples containing extract of butterfly pea flowers followed a first-order kinetic reaction; these compounds presented the highest stability when the lowest temperature was applied during heating (60 °C). The pH value and stability of ascorbic acid in isotonic samples were affected by heating. Therefore, greater degradation was observed at higher temperatures. The isotonic sample heated at 80 °C showed the lowest percentage of digestive stability for anthocyanins and ascorbic acid after *in vitro* digestion, in agreement with the results of thermal stability analysis. However, further studies must be conducted to investigate the stability of anthocyanins from butterfly pea flowers in different food matrices in order to confirm their applicability as a natural dye in industries.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors are grateful for the financing of the project by the Brazilian Federal Agencies: “Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel” (CAPES) - Financial Code 001, and “National Council for Scientific and Technological Development” (CNPq).

#### **DECLARATION OF CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare no conflict of interest.

#### **AUTHORS' CONTRIBUTIONS**

All authors contributed equally to the conception of the study and writing of the manuscript. All authors critically revised the manuscript and approved of the final version.

## 5. REFERENCES

BARBOSA JÚNIOR, J. L. et al. Mass transfer kinetics and mathematical modelling of the osmotic dehydration of orange-fleshed honeydew melon in corn syrup and sucrose solutions. **International journal of food science & technology**, v. 48, n. 12, p. 2463-2473, 2013. Available from: <<https://doi.org/10.1111/ijfs.12237>>. Accessed: Jun. 8, 2021. doi: 10.1111/ijfs.12237.

CHEN, Y. et al. Bioaccessibility and biotransformation of anthocyanin monomers following in vitro simulated gastric-intestinal digestion and in vivo metabolism in rats. **Food & Function**, v.11, p.6692-6692, 2020. Available from: <<https://doi.org/10.1039/D0FO90028A>>. Accessed: Jul. 1, 2020. doi: 10.1039/D0FO90028A.

DE ROSSO, V.V. & MERCADANTE, A. Z. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. **Journal of Food Chemistry**, v.55, n.13, p.5062-5072, 2007. Available from: <<https://doi.org/10.1021/jf0705421>>. Accessed: Aug. 7, 2020. doi: 10.1021/jf0705421.

GIRONÉS-VILAPLANA, A. et al. Quality and microbial safety evaluation of new isotonic beverages upon thermal treatments. **Food Chemistry**, v.194, p.455-462, 2016. Available from: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.011>>. Accessed: Jul. 1, 2020. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.08.011.

HSU, H.-Y. et al. Degradation of ascorbic acid in ethanolic solutions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, p.10696-10701, 2012. Available from: <<https://doi.org/10.1021/jf3032342>>. Accessed: Apr. 7, 2020. doi: 10.1021/jf3032342.

JIANG, T. et al. Degradation of anthocyanins and polymeric color formation during heat treatment of purple sweet potato extract at different pH. **Food Chemistry**, v.274, p.460-470, 2019. Available from: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.141>>. Accessed: Mar. 23, 2021. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.07.141.

KARA, Ş. & ERÇELEBI, E. A. Thermal degradation kinetics of anthocyanins and visual colour of Urmu mulberry (*Morus nigra* L.). **Journal of Food Engineering**, v.116, p.541-547, 2013. Available from: <<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.12.030>>. Accessed: Apr. 7, 2020. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2012.12.030.

KUMAR, V. et al. Validation of HPTLC method for the analysis of taraxerol in

*Clitoria ternatea*. **Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques**, v.19, p.244-250, 2008. Available from:

<<https://doi.org/10.1002/pca.1042>>. Accessed: Sep. 10, 2020. doi: 10.1002/pca.1042.

LEE, J. et al. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.88, n.5, p.1269-1278, 2005. Available from: <<https://doi.org/10.1093/jaoac/88.5.1269>>. Accessed: Apr. 7, 2020. doi: 10.1093/jaoac/88.5.1269.

MARTYNENKO, A. & CHEN, Y. Degradation kinetics of total anthocyanins and formation of polymeric color in blueberry hydrothermodynamic (HTD) processing. **Journal of Food Engineering**, v.171, p.44-51, 2016. Available from:

<<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.10.008>>. Accessed: Apr. 1, 2021. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2015.10.008.

MINEKUS, M. et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food— an international consensus. **Food & Function**, v.5, n.6, p.1113-1124, 2014. Available from: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2014/fo/c3fo60702j>>. Accessed: Sep. 10, 2020. doi: 10.1039/C3FO60702J.

ORDÓÑEZ-SANTOS, L.E. & MARTÍNEZ-GIRÓN, J. Thermal degradation kinetics of carotenoids, vitamin C and provitamin A in tree tomato juice. **International Journal of Food Science & Technology**, v.55, n.1, p.201-210, 2020. Available from:

<<https://doi.org/10.1111/ijfs.14263>>. Accessed: May. 27, 2020. doi: 10.1111/ijfs.14263.

PATRAS, A. et al. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. **Trends in Food Science & Technology**, v.21, n.1, p.3-11, 2010. Available from: <<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.07.004>>. Accessed: Apr. 6, 2021. doi: 10.1016/j.tifs.2009.07.004.

PÉREZ-VICENTE, A. et al. In vitro gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.8, p.2308-2312, 2002. Available from:

<<https://doi.org/10.1021/jf0113833>>. Accessed: Apr. 8, 2020. doi: 10.1021/jf0113833.

QIU, J. et al. Formation and degradation kinetics of organic acids during heating and drying of concentrated tomato juice. **LWT**, v.87, p.112-121, 2018. Available from:

<<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.081>>. Accessed: Apr. 8, 2020. doi: 10.1016/j.lwt.2017.08.081.

RUIZ, B.G. et al. Spectrophotometric method for fast quantification of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in simple matrix for kinetics measurements. **Food Chemistry**, v.211, p.583-589, 2016. Available from: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.107>>. Accessed: Apr. 2, 2020. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.05.107.

## CAPÍTULO IV

### **INFLUÊNCIA DO PH E DO TIPO DE RESINA MACROPOROSA NAS PROPRIEDADES DE ADSORÇÃO/DESSORÇÃO E TERMODINÂMICAS NA SEPARAÇÃO DE ANTOCIANINAS DE Clitoria Ternatea L**

R.O. Santos<sup>1</sup>, L.M. Keller<sup>2</sup>, J.L.B. Júnior<sup>1,2</sup>, M.I.M.J. Barbosa<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA), Universidade Federal Rural de Rio de Janeiro (UFRRJ), Rodovia BR 465, Km 7, Seropédica/RJ, 23897-000, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Tecnologia de Alimentos, Instituto de Tecnologia-IT, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Rodovia BR 465, Km 7, Seropédica/RJ, 23897-000, Brasil.

**Manuscrito em preparação para ser enviado para Journal of Food Process Engineering (Qualis B1 - Ciência de alimentos/Capes).**



## RESUMO

A coloração intensa das pétalas das flores de feijão borboleta (*Clitoria Ternatea* L.) é proveniente das antocianinas, que são fitoquímicos antioxidantes que apresentam muitos benefícios à saúde. Os métodos convencionais de extração dessas substâncias fornecem soluções contendo, além desses pigmentos, subprodutos como açúcares, ácidos orgânicos e proteínas, que podem acelerar a degradação das antocianinas de interesse. Nesse contexto a utilização de resinas macroporosas vem apresentando destaque dentre os processos mais utilizados atualmente para a separação e purificação de compostos fenólicos em vegetais, pois além de ser um processo com baixo custo, as diferentes características de cada resina proporcionam uma maior seletividade no processo de adsorção/dessorção, possibilitando sistemas de alta concentração desses compostos adsorvidos pelas resinas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento de adsorção e dessorção de antocianinas extraídas das pétalas das flores de cunhã, utilizando seis diferentes resinas macroporosas de adsorção. As resinas XAD7HP e DAX8 apresentaram alta capacidade de adsorção, 248,55 mg/g e 228,84 mg/g, respectivamente, e os maiores valores de recuperação das antocianinas; 75,66% e 52,64%, respectivamente. As resinas XAD4 e a XAD16 apresentaram bons resultados no processo de adsorção, entretanto o rendimento da dessorção foi bastante inferior. O modelo de Langmuir foi o que melhor se ajustou aos dados experimentais das isotermas de adsorção para a resina DAX8. Por sua vez, o modelo de Freundlich foi o melhor utilizando a resina XAD7HP. O modelo de pseudo-segunda ordem foi o que melhor se ajustou aos dados experimentais das cinéticas de adsorção nas diferentes temperaturas utilizadas. As resinas macroporosas apresentaram resultados promissores na obtenção de extratos obtidos a partir do feijão borboleta com potencial de inovação para a indústria de alimentos.

**Palavras-chave:** Pigmento natural, purificação, cunhã

## ABSTRACT

The intense coloration of the petals of the butterfly bean flowers (*Clitoria Ternatea* L.) comes from anthocyanins, which are antioxidant phytochemicals that have many health benefits. Conventional methods for extracting these substances provide solutions containing, in addition to these pigments, by-products such as sugars, organic acids and proteins, which can accelerate the degradation of the anthocyanins of interest. In this context, the use of macroporous resins has been highlighted among the processes most used today for the separation and purification of phenolic compounds in vegetables, as in addition to being a low-cost process, the different characteristics of each resin provide greater selectivity in the process of adsorption/desorption, enabling systems of high concentration of these compounds adsorbed by resins. In this context, the objective of this work was to evaluate the adsorption and desorption behavior of anthocyanins extracted from the petals of the butterfly bean flowers, using six different macroporous adsorption resins. The XAD7HP and DAX8 resins showed high adsorption capacity, 248.55 mg/g and 228.84 mg/g, respectively, and the highest recovery values for anthocyanins; 75.66% and 52.64%, respectively. The XAD4 and XAD16 resins showed good results in the adsorption process, however the desorption yield was much lower. The Langmuir model was the best fit to the experimental data of the adsorption isotherms for the DAX8 resin. In turn, the Freundlich model was the best using XAD7HP resin. The pseudo-second order model was the one that best fit the experimental data of the adsorption kinetics at the different temperatures used. Macroporous resins showed promising results in obtaining extracts obtained from butterfly beans with potential for innovation for the food industry.

**Keywords:** Natural pigment, purification, cunhã

## 1. INTRODUÇÃO

A substituição dos corantes e outros aditivos sintéticos por outros cuja origem seja de fontes naturais, vem ganhando relevância nos últimos anos, devido à crescente demanda dos consumidores por produtos saudáveis, com reduzido teor de compostos sintéticos e que apresentem um menor impacto ao meio ambiente, dentro da tendência NAFNAC (no artificial flavour and colour). Além disso, alguns corantes sintéticos disponíveis têm seu uso proibido em alguns países, como na união europeia, devido aos sinais de toxicidade em curto e longo prazo, incluindo possíveis efeitos carcinogênicos relacionados ao seu consumo (AMCHOVA, KOTLOVA & RUDA-KUCEROVA, 2015; MARTINS *et al.*, 2016).

As antocianinas são pigmentos naturais largamente distribuídos na natureza e que apresentam efeitos biológicos benéficos, incluindo ações antimicrobiana, anti-inflamatória, vasodilatadora e antioxidantes (ACOSTA-ESTRADA, GUTIÉRREZ-URIBE & SERNA-SALDÍVAR, 2014). Estudos têm demonstrado que a inserção regular de substâncias antioxidantes na dieta pode produzir uma ação protetora contra os processos oxidativos, que naturalmente ocorrem no organismo (SHAHIDI & CHANDRASEKARA, 2017; CHEN *et al.*, 2018). Nesse sentido, a busca por novas fontes de corantes naturais, métodos de extração e aplicação desses pigmentos tem despertado interesse de diferentes segmentos, em especial da indústria de alimentos.

O feijão borboleta (*Clitoria ternatea* L.), também conhecido como cunhã, é uma leguminosa forrageira e perene originária da Ásia tropical, é uma planta tolerante a seca, podendo se desenvolver em áreas onde o regime pluvial é baixo. O stress sofrido pelas plantas durante o seu desenvolvimento natural, como ferimentos, radiação UV, baixo regime pluvial, infecções, entre outros, gera a formação de metabólitos secundários, substâncias de defesa das plantas em resposta ao estresse ambiental (BARROS, ROSSETTI & DE CARVALHO, 2004). Dessa forma, as pétalas de feijão borboleta apresentam vibrantes tons de azuis a roxeados, decorrentes da presença de antocianinas, principalmente da delfinidina, antocianina que pode apresentar diferentes estruturas dependendo de sua acilação, como ternatinas A1-A3, B1-B4, C1-C5, quercetina, entre outros (ESCHER *et al.*, 2020). Uma das diferenças existentes entre as antocianinas está no número de grupos hidroxílicos na molécula, na natureza e no número de açúcares ligados à molécula e na posição dessas

ligações, desse modo cada antocianina apresentará uma especificidade no processo de extração e separação (TANG & GIUSTI, 2018; BELWAL *et al.*, 2020).

Os métodos clássicos de separação e purificação de compostos bioativos a partir de plantas são, por exemplo, extração por fluido supercrítico, separação por membranas e extração com solventes orgânicos (DAI & MUMPER, 2010; FARÍAS-CAMPOMANES, ROSTAGNO & MEIRELES, 2013). Entretanto, estes métodos apontam desvantagens para produção em escala industrial pois requerem muito tempo para realização, geram alto custo, consumo de grande quantidade de solventes e pouca recuperação (FU *et al.*, 2006).

O processo de separação utilizando resinas macroporosas se destaca por seu baixo custo, boa seletividade e reduzido consumo de solvente orgânico, quando comparados aos métodos tradicionais de separação de diferentes fitoquímicos, sendo empregado na recuperação, concentração, separação e purificação de compostos vegetais (CHANDRASEKHAR, MADHUSUDHAN & RAGHAVARAO, 2012). Estudos apresentam resultados promissores na separação de antocianinas com a aplicação de resinas macroporosas, produzindo sistemas de alta concentração de antocianinas adsorvidas pelas resinas e utilizando soluções etanólicas como solvente no processo de dessorção (CHEN *et al.*, 2016; ZOU *et al.*, 2017).

As resinas macroporosas são polímeros que possuem características físico-químicas distintas, para uso de acordo com o composto de interesse e suas propriedades, além de elevada resistência mecânica e velocidade de adsorção (CAPELLO *et al.*, 2019). Esta seletividade está diretamente relacionada à estrutura, polaridade, tamanho de partícula, porosidade, área superficial do adsorvente e a fatores externos, como temperatura e pH.

A temperatura é bastante influenciada pela característica hidrofóbica de cada resina, de forma que o aumento da temperatura pode levar a uma diminuição na tensão superficial em resinas hidrofóbicas, ocasionando a maior migração do soluto e conseqüentemente maior adsorção. Em soluções com diferentes valores de pH ocorre uma seletividade no processo de adsorção diferente e específico para cada tipo de resina, sendo orientada pelas suas características físico-químicas como a polaridade (SCORDINO *et al.*, 2003; SCORDINO *et al.*, 2004; KAMMERER *et al.*, 2007). Nesse contexto, é de grande importância o estudo dessas variáveis para que o processo de adsorção e dessorção ocorram em condição ideal e apresentem maior produtividade e eficiência.

Embora as antocianinas provenientes de diferentes fontes tenham sido extensivamente estudadas para obtenção de pigmentos naturais (CORRÊA *et al.*, 2011; ALVAREZ *et al.*, 2019; ECHER *et al.*, 2020), o estudo das antocianinas oriundas de feijão borboleta é escassa, o que representa uma área potencial de pesquisa. Além disso, nenhum estudo foi realizado para investigar o comportamento da adsorção e dessorção das antocianinas de extrato de feijão borboleta em resinas macroporosas.

Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento das resinas XAD2, XAD4, XAD7HP, DAX8, XAD1180N e XAD16 na separação e purificação das antocianinas oriundas das pétalas de feijão borboleta, em diferentes condições de pH e temperatura, a fim de selecionar o melhor sistema-modelo de trabalho e estudar o comportamento das melhores resinas em ensaios de cinética, termodinâmica e isoterma.

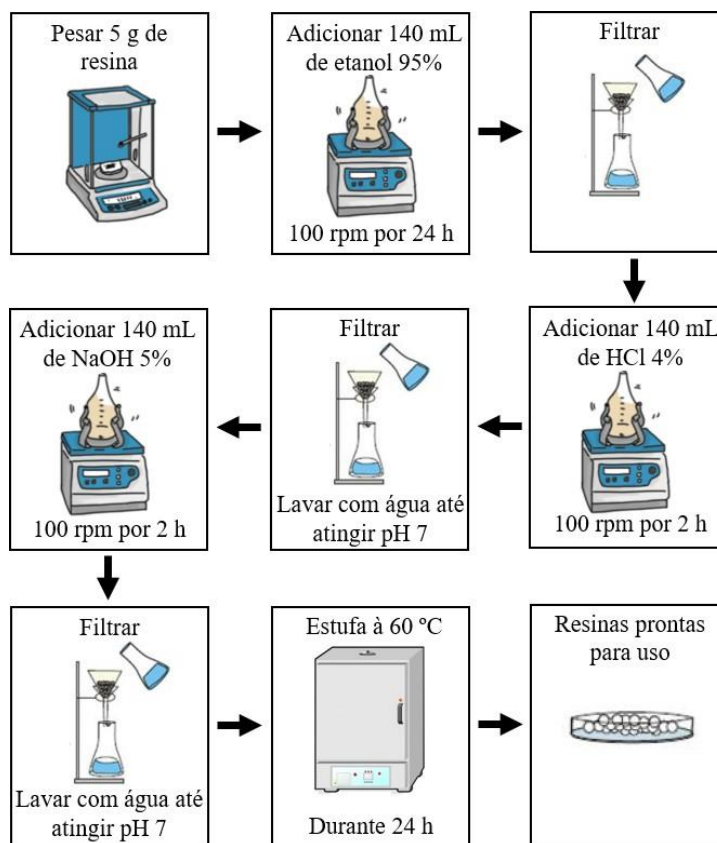
## **2. MATERIAIS E METODOS**

### **2.1. Materiais**

As amostras de feijão borboleta (*Clitoria Ternatea* L.) obtidas no Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA) localizado em Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil (latitude: 22°45'24" S; longitude: 43°40'27" O, Sistema geodésico brasileiro SIRGAS 2000). As resinas Amberlite (XAD2, XAD4, XAD7HP, DAX8, XAD1180N e XAD16) foram adquiridas da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Hidróxido de sódio, ácido acético glacial, ácido clorídrico, acetato de sódio, ácido bórico, cloreto de potássio, laurilsulfato e fosfato de sódio monobásico foram obtidos da Vetec (São Paulo, Brasil). O etanol foi obtido na Neon (São Paulo, Brasil).

### **2.2. Pré-tratamento das resinas**

O pré-tratamento das resinas (Tabela 1) foi realizado de acordo com a metodologia proposta por BURAN *et al.* (2014), descrito no esquema da figura 1, onde 5 g de cada resina foram tratadas em etanol (140 mL, 95% v/v) por 24 h em mesa orbital com controle de agitação e temperatura (NT712, Novatecnica, Piracicaba, Brasil) a temperatura ambiente.



**Figura 1**

**Figura 1:** Metodologia de ativação das resinas

Em seguida, as resinas foram lavadas com água destilada de forma exaustiva e colocadas em tratamento com 140 mL de solução aquosa de HCl (4% v/v) por 2 h em mesa orbital com controle de agitação e temperatura (NT712, Novatecnica, Piracicaba, Brasil) à temperatura ambiente. Após este procedimento, as resinas foram lavadas com água destilada, para assegurar pH 7, e em seguida colocadas em tratamento com 140 mL de solução aquosa de NaOH (5% m/v) por 2 h em mesa orbital com controle de agitação e temperatura (NT712, Novatecnica, Piracicaba, Brasil) a temperatura ambiente. Ao final desse procedimento, as resinas foram lavadas exaustivamente com água destilada, para assegurar pH 7 do eluente e o material foi seco em estufa (60 °C) até peso constante (Figura 1).

As características e propriedades físicas e químicas das seis resinas utilizadas nesse estudo são mostradas na tabela 1.

**Tabela 1:** Propriedades químicas e físicas das diferentes resinas macroporosas de adsorção/dessorção

Resinas	Matriz química	Polaridade	Área de superfície (m <sup>2</sup> /g)	Tamanho do poro (Å)
XAD2	Estireno-divinilbenzeno	Não polar	300	90
XAD4	Estireno-divinilbenzeno	Não polar	750	100
XAD7HP	Éster acrílico	Polar	500	450
DAX8	Éster acrílico	Moderadamente polar	160	225
XAD1180N	Estireno-divinilbenzeno	Não polar	500	400
XAD16	Estireno-divinilbenzeno	Não polar	800	200

**Fonte:** Fabricante Amberlite®

### 2.3. Preparação das soluções tampão

Para solução tampão de pH 3 foi dissolvido em água destilada 12 g de acetato de sódio, em seguida 6 mL de ácido acético glacial foram adicionados e a mistura avolumada até 1 L.

Para solução tampão de pH 5 foi adicionado 13,61 g de acetato de sódio tri-hidratado adicionado água destilada para completa dissolução até completar o volume do balão (1 L).

Para solução tampão de pH 9 foi dissolvido 12,37 g de ácido bórico e 14,91 g de cloreto de potássio em água destilada e a mistura avolumada a 1 L em balão volumétrico. Em seguida, 50 mL da solução obtida foi transferida para um balão volumétrico de 200 mL e adicionado 20 mL de hidróxido de sódio 0,20 M e 120 mL de água.

Para solução tampão de pH 11 foram dissolvidos 16,35 g de fosfato de sódio monobásico, 7,05 g de hidróxido de sódio e 3 g de laurilsulfato em água destilada e a mistura avolumada a 1 L em balão volumétrico.

## 2.4. Preparação dos extratos de feijão borboleta

As amostras de feijão borboleta foram submetidas a desidratação em estufa de circulação de ar a 45 °C por 5 horas (MAKASANA, *et al.*, 2016). Após a secagem, as flores foram trituradas em moinho (Moinho analítico A11, IKA, Brasil) até a obtenção de um pó fino que foi acondicionado em sob refrigeração e em ausência de luz.

Para o preparo dos extratos de flores de feijão borboleta (FB), 10,50 g do pó das pétalas secas foram dissolvidos em 1 L de solução tampão de pH 3, 5, 9 e 11 obtendo-se os EFB3, EFB5, EFB9 e EFB11, respectivamente (CAPELLO, *et al.*, 2019). Todos os extratos foram centrifugados a 3.500 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi coletado e filtrado (Micropore 0,45µm Agilent), antes dos ensaios de adsorção/dessorção.

## 2.5. Efeito do pH e do tipo de resina na adsorção/dessorção das antocianinas de extrato de flores feijão borboleta com resinas macroporosas

Os ensaios de adsorção seguiram a metodologia proposta por BURAN *et al.* (2014) e CHEN & ZHANG (2014) com pequenas modificações. 0,50 g de cada resina pré-tratada (XAD2, XAD4, XAD7HP, DAX8, XAD1180N e XAD16) e 10 mL dos extratos EFB3, EFB5, EFB9 e EFB11 preparados de acordo com o item 2.4., foram colocados em um erlenmeyer de 125 mL e submetidos a agitação (120 rpm) em mesa orbital com controle de agitação e temperatura (NT712, Novatecnica, Piracicaba, Brasil) a 30 °C por 24 h.

Para os ensaios de dessorção, as resinas submetidas a 24 h de adsorção foram retiradas do meio por filtração e lavadas em água destilada (~20 mL). Em seguida, as resinas e 20 mL de etanol (PA) foram colocados em um erlenmeyer de 125 mL, que foi submetido a agitação (120 rpm) em mesa orbital com controle de agitação e temperatura (NT712, Novatecnica, Piracicaba, Brasil) a 50 °C, por 24 h.

Todos os experimentos de adsorção e dessorção foram realizados em duplicata. As razões e capacidades de adsorção e dessorção foram calculadas com base nas seguintes equações:

$$A = 100 \times \frac{(C_0 - C_e)}{C_0} \quad \text{Equação 1}$$

$$q_e = \left( C_0 - C_e \right) \times \frac{V_0}{m} \quad \text{Equação 2}$$



onde  $A$  é a taxa de adsorção (%),  $q_e$  é a capacidade de adsorção (mg/g de resina seca) em equilíbrio,  $C_0$  é a concentração inicial de antocianinas nos extratos (mg/L),  $m$  é o peso inicial da resina (g),  $V_0$  é o volume de extrato utilizado (mL).

$$D = G_d \times \frac{V_d}{(C_0 - C_e) \times V_0} \quad \text{Equação 3}$$

$$q_d = G_d \times \frac{V_d}{m} \quad \text{Equação 4}$$

$$R = \frac{C_d \times V_d}{C_0 \times V_0} \times 100\% \quad \text{Equação 5}$$

onde  $D$  é a taxa de dessorção (%),  $q_d$  é a capacidade de dessorção (mg/g de resina),  $R$  (%) é a porcentagem de recuperação após completa dessorção,  $C_d$  é a concentração de antocianinas na solução de dessorção (mg/L),  $V_d$  é o volume da solução de dessorção (mL).

Em todos os ensaios de adsorção e de dessorção variando o pH e o tipo de resina, foi quantificado o teor das antocianinas monoméricas, conforme o item 2.6. As duas resinas que apresentaram a maior capacidade de adsorção e capacidade de liberação das antocianinas monoméricas de feijão borboleta, além da melhor condição de pH foram selecionados para serem utilizadas nos testes de isotermas, termodinâmica e cinética de adsorção.

## 2.6. Quantificação do teor de antocianinas monoméricas

As antocianinas monoméricas (MA) foram quantificadas pelo método de pH diferencial, descrito por LEE, DURST & WROLSTAD (2005) usando a cianidina 3-glicosídeo como referência. As amostras foram diluídas em pH 1 (tampão de cloreto de potássio, 0,025 M) e pH 4,50 (tampão de acetato de sódio, 0,40 M). Em seguida, eles foram agitados para homogeneização completa e a absorbância foi medida em 520 e 700 nm. A Equação 6 foi usada para calcular o conteúdo de antocianinas.

$$MA = \frac{|ABS|_{520nm} - |ABS|_{700nm}}{\epsilon \times MW \times DF \times 10^3} \quad \text{Equação 6}$$

onde  $MA$  é o teor de antocianinas monoméricas (mg. L<sup>-1</sup>),  $ABS$  é a leitura de absorbância ( $ABS_{520nm} - ABS_{700nm}$ ) em pH 1,0 - ( $ABS_{520nm} - ABS_{700nm}$ ) em pH 4,5,  $MW$  é o peso molecular (449,2 g/mol para cianidina-3-glucosídeo),  $DF$  é o fator de diluição e  $\epsilon$  é o coeficiente de extinção (26900 L. cm<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> para cianidina 3-glucosídeo).

## 2.7. Isotermas de adsorção e termodinâmica

A fim de investigar o efeito da temperatura e concentração inicial na adsorção do extrato de feijão borboleta, foram realizados experimentos de isoterma de adsorção. As resinas (XAD7HP e DAX8), previamente selecionadas de acordo com o item 2.5., foram submetidas a soluções de pH 5, previamente determinado nos ensaios de adsorção e dessorção, de acordo com o item 2.5., contendo diluições do extrato de feijão borboleta de 10, 15, 20, 25, 30 e 35 g/mL em 3 diferentes temperaturas (20, 30 e 40 °C).

Os dados experimentais da cinética de adsorção foram submetidos aos modelos referentes às equações:

$$\text{Langmuir: } Q_e = \frac{Q_m K_L C_e}{1 + K_L C_e} \quad \text{Equação 7}$$

$$\text{Freundlich: } Q_e = K_f C_e^{\frac{1}{n}} \quad \text{Equação 8}$$

onde  $Q_m$  é a capacidade de adsorção máxima teórica ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ),  $K_L$  é a constante de equilíbrio,  $K_f$  é a constante de Freundlich que indica a capacidade de adsorção do sistema,  $1/n$  é uma constante empírica relacionada a afinidade entre adsorvente e adsorvato (SANDHU & GU, 2013; CHEN *et al.*, 2016).

Os parâmetros termodinâmicos, incluindo a energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ), Entalpia ( $\Delta H$ ) e Entropia ( $\Delta S$ ) foram calculados de acordo com as equações 9 e 10.

$$\Delta G = -RT \ln K_L \quad \text{Equação 9}$$

$$\ln K_L = \frac{\Delta H}{R} \times \frac{1}{T} + \frac{\Delta S}{R} \quad \text{Equação 10}$$

onde R é o constante de gás ideal (8.314 J/mol K), T é a temperatura e  $K_L$  é a razão entre a quantidade adsorvida no sólido e a concentração de equilíbrio na solução (CAPELLO *et al.*, 2019).

## 2.8. Cinéticas de adsorção

200  $\mu\text{L}$  do extrato de feijão borboleta (10,50 g/L em pH 5) foram retirados a cada 15 min durante as duas primeiras horas, na terceira e quarta hora foram retirados a cada 30 min, na quinta e na sexta hora foram retirados a cada 45 min e na sétima e oitava hora ocorreram as retiradas a cada 60 min.

Os dados experimentais da cinética de adsorção foram submetidos aos modelos cinéticos referentes às equações:

$$\text{Pseudo 1ª ordem: } \ln(Q_e - Q_t) = \ln Q_e - k_1 \times t \quad \text{Equação 11}$$

$$\text{Pseudo 2ª ordem: } \frac{t}{Q_t} = \frac{1}{k_2 \times Q_e^2} + \frac{1}{Q_e} t \quad \text{Equação 12}$$

onde  $Q_e$  (mg/g) representa a capacidade de adsorção no equilíbrio e  $Q_t$  (mg/g) representa a capacidade de adsorção no tempo  $t$ ,  $k_1$  é a constante para a equação de pseudo primeira ordem,  $k_2$  é a constante para a equação de pseudo segunda ordem (GHASEMI *et al.*, 2014; BULLEN, SALEESONGSOM & WEISS, 2020).

## 2.9. Análise estatística

A análise estatística e ajustes dos modelos aos dados foram realizados com o software Statistic (Statsoft versão 7.0) e XLSTAT 2016. Todas as análises foram realizadas em triplicata, e os resultados foram expressos em médias seguidas de desvios-padrão. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por meio da análise de variância e do teste de Tukey, considerando um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

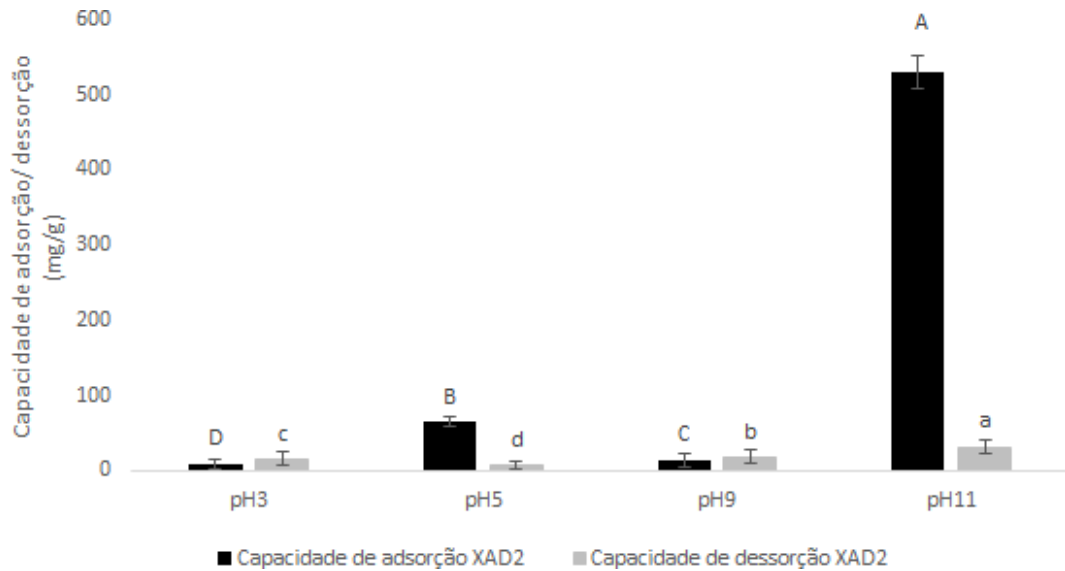
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Efeito do pH e do tipo de resina na adsorção/dessorção das antocianinas de extrato de flores feijão borboleta com resinas macroporosas

O pH afetou significativamente ( $p < 0,05$ ) a capacidade de adsorção e recuperação das antocianinas de feijão borboleta nas diferentes resinas avaliadas (Figuras 2 a 7). O pH apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para todas as resinas avaliadas em relação ao processo de adsorção, no qual selecionar e controlar o pH inicial das soluções é de extrema importância para o sucesso nas interações físico-químicas entre soluto e adsorvente (WU *et al.*, 2015).

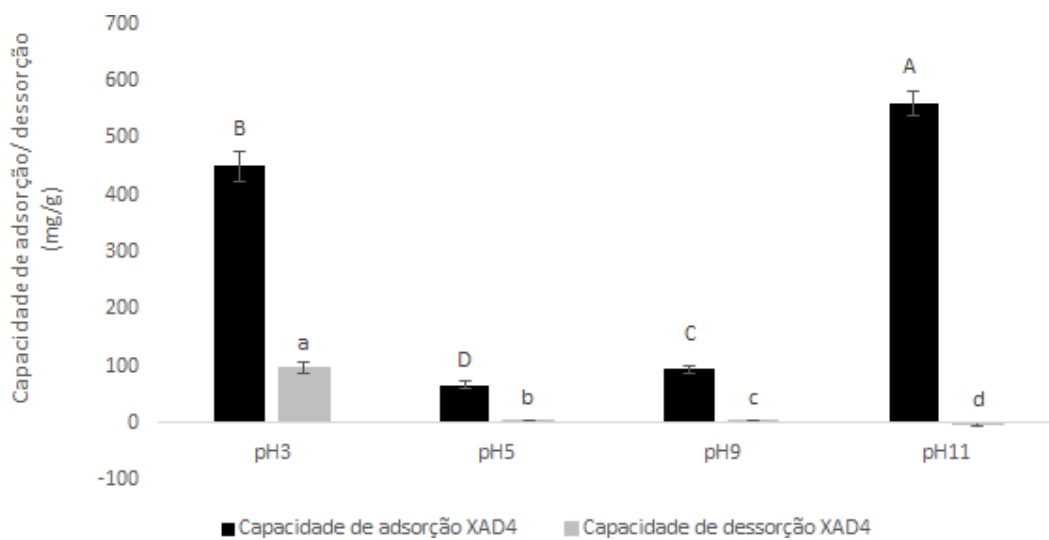
A resina XAD2 (figura 2) apresentou melhor capacidade de adsorção em pH 11 (529,65 mg/g) entretanto a capacidade de recuperação foi bastante reduzida (6,39%), semelhante aos outros valores de pH. A resina XAD4 (figura 3) apresenta bons resultados de capacidade de adsorção em pH 3 (450,77 mg/g) e pH 11 (561,70 mg/g). A resina XAD7HP, como mostra a figura 4, apresenta um equilíbrio maior entre as capacidades de adsorção e dessorção nos quatro valores de pH diferentes, apresentado melhores resultados em pH 5. A resina DAX8 (figura 5) também apresenta uma maior harmonia entre a capacidade de adsorção e dessorção nos quatro valores diferentes de pH. As capacidades de adsorção mais altas para a resina XAD1180N (figura 6) foram verificadas em pH 9 (360,02 mg/g) e pH 11 (529,01 mg/g), porém a capacidade de recuperação apresentou 29,64% e 1,79%, respectivamente. A resina XAD16 (figura 7) apresentou elevadas capacidades de adsorção em pH 11 (529,01 mg/g) e em pH 3 (459,42 mg/g), entretanto a capacidade de dessorção não foram tão expressivas.

Em pH 11 (Figuras 2 a 7) é possível verificar uma elevada capacidade de adsorção em todas as seis resinas, entretanto o percentual de recuperação é muito baixo, em algumas amostras até negativa, o que pode ser resultado da degradação das antocianinas nesse valor de pH (NACHTIGALL *et al.*, 2010; YONG *et al.*, 2019). O processo de adsorção ocorre através de ligações de hidrogênio ou forças de van der Waals, e essa diferença na capacidade de adsorção e dessorção ocorre devido as condições do meio e também das características individuais de cada resina (DAS, GOUD & DAS, 2018).



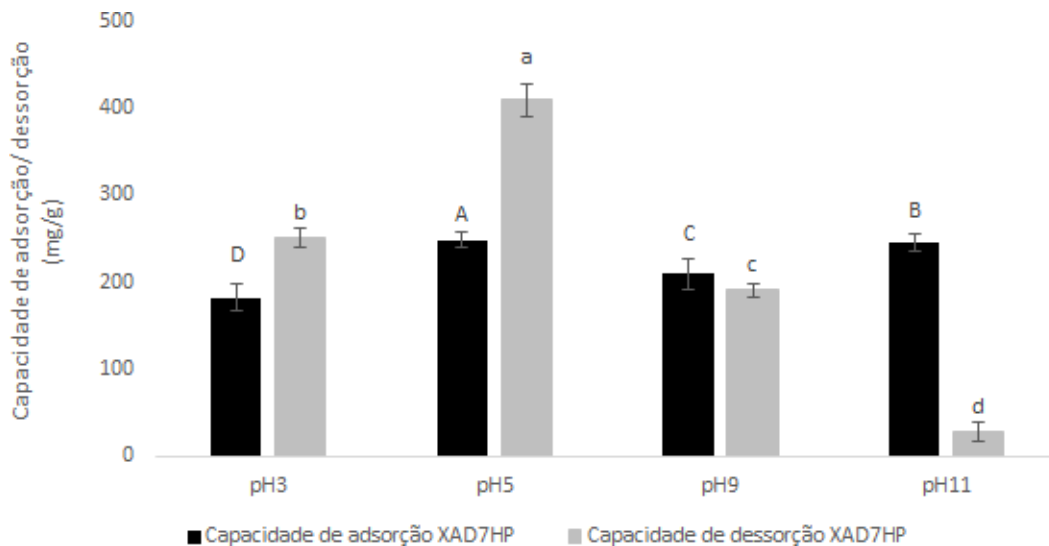
**Figura 2:** Ensaio em diferentes valores de pH para capacidade de adsorção e capacidade de desorção da resina XAD2

Letras maiúsculas diferentes apresentam diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre a capacidade de adsorção. Letras minúsculas diferentes apresentam diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre a capacidade de desorção.



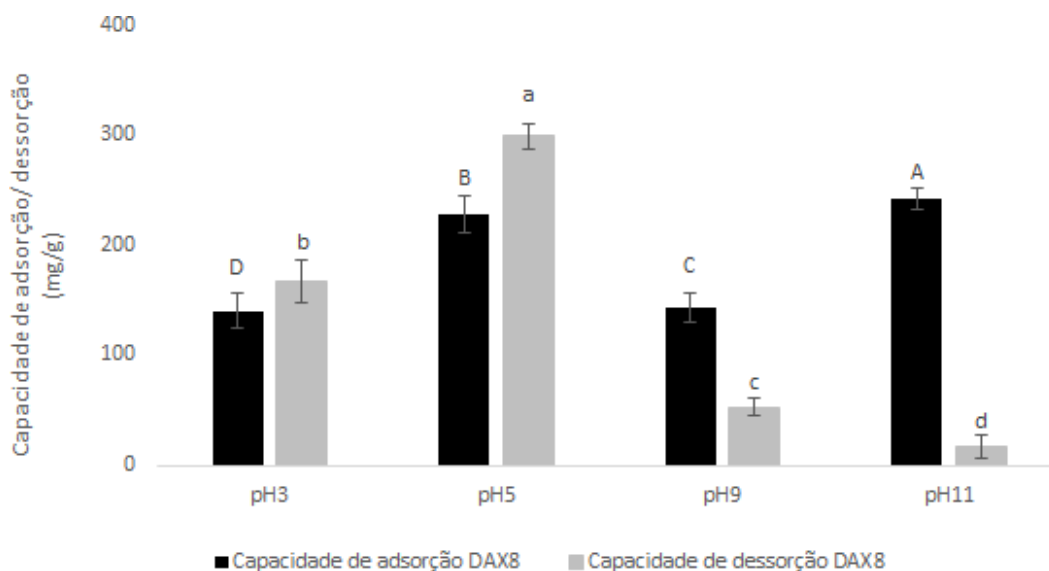
**Figura 3:** Ensaio em diferentes valores de pH para capacidade de adsorção e capacidade de desorção da resina XAD4

Letras maiúsculas diferentes apresentam diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre a capacidade de adsorção. Letras minúsculas diferentes apresentam diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre a capacidade de desorção.



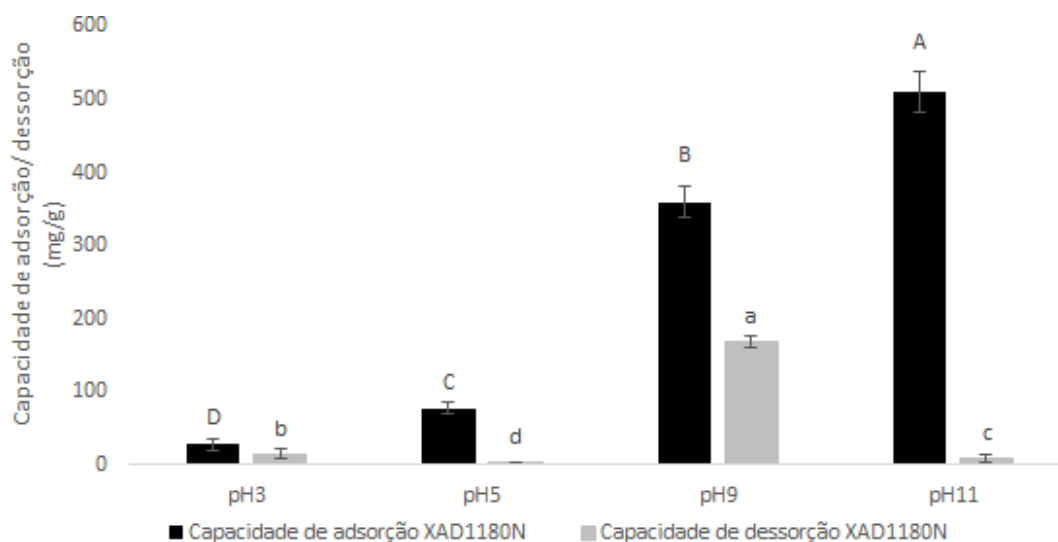
**Figura 4:** Ensaio em diferentes valores de pH para capacidade de adsorção e capacidade de desorção da resina XAD7HP

Letras maiúsculas diferentes apresentam diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre a capacidade de adsorção. Letras minúsculas diferentes apresentam diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre a capacidade de desorção.



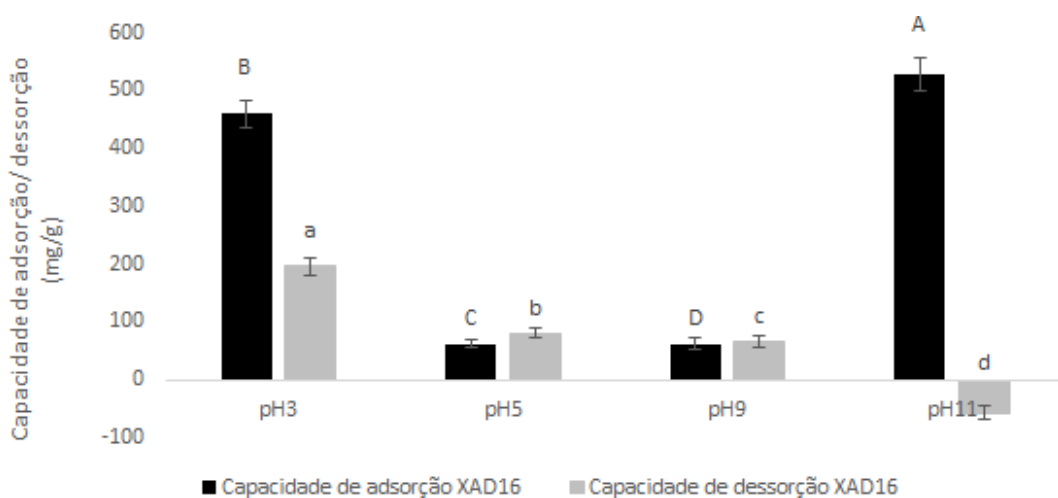
**Figura 5:** Ensaio em diferentes valores de pH para capacidade de adsorção e capacidade de desorção da resina DAX8

Letras maiúsculas diferentes apresentam diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre a capacidade de adsorção. Letras minúsculas diferentes apresentam diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre a capacidade de desorção.



**Figura 6:** Ensaio em diferentes valores de pH para capacidade de adsorção e capacidade de dessorção da resina XAD1180N

Letras maiúsculas diferentes apresentam diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre a capacidade de adsorção. Letras minúsculas diferentes apresentam diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre a capacidade de dessorção.



**Figura 7:** Ensaio em diferentes valores de pH para capacidade de adsorção e capacidade de dessorção da resina XAD16

Letras maiúsculas diferentes apresentam diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre a capacidade de adsorção. Letras minúsculas diferentes apresentam diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre a capacidade de dessorção.

As resinas apresentam diferenças em sua estrutura química, polaridade, tamanho de partícula, porosidade e área de superfície, o que influencia na capacidade de adsorção, que é a quantidade de antocianinas adsorvidas pela resina e na capacidade de dessorção,

caracterizada pela quantidade de antocianinas recuperadas pelo solvente de dessorção (CAPELLO *et al.*, 2019).

A resina XAD7HP (polar) e a resina DAX8 (moderadamente polar), mantiveram os melhores resultados na capacidade de adsorção e dessorção, sendo os resultados superiores verificados em pH 5 (figuras 4 e 5). Desse modo, as resinas XAD7HP e DAX8 foram selecionadas, evidenciando uma maior afinidade às antocianinas presentes no extrato de feijão borboleta, que pode ser justificada pela semelhança de polaridade entre as antocianinas e as resinas (JAMPANI, NAIK & RAGHAVARAO, 2014). O estudo de CHEN *et al.* (2016) com resinas macroporosas para extração de antocianinas de amora, também verificou que a resina XAD7HP mostrou melhor relação entre a capacidade de adsorção 86,45% e percentual de recuperação 80,81%.

Em pH, 5 foi verificado a melhor resposta das resinas XAD7HP e DAX8 para o capacidade de adsorção e dessorção das antocianinas de feijão borboleta, onde foi verificado a maior capacidade de adsorção, 248,55 mg/g para resina DAX7HP e 228,84 mg/g para resina DAX8, e também a maior porcentagem de recuperação das antocianinas, 75,66% e 52,64%, respectivamente. As resinas XAD4 (figura 3) e XAD16 (figura 7), como descrito na tabela 1, possuem as maiores áreas de superfície 750 e 800 m<sup>2</sup>/g, respectivamente, e em pH 3 apresentaram elevada capacidade de adsorção, porém a capacidade de dessorção foi reduzida (BURAN *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2016).

### **3.2. Isotermas de adsorção e termodinâmica**

Neste estudo foram aplicados, para o ajuste dos dados de adsorção em equilíbrio, dois dos modelos isotérmicos mais utilizados, Langmuir e Freundlich. O modelo de Langmuir reflete uma superfície adsorvente uniforme e adsorção de monocamada em locais homogêneos específicos e o modelo de Freundlich representa a adsorção de multicamadas em superfícies heterogêneas (JI *et al.*, 2010). Os coeficientes de correlação (tabela 2) mostram que para a resina XAD7HP o modelo isotérmico que melhor se ajusta é o de Freundlich, exceto em 20 °C, mesmo o modelo de Langmuir apresentando altos coeficientes de correlação, como é possível verificar na figura 8.



**Tabela 2:** Ajuste dos modelos de Langmuir e Freundlich nas resinas XAD7HP e DAX8

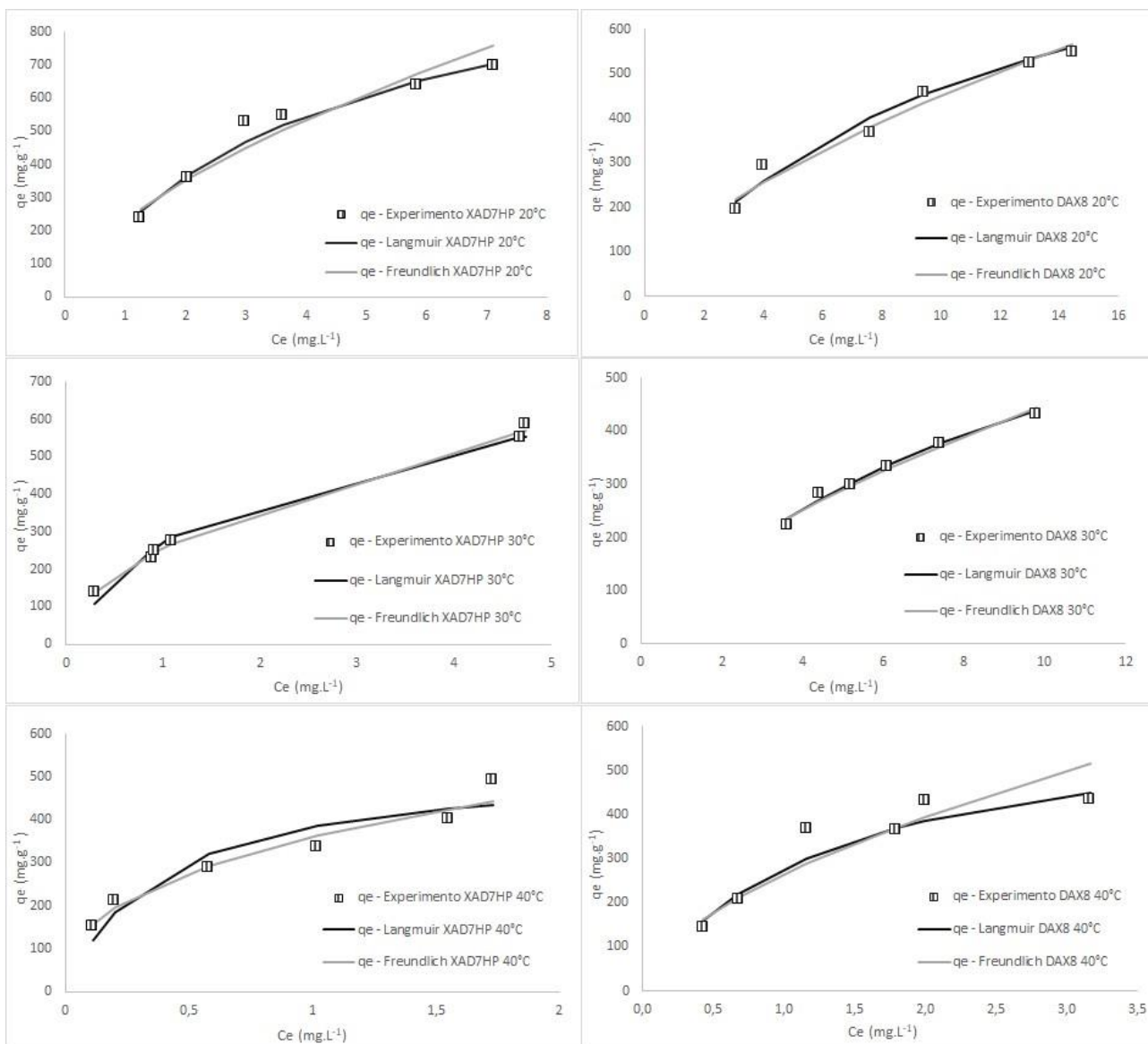
Temperatura (°C)	Langmuir			Freundlich		
	$Q_m$ (mg/g)	$K_L$ (L/mg)	$R^2$	$1/n$	$K_F$ (L/mg)	$R^2$
XAD7HP						
20	1111,11	0,24	0,96	0,61	231,74	0,93
30	769,23	0,54	0,98	0,51	256,45	0,99
40	526,32	2,71	0,94	0,38	360,00	0,97
DAX8						
20	1000,00	0,09	0,94	0,62	108,79	0,95
30	909,09	0,10	0,96	0,62	103,89	0,97
40	625,00	0,80	0,93	0,58	264,30	0,89

$Q_m$  = capacidade de adsorção máxima teórica;  $K_L$  = constante de equilíbrio;  $K_F$  = constante de Freundlich;  $1/n$  = constante empírica

CHEN & ZANG (2014) em seu estudo com folhas de *Vaccinium Bracteatum Thunb* utilizando resina NKA-2, também verificaram que ambos os modelos de ajuste, Langmuir e Freundlich, apresentaram valores altos de coeficiente de correlação.

A constante de Freundlich ( $K_F$ ) se manteve crescente com o aumento da temperatura e a constante empírica relacionada a afinidade entre adsorvente e adsorvato ( $1/n$ ) apresentou valor menor que 1 em todas as temperaturas estudadas, o que indica que a adsorção ocorreu de maneira favorável (CHAO *et al.*, 2014).

Já para a resina DAX8 o modelo que melhor se ajustou aos resultados foi o modelo de Langmuir, que apresentou altos valores para capacidade máxima de adsorção ( $Q_m$ ) na temperatura 20 e 30 °C, 1000,00 e 909,09 mg/g, respectivamente, o que mostra boa eficiência de adsorção da resina, e que corrobora com os valores da constante de equilíbrio ( $K_L$ ) que aumentaram conforme o aumento da temperatura.



**Figura 8:** Isotermas de adsorção das resinas XAD7HP e DAX8 baseadas nos modelos isotérmicos Langmuir e Freundlich

Os resultados dos ensaios termodinâmicos (tabela 3) mostram que para resina DAX8 o aumento da temperatura reduziu o valor de energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ), o que evidencia a maior viabilidade da reação em temperaturas mais altas, assim como para XAD7HP que quando submetida ao processo de adsorção a 40 °C apresentou um valor de  $\Delta G$  negativa, o que caracteriza em uma reação espontânea.

**Tabela 3:** Constantes dos modelos cinéticos de pseudo-primeira e pseudo-segunda ordem para as resinas XAD7HP e DAX8 no extrato de feijão borboleta

	Pseudo-primeira ordem				Pseudo-segunda ordem		
	Q <sub>e</sub> exp (mg/g)	Q <sub>e</sub> calc (mg/g)	K <sub>1</sub> (min <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	Q <sub>e</sub> calc (mg/g)	K <sub>2</sub> (min <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
XAD7HP	227,27	24,44	0,0064	0,92	228,56	0,00084	0,99
DAX8	207,67	41,12	0,0069	0,98	208,33	0,00049	0,99

Q<sub>e</sub> = capacidade de adsorção no equilíbrio; K<sub>1</sub> = constante para a equação de pseudo primeira ordem; K<sub>2</sub> = constante para a equação de pseudo segunda ordem

Os valores calculados para Entalpia ( $\Delta H$ ) foram positivos para ambas as resinas, sendo 91.570,40 (KJ/mol) para XAD7HP e 93.279,71 (KJ/mol) para DAX8, o que sugere que a reação apresenta um balanço energético positivo, indicando que ocorreu mais absorção de energia do que liberação, se caracterizando por uma reação endotérmica e mais favorável em temperaturas mais altas. O que corrobora com o que foi apresentado pelo estudo de GUO *et al.* (2018), que utilizou resina macroporosa NKA-II (resina de característica polar, assim como a XAD7HP e DAX8) para purificação de polifenóis oriundos de extratos de casca de kiwi, o estudo também verificou uma reação endotérmica em seu processo de adsorção.

A entropia ( $\Delta S$ ) no presente estudo de adsorção (tabela 4) apresentou valores positivos em ambas as resinas, o que resulta no aumento na aleatoriedade, na interface adsorbato/solução durante o processo de adsorção, ou seja, a reação de adsorção para ambas as resinas se caracteriza em uma reação espontânea (CHAO *et al.*, 2014).

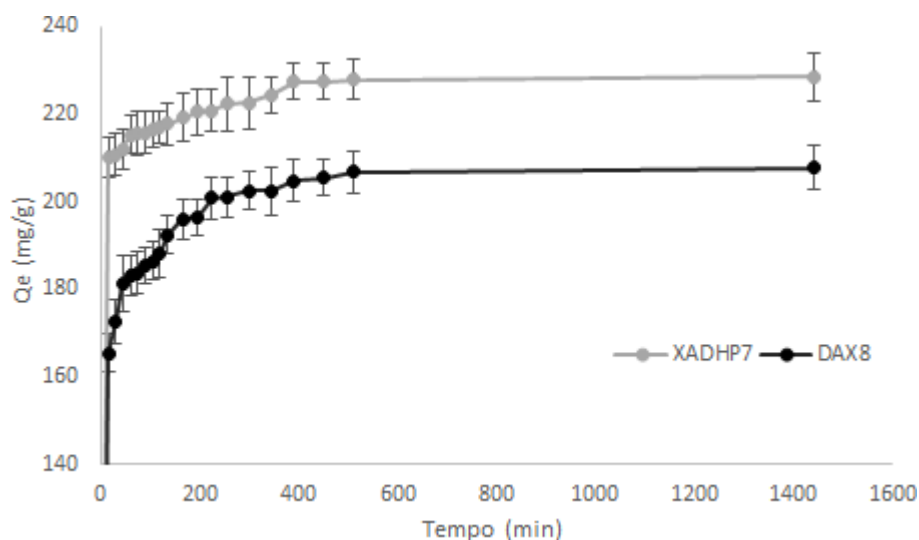
**Tabela 4:** Parâmetros termodinâmicos para a adsorção do extrato de feijão borboleta nas resinas XAD7HP e DAX8

	Temperatura (°C)	$\Delta G$ (KJ/mol)	$\Delta H$ (KJ/mol)	$\Delta S$ (J/mol)
XAD7HP	20	3446,20		
	30	1542,95	91570,40	299,57
	40	-2594,34		
DAX8	20	5920,50		
	30	5903,38	93279,71	261,16
	40	580,68		

$\Delta G$ = energia livre de Gibbs;  $\Delta H$ = entalpia;  $\Delta S$ = entropia

### 3.3. Cinéticas de adsorção

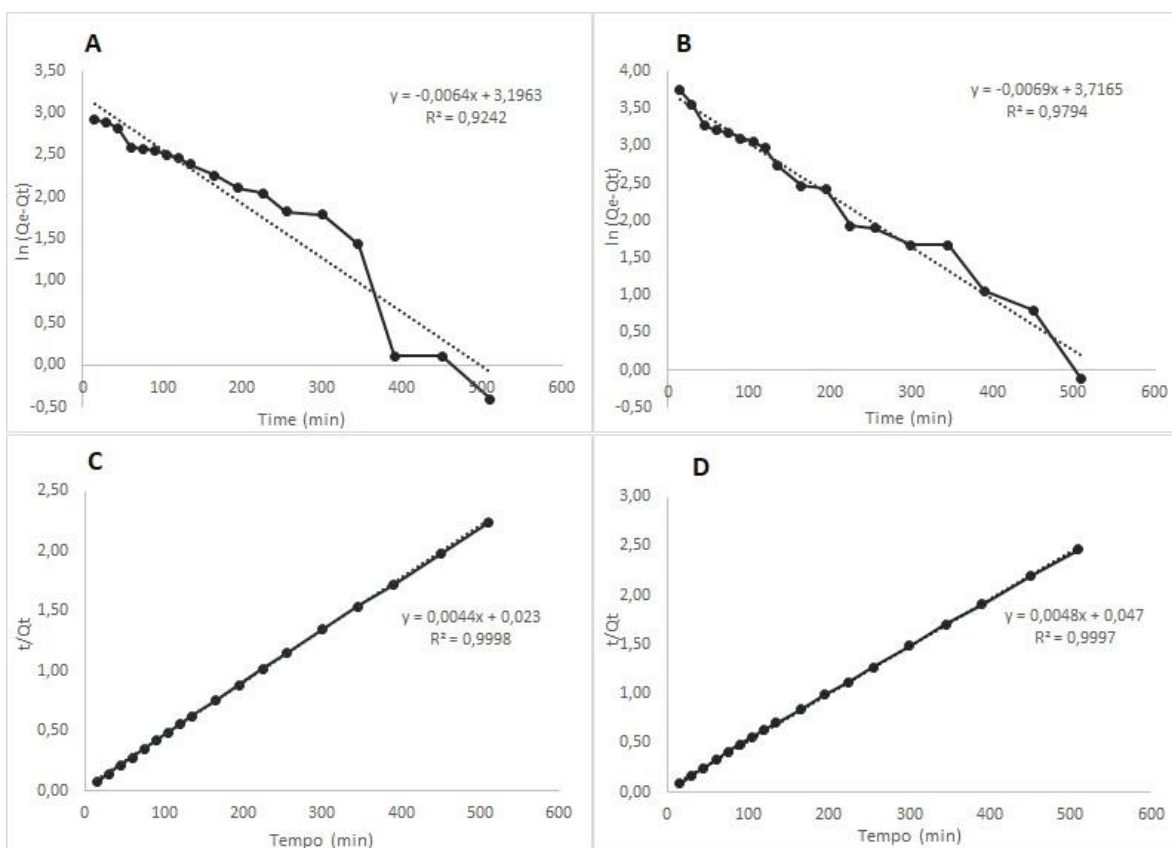
As características da capacidade de adsorção em função do tempo estão apresentadas na figura 9, onde é possível verificar que tanto na resina XAD7HP como na resina DAX8 a capacidade de adsorção no equilíbrio ocorreu, aproximadamente, em 400 minutos após o início do processo de adsorção para ambas as resinas. As resinas apresentaram alta capacidade de adsorção logo nos primeiros minutos, onde a resina DAX7HP atingiu os maiores valores, chegando a 210,09 mg/g após 15 minutos do início da adsorção, sendo que o maior valor da capacidade de adsorção, para abas, ocorreu no equilíbrio. Essa tendência na curva de adsorção também foi verificada por PARK & LEE (2021) em seu estudo utilizando a resina XAD7HP, e outras quatro resinas, no processo de adsorção e dessorção para purificação de compostos fenólicos em alga marinha.



**Figura 9:** Cinética de adsorção utilizando resina macroporosa em extrato de feijão borboleta

O modelo cinético de pseudo-primeira ordem geralmente apresenta bons ajustes ao longo do estágio inicial do processo de adsorção, enquanto o modelo de pseudo-segunda ordem prevê o comportamento ao longo de todo processo de adsorção (PARK & LEE, 2021). Após a aplicação dos dois modelos experimentais, foi possível verificar que o modelo cinético de pseudo-segunda ordem melhor descreve a adsorção das antocianinas oriundas das pétalas de feijão borboleta. Mesmo o modelo de pseudo-primeira apresentar, para ambas as

resinas, elevados valores de coeficientes de correlação, como 0,92 para XAD7HP (figura 10A) e 0,98 para DAX8 (figura 10B), o modelo não apresenta concordância entre valores dos coeficientes preditos e experimentais (tabela 3), o valor de  $Q_e$  experimental da XAD7HP é 9,29 vezes maior que o  $Q_e$  calculado, o que corrobora com os melhores resultados apresentados após aplicação do modelo cinético de pseudo-segunda ordem, como apresentando na figura 10C com a modelagem de dados cinética de pseudo-segunda ordem na resina XAD7HP e figura 10D com a modelagem de dados cinética de pseudo-segunda ordem na resina DAX8 (SANDHU & GU, 2013; MENG, GUI & YUN, 2021). O modelo de pseudo-segunda ordem também apresentou melhor ajuste no estudo de CHE ZAIN et al. (2021) com a resina macroporosa XAD7HP para adsorção de flavonoides em extrato de folhas de dendê.



**Figura 10:** Modelagem de dados cinéticos aplicando cinética de pseudo-primeira ordem na resina XAD7HP (A) e na resina DAX8 (B), e modelagem de dados cinética de pseudo-segunda ordem na resina XAD7HP (C) e na resina DAX8 (D)

As constantes de velocidade,  $k_1$  e  $k_2$  para os modelos de pseudo-primeira e pseudo-segunda ordem, respectivamente, foram maiores para a resina XAD7HP, o que demonstra sua alta capacidade de adsorção em compostos fenólicos, justificado também pela sua área de superfície e tamanho de poro.

#### 4. CONCLUSÃO

As resinas XAD7HP e DAX8 apresentaram os melhores resultados em capacidade de adsorção e dessorção no processo de separação e purificação das antocianinas de feijão borboleta. A análise do processo de adsorção e dessorção em diferentes valores de pH mostrou que o pH 5 foi o mais promissor, chegando a uma capacidade de adsorção de 228,84 mg/g para resina DAX8 e porcentagem de recuperação de 75,66% das antocianinas para XAD7HP. O modelo de pseudo-segunda ordem, apresenta coeficiente de correlação 0,99 para ambas as resinas. Os dados da isoterma mostraram que o modelo que melhor se ajustou aos resultados da resina XAD7HP foi o modelo de Freundlich, mesmo o modelo de Langmuir apresentando altos coeficientes de correlação, já para a resina DAX8 o modelo de Langmuir apresentou melhor ajuste aos resultados. Por fim, as isotermas de adsorção se comportaram de forma endotérmica e, conseqüentemente, se mostraram mais favoráveis em temperaturas mais altas.

O presente estudo é de grande relevância para uma maior compreensão dos parâmetros e condições de adsorção e dessorção, importantes para a consolidação do processo de separação das antocianinas oriundas das pétalas da flor de feijão borboleta.

## 5. REFERÊNCIAS

ACOSTA-ESTRADA, B. A., GUTIÉRREZ-URIBE, J. A. & SERNA-SALDÍVAR, S. O. Bound phenolics in foods, a review. **Food chemistry**, v. 152, p. 46-55, 2014.

ALVAREZ, C. E., CONTRERAS, J. L., RODRIGUEZ, D. E., RONDON, D. J., MUNOZ, W. B., & MEZQUITA, P. C. Aplicacion de microencapsulado de antocianinas extraidas de repollo morado en bebidas lacteas fermentadas. **Acta Agronomica**, v. 68, n. 2, p. 134-142, 2019.

AMCHOVA, P., KOTLOVA, H. & RUDA-KUCEROVA, J. Health safety issues of synthetic food colorants. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 73, p. 914-922, 2015.

BARROS, N. N., ROSSETTI, A. G. & DE CARVALHO, R. B. Fenó de cunhã (*Clitoria ternatea* L.) para acabamento de cordeiros. **Embrapa Caprinos e Ovinos- Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2004.

BELWAL, T., LI, L., YANQUN, X., CRAVOTTO, G., & LUO, Z. Ultrasonic-assisted modifications of macroporous resin to improve anthocyanin purification from a *Pyrus communis* var. Starkrimson extract. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 62, p. 104853, 2020.

BULLEN, J., SALEESONGSOM, S., & WEISS, D. A revised pseudo-second order kinetic model for adsorption, sensitive to changes in sorbate and sorbent concentrations, 2020.

BURAN, T. J., SANDHU, A. K., LI, Z., ROCK, C. R., YANG, W. W., & GU, L. Adsorption/desorption characteristics and separation of anthocyanins and polyphenols from blueberries using macroporous adsorbent resins. **Journal of Food Engineering**, v. 128, p. 167-173, 2014.

CAPELLO, C., LEANDRO, G. C., CAMPOS, C. E. M., HOTZA, D., CARCIOFI, B. A. M., & VALENCIA, G. A. Adsorption and desorption of eggplant peel anthocyanins on a synthetic layered silicate. **Journal of Food Engineering**, v. 262, p. 162-169, 2019.

CHANDRASEKHAR, J.; MADHUSUDHAN, M. C. & RAGHAVARAO, K. S. M. S. Extraction of anthocyanins from red cabbage and purification using adsorption. **Food and bioproducts processing**, v. 90, n. 4, p. 615-623, 2012.

CHAO, Y., ZHU, W., YAN, B., LIN, Y., XUN, S., JI, H., ... & HAN, C. Macroporous polystyrene resins as adsorbents for the removal of tetracycline antibiotics from an aquatic environment. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 131, n. 15, 2014.

CHE ZAIN, M. S., LEE, S. Y., TEO, C. Y., & SHAARI, K. Adsorption/Desorption Characteristics and Simultaneous Enrichment of Orientin, Isoorientin, Vitexin and Isovitexin from Hydrolyzed Oil Palm Leaf Extract Using Macroporous Resins. **Processes**, v. 9, n. 4, p. 659, 2021.

CHEN, Y., & ZHANG, D. Adsorption kinetics, isotherm and thermodynamics studies of flavones from *Vaccinium Bracteatum* Thunb leaves on NKA-2 resin. **Chemical Engineering Journal**, v. 254, p. 579-585, 2014.

CHEN, Y., ZHANG, W., ZHAO, T., LI, F., ZHANG, M., LI, J., ... & YANG, L. Adsorption properties of macroporous adsorbent resins for separation of anthocyanins from mulberry. **Food Chemistry**, v. 194, p. 712-722, 2016.

CHEN, Y., HUNG, Y. C., CHEN, M., LIN, M. E LIN, H. Enhanced storability of blueberries by acidic electrolyzed oxidizing water application may mediated by regulating ROS metabolism. **Food Chemistry**, v. 270, p. 229-235, 2018.

CORRÊA, A. D., SACZK, A. A., MARTINS, M. P., & CASTILHO, R. O. Antocianinas, estabilidade dos pigmentos e atividade antioxidante na jabuticaba [*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg]. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 33, p. 877-87, 2011.

DAI, J. & MUMPER, R. J. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v. 15, p. 7313–7352, 2010.

DAS, A. B., GOUD, V. V. & DAS, C. Adsorption/desorption, diffusion, and thermodynamic properties of anthocyanin from purple rice bran extract on various adsorbents. **Journal of Food Process Engineering**, v. 41, n. 6, p. e12834, 2018.

ECHER, M. D. M., GUIMARÃES, V. F., INAGAKI, A. M., DALASTRA, G. M., & Hachmann, T. L. Photosynthetic pigments and gas exchange in red and green cabbage under no-tillage and conventional systems<sup>1</sup>. **Revista Ciência Agronômica**, v. 51, 2020.

ESCHER, G. B., WEN, M., ZHANG, L., ROSSO, N. D., & GRANATO, D. Phenolic composition by UHPLC-Q-TOF-MS/MS and stability of anthocyanins from *Clitoria ternatea* L.(butterfly pea) blue petals. **Food chemistry**, v. 331, p. 127341, 2020.



FARÍAS-CAMPOMANES, A. M.; ROSTAGNO, M. A. & MEIRELES, M. A. A. Production of polyphenol extracts from grape bagasse using supercritical fluids: Yield, extract composition and economic evaluation. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 77, p. 70–78, 2013.

FU, Y.; ZU, Y.; LIU, W.; EFFERTH, T.; ZHANG, N.; LIU, X. & KONG, Y. Optimization of luteolin separation from pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] leaves by macroporous resins. **Journal of Chromatography A**, v. 1137, p. 145–152, 2006.

GHASEMI, M., GHASEMI, N., ZAHEDI, G., ALWI, S. R. W., GOODARZI, M., & JAVADIAN, H. Kinetic and equilibrium study of Ni (II) sorption from aqueous solutions onto *Peganum harmala*-L. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 11, n. 7, p. 1835-1844, 2014.

GUO, C., QIAO, J., ZHANG, S., REN, X., & LI, M. Purification of polyphenols from kiwi fruit peel extracts using macroporous resins and high - performance liquid chromatography analysis. **International journal of food science & technology**, v. 53, n. 6, p. 1486-1493, 2018.

KAMMERER, D. R., SALEH, Z. S., CARLE, R., & STANLEY, R. A. Adsorptive recovery of phenolic compounds from apple juice. **European Food Research and Technology**, v. 224, n. 5, p. 605-613, 2007.

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

Ji, L., SHAO, Y., XU, Z., ZHENG, S., & ZHU, D. Adsorption of monoaromatic compounds and pharmaceutical antibiotics on carbon nanotubes activated by KOH etching. **Environmental science & technology**, 44, n. 16, p. 6429-6436, 2010.

LEE, J., DURST, R. W., WROLSTAD, R. E., & COLLABORATORS. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. **Journal of AOAC international**, v. 88, n. 5, p. 1269-1278, 2005.

MAKASANA, J., DHOLAKIYA, B. Z., GAJBHIYE, N. A., BISHOYI, A. K., & RAJU, S. Assessment of chemical diversity in *Clitoria ternatea* accessions by an improved

and validated HPTLC method. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v. 86, n. 9, p. 1133-1139, 2016.

MARTINS, N., RORIZ, C. L., MORALES, P., BARROS, L. & FERREIRA, I. C. Food colorants: Challenges, opportunities and current desires of agro-industries to ensure consumer expectations and regulatory practices. **Trends in Food Science & Technology**, v. 52, p. 1-15, 2016.

MENG, L., GUI, X., & YUN, Z. Static and dynamic studies of adsorption by four macroporous resins to enrich oridonin from *Rabdosia rubescens*. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 32, p. 151-158, 2021.

NACHTIGALL, A. M., SILVA, P. I., BERTOLDI, M. C., & STRINGHETA, P. C. IMPACTO DA LUZ, pH, ÁCIDO ASCÓRBICO E GLICOSE NA ESTABILIDADE DE ANTOCIANINAS DA FONTE NÃO USUAL “MARIA-PRETINHA”(Solanum americanum, Mill.). **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 28, n. 2, 2010.

PARK, J. J., & LEE, W. Y. Adsorption and desorption characteristics of a phenolic compound from *Ecklonia cava* on macroporous resin. **Food Chemistry**, v. 338, p. 128150, 2021.

SANDHU, A. K., & GU, L. Adsorption/desorption characteristics and separation of anthocyanins from muscadine (*Vitis rotundifolia*) juice pomace by use of macroporous adsorbent resins. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 7, p. 1441-1448, 2013.

SCORDINO, M., DI MAURO, A., PASSERINI, A., & MACCARONE, E. Adsorption of flavonoids on resins: hesperidin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 24, p. 6998-7004, 2003.

SCORDINO, M., DI MAURO, A., PASSERINI, A., & MACCARONE, E. Adsorption of flavonoids on resins: cyanidin 3-glucoside. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 7, p. 1965-1972, 2004.

SHAHIDI, F. & CHANDRASEKARA, A. Interaction of phenolics and their association with dietary fiber. **Dietary Fiber Functionality in Food and Nutraceuticals: From Plant to Gut**, p. 21-44, 2017.

TANG, P. & GIUSTI, M. M. Black Goji as a Potential Source of Natural Color in a Wide pH Range. **Food Chemistry**, v. 269, p. 419-426, 2018.

WU, S., WANG, Y., GONG, G., LI, F., REN, H., & LIU, Y. Adsorption and desorption properties of macroporous resins for flavonoids from the extract of Chinese wolfberry (*Lycium barbarum* L.). **Food and Bioprocess Processing**, v. 93, p. 148-155, 2015.

YONG, H., WANG, X., ZHANG, X., LIU, Y., QIN, Y., & LIU, J. Effects of anthocyanin-rich purple and black eggplant extracts on the physical, antioxidant and pH-sensitive properties of chitosan film. **Food Hydrocolloids**, v. 94, p. 93-104, 2019.

ZOU, Y.; ZHAO, M.; LIN, L.; WANG, Y. Enrichment of antioxidants in black garlic juice using macroporous resins and their protective effects on oxidation-damaged human erythrocytes. **Journal of Chromatography B**, v.1060, p. 443-450, 2017.

## CONCLUSÃO GERAL

A utilização de corantes naturais como alternativa aos corantes sintéticos utilizados nas indústrias apresenta diversos estudos em sistemas-modelo de *soft drinks* e aquosos, explorando diferentes tecnologias para uma melhor aplicação desses corantes naturais. Em sua grande maioria, esses tipos de produtos hoje no mercado são adicionados de corantes sintéticos, o que evidencia a importância e relevância desses estudos para atender aos consumidores que atualmente procuram por produtos que apresente uma composição mais natural e com redução de compostos sintéticos.

O estudo de prospecção tecnológica de patentes realizado para identificar os avanços tecnológicos e o posicionamento do mercado em relação a extração e purificação de antocianinas utilizando resina macroporosa se mostrou uma técnica bastante difundida e bem utilizada mundialmente, tanto em empresas como em centros de pesquisas e universidades, e que a China é o país que possui maior destaque em número de depósitos de patentes nessa área no mundo, o que demonstra um grande avanço dessa tecnologia no país.

Dentre os corantes naturais mais estudados as antocianinas é um grupo que apresenta grande destaque, e nesse sentido foram selecionadas as flores de feijão borboleta para estudo de viabilização das antocianinas presentes nas pétalas para dessas flores como corante natural. O estudo utilizando o extrato de pétalas de feijão borboleta em sistema modelo isotônico verificou que as antocianinas apresentaram boa estabilidade térmica, sendo a maior degradação (52,40%), após os 180 minutos foi verificada na amostra de solução tampão com adição de ácido ascórbico e submetida a 80 °C. A investigação da estabilidade digestiva do ácido ascórbico e das antocianinas nas amostras de sistema modelo isotônico mostrou que, nas três diferentes temperaturas, o ácido ascórbico apresentou maior estabilidade na fase gástrica e que as antocianinas bioacessíveis se mantiveram acima de 41,00% ao final da fase intestinal.

Dentre as seis diferentes resinas macroporosas estudadas, as resinas DAX8 e XAD7HP demonstraram-se mais eficientes na obtenção de extratos purificados de antocianinas provenientes das de feijão borboleta, o que foi definido pela maior de capacidade de adsorção/dessorção e percentual de recuperação apresentada pelas duas resinas. Cada resina foi estudada em quatro diferentes faixas de pH (3, 5, 9 e 11), dentre os

quais foram observados que os maiores percentuais de adsorção e dessorção foram atingidos em pH 5. Após a seleção das resinas e do pH a ser utilizado, foram realizados estudos de cinética, termodinâmica e isothermas, mostrando que o equilíbrio da capacidade de adsorção ocorreu em aproximadamente 400 minutos após o início da adsorção, em ambas as resinas, e que o processo se caracteriza em uma reação endotérmica, que ocorre de forma mais favorável em temperaturas mais altas.

Os resultados deste estudo revelaram que o uso de antocianinas, como fonte de corante natural, vem ganhando cada vez mais destaque e que a utilização de resinas macroporosa para extração e purificação dessas antocianinas é um processo eficiente, com baixo custo e bastante difundido por empresas e centros de pesquisa pelo mundo, e que o uso de flores de feijão borboleta como corante natural apresenta grande potencial.

## APÊNDICE I

# **Guia Básico primeiros passos para patentear sua invenção**

# **Como patentear minha invenção?**

**Identificando sua invenção e fazendo  
a busca de anterioridades**

## APRESENTAÇÃO

A inovação tecnológica tem sido uma das agendas preponderantes na pauta do desenvolvimento econômico nacional, entretanto o incentivo à inovação e proteção tecnológica no país apresenta uma evolução ainda lenta. Nesse contexto, o presente manual tem como objetivo auxiliar os depositantes de patentes com os conceitos básicos no processo inicial de uma patente, com referência na Lei da Propriedade Industrial nº 9279/1996 (LPI), instruções normativas e resoluções vigentes. Explicando, de forma didática, as regras para patenteabilidade, o que não é considerado invenção pela legislação brasileira e como alguns acordos internacionais influenciam no processo de requerimento de uma patente.

O manual traz exemplos em diferentes áreas técnicas com a finalidade de aproximar as discussões levantados no presente manual, com o cotidiano e questionamentos dos depositantes, como a importância do entendimento da invenção, do que constitui a invenção e quais são de fato as características tecnológicas. Abordaremos, em geral, exemplos na área de alimentos, distinguindo frente ao já encontrado no estado da técnica, o que se caracteriza como invenção. Ter esse conceito bem definido gera impacto ao longo de todo processo de caracterização da invenção, busca de anterioridades e análise dos documentos.

Assim, espera-se que esse guia possa esclarecer o início do processo de construção do pedido de patente de invenção, além de incentivar o uso da proteção industrial como ferramenta de inovação, estímulo para o desenvolvimento e crescimento da pesquisa.

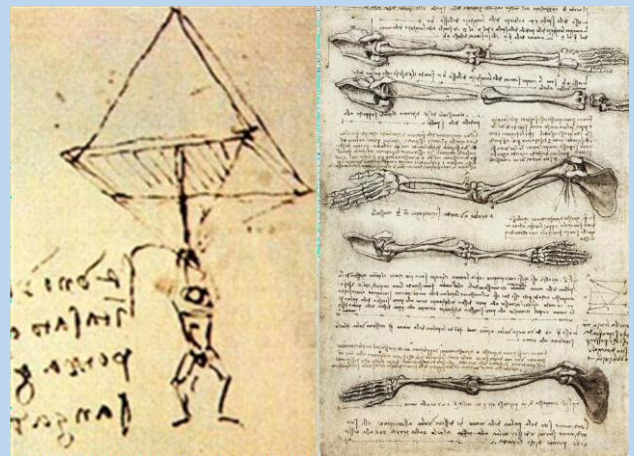
Nosso objetivo não é esgotar o tema ou mesmo ser um guia definitivo – está longe disso! – mas o de ser uma importante ferramenta nos momentos iniciais desse processo. Assim, esse pequeno manual está organizado de forma a trazer informações fundamentais para que você possa dar seus primeiros passos no sentido de patentear sua invenção.

## O que é uma patente?

Dito de forma simples, uma patente é um título de propriedade temporário conferido pelo estado ao detentor de uma **invenção** ou **modelo de utilidade**. Conforme definição do INPI<sup>5</sup>. Nesse trabalho iremos abordar apenas patentes de invenção.

*“A patente é um título de propriedade temporário, oficial, concedido pelo Estado, por força de lei, ao seu titular ou seus sucessores (pessoa física ou pessoa jurídica), que passam a possuir os direitos exclusivos sobre o bem, seja de um produto, de um processo de fabricação ou aperfeiçoamento de produtos e processos já existentes, objetos de sua patente. Terceiros podem explorar a patente somente com permissão do titular (mediante uma licença).”*

Chama-se **invenção** o ato de criação de uma nova tecnologia, seja em um processo, objeto ou sistema, ou um aperfeiçoamento de tecnologias pré-existentes. Em ambos os casos como resultado de um trabalho dirigido a resolução de problemas específicos. O termo não deve ser confundido com **descoberta**, que é a aquisição de um conhecimento já existente.



Esboços de Leonardo da Vinci. À esquerda um modelo de pára-quadras, que foi o aprimoramento de outro desenho (de um anônimo) do período renascentista, o que pode ser considerada uma invenção. À direita os seus estudos anatômicos, no qual revelou diversas estruturas do corpo humanos, o que pode ser considerada uma descoberta.

*Imagens Wikimedia Commons*

<sup>5</sup> Manual Básico para Proteção por Patentes de Invenções, Modelos de Utilidade e Certificados de Adição. Versão 2021/06. INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.



## **Convenção da união de Paris (CUP)**

A Convenção de Paris foi o primeiro acordo internacional relativo à Propriedade Intelectual. Foi assinado em 1883 e continua em vigor até hoje. Esse acordo estabelece os quatro princípios fundamentais de uma patente:

- **Territorialidade**

A proteção conferida por uma patente tem validade somente nos limites territoriais do país que a concede. Assim, não existe “patente mundial”, elas são sempre nacionais ou, no máximo, regionais, quando um grupo de países, por meio de acordos bilaterais ou multilaterais estabelecem tal regime.

- **Tratamento nacional**

Os nacionais de cada um dos países membros do acordo gozam, em todos os outros países membros a União, da mesma proteção, vantagens e direitos concedidos pela legislação do país a seus nacionais, sem que nenhuma condição de domicílio ou de estabelecimento seja exigida.

- **Prioridade unionista**

O primeiro pedido de patente depositado em um dos países membros serve de base para depósitos em outros países relativos à mesma matéria, efetuados pelo mesmo depositante ou seus sucessores legais. O prazo para exercer tal direito é de 12 (doze) meses.

- **Independência dos direitos**

As patentes concedidas ou pedidos depositados em quaisquer dos países membros da Convenção são independentes das patentes correspondentes concedidas ou depositadas em qualquer outro País signatário ou não da Convenção. Assim, quando uma patente é concedida ou rejeitada em um país isso não obrigatório par os demais países onde essa mesma invenção foi depositada.

## Conclusão

Assim, temos as características principais:

- Título de propriedade
- Limite temporal
- Proteção de invenções
- Tratamento nacional
- Prioridade
- Territorialidade
- Independência de direitos

Sabendo quais são as características de uma patente, podemos passar à próxima etapa.

## Exceções

No Brasil, segundo a Lei da Propriedade Industrial (LPI) no seu Artigo 10<sup>6</sup>. Não se considera invenção nem modelo de utilidade:

- I - descobertas, teorias científicas e métodos matemáticos;
- II - concepções puramente abstratas;
- III - esquemas, planos, princípios ou métodos comerciais, contábeis, financeiros, educativos, publicitários, de sorteio e de fiscalização;
- IV - as obras literárias, arquitetônicas, artísticas e científicas ou qualquer criação estética;
- V - programas de computador em si;
- VI - apresentação de informações;
- VII - regras de jogo;
- VIII - técnicas e métodos operatórios ou cirúrgicos, bem como métodos terapêuticos ou de diagnóstico, para aplicação no corpo humano ou animal; e
- IX - o todo ou parte de seres vivos naturais e materiais biológicos encontrados na natureza, ou ainda que dela isolados, inclusive o genoma ou germoplasma de qualquer ser vivo natural e os processos biológicos naturais.

Finalmente, existe outra categoria, que mesmo que haja alguma invenção, segundo a mesma lei, no Artigo 18<sup>7</sup>, não são patenteáveis:

- I - o que for contrário à moral, aos bons costumes e à segurança, à ordem e à saúde públicas;
- II - as substâncias, matérias, misturas, elementos ou produtos de qualquer espécie, bem como a modificação de suas propriedades físico-químicas e os respectivos processos de obtenção ou modificação, quando resultantes de transformação do núcleo atômico; e

---

<sup>6</sup> Maiores detalhes referidos aos pontos descritos no Artigo 10 da LPI podem ser encontrados nas diretrizes para exame de patentes Bloco II.

<sup>7</sup> Maiores detalhes referidos aos pontos descritos no Artigo 18 da LPI podem ser encontrados nas diretrizes para exame de patentes Bloco II.

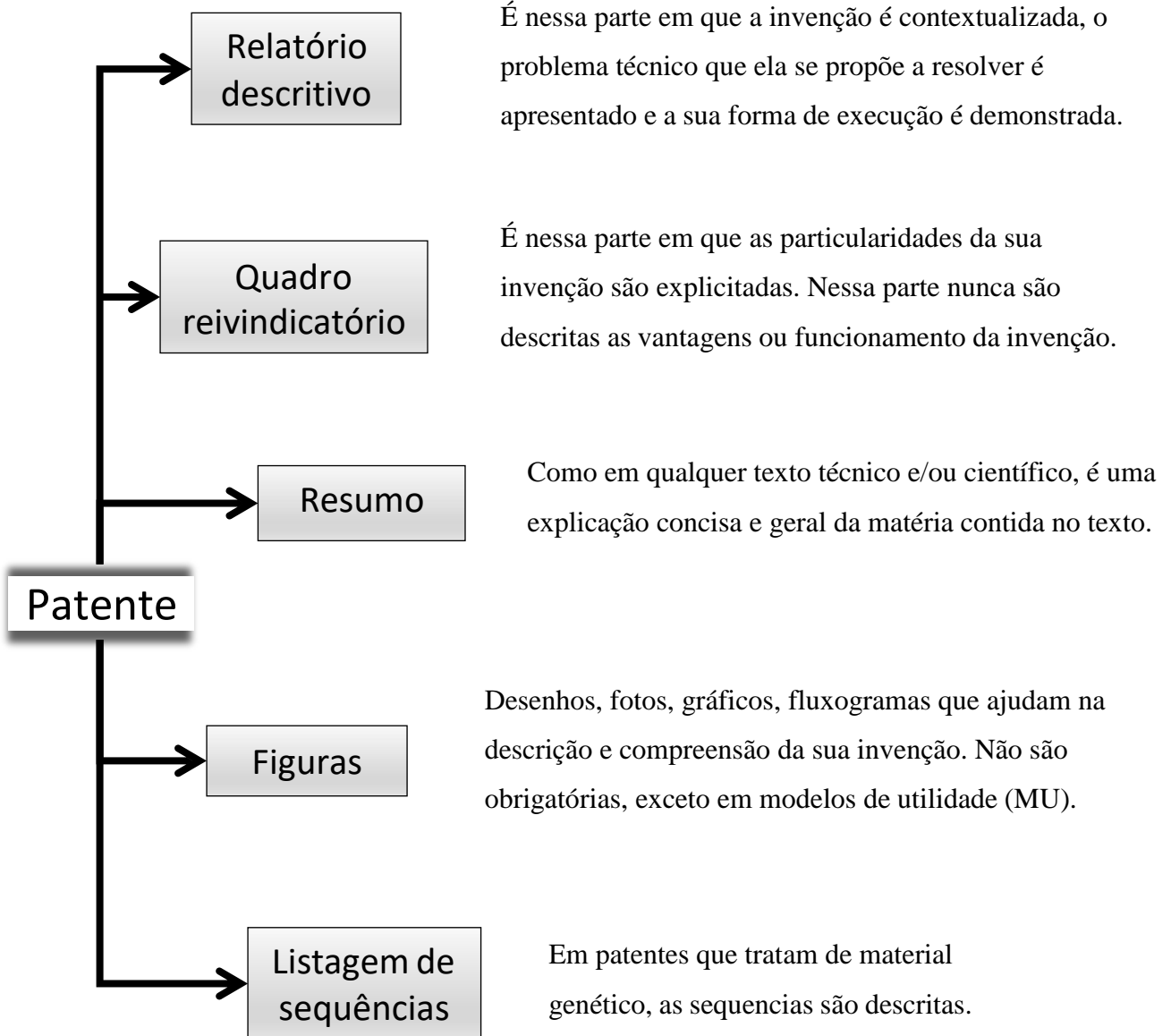
III - o todo ou parte dos seres vivos, exceto os microorganismos transgênicos que atendam aos três requisitos de patenteabilidade - novidade, atividade inventiva e aplicação industrial - previstos no art. 8º e que não sejam mera descoberta.

Parágrafo único. Para os fins desta Lei, microorganismos transgênicos são organismos, exceto o todo ou parte de plantas ou de animais, que expressem, mediante intervenção humana direta em sua composição genética, uma característica normalmente não alcançável pela espécie em condições naturais.

Se sua invenção não incorre em nenhuma das exceções, podemos passar à próxima etapa.

## Estrutura de uma patente

De forma geral, uma patente possui cinco partes: relatório descritivo, quadro reivindicatório, resumo, figuras e listagem de seqüências. Dessas, apenas três podem ser consideradas são obrigatórios, o relatório descritivo, o quadro reivindicatório e o resumo.



Todos os dados bibliográficos, como título, titular, inventores, classificação, etc. são inseridos na folha de rosto.

Agora que entendemos o que é uma patente, quais suas características e sua estrutura, vamos ao passo seguinte, que é a compreensão da sua invenção.

## Compreenda sua invenção

Este ponto é importantíssimo. Pode até em um primeiro momento parecer óbvio, mas é uma importante barreira a ser vencida antes da redação da sua patente. A compreensão da invenção é fundamental para que você faça uma busca de anterioridades<sup>8</sup> de forma eficiente e eficaz.

Pode parecer em um primeiro momento pretensão de nossa parte essa seção desse manual, afinal, quem melhor que o próprio inventor para compreender sua própria invenção? Nesse ponto concordamos. Contudo, na área acadêmica, é comum raciocinarmos em termos de aceitação ou rejeição de hipótese, mas, quando tratamos de patentes essa abordagem tem que ser feita de outro ângulo. Conforme mencionamos anteriormente, uma patente trata de invenções e invenções são trabalhos dirigidos à resolução de problemas técnicos específicos, não de posterior confirmação ou refutação de hipóteses.

Dito isso, vamos à questão:

- **Área técnica**

Toda invenção está inserida em uma área técnica específica. Essa informação é fundamental para a pesquisa de anterioridades, que são os documentos que servirão de ponto de partida do qual sua patente será escrita, bem como documentos de referência no momento em que a patente for examinada. Isso decorre do fato de que, em geral, apenas patentes de uma mesma área técnica podem ser consideradas no exame de patentes.

Essa área pode ser as mais diversas como, por exemplo, corantes alimentares, máquinas plantadeiras, processos para embalagens de líquidos em garrafas, composições de produtos alimentícios, kits para análises da qualidade da água, esteiras transportadoras, etc.

---

<sup>8</sup> Todos os documentos publicados até a data de depósito de patentes. Esse tema será melhor explorado mais adiante

É importante mencionar que essa questão não é meramente declaratória, ela também pode – e deve – ser interpretada pelo examinador frente à tecnologia descrita no pedido de patente.

- **Categoria**

Uma invenção pode ser de duas categorias<sup>9</sup>, produto ou processo, ou a combinação dessas possibilidades desde que unidas pelo mesmo conceito inventivo<sup>10</sup>.

As patentes de produtos tratam da descrição de algo material em si, seja um composto químico, composições, objetos, aparelhos, dispositivos, equipamentos/aparelhos, kits etc. Por outro lado, as patentes de processo descrevem uma série de ações sequenciais que visam alcançar um objetivo específico, são como a descrição de uma metodologia/processo, não um produto em si.

Eventualmente, pode haver a combinação dessas categorias, quando, por exemplo, um produto A pode ser obtido por meio de um método para produção desse produto A. Nesse caso, tanto o produto quanto os processos estão obviamente inter-relacionados. Contudo, não é possível a proteção em uma mesma patente de um produto A e o método para obtenção de um produto B, sendo o produto B diferente de A.

- **Princípios da invenção**

É importante ter em mente os princípios técnicos que fundamentam sua invenção. Desse modo, você terá que ser capaz de responder no que você se baseou para desenvolver essa invenção. Para que fique mais claro, citamos aqui três exemplos hipotéticos descritos de forma resumida:

---

<sup>9</sup> Manual Básico para Proteção por Patentes de Invenções, Modelos de Utilidade e Certificados de Adição. Versão 2021/06. INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

<sup>10</sup> Uma única invenção ou um grupo de invenções inter-relacionadas de forma a constituírem a mesma matéria tecnológica.



- a) O processo de pasteurização baseia-se no uso do calor durante determinado período de tempo (binômio tempo-temperatura) minimamente necessário para destruir microrganismos patogênicos, contudo não tão severo a ponto de descaracterizar em demasia o alimento. Assim, para um processo de pasteurização define-se uma faixa de tempo e de temperatura que sejam adequadas aos objetivos do processo;
- b) O método de Soxhlet para extração lipídios de um material sólido baseia-se na solubilidade dos lipídios em solvente apolares (de baixa polaridade, mais extamente). Assim, tempo de processo, polaridade do solvente, temperatura devem ser adequados à extração dos lipídios da matriz em questão;
- c) O processo de adsorção de antocianinas em resinas baseia-se na afinidade e que as moléculas desses corantes naturais com essas resinas fazendo com que as moléculas se fixem ao substrato, etc.

- **Meios**

Nenhuma atividade humana é possível sem os meios adequados para sua realização. Para que algo exista são necessários meios para trazê-lo à existência, assim também são as invenções. Neste caso são necessários meios, como os componentes de uma máquina, as matérias primas de um produto, etc. Caso seja um processo, de que forma as condições de processo, as características de cada etapa, etc. serão atingidas.

Essa compreensão é de suma importância, pois a descrição dos meios para a obtenção/realização da invenção é uma parte indispensável em uma patente.

Assim, algumas questões devem ser respondidas. Abaixo temos alguns exemplos:

- a) Quais os equipamentos e onde acontecerão essas etapas do processo? Qual a função de cada um?
- b) No caso do processo de adsorção de antocianinas em resinas são necessários um extrato de fontes naturais, uma resina, um eluente, um suporte para a resina, um termostato, etc;

- c) Para uma esteira transportadora é preciso um meio de acionamento, uma superfície de transporte e estruturas de suporte, enfim, são necessários seus componentes/peças;
- d) Uma embalagem longa-vida é constituída por camadas de material polimérico, alumínio, papelão, papel;
- e) Um equipamento para a produção de uma bebida é constituído por reservatório removível, meios para resfriamento da bebida, válvulas de distribuição conectadas ao reservatório, um leitor de RFID que recebe os dados e informações do painel de distribuição, etc;

- **Características**

Tendo em conta os itens anteriormente mencionados, é importante ter em mente as características do produto ou do processo.

Mais uma vez três exemplos simples descritos de forma resumida:

- a) Suponhamos que você produza lipases fúngicas e sua invenção seja o desenvolvimento de um processo para a obtenção mais enzimas por volume de substrato. Esse processo deve ser bem caracterizado para que seus objetivos sejam atingidos. Desse modo, as características do processo devem ser definidas. Qual a espécie/gênero produtor? Qual o substrato? Qual a faixa de temperatura? Qual o tempo de fermentação? Qual o tipo de extração/purificação?
- b) Ainda usando o exemplo das lipases, suponhamos que seu objetivo seja produzir uma enzima com melhores propriedades ou com características mais adequadas a um fim específico diferente da aplicação atual. Qual seria a atividade enzimática? Seu sítio ativo demonstra preferência por ácidos graxos de cadeia longa ou curta? Quais são suas temperaturas e pH ótimos? Essas características direcionarão sua aplicação final.

Outra questão importante nesse tópico é saber se sua invenção tem variações, ou seja, se ela pode ser abordada de outro ponto de vista além do principal.

Por exemplo, algum componente pode ser alterado? Algum item pode ser inserido ou retirado de um equipamento de forma que esse produza variações do mesmo produto? Os kits podem ter diferentes combinações das mesmas partes?

- c) Suponhamos que você tenha uma composição para bolo com farinha de trigo, açúcar cristal, ovos e um lipídio. Esse lipídio pode ser um óleo ou uma gordura (lipídio sólido à temperatura ambiente)? Se for apenas gordura, pode ser manteiga, ou margarina ou banha ou a combinação de duas ou das três gorduras? Se for apenas óleo, pode ser de soja ou óleo de milho ou azeite de oliva ou a combinação dos três? É possível conseguir resultados diferentes com cada um desses itens?
  
- d) Voltando à lipase dos itens anteriores, suponhamos que você produza lipases e sua invenção seja o desenvolvimento de um processo para a obtenção mais eficiente dessas enzimas. Esse processo deve ser bem caracterizado para que seus objetivos sejam atingidos. O meio de cultura deve ser glicose ou outros monossacarídeos também podem ser usados? E dissacarídeos?

- **Melhorias/soluções**

Eventualmente, essa etapa pode se confundir ou ser realizada de forma simultânea à anterior. Nesse momento você terá que responder qual foi o avanço, melhoria ou vantagem frente ao já existente no estado da técnica, ou o problema solucionado por sua invenção também frente ao estado da técnica.

Essas melhorias e/ou resoluções de problemas técnicos podem ser abordadas em diferentes pontos de vista. Abaixo citamos alguns exemplos genéricos para melhor ilustrar essa questão:

- a) Um processo que produza o mesmo produto ou um produto semelhante ao que se produzia antes, mas que economize matéria-prima e energia;
- b) Um produto de qualidades/propriedades semelhante ao que se produzia antes, mas que demande menos matéria-prima;
- c) Um processo mais simplificado em que uma ou mais etapas foram suprimidas;
- d) Um processo mais complexo, com a adição de uma ou mais etapas, mas que resulte em produtos de características superiores ou economicamente mais vantajosos;
- e) Um produto com melhores características físico-químicas, organolépticas ou de conservação;
- f) Um ingrediente que confira características especiais a um produto;
- g) Uma máquina que desperdice menos material ou que consiga produzir com maior velocidade;
- h) Um produto como uma abertura de embalagem que seja mais fácil de abrir ou que dificulte a abertura por parte de crianças, etc.

Enfim, essas vantagens e diferenciais frente ao estado da técnica devem estar claros.

Compreendida a invenção, passamos à próxima etapa.

## Critérios de patenteabilidade

Sabendo que tenho uma invenção e ela não se enquadra nas exceções previstas na lei, e que a mesma esteja completamente compreendida é preciso ter claros quais são os critérios de patenteabilidade, ou seja, quais são as condições para que uma patente seja concedida.

Assim temos como condições básicas a aplicação industrial, a novidade e a atividade inventiva. Adicionalmente, a suficiência descritiva, a clareza e a unidade de invenção também são relevantes.

- **Aplicação industrial**

Segundo o Artigo 15 da LPI, uma Invenção é considerada suscetível de aplicação industrial quando puderem ser produzidos ou utilizados em qualquer tipo de indústria.

É importante salientar que isso não se aplica somente ao setor industrial em si, também se aplica as atividades agropecuárias, extrativas e de serviços, desde que dotados de repetibilidade. Além disso, não é necessário demonstrar viabilidade econômica.

- **Novidade**

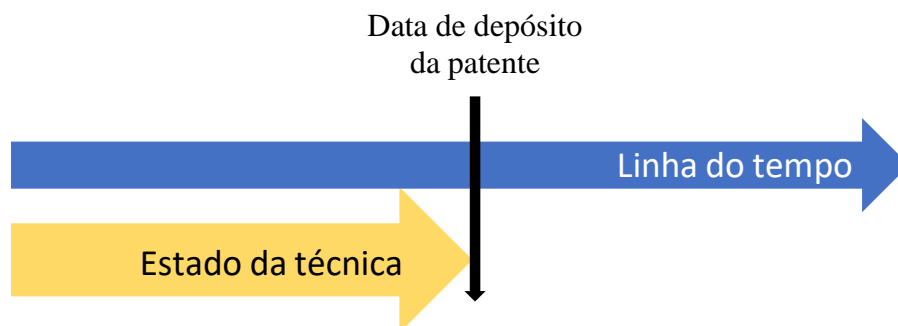
Segundo o Artigo 11 da LPI, a invenção é considerada nova quando não compreendida no **estado da técnica**. Quer dizer, essa invenção é considerada nova ou inexistente até o momento da sua criação.

Nessa avaliação é preciso ter em conta se todos os **elementos** da invenção estão presentes **integralmente** por um **único documento (anterioridade)** compreendido no estado da técnica. Caso a resposta seja sim, então não apresenta novidade

Considera-se **estado da técnica** todos os documentos publicados, independente da língua, do local ou da natureza (patentes, artigos, livros, resumos em congresso, resumos expandidos, vídeos, palestras, dissertações, teses, trabalhos de conclusão, catálogos, notas técnicas, manuais, reportagens, etc.) ou o número de pessoas que tiveram acesso a esses documentos até a data de depósito de uma patente

Para avaliação da novidade é preciso identificar os elementos da sua invenção e assim determinar se um único documento encontrado no estado da técnica descreve todos esses elementos.

Suponhamos que você deposite uma patente no dia 21/07/2021. Estado da técnica são todos os documentos colocados à disposição do público até o dia 20/07/2021.



- **Atividade inventiva**

Para obter uma patente, não basta que a matéria seja apenas diferente. Essa “diferença” entre o estado da técnica e o seu documento não deve ser óbvia para um **técnico no assunto**.

Assim, uma invenção é dotada de atividade inventiva sempre que, para

uma pessoa que tenha conhecimento naquela área, o que chamamos de técnico no assunto, não decorra de maneira evidente ou óbvia a partir do que já está no estado da técnica, ou seja, vai apresentar atividade inventiva quando, mesmo com as informações e pesquisas já divulgadas, chegar aquela invenção para um técnico no assunto, ainda assim demande de uma criação intelectual, não é apenas a junção de informações.

Considera-se um **técnico no assunto**, para este propósito, o indivíduo que tenha conhecimentos na área técnica da invenção. Esse indivíduo deve ser ciente não apenas do ensinamento da invenção em si e de suas referências, mas também do conhecimento geral da técnica à época do depósito do pedido.

- **Suficiência descritiva**

Em linhas gerais, uma invenção estará suficientemente descrita quando, em seu relatório descritivo, estiver redigida de forma completa, de modo a permitir sua reprodução por um técnico no assunto. Essa descrição deve conter condições/meios suficientes que garantam a concretização da invenção e, indicar, quando for o caso, a melhor forma/variação de execução.

Uma maneira de aferir essa questão é ponderando se alguém com um conhecimento naquela área técnica da sua invenção, lendo sua patente, seria capaz de reproduzi-la. Se sua resposta for positiva, isso indica que provavelmente sua invenção tem suficiência descritiva. Caso contrário, talvez seja melhor fazer uma descrição incluindo os pontos faltantes.

- **Clareza**

As reivindicações deverão ser fundamentadas no relatório descritivo, caracterizando as particularidades do pedido e definindo, de modo claro e preciso, a matéria objeto da proteção. Assim, a leitura deve evitar ambiguidades ou indefinições, especialmente no que concerne ao diferencial que a sua invenção tem do estado da técnica.

Atente-se ao fato de que, neste caso, quando falamos “diferencial” não estamos nos referindo às vantagens ou simples funcionamento da invenção, mas as diferenças objetivas/constitutivas entre o estado da técnica e sua invenção.

- **Unidade de Invenção**

Segundo o Artigo 22 da LPI, o pedido de Patente de Invenção deverá se referir a uma única invenção ou a um grupo de invenções inter-relacionadas, de maneira a compreenderem um único conceito inventivo. Por sua vez, segundo o Artigo 23 da LPI, o pedido de Patente de Modelo de Utilidade terá de se referir a um único modelo principal, que poderá incluir uma pluralidade de elementos distintos, desde que mantida a unidade técnico-funcional e corporal do objeto.

Desse modo é importante entender que todos os elementos de sua invenção podem compreender uma única invenção, ou um grupo de invenções, desde que esses elementos representem um único conceito inventivo.

Até aqui entendemos o que é invenção e quais são os critérios para que um pedido de patente seja concedido, passemos à próxima etapa.



## Busca de anterioridades

Conforme vimos anteriormente, antes de depositar um pedido de patente é necessário saber se alguém, em qualquer lugar do mundo publicou alguma tecnologia igual ou próxima a sua, ou seja, é preciso fazer uma busca de **anterioridades**, levando em consideração a data do depósito ou a data da prioridade<sup>11</sup>.

Sua busca deve ser de abrangência mundial mesmo que você deseje depositar uma patente apenas no Brasil. Caso você faça uma busca apenas em bases nacionais, essa busca será, evidentemente, deficiente. Dito isso, vamos aos conceitos mais relevantes.

- **Bases de patentes**

Normalmente, no meio acadêmico, estamos familiarizados com a busca de artigos. Em geral, essas buscas são feitas por meio do uso de palavras específicas ou em revistas selecionadas em determinado campo do conhecimento.

Considera-se **anterioridade** todos os documentos publicados, (independente da língua, local ou natureza) que antecipe a invenção do pedido de patente até a data de depósito ou a data de prioridade quando houver.

Contudo, as anterioridades usadas no exame de pedidos de patentes, além de artigos, também são usadas outras patentes. Esses documentos estão disponíveis em diversas bases, muitas delas gratuitas. Mesmo nas bases gratuitas, consegue-se muito bons resultados. Alguns exemplos de bases gratuitas são: *Espacenet*, *Busca Web INPI*, *Google Patents*, *Patentscope*, *Patent Lens*, etc.

---

<sup>11</sup> Data de prioridade: Ao pedido de patente depositado em país que mantenha acordo com o Brasil, ou em organização internacional, que produza efeito de depósito nacional, será assegurado o direito de prioridade, nos prazos estabelecidos no acordo, não sendo o depósito invalidado nem prejudicado por fatos ocorridos nesses prazos

Para uma busca minimamente eficiente é necessária a compreensão de alguns conceitos.

### 1. Palavras-chave

São as palavras que serão usadas para fazer a busca. O uso de palavras em línguas estrangeiras, especialmente o inglês, é fundamental. Tenha em mente que devem ser usados sinônimos e variações além de termos que o englobem ou subcategorias que possam descrever ou serem relevantes para sua invenção.

Nesse ponto é importante ter uma noção de **operadores lógicos** (ou booleanos).

Os principais **operadores lógicos** são **AND**, **OR** e **NOT**. Onde AND é aditivo, OR é alternativo e NOT é excludente.

- Exemplo 1:

Você pesquisará sobre um processo no qual a glicose é um insumo importante, então considere usar os sinônimos e termos afins: *glucose*, *glucopyranose*, *glucopyranoside*, *dextrose*, *glucofuranose*, *glucopyranose*. Adicionalmente, poderão ser usados termos que não expressam a glicose em si, mas a englobam, como *aldohexoses*.

Como os termos sinônimos ou afins, os operadores são alternativos OR:

*glucose* OR *glucopyranose* OR *glucopyranoside* OR *dextrose* OR *glucofuranose* OR *glucopyranose* OR *aldohexoses*

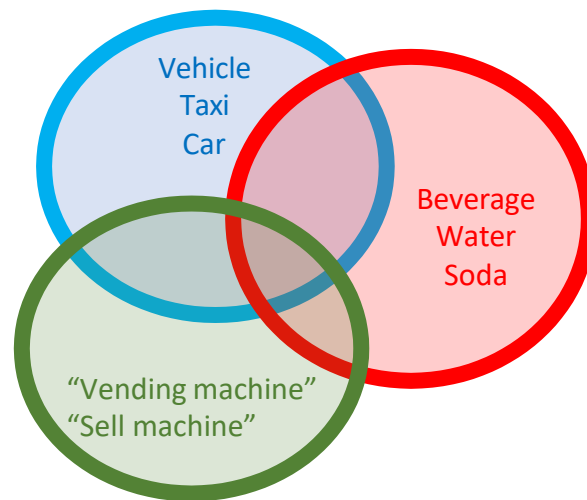
- Exemplo 2:

Você pesquisará sobre um método para o cultivo milho, então temos: *maize*, *corn*, *Zea mays*. Adicionalmente, poderão ser usados termos que não expressam o milho em si, mas a englobam, como *Zea*, que é o gênero ou *poaceae*, *graminae*, que é a família das gramíneas da qual o milho faz parte ou os seus nomes em inglês *grasses* (gramíneas).



- O segundo é que é uma máquina de venda de bebidas bebida, então poderíamos ter: *beverage, water, soda*;
- O terceiro é que é uma máquina de venda, então teríamos: *vending machine, sell machine*.

Com a determinação de diferentes características de uma invenção temos que fazer a combinação de termos, então os operadores, além de alternativos devem ser aditivos:



*(vehicle OR taxi OR car) AND (beverage, water, soda) AND (“vending machine” OR “sell machine”).*

Na busca de uma patente, é necessário buscar termos mais específicos, pois as invenções tendem a ser mais específicas. No entanto, muitas vezes não é possível uma especificidade muito grande em uma busca. Para isso temos a classificação internacional de patentes (CIP).

## 2. Classificações

Em poucas palavras, o sistema de classificações de patentes é um conjunto de símbolos (ou códigos) que tratam das mais diferentes características técnicas de uma invenção. As mais importantes atualmente são a IPC (Sigla de *International Patent*

*Classification*) e a CPC (*Cooperative Patent Classification*). De uma forma geral, a CPC tende a ser mais específica e complexa, pois a quantidade de símbolos são 200 mil, ou seja, existem 200 mil áreas técnicas marcadas chegando a níveis de detalhamento realmente significativos. Contudo, embora tenha menos símbolos a IPC já fornece uma quantidade significativa de símbolos.

Como dito anteriormente, as classificações são, em geral, bastante específicas. Por exemplo, a classificação IPC **A23J 1/20** é aplicada em patentes que descrevam “Composições à base de proteínas para produtos alimentícios ou preparação de proteínas para produtos alimentícios, mais especificamente a obtenção de composições à base de proteínas para produtos alimentícios a partir de leite”.

—	<b>A23J</b>	COMPOSIÇÕES À BASE DE PROTEÍNAS PARA PRODUTOS ALIMENTÍCIOS; PREPARAÇÃO DE PROTEÍNAS PARA PRODUTOS ALIMENTÍCIOS; COMPOSIÇÕES DE FOSFATÍDEOS PARA PRODUTOS ALIMENTÍCIOS [4]
—	<b>A23J 1/00</b>	Obtenção de composições à base de proteínas para produtos alimentícios; Abertura de ovos a granel e separação de gemas e claras [2006.01]
	A23J 1/02	• a partir de carnes [2006.01]
	A23J 1/04	• a partir de peixes ou outros animais marinhos [2006.01]
	A23J 1/06	• a partir de sangue [2006.01]
	A23J 1/08	• a partir de ovos [2006.01]
—	<b>A23J 1/09</b>	• • separação de gemas e claras [2006.01]
	A23J 1/10	• a partir de cabelos, penas, chifres, peles, couros, ossos ou similares [2006.01]
	A23J 1/12	• a partir de cereais, trigo, farelo ou melaço [2006.01]
	A23J 1/14	• a partir de sementes leguminosas ou de outros vegetais; de tortas ou outras sementes oleaginosas [2006.01]
	A23J 1/16	• a partir de águas residuais de fábricas de amido ou de resíduos similares [2006.01]
	A23J 1/18	• a partir de leveduras [2006.01]
—	<b>A23J 1/20</b>	• a partir de leite, p. ex. caseína (coalhadas ou queijos A23C); a partir de soro de leite coalhado [2006.01]
	A23J 1/22	• • Secagem da caseína [2006.01]

Assim, se uma patente apresenta essa classificação, mesmo que não contenha uma ou mais palavras-chave sequer relacionada ao assunto, já seria suficiente para resgatar documentos patentários com essa informação. Desse modo, se fossem usadas apenas palavras-chave esses documentos não seriam encontrados.

Um ponto importante é que elas possuem uma estrutura hierárquica. Os símbolos são apresentados em uma hierarquia de pontos, ou seja, quanto mais pontos, mais específico e completo é o detalhamento buscado. Por exemplo, se antes da descrição de uma classificação houver dois pontos essa está subordinada à primeira classificação acima que contiver 1 ponto.

Vejamos o exemplo abaixo:

A21B 1/00 Fornos de panificação

A21B 1/02 • caracterizados pelas disposições de aquecimento

A21B 1/04 •• Fornos aquecidos por fogo somente antes do cozimento

A21B 1/06 •• Fornos aquecidos por radiadores

A21B 1/08 ••• por radiadores aquecidos a vapor

No exemplo acima o símbolo A21B 1/08 tem três pontos (•••), desse modo está subordinado ao primeiro item acima que tem dois pontos (••) ou seja, A21B 1/06 que, por sua vez, está subordinada à primeira classificação que tem um ponto (•). Desse modo lê-se a classificação A21B 1/08 como “Fornos de panificação caracterizados pelas disposições de aquecimento, *sendo os* Fornos aquecidos por radiadores aquecidos a vapor”. Se fosse A21B 1/06 seria apenas “Fornos de panificação caracterizados pelas disposições de aquecimento, *sendo os* Fornos aquecidos por radiadores).

Assim, se eu estiver buscando apenas por “fornos de panificação caracterizados pelas disposições de aquecimento” eu posso usar A21B 1/02 e apenas “Fornos de panificação” A21B 1/00.

Desse modo, utilizando as classificações, é possível decidir qual o nível de aprofundamento/detalhamento que desejo encontrar, assim como, encontrar características bastante específicas.

### **3. Outros**

Além da utilização das palavras chaves em conjunto com os operadores booleanos e classificação de patentes, também é possível realizar a busca por anterioridades filtrando o nome do depositante ou inventor, ano de depósito, empresa e ou instituto de pesquisa.

O conhecimento de cada ferramenta é de grande importância para realização de uma busca consistente e para consolidação da melhor estratégia para busca, que pode apresentar alterações mediante às características da tecnologia e especificações da invenção.

Depois de feita a busca os documentos devem ser ranqueados pela similaridade em relação ao documento ou texto ou tecnologia (no caso sua patente) de referência.

## Comparação de documentos

Compreendida a invenção e em posse das anterioridades encontradas na busca é necessário fazer uma comparação entre esses documentos. Essa comparação é de fundamental importância, pois, conforme vimos anteriormente, para que uma invenção seja patenteável é preciso que ela seja nova (não contida no estado da técnica) e ter atividade inventiva – ato inventivo no caso de modelos de utilidade – (a novidade, quando existente, não ser óbvia para um técnico no assunto) e aplicação industrial (replicabilidade).

Dito isso, vamos aos passos:

- 1) Inicialmente é necessário estabelecer quais são as diferenças entre a minha invenção e o estado da técnica.

Neste caso é importante ter uma relação de todas as características do futuro pedido de patente. Tendo essa lista, deve-se verificar quais as características estão contidas nas anterioridades.

Uma ferramenta que pode ajudá-lo é a confecção de uma tabela tal como mostrada nos exemplos logo abaixo.

### **Exemplo 1**

Suponhamos que você queira patentear uma mistura para bolo com farinha de trigo, açúcar cristal, manteiga e ovos, sendo essa mistura assada em forno a lenha. Foi realizada uma busca na mesma área técnica, ou seja, formulações para bolo. Nessa busca onde foram encontradas quatro anterioridades identificadas como D1, D2, D3 e D4.



Características da invenção					
	Composição				Forno a lenha
	Farinha de trigo	Açúcar	Manteiga	Ovos inteiros	
Doc 1	x	x	(3)	(5)	x
Doc 2	x	x	x	---	x
Doc 3	x	(2)	(4)	(6)	x
Doc 4	(1)	x	x	x	x

Nota: (x) características idênticas; (---) sem característica similar ou ingrediente substituinte; (1) farinha de milho (2) melaço de cana (3) banha de porco, (4) óleo de soja, (5) ovo em pó, (6) claras.

Como vemos acima, não foram encontrados documentos que tragam exatamente todas as características da nossa invenção, mas podemos dizer que a mesma apresenta novidade?

A novidade deve ser avaliada, não apenas pelo idêntico, exatamente a mesma característica, mas também para o que a característica agrega a invenção. Vamos avaliar o exemplo 1, o documento 4 mostra o uso de uma farinha de milho no lugar da farinha de trigo da invenção avaliada. Por mais que sejam farinhas diferentes, elas promovem o mesmo efeito ao bolo, possuem elementos semelhantes e cooperam da mesma forma ao bolo. O mesmo se aplica ao documento 3 pelo melaço de cana e para óleo de soja, e ao documento 1 com a banha de porco e o ovo em pó. Entretanto, o documento 2 apresenta um bolo que não utiliza ovos e nenhum outro ingrediente similar ou substituinte. O ovo é um importante ingrediente na formulação de bolos, ele traz estrutura e firmeza à massa devido a lecitina, um emulsificante natural. Assim, em comparação ao documento 2 o exemplo 1 apresenta novidade.

É importante ressaltar que não tratamos de forma exaustiva cada questão aqui abordada e os exemplos têm caráter apenas didático. É importante verificar nas Diretrizes para exame de patentes que apresenta mais possibilidades e exemplos.

2) Outro ponto importante é: As características da invenção podem ser obtidas pela combinação de dois ou mais documentos?

Após identificar a diferença da sua invenção em comparação ao já disponível no estado da técnica, é importante verificar se essa diferença pode ser solucionada ou antecipada pela combinação de técnicas e informações encontradas em dois ou mais desses documentos disponíveis no estado da técnica.

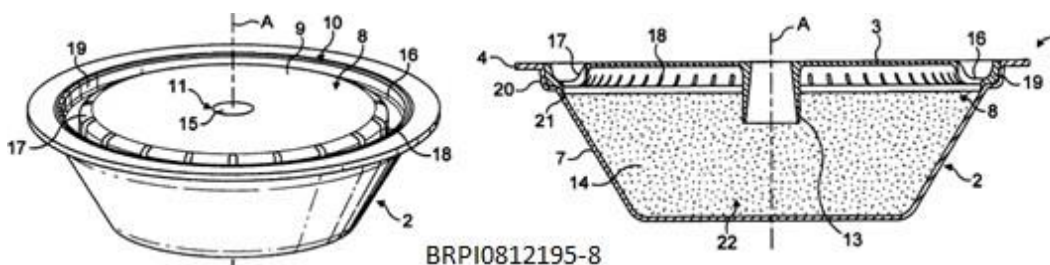
Voltando ao exemplo do bolo

3) Essa diferença tem atividade inventiva?

Mesmo com a combinação de dois ou mais documentos, a diferença da sua invenção não é antecipada pelo estado da técnica e assim apresenta atividade inventiva.

### Exemplo 2

Vamos supor que você queira patentear uma cápsula para produção de café/chá, em que a bebida é preparada a partir da introdução de água na cápsula e contato da água com café/chá, onde aberturas para passagem do líquido permite que a bebidas escoe da cápsula sob forças centrífugas, como no exemplo da patente BRPI0812195-8.



Então temos a tabela

Características da invenção				
	Cápsula	Café/chá	Aberturas para passagem de água	A bebida deixa a cápsula sob força centrífuga
Doc 1	x	x	x	---
Doc 2	x	x	x	---
Doc 3	x	x	x	---

Nota: (x) características idênticas; (---) sem característica similar

Assim, nenhum documento apresenta a característica de expulsar a bebida da cápsula através de força centrífuga.

Contudo, é possível combiná-los de forma a termos todas as características?

Nesse caso não, mesmo os três documentos encontrados no estado da técnica apresentarem uma cápsula, conter o produto a ser produzido e diversas aberturas para o escoamento dessa bebida, nenhum deles antecipa o uso da força centrífuga para a saída da bebida. Mesmo que se faça a combinação de dois ou dos três documentos, não será possível chegar à invenção apresentada.

Assim, chegamos à conclusão que, em comparação com o estado da técnica encontrado nas buscas, os documentos não antecipam todas as características da invenção.

## Conclusão

Finalmente, após entendermos o que é e quais os componentes da invenção, verificarmos os critérios para que um pedido de patente seja concedido, realizando a busca de anterioridades e comparando com os componentes da invenção, para assim chegarmos a conclusão se a invenção tem possibilidade de receber o deferimento de patente.

Caso a resposta seja positiva é a hora de estruturar e redigir o pedido de patente, documento que será avaliado pelo corpo técnico do INPI.

## **APÊNDICE II**

### **EXAME TÉCNICO DE PATENTEABILIDADE APLICADO AO PRESENTE ESTUDO DE TESE**

## INTRODUÇÃO

O trabalho para avaliação de patenteabilidade refere-se a separação e purificação de antocianinas em extrato de pétalas de feijão borboleta (*Clitoria Ternatea* L.), uma leguminosa cultivada em regiões tropicais. As flores do feijão borboleta possuem cerca de 1,5 a 3 cm de comprimento em forma de borboleta, o que originou seu nome popular, e têm uma cor azul brilhante, sendo geralmente cultivadas para fins ornamentais. O componente de pigmento do feijão borboleta é uma mistura de flavonoides denominado como ternatinas A a F (JPH03223298A). Foi utilizado resinas macroporosas em extrato de pétalas de feijão borboleta preparado a partir da adição do pó desidratado das pétalas em solução tampão. A aplicação de resinas para extração desses compostos apresenta a vantagem de uma metodologia simples e com baixo custo em comparação com a tecnologia existente (CN107056740A).

### **Análise referente aos artigos 10º, 18º e 22º da LPI**

Artigo 10º - Não se considera invenção nem modelo de utilidade:

- Concepções puramente abstratas;
- Esquemas, planos, princípios ou métodos comerciais, contábeis, financeiros, educativos, publicitários, de sorteio e de fiscalização;
- Obras literárias, arquitetônicas, artísticas e científicas ou qualquer criação estética;
- Programas de computador em sim;
- Apresentação de informações;
- Regras de jogo;
- Técnicas e métodos operatórios ou cirúrgicos, métodos terapêuticos ou de diagnóstico, para aplicação no corpo humano ou animal;
- Todo ou parte de seres vivos naturais e materiais biológicos encontrados na natureza, ou ainda que dela isolados, inclusive genoma ou germoplasma de qualquer ser vivo natural e os processos biológicos naturais.

Artigo 18º - Não são patenteáveis:

- O que for contrário a moral, aos bons costumes e à segurança, à ordem e à saúde pública;
- Substâncias, matérias, misturas, elementos ou produtos de qualquer espécie, bem como a modificação de suas propriedades físico-químicas e os respectivos processos de obtenção ou modificação, quando resultantes de transformação do núcleo atômico;
- Todo ou parte de seres vivos, exceto os microorganismos transgênicos que atendam aos três requisitos de patenteabilidade (novidade, atividade inventiva e aplicação industrial), previstos no artigo 8º e que não seja mera descoberta.

Artigo 22º - O pedido de patente de invenção terá de se referir a uma única invenção ou a um grupo de invenções inter-relacionadas de maneira a compreenderem um único conceito inventivo.

Assim, verificando os três artigos da LPI (10º, 18º e 22º), é possível concluir que o trabalho desenvolvido nessa tese não infringe nenhum deles.

### **Análise de documentos e requisitos de patenteabilidade referente aos artigos 8º, 11º, 13º e 15º da LPI**

Artigo 8º - É patenteável a invenção que atenda aos requisitos de novidade, atividade inventiva e aplicação industrial.

Artigo 11º - A invenção e o modelo de utilidade são considerados novos quando não compreendidos no estado da técnica.

§ 1º - O estado da técnica é constituído por tudo aquilo tornado acessível ao público antes da data de depósito do pedido de patente, por descrição escrita ou oral, por uso de qualquer outro meio, no Brasil ou no exterior, ressalvado o disposto nos artigos 12, 16, e 17.

§ 2º - Para fins de aferição de novidade, o conteúdo completo do pedido depositado no Brasil, e ainda não publicado, será considerado estado da técnica a partir da data de depósito, ou da prioridade reivindicada, desde que venha a ser publicado, mesmo que subsequentemente.

§ 3º - O disposto no parágrafo anterior será aplicado ao pedido internacional de patente depositado segundo tratado ou convenção em vigor no Brasil, desde que haja processamento nacional.

Artigo 13º - A invenção é dotada de atividade inventiva sempre que, para um técnico no assunto, não decorra de maneira evidente ou óbvia do estado da técnica.

Artigo 15º - A invenção e o modelo de utilidade são considerados suscetíveis de aplicação industrial quando possam ser utilizados ou produzidos em qualquer tipo de indústria.

Para verificar esses quatro artigos (8º, 11º, 13º e 15º) foi necessário realizar a busca por anterioridades, utilizando as estratégias de busca já mencionadas no apêndice 1, para verificar se existe algum documento de patente, artigo ou publicação divulgados e que impeça a patenteabilidade desse trabalho de tese.

Foram utilizadas as palavras-chave:

(MACROPOROUS RESIN OR RESIN OR MACROPOROUS) AND (BUTTERFLY PEA OR BUTTERFLY BEAN OR CLITORIA TERNATEA OR CUNHÃ) AND ANTHOCYANIN

Nas bases de dados: Google Patentes e Espacenet.

Foram selecionados os quatro documentos:

**D1: O documento chinês CN110437197B2 “Método para extrair antocianinas de ervilha-borboleta” de 12/11/2019 que teve a patente concedida em 13/04/2021.**

D1 divulga a extração de antocianinas da flor do feijão borboleta através da adsorção por resina macroporosa, eluição do produto contendo antioxidantes naturais com etanol, concentração e secagem da solução dessorvida. O documento relata a vantagem de extrair simultaneamente vários produtos de antocianina da flor de feijão borboleta com alto teor de

produto de antocianina, tem condição de processo de extração total e alto rendimento e ambientalmente correto.

D1 apresenta a etapa de congelamento ou desidratação das pétalas de feijão borboleta, a formulação de um extrato com solução ácida em pH 2,5 - 6,5, de preferência 4 – 6, o uso de resina XAD-7HP, HP-50, D3520 ou DM-130 para o processo de adsorção, eluição com etanol e secagem por liofilização a vácuo.

**D2: O documento chinês CN103951646B “Método de extração de resina de adsorção macroporosa de procianidina de folha de feijoa” de 30/07/2014 e que teve a patente concedida em 10/08/2016.**

D2 divulga a extração de proantocianidina das folhas de feijoa envolve a realização de adsorção e dessorção da amostra, filtrando, separando e purificando com resina macroporosa.

D2 apresenta as etapas de pré-tratamento das resinas AB-8, X-5, D101, S-8, D3520 em etanol por 24 horas e sem seguida lavando com água destilada. A realização da adsorção estática e medição de dessorção para triagem das melhores resinas macroporosas para obtenção do melhor parâmetro da técnica. O documento relata que a invenção melhora a velocidade de processamento das procianidinas da folha do fruto da feijoa, o custo é baixo, apresenta bons resultados e tem baixo custo e popularização na indústria.

**D3: O documento chinês CN1596730A “Método de fabricação do extrativo de flor Clitoria Ternatea e extrativo de sacarídeos” de 23/03/2005.**

D3 divulga método de fabricação de um aditivo alimentar e agente de coloração contemplando o contato da solução bruta de feijão borboleta com adsorvente macroporoso, após adsorção o produto é eluído com solvente orgânico não ácido ou mistura de água e solvente orgânico não-ácido.

**D4: O documento japonês JP4207844B2 “Estabilizador e método de estabilização do pigmento” de 02/12/2005 e que teve a patente concedida em 14/01/2009.**



D4 divulga a extração de pigmentos das pétalas de feijão borboleta, utilizando água e/ou um solvente orgânico solúvel em água para utilização como estabilizador de corante em produtos alimentícios.

### **CONCLUSÃO**

Assim, frente ao já revelado no estado da técnica toda a matéria apresentada no presente trabalho não atende ao requisito de atividade inventiva (Art. 8º combinado com 13º da LPI).