

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA**  
**DE ALIMENTOS**

**Ana Paula Bianchi**

**Avaliação do potencial antioxidante de extratos encapsulados de mirtilo**

**Passo Fundo**

**2017**

**Ana Paula Bianchi**  
**Nutricionista**

**Avaliação do potencial antioxidante de extratos encapsulados de mirtilo**

Dissertação de Mestrado apresentada para  
obtenção do título de Mestre em Ciência e  
Tecnologia de Alimentos  
Orientadora: Prof. Dra. Vera Maria Rodrigues  
Co-orientadora: Prof. Dra. Telma Elita Bertolin  
Linhas de pesquisas: Qualidade e propriedades  
funcionais de alimentos e Caracterização de  
matérias-primas e produtos alimentícios

**Passo Fundo**  
**2017**

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS**

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**Avaliação do potencial antioxidante de extratos encapsulados de mirtilo**

Elaborada por  
**Ana Paula Bianchi**

Como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos**

**Comissão Examinadora**

  
**Vera Maria Rodrigues, Dra., UPF**  
(Orientadora/Presidente)

  
**Telma Elita Bertolin, Dra., UPF**

  
**Maria Tereza Friedrich, Dra., UPF**

  
**Wagner Luiz Priamo, Dr., IFRS**

**Passo Fundo, RS, Brasil  
2017**

CIP – Catalogação na Publicação

---

B577e      Bianchi, Ana Paula  
              Avaliação do potencial antioxidante de extratos  
              encapsulados de mirtilo / Ana Paula Bianchi. – 2017.  
              122 p. : il. color. ; 30 cm.

Orientadora: Prof. Dra. Vera Maria Rodrigues  
Coorientadora: Prof. Dra. Telma Elita Bertolin  
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos) – Universidade de Passo Fundo, 2017.

1. Produtibilidade agrícola. 2. Mirtilo – Cultivo. 3.  
Composição química. 4. Antioxidantes. I. Rodrigues,  
Vera Maria , orientadora. II. Bertolin, Telma Elita,  
coorientadora. III. Título.

CDU: 582.912.46

---

Catalogação: Bibliotecária Marciéli de Oliveira - CRB 10/2113

Dedico este trabalho para alguém que, inesperadamente, está a caminho e que vem para me mostrar o quão fascinante a vida pode ser.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por guiar meus passos e me proporcionar saúde para buscar os meus objetivos e por me conceder paciência e força nos momentos difíceis dessa caminhada.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

Agradeço a minha família, sempre tão presente em minha vida, e ao Pedro, por estar comigo em qualquer circunstância.

Um agradecimento especial a minha querida orientadora, Professora Vera, principalmente pela amizade desenvolvida e pelas palavras de consolo quando necessitei. Igualmente agradeço a professora Telma, minha co-orientadora. Pessoas de enorme coração das quais sentirei saudades.

A todos os colegas de classe, pela amizade e companheirismo. Em especial aquelas que se tornaram mais que colegas: Patrícia, Kelly, Vanessa, Meri, Nielly e Mariana, e que souberam dividir alegrias, tristezas, desesperos e conquistas nesses dois anos.

Agradeço as minhas ajudantes, as estagiárias Tassiele, Brenda e Geovanna pela dedicação em me auxiliar nos experimentos.

Aos funcionários da UPF, em especial à Clarice e ao João que tanto me ajudaram na execução dos experimentos.

Agradeço ao IFRS Campus Sertão pela disponibilidade da realização de alguns testes naquele local, especialmente à Denise, sempre dedicada em ajudar.

À minha banca do exame de qualificação, professores Vandrê e Wagner, pela coerência de suas contribuições e pela singela forma de expressá-las. E à professora Maria Tereza, por aceitar em contribuir com esta pesquisa.

*“Julgue seu sucesso pelas coisas que você teve  
que renunciar para conseguir”*

*Dalai Lama*

## RESUMO

Os consumidores estão cada vez mais preocupados com a saúde e bem-estar em geral. Isso se deve pelo aumento de casos de doenças crônicas e degenerativas, as quais são causadas não somente pelo aumento da expectativa de vida, mas também por mudanças a longo prazo no estilo de vida, como dietas desequilibradas e sedentarismo. Os órgãos de saúde hoje em dia recomendam uma série de cuidados com a alimentação e saúde em geral. Diante disso, os alimentos funcionais tornaram-se uma nova e promissora tendência na indústria alimentícia e farmacêutica. O mirtilo (*Vaccinium* sp.) é uma fruta que está ganhando destaque neste segmento da indústria, ocasionado pelo reconhecimento das suas propriedades terapêuticas. Estas se devem, sobretudo, pela presença de compostos fenólicos, os quais desempenham atividade antioxidante capaz de contribuir para a prevenção de doenças. Por ser uma fruta de pequena produção e de curta vida útil, torna-se necessário a aplicação de tecnologias de processamento que mantenham as propriedades desejadas. A técnica de secagem por atomização associada a encapsulação tem por finalidade fornecer a proteção das substâncias de interesse, pois evita o contato direto delas com a luz e o calor. Isto tem possibilitado uma maior oferta de alimentos com potencial funcional e com maior vida de prateleira, ao mesmo tempo em que agrega valor comercial aos produtos desenvolvidos. O domínio das técnicas de processamento para o mirtilo, e o conhecimento da manutenção das propriedades funcionais de produtos elaborados é de suma importância para a indústria que deseja se destacar no ramo de alimentos funcionais. Este estudo objetivou a caracterização de dois extratos encapsulados de mirtilo produzido no norte do Rio Grande do Sul. Testamos dois agentes encapsulantes: goma arábica (GA) e concentrado proteico de soro de leite (CPS). A partir do extrato encapsulado que apresentou melhor resposta funcional, morfológica e sensorial, continuou-se o estudo com tal extrato realizando testes de estabilidade dos compostos bioativos durante a vida de prateleira e verificando seu comportamento antioxidante também em um teste *in vivo*, tendo como modelo experimental a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Como testes morfológicos da encapsulação dos extratos utilizamos a Eficiência da Encapsulação (EE) e avaliação da morfologia externa das microcápsulas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). A análise de cor foi realizada como atributo sensorial. Para verificação do potencial funcional avaliamos os compostos fenólicos totais e os individuais por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e mensuramos a atividade antioxidante por DPPH. Nossos resultados foram mais satisfatórios com o extrato encapsulado com GA (E1) no que diz respeito à morfologia, análise de cor e potencial funcional. Dessa forma, o E1 foi selecionado para dar continuidade ao estudo, onde obtivemos diminuição de fenóis e flavonoides totais durante o armazenamento a 4° C por 5 e 10 meses. Em relação a estabilidade da atividade antioxidante frente a temperaturas de -18, 4 e 25° C por 4 semanas, obtivemos perdas significativas em todas as temperaturas, todavia melhores resultados foram obtidos quando o extrato permaneceu sob congelamento (-18°C). Em nosso teste *in vivo*, o emprego do E1 em células de *Saccharomyces cerevisiae* estressadas com ferro foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica através do método TBARS e aumentar a atividade da GPX. Nosso estudo comprovou que o extrato de mirtilo encapsulado com goma arábica manteve a funcionalidade antioxidante presente na fruta e pode ser um ingrediente promissor no desenvolvimento de alimentos funcionais. Sugere-se que as indústrias de interesse devem assegurar a conservação adequada para evitar a degradação dos compostos bioativos e garantir assim, maior vida de prateleira ao produto.

Palavras-chave: Frutas vermelhas. Microencapsulação. Nutracêuticos.



## ABSTRACT

Consumers are increasingly concerned about health and well-being in general. This is due to the increase in cases of chronic and degenerative diseases, which are caused not only by an increase in life expectancy, but also by long-term changes in lifestyle, such as unbalanced diets and sedentary lifestyle. The health agencies nowadays recommend a series of care with food and health in general. Faced with this, functional foods have become a new and promising trend in the food and pharmaceutical industry. Blueberry (*Vaccinium* sp.) Is a fruit that is gaining prominence in this segment of the industry, caused by the recognition of its therapeutic properties. These are mainly due to the presence of phenolic compounds, which play an antioxidant activity capable of contributing to the prevention of diseases. Because it is a fruit of small production and of short useful life, it becomes necessary the application of processing technologies that maintain the desired properties. The spray-drying technique associated with encapsulation is intended to provide the protection of the substances of interest, since it avoids the direct counting of them with light and heat. This has enabled a greater supply of food with functional potential and longer shelf life, while adding commercial value to the products developed. The mastery of the processing techniques for blueberry, and the knowledge of the maintenance of the functional properties of elaborated products is of paramount importance for the industry that wishes to stand out in the branch of functional foods. This study aimed to characterize two blueberry encapsulated extracts produced in the north of Rio Grande do Sul. We tested two encapsulating agents: gum arabic (GA) and whey protein concentrate (CPS). From the encapsulated extract that presented the best functional, morphological and sensorial response, the study was continued with this extract, carrying out stability tests of the bioactive compounds during the shelf life and verifying their antioxidant behavior also in an in vivo test, using as a model The yeast *Saccharomyces cerevisiae*. As morphological tests of the encapsulation of the extracts we used the Encapsulation Efficiency (EE) and evaluation of the external morphology of the microcapsules by Scanning Electron Microscopy (SEM). Color analysis was performed as a sensorial attribute. To verify the functional potential we evaluated the total and individual phenolic compounds by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and measured the antioxidant activity by DPPH. Our results were more satisfactory with the extract encapsulated with GA (E1) with respect to morphology, color analysis and functional potential. In this way, E1 was selected to continue the study, where we obtained a reduction of phenols and total flavonoids during storage at 4° C for 5 and 10 months. In relation to the stability of the antioxidant activity against temperatures of -18, 4 and 25° C for 4 weeks, we obtained significant losses at all temperatures, but better results were obtained when the extract remained under freezing (-18°C). In our in vivo test, the use of E1 in iron-stressed *Saccharomyces cerevisiae* cells was able to reduce lipid peroxidation through the TBARS method and increase GPX activity. Our study has proven that the blueberry extract encapsulated with gum arabic has maintained the antioxidant functionality present in the fruit and can be a promising ingredient in the development of functional foods. It is suggested that the industries of interest should ensure proper conservation to avoid degradation of the bioactive compounds and thus ensure longer shelf life to the product.

Key-words: Red fruits. Microencapsulation. Nutraceutical.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mirtilos .....	17
Figura 2 - Estrutura química dos flavonoides.....	22
Figura 3 - Estrutura química dos ácidos hidroxibenzóicos (a) e hidroxicinâmicos (b).....	23
Figura 4 - Estrutura química de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol.....	24
Figura 5 - Estruturas das antocianidinas mais comuns em alimentos de origem vegetal.....	25
Figura 6 - Estrutura química das antocianinas .....	26
Figura 7 - Representação da estrutura das cápsulas (a) mononucleares e (b) multinucleares ...	27
Figura 8 - Diagrama esquemático do <i>spray dryer</i> .....	33
Figura 9 - CPS líquido (esquerda) e em pó (direita) após secagem por atomização .....	44
Figura 10 - Mirtilos utilizados no trabalho .....	55
Figura 11 - EB concentrado na tentativa de secagem por liofilização .....	59
Figura 12 - Fotomicrografia do E1 obtida por MEV, aumento de 4000 X .....	62
Figura 13 - Fotomicrografia do E2 obtida por MEV, aumento de 4000 X .....	62
Figura 14 - EB em T0 (esquerda) e T1 (direita).....	65
Figura 15 - E1 (esquerda) e E2 (direita).....	66
Figura 16 - Inibição do radical DPPH quando em contato com o extrato bruto (EB) – T0 e T1 .....	72
Figura 17 - Inibição do radical DPPH quando em contato com o E1 – T0 e T5.....	73
Figura 18- Inibição do radical DPPH quando em contato com E2 – T0.....	74
Figura 19 - Inibição do radical DPPH quando em contato com E2 – T0 após ruptura da cápsula por 155 min. ....	75
Figura 20 - Estabilidade antioxidante do E1 submetido a diferentes temperaturas.....	79
Figura 21 - Valores médios de peroxidação frente à toxicidade de ferro com e sem tratamento com E1 .....	81
Figura 22 - Valores médios da dosagem da atividade enzimática da GPX por DTNB frente à toxicidade de ferro com e sem tratamento de extrato de mirtilo.....	83

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de H <sup>+</sup> dos ácidos orgânicos.....	39
Tabela 2 - Composição físico-química do mirtilo em 100g da fruta.....	56
Tabela 3 - Quantidade de extrato em pó obtido em relação ao volume de solução colocada no <i>spray dryer</i> .....	58
Tabela 4 - Análise da EE dos extratos em pó de mirtilo .....	60
Tabela 5 - Cor do EB logo após ser produzido (T0) e após 1 mês de armazenamento (T1)....	64
Tabela 6 - Análise de cor dos extratos em pó de mirtilo (E1 e E2).....	65
Tabela 7 - Teores médios de compostos fenólicos totais de extratos de mirtilo .....	68
Tabela 8 - Compostos fenólicos identificados por HPLC em extrato bruto de mirtilo (EB) ...	69
Tabela 9 - Tempo de pico e % máximo de inibição do radical DPPH quando em contato com extratos de mirtilo .....	71
Tabela 10 - Diferença após a ruptura de cápsula do E2 por 150 min.....	75
Tabela 11 - Teores médios de fenóis totais e flavonoides do E1 em 0, 5 e 10 meses de armazenamento sob refrigeração à 4°C .....	77
Tabela 12 - Estabilidade antioxidante do E1 frente à diferentes temperaturas durante quatro semanas .....	78

## **LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**

CPS: concentrado proteico de soro de leite

E1: extrato em pó de mirtilo encapsulado com GA

E2: extrato em pó de mirtilo encapsulado com CPS

EB: extrato bruto de mirtilo

GA: goma arábica

T0: tempo inicial

T1: tempo após 1 mês de armazenamento do EB

T5: tempo após 5 meses de armazenamento do E1 ou E2

## SUMÁRIO

<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>12</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS</b> .....	<b>15</b>
<b>2.2 MIRTILO</b> .....	<b>16</b>
<b>2.2.1 Atividade antioxidante no mirtilo e benefícios à saúde humana</b> .....	<b>18</b>
2.2.1.1 Determinação da capacidade antioxidante .....	19
<b>2.2.2 Compostos fenólicos</b> .....	<b>21</b>
2.2.2.1 Antocianidinas e antocianinas .....	24
<b>2.3 ENCAPSULAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS</b> .....	<b>26</b>
<b>2.3.1 Goma arábica como material encapsulante</b> .....	<b>28</b>
<b>2.3.2 Concentrado Proteico de Soro do Leite (CPS) como material encapsulante</b> ...	<b>29</b>
<b>2.4 PROCESSO DE ATOMIZAÇÃO</b> .....	<b>31</b>
<b>2.5 LEVEDURA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i></b> .....	<b>33</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
<b>3.1 MATÉRIA-PRIMA</b> .....	<b>37</b>
<b>3.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO MIRTILO</b> .....	<b>37</b>
<b>3.2.1 Determinação do pH</b> .....	<b>37</b>
<b>3.2.2 Determinação da acidez titulável</b> .....	<b>38</b>
<b>3.2.3 Determinação da acidez em ácido orgânico</b> .....	<b>38</b>
<b>3.2.4 Teor de sólidos totais</b> .....	<b>39</b>
<b>3.2.5 Cor</b> .....	<b>39</b>
<b>3.2.6 Composição química</b> .....	<b>40</b>
3.2.6.1 Umidade .....	40
3.2.6.2 Cinzas .....	40
3.2.6.3 Proteínas .....	41
3.2.6.4. Lipídeos .....	41
3.2.6.5 Fibra bruta .....	42
3.2.6.6 Carboidratos .....	43
3.2.6.7 Valor calórico total (VCT) .....	43
<b>3.3 ELABORAÇÃO DOS EXTRATOS EM PÓ DE MIRTILO</b> .....	<b>43</b>
<b>3.3.1 Preparo dos materiais encapsulantes</b> .....	<b>44</b>
<b>3.3.2 Encapsulação em <i>spray dryer</i></b> .....	<b>45</b>
<b>3.4 ANÁLISES MORFOLÓGICAS, SENSORIAIS E FUNCIONAIS DOS EXTRATOS EM PÓ DE MIRTILO</b> .....	<b>45</b>
<b>3.4.1 Propriedades morfológicas</b> .....	<b>45</b>
3.4.1.1 Eficiência da Encapsulação (EE).....	45
3.4.1.2 Morfologia externa das microcápsulas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	46
<b>3.4.2 Propriedades Sensoriais</b> .....	<b>46</b>
3.4.2.1 Cor .....	46
<b>3.4.3 Propriedades Funcionais</b> .....	<b>47</b>
3.4.3.1 Compostos fenólicos totais .....	47

3.4.3.2 Identificação e quantificação de compostos fenólicos individuais por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD).....	48
3.4.3.3 Atividade antioxidante por DPPH .....	48
<b>3.5 ESTABILIDADE DAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS FRENTE A VIDA DE PRATELEIRA DO EXTRATO SELECIONADO .....</b>	<b>50</b>
3.5.1 Estabilidade de fenóis totais .....	50
3.5.2 Estabilidade de flavonoides totais .....	51
3.5.3 Estabilidade antioxidante pelo método ABTS em diferentes temperaturas ....	51
<b>3.6 ESTUDO <i>IN VIVO</i> COM O MODELO <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>.....</b>	<b>52</b>
3.6.1 Avaliação da peroxidação lipídica pelo método de ácido tiobarbitúrico (TBARS) .....	53
3.6.2 Dosagem da atividade enzimática da glutatona.....	53
<b>3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>54</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
<b>4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO MIRTILO .....</b>	<b>55</b>
<b>4.2 ELABORAÇÃO DOS EXTRATOS EM PÓ DE MIRTILO .....</b>	<b>58</b>
<b>4.3 ANÁLISES MORFOLÓGICAS, SENSORIAIS E FUNCIONAIS DOS EXTRATOS EM PÓ DE MIRTILO .....</b>	<b>60</b>
<b>4.3.1 Propriedades morfológicas .....</b>	<b>60</b>
4.3.1.1 Eficiência da Encapsulação (EE).....	60
4.3.1.2 Morfologia externa das microcápsulas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	61
<b>4.3.3 Propriedades Sensoriais .....</b>	<b>64</b>
4.3.2.1 Análise de cor .....	64
<b>4.3.3 Propriedades funcionais.....</b>	<b>67</b>
4.3.3.1 Compostos fenólicos totais.....	67
4.3.3.2 Identificação e quantificação de compostos fenólicos individuais por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	69
4.3.3.3 Atividade antioxidante por DPPH .....	71
<b>4.4 ESTABILIDADE DAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS FRENTE A VIDA DE PRATELEIRA DO EXTRATO SELECIONADO .....</b>	<b>76</b>
4.4.1 Estabilidade de fenóis e flavonoides totais .....	77
4.4.2 Estabilidade antioxidante pelo método ABTS em diferentes temperaturas ....	78
<b>4.5 ESTUDO <i>IN VIVO</i> COM O MODELO <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>.....</b>	<b>80</b>
4.5.1 Peroxidação lipídica pelo método de TBARS .....	81
4.5.2 Atividade enzimática da glutatona .....	82
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>85</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>86</b>
<b>APÊNDICE A – ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>	<b>110</b>



## 1 INTRODUÇÃO

Observamos nas últimas décadas um aumento na expectativa de vida da população, mas a longevidade pode vir acompanhada de doenças crônicas não transmissíveis, ocasionadas não somente pelo envelhecimento, mas também pelas mudanças no estilo de vida, em especial por dietas desequilibradas e sedentarismo. Órgãos ligados à saúde e bem-estar, como a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), propõem alternativas para a manutenção e melhoria geral da qualidade de vida dos indivíduos. Diante disso, uma nova tendência alimentar e de cuidados com saúde vem sendo evidenciada. O consumidor consciente busca por uma alimentação que, além de ter praticidade de consumo, possa beneficiar a saúde.

A indústria de alimentos, atenta a este novo e crescente segmento de mercado, tem investido na busca de substâncias que contenham compostos bioativos, com interesse para o desenvolvimento de alimentos saudáveis, com potencial funcional. Produtos enriquecidos com frutas que desempenham atividade antioxidante, por exemplo, podem incrementar o mercado e garantir boas perspectivas financeiras à indústria.

O mirtilo (*Vaccinium* sp. ou *blueberry* em inglês) é uma fruta que tem se destacado no mercado mundial pelo reconhecimento da sua composição, rica em compostos fenólicos como os flavonoides e antocianinas. Estes pigmentos, além de conferirem a cor arroxeada-escura à fruta, são responsáveis pela atividade antioxidante, associada a neutralização de radicais livres.

No Brasil, a produção de mirtilo ainda é pequena, levando a um alto custo no mercado regional, o que tem estimulado a expansão da cultura e o aumento da demanda pelo produto. Além disso, a safra de mirtilo no sul do país ocorre apenas em dois a três meses no ano (dezembro a fevereiro) e que força o mercado regional a adquirir parte do produto de mercados externos, geralmente vindo do Chile e dos EUA.

Por ser uma fruta muito sensível, com uma curta vida útil, torna-se necessário a aplicação de processos tecnológicos que visem prolongar a validade deste produto, na forma *in natura* ou mesmo, no desenvolvimento de novos produtos (geleias, sucos, sorvetes, *shakes*, etc.) a fim de aproveitar os seus benefícios para atender à exigência do mercado consumidor.

Ao submeter o mirtilo ao processamento industrial, pode-se haver perdas nutricionais e de compostos bioativos frente às condições do processo (luz, temperatura, etc.). Uma técnica que vem sendo bastante utilizada neste segmento, com o intuito de preservar a funcionalidade de alimentos com propriedades bioativas, é a encapsulação seguida da secagem por atomização. Esta técnica evita o contato direto das substâncias de interesse com a luz e o calor, já que estão



protegidas, envoltas pelo encapsulante. Manter a funcionalidade da fruta, mesmo com a aplicação desses processos é o grande desafio para a indústria de alimentos que deseja se destacar no ramo de alimentos funcionais.

Buscando contribuir com a ciência e ao mesmo tempo aperfeiçoar a indústria de alimentos que se propõe a desenvolver produtos com atributos funcionais ou terapêuticos, o objetivo deste trabalho foi elaborar e estudar as propriedades morfológicas, sensoriais e funcionais de dois extratos de mirtilo secos por atomização utilizando-se diferentes materiais encapsulantes. O extrato que apresentou melhores condições dentre estes parâmetros foi submetido a testes de estabilidade funcional durante a vida de prateleira e de comportamento antioxidante em um ensaio *in vivo*, utilizando-se como modelo experimental a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS

O conceito de alimentos funcionais surgiu inicialmente no Japão, em meados da década de 80, e nos anos 90, recebeu a designação em inglês de FOSHU (*foods for specified health use*, ou alimentos para uso específico de saúde). O termo refere-se aos alimentos na forma natural que fazem parte de uma dieta habitual, mas que demonstram benefícios fisiológicos e/ou reduzem o risco de doenças crônicas, além das suas funções básicas nutricionais (COSTA; ROSA, 2010). Seus efeitos vêm sendo estudados, principalmente, nas patologias, como o câncer, diabetes, hipertensão, mal de Alzheimer, doenças ósseas, cardiovasculares, inflamatórias e intestinais (VIDAL et al., 2012).

O termo “nutracêutico” se relaciona a uma ampla gama de alimentos e componentes alimentares com forte apelo à saúde. Incluem suplementos alimentares, nutrientes isolados, produtos herbais, alimentos enriquecidos com determinados ingredientes ou alimentos processados (MORAES; COLLA, 2006; DOBRENOVA; GRABNER-KRÄUTER; TERLUTTER, 2015).

Os critérios para aprovação de alimentos funcionais, bem como para denominações de alegações variam de acordo com a regulamentação local ou regional. No Brasil, a legislação não define “alimento funcional”. A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) (1999) define “alegações de propriedades funcionais” – que se refere ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente, desempenha no crescimento, no desenvolvimento, na manutenção e em outras funções normais do organismo humano. Da mesma forma, determina “alegações de propriedade de saúde” – a qual afirma, sugere e implica a existência de relação entre alimento ou ingrediente e a doença ou condição relacionadas à saúde (BRASIL, 1999).

Um alimento funcional pode ser classificado de acordo com o alimento em si ou conforme os componentes bioativos nele presentes, como, por exemplo, os probióticos, as fibras, os fitoquímicos, as vitaminas, os minerais, as ervas, os ácidos graxos ômega-3, além de determinados peptídeos e proteínas. Existem outras duas formas de classificação desses alimentos: quanto à fonte, podendo ser de origem vegetal ou animal; ou quanto aos benefícios que oferecem, atuando em seis áreas do organismo (no sistema gastrointestinal, no sistema cardiovascular, no metabolismo de substratos, no crescimento, no desenvolvimento e

diferenciação celular, no comportamento das funções fisiológicas e como antioxidantes) (ARVANITTOYANNIS; HOUWELINGEN-KOUKALIAROGLOU, 2005; CASEMIRO; RAMOS, 2014).

A inovação voltada a estes alimentos e produtos funcionais tornou-se uma forte tendência nos setores farmacêutico e alimentício (DE BARCELLOS et al., 2012). Vários são os fatores que estimulam o desenvolvimento deste mercado, dentre os quais se destacam: o aumento da expectativa de vida; o elevado custo dos serviços de saúde; os avanços na tecnologia de alimentos e ingredientes; a necessidade que as instituições de pesquisa têm de divulgar os resultados de suas investigações; diferentes tipos de mídia que proporcionam uma maior cobertura de propagandas; e às questões de saúde, em que se observa um maior interesse da população por uma melhor qualidade de vida (ARVANITTOYANNIS; HOUWELINGEN-KOUKALIAROGLOU, 2005; OLIVEIRA, et al. 2012).

O mirtilo pode ser considerado um alimento funcional porque responde às exigências de tal definição, implicando que o desenvolvimento de novos produtos que contenham esta fruta processada é uma área promissora dentro da indústria alimentícia. Segundo Casemiro e Ramos (2014) e Oliveira, et al. (2012), o consumidor está exigindo alimentos que suprem suas necessidades nutricionais, e que possam contribuir para o fortalecimento da sua saúde e manutenção do seu bem-estar, além de retardar o aparecimento de doenças e o processo natural de envelhecimento.

## **2.2 MIRTILO**

O mirtilo (ou *blueberry*, em inglês), do gênero *Vaccinium* e família *Ericaceae* (WANG et al., 2015) pertence ao grupo das frutas vermelhas e tem formato de uma pequena baga que cresce em um arbusto caducifólio baixo, de 1 a 2 metros de altura. De sabor ligeiramente agri-doce, o mirtilo apresentam coloração avermelhada a azulada quando maduros e são cobertos por uma cera denominada pruína (Figura 1) (ANTUNES e HAFFMANN, 2002; CANTUARIAS-AVILÉS, 2014).

Figura 1 - Mirtilos



Fonte: Sousa (2007).

Ao mesmo tempo em que apresenta baixo teor de lipídio, proteína e sódio, a composição química do mirtilo é bem variada ao se tratar de vitaminas e minerais, além de apresentar alto teor de umidade, fibras e açúcares. Exibe uma considerável quantidade das vitaminas A, B, C e ácido fólico (B9), e dos minerais cálcio, potássio, magnésio, fósforo, ferro, manganês. (MORAZZONI; BOMBARDELLI, 1996; SILVEIRA; VARGAS; ROSA, 2007; DEL BO et al., 2015).

Pode-se dizer que o mirtilo é uma das frutas que mais cresce em consumo no mundo (MORAZZONI; BOMBARDELLI, 1996; WANG, et al., 2015). Sua procura e aceitabilidade pela população é atribuída à disseminação das pesquisas que confirmam o potencial terapêutico da fruta à saúde humana. A presença de compostos fenólicos como as antocianinas e antocianidinas, resveratrol, taninos, ácido málico, cítrico e tartárico, conferem ao mirtilo importante atividade antioxidante (DEL BO et al., 2015). Em um estudo realizado por Prior et al. (1998) evidenciou-se que o mirtilo possui a maior atividade antioxidante comparado a outros 42 tipos de frutas e vegetais.

Mundialmente, a produção comercial de mirtilo ocorre principalmente na América do Norte (EUA e Canadá), na Europa (Polônia, Alemanha) e também em países do Hemisfério Sul (Chile, Argentina, Uruguai, Austrália). Em todas as regiões, a produção mundial de mirtilo tem aumentado de forma significativa. Entre 1998 e 2011, a produção comercial cresceu de 143.704

para 467.048 toneladas (FAO, 2015). Isto se deve ao maior consumo de mirtilo no Hemisfério Norte, impulsionado pela crescente demanda de alimentos com potencial funcional. No mesmo período, a área mundial colhida em mirtilo aumentou em 60%, de 48.903 para 81.091 hectares (BRAZELTON, 2013).

A introdução da cultura de mirtilo no Brasil ocorreu na década de 80, inicialmente no estado do Rio Grande do Sul. Todavia, foi nos anos 2000 que ocorreu a maior expansão do cultivo comercial desta fruta na região sul, estimulada pela crescente demanda mundial e pelos atrativos preços no mercado europeu (CANTUARIAS-AVILÉS, 2010). Segundo Fachinello (2008), a área cultivada no Brasil é superior a 150 hectares, sendo que o Rio Grande do Sul ainda é o estado que mais se destaca na produção de mirtilo, com uma área plantada de 65 hectares e uma produção em torno de 150 toneladas.

Entretanto, por consequência de as condições climáticas serem exigentes para o cultivo do mirtilo, o plantio do fruto é pouco disseminado no país, o que torna caro o custo do produto. A disponibilidade de água, clima favorável e terras aptas caracterizam o RS como um bom local para o cultivo desta fruta (SILVEIRA; VARGAS; ROSA, 2007).

Esta fruta pode ser classificada em três grandes grupos principais: *rabbiteye*, *lowbush* e *highbush*. Segundo Zen (2010), os cultivares do primeiro grupo adaptam-se em regiões de pouco frio (cerca de 300 horas de frio), enquanto as do grupo *highbush* se adaptam melhor em regiões mais frias, que geralmente coincidem com as de maior altitude. Já a *lowbush* é a que mais necessita de frio (acima de 1000 horas de frio por ano).

### **2.2.1 Atividade antioxidante no mirtilo e benefícios à saúde humana**

As pesquisas sobre compostos bioativos têm aumentado devido à sensibilização dos consumidores pelos seus benefícios associados à manutenção da saúde e bem-estar. Entre estes compostos, aqueles que estão relacionados a atividade antioxidante são mais frequentemente investigados pelos pesquisadores devido à sua capacidade de estabilizar ou desativar radicais livres, evitando danos estruturais celulares (PAZ et al., 2015).

Além da elevada capacidade antioxidante do mirtilo estar relacionada com o seu conteúdo total de compostos fenólicos, principalmente na forma de antocianinas, o ácido ascórbico (vitamina C) também apresenta uma pequena contribuição para atividade antioxidante. (SUN et al., 2002; REQUE et al., 2014). Estes compostos concentram-se principalmente na pele dos frutos, em vacúolos de células ligados a açúcares que conferem a fruta estabilidade e solubilidade em água (REQUE et al., 2014).

A capacidade que os compostos fenólicos apresentam de inativar os radicais livres, formados a partir de espécies reativas de oxigênio, é atribuída à presença de grupamentos hidroxilas (OH<sup>-</sup>) que possuem capacidade de se ligar a estes radicais livres presentes no organismo e impedir a sua ação, que poderia causar danos e/ou oxidação de componentes de células. (WANG et al., 2015).

O termo radical livre é frequentemente utilizado para designar qualquer átomo ou molécula contendo um ou mais elétrons desemparelhados nos orbitais mais externos, o que tornam estas moléculas altamente reativas, capazes de reagir com qualquer composto que esteja próximo, possuindo papel oxidante. Sendo assim, a formação de espécies reativas de oxigênio e radicais livres ocorre no metabolismo biológico normal, porém com maior ênfase em circunstâncias patológicas ou no processo de envelhecimento (GRACE, 1994; MARRONI; MARRONI, 2002).

Alimentos ricos em compostos fenólicos possuem função antioxidante e podem atuar beneficemente sobre os radicais livres. Muitos estudos têm demonstrado que estes alimentos desempenham papel fundamental na prevenção de diversas patologias, já que a produção exagerada de espécies reativas de oxigênio está envolvida na etiologia de diversas doenças, tais como câncer, dislipidemias, doenças neurodegenerativas, doenças inflamatórias, problemas cardiovasculares, doenças decorrentes do envelhecimento, entre outras que afetam a qualidade de vida dos indivíduos (CODY; MIDDLETON; HARBORNE, 1986; AMARAL, 2005; PARANÁ, 2011; DENG et al., 2013). Em um estudo experimental, Pervin et al. (2016) comprovaram o efeito terapêutico de extrato de mirtilo na regulação dos mediadores inflamatórios ocasionados por colite ulcerativa induzida em ratos.

#### 2.2.1.1 Determinação da capacidade antioxidante

Existem diversos métodos para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de substâncias biologicamente ativas, envolvendo desde ensaios químicos com substratos lipídicos a ensaios mais complexos utilizando as mais diversas técnicas instrumentais (SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

Estes testes têm se tornado ferramentas usuais e extremamente necessárias na seleção inicial de substâncias que possam ser utilizadas como fármacos, auxiliando os pesquisadores na avaliação da atividade de substâncias isoladas de produtos naturais, bem como obtidas de fontes sintéticas. Além disso, estes métodos podem auxiliar na escolha das espécies de planta para estudos químicos e farmacológicos, bem como grau de maturação, condições ambientais,

etc. e comprovar a presença de substâncias antioxidantes em alimentos como frutas, legumes e bebidas, ressaltando a importância de uma dieta rica em vegetais (ALVES et al., 2010).

Devido aos diferentes tipos de radicais livres e as suas diferentes formas de atuação nos organismos vivos, dificilmente existirá um método simples e universal pelo qual a atividade antioxidante possa ser medida precisa e quantitativamente. Assim, a busca por testes mais rápidos e eficientes tem gerado um grande número de métodos para avaliar a atividade de antioxidantes naturais pelo uso de uma grande variedade de sistemas geradores de radicais livres (ALVES et al., 2010).

Devido à larga divergência dos resultados de testes com antioxidantes naturais em alimentos, muitos protocolos e diretrizes têm sido estabelecidos no sentido de trazer ordem e concordância a este importante campo (FRANKEL; FINLEY, 2008). Para se ter uma avaliação mais precisa da atividade antioxidante de uma determinada substância, é necessário saber quais tipos de radicais são gerados, como, onde e a extensão do dano causado. Assim, o entendimento sobre os efeitos dos compostos antioxidantes somente pode ser aperfeiçoado se metodologias mais específicas forem utilizadas, e se estas forem capazes de definir quais produtos são formados e inibidos pelos antioxidantes, e em quais condições, sistemas e alvos de proteção (HALLIWELL et al., 1995).

Halliwell (2000) propõe algumas questões que devem ser usadas para avaliar a ação antioxidante *in vivo*, que podem ser respondidas por experimentos simples e seu resultado nos permite rejeitar um possível antioxidante, pois um composto que exibe baixa atividade antioxidante *in vitro* provavelmente exibirá pouca atividade *in vivo*.

O efeito do sequestro de radicais é determinado não somente pela reatividade do antioxidante com o radical, mas também pela sua concentração. Embora muitos antioxidantes reajam rapidamente com o radical hidroxil, muitas moléculas biológicas, que são mais abundantes que os antioxidantes, reagem também rapidamente com esse radical. Por isso é praticamente impossível para algum antioxidante sequestrar o radical hidroxil efetivamente. Outro ponto importante é saber onde os radicais livres são produzidos, e se o antioxidante é capaz de alcançá-los. Por exemplo, a vitamina C é um potente sequestrador para radicais hidrofílicos, mas pobre frente a radicais lipofílicos (NIKI, 2002).

Os testes antioxidantes em alimentos e sistemas biológicos podem ser classificados em dois grupos: os ensaios usados para avaliar peroxidação lipídica, no qual um lipídio ou substrato lipoproteico sob condições padrão é usado e o grau de inibição da oxidação é medido, e os ensaios usados para medir a habilidade de sequestro de radicais livres (SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

### 2.2.2 Compostos fenólicos

Frutas vermelhas são, em geral, excelentes fontes vegetais de compostos bioativos, como os compostos fenólicos (PIMENTEL; FRANCKI; GOLLUCKE, 2005). O mirtilo, por fazer parte deste grupo de frutas, possui em sua composição uma vasta combinação desses compostos fenólicos. As principais subclasses de fenólicos presentes no mirtilo são os flavonóides (antocianinas, flavanóis e flavonóis), os estilbenos (resveratrol), os ácidos fenólicos (derivados dos ácidos cinâmicos e benzóicos) e os taninos (FRANCIS, 2000; SOUZA, et al., 2014).

Os compostos fenólicos são encontrados amplamente em plantas e são um grupo muito diversificado de fitoquímicos derivados da fenilalanina e tirosina. Originam-se do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução. Além disso, se formam em condições de estresse como infecções, ferimentos e radiações UV, atuando como agente antipatogênico (NACZK; SHAHIDI, 2004). Em alimentos, são responsáveis pela pigmentação, adstringência, aroma e estabilidade oxidativa (PELEG; BODINE; NOBLE, 1998; NACZK; SHAHIDI, 2004).

Compostos fenólicos são assim denominados por fazer parte do grupo de compostos químicos que possuem mais de um anel fenólico por molécula. As estruturas de polifenóis naturais variam de moléculas simples, como ácidos fenólicos, para compostos altamente polimerizados, tais como taninos. Por apresentarem estruturas variadas, são multifuncionais. Existem cerca de cinco mil fenóis, dentre eles destacam-se os flavonoides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis (HARBORNE; BAXTER; MOSS, 1999; CHENG et al., 2014).

Nos vegetais, os compostos fenólicos estão presentes na forma livre (agliconas) ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (BRAVO, 1998; DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004). Ribéreau-Gayon (1968) classificou estes compostos em três categorias: pouco distribuídos na natureza, polímeros e largamente distribuídos na natureza.

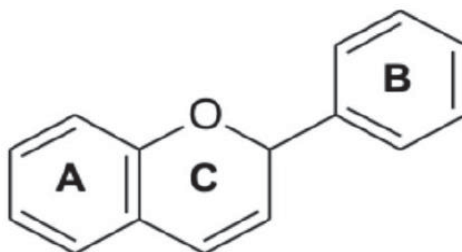
Na família dos compostos pouco distribuídos na natureza, encontra-se um número bem reduzido, embora com certa frequência. Neste grupo estão os fenóis simples, o pirocatecol, a hidroquinona e o resorcinol. Pertencem ainda a esta família os aldeídos derivados dos ácidos benzóicos, que são constituintes dos óleos essenciais, como a vanilina. Já os polímeros são alguns fenólicos que não se apresentam na forma livre nos tecidos vegetais, é o caso dos taninos e das ligninas (SOARES, 2002).



No grupo dos compostos largamente distribuídos na natureza estão os fenólicos encontrados geralmente em todo reino vegetal, mas às vezes podem estar localizados em uma só planta. Este grupo pode-se dividir em flavonoides (antocianinas, flavonóis e seus derivados), ácidos fenólicos (ácidos benzóico, cinâmico e seus derivados) e cumarinas (KING; YOUNG, 1999).

Os flavonoides são compostos de baixa massa molecular, consistindo em 15 átomos de carbono, organizados na configuração C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (HARBORNE; BAXTER; MOSS, 1999). Sua estrutura química consiste em dois anéis aromáticos, denominados anel A e B, unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico, denominado anel C (Figura 2).

Figura 2 - Estrutura química dos flavonoides

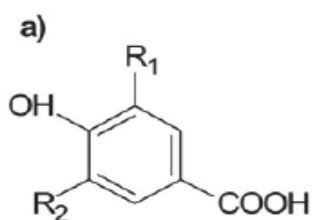


Fonte: Angelo; Jorge (2007).

O anel aromático A é derivado do ciclo acetato/malonato, enquanto o anel B é derivado da fenilalanina (MERKEN; BEECHER, 2000). Variações em substituição do anel C padrão resultam em importantes classes de flavonoides, como flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis (ou catequinas), isoflavonas e antocianidinas. Substituições dos anéis A e B originam diferentes compostos dentro de cada classe de flavonoides. Estas substituições podem incluir oxigenação, alquilação, glicosilação, acilação e sulfação (HOLLMAN; KATAN, 1999; AHERNE; O'BRIEN, 2002).

Os ácidos fenólicos caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes para os vegetais (SOARES, 2002). Consistem em dois grupos: os derivados do ácido hidroxibenzóico e os derivados do ácido hidroxicinâmico (Figura 3).

Figura 3 - Estrutura química dos ácidos hidroxibenzoicos (a) e hidroxicinâmicos (b)

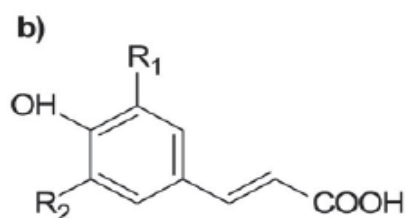


Ácido p-hidroxibenzoico:  $R_1 = R_2 = H$

Ácido protocatecuico:  $R_1 = OH, R_2 = H$

Ácido vanílico:  $R_1 = OCH_3, R_2 = H$

Ácido siríngico:  $R_1 = R_2 = OCH_3$



Ácido p-cumárico:  $R_1 = R_2 = H$

Ácido caféico:  $R_1 = OH, R_2 = H$

Ácido ferúlico:  $R_1 = OCH_3, R_2 = H$

Fonte: Angelo; Jorge (2007).

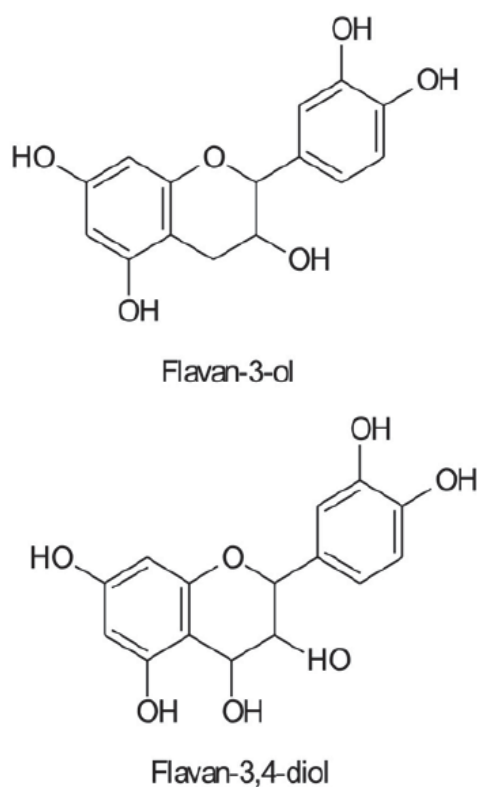
Os ácidos hidroxibenzoicos incluem os ácidos gálico, p-hidroxibenzoico, protocatecuico, vanílico e siríngico, que têm estrutura comum, C6–C1 26; enquanto os ácidos hidroxicinâmicos, são compostos aromáticos com três carbonos que formam uma cadeia lateral (C6–C3), como os ácidos caféico, ferúlico, p-cumárico e sináptico (BRAVO, 1998), sendo estes antioxidantes mais ativos do que os derivados do ácido benzoico (BALASUNDRAN; SUNDRAN; SAMMAN, 2006). Isso se deve à dupla ligação presente na molécula dos derivados do ácido cinâmico, que participa da estabilidade do radical por ressonância de deslocamento do elétron desemparelhado, enquanto que os derivados do ácido benzoico não apresentam essa característica (WANASUNDARA; AMAROWICZ; SHAHIDI, 1994).

Os taninos possuem a massa molecular relativamente alta, constituindo uma classe de polifenóis e, segundo a estrutura química, são classificados em taninos hidrolisáveis e taninos condensáveis (OSZMIANSKI, et al., 2007).

Taninos condensáveis, denominados proantocianidinas, são oligômeros e polímeros de flavan-3-ol (catequina) e/ou flavan-3,4-diol (leucocianidina), produtos do metabolismo do

fenilpropanol (Figura 4). As proantocianidinas, assim denominadas, provavelmente pelo fato apresentarem pigmentos avermelhados da classe das antocianidinas, como cianidina e delphinidina, apresentam uma rica diversidade estrutural, resultante de padrões de substituições entre unidades flavânicas, diversidade de posições entre suas ligações e estereoquímica de seus compostos (MONTEIRO, et al., 2005).

Figura 4 - Estrutura química de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol



Fonte: Angelo; Jorge (2007).

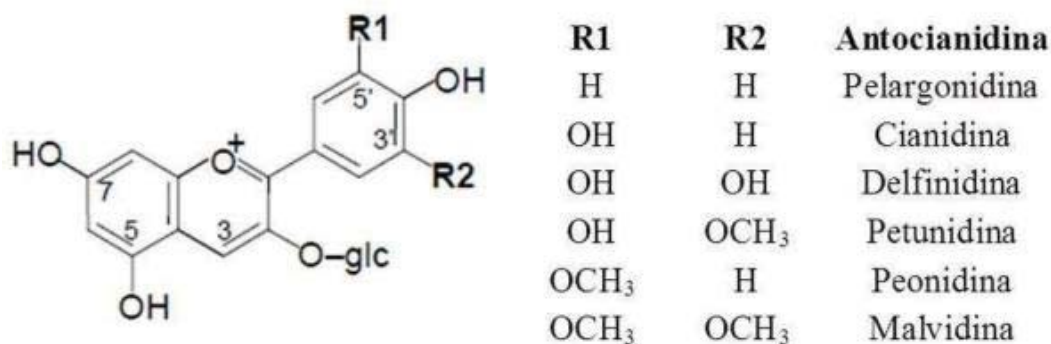
Os taninos hidrolisáveis são ésteres de ácidos gálico e elágicos glicosilados, formados a partir do chiquimato, onde os grupos hidroxilas do açúcar são esterificados com os ácidos fenólicos. Os taninos elágicos são muito mais frequentes que os gálicos, e é provável que o sistema bifenílico do ácido hexaidroxidifenílico seja resultante da ligação oxidativa entre dois ácidos gálicos (KING; YOUNG, 1999; BURNS, et al., 2000; PORTER, 1989).

#### 2.2.2.1 Antocianidinas e antocianinas

As antocianidinas são as estruturas básicas das antocianinas. Quando as antocianidinas estão na forma glicosilada, ou seja, ligadas a um açúcar, elas são chamadas antocianinas

(KONG et al., 2003). Dentre as encontradas na natureza, apenas seis estão presentes em alimentos: pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina, que diferem entre si quanto ao número de hidroxilas e grau de metilação, presentes no anel B (Figura 5) (MACHEIX; FLEURIT; BILLOT, 1990; KONG et al., 2003).

Figura 5 - Estruturas das antocianidinas mais comuns em alimentos de origem vegetal



Fonte: Pascual-Tereza; Moreno; Garcia-Vigueira (2010)

Antocianinas pertencem a uma das subclasses dos flavonoides e representam os compostos fenólicos presentes em maior quantidade no mirtilo, que têm expressiva presença na casca do fruto. Na polpa, por sua vez, as procianidinas estão em maior quantidade (KAISU et al., 2008). Kalt et al., (1999) e Zen (2010) relatam que dentre as frutas vermelhas, o mirtilo apresenta maior capacidade antioxidante, a qual é diretamente ligada ao seu alto teor de antocianinas.

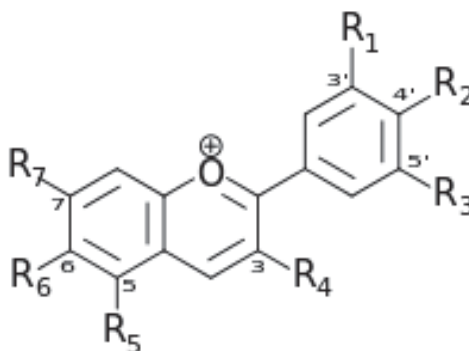
Compõem o grupo de pigmentos responsáveis por grande parte das cores em flores, frutas, folhas, caules e raízes de plantas. Esses pigmentos conferem diferentes tonalidades de cor, oscilando entre vermelho, laranja e roxo, de acordo com condições intrínsecas, como o pH, encontradas nos vegetais (TEIXEIRA; STRINGHETA; OLIVEIRA, 2008). Além disso, a função desses importantes pigmentos é de proteger as plantas de estressores ambientais, como baixas temperaturas e luz ultravioleta (DEL BO et al., 2015).

As antocianinas são constituídas por dois anéis de benzeno e um anel heterocíclico central contendo oxigênio (KONCZAK; ZHANG, 2004). São compostos solúveis em água e sensíveis ao calor apresentando-se, na maior parte das vezes, glicosadas com açúcares que auxiliam na estabilização da molécula (TEIXEIRA; STRINGHETA; OLIVEIRA, 2008).

A estrutura das antocianinas é baseada em um esqueleto C15, consistindo de um anel aromático ligado a um segundo anel na posição de C2. Essa estrutura é completa por uma ou mais moléculas de açúcar ligadas em diferentes posições hidroxiladas da estrutura básica

(Figura6). As antocianinas diferem entre si pelo número de grupos hidroxila, número e natureza dos açúcares unidos à molécula, posição desse açúcar e pelo número e natureza dos ácidos alifáticos ou aromáticos unidos aos açúcares da molécula (KONG et al., 2003).

Figura 6 - Estrutura química das antocianinas



Fonte: López; Jiménez; Vargas (2000).

O interesse por esses pigmentos se intensificou uma vez que pesquisas têm demonstrado que as antocianinas e suas respectivas agliconas são compostos bioativos e que, entre os vários outros efeitos fisiológicos, possuem capacidade antioxidante (KÄHKÖNEN; HEINONEN, 2003; TSUDA, 2012) e propriedade anti-inflamatória (MATSUI et al., 2002; MIGUEL, 2011), promovem vasodilatação (BURNS et al., 2000; SPECIALE et al., 2014; JENNINGS et al., 2012) e regulação do metabolismo de lipídios; manutenção da função hepática e função cardioprotetora, por reduzir placas de ateroma (WU et al., 2013; JIA et al., 2013).

Atuam também na prevenção da hiperglicemia (MATSUI et al., 2002), estimulam a secreção de insulina (JAYAPRAKASAM et al., 2005), melhoram a adaptação da visão e previnem a fadiga visual (NAKAISHI et al., 2000). Zhang, Vareed e Nair (2005) constataram que as antocianinas cianidina, delphinidina, pelargonidina, petunidina e malvidina exercem efeito inibitório na proliferação de células cancerígenas humanas que são originadas no estômago, cólon, mama, pulmão e sistema nervoso central.

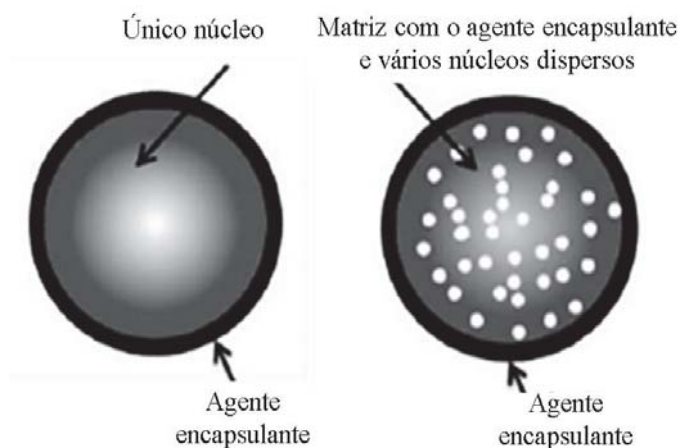
### 2.3 ENCAPSULAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

A encapsulação é a tecnologia de recobrir partículas sólidas ou pequenas gotas de material líquido ou gasoso, formando cápsulas em miniatura, as quais podem liberar seu conteúdo em taxas controladas sob condições específicas. Tais cápsulas podem apresentar tamanhos variando desde frações de micron até vários milímetros, em diferentes formas,

dependendo dos materiais e métodos utilizados em sua preparação. O material externo é o agente encapsulante, enquanto que o ingrediente interno é o material ativo (FÁVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008; NESTERENKO et al., 2013).

As cápsulas fisicamente são caracterizadas pela sua forma esférica e por apresentar aspecto sólido. Nos métodos de encapsulação, diferentes grupos morfológicos podem ser observados, sendo dois os mais comumente visualizados: (1) mononucleares, onde o material ativo fica concentrado próximo ao centro, rodeado pelo agente encapsulante ou, (2) multinucleares, onde o agente encapsulante forma uma rede tridimensional com vários materiais ativos que podem estar adsorvidos, incorporados ou ligados covalentemente à matriz (Figura 7) (FANG; BHANDARI, 2010).

Figura 7 - Representação da estrutura das cápsulas (a) mononucleares e (b) multinucleares



Fonte: Burgain et al. (2011).

A indústria de alimentos utiliza a encapsulação por várias razões, entre elas destacam-se: transformar líquidos em sólidos para uso em sistemas secos; reduzir a reatividade do material ativo em relação ao ambiente (luz, oxigênio e umidade); diminuir as taxas de evaporação (compostos voláteis) ou transferência de massa do material ativo para o ambiente; controlar a liberação do material ativo até o estímulo apropriado; mascarar o sabor e o odor do material ativo; aumentar o *shelf life*; e melhorar as condições de manuseio do material ativo através da redução da higroscopicidade, prevenção da formação de aglomerados, dispersão uniforme do material ativo em misturas, principalmente quando em pequenas quantidades, dando-lhe dimensões e superfície similares às dos demais componentes, e manutenção da integridade de sua estrutura (SHAHIDI; HAN, 1993; AZEREDO, 2005; MADENE et al., 2006).

As definições e empregos da encapsulação têm sido ampliados devido às novas necessidades que a indústria de alimentos apresenta em propriedades cada vez mais complexas nas formulações, que muitas vezes só podem ser conferidas através da encapsulação (GOUIN, 2004).

A composição do agente encapsulante, o qual é basicamente um material com capacidade para formar filmes, é o principal determinante das propriedades funcionais das cápsulas. A escolha do agente encapsulante depende de uma série de fatores, entre eles a não reatividade com o material a ser encapsulado, o processo utilizado para a formação da microcápsula e o mecanismo de liberação ideal. Muitos materiais podem ser utilizados como cobertura para as microcápsulas, dentre eles: goma arábica, ágar, alginato e carragena; os carboidratos amido, amidos modificados, dextrinas e sacarose; as celuloses carboximetilcelulose, acetilcelulose, nitrocelulose; os lipídios parafina, mono e diacilgliceróis, óleos e gorduras; os materiais inorgânicos sulfato de cálcio e silicatos; as proteínas do glúten, caseína, gelatina e albumina (JACKSON; LEE, 1991; SHAHIDI; HAN, 1993; CARMO; FERNANDES; BORGES, 2015).

Os mecanismos de liberação dos materiais ativos microencapsulados variam de acordo com a natureza do agente encapsulante, sendo que normalmente ocorrem devido a mecanismos como: variação de temperatura e de pH, solubilidade do meio, biodegradação, difusão, ruptura mecânica, permeabilidade seletiva e gradiente de concentração existente em relação ao meio de liberação. Cabe ressaltar que a espessura da cobertura da microcápsula pode ser modificada de forma que a estabilidade e a permeabilidade sejam alteradas (BAKAN, 1973).

### **2.3.1 Goma arábica como material encapsulante**

A goma arábica é uma goma neutra ou levemente ácida que é extraída a partir do exudado de árvores de Acácia. Esta goma apresenta alta solubilidade em água e baixa viscosidade em solução, que reduz na presença de um eletrólito e em pHs extremos. Podem ser utilizadas soluções com a concentração de até 50%, sendo que acima dessa concentração a dispersão apresenta características de gel (BE MILLER; WHISTLER, 1996).

Estruturalmente a goma arábica é um heteropolissacarídeo complexo que apresenta estrutura muito ramificada. Sua cadeia principal é formada por unidades de D - galactose, unidas por ligações glicosídicas em  $\beta$ - D-1,3, apresentando diferentes estruturas em suas cadeias laterais, como D - galactose, L-ramnose, L-arabinose e ácido D-glucurônico, as quais

estão ligadas a cadeia principal por ligações  $\beta$ -1,6 (MCNAMEE; O'RIORDAN; O'SULLIVAN, 1998).

Esta heteroglicana complexa é composta por duas frações: a primeira é formada por polissacarídeos, com nenhum ou pouco material nitrogenado, correspondendo a 70% da molécula; e a segunda, de maior peso molecular, apresenta uma proteína como parte integrante em sua estrutura. Na segunda fração os polissacarídeos são ligados covalentemente à proteína por ligações ao aminoácido hidroxiprolina e talvez a unidades de serina. O total de proteína presente nesta fração é de aproximadamente 2%, sendo que as frações específicas podem conter até 25% (BE MILLER; WHISTLER, 1996; RIBEIRO; SERAVALLI, 2004).

Em alimentos, esta goma é utilizada como emulsionante e estabilizador de emulsões do tipo óleo em água. Apresenta compatibilidade com elevadas concentrações de açúcar, fazendo com que tenha seu uso generalizado em confeitos que apresentam alto teor de açúcar e baixo teor de água (BE MILLER; WHISTLER, 1996). A goma arábica é amplamente utilizada no processo de encapsulação de compostos lipossolúveis, como limoneno (KAUSHIK, ROOS, 2007), óleo de soja (MCNAMEE; O'RIORDAN; O'SULLIVAN, 1998), azeite de oliva (CALVO et al., 2010), pigmentos do grupo dos carotenoides (ROCHA, 2009; RASCÓN et al., 2011) e flavors (KRISHNAN; KSHIRSAGAR; SINGHAL, 2005), devido à formação de uma emulsão estável e retenção dos compostos voláteis, respectivamente. Também já foi utilizada como material encapsulante de enzimas (RAMAKRISHNAN et al., 2007).

### **2.3.2 Concentrado Proteico de Soro do Leite (CPS) como material encapsulante**

O soro de leite é definido como o líquido esverdeado e translúcido obtido após a precipitação (enzimática ou ácida) da caseína (JELEN, 2003). Desta forma, as proteínas do soro de leite bovino são definidas como aquelas que permanecem retidas no soro do leite depois da coagulação da caseína, a 20°C e pH 4,6.

O soro contém aproximadamente 20% das proteínas originais do leite sendo este o seu componente mais valioso (SGARBIERI, 2005). Quando a rede de caseína é formada e removida do leite para a produção de queijo, o fluido resultante contém aproximadamente 0,6% de proteína e 93% de água. Como a concentração das proteínas é reduzida, são necessárias etapas de concentração para viabilizar que a utilização deste componente (FOEGEDING; LUCK, 2002).



O soro pode ser processado com simples secagem. Este processo foi utilizado com o objetivo de apenas concentrar o conteúdo do soro. Entretanto, como o produto oriundo deste processo (simples evaporação) apresenta excesso de minerais, não é atrativo para o consumo humano e acaba destinado à alimentação animal (DE WIT, 2001).

O desenvolvimento de novas tecnologias de separação por membranas (especialmente a ultra filtração) com a simultânea concentração, remoção de lactose, desmineralização e, a descoberta da importância das proteínas do leite (por suas características funcionais e/ou nutricionais) resultaram na produção de soro em pó com reduzido conteúdo de minerais que permitiu sua incorporação à alimentação humana, aumentando o valor agregado do produto (BORGES, 2001)

A partir desta técnica, com posterior secagem do soro de leite (por *spray dryer* ou liofilização), é possível obter produtos que apresentem maior razão entre o conteúdo de proteína e de sólidos totais (em relação à razão originalmente presente no soro). Estes produtos são designados concentrados proteicos do soro de leite. Estes podem conter diferentes porcentagens de proteínas em relação aos sólidos (VAN DER HORST, 2000).

Inúmeras pesquisas têm demonstrado as qualidades nutricionais e funcionais das proteínas solúveis do soro do leite e suas vantagens em relação a outras fontes protéicas (HARAGUCHI; ABREU; DE PAULA, 2006) originadas de sua composição em aminoácidos que atendem à maioria das exigências fisiológicas do ser humano.

Ademais, as proteínas do soro do leite são conhecidas pela versatilidade de suas propriedades tecnológicas (solubilidade, formação e estabilização de espuma, capacidade emulsificante e estabilidade das emulsões, gelificação, formação de filmes comestíveis e biodegradáveis, absorção e retenção de água e de gordura, melhoria nas propriedades sensoriais, ligação de aroma e sabor e formação de micropartículas) que são responsáveis por sua vasta utilização em produtos alimentícios (MODLER, 2000).

A maior fração proteica do soro compreende as lactoalbuminas. Esta fração contém três classes de proteínas: a  $\beta$ -lactoglobulinas ( $\beta$ -Lg), a  $\alpha$ -lactoalbumina ( $\alpha$ -La) e a soro albumina (BSA), que representam aproximadamente 50, 20 e 10% do total de proteínas do soro respectivamente (FOX; Mc SWEENEY, 1998).

Como a  $\beta$ -Lg e a  $\alpha$ -La compõe a maior parte das proteínas do soro (cerca de 70%) suas características e propriedades influenciam fortemente as funcionalidades do concentrado proteico do soro de leite (CPS). Estas proteínas constituem um grupo bastante diversificado com características estruturais bem diferentes, apresentam estrutura globular e anfifílica

contendo algumas pontes dissulfeto, que lhes conferem certo grau de estabilidade estrutural (NICORESCU et al., 2008).

A  $\beta$ -lactoglobulina é uma proteína globular com 162 resíduos aminoácídicos incluindo uma proporção relativamente alta de aminoácidos com cadeias ramificadas (como a leucina, isoleucina e valina) que conferem à proteína uma estrutura particular na forma de um cálice achatado formando uma cavidade (bolso) hidrofóbica (JELEG, 2003). A cavidade formada por possuir caráter fortemente hidrofóbico pode servir de sítio de ligação para uma gama de compostos de baixo peso molecular, incluindo os ácidos graxos, retinol e pequenos compostos hidrofóbicos (KONTOPIDIS; HOLT; SAWYER, 2002).

A  $\alpha$ -lactoalbumina é uma pequena metaloproteína globular com a estrutura bem estabilizada por pontes dissulfeto. É composta por 123 aminoácidos e apresenta a forma de um elipsoide, com uma profunda fenda, dividindo a molécula em dois lobos: um grande composto principalmente de estruturas em  $\alpha$ -hélices e outro menor em que predominam as estruturas de folhas  $\beta$ -pregueada (PERMYAKOV; BERLINER, 2000).

A estrutura global tridimensional é estabilizada por um centro de ligação de  $\text{Ca}^{2+}$  que está localizado no bolso formado por um loop entre duas  $\alpha$ -hélices ligando os lobos da estrutura. Nesta cavidade (bolso) o íon de cálcio é retido pelos oxigênios “ligantes” dos grupos carboxílicos de três resíduos do aminoácido asparagina e dois grupos carbonilas (dos resíduos 79 e 84) (PERMYAKOV; BERLINER, 2000).

Quando o pH é reduzido abaixo de 5, os resíduos de asparagina tornam-se protonados (ou seja, os prótons competem com o  $\text{Ca}^{2+}$  pelos oxigênios dos carboxilatos) e perdem a habilidade de reter o cálcio (PERMYAKOVA; BERLINER, 2000).

De forma geral, as proteínas do soro de leite são solúveis em uma ampla faixa de pH (exceto na faixa de pH correspondente ao ponto isoelétrico) e estabilizam emulsões formando um “filme” interfacial entre os componentes hidrofóbicos e hidrofílicos do sistema. Além disso, pelas características das principais proteínas presentes no CPS, este produto tem sido descrito como bom material de parede e eficiente para encapsulação de compostos voláteis (ONWULATA et al., 1994).

## 2.4 PROCESSO DE ATOMIZAÇÃO

A secagem por atomização, também conhecida como *spray drying*, consiste na transformação de um produto líquido em sólido, normalmente em forma de pó, por meio de uma corrente de ar aquecida (FELLOWS, 2006). Dependendo das condições operacionais, a

secagem por atomização pode produzir pós com partículas que variam entre um mínimo de 10-50  $\mu\text{m}$ , a partículas maiores que variam entre 2 e 3 mm (GHARSALLAOUI et al., 2007; TONON, 2009).

A aplicação deste processo iniciou-se no século XVIII, com a secagem de ovos. Em nível industrial, a utilização da atomização começou na primeira metade do século XX, com a produção de leite e sabão, ambos na forma de pó. A secagem em aparelho de *spray dryer* se tornou bastante utilizado, especialmente para a secagem de produtos termossensíveis, como alimentos e materiais de origem biológica, devido ao pequeno tempo de residência do produto na câmara de secagem, mantendo a temperatura das partículas baixas e prevenindo as mesmas de uma possível degradação térmica (FAVARO-TRINDADE et al., 2008). Dentre os produtos sensíveis ao calor preservados pela atomização, destacam-se: vitaminas, minerais, antioxidantes, proteínas, micro-organismos, produtos obtidos a partir de plantas, corantes, enzimas, ácidos, aromatizantes, edulcorantes, lipídeos, dentre outros (GOULA; ADAMOPOULOS, 2005; HIJO et al., 2015).

As principais etapas no processo de secagem por atomização incluem: a atomização; o contato do líquido com o ar quente; a evaporação das gotículas de água; e a separação do produto seco do ar úmido (GHARSALLAOUI et al. 2007). As vantagens do método por *spray drying* são a sua rapidez e custo relativamente baixo. A técnica é altamente reprodutível e sua característica mais importante consiste na sua adequação para aplicações industriais (BURGAIN et al., 2011).

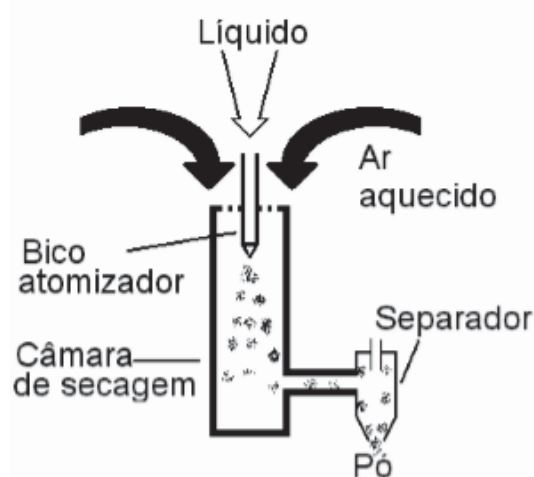
A atomização do produto líquido em pequenas gotículas, obtidas por pressão ou energia centrífuga, ocorre com a transferência de calor do líquido com o ar seco. O contato do líquido com o ar quente é o início da fase de secagem do líquido durante a atomização, onde o contato do ar pode ser feito através de corrente normal (pulverização na mesma direção do ar) e contracorrente (fluxo de ar em direção oposta a pulverização do líquido). A temperatura do ar de secagem varia entre 150 e 220° C na entrada e 50 a 80° C na saída, evitando possíveis degradações do produto final por altas temperaturas. A evaporação das gotículas de água é realizada pela transferência de calor entre o ar quente e o líquido a ser atomizado, bem como o balanço de temperatura e pressão parcial de vapor. Já a separação do produto seco do ar úmido ocorre quando as partículas mais densas são recuperadas na base da câmara de secagem, enquanto as mais finas passam por um compartimento conhecido como ciclone, onde as mesmas são separadas do ar úmido (GHARSALLAOUI et al., 2007).

Os produtos obtidos a partir da secagem por atomização podem ser afetados por: propriedades do produto a ser atomizado; procedimento de funcionamento do atomizador; velocidade e temperatura (entrada e saída) do ar de secagem (TONON, 2009).

A eficiência do processo de secagem por atomização é baseada no aumento da área de contato entre o produto a ser seco e o agente responsável pela secagem do mesmo, nesse caso o ar quente. Esse princípio pode ser entendido como uma esfera que toma a forma quando é atomizada pelo *spray dryer*, ocorrendo a redução do diâmetro da esfera pela metade e, posteriormente, aumentando a superfície de contato em cerca de oito vezes na área superficial. O fato de gerar uma alta área de contato por grama de líquido é inigualável na secagem por atomização (GHARSALLAOUI et al., 2007).

Devido à presença de açúcares e ácidos de baixa massa molecular que apresentam temperatura de transição vítrea baixa, os sucos de frutas desidratados podem apresentar algumas características negativas como higroscopicidade e pegajosidade do produto final, aderindo as paredes do secador e proporcionando ao produto desidratado características como dificuldades de manipulação, transporte, armazenamento (GOULA & ADAMOPOULOS, 2005; JAYASUNDERA et al., 2009; WANG & LANGRISH, 2009; PAGANI, 2010). O diagrama esquemático do *Spray dryer* está representado na Figura 8.

Figura 8 - Diagrama esquemático do *spray dryer*



Fonte: Labmaq (2003).

## 2.5 LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae*

Embora existam ensaios químicos relativamente simples para avaliação da capacidade antioxidante, estes não são representativos das condições celulares do homem. Tendo em vista

que antioxidantes assumem papel importante na medicina preventiva é necessário que as informações sejam obtidas a partir de sistemas biológicos (FUKUMOTO; MAZZA, 2000).

A avaliação da capacidade antioxidante empregando animais de laboratório é, em geral, de difícil execução e necessita de um número elevado de animais para assegurar resultados estatisticamente significativos. Já os ensaios realizados com microrganismos são fáceis, rápidos e podem utilizar um grande número de células com as mesmas características genéticas (HENRIQUES et al., 2001).

Várias razões tornaram a levedura *Saccharomyces cerevisiae* um dos melhores modelos de sistema eucariótico unicelular para estudos de estresse oxidativo. Seu metabolismo é semelhante ao de eucariotos superiores, com mecanismos próprios de ativação metabólica (citocromo P450) e de destoxificação, que não estão presentes em bactérias. Os ensaios em células eucarióticas permitem a avaliação da atividade antioxidante de inúmeros compostos de forma rápida, econômica e reprodutível e os resultados obtidos podem ser mais facilmente extrapolados para o homem, do que os obtidos em ensaios químicos (SOARES et al., 2003).

As semelhanças funcionais e estruturais entre as células de levedura e de mamíferos, aliadas à facilidade de manipulação genética destes microrganismos, tem levado a que as leveduras sejam amplamente utilizadas como modelos celulares em estudos toxicológicos, no estabelecimento de diagnósticos de toxicidade de variados produtos de natureza antropogênica, como os fitofármacos, os resíduos da indústria química ou compostos de origem natural (LIMA; MOTA, 2003).

Em qualquer organismo aeróbio eucariota, as espécies reativas de oxigênio (ROS) ocorrem naturalmente no ambiente celular como subprodutos da respiração mitocondrial (CARMEL-HAREL et al., 2001). Devido à elevada reatividade que estas espécies químicas exibem, podem provocar elevados danos celulares como a oxidação de proteínas, a inativação enzimática, a peroxidação lipídica e mutações ao nível do DNA que, em situações extremas, podem levar à morte celular (JAMIERSON, 1998; BARBOSA et al., 2010).

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos culminou no desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante, que têm o objetivo de limitar os níveis intracelulares de tais espécies reativas e controlar a ocorrência de danos decorrentes (BARBOSA et al., 2010).

A instalação do processo de estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses. Tal processo conduz à oxidação de biomoléculas com conseqüente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio

homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

Os antioxidantes sejam naturais ou sintéticos, possuem elevada estabilidade oxidativa em função de sua estrutura molecular e, por isso, desempenham papel fundamental na prevenção da oxidação resultante da ação dos radicais livres (ANDRADE-WARTHA, 2007). Os sistemas antioxidantes existem sob a forma de compostos enzimáticos e não enzimáticos. O sistema antioxidante enzimático inclui a superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-PX), glutathione reductase (GSH-Rd) e a catalase (CAT). Estas enzimas são responsáveis pela remoção do ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroperóxidos orgânicos e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), respectivamente (LUSHCHAK; GOSPODARYOV, 2005; PIETTA, 2000; YU, 1995). Já o sistema antioxidante não enzimático relaciona-se com um grupo de antioxidantes que podem ser congregados em compostos produzidos *in vivo*, como é o caso da glutathione, da ubiquinona e do ácido úrico, e em compostos obtidos diretamente da dieta, tais como o *α*-tocoferol (vitamina E), betacaroteno (pró-vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C), e compostos fenólicos onde se destacam os flavonoides e poliflavonoides (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; LUZ et al., 2011).

O melhor exemplo conhecido de um sistema de defesa antioxidante enzimático é a glutathione (GSH), um tripeptídeo ( $\gamma$ -L-glutamyl-L-cystinylglycine). GSH atua como um eliminador de radicais com seu grupo redox sulfidrilo ativo, este reage com o oxidante para a formação de glutathione oxidada (GSSG). A glutathione reduzida (GSH) é, possivelmente, a mais abundante molécula redox eliminadora de radicais livres das células. Consequentemente, o seu papel na manutenção do estado redox celular é muito importante (CHIOU; TZENG, 2000; HATEM et al., 2014; JAMIESON, 1998; ROVER JÚNIOR et al., 2001).

As enzimas glutathione peroxidases (GPXs) pertencem a uma família de enzimas filogeneticamente relacionadas, estas detoxificam uma variedade de metabólitos de oxigênio reativos e, portanto, protegem contra danos oxidativos (ROVER JÚNIOR et al., 2001; URSINI; MAIORINO, 2013). Elas catalisam a redução de  $H_2O_2$  pela GSH:  $2\text{ GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{ H}_2\text{O} + \text{GSSG}$ . No ciclo da glutathione, a GSH é regenerada através da glutathione-reductase (GR):  $\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow 2\text{ GSH} + \text{NADP}^+$ . GPXs têm sido conhecidas por catalisar a redução de  $H_2O_2$  ou hidroperóxidos orgânicos a água ou os álcoois correspondentes, usando glutathione (GSH) como redutor (HERBETTE et al., 2007).

A glutathione reduzida (GSH) é utilizada pelas glutathione peroxidases (GPXs) que reduzem o  $H_2O_2$  e peróxidos orgânicos e formam GSSG. GPXs protegem as proteínas e membranas celulares contra a oxidação (MEISTER, 1988). Foi reportado que o conteúdo de

glutathiona intracelular em células na fase estacionária é aproximadamente 3 vezes maior do que em células em fase log, o que mostra que o nível de glutathiona intracelular também pode ser um dos fatores que determinam a resistência contra diferentes estresses em leveduras (IZAWA et al., 1995).

O retorno ao equilíbrio redox após o estresse oxidativo depende da coordenação adaptativa de respostas entre as vias de sinalização associadas ao estado redox, fatores genéticos regulatórios e os antioxidantes. A participação da glutathiona na fisiologia do metabolismo celular reflete a importância desta molécula em a) a desintoxicação de peróxidos altamente reativos por conjugação de eletrófilos e metais através da reação da glutathiona acoplada a peroxidase, (b) a manutenção da integridade das proteínas intracelulares, reduzindo ligações dissulfeto e regulando a sua síntese; e (c) a regulação do equilíbrio redox celular (HADDAD et al., 2000).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida nos laboratórios da Universidade de Passo Fundo - UPF, em Passo Fundo-RS e nos laboratórios do Núcleo de Experimentação e Estudos Analíticos do Instituto Federal do Rio Grande do Sul, campus Sertão-RS. A realização dos experimentos se estendeu durante os últimos 12 meses.

#### 3.1 MATÉRIA-PRIMA

Foram adquiridos cinco quilogramas (5 kg) de mirtilos da espécie *Vaccinium ashei*, grupo *Rabbiteye* e variedade “*Climax*”, colhidos no mês de janeiro de 2016, de um produtor localizado no município de Erechim-RS

As frutas chegaram aos laboratórios da UPF em caixas térmicas resfriadas com gelo, devidamente embaladas em sacos de 1 kg de polietileno resistentes e fechados, na temperatura em torno de 4°C. Para o armazenamento, as amostras foram novamente envoltas por outro saco de polietileno e também por papel pardo para evitar o contato com a luz e, então, armazenadas em freezer (-18° C) até o momento dos experimentos.

#### 3.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO MIRTILO

Para a caracterização físico-química preparou-se a amostra triturando-se em liquidificador (marca Poli, modelo TR-02), 300 g de mirtilo previamente descongelados, exceto para a análise da cor em que se avaliou o mirtilo *in natura*.

A amostra triturada foi acondicionada em um recipiente de vidro com tampa, envolto de papel alumínio, sob refrigeração (4° C) até a realização dos testes. Todas as análises e determinações foram realizadas em triplicatas.

##### 3.2.1 Determinação do pH

O pH foi determinado a 25° C utilizando-se uma massa triturada de mirtilo (1:1) em um béquer de 10 mL. O pH foi lido em aparelho pHmetro (marca Digimed, modelo DM-22) previamente calibrado com soluções tampão na faixa de pH 4,0 e 7,0.



### 3.2.2 Determinação da acidez titulável

A acidez titulável foi determinada pelo método de volumetria potenciométrica segundo metodologia do manual de Adolfo Lutz (2005). Usou-se um pHmetro (marca Digimed, modelo DM-22) que foi calibrado com soluções-tampão na faixa de pH 7,0 e 4,0, de acordo com as instruções do fabricante.

Mediu-se 5 g da amostra homogeneizada e colocou-se em um béquer (300 mL), diluiu-se em 100 mL de água destilada e agitou-se a mistura moderadamente. Inseriu-se o eletrodo do pHmetro na solução. Após titulou-se com solução de hidróxido de sódio ( $0,1 \text{ mol/L}^{-1}$ ) até a faixa de pH de 8,2 a 8,4. O volume gasto de hidróxido foi anotado e o valor da acidez, expresso em % de solução normal, tal como mostra a Equação 1.

$$\text{Acidez} = \left( \frac{v \times 10}{P} \right) \quad (1)$$

Em que:

v = volume gasto (mL) da solução de hidróxido de sódio ( $0,1 \text{ mol/L}$ ) na titulação

P = massa da amostra usada (g)

### 3.2.3 Determinação da acidez em ácido orgânico

Utilizou-se a metodologia proposta por Adolfo Lutz (2005), na qual pesou-se 1 g de amostra homogeneizada e colocou-se em um erlenmeyer (100 mL) efetuando-se a diluição com 50 mL de água destilada. Posteriormente adicionou-se 4 gotas de fenolftaleína e então foi titulado com solução de hidróxido de sódio ( $0,1 \text{ mol/L}$ ), sob agitação constante, até coloração rósea persistente por trinta segundos.

Este método expressa o teor de acidez em g de ácido orgânico por cento, considerando o respectivo ácido predominante na amostra, ou conforme determina o padrão de identidade e qualidade do produto analisado tal como a Equação 2.

$$\text{Teor de acidez} = \left( \frac{v \times M \times PM}{10 \times P \times n} \right) = \text{g de ácido orgânico} \quad (2)$$

Em que:

Teor de acidez orgânica = g de ácido orgânico (%)

V = volume da solução de hidróxido de sódio gastos (mL)

M = concentração molar do hidróxido de sódio

P = massa da amostra (g) ou volume pipetado (mL)

PM = peso molecular do ácido correspondente (g/gmol)

n = número de hidrogênios ionizáveis (Tabela 1)

Tabela 1 - Número de H<sup>+</sup> dos ácidos orgânicos

Ácidos orgânicos	PM (g)	n
Ácido cítrico	192	3
Ácido tartárico	150	2
Ácido málico	134	2
Ácido láctico	90	1
Ácido acético	60	1

Fonte: Adolfo Lutz (1985)

### 3.2.4 Teor de sólidos totais

A determinação de sólidos totais foi obtida pela técnica de filtração, de acordo com Adolfo Lutz (2005). O método baseia-se em secar os cadinhos na estufa até peso constante, após adicionar 50 g da amostra filtrada à vácuo e levar a estufa (marca Odontobrás, modelo EL 1.0) a 105°C até peso constante, tal como a Equação 3.

$$\text{Sólidos totais \% (m/m)} = \frac{N \times 100}{P} \quad (3)$$

Em que:

N = massa de matéria seca (g)

P = massa inicial de amostra (g)

### 3.2.5 Cor

A avaliação da cor dos frutos inteiros de mirtilo foi realizada utilizando o aparelho espectrofotômetro (marca HunterLab®, modelo ColorQuest II Sphere) com sensor ótico geométrico de esfera. Estabeleceu-se o iluminante D65, o ângulo de 10° para o observador e a escala de leitura colorimétrica empregada foi a do sistema de coordenadas cromáticas com base no espaço de cor CIELAB L\*a\*b\*, onde L\* mede a luminosidade tendo uma variação de branco (100) a preto (0), a\* é uma indicação de tonalidade na direção do verde se assumir valores negativos (-a\*) e na direção do vermelho se assumir valores positivos (+a\*) e b\* é uma

indicação de tonalidade na direção do azul se assumir valores negativos (-b\*) e na direção do amarelo se assumir valores positivos (+b\*).

### 3.2.6 Composição química

A composição química foi caracterizada quanto aos teores de umidade, cinzas, proteína, carboidratos, lipídeos, fibras e valor calórico total.

#### 3.2.6.1 Umidade

O teor de umidade foi determinado segundo a referência de Adolfo Lutz (2005) na qual foram pesadas 5 g de amostra homogeneizada, colocando-se em cápsula tarada e seca. As amostras foram levadas à estufa (marca Odontobrás, modelo EL 1.0) a 105°C para dessecar o material até peso constante. O resultado foi expresso em % de água/100 g de mirtilo *in natura* (Equação 4).

$$\text{Umidade} = \left( \frac{P-p}{P} \right) \times 100 \quad (4)$$

Em que:

P = massa do alimento (g)

p = massa do alimento seco (g)

#### 3.2.6.2 Cinzas

A parte inorgânica da matéria-prima foi determinada segundo Adolfo Lutz (2005), onde pesou-se 3 g da amostra em cadinho calcinado e tarado e, em seguida, foi feita a incineração em bico de Bunsen. Após carbonizar o material, o cadinho foi levado para a mufla (marca Quimis, modelo Q318M) a 550°C até a total queima da matéria orgânica existente na amostra. Após retirou-se da mufla e colocou-se em dessecador para diminuir a temperatura do cadinho e, então pesou-se em balança analítica (marca Ohaus, modelo Adventurer). O teor de cinzas foi avaliado segundo a Equação 5 e expresso em % (m/m):

$$\text{Cinzas} = \frac{a \times 100}{P} \quad (5)$$

Em que:

A = massa de cinzas(g)

P = massa inicial da amostra (g)

### 3.2.6.3 Proteínas

Utilizou-se o método de Kjeldahl descrito por Adolfo Lutz (2005), no qual pesou-se 1 g de amostra em papel livre de nitrogênio e transferiu-se para o frasco de digestão juntamente com o papel. Adicionou-se sulfato de potássio e sulfato de cobre como catalisadores e 20 mL de ácido sulfúrico concentrado. Fez-se a digestão até que a solução se apresentasse levemente esverdeada. Foram transferidos 25 mL de ácido bórico para erlenmeyer (250 mL) adicionando-se uma solução indicadora mista (vermelho de metila e verde de bromocresol), e mergulhou-se a saída no condensador do erlenmeyer. Foi adicionado ao Kjeldahl 250 mL de água destilada e hidróxido de sódio a 40% até a alcalinização. Colocou-se então no conjunto destilador e destilou-se até recolher um volume de 125 mL de destilado. Após titulou-se a solução do erlenmeyer com solução de HCl (0,1 mol/L) até a mudança da coloração. O teor de proteínas (%) foi calculado segundo a Equação 6.

$$\text{Proteínas totais} = \frac{(V_A - V_B) \times F \times 0,14}{P} \quad (6)$$

Em que:

$V_A$  = volume de HCl (mol/L<sup>-1</sup>) gasto na titulação da amostra (mL)

$V_B$  = volume de HCl (mol/L<sup>-1</sup>) gasto na titulação do branco (mL)

F = 6,25 (valor médio) fator de correção para nitrogênio proteico

P = massa da amostra (g)

### 3.2.6.4. Lipídeos

Para determinação de lipídeos utilizou-se a técnica de Monjonier, descrita pela A.O.A.C (2016), na qual pesou-se 2 g da amostra em um béquer (50mL), adicionou-se 2 mL de álcool e foi agitado até a homogeneização da amostra. Após adicionou-se 10 mL de HCl e agitou-se novamente. O béquer foi colocado em banho-maria a uma temperatura de 70 a 80°C e agitado em intervalos frequentes durante 35 min. Foram adicionados 10 mL de álcool, esperou-se

esfriar e então transferiu-se a mistura para o frasco de Monjonier para extração da gordura. Lavou-se o béquer com 3 porções de 25 mL de éter e então fechou-se o frasco com rolha de neoprene e agitou-se vigorosamente por 1 min. Adicionou-se mais 25 mL de éter de petróleo e agitou-se vigorosamente por mais 1 min. Então foi deixado o líquido ficar praticamente claro e após tirou-se o máximo possível da solução éter/gordura através de funil com uma camada de algodão para um béquer (125 mL), previamente seco, resfriado e pesado.

O processo de extração foi repetido por mais 2 vezes, utilizando duas porções de 15 mL de éter de cada vez. Em cada uma das vezes, foi extraído por agitação e após vertido o solvente para o mesmo béquer. Lavou-se a ponta do funil e do frasco de Monjonier com alguns mL da mistura de ambos os éteres em volumes iguais, livres de água em suspensão. Então levou-se ao banho-maria (marca Tecnal, modelo TE-0541) para evaporação do solvente e após terminou-se a secagem em estufa (marca Odontobrás) a 100°C, até peso constante. O branco foi feito nas mesmas condições e com os mesmos reagentes utilizados. O teor de lipídeos foi observado em % segundo a Equação 7.

$$\text{Lipídeos} = \frac{100 \times (N - \text{branco})}{P} \quad (7)$$

Em que:

N = massa de lipídios (g)

P = massa da amostra (g)

Branco = massa do branco (g)

### 3.2.6.5 Fibra bruta

Para determinação de fibra bruta seguiu-se a metodologia proposta por Adolfo Lutz (2005), na qual foram pesadas 2 g de amostra e adicionadas em um béquer (600 mL) juntamente com 200 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,255 mol/L). O béquer então foi levado para o aquecimento com refluxo e mantido em ebulição por 30 min. Após filtrou-se em funil de Buchner aquecido, usando sucção, com auxílio de papel filtro e tecido nylon. O resíduo então foi transferido para o mesmo béquer, com auxílio de 200 mL de solução de hidróxido de sódio (0,313 mol/L). Colocou-se em refluxo por mais 30 min. Em seguida, filtrou-se em cadinho de fundo sinterizado, lavado com água fervente e, após com 20 mL de ácido clorídrico (1% -v/v) e novamente com água fervente, seguido de 20 mL de álcool. Levou-se os cadinhos para a estufa a 100°C por 1 h, resfriado em dessecador e pesado. As operações de aquecimento e resfriamento

foram realizadas até peso constante. Após, incinerou-se em mufla (marca Quimis, modelo Q318M) a 600°C, resfriou-se e repetiu-se a operação até peso constante. A perda de peso representa a quantidade de fibra presente na amostra (% - m/m) calculada pela Equação 8.

$$\text{Fibra bruta} = \left( \frac{100 \times N}{P} \right) \quad (8)$$

Em que:

N = massa de fibra (g)

P = massa da amostra (g)

### 3.2.6.6 Carboidratos

A quantificação de carboidratos (%) foi calculada por diferença entre 100 e o soma dos teores de umidade, cinzas, lipídeos e proteínas (ADOLFO LUTZ, 2005), segundo a Equação 9.

$$\text{Carboidratos} = 100 - (\text{umidade} + \text{proteína} + \text{lipídeos} + \text{fibras} + \text{cizas}) \quad (9)$$

### 3.2.6.7 Valor calórico total (VCT)

O VCT, também descrito por Adolfo Lutz (2005) foi expresso em kcal/100 g e calculado pela soma dos seguintes fatores, através do cálculo de Equação 10.

Proteínas = % x 4

Lipídeos = % x 9

Carboidratos = % x 4

$$\text{VCT} = [(\% \text{carboidrato} \times 4) + (\% \text{proteínas} \times 4) + (\% \text{lipídeos} \times 9)] \quad (10)$$

## 3.3 ELABORAÇÃO DOS EXTRATOS EM PÓ DE MIRTILO

A partir dos frutos de mirtilo foram elaborados dois extratos em pó resultantes do processo de atomização, os quais diferiam entre si pelo material encapsulante.

Para obtenção de cada extrato pesou-se 100 g de mirtilo previamente descongelados, os quais foram submersos em 100 mL de uma solução etanólica 70% para a extração dos compostos bioativos. Esta mistura foi acondicionada em béquer envolto com papel alumínio para evitar a fotodegradação. O pH da mistura foi ajustado para 4,0 com ácido cítrico (1 mol/L)

e a mistura foi deixada em repouso por 12 h sob refrigeração (4°C) ao abrigo da luz. Seguiu-se a metodologia proposta por Rocha (2009), com algumas adaptações.

Decorridas as 12 h a mistura foi então triturada em liquidificador (marca Poli, modelo TR-02), durante 5 min para a completa dissolução dos frutos e então, deixada em repouso por mais 12 h. Após este período a amostra foi filtrada em tecido de *nylon* seguido de papel filtro, tendo o grau Brix aferido com o auxílio de um aparelho refratômetro digital (marca Atago, modelo PAL-1) e, então, o pH foi corrigido para 5,5 com hidróxido de sódio 1 mol/L. O produto obtido a partir dessa filtração foi caracterizado de extrato bruto de mirtilo (EB), que imediatamente foi armazenado sob refrigeração (4°C) em recipiente de vidro com tampa e envolto de papel alumínio.

### 3.3.1 Preparo dos materiais encapsulantes

Foram definidos dois encapsulantes: Goma Arábica (GA) e Concentrado Proteico de Soro de leite (CPS). A GA utilizada foi de marca comercial (Audaz Brasil), adquirida no comércio local e continha teor mínimo de pureza de 99,5%.

O CPS foi elaborado na Universidade de Passo Fundo por Seguenka (2016), obtido a partir do soro de leite, no qual aplicou-se o processo de separação por membranas (ultrafiltração). Conforme exposto na Figura 9, para ser utilizado neste trabalho, o CPS que se encontrava na forma líquida foi seco por atomização em aparelho de *spray dryer* (marca Labmaq do Brasil, modelo MDS 1.0). O equipamento operou com a temperatura de ar na câmara de secagem de 160° C, vazão de ar de 4 m<sup>3</sup>/min e vazão de alimentação de 0,4 m<sup>3</sup>.m<sup>-1</sup> L. O bico atomizador utilizado foi o de número 3 (micragem de 1,2 µm). Segundo Seguenka (2016), o produto apresentou 89,95% de proteínas em base seca.

Figura 9 - CPS líquido (esquerda) e em pó (direita) após secagem por atomização



Fonte: Autor (2017)

Para o preparo das soluções encapsulantes seguiu-se a metodologia descrita por Valduga et al. (2008) para a GA e Flôres et al. (2015) para o CPS, com algumas adaptações.

A proporção da concentração final de EB e material encapsulante foi de 1:4, respectivamente nos dois extratos. Para tal, dissolveu-se 90 g de cada encapsulante em 300 mL de água deionizada e homogeneizou-se com o auxílio de um agitador magnético por 10 min. na temperatura de 30° C para a total solubilização. Para cada uma dessas soluções, acrescentou-se 100 mL de EB, totalizando 400 mL de líquido a serem desidratados, para cada extrato em pó que se pretendeu elaborar.

### **3.3.2 Encapsulação em *spray dryer***

As misturas contendo EB e material encapsulante foram então, colocadas no *spray dryer* (marca Labmaq, modelo MDS 1.0). O ar na câmara de secagem operou na temperatura de entrada em 120°C, vazão de ar em torno de 4 m<sup>3</sup>/min, e vazão de alimentação de 0,4 m<sup>3</sup>.m<sup>-1</sup> L. O bico atomizador utilizado foi o de número 2, possuindo micragem de 1,0 µm. Para a determinação das condições de secagem, seguiu-se a metodologia de Bonfante (2015).

Durante o período de sucção pela bomba do aparelho, manteve-se a homogeneização constante da amostra líquida utilizando um agitador magnético. Tomou-se o cuidado de não expor à luz as misturas e os extratos em pó obtidos para evitar fotodegradação.

Ao final do processo de secagem, obteve-se então, os dois produtos, sendo o extrato em pó de mirtilo encapsulado com GA (E1) e o extrato em pó de mirtilo encapsulado com CPS (E2).

## **3.4 ANÁLISES MORFOLÓGICAS, SENSORIAIS E FUNCIONAIS DOS EXTRATOS EM PÓ DE MIRTILO**

Uma série de experimentos foi realizada para escolher o melhor extrato em pó quanto as propriedades morfológicas, sensoriais e funcionais.

### **3.4.1 Propriedades morfológicas**

#### **3.4.1.1 Eficiência da Encapsulação (EE)**



A eficiência da encapsulação (EE) dos extratos E1 e E2 foi determinada de acordo com Bae & Lee (2008) e Carneiro et al. (2013) com algumas adaptações. Como solvente para esta análise utilizou-se hexano, devido os materiais encapsulantes terem baixa solubilidade quando em contato com este solvente, permitindo a remoção do material não encapsulado e também evitando possíveis danos na parede do polímero.

Foi pesada 0,2 g de pó encapsulado e adicionado 15 mL de hexano, deixando esta mistura em local escuro na temperatura ambiente por 5 min. Após iniciou-se a filtração por meio de um filtro de membrana (porosidade de 0,45 µm). O material retido no filtro foi seco em estufa a uma temperatura de 30°C. Após a secagem o material foi redissolvido em 20 mL de água deionizada, sob agitação em vórtex por 5 min., com a finalidade de romper a parede do polímero e liberar o extrato de mirtilo. Após a agitação, colocou-se em placas de Petry e levou-se novamente à estufa a 150°C para evaporação da água até massa constante. Dessa forma, a EE do extrato de mirtilo, em cada ensaio, foi expressa em porcentagem a partir do cálculo da equação 11.

$$EE = \frac{\text{massa final do extrato encapsulado seco à } 150^{\circ}\text{C}}{\text{massa de material retido no filtro após a secagem à } 30^{\circ}\text{C}} \times 100 \quad (11)$$

#### 3.4.1.2 Morfologia externa das microcápsulas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia externa das microcápsulas do E1 e do E2 foi avaliada por fotomicrografias eletrônicas necessitando de preparo prévio das amostras. Para o preparo das amostras inicialmente realizou-se uma metalização com ouro na qual se utilizou um aparelho metalizador (marca Quoron, modelo Q150R ES). O mesmo operou com corrente de 50 mA durante 100 s., obtendo-se uma camada de ouro com espessura de 5 nm.

Os extratos foram então submetidos a fotomicrografias eletrônicas em um microscópio eletrônico de varredura de bancada (marca Tescan, modelo Veja 3), utilizando uma aceleração de voltagem de 20 kV. Através disso, foi possível visualizar a morfologia das amostras e obter os diâmetros médios das cápsulas.

### 3.4.2 Propriedades Sensoriais

#### 3.4.2.1 Cor

A análise de cor do EB, E1 e E2 foi realizada utilizando-se o aparelho espectrofotômetro (marca HunterLab®, modelo ColorQuest II Sphere), com sensor ótico geométrico de esfera. Foram obtidos valores de  $L^*$ ,  $-a^*/+a^*$  e  $-b^*/+b^*$ .

Para avaliar a manutenção da cor dos produtos elaborados durante a vida de prateleira, repetiu-se a avaliação de cor após 1 mês para o EB e após 5 meses para os extratos em pó (E1 e E2).

### 3.4.3 Propriedades Funcionais

O EB foi avaliado para comparação com os extratos em pó (E1 e E2), uma vez que não foi possível fazer a secagem deste extrato sem encapsulante, conforme explanado no item 4.2 (Elaboração dos extratos em pó de mirtilo).

Com o intuito de avaliar o comportamento dos extratos após o seu armazenamento no que diz respeito a atividade antioxidante, a análise de DPPH foi repetida, em que o EB foi reavaliado após 30 dias da sua elaboração, e os extratos em pó (E1 e E2), após 5 meses da sua elaboração. Os extratos permaneceram armazenados em recipiente escuro com tampa, sob refrigeração a 4°C.

#### 3.4.3.1 Compostos fenólicos totais

A determinação de compostos fenólicos totais foi realizada partindo-se da metodologia de Swain e Hillis (1959), que utilizou o reagente Folin-Ciocalteu e ácido gálico como padrão.

As amostras foram preparadas da seguinte forma: a) EB: 0,250 mL do extrato + 20 mL de etanol 70%; b) E1: 1 g de extrato em pó + 20 mL de água deionizada (espera de 10 min. para a ruptura da cápsula) + 46,6 mL de etanol 95%. c) E2: 1 g do extrato em pó + 20 mL de água deionizada (espera de 10 min. para a ruptura da cápsula). Precipitou-se a proteína adicionando-se 9 mL de solução de ácido acético a 6%, seguido de centrifugação por 15 min à 5.000 rpm. O sobrenadante foi retirado e adicionado em 26,1 mL de etanol 95%. A metodologia adotada para precipitação de proteína foi adaptada segundo a proposta de Boroski et al. (2015) que utilizou ácido tricloroacético para a precipitação.

Após o preparo das amostras, adicionou-se em tubos de ensaio, os seguintes componentes, em ordem: 1 mL da amostra (15 mg/mL), 1 mL de etanol a 95%, 5 mL de água destilada e 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu 50 % (v/v). Os tubos foram agitados em agitador vórtex por 30 s e após adicionado 1 mL da solução de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 5

%. Os tubos foram deixados em repouso na ausência de luz por 60 min. O “branco” foi preparado nas mesmas condições que a amostra, contanto que o volume da amostra foi substituído por 1 mL do solvente na qual esta foi preparada.

A absorbância foi lida em espectrofotômetro (marca PG Instruments, modelo T60 UV-Visible) calibrado com etanol (95%) no comprimento de onda de 725 nm.

A quantidade de compostos fenólicos totais foi calculada com base na curva analítica de ácido gálico ( $y = 4,7997x - 0,0043$ ), preparada nas concentrações entre 0 e 100 mg/L.

#### 3.4.3.2 Identificação e quantificação de compostos fenólicos individuais por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD)

Para este experimento utilizou-se somente o EB, o qual foi preparado dissolvendo-o em água, até atingir uma concentração de 5 mg/mL. A amostra foi filtrada em filtro de seringa de 0,45  $\mu\text{m}$ .

A separação cromatográfica foi realizada em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), da marca Shimadzu, composto por duas bombas quaternárias, autosampler, modelo 20ACHT e detector de arranjo diodos (DAD), modelo SPD-M20A. Todos os módulos foram controlados pelo Software LabSolutions. A coluna utilizada foi a C-18 (ODS) fase reversa (150 mm x 4,5 mm).

A fase móvel aquosa foi o ácido orto-fosfórico 1% e a fase móvel orgânica o metanol. A identificação dos compostos ocorreu através dos espectros obtidos entre 200 e 600 nm em DAD frente aos respectivos tempos de retenção dos padrões injetados. O fluxo da fase móvel usado foi de 0,25 mL/min e o volume de injeção de 5  $\mu\text{L}$ .

As curvas de calibração e de regressão linear com base nas áreas dos picos foram utilizadas para identificar e quantificar os picos correspondentes aos 7 padrões externos usados, todos em grau cromatográfico, sendo eles: ácido gálico, ácido elágico, rutina, quercetina, ácido caféico, campferol e mangiferina.

#### 3.4.3.3 Atividade antioxidante por DPPH

O princípio deste método é a transferência de elétrons de um composto antioxidante para o radical livre, o DPPH, que ao se reduzir, ocorre a mudança da sua coloração, passando da cor púrpura para amarelo.

Sánchez-Moreno; Larrauri; Saura-Calixto (1998) propuseram uma metodologia para a avaliação da atividade antioxidante levando em conta não somente a concentração do antioxidante, mas também o tempo de reação necessário para sequestrar este radical, introduzindo assim a eficiência antirradicalar como um novo parâmetro. Logo, a atividade antioxidante de certa substância corresponde a quantidade de DPPH consumida por esta substância, durante determinado tempo (DUARTE-ALMEIDA, et al., 2006; BOROSKI, et al., 2015).

A avaliação da atividade antioxidante por meio da capacidade sequestrante de radicais 2,2-difenil-1 picrilhidrazil (DPPH) foi realizada de acordo com Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) com algumas modificações. Para tanto, pesou-se 0,03943 g do DPPH em um becker envolto de papel alumínio e dissolveu-se em 10 mL de etanol absoluto. A partir dessa solução, fez-se uma diluição 1:100 com etanol 80%, até que a absorbância ficasse entre 0,5 nm e 0,6 nm, em um comprimento de onda de 515 nm. Essa leitura foi realizada após a calibração do espectrofotômetro (marca Eppendorf, modelo Kinetic) com etanol 80%.

As amostras foram preparadas da seguinte forma: para o EB utilizou-se 50 mL dissolvidos em 10 mL de água deionizada. Os extratos em pó (E1 e E2) foram preparados utilizando-se 0,5 g dissolvidas em 100 mL de água e agitadas em vórtex por 10 min. para a ruptura da cápsula, sendo que para o E2 foi necessário efetuar a precipitação de proteínas conforme descrito no item 3.4.3.1 (Determinação de compostos fenólicos totais).

O teste DPPH foi realizado utilizando-se tubos de ensaio, onde transferiu-se 0,1 mL de amostra (5 mg/mL), seguido de 2,9 mL da solução de DPPH. Os tubos do tempo “0” foram agitados em Vórtex e então, a leitura foi realizada. Os demais tubos foram mantidos em ambiente escuro até a leitura a cada 15 min.

Há um grande número de trabalhos na literatura empregando a técnica de DPPH, entretanto não há uma padronização na apresentação dos resultados (BOROSKI et al., 2015; OLIVEIRA, 2015). Neste trabalho os resultados foram expressos em percentual de inibição (% de inibição) (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET,1995; SÁNCHEZ-MORENO; LARRAURI; SAURA-CALIXTO, 1998; KARADAQ, et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2015). Tal método de interpretação foi escolhido em função de que em extratos encapsulados a liberação de compostos bioativos e, portanto, atividade antioxidante, geralmente ocorre constantemente por um determinado período de tempo, até atingir o seu pico máximo de liberação, para então haver o decréscimo dessa atividade. Os resultados do % de inibição foram interpretados da seguinte forma: >70% = eficiência em sequestrar o radical livre; 60-70% =

ação antioxidante moderada; e <60% = fraca capacidade em sequestrar o radical DPPH (MELO, et al., 2006).

O cálculo da porcentagem de inibição do radical foi realizado como demonstra a Equação 12, descrita por Brand-Willians, Cuvelier e Berset (1995).

$$\% \text{ de inibição} = \frac{(1-A_f) \times 100}{A_0} \quad (12)$$

Em que:

A<sub>0</sub>: absorbância inicial

A<sub>f</sub>: absorbância final

Utilizou-se o teste DPPH para monitorar a atividade antioxidante dos extratos em relação ao armazenamento, sendo que o EB foi reavaliado após 1 mês, e os extratos em pó, após 5 meses da sua elaboração. Os mesmos permaneceram armazenados em recipiente escuro com tampa sob refrigeração a 4°C.

### **3.5 ESTABILIDADE DAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS FRENTE A VIDA DE PRATELEIRA DO EXTRATO SELECIONADO**

O extrato em pó que teve melhor resposta quanto aos aspectos morfológicas, sensoriais e funcionais foi submetido a novas análises, as quais dizem respeito a estabilidade dos compostos bioativos frente ao armazenamento por 0, 5 e 10 meses.

Para verificar a manutenção das propriedades bioativas do extrato selecionado durante sua vida de prateleira, as avaliações de estabilidade de fenóis e flavonoides totais foram realizadas logo após a elaboração do extrato, ou seja, com 0 meses de armazenamento; após estarem armazenadas por 5 meses; e após o armazenamento por 10 meses. Durante este período as amostras permaneceram sob refrigeração à 4°C em recipiente vedado de cor escura.

#### **3.5.1 Estabilidade de fenóis totais**

A quantificação de fenóis totais foi realizada por Folin-Ciocalteu, método que envolve a redução do reagente pelos compostos fenólicos das amostras com concomitante

formação de um complexo azul cuja intensidade aumenta linearmente a 760 nm, conforme descrito por Roesler et al. (2007).

A quantidade total de fenóis dos extratos foi quantificada por meio de uma curva padrão preparada com ácido gálico ( $y = 0,0178x + 0,0332$ ) e expressa como equivalente de ácido gálico (GAE). O extrato de mirtilo foi preparado utilizando a concentração de 10 mg/mL, sendo filtrado em filtro de seringa 0,45 µm.

Para reação colorimétrica, uma alíquota de 0,5 mL do extrato foi adicionada 2,5 mL solução aquosa do reativo de Folin-Ciocalteu a 10% e 2,0 mL de carbonato de sódio 7,5%. A mistura foi incubada por 5 min. em banho-maria a 50°C e, posteriormente, a quantificação foi medida usando-se branco como referência.

### **3.5.2 Estabilidade de flavonoides totais**

O teor de flavonoides totais foi determinado de acordo com o método proposto por Zhishen, Mengcheng e Jianming (1999), através de um ensaio colorimétrico que consiste na adição de cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) e nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) à amostra. O intuito do teste é promover a formação do complexo flavonóide-alumínio (grupo carbonila + ion  $\text{Al}^{+3}$ ) que, em meio alcalino, apresenta coloração rosa com leitura de absorbância em espectrofotômetro a 510 nm.

As amostras utilizadas foram preparadas a uma concentração de 10 mg/mL. A quantificação de flavonoides totais das amostras foi realizada por meio de curva padrão preparada com catequina ( $y = 0,0045x + 0,0027$ ) e expressa como equivalentes de catequina.

### **3.5.3 Estabilidade antioxidante pelo método ABTS em diferentes temperaturas**

A estabilidade da atividade antioxidante do E1 foi avaliada a cada sete dias durante o período de um mês. O extrato foi colocado em placas de Petry que foram acondicionadas sob temperatura ambiente (25°C), refrigeração (4°C) e congelamento (-18°C).

Para tal utilizou-se o método de avaliação da atividade antioxidante através da captura do radical 2,2'-azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS), descrita por Re et al. (1999) com algumas modificações. Neste método o radical livre é gerado por uma reação química ocasionada por persulfato de potássio.

A amostra foi preparada utilizando-se 0,5 g de pó do extrato dissolvidas em 100 mL de água e deixada sob agitação de vórtex por de 10 min. para a ruptura da cápsula.

Uma solução estoque de ABTS foi preparada utilizando-se 38,4 mg do reativo ABTS dissolvidos em 100mL de água deionizada. A solução foi acondicionada sob refrigeração e o abrigo da luz. Após, preparou-se a solução estoque de persulfato de potássio (2,45 mmol/L) onde 42,7 mg foram dissolvidos em 100 mL de água deionizada.

Em um recipiente envolto com papel alumínio adicionou-se 50 mL da solução de ABTS e 50 mL da solução de persulfato de potássio e, então, essa solução foi armazenada em local escuro, de temperatura ambiente por no mínimo 16 h.

Passado o tempo, calibrou-se o espectrofotômetro (marca Eppendorf, modelo Kinetic) com álcool etílico no comprimento de onda de 734 nm. A solução de ABTS foi então, acrescida de álcool etílico PA até que a absorbância ficasse entre 0,695 – 0,705.

Em tubos de ensaio, adicionou-se 20 µL de amostra e 980 µL da solução de ABTS. O branco foi preparado nas mesmas condições, sendo que a amostra foi substituída por água deionizada. Os tubos foram agitados em vórtex e, em seguida, deixados em repouso ao abrigo da luz durante 6 min. e após efetuaram-se as leituras.

O cálculo da porcentagem de inibição do radical foi realizado pela Equação 12, descrita por Brand-Willians, Cuvelier e Berset (1995).

### **3.6 ESTUDO *IN VIVO* COM O MODELO *Saccharomyces cerevisiae***

O extrato em pó que apresentou melhor resposta quanto aos aspectos morfológicas, sensoriais e funcionais foi avaliado também em um modelo *in vivo*, utilizando-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, já que esta tem se mostrado adequada para determinação da capacidade antioxidante de diferentes compostos, fornecendo resultados rápidos, reprodutíveis e passíveis de serem correlacionados aos observados no homem.

A levedura *Sacchamomyces cerevisiae* foi obtida da Euroscarf, Frankfurt, Alemanha. A linhagem utilizada nos experimentos foi a Cepa BY 4741, genótipo MAT A; his 3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0.

Como meio de cultivo utilizou-se o YPD 2% líquido (glicose, peptona e extrato de levedura). As culturas foram incubadas a 30°C, em agitador orbital ajustado para 90 rpm até a primeira fase exponencial de crescimento (0,3 mg de peso seco de células/mL).

O fator de conversão em peso seco foi calculado a partir da filtração de um volume adequado da suspensão de células em filtro Millipore (0,45 µm), que, posteriormente, foi seco em estufa a 60 °C até atingir o peso constante e a construção de uma curva de calibração ( $y =$

0,732x – 0,061). Após o crescimento, as células de levedura foram centrifugadas e submetidas ao tratamento com sulfato ferroso (4,0 Mm) de acordo com Benetti (2013).

O extrato de mirtilo encapsulado com goma arábica (E1) foi então preparado para ser utilizado nos testes. Seguiu-se a metodologia de Oprea et al. (2014), com modificações, na qual dissolveu-se o pó do extrato de mirtilo em água a uma concentração de 10 mg/mL. Após este processo, realizou-se a filtração e esterilização da amostra que ocorreu em capela de fluxo laminar para a posterior utilização nos meios de cultivo com *Saccharomyces cerevisiae*. O processo foi realizado através do uso de filtros de seringa do tipo Minisart RC20 com membranas hidrofílicas de celulose de 0,2 µm.

As células então, foram submetidas ao tratamento com o extrato de mirtilo encapsulado com goma arábica (E1), as quais foram incubados a 30°C em erlenmeyers de 50 mL, com agitação orbital à 90 rpm. Ao longo de 24 h de tratamento, em concentração de 0,8 µL de proteínas por mL de solução, foram realizadas 2 lavagens com 5 mL de água destilada estéril e as células, centrifugadas por 5 min. a 1500 rpm para a obtenção da massa celular para as análises (BENETTI, 2013).

### **3.6.1 Avaliação da peroxidação lipídica pelo método de ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

A avaliação da lipoperoxidação foi realizada incubando-se a 100 ° C durante 15 minutos 250 µL de amostra, 250 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% e 500 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67%. O produto formado foi medido a 535 nm (OHKAWA, OHISHI, YAGI, 1979).

A curva de calibração foi obtida com soluções de malondialdeído 0,75 - 9 µmol/L ( $y = 0,1127x - 0,0258$ ) e a unidade expressa em µM MDA.

### **3.6.2 Dosagem da atividade enzimática da glutatona**

Inicialmente foi pipetado uma quantidade equivalente a 2 mL da amostra em tubos de parede grossa e centrifugado a 2000 rpm por 10 min. Após foi retirado o sobrenadante e adicionado 1,3 mL de TCA 10% para reagir, sendo novamente centrifugado a 2000 rpm por 20 min, e então o sobrenadante foi retirado.

Ao sobrenadante foi adicionado 130 µL de Ellmans Reagent, 5,5 Dithiobis-(2-Nitrobenzoic Acid) – DTNB e realizada a homogeneização. A leitura foi realizada em 412 nm, sendo que o cálculo final das amostras foi obtido a partir da construção de uma curva padrão



com cisteína 0,5 mmol, TFK 0,05 mol, pH 6,8, DTNB 10 mmol e H<sub>2</sub>O ( $y = 0,005x + 0,1501$ ). O resultado final foi expresso em  $\mu\text{M}$ .

### **3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados obtidos neste estudo foram representados como a média e desvio padrão de pelo menos três triplicatas, e então avaliados por análise de variância ANOVA e teste de Tukey a 5% de significância ( $p < 0,05$ ), utilizando-se o programa SASM Agri.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO MIRTILO

A cor do mirtilo *in natura* apresentou valores de  $L^* = 15,57 (\pm 2,45)$ , significando que está mais próxima do escuro, pois o valor de zero significa cor preta, aumentando até 100 quando a cor tem brilho intenso;  $a^* = 2,34 (\pm 0,16)$ , indicando que a cor da fruta assumiu o tom vermelho, pois o resultado foi positivo; e  $b^* = - 3,59 (\pm 0,16)$ , sendo que a cor azul está em evidência, já que este parâmetro foi negativo. Na Figura 10 pode-se observar alguns mirtilos utilizados neste trabalho, bem como a intensidade de cor da fruta.

Figura 10 - Mirtilos utilizados no trabalho



Fonte: Autor (2017)

A cor da epiderme e da polpa do mirtilo é conferida pela presença de antocianinas que se encontram, normalmente, no interior dos vacúolos das células da epiderme, dissolvidas em meio aquoso ligeiramente ácido, sendo as antocianinas o maior grupo de pigmentos solúveis em água. A cor da fruta está estreitamente correlacionada com o teor de antocianinas e este, por sua vez, está relacionado com o pH e a relação açúcar/ácido. O teor de antocianinas está inversamente relacionado com o tamanho da baga (SOUSA, et al., 2007).

A Tabela 2 mostra a composição físico-química do mirtilo estudado nesta pesquisa, para 100 g de fruta.

Tabela 2 - Composição físico-química do mirtilo em 100g da fruta

Composição físico-química	Teor encontrado
pH	2,25 ( $\pm 0,18$ )
Sólidos solúveis ( $^{\circ}$ Brix)	14,85 ( $\pm 0,06$ )
Acidez titulável (%)	8,55 ( $\pm 0,24$ )
Ácido málico (/100g)	0,59
Ácido cítrico (/100g)	0,57
Proteínas (%)	1,01 ( $\pm 0,14$ )
Lipídios (%)	0,28 ( $\pm 0,03$ )
Cinzas (%)	0,18 ( $\pm 0,00$ )
Fibra bruta (%)	0,15 ( $\pm 0,03$ )
Carboidratos (%)	13,65
Valor calórico total (kcal)	61,16

Fonte: Autor (2017)

A literatura (ANTUNNES; HOFFMANN, 2002) sugere que o sabor do mirtilo varia de doce ácido a um sabor mais ácido. O mirtilo estudado neste trabalho apresentou pH de 2,25, confirmando a afirmação dos autores. O pH também é um fator importante na conservação das frutas. Arsego et al. (2003) sugere que este parâmetro em frutas atua na retenção de antocianinas, uma vez que em pH menor que 3 estes componentes são mais estáveis frente a fatores que aceleram sua decomposição (ARSEGO, et al., 2003). Reque et al. (2014) encontraram valor semelhante de pH (2,92) quando estudaram frutos de mirtilo cultivados no município de Camaquã-RS.

A acidez titulável do mirtilo apresentou um valor de 8,55%, e o teor dos ácidos orgânicos se mostrou maior para ácido málico (0,59 g/100 g de mirtilo), seguido do ácido cítrico (0,57 g/100 g de fruta).

Sousa (2007) sugere que os frutos de mirtilo contêm ácidos orgânicos em teores elevados, sendo os mais comuns os ácidos cítrico e o málico, como observamos em nosso estudo. Segundo Eck (1988) a acidez total dos frutos de mirtilo, no momento da colheita, deve estar entre 0,3 e 1,3% de ácido cítrico, com um pH em torno de 3,75 ( $\pm 0,5$ ) e o teor de sólidos solúveis acima de 10%. Estes dados mostram que as amostras deste estudo estão dentro dos parâmetros esperados para a maturidade dos frutos.

Os sólidos solúveis totais apresentaram 14,85° Brix, indicando a presença de açúcares solúveis, ácidos orgânicos e outros constituintes menores (HOBSON; GRIERSON; TOMATO, 1993). Este valor se mostrou superior em comparação com o estudo de Reque et al. (2014), no

qual encontrou valor médio de 11,15°Brix. O teor de sólidos solúveis no mirtilo varia de 7% nos frutos verdes a 15% ou mais nos frutos maduros. A concentração desses sólidos constitui-se em uma das variáveis mais importantes para medir a qualidade dos frutos, como o grau de maturação (HOBSON; GRIERSON; TOMATO, 1993). Como as frutas de mirtilo utilizadas nesta pesquisa mostraram grau Brix próximo a 15%, pode-se afirmar que estão com grau de maturação desejável.

A determinação de pH, acidez e o teor de sólidos solúveis contribuem para a apreciação objetiva do sabor dos frutos. O pH, geralmente inferior a 4,5, aumenta no decorrer do amadurecimento e influencia as características sensoriais e a capacidade de conservação dos frutos. É um parâmetro importante na determinação do potencial de crescimento de microrganismos patogênicos. Embora baixo, o pH do mirtilo ainda possibilita o crescimento de algumas leveduras e bolores tolerantes aos ácidos (SOUSA, 2007).

Pode-se afirmar que o mirtilo é um fruto que apresenta elevado teor de água (> 80%), tornando-o susceptível a deterioração microbiana. Tal quantidade de água depende, especialmente, da disponibilidade hídrica do solo durante o cultivo (SOUSA, 2007). Valor semelhante de umidade (85,78%) foi encontrado por Reque et al. (2014), ao analisar frutos provenientes do município de Camaquã, também no estado do Rio Grande do Sul, indicando que a umidade dos frutos destes estudo estão de acordo com outros cultivos do estado do RS.

O mirtilo estudado apresentou conteúdo proteico elevado (1,01%) quando comparado com outros estudos, como o de Rocha (2009) que apresentou um teor proteico de 0,63% em frutos de mirtilo também do grupo *Rabbiteye* e variedade “*Bluegem*” produzido em Antônio Carlos - MG. Silveira, Vargas e Rosa (2007) encontraram teor de proteína de 0,57% no mirtilo do grupo “*Highbush*” produzido na serra gaúcha. Pode-se afirmar, portanto, que o teor de proteína no mirtilo utilizado nesta pesquisa foi bastante superior ao reportado na literatura.

Em um estudo que comparou o teor de lipídios em mirtilos das variedades *Bluebelle*, *Delite*, *Woodart* e *Flórida* verificou-se valores entre 0,26 e 0,28% para todas as variedades, estando condizente com o teor encontrado na atual pesquisa (0,28%). No entanto, diferentes valores de lipídios em mirtilos foram citados na literatura, como 0,73% (REQUE et al., 2014) e 0,10% (SILVEIRA; VARGAS E ROSA, 2007). Este fator pode estar associado a variedade da fruta e as condições climáticas (solo e recursos hídricos) em que foi cultivada.

O teor de cinzas encontrado neste estudo (0,18%) foi semelhante ao encontrado por Silveira; Vargas e Rosa (2007) (0,19%). Ao comparar com o banco de dados da USDA (2011), eles são inferiores, pois reportam teores de 1,52%. Segundo Wang e Zheng (2003), a densidade da cinza varia em função da temperatura de queima da amostra na mufla. Esse autor também

relata que a cinza pode ser considerada como uma medida geral de qualidade nos alimentos, uma vez que maiores teores de cinza retratam também maiores teores de cálcio, magnésio, ferro, fósforo, sódio e outros componentes minerais nos frutos. Isto indica que nossa amostra pode ter baixo teor destes minerais.

A determinação de fibras identificou um valor de 0,15%, inferior se comparado a outros estudos como o de Silveira; Vargas e Rosa (2007) (1,69%). O teor de carboidrato encontrado nesta pesquisa foi de 13,65% e quando comparado ao estudo de Rocha (2009), que foi de 15,32% observa-se que nosso mirtilo tem um teor levemente inferior. Sugere-se que, quanto mais doce for o mirtilo maior teor de carboidratos e, portanto, melhor será sua aceitabilidade, pelos consumidores.

O valor calórico total do mirtilo foi de 61,16 kcal/100 g de fruto e, portanto, semelhante ao de Sousa (2007) que variou de 51 a 62 kcal/100 g. Como o teor de carboidratos no nosso estudo foi levemente menor que o reportado na literatura é natural que o teor calórico seja também menor.

## 4.2 ELABORAÇÃO DOS EXTRATOS EM PÓ DE MIRTILO

O extrato em pó de mirtilo encapsulado com goma arábica (E1) e o extrato em pó de mirtilo encapsulado com CPS (E2) saíram da câmara de secagem numa temperatura de 86,5 °C.

A quantidade de massa (extrato em pó) em relação ao volume de solução colocada para secar pode ser observada na Tabela 3. Ressalta-se que esta massa é resultado do pó obtido no frasco coletor do aparelho mais a massa retida no corpo do aparelho *spray dryer*.

Tabela 3 - Quantidade de extrato em pó obtido em relação ao volume de solução colocada no *spray dryer*

Extratos	Solução colocada para secar (EB + encapsulante) (mL)	Concentração da solução (°Brix)	Massa de extrato em pó obtida (g)
E1	400 mL	20,3	60
E2	400 mL	19,5	46

Legenda: E1 = extrato de mirtilo em pó encapsulado com goma arábica; E2 = extrato de mirtilo em pó encapsulado com CPS.

Fonte: Autor (2017)

A secagem de cada extrato ocorreu em média 1 h e 30 min, indicando que os encapsulantes utilizados neste estudo não interferiram no processo de secagem. Os extratos prontos foram acondicionados em recipiente de polietileno de cor escura, identificados e armazenado sob refrigeração (4°C) até posteriores determinações analíticas.

Em um estudo que comparou a função encapsulante de goma arábica e soro de leite líquido na preservação da *Bifidobacterium* por *spray dryer*, através do rendimento da microencapsulação e da viabilidade das microcápsulas durante o armazenamento, evidenciou que o soro de leite foi mais eficiente do que a goma arábica (CASTRO-CISLAGHI; FRITZEN-FREIRE; SANT'ANNA, 2012).

Valduga et al. (2008) desenvolveram um trabalho para obter corante natural, na forma de pó a partir do bagaço de uva de cultivar Isabel (*Vitis labrusca*), onde foram realizados estudos de extração e encapsulamento com goma arábica e maltodextrina. Segundo os autores, o melhor resultado foi obtido utilizando proporções iguais dos dois encapsulantes juntos.

Ressalta-se que, para comparação com os extratos encapsulados, foi tentado elaborar um extrato em pó de mirtilo, sem encapsulante, somente utilizando o EB concentrado previamente em evaporador rotativo (marca Tecnal, modelo TE-211). Entretanto, a secagem por atomização não foi possível, pois o extrato resultante não adquiria a forma de pó e sim, em um aglomerado gelatinoso que se condensava nas paredes do frasco coletor do aparelho. Condições alternadas de temperatura e vazão de alimentação no *spray* foram ajustadas para a secagem, porém as tentativas não obtiveram êxito. Então, realizou-se a secagem do EB concentrado por liofilização (-40°C e 500 mmHg) e novamente, não se obteve sucesso na secagem. A Figura 11 mostra o EB no aparelho liofilizador (marca Terroni, modelo LS 3000), após ultracongelamento, já na terceira etapa de secagem, formando bolhas de ar.

Figura 11 - EB concentrado na tentativa de secagem por liofilização



Fonte: Autor (2017)

Tais resultados negativos destas secagens podem ter sido ocasionados devido a composição química do mirtilo, na qual há grande presença de polissacarídeos (açúcares) como a pectina, ou mesmo pelo baixo pH do extrato. Sugere-se ainda que a não secagem por liofilização pode ter ocorrido devido ao rápido descongelamento que soluções alcólicas sofrem, mesmo quando são submetidas ao congelamento em aparelho ultra freezer por 24 h.

Pagani (2010) sugere que, devido à presença de açúcares e ácidos de baixo peso molecular, que apresentam temperatura de transição vítrea baixa, os sucos de frutas podem apresentar algumas características negativas como higroscopicidade e pegajosidade do produto final, aderindo as paredes do secador e proporcionando ao produto características como dificuldades de manipulação, transporte e armazenamento.

Não sendo possível a obtenção de um extrato em pó de mirtilo não encapsulado, o EB líquido foi utilizado na comparação com os extratos em pó encapsulados.

### 4.3 ANÁLISES MORFOLÓGICAS, SENSORIAIS E FUNCIONAIS DOS EXTRATOS EM PÓ DE MIRTILO

#### 4.3.1 Propriedades morfológicas

##### 4.3.1.1 Eficiência da Encapsulação (EE)

A Tabela 4 apresenta os resultados da EE, onde é possível observar que não houve diferença significativa entre os mesmos.

Tabela 4 - Análise da EE dos extratos em pó de mirtilo

Extrato avaliado	EE (%)
E1	89,16a±1,89
E2	93,12a ±0,91

Legenda: E1 = extrato de mirtilo em pó encapsulado com goma arábica; E2 = extrato de mirtilo em pó encapsulado com CPS. Médias de duas repetições ± estimativa de desvio padrão. As médias seguidas de uma mesma letra minúscula na coluna não variaram estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Autor (2017)

De acordo com estes resultados, a quantidade utilizada de material encapsulante se mostrou ser satisfatória para formar uma cobertura protetora sobre a superfície das gotículas de extrato bruto de mirtilo durante o processo de secagem.

Segundo autores (JAFARI; ASSADPOOR; BHANDARI, 2008; TAN et al., 2015) a utilização de uma concentração elevada de agente encapsulante resulta em uma membrana densa e rigidamente envolta que pode circundar eficientemente os solutos dispersos, tais como as saponinas, fenólicos e flavonoides do núcleo e assim prevenir a degradação destes compostos bioativos frente à exposição ao calor e à oxidação. Do mesmo modo, a atividade antioxidante também pode ser preservada (CARNEIRO et al., 2012).

Um dos principais fatores que influenciam a estabilidade de compostos encapsulados é a natureza do material encapsulante. Para a escolha do material a ser utilizado deve-se considerar as propriedades físicas e químicas do núcleo (porosidade, solubilidade, etc.) e da parede (viscosidade, propriedades mecânicas, transição vítrea, capacidade de formação de filme, etc.), compatibilidade do núcleo com a parede, mecanismo de controle e fatores econômicos (BRAZEL, 1999).

Os agentes encapsulantes devem atender a requisitos, como: boas propriedades de formação de filme; baixa higroscopicidade; baixa viscosidade a altas concentrações de sólidos, sabor e odor suaves; fácil reconstituição e baixo custo. Ainda, é desejável apresentar estabilidade da emulsão, alta eficiência de encapsulação, estabilidade durante a estocagem, alto grau de proteção do núcleo e boas características microscópicas da superfície do produto final (PÉREZ, 2003; GHARSALLAOUI et al., 2007).

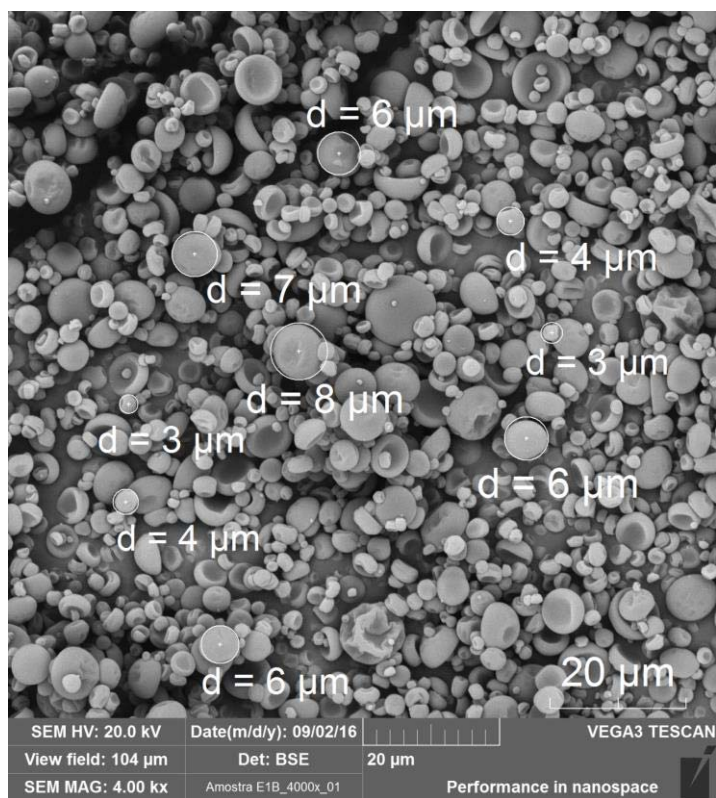
Tan et al. (2015) reportam que além de melhorar o processo de secagem, a encapsulação pode evitar a absorção de umidade da atmosfera e reduzir os problemas de aglomeração durante o armazenamento. Além disso, pode melhorar a estabilidade dos compostos bioativos durante o armazenamento ou durante sua incorporação em alimentos funcionais que requerem exposição a soluções ácidas e/ou alcalinos ou temperaturas elevadas durante a sua preparação.

#### 4.3.1.2 Morfologia externa das microcápsulas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os aspectos microestruturais das partículas do E1 e do E2 foram analisadas por MEV e observadas sob ampliação de 4000 vezes, por um campo de visão de 104  $\mu\text{m}$  e distância de trabalho (MD) de 15 mm, conforme é possível observar nas Figuras 12 e 13, respectivamente.

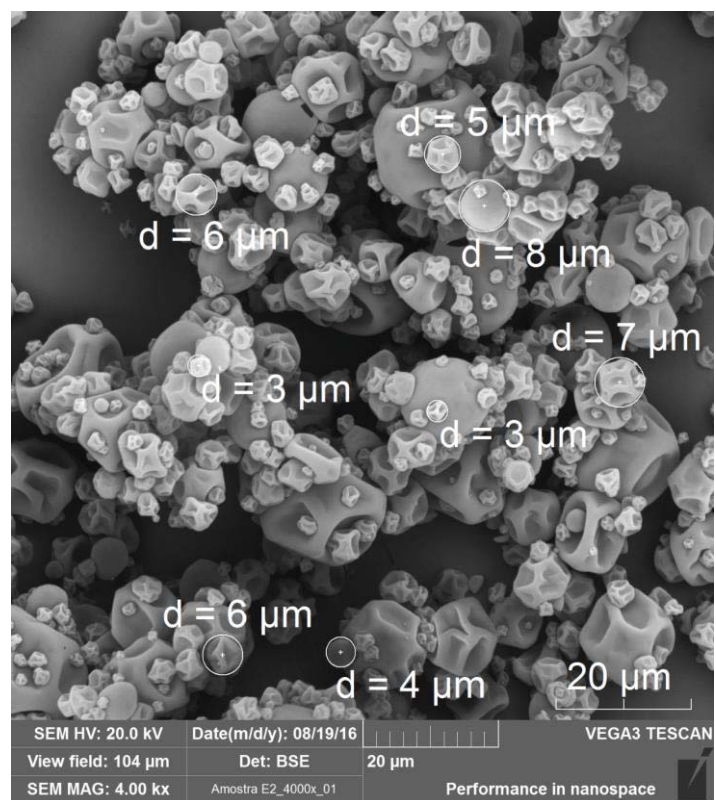


Figura 12 - Fotomicrografia do E1 obtida por MEV, aumento de 4000 X



Fonte: Autor (2017)

Figura 13 - Fotomicrografia do E2 obtida por MEV, aumento de 4000 X



Fonte: Autor (2017)

Nas imagens 12 e 13 observam-se extratos com partículas esféricas de diferentes tamanhos, com um leve grau de aglomeração entre elas, uma característica bem conhecida de pós secos por atomização (KHA; NGUYEN; ROACH, 2010). De um modo geral nos dois extratos, a maioria das microcápsulas apresentou tamanho na faixa de 3 a 8  $\mu\text{m}$ . Foi possível observar também que os pós encapsulados se encontram livres de rachaduras e poros, o que é muito importante para evitar que o extrato de mirtilo seja exposto ao ambiente e degradado através da oxidação.

Da mesma forma que o verificado por Mata; Medeiros; Duarte (2005) quando realizaram a avaliação do microencapsulamento de umbu em pó, no nosso estudo foi observado igualmente que as partículas pequenas tendem a aderir a partículas de maior grau de magnitude e não se evidenciou fragmentação de partículas ou rachadura de superfície.

Osorio; Forero; Carriazo (2011), realizaram por MEV avaliação da goiaba microencapsulada com maltodextrina e goma arábica e obtiveram o mesmo formato das partículas do E1, observando que a maioria do tamanho das partículas estava entre 3 e 5  $\mu\text{m}$ . Os mesmos autores citam que a obtenção de partículas esféricas na microencapsulação demonstra um sucesso no processo.

Enquanto as cápsulas do E1 apresentaram uma superfície lisa e tamanho mais uniforme, as cápsulas do E2 mostraram tamanhos irregulares, tendo cápsulas maiores e apresentando superfície aparentemente oca e/ou enrugada (Figura 13). Tal fato pode ser explicado pela natureza do encapsulante deste extrato, sendo este um complexo de proteínas. Entretanto, Mestry, Mujumdar e Thorat (2011) sugerem que as cápsulas se tornam enrugadas devido as temperaturas de secagem utilizadas. De acordo com Nijdam e Langrish (2005), quando a temperatura de secagem é elevada, um grande número de partículas em pó tende a ter superfícies lisas, porque a umidade evapora rapidamente da superfície, deixando-a lisa e rígida. No entanto, quando a temperatura de secagem é relativamente baixa, as partículas produzidas tendem a encolher e formar superfícies enrugadas (TONON; BRABET; HUBINGER, 2008). Isso ocorre porque a umidade permanece na superfície da cápsula, tornando-a macia e maleável, e as partículas são suscetíveis à deflação quando esfriam (NIJDAM; LANGRISH, 2005). Por conseguinte, a otimização das temperaturas de entrada e de saída de secagem por atomização parece ser necessária para melhorar as características de superfície das partículas em pó produzidas no presente estudo. É desejável obter partículas esféricas lisas para maximizar a estabilidade do pó (OSORIO et al., 2010). Diante do exposto, pode-se admitir que o E1 apresentou melhor resposta na encapsulação.

### 4.3.3 Propriedades Sensoriais

#### 4.3.2.1 Análise de cor

A partir da elaboração do extrato bruto de mirtilo (EB) fez-se um teste para analisar uma possível modificação da cor após seu armazenamento por 1 mês, sabendo-se que o mesmo se apresenta na forma líquida e, portanto, com uma curta vida útil. Este parâmetro pode sugerir se o EB tem condições de ficar armazenado (vida de prateleira) ou se é necessário a elaboração dos extratos em pó em menor período de tempo possível, para que estes produtos finais não venham a sofrer alterações sensoriais.

A Tabela 5 demonstra a análise de cor do EB recém produzido (T0) e após 1 mês (T1) de armazenamento à 4°C em ambiente escuro, pelas coordenadas L\*, a\* e b\* do sistema CIELab.

Tabela 5 - Cor do EB logo após ser produzido (T0) e após 1 mês de armazenamento (T1)

Tempo	L*	a*	b*
T0	25,38a ±0,00	09,43a ±0,01	02,33ba ±0,02
T1	24,75b ±0,08	04,93b ±0,02	01,30b ±0,01

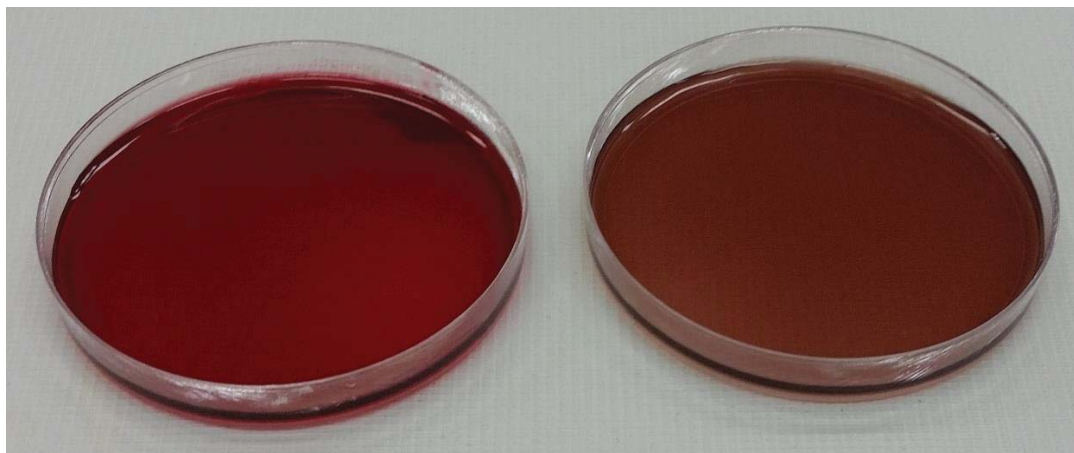
Legenda: EB = extrato bruto de mirtilo; T0 = avaliação do EB logo após a sua elaboração; T1 = avaliação do EB após o armazenamento por 1 mês. Médias de três repetições ± estimativa de desvio padrão. As médias seguidas de uma mesma letra minúscula na mesma coluna não variaram estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras minúsculas representam diferenças entre o EB em diferentes tempos (T0, T1).

Fonte: Autor (2017)

Conforme observado na Tabela 5, houve modificação significativa de cor do EB após seu armazenamento por 1 mês, provavelmente ocasionada pela oxidação. Este dado sugere que deve-se elaborar os extratos em pó logo após a produção do EB, uma vez que este sofre alterações de cor durante o seu armazenamento, podendo acarretar prejuízos sensoriais também aos extratos em pó.

A Figura 14 demonstra o EB logo após sua elaboração (E1) e após ter ficado armazenado por 1 mês (T1).

Figura 14 - EB em T0 (esquerda) e T1 (direita)



Fonte: Autor (2017)

Segundo Jackman & Smith (1992) a presença de oxigênio no meio é um fator significativo na degradação de antocianinas, mesmo na ausência de luz, em todos os valores de pH. Esta degradação ocorre através de um mecanismo de oxidação direta ou indireta dos constituintes do meio que reagem com as antocianinas. Precipitados e desenvolvimento de turbidez em sucos de frutas podem ser resultado da oxidação direta da base carbinol de antocianinas.

Para a elaboração dos extratos em pó de mirtilo utilizou-se então, um EB recém produzido. Os extratos em pó foram avaliados logo após a sua elaboração e, novamente após 5 meses de armazenamento. A diferença de cor dos produtos finais (E1 e E2) pode ser verificada na Tabela 6.

Tabela 6 - Análise de cor dos extratos em pó de mirtilo (E1 e E2)

Extratos	L*	a*	b*
E1 – T0	71,7 aA ±0,1	15,23 aA ±0,04	-4,12 aA ±0,17
E1 – T5	71,7 aA ±0,08	15,21 aA ±0,01	-4,10 aA ±0,04
E2 – T0	87,10 bA ±0,18	0,14 bA ±0,09	3,47 bA ±0,30
E2 – T5	87,1 bA ±0,13	0,15 bA ±0,04	3,45bA ±0,04

Legenda: E1 = extrato de mirtilo em pó encapsulado com goma arábica; E2 = extrato de mirtilo em pó encapsulado com CPS. T0 = avaliação dos extratos logo após a sua elaboração; T5 = avaliação dos extratos após o armazenamento por 5 meses. Médias de três repetições ± estimativa de desvio padrão. As médias seguidas de uma mesma letra na mesma coluna não variaram estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras minúsculas representam as diferenças entre os dois extratos no tempo 0 (T0). Letras maiúsculas representam diferenças entre um mesmo extrato nos diferentes tempos (T0 e T5).

Fonte: Autor (2017)

Os dois extratos apresentaram diferenças significativas de cor entre si quando avaliados pelas coordenadas  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  do sistema CIELab. Contudo, não se verificou modificações significativas de cor nestes extratos após o armazenamento por 5 meses.

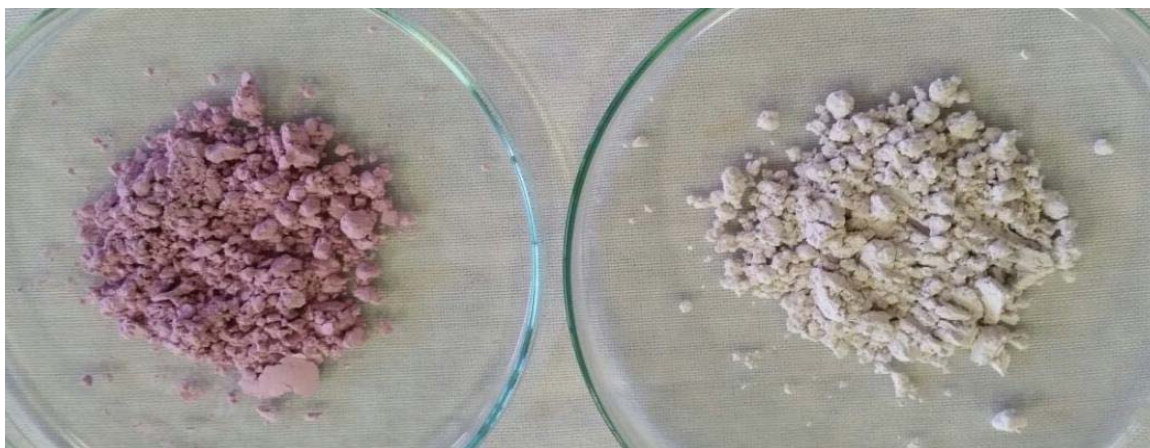
Valores de “ $L^*$ ” representam a luminosidade numa escala de 0 a 100, indicando pouco brilho (escuro) e muito brilho (claro), respectivamente. Neste estudo, o extrato que apresentou maior valor de  $L^*$  (mais brilho ou cor mais clara) foi o E2. Os extratos encapsulados deste estudo após a secagem perderam o tom mais escuro e adquiriram tons mais claro, isso ocorreu pela presença dos encapsulantes (GA e CPS) pois estes possuem coloração clara e estão em maior proporção em relação ao extrato bruto de mirtilo (EB).

A coordenada “ $a^*$ ” representa a variação das tonalidades das cores verde e vermelho, onde valores negativos correspondem à intensidade da cor verde e os positivos à intensidade da cor vermelha. O E1 apresentou maior valor de  $a^*$ , indicando que o extrato encapsulado com goma arábica manteve melhor a cor da matéria-prima, ou seja, do mirtilo.

Valores de “ $b^*$ ” representam a variação das tonalidades das cores azul e amarelo, onde valores negativos correspondem à intensidade da cor azul e os valores positivos à intensidade da cor amarela. O E2 apresentou maior valor positivo de  $b^*$ , indicando perda do tom azul e adquirindo tons mais amarelados, provavelmente ocasionado pelo seu encapsulante (CPS), que é um produto obtido a partir do soro de leite. Em contrapartida, o E1 manteve o tom azulado, mostrando novamente maior semelhança com a cor da fruta *in natura*.

A diferença de cor dos extratos encapsulados pode ser verificada na Figura 15.

Figura 15 - E1 (esquerda) e E2 (direita)



Fonte: Autor (2017)

A cor dos alimentos é um importante atributo de qualidade, não só servindo de base para a identificação e a aceitação de grande variedade de produtos, mas também influenciando positiva ou negativamente na percepção dos demais atributos sensoriais. A cor é um fator decisivo no momento da escolha de um produto, sendo que o primeiro contato com o alimento é através da cor (PONTES, 2004). Magalhães et al. (2016) relata que 93,33% das mulheres e 80,95% dos homens observam, dentre os atributos intrínsecos de um produto, a cor, para tomar a decisão da compra.

O mirtilo é uma das frutas que apresenta maior quantidade de antocianinas. Estas, por sua vez, compõem o maior grupo de pigmentos solúveis em água do reino vegetal e são estudadas em todo o mundo como agentes da coloração natural em alimentos, sendo elas as responsáveis pelos tons compreendidos desde a coloração vermelha até a coloração azul em muitas frutas, legumes e hortaliças (MAZZA; MINIATI, 1993; BRIDLE; TIMBERLAKE, 1997; LOPES et al., 2007). Estes pigmentos constituem uma importante alternativa para a substituição dos corantes sintéticos na indústria de alimentos. O maior limitante para o uso das antocianinas é a sua baixa estabilidade, quando comparada aos corantes sintéticos (XAVIER, 2004).

Segundo Pontes (2004), o uso de corantes naturais em produtos alimentícios é uma tendência atual, pelo seu forte apelo de marketing, em razão dos consumidores demandarem cada vez mais produtos que tragam benefícios a saúde. Os corantes naturais vêm sendo altamente aplicáveis, porque além de conferirem cor a alimentos, podem contribuir com propriedades sensoriais, antioxidantes, antimicrobianas e farmacológicas, como anticarcinogênico, por exemplo.

Desta forma, acredita-se que produtos derivados de mirtilo podem ser usados também como corantes naturais na formulação de novos alimentos. Neste trabalho, o E1 mostrou-se como o extrato em pó que manteve de forma mais eficiente a cor vermelha, assemelhando-se a cor do mirtilo. Este dado pode significar que o E1 teria uma maior possibilidade de ser aceito na indústria para formulação de novos alimentos. Além disso, conforme visto na Tabela 6, os extratos avaliados não sofreram alteração de cor durante a vida de prateleira pelo período de 5 meses, favorecendo seu uso como corante natural.

### **4.3.3 Propriedades funcionais**

#### **4.3.3.1 Compostos fenólicos totais**

O teor de compostos fenólicos totais do EB, E1 e E2 pode ser verificado na Tabela 7. Tais resultados foram obtidos a partir da curva analítica de ácido gálico. Os valores de absorvância para os extratos foram inseridos na equação da curva e os valores foram expressos em mg de ácido gálico por g de extrato (mg EAG/g).

Tabela 7 - Teores médios de compostos fenólicos totais de extratos de mirtilo

Tipo do extrato	Compostos fenólicos totais (mgAGE/g de mirtilo)
EB	204a ±0,01
E1	109b ±0,00
E2	100c ±0,02

Legenda: EB = extrato bruto de mirtilo; E1 = extrato de mirtilo em pó encapsulado com goma arábica; E2 = extrato de mirtilo em pó encapsulado com CPS. Médias de três repetições ± estimativa de desvio padrão. As médias seguidas de uma mesma letra na mesma coluna não variaram estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Autor (2017)

A concentração de compostos fenólicos depende das diferenças genéticas existentes entre as várias cultivares, das condições de solo, clima do local de cultivo, das técnicas utilizadas em sua produção, bem como do grau de maturação dos frutos e das condições de estocagem pós-colheita (ZADERNOWSKI; NACZK; NESTEROWICZ, 2005; SEVERO, et al., 2009).

Nossos resultados mostram que em todos os extratos o teor de compostos fenólicos diferem entre si. Nos extratos em pó (E1 e E2) observa-se redução no teor de compostos fenólicos totais, se comparados ao EB. Isso pode ser explicado devido à alta temperatura aplicada no método de secagem (MORAES; PERTUZZATI, 2007; OLIVEIRA et al., 2015). Malacrida e Motta (2006) afirmam que as antocianinas são sensíveis ao aumento de temperatura, tanto na etapa de processamento como na estocagem de alimentos. A degradação antociânica afeta diretamente as medidas de polifenóis e atividade antioxidante.

Pertuzatti, Jacques e Zambiasi (2007), estudando polpa de mirtilo, observaram queda nos teores de compostos fenólicos, que passaram de 1249 mg AGE/100 g na polpa *in natura*, para 208,08 mg AGE/100 g na polpa atomizada sem encapsulante. Da mesma forma, no estudo de Oliveira et al. (2015) observou-se queda nestes compostos de 210,87 mg EAG/g para 167,40 mg EAG/g, da polpa de mirtilo *in natura* para polpa em pó encapsulada com maltodextrina na proporção 1:1, respectivamente.

Em nosso estudo, mesmo com a diminuição dos compostos fenólicos nos extratos submetidos a secagem, pode-se afirmar que essas concentrações ainda se mantiveram relativamente altas, pois esta redução foi em torno de 50% quando comparada com o EB que não foi submetido ao aquecimento, o que também foi observado em outros estudos da literatura.

A perda destes compostos não foi maior em decorrência da proteção que o encapsulante possibilitou nos extratos secos.

Todavia, o extrato encapsulado com goma arábica (E1) se mostrou mais eficiente na preservação destes compostos (Tabela 7) em comparação com o extrato encapsulado com CPS (E2). Boroski et al. (2015) sugerem que derivados do leite podem ser analisados quanto ao teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante após a precipitação da proteína, embora ainda ocorra a presença de aminoácidos aromáticos que devem ser considerados como interferentes.

Diversos estudos confirmam que os compostos fenólicos, presentes em frutas e hortaliças, são um dos principais responsáveis pela sua atividade antioxidante numa relação direta (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002; SEERAM, et al., 2008; PACHECO-PALENCIA; MERTENS-TALCOTT; TALCOTT, 2009; OLIVEIRA et al., 2015).

#### 4.3.3.2 Identificação e quantificação de compostos fenólicos individuais por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A Tabela 8 demonstra os compostos fenólicos identificados e quantificados no EB. Os ácidos gálico, elágico e cafeico, e a rutina, quercetina e mangiferina foram os compostos fenólicos separados e identificados por HPLC nesta pesquisa.

Tabela 8 - Compostos fenólicos identificados por HPLC em extrato bruto de mirtilo (EB)

Polifenóis	EB (mg/mL)
Ácido gálico	2,339
Ácido elágico	8,692
Rutina	5,509
Quercetina	0,573
Ácido cafeico	0,117
Campferol	0
Mangiferina	2,501

Legenda: EB = extrato bruto de mirtilo. Médias de três repetições.

Fonte: Autor (2017)

O ácido elágico foi o ácido fenólico predominante dentre os compostos fenólicos analisados no EB (Tabela 8). Este dado diverge do estudo de Pertuzatti (2009) em que o principal constituinte encontrado em extrato bruto de mirtilo foi o ácido gálico. No entanto, a rutina e o ácido gálico, respectivamente, também foram encontrados em quantidades elevadas no presente estudo.



Segundo Skrede e Wrolstad (2002) os ácidos fenólicos mais comumente encontrados em pequenas frutas são os ácidos cinâmicos e benzóicos. Os ácidos cinâmicos frequentemente encontrados são o ácido cafeico, p-cumárico e o ferúlico, e os ácidos benzóicos mais comuns em pequenas frutas são p-hidroxibenzóico, ácido gálico e elágico, sendo o último mais encontrado em membros da família *Rosaceae*, especificamente, morango, framboesa e amora.

O flavonoide rutina foi o segundo composto encontrado em maior abundância. Valores de rutina também foram encontrados em mirtilo, *goji berry* e açaí no estudo de Moura (2016), sendo que em tal estudo, a maior concentração deste flavonoide foi encontrada em *goji berry*.

A mangiferina é um dos constituintes fenólicos majoritários encontrados em mangueira, podendo ser detectada nas folhas, casca do caule, fruto e raízes (RICHARDSON, 1983; RIBEIRO et al., 2008). Segundo Canuto (2009) o interesse científico pela mangiferina é atribuído ao seu grande potencial farmacológico, cujo estudo permitiu a descoberta de várias atividades, tais como antioxidante, anti-inflamatória, hipoglicemiante e imunomodulatória. Ressalta-se que não foram encontrados na literatura outros estudos que apontassem a presença de mangiferina em pequenas frutas como mirtilo. Tal resultado deve então, ser interpretado com cautela, uma vez que pode ser sido ocasionado devido a um erro experimental.

A quercetina foi identificada em nosso extrato bruto de mirtilo, sendo ela um dos principais componentes presentes na casca do mirtilo. A radiação solar é responsável por aumentar o conteúdo tanto de quercetina, como de campferol em folhas de “*Bilberry*”, que é o mirtilo nativo europeu, o que sugere que estes compostos sejam fotoprotetores (RIIHINEN et al., 2008). Em nosso estudo, campferol não foi identificado nos extratos avaliados.

Slatnar et al. (2012) avaliou a composição fenólica em relação a atividade antioxidante de sucos de frutas vermelhas e concluiu que os flavonóis quercetina, miricetina e campferol presentes no suco de mirtilo são mais eficazes em desempenhar atividade antioxidante quando comparados as antocianinas.

Estudos com identificação e quantificação de compostos fenólicos podem ser encontrados na literatura, porém o método empregado, equipamento e condições para separação e identificação são distintos.

No estudo de Huang et al. (2012) que identificou compostos fenólicos presentes em mirtilos produzidos em Nanjing (China), relatou que os mesmos continham altos níveis de ácido hidroxibenzóico e ácido vanílico e identificou, como compostos fenólicos predominantes a catequina, o ácido cafeico, ácido ferúlico, rutina, miricetina, quercetrina e quercetina. Os autores concluíram que não haviam grandes diferenças na composição daquele mirtilo com aqueles produzidos em outras regiões do mundo.

As divergências entre os valores encontrados neste trabalho frente aos de outros pesquisadores, quantidades variadas, presença ou ausência de alguns compostos nos extratos, podem estar associadas a vários fatores, como cultivar, forma de cultivo em áreas distintas, originando frutos com composições diferentes, diferenças nos métodos de extração aplicado e sensibilidade dos equipamentos de identificação e das condições operacionais como temperatura, tempo de eluição, tipo de coluna, e método de análise.

#### 4.3.3.3 Atividade antioxidante por DPPH

A Tabela 9 apresenta o pico máximo de atividade antioxidante dos extratos de mirtilo em relação ao tempo (min.) quando em contato com o radical DPPH.

Os extratos foram reavaliados após serem submetidos ao armazenamento a 4°C em ambiente escuro. Considerou-se os seguintes tempos de armazenamento: T0 para todos os extratos (EB, E1 e E2) avaliados logo após a sua elaboração; T1 para o EB reavaliado após 1 mês de armazenamento; e T5 para os extratos em pó (E1 e E2) reavaliados após 5 meses de armazenamento.

Tabela 9 - Tempo de pico e % máximo de inibição do radical DPPH quando em contato com extratos de mirtilo

Extratos	Tempo de pico máximo da inibição (min.)	Percentual máximo de inibição (%)
EB – T0	30 min.	87,72 aA ± 0,38
EB – T1	30 min.	80,69 B ± 1,24
E1 – T0	150 min.	80,54 bA ± 2,56
E1 – T5	150 min.	66,32B ± 3,51
E2 – T0	15 min.	33,3 c ± 1,78
E2 – T5	*	*

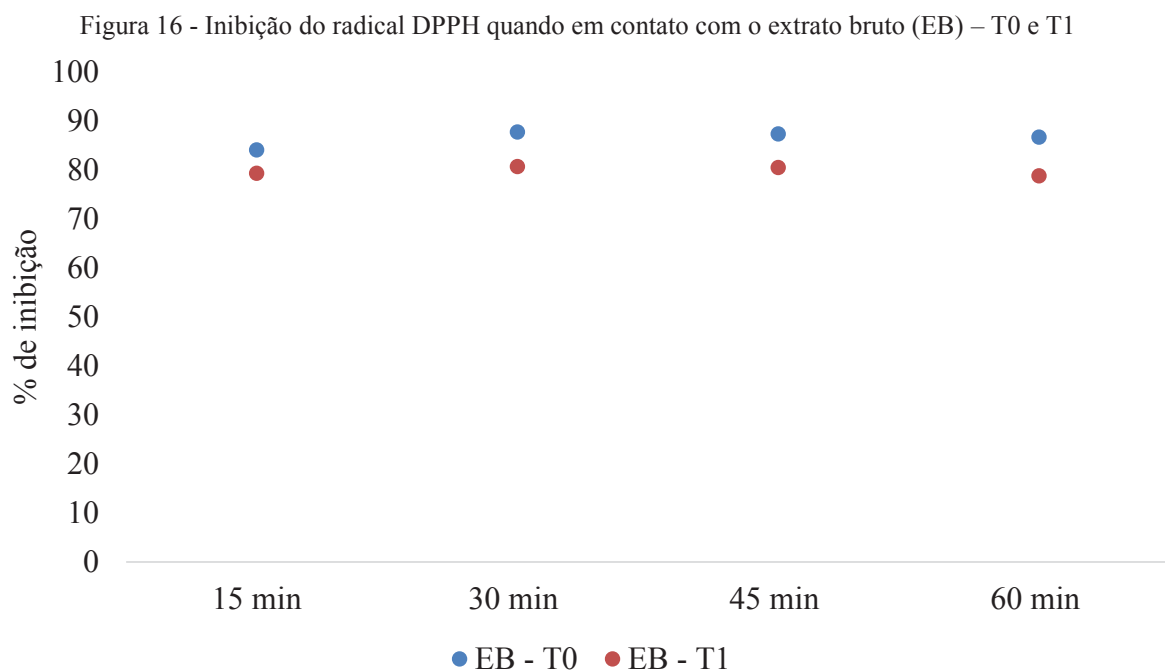
Legenda: EB = extrato bruto de mirtilo; E1 = extrato de mirtilo em pó encapsulado com goma arábica; E2 = extrato de mirtilo em pó encapsulado com CPS; T0 = avaliação dos extratos logo após a sua elaboração; T1 = avaliação do EB após o armazenamento por 1 mês; T5 = avaliação dos extratos em pó (E1 e E2) após o seu armazenamento por 5 meses. \* = resultado não mensurado. As médias seguidas de uma mesma letra na coluna não variaram estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras minúsculas representam as diferenças entre os três extratos (EB, E1 e E2) no tempo 0 (T0). Letras maiúsculas representam as diferenças entre um mesmo extrato nos diferentes tempos (T0, T1 ou T5).

Fonte: Autor (2017)

A Tabela 9 evidencia que o EB (em T0 e T1) e o E1 (em T0) apresentaram eficiência na captura do radical DPPH, cujo % de inibição foi superior a 70%. Tanto o EB quanto o E1 apresentaram perda significativa em sua atividade antioxidante após serem armazenados. O E2, por sua vez, apresentou uma inibição inferior a 60% (33,3%), elucidando uma fraca capacidade em sequestrar o radical DPPH, sendo este resultado estatisticamente inferior aos outros extratos

avaliados. Sendo assim, não reavaliamos este extrato após o armazenamento por 5 meses, entretanto o estudamos mais detalhadamente a seguir.

O Figura 16 apresenta a correlação do EB ao ser recém produzido (T0) e também após o armazenamento por um mês (T1).



Legenda: EB - T0 = extrato bruto de mirtilo logo após a sua elaboração; EB - T1 = extrato bruto de mirtilo após o seu armazenamento por 1 mês.

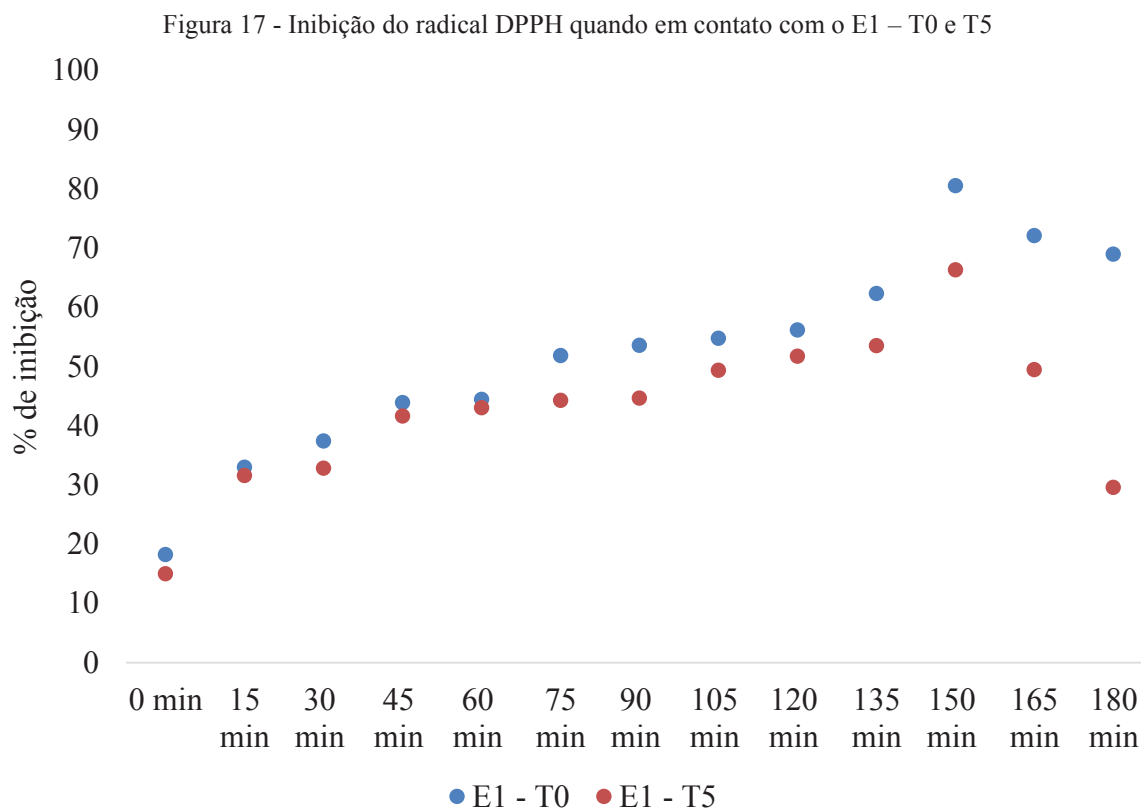
Fonte: Autor (2017)

Embora o EB em T1 apresentou alta eficiência na captura do radical DPPH (80,69% de inibição), sua atividade antioxidante sofreu decréscimo significativo (Tabela 9) após o armazenamento. Além disso, é possível notar que tanto em T0 como em T1, o percentual máximo de inibição de DPPH ocorreu em 30 minutos. Este tempo é considerado habitual para amostra de frutas não encapsuladas.

Pertuzatti (2009), ao avaliar a atividade antioxidante na casca, polpa e fruta inteira de mirtilo, constatou que a parte que apresentou a maior atividade antioxidante foi a casca, em 30 min. de contato com o DPPH. Em estudo envolvendo outras frutas, as polpas de acerola e de uva se destacaram na avaliação da atividade antioxidante, com mais de 90% de sequestro do radical DPPH após 30 min. (VARGAS; HOELZEL; ROSA, 2008).

Em extratos encapsulados entende-se que quanto maior for o tempo da inibição máxima, maior será a eficiência do agente encapsulante. A Figura 17 mostra a inibição do radical DPPH

em relação ao tempo, quando em contato com o E1 recém produzido (T0) e após o armazenamento por cinco meses (T5).



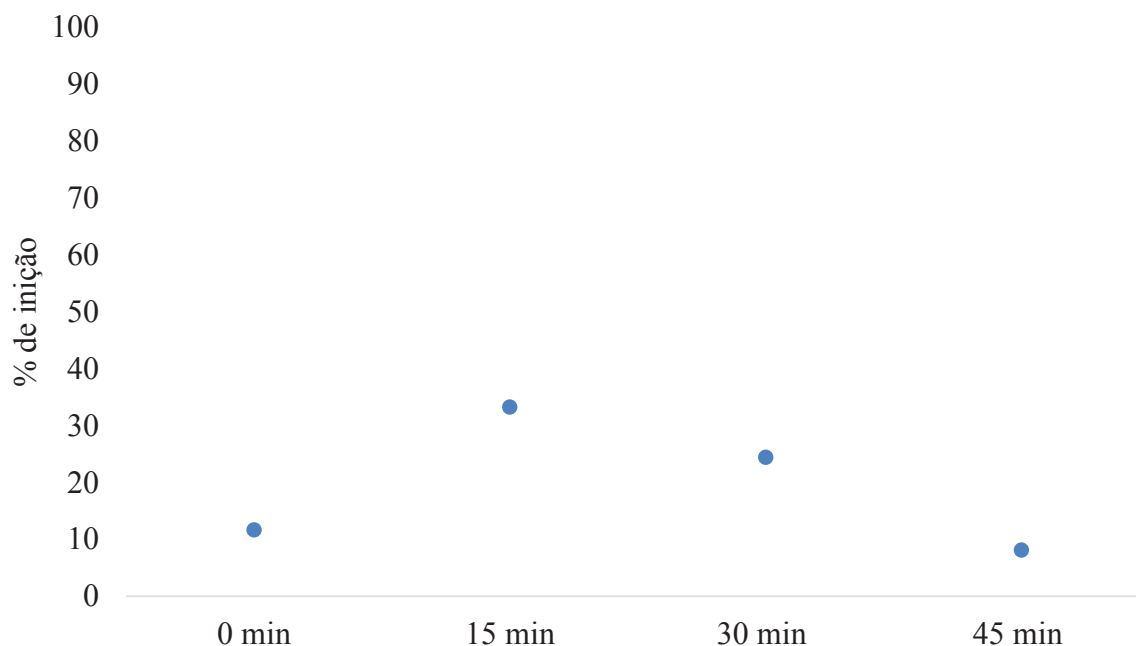
Legenda: E1 - T0 = extrato em pó de mirtilo encapsulado com goma arábica logo após a sua elaboração; E1 - T5 = extrato em pó de mirtilo encapsulado com goma arábica após o seu armazenamento por 5 meses.

Fonte: Autor (2017)

A atividade antioxidante do E1, tanto em T0 quanto em T5, apresentou % de inibição máxima do radical DPPH em 150 min. (2 h 30 min.). Por meio deste dado, pode-se afirmar que, embora o armazenamento do E1 ocasionou diminuição significativa da atividade antioxidante de 80,54% (T0) para 66,32% (T5) (Tabela 9), o tempo de pico máximo de inibição manteve-se igual, em 150min. Este dado sugere êxito no processo de encapsulação.

Para a análise do E2 houve a necessidade de realizar algumas adaptações nas condições do teste. Considerou-se um menor período de tempo em função da necessidade do processo de precipitação de proteínas, pois acredita-se que a inibição do radical DPPH aconteça de forma mais rápida, uma vez que a cápsula foi rompida e precipitada. Dessa forma, não foi possível verificar a eficiência do encapsulante CPS por meio do tempo de pico máximo de inibição. Por este motivo e pelo fato de o E2 ter apresentado uma atividade antioxidante muito inferior ao E1, não foi repetida a análise após o armazenamento. A Figura 18 demonstra a inibição do radical DPPH quando em contato com E2, logo após a sua produção (T0).

Figura 18- Inibição do radical DPPH quando em contato com E2 – T0



Legenda: E2 - T0 = extrato em pó de mirtilo encapsulado com CPS após a sua elaboração.

Fonte: Autor (2017)

Verifica-se que o E2 apresentou o maior pico de atividade antioxidante (33,3%) em 15 min., no entanto, essa atividade se mostrou muito inferior a encontrada no E1. Com base nestes resultados, sugere-se duas hipóteses:

1ª) O CPS não agiu de forma eficiente na encapsulação do extrato de mirtilo e, ao ser submetido ao processo de atomização, houve a degradação da atividade antioxidante.

2ª) O CPS agiu eficientemente na encapsulação do extrato de mirtilo, a ponto de a cápsula não ter sido rompida no preparo da amostra (10 min. em contato com o solvente sob agitação em vórtex), como evidenciado no E1, onde o pico máximo de atividade antioxidante ocorreu em 150 min. Assim sendo, a cápsula não rompida foi submetida ao processo de precipitação de proteína, não havendo a liberação da atividade antioxidante para o sobrenadante.

Com base na segunda hipótese e a baixa atividade antioxidante encontrada no E2, fez-se necessária uma nova avaliação, na qual trabalhou-se com uma adaptação do método para o rompimento da cápsula. Para tal, o E2 foi deixado em contato com o solvente, sob agitação e proteção da luz, por um período de 2 h 30 min. (tempo estimado em que o E1 apresentou maior atividade antioxidante). Após este período fez-se a precipitação da proteína com solução de ácido acético (6%), nas mesmas condições descritas anteriormente. A Tabela 10 mostra a diferença encontrada na nova avaliação em relação à anterior pelo método DPPH e a Figura 19 apresenta os novos resultados considerando a mesma faixa de tempo.

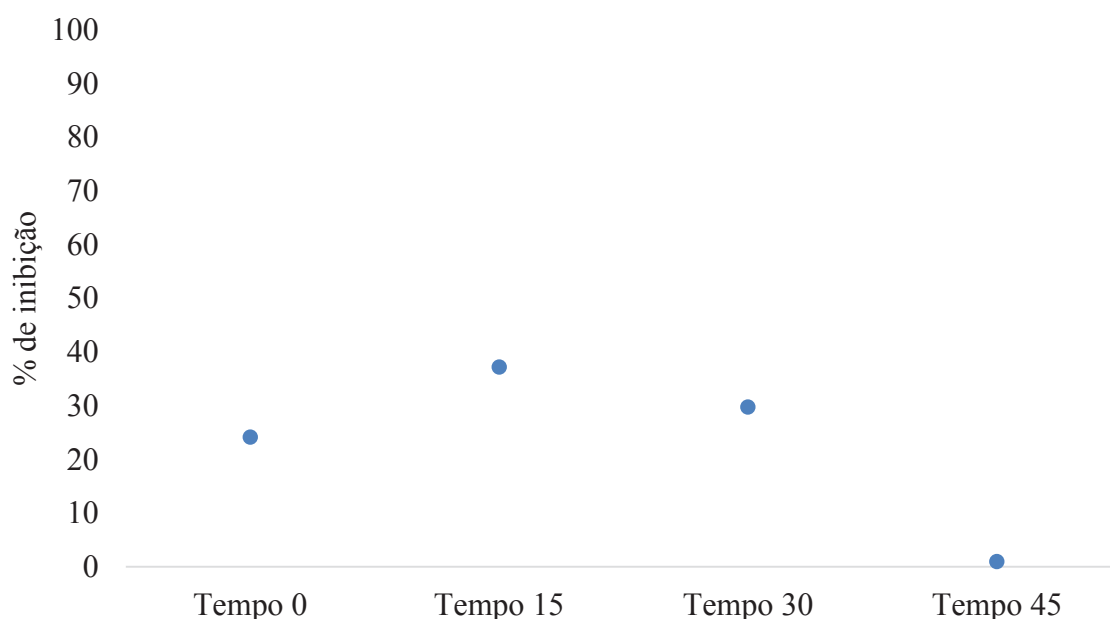
Tabela 10 - Diferença após a ruptura de cápsula do E2 por 150 min.

E2 em contato com o solvente	Tempo de pico máximo da inibição (min)	Percentual máximo de inibição (%)
Ruptura das cápsulas por 10 min.	15 min.	33,3a ±1,78
Ruptura das cápsulas por 150min.	15 min.	37,2a ±7,72

Legenda: EB = extrato de mirtilo encapsulado com CPS. As médias seguidas de uma mesma letra na mesma coluna não variaram estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Autor (2017)

Figura 19 - Inibição do radical DPPH quando em contato com E2 – T0 após ruptura da cápsula por 155 min.



Legenda: E2 - T0 = extrato em pó de mirtilo encapsulado com CPS após a sua elaboração.

Fonte: Autor (2017)

Por meio das últimas explicações, observa-se que não houve diferença significativa na atividade antioxidante do E2 após a adaptação do processo de ruptura da cápsula.

Considera-se então, que a primeira hipótese levantada a respeito da baixa atividade antioxidante do E2 tenha sido a mais coerente. Desta maneira, a análise DPPH evidencia que o E1 mostrou uma melhor atividade antioxidante, quando comparado ao E2.

Ressalta-se que, para a confiabilidade dos resultados deste experimento, verificou-se também a atividade antioxidante dos encapsulantes em pó utilizados na pesquisa (GA e CPS), todavia, os mesmos não demonstraram atividade quando avaliados isoladamente. Realizamos também outra avaliação utilizando uma força de cisalhamento maior no momento de romper as microcápsulas dos extratos, triturando as amostras (solução de pó + água) no liquidificador por

5 min., entretanto não observamos alterações nos resultados de % de inibição e de tempo de pico máximo de inibição.

A atividade antioxidante encontrada em nossos extratos apresentou correlação direta com os teores de compostos fenólicos totais. Outros autores relatam que uma dieta rica em frutas que contém elevados teores de polifenóis proporciona prevenção contra doenças, devido às propriedades antioxidantes (NICHENAMETLA et al., 2006).

Segundo Giovanelli, Brambilla e Sinelli (2013), a atividade antioxidante do mirtilo depende do seu complexo fitoquímico, sendo representado principalmente por antocianinas, procianidinas, ácido clorogênico e outros compostos flavonóides. Supõe-se que as antocianinas são responsáveis por cerca de 84% da atividade antioxidante do mirtilo, enquanto que o ácido ascórbico, o qual também está presente em mirtilos numa quantidade significativa, contribui em 10% da capacidade antioxidante (BARBERIS et al., 2015; HARASYM; OLEDZKI, 2014).

Diferente de algumas outras bagas, a atividade antioxidante de mirtilos é maior nos estágios iniciais de maturação e durante a pigmentação inicial do que na fase madura. Isto está relacionado com um alto nível de ácidos hidroxicinâmicos e flavonóis antes da maturação. A menor capacidade antioxidante de mirtilos maduros pode indicar que as antocianinas têm menor potencial antioxidante do que outros compostos fenólicos, como flavonóis (RODARTE CASTREJÓN, 2008).

Com relação à variância de cultivares, para os mirtilos *rabbiteye* (utilizados na atual pesquisa) a hipótese era de que eles poderiam ter maior atividade antioxidante do que as variedades *lowbush* e *highbush*. Isto pode ser devido à sua pele mais espessa, tendo concentrações mais altas de antocianinas. As variações do teor fenólico total entre cultivares e estádios de maturação são relevantes para as mudanças obtidas na atividade antioxidante. Além disso, a contribuição de cada composto fenólico individual para a capacidade antioxidante total pode variar (PERTUZATTI et al., 2014).

Em um estudo realizado por Reque et al. (2014) foi constatado que o congelamento de frutos de mirtilo aumentou a capacidade antioxidante durante os primeiros três meses de armazenamento, seguido de uma redução até ao final dos seis meses de armazenamento.

#### **4.4 ESTABILIDADE DAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS FRENTE A VIDA DE PRATELEIRA DO EXTRATO SELECIONADO**

Perante os testes realizados até então, evidencia-se que o extrato em pó de mirtilo encapsulado com goma arábica (E1) apresentou melhores características morfológicas,

sensoriais e funcionais, sendo, por tal motivo, selecionado para dar continuidade aos estudos.

#### 4.4.1 Estabilidade de fenóis e flavonoides totais

Com o intuito de avaliar a estabilidade dos fenóis totais e flavonoides presentes no E1 em relação ao tempo de armazenamento, verificou-se o conteúdo cujo os resultados estão representados na Tabela 11. O extrato foi avaliado logo após a sua elaboração, e após 5 e 10 meses de armazenamento sob refrigeração (4°C). A quantidade total de fenóis do extrato foi quantificada por meio de uma curva padrão preparada com ácido gálico e expressa como equivalente de ácido gálico (GAE); e a quantificação de flavonoides totais foi realizada por meio da curva padrão preparada com catequina e expressa como equivalentes de catequina.

Tabela 11 - Teores médios de fenóis totais e flavonoides do E1 em 0, 5 e 10 meses de armazenamento sob refrigeração à 4°C

E1 em meses de armazenamento	Fenóis totais (µg/mL ácido gálico)	Flavonóides totais (µg/mL catequina)
0 meses	6,89a ± 0,81	17,84a ± 1,12
5 meses	2,82b ± 1,26	8,73b ± 1,33
10 meses	1,58b ± 1,44	8,62b ± 1,74

Legenda: E1 = extrato de mirtilo em pó encapsulado com goma arábica. As médias seguidas de uma mesma letra na mesma coluna não variaram estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Autor (2017)

Os resultados indicam potencial do extrato de mirtilo encapsulado com goma arábica (E1) como alimento funcional, pois verificou-se a presença de compostos bioativos como os fenóis e flavonoides, mesmo após o processamento da fruta.

A Tabela 11 mostra coerência entre as duas análises, em que obteve-se queda estatisticamente significativa no teor tanto de fenóis quanto de flavonoides após o armazenamento por 5 e 10 meses, se comparado com o extrato sem armazenamento. Entretanto, nos dois períodos de armazenamento (5 e de 10 meses), não foram observadas diferenças estatísticas, apontando uma estabilização na degradação desses compostos a partir do 5º mês. Tal dado é de relevância para a indústria de alimentos pois sugere que o E1 mantém os fenóis e flavonoides totais por até 10 meses sob refrigeração a 4°C, mas que de 0 para 5 ou 10 meses ocorre uma perda significativa nestes compostos.

Segundo Gomes, Silva e Pinheiro (2016) a adoção de um padrão alimentar equilibrado, rico em alimentos com ação antioxidante e anti-inflamatória, como as frutas ricas em flavonoides (“berries”), pode apresentar papel crucial na prevenção e regressão de mediadores do estresse oxidativo (COSTAMAGNA et al, 2016) e na inibição das vias de sinalização



inflamatórias, especialmente as vias STAT (MOSS; RAMJI, 2015) e NF- $\kappa$ B (NAVARRETE; ALARCON; PALOMO, 2015) que, conseqüentemente, podem inibir a secreção de mediadores inflamatórios.

Trabalhos encontrados na literatura indicam similaridade com os dados obtidos neste estudo, se reportados em mesma unidade. Oliveira (2014) encontrou teor de flavonoides totais de 25,53 mg/g quando analisou polpa de mirtilo encapsulada com goma arábica (1:1). Resultados mais satisfatórios foram encontrados por Pante (2014) ao estudar polpa integral de amora-preta encapsulada com goma arábica (33,33 mg equivalente quercetina/100 g) e com maltodextrina (29,02 mg equivalente quercetina/100 g). No trabalho de Tosoni (2015) também se evidenciou um maior teor de flavonoides no extrato de framboesa encapsulado com goma arábica (0,2107 mg/100g de quercetina) quando comparado ao encapsulado com maltodextrina (0,1511 mg/100g de quercetina).

#### 4.4.2 Estabilidade antioxidante pelo método ABTS em diferentes temperaturas

A Tabela 12 e o gráfico representado pela Figura 20 demonstram a atividade antioxidante do E1 avaliada a cada sete dias durante quatro semanas, sob congelamento (-18°C), refrigeração (4°C) e temperatura ambiente (25°C).

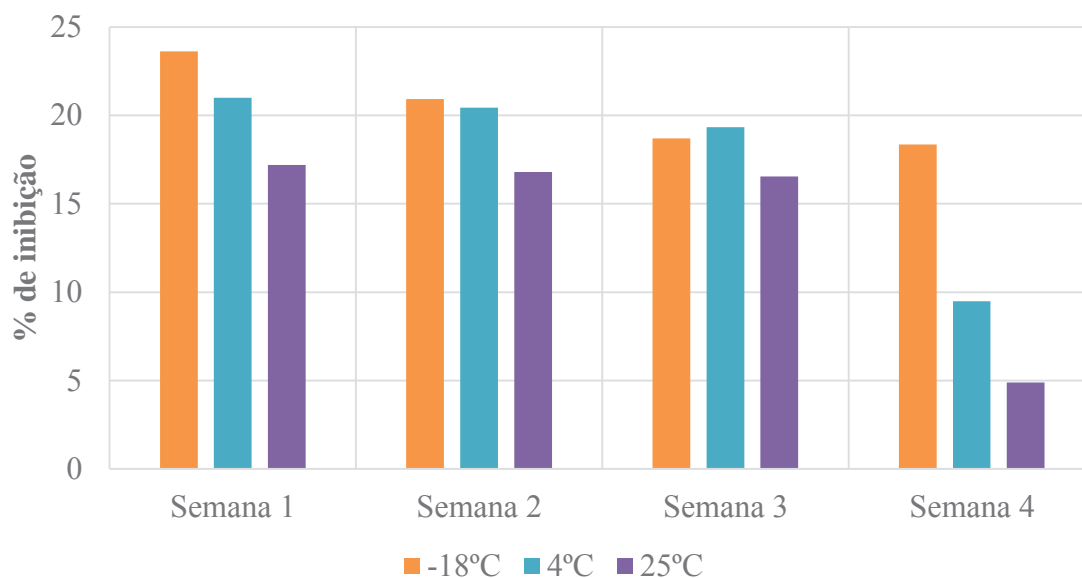
Tabela 12 - Estabilidade antioxidante do E1 frente à diferentes temperaturas durante quatro semanas

Condições de temperatura	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
-18°C	23,62a $\pm$ 0,02	20,93b $\pm$ 0,10	18,69 c $\pm$ 0,42	18,36c $\pm$ 0,32
4°C	21,00 a $\pm$ 0,03	20,44 a $\pm$ 0,48	19,33b $\pm$ 0,03	9,48 c $\pm$ 0,04
25°C	17,2a $\pm$ 0,02	16,79ab $\pm$ 0,18	16,55b $\pm$ 0,33	4,89 c $\pm$ 0,03

Legenda: E1 = extrato de mirtilo encapsulado com goma arábica. As médias seguidas de uma mesma letra, na mesma linha, não variaram estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Autor (2017)

Figura 20 - Estabilidade antioxidante do E1 submetido a diferentes temperaturas



Fonte: Autor (2017)

Os extratos mantidos sob refrigeração (4°C) e temperatura ambiente (25°C) tiveram um declínio considerável da atividade antioxidante a partir da terceira semana, evento não observado no extrato congelado (-18°C), que apresentou diminuição de sua atividade antioxidante da primeira para a segunda semana, mas que se estabilizou da terceira para a quarta semana. Sugere-se dessa forma, que o extrato congelado (-18°C) apresentou menor degradação de seus compostos, sendo essa uma informação importante sobre a manutenção da atividade antioxidante deste produto, quando submetido ao armazenamento.

Em todas as amostras observou-se diferenças a 5% de significância em função do tempo de armazenamento. Tal resultado corrobora para a conclusão de que os compostos responsáveis pela atividade antioxidante são sensíveis ao armazenamento, principalmente quando há incidência de calor. Todavia, o fato de que em até duas semanas não houve alteração da atividade antioxidante nos extratos mantidos sob 4° e 25°C pode estar indicando uma proteção pelo encapsulante utilizado.

Em um trabalho realizado por Jacques (2009) sobre a estabilidade de polpa de amora preta armazenada em diferentes condições de temperaturas (-10, -18 e -80°C) durante 6 meses, o autor relatou que a temperatura de -10°C foi suficiente para não causar alterações significativas com relação à fenóis totais, antocianinas totais, capacidade antioxidante e acidez titulável em apenas 2 meses. A temperatura de -18°C foi suficiente para não causar alterações significativas nas polpas com relação à fenóis totais e capacidade antioxidante por 4 meses, antocianinas totais por 2 meses e  $\beta$ -caroteno 6 meses. Na temperatura de -80°C,

poucas foram as alterações causadas na polpa armazenada por 6 meses, sendo observado apenas pequenas alterações em sólidos solúveis.

Fracassetti et al. (2013) avaliaram os efeitos do armazenamento sobre o teor de antocianinas totais e atividade antioxidante do pó congelado de mirtilo silvestre mantido a 25, 42, 60 e 80°C por 49 dias. O armazenamento reduziu o conteúdo de antocianinas totais em todas as temperaturas, todavia, esta redução foi mais lenta a 25°C (-3% após 2 semanas), enquanto que foi mais rápida a 60°C (-60%) e a 80°C (-85%) após 3 dias. Contudo, não foram detectadas alterações significativas na atividade antioxidante pelo aumento da temperatura.

Já no estudo de Murphy et al. (2009) foi avaliada a manutenção da atividade antioxidante de mirtilos sob diferentes formas de cocção doméstica. Os autores relataram que não houve perda significativa da atividade antioxidante nem mesmo quando os frutos foram submetidos à fritura. O mirtilo frito ainda manteve melhor essa atividade quando comparado ao mirtilo cozido em fogo baixo controlado. Os autores concluíram que mirtilos parecem ser estáveis ao calor da cocção e podem fazer parte de receitas gastronômicas como boa fonte de antioxidantes dietéticos.

Dados de estabilidade deste trabalho e de estudos encontrados na literatura demonstram a eficácia da conservação de pó encapsulado de mirtilo sob baixas temperaturas para a manutenção dos compostos bioativos.

Em relação ao processo de secagem aplicado, Tatar Turan et al. (2016) estudaram a influência do uso de um bico ultrassônico na atomização sobre a estabilidade das propriedades funcionais de um pó encapsulado de mirtilo. Houve diferença significativamente maior no teor fenólico total e no poder antioxidante das microcápsulas produzidas por um bico ultrassônico quando comparado a um bico convencional. Além disso, o bocal ultrassônico mostrou um efeito protetor significativo sobre as propriedades físico-químicas do que o bico convencional. Os autores concluíram que a produção de microcápsulas utilizando bicos ultrassônicos é viável para ser usado como uma ferramenta funcional na indústria de alimentos.

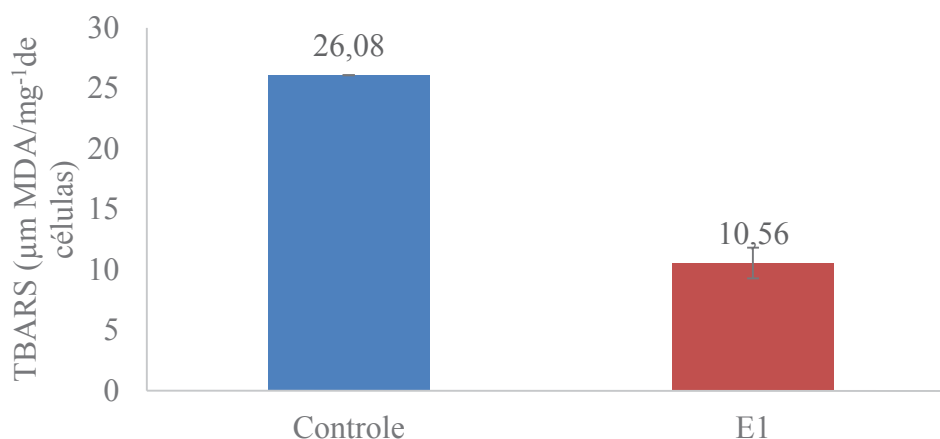
#### **4.5 ESTUDO *IN VIVO* COM O MODELO *Saccharomyces cerevisiae***

Os resultados dos ensaios utilizando o E1 no modelo *Sacharomyces cerevisiae* estão apresentados a seguir, nos itens 4.5.1 (Peroxidação lipídica pelo método de TBARS) e 4.5.2 (Atividade enzimática da glutathiona (GPX) por DTNB).

#### 4.5.1 Peroxidação lipídica pelo método de TBARS

Os resultados que estão apresentados na Figura 21 são relativos à peroxidação lipídica - TBARS frente à toxicidade de ferro em *Saccharomyces cerevisiae*. Verificamos diminuição significativa dos níveis de peroxidação lipídica nas cepas tratadas com E1 ( $10,56 \pm 1,27$ ), se comparadas ao controle ( $26,08 \pm 0,01$ ).

Figura 21 - Valores médios de peroxidação frente à toxicidade de ferro com e sem tratamento com E1



Legenda: E1 = extrato de mirtilo encapsulado com goma arábica.

Fonte: Autor (2017)

Um dos principais mecanismos de lesão causada pelo estresse oxidativo como resultado da geração de radicais livres é a oxidação da camada lipídica da membrana celular, podendo levar a danos celulares (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; SAMPAIO; MORAES, 2010; FRANÇA et al., 2013). Os nossos resultados relativos aos níveis de peroxidação lipídica (Figura 21) nos revelam que o extrato de mirtilo encapsulado com goma arábica diminuiu de forma significativa os níveis de peróxidos nas células em estudo.

Salientamos que independentemente do extrato de mirtilo agir sobre a toxicidade de ferro, ele também mostra ação antioxidante nas cepas que não apresentam a expressão do ferro, efetivando seu poder protetor frente a peroxidação lipídica. Os estudos com antioxidantes têm evidenciado benefícios no uso de nutrientes isolados no tratamento e prevenção de doenças. Estes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células dificultando o ataque das espécies reativas sobre os lipídeos (BERTOLIN et al., 2009).

A eficácia do sistema antioxidante depende do tipo de molécula geradora do estresse oxidativo, como também a localização intra ou extracelular dessa molécula. O extrato de

mirtilo, substância de interesse nesse estudo atua mais diretamente no radical hidroxil, podendo assim ser utilizado para minimizar os danos à membrana celular, inibindo a formação de radicais livres e protegendo a saúde. Slatnar et al. (2012) avaliaram o efeito do suco de diferentes bagas na oxidação em células de *Saccharomyces cerevisiae*. Como resultados, os autores obtiveram diminuição significativa da oxidação intracelular em relação ao grupo controle quando utilizado o suco de mirtilo. Oprea et al. (2014) estudaram o efeito protetor de extratos de mirtilo em células de *Saccharomyces cerevisiae* estressadas com cádmio e obtiveram como resultado uma ação protetora do mirtilo contra este estressor. Os autores concluíram que extrato de mirtilo pode ser utilizado como suplemento alimentar potencialmente valioso para indivíduos expostos a cádmio.

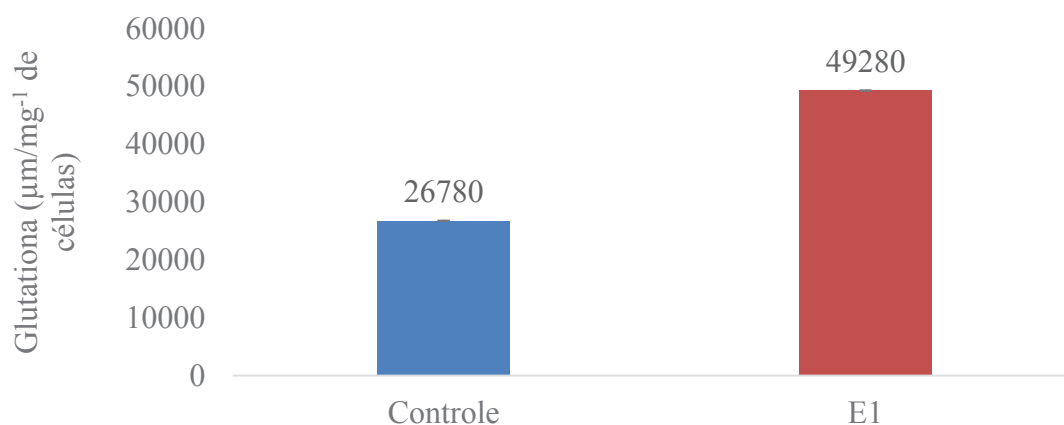
A levedura *Sacharomyces cerevisiae* é um modelo de organismo apropriado para processos celulares eucarióticos fundamentais, como a atividade antioxidante celular relacionada a compostos bioativos (CIGUT, et al. 2011; ZAKRAJSEK; RASPOR; JAMNIK; 2011). Nestes organismos os danos oxidativos de proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e outros componentes celulares, bem como sistemas de defesa contra o estresse oxidativo são semelhantes ao organismo humano em quase todos os níveis de organização celular. Assim sendo, os microrganismos são modelos úteis para estudar vários aspectos do estresse oxidativo nos níveis bioquímico, biológico molecular e celular (SIGLER, et al. 2009; SLATNAR et al., 2012).

Partindo-se da ideia de que o organismo da *Saccharomyces cerevisiae* apresenta semelhança com o organismo humano em termos de oxidação e peroxidação lipídica, este resultado abre novos caminhos de oportunidades para o desenvolvimento de terapias preventivas ou de reversão contra os danos causados pela toxicidade celular de ferro a partir da utilização do extrato de mirtilo.

#### **4.5.2 Atividade enzimática da glutathiona**

Os resultados da Figura 22 representam a dosagem da atividade da glutathiona peroxidase (GPX) em *Saccharomyces cerevisiae* frente à toxicidade com ferro. O tratamento com E1 mostrou aumento significativo nos índices de GPX.

Figura 22 - Valores médios da dosagem da atividade enzimática da GPX por DTNB frente à toxicidade de ferro com e sem tratamento de extrato de mirtilo



Legenda: E1 = extrato de mirtilo encapsulado com goma arábica.  
Fonte: Autor (2017)

Os radicais livres, gerados por reações metabólicas, são os principais responsáveis pelos danos celulares (BARBOSA et al., 2010; FRANCISQUETI et al., 2017). De acordo com esses autores a presença de radicais livres conduz uma reação em cadeia, que passa a alterar a conformação, a estrutura ou as funções de proteínas, fosfolipídios de membrana, ácidos nucleicos e outros componentes celulares (BARBOSA et al., 2010). O aumento na produção de espécies reativas de oxigênio ocorre devido erros na síntese das enzimas endógenas antioxidantes, quando incapazes de evitar os danos celulares (COLLIER; KANAAN; KORDOWER, 2011; FRANCISQUETI et al., 2017). A eficiência das defesas antioxidantes naturais, que incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutaciona (GPX), é crucial na atenuação destes radicais livres e na possível instalação do estresse oxidativo (RISTOW; SCHMEISSER, 2011).

Nossos achados através da quantificação da atividade da enzima GPX revelaram que o extrato de mirtilo foi capaz de modular os parâmetros enzimáticos aumentando significativamente os níveis de atividade da GPX frente à toxicidade por ferro.

As enzimas GPX, juntamente com as SOD e CAT fornecem a primeira linha de defesa antioxidante contra espécies reativas de oxigênio através da desmutação catalisada por enzimas de  $O_2$  - para  $H_2O_2$ , que é ainda reduzida a oxigênio e água (SALMINEN; PAUL, 2014). Estas desempenham papel importante no processo metabólico da detoxificação eletrofílica, sendo considerado um fiável índice de estressor oxidativo (CHIOU; TZENG, 2000; HATEM et al., 2014; JAMIESON, 1998; ROVER JÚNIOR et al., 2001).

No estudo realizado por Guo, Kim e Lee (2017) que investigaram os efeitos da administração de pó de mirtilo liofilizado no desempenho cognitivo de ratos adultos expostos

a estresse leve crônico, detectaram aumento significativo expressivo na atividade da (GPX) e concluíram que a suplementação de mirtilo parece ter potencial benéfico em termos de prevenção de um declínio cognitivo durante o estresse, sendo que estes efeitos podem se estender ao declínio cognitivo associado a outras doenças neuropáticas.

Efeitos positivos na atividade da GPX com a administração de mirtilo também foram evidenciados no estudo de Song, Huang e Yu (2016), os quais induziram diabetes e inflamação de retinas em ratos. Com a suplementação de mirtilo os autores obtiveram um aumento no conteúdo da glutathiona (GSH e GPX) e evidenciaram maior capacidade antioxidante da retina dos animais.

## 5 CONCLUSÕES

O extrato de mirtilo encapsulado com goma arábica (E1), quando comparado ao extrato encapsulado com CPS (E2), se mostrou mais eficiente na preservação das propriedades funcionais e características morfológicas. Além disso, este extrato apresentou atributo sensorial (cor) muito semelhante a fruta de mirtilo, o que favorece o seu uso como corante natural no desenvolvimento de novos alimentos enriquecidos deste extrato.

Nossos testes evidenciaram que o E1 mantido sob refrigeração (4°C) por 10 meses sofreu uma diminuição de seus compostos bioativos e da atividade antioxidante logo nos 5 meses de armazenamento. Comprovamos também que este extrato em pó, quando mantido sob congelamento (-18°C), consegue manter de forma mais eficiente sua atividade antioxidante. As indústrias de interesse devem assegurar a conservação deste tipo de extrato preferencialmente sob congelamento para evitar a degradação dos compostos bioativos e consequente perda da atividade antioxidante.

Quando aplicamos o E1 em células de levedura *Sacharomyces cerevisiae* estressadas com íons de ferro, obtivemos redução significativa da peroxidação lipídica assim como um aumento na atividade enzimática da glutathione.

Profissionais de saúde como nutricionistas, além de recomendarem o consumo de frutas vermelhas *in natura*, como o mirtilo, por exemplo, podem ainda sugerir o consumo de alimentos industrializados enriquecidos com extratos de frutas que apresentem características funcionais semelhantes. O nosso extrato de mirtilo encapsulado com goma arábica mostrou atender ao requisito mencionado, tornando-se um ingrediente promissor no desenvolvimento de produtos alimentícios com fins terapêuticos. Diante do exposto, nosso estudo forneceu dados importantes para a indústria de alimentos que deseja se aprimorar e investir no ramo de alimentos saudáveis, como os alimentos funcionais.



## REFERÊNCIAS

- A.O.A.C (Association of Official Analytical Chemists). **Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists**, nº 922.06, chapter 32, p. 5., 18<sup>a</sup>ed., Gaithersburg, Mariland, 2016.
- ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 14141. **Escalas utilizadas em análise sensorial de alimentos e bebidas**. ABNT/CEE-174 Análise Sensorial. 1998.
- AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and, metabolism. **Nutrition Research Reviews**, New York, v. 18, n. 1, p. 75-81, 2002.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2010, 2010.
- AMARAL, T. P. D. **Estudo de compostos químicos e avaliação da atividade antioxidante in vitro para os extratos padronizados de *Cuphea Ingrata Cham. Sheld* (Sete Sangrias)**. Trabalho de conclusão de curso (Faculdade de Farmácia), Universidade Comunitária Regional de Chapecó, Chapecó-SC, 2005.
- ANDRADE-WARTHA, E. R. S. **Capacidade antioxidante in vitro do pedúnculo de caju (*Anacardium Occidentale L.*) e efeito sobre as enzimas participantes do sistema antioxidante de defesa do organismo animal**. 2007. 87f. (Tese de Doutorado). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.
- ANTUNES, L. E.; HOFFMANN, A. **Como cultivar mirtilo**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2002. 112 p.
- ARSEGO, J. L.; CAPEL, L. S. MARASCHIN, R. P.; IANSSEN, C.; ABREU, M. F.; VENDRUSCULO, L. S.; PEDROTTI, E. L.; MARASCHIN, M. Cinética de extração de antocianinas em frutos de framboesa (*Rubus idaeus*) e amora preta (*Rubus fruticosus*). In: **Congresso Brasileiro de Fruticultura**, 2002. Belém. In: Anais do XVII Congresso Brasileiro de Fruticultura. Belém: Sociedade de Fruticultura, 2002.

ARVANITTOYANNIS, I. S.; HOUWELINGEN-KOUKALIAROGLOU, M. V. Functional foods: a survey of health, claims, pros and cons, and current legislation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, n. 5, p. 385-404, 2005.

AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, n. 1, p. 89-97, 2005.

BAE, E. K.; LEE, S. J. Microencapsulation of avocado oil by spray drying using whey protein and maltodextrin. **Journal of Microencapsulation**, v. 25, n. 8, p. 549-560, 2008.

BAKAN, J. A. Microencapsulation of foods and related products. **Food Technology**, Chicago, v. 27, n. 11, p. 34-44, 1973.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.

BARBERIS A., SPISSU Y., FADDA A., AZARA E., BAZZU G., MARCEDDU S., ANGIIONI A., SANNA D., SCHIRRA M., SERRA P.A. Simultaneous amperometric detection of ascorbic acid and antioxidant capacity in orange, blueberry and kiwi juice, by a telemetric system coupled with a fullerene- or nanotubes-modified ascorbate subtractive biosensor. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 67, p. 214–223, 2015.

BARBOSA, K. B.; COSTA, N. M.; ALFENAS, R. C.; PAULA, S. O.; MINIM, V. P.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações, fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 18, 2010.

BE MILLER, J. N.; WHISTLER, R. L. Carbohydrates. In: FENNEMA, O.R. **Food Chemistry**. 3ed. Cap.4, p.157-224. 1996.

BENETTI, F. **Restrição calórica e extrato de *Spirulina platensis* frente a íons ferroso no envelhecimento de *Saccharomyces cerevisiae* deletada ao gene *sir 2***. 129f. 2013. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-Graduação em Envelhecimento Humano), Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo/RS, 2013.

BERTOLIN, T. E.; PILATTI, D.; BAVARESCO, K.; GIACOMINI, A. C.; COLLA, L. M., COSTA, J. A. V. Effect of microalga *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) on hippocampus lipoperoxidation and lipid profile in rats with induced hypercholesterolemia. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 1253- 1259, 2009.

BONFANTE, K. V. Aplicação de extrato de mirtilo (*Vaccinium* sp) microencapsulado em sorvete. 2015. Trabalho de conclusão de curso (Engenharia de Alimentos), Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo/RS, 2015.

BORGES, P. F. Z. Pilot scale production of protein concentrates from cow's milk: composition and nutritive value. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 4, p. 1-8, 2001.

BOROSKI, M.; VISENTAINER, J. V.; COTTICA, S. M.; MORAIS, D. R. **Antioxidantes: princípios e métodos analíticos**. 1ª ed, Curitiba: Editora Appris, 2015.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Portaria nº 15, de 30 de abril de 1999. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 03 maio 1999.

BRASIL. Instituto Adolfo Lutz. **Normas analíticas: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3 ed. São Paulo, 2005. v. 2, 533p.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BRAZEL, C. S. Microencapsulation: offering solutions for the food industry. **Cereal Foods World**. v. 44, n. 6, p. 388-393, 1999.

BRAZELTON, C. **World blueberry acreage & production**. World Blueberry Acreage & Production Report, p. 77, 2013.

BRIDLE, P.; TIMBERLAKE, C. F. Anthocyanins as natural food colours – selected aspects. **Food Chemistry**, v.58, n.1-2, p.103-109, 1997.

BURGAIN, J.; GAIANI, C.; LINDER, M.; SCHER, J. Encapsulation of probiotic living cells: from laboratory scale to industrial applications. **Journal of Food Engineering**, v.104, n.4, p.467-483, 2011.

BURNS, J.; GARDNER, P. T., O'NEIL, J.; CRAWFORD, S.; MORECROFT, I.; McPHAIL, D. B.; LISTER, C.; MATTHEWS, D.; MacLEAN, M. R.; LEAN, M. E. J.; DUTHIE, G. G.; CROZIER, A. Relationship among antioxidant activity, vasodilatation capacity, and phenolic content of red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 2, p. 220-230, 2000.

CALVO, P.; HERNÁNDEZ, T.; LOZANO, M.; GONZÁLEZ-GÓMEZ. Microencapsulation of extra-virgin olive oil by spray-drying: Influence of wall material and olive quality. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, p. 852-858, 2010.

CANTUARIAS-AVILÉS, T. **Cultivo do mirtilheiro (*Vaccinium sp.*)**. Piracicaba: ESALQ, 2010. 38 p.

CANTUARIAS-AVILÉS, T.; SILVA, S. R.; MEDINA, R. B.; MORAES; A. F. G.; ALBERTI, M. F. Cultivo do mirtilo: atualizações edesempenho inicial de variedades de baixa exigência em friono estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, v. 36, n. 1, p. 139-147, 2014.

CANUTO, K. M. **Propriedades Qumicas e Farmacologicas de Mangiferina: Um Composto Bioativo de Manga (*Mangifera indica L.*)**. 1ª ed. Petrolina: Embrapa Semi-árido (on-line), 2009.

CARMEL-HAREL O.; STEARMAN R.; GASCH A. P.; BOTSTEIN D.; BROWN P. O.; STORZ G. Role of thioredoxin reductase in the Yap1p-dependent response to oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 595-605, 2001.

CARMO, E. L.; FERNANDES, R. V. B.; BORGES, S. V. Microencapsulação por spray drying, novos biopolímeros e aplicações na tecnologia de alimentos. **Journal of Chemical Engineering and Chemistry**, v. 01, n. 02, p. 30-44, 2015.

CARNEIRO, H.C.F.; TONON, R.V.; GROSSO, C.R.F.; HUBINGER, M.D. Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. **Journal of Food Engineering**, v. 115, p. 443-451, 2013.

CASEMIRO, I. P.; RAMOS, P. Produção científica sobre alimentos funcionais: uma análise das publicações brasileiras entre 2007 e 2013. **Demetra**, v. 9, n. 4, p. 925-941, 2014.

CASTRO-CISLAGHI, F. P.; FRITZEN-FREIRE, C. B.; SANT'ANNA, E. S. Potencial do soro de leite líquido como agente encapsulante de *Bifidobacterium Bb-12* por spray drying: comparação com goma arábica. **Ciência Rural Online**, Santa Maria, 2012.

CHENG, A.; YAN, H.; HAN, C.; WANG, W.; TIAN, Y.; CHEN, X. Polyphenols from blueberries modulate inflammation cytokines in LPS-induced RAW264.7 macrophages. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2014.

CHIOU, T. J.; TZENG, W.F. The roles of glutathione and antioxidant enzymes in menadione-induced oxidative stress. **Toxicology**, v. 154, p. 75-84, 2000.

CIGUT, T.; POLAK, T.; GASPERLIN, L.; RASPOR, P.; JAMNIK, P. Antioxidative Activity of Propolis Extract in Yeast Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p.11449–11455, 2011.

CODY, V. JR.; MIDDLETON. E.; HARBORNE, B. J. Progress in Clinical and Biological Research. **Biochemical, Pharmacological, and Structure-activity relationships**. New York, v. 213, p. 113-124, 1986.

COLLIER, T. J.; KANAAN, N. M.; KORDOWER, J. H. Ageing as a primary risk factor for Parkinson's disease: evidence from studies of non-human primates. **Nature Neuroscience**, v. 12, n. 6, p. 359-366, 2011.

COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. B. **Alimentos funcionais: componentes bioativos e efeitos fisiológicos**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2010.

COSTAMAGNA, M. S.; ZAMPINI, I. C.; ALBERTO, M. R.; CUELLO, S.; TORRES, S.; PEREZ, J.; QUISPE, C.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; ISLA, M.I. Polyphenols rich fraction from *Geoffroea decorticans* fruits flour affects key enzymes involved in metabolic syndrome, oxidative stress and inflammatory process. **Food Chemistry**, n. 1, v. 190, p. 392-402, 2016.

DE BARCELLOS, M. D.; HOPPE, A.; VIEIRA, L. M.; OLIVEIRA, G. Market orientation for functional food industry. In: WAGENINGEN INTERNATIONAL CONFERENCE ON CHAIN AND NETWORK MANAGEMENT, 10th, 2012, Wageningen. **Multi-stakeholder dynamics in chains and networks**. Wagenigen: Wageningen University, 2012.

DE WIT, J. N. 'Whey protein concentrates: manufacture, composition and applications', **Industrial Proteins**, v.9, n.3, p.3–5, 2001.

DEBRENOVA, F. V., GRABNER-KRAUTER, S. TERLUTTER, R. Country-of-origin (COO) effects in the promotion of functional ingredients and functional foods. **European Management Journal**, 2015.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**. Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DEL BO, C.; CAO, Y.; ROURSGAARD, M.; RISO, P.; PORRINI, P.; LOFT, S.; MOLLERET, P. Anthocyanins and phenolic acids from a wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) powder counteract lipid accumulation in THP-1-derived macrophages. **European Journal of Nutrition**, 2015.

DENG, G. F.; XU, X. R.; ZHANG, Y.; LI, D., GAN, R. Y.; LI, H. B. Phenolic compounds and bioactivities pigmented rice. **Reviews of Food Science and Nutrition Critical**, v. 53, p. 296-306, 2013.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema b-caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, 2006.

ECK, P. **Blueberry Science**. Rutgers University Press, New Brunswick, N. J., 1988.  
FACHINELLO, J. C. Mirtilo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 2, p. 285-576, 2008.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 10, p. 510-523, 2010.

FAO. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 17 de setembro de 2015.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 103-112, 2008.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de Alimentos**. 2. ed, Porto Alegre: Editora Artmed, 2006. 602 p.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, Botucatu, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FLÔRES, F. P.; SINGH, R. K.; KERR, W. L.; PHILLIPS, D. R.; KONG, F. In vitro release properties of encapsulated blueberry (*Vaccinium ashei*). **Food Chemistry**, v. 168, p. 225-232, 2015.

FOEGEDING, E.; LUCK, P., in: **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. Caballero, B., Trugo, L., Finglas, P., (Ed.), Academic Press, New York, 2002; pp. 1957-1960.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. (Ed.) **Milk Protein in: Dairy Chemistry & Biochemistry**. London: Blackie Academic Professional, p. 146-238, 1998.

FRACASSETTI, D.; DEL BO, C.; SIMONETTI, P.; GARDANA, C.; KLIMIS-ZACAS, D.; CIAPPELLANO, S. Effect of Time and storage temperature on anthocyanin decay and antioxidant activity in wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) powder. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 12, p. 2999-3005, 2013.

FRANÇA, B. K.; ALVES, M. R. M.; SOUTO, F. M. S.; TIZIANE, L.; BOAVENTURA, R. F.; GUIMARÃES, A.; ALVES JR, A. Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **Jornal Português de Gastreterologia**, v. 20. n. 5, p. 199-206, 2013.

FRANCIS, F.J. Anthocyanins and betalains: composition and applications. **Cereal Foods World**, v. 45, p. 208-213, 2000.

FRANCISQUETI, F. V.; CHIAVERINI, L. C. T.; SANTOS, K. C.; MINATEL, I. O.; RONCHI, C. B.; FERRON, A. J. T.; FERREIRA, A. L.; CORREA, C. R.; The role of oxidative stress on the pathophysiology of metabolic syndrome. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 63, n. 1, 2017.

FRANKEL, E. D.; FINLEY, J. W.; J. How to standardize the multiplicity of methods to evaluate natural antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 13. p. 4901-4908, 2008.

FUKUMOTO, L. R.; MAZZA, G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3597-3604, 2000.  
GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, n. 9, p. 1107-1121, 2007.

GHARSALLAOURI, A.; ROUDART, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spraydrying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, p. 1107-1121, 2007.

GIOVANELLI, G.; BRAMBILLA, A.; SINELLI, N. Effects of osmo-air dehydration treatments on chemical, antioxidant and morphological characteristics of blueberries. **LWT - Food Science and Technology**, v.54, p. 577-584, 2013.

GOMES, S. F.; SILVA, F. C.; PINHEIRO, A. C. V. Efeito do consumo de frutas ricas em flavonoides sobre mediadores inflamatórios, bioquímicos e antropométricos relacionados ao

metabolismo energético. **Nutrição clínica e Dietoterapia hospitalar**, v. 36, n. 3m, p. 170-180, 2016.

GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Food Science and Technology**, London, v. 15, p. 330-347, 2004.

GOULA, A. M.; ADAMOPOULOS, K. G. Spray drying of tomato pulp in dehumidified air: II. The effect on powder properties. **Journal of Food Engineering**, v. 66, 2005.

GRACE, P. A. Ischaemia-reperfusion injury. **British Journal of Surgery**, v. 81, p. 637-647, 1994.

GUO, Q.; KIM, Y. N.; LEE, B. H. Protective effects of blueberry drink on cognitive impairment induced by chronic mild stress in adult rats. **Nutrition research and practice**, v. 11, n. 1, p. 25-32, 2017.

HADDAD, J. J. E.; OLVER, R. E.; AND LAND, S. C. Antioxidant/Pro-oxidant Equilibrium Regulates HIF-1 $\alpha$  and NF- $\kappa$ B Redox Sensitivity: evidence for inhibition by glutathione oxidation in alveolar epithelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 21130-21139, 2000.

HALLIWELL, B. **The antioxidant paradox**. *Lancet*, v. 355, n. 9210, p. 1179-1180, 2000.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; AROUMA, O. I. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 7, p. 601-617, 1995.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n.2, p. 142-231, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radical in Biology and Medicine**. 3 ed. Oxford: Oxford University Press; 2002, 4 ed., 2007.

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C.; DE PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 19, n.4, p.479-488, 2006.

HARASYM, J.; OLEDZKI, R. Effect of fruit and vegetable antioxidants on total antioxidant capacity of blood plasma. **Nutrition**, v. 30, n. 5, p. 511-517, 2014.



HARBORNE, J. B.; BAXTER, H.; MOSS, G. P. editores. **Phytochemical dictionary: handbook of bioactive compounds from plants**. 2 ed. London: Taylor & Francis, 1999.

HATEM, E.; BERTHONAUD, V.; DARDALHON, M.; LAGNIEL, G.; BAUDOUIN-CORNU, P.; HUANG, M. E.; LABARRE, J.; AND CHÉDIN, S. Glutathione is essential to preserve nuclear function and cell survival under oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 67, p. 103-114, 2014.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure - activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.13, p.572-84, 2002.

HENRIQUES, J. A. P.; DAFRÉ, A. L.; PICADA, J. N.; MARIS, A. F.; SALVADOR, M. Espécies reativas de oxigênio e avaliação de antioxidantes em sistemas biológicos. In: SERAFINI, L. A.; Barros, N. M.; AZEVEDO, J. L. (Eds.) **Biotecnologia na Agricultura e na Agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, 2001. v.1, p. 227-252.

HERBETTE, S.; ROECKEL-DREVET, P.; DREVET, J. R. Seleno-independent glutathione peroxidases. **FEBS Journal**, v. 274, p. 2163-2180, 2007.

HIJO, A. A. C. T., COSTA, J. M. G., SILVA, E. K., AZEVEDO, V. M., YOSHIDA, M. I., BORGES, S. V. Physical and thermal properties of oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil microparticles. **Journal of Food Process Engineering**, Westport, v. 38, n. 1, p. 1-10, feb. 2015.

HOBSON, G. E.; GRIERSON, D. TOMATO, I. In: SEYMOUR, G. B.; TAYLOR, J. E.; TUCKER, G. A. (ed) **Biochemistry of fruits ripening**, London: Champman e Hall, cap. 13, p. 405-422, 1993.

HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 9, p. 937-942, 1999.

HUANG, W.; ZHANG, H.; LIU, W. LI, C. Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. **J Zhejiang Univ Sci B** . v. 13, n. 2, p. 94-102,2012.

IZAWA, S.; INOUE, Y.; AND KIMURA, A. Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v. 368, p. 73-76, 1995.

JACKMAN, R. L.; SMITH, J. L. Anthocyanins and betalains. In: HENDRY, G.A.F. and HOUGHTON, J.D. **Natural Food Colorants**. London: Blackie Academic. p.183-241, 1992.

JACKSON, L.S.; LEE, K. Microencapsulation and food industry. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 24, n. 4, p. 289-297, 1991.

JACQUES, A. C. **Estabilidade de compostos bioativos em polpa congelada de amora-preta (*rubus fruticosus*) cv. TUPY**. 60f. 2009. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS, 2009.

JAFARI, S. M.; ASSADPOOR, E.; HE, Y.; BHANDARI, B. Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. **Drying Technology**, v. 26, p. 816–835, 2008.

JAMIESON, D. J. Oxidative stress responses of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 14, v. 16, p. 1511-1527, 1998.

JAYAPRAKASAM, B.; VAREED, S. K.; OLSON, L. K.; NAIR, M. G. Insulin secretion by bioactive anthocyanins and anthocyanidins present in fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 1, p. 28-31, 2005.

JAYASUNDERA, M.; ADHIKARI, B.; ALDRED, P.; GHANDI, A. Surface modification of spray dried food and emulsion powders with surface-active proteins: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 93, p. 266-277, 2009.

JELLEN, P. Whey processing, utilization and products. In: ROGINSKI, H.; FUQUAY, J. W.; FOX, P.F. (Ed). **Encyclopedia of Dairy Sciences**. London, UK: Academic Press, 2003. cap. p. 2739–2745.2003.

JENNINGS, A., WELCH, A. A.; FAIRWEATHER-TAIT, S. J.; KAV, C.; MINIHANE, A. M.; CHOWIENCZYK, P.; JIANG, B.; CECELJA, M.; SPECTOR, T.; MACGREGOR, A.; CASSIDY, A. Higher anthocyanin intake is associated with lower arterial stiffness and central blood pressure in women. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 96, p. 781–788, 2012.

JIA, Y.; Hoang, M. H.; Jun, H. J.; Lee, J. H.; Lee, S. J. Cyanidin, a natural flavonoid, is an agonistic ligand for liver X receptor alpha and beta and reduces cellular lipid accumulation in macrophages and hepatocytes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 23, p. 4185–4190, 2013.

KÄHKÖNEN, M. P.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n. 3, p. 628-633, 2003.

KAISU, R.; JAAKOLA, L.; KÄRENLAMPI, S.; HOHTOLA, A. Organ-specific distribution of phenolic compounds in bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and 'northblue' blueberry (*Vaccinium corymbosum* x *V. Angustifolium*). **Food Chemistry**, Barking, v. 110, n. 1, p. 156-160, 2008.

KALT, W.; FORNEY, C. F.; MARTIN, A.; PRIOR, R. L. Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 11, p. 4638-4644, 1999.

KARADAG, A.; OZCELIK, B.; SANER, S. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. **Food Analytical Methods**, v. 2, n. 1, p. 41-60, 2009.

KAUSHIK, V.; ROOS, Y. H. Limonene encapsulation in freeze-drying of gum arabic–sucrose–gelatin systems. **LWT**, v. 40, p. 1381-1391, 2007.

KHA, T.C.; NGUYEN, M. H.; ROACH, P. D. Effects of spray drying conditions on the physicochemical and antioxidant properties of the gac (*Momordica cochinchinensis*) fruit aril powder. **Journal of Food Engineering**, v. 98, n. 3, p. 385-392, 2010.

KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 50, n. 2, p. 213-218, 1999.

KONCZAK, I.; ZHANG, W. Anthocyanins: more than nature's colours. **Hindawi Publishing Corporation**, 2004.

KONG, J. M.; CHIA, L. S.; GOH, N. K.; CHIA, T. F.; BROUILLARD, F. Analysis and biological activities of anthocyanins. Review. **Phytochemistry**, v. 64, p. 923–933, 2003.

KONTOPIDIS, G.; HOLT, C.; SAWYER, L. The ligand-binding site of Bovine [beta]-lactoglobulin: evidence for a Function? **Journal of Molecular Biology**. London, v. 318, n. 4, p. 1043-1055, 2002.

KRISHNAN, S.; KSHIRSAGAR, A. C.; SINGHAL, R. S. The use of gum arabic and modified starch in the microencapsulation of a food flavoring agent. **Carbohydrate Polymers**, v.62, p.309–315, 2005.

LABMAQ DO BRASIL LTDA. (2003) **Manual de Operações do Mini-Spray dryer MSD 0.5**. Departamento de Engenharia (engenharia@labmaqdo brasil.com.br).

LIMA, N.; MOTA, M. **Biotecnologia: Fundamentos e aplicações**. LIDEL-Edições Técnicas Lda, Lisboa. 2003.

LOPES, T. J.; XAVIER, M. F.; QUADRI, M. G. N.; QUADRI, M. B. Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. **Revista Brasileira de Agrociências**. Pelotas, v.13, n.3, p.291-2977, 2007.

LÓPEZ, O. P.; JIMÉNEZ, A. R.; VARGAS, F.D. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains – characteristics, biosynthesis, processing, and stability. **Critical Reviews Food Science Nutrition**, v.40, n.3, p.173-289, 2000.

LUSHCHAK, V. I.; GOSPODARYOV, D. V. Catalases protect cellular proteins from oxidative modification in *Saccharomyces cerevisiae*. **Cell Biology Internacional**, v. 29, n. 30, p. 187-92, 2005.

LUZ, H. K. M.; WANDERLEY, L. S.; Faustino, L. R.; Silva, C. M. G.; Figueiredo, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Papel de agentes antioxidantes na criopreservação de células germinativas e embriões. **Acta Scientia e Veterinariae**, v. 39, n. 2, p. 956, 2011.

MACHEIX, J. J.; FLEURIT, A.; BILLOT, J. **Fruit Phenolics**. Boca Raton: CRC Press, 1990.

MADENE, A.; JACQUOT, M.; SCHER, J.; DESOBRY, S. Flavour encapsulation and controlled release – a review. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 41, p. 1–21, 2006.

MAGALHÃES, D. R.; LOPES, M. A.; ROSA, C. M. B. M.; BRUHN, F. R. P.; BORGES, J. C.; CUNHA, C. F. Fatores socioeconômicos que influenciam na disposição de consumidores em adquirir carne bovina com certificação de origem em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.83, 2016.

MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade. **B. CEPPA**, Curitiba, v. 24, n. 1, p. 59-82, 2006.

MARRONI, N. P.; MARRONI, C. A. **Estresse Oxidativo e Antioxidante**. Porto Alegre: Editora Ulbra, p. 33-48, 2002.

MATA, M. E. R. M.; MEDEIROS, S.S.A.; DUARTE, M. E. E. Microencapsulamento do umbu em pó com diferentes formulações de maltodextrina: estudo do tamanho das partículas por microscopia eletrônica. **Revista Brasileira de Produção Agroindustrial**, Campina Grande, v. 7, n.1, p.59-70, 2005.

MATSUI, T.; EBUCHI, S.; KOBAYASHI, M.; FUKUI, K.; SUGITA, K.; TERAHARA, N.; MATSUMOTO, K. Anti-hyperglycemic effect of diacylated anthocyanin derived from *Ipomoea batatas* cultivar Ayamurasaki can be achieved through the  $\alpha$ -glucosidase inhibitory action. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 25, p. 7244-7248, 2002.

MAZZA, G.; MINIATI, E. **Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains**. CRC Press, London, 1993, 362 p.

MCNAMEE, B. F.; O'RIORDAN, E. D.; O'SULLIVAN, M. Emulsification and microencapsulation properties of gum Arabic. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.4551-4555, 1998.

MEISTER, A. Glutathione metabolism and its selective modification. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, p.17205-17208, 1998.

MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. A. G.; LEAL, F. L. L.; CAETANO, A.C. S.; NASCIMENTO, R. J. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 639-644, 2006.

MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 577-99, 2000.

MESTRY, A. P.; MUJUMDAR, A. S.; THORAT, B. N. Optimization of Spray Drying of an Innovative Functional Food: Fermented Mixed Juice of Carrot and Watermelon. **Journal of Drying Technology**, v. 29, n. 10, 2011.

MIGUEL, M. G. Anthocyanins: antioxidants and/or antiinflammatory activities. **Japs-Olson Reviews**, v. 1, p. 07-15, 2011.

MODLER, H.W. Milk processing. In: NAKAI, S.; MODLER, W. (Eds.). **Food proteins: processing applications**. Wiley-VCH, Inc., 2000. p.1-21.

MONTEIRO, J. M.; Albuquerque, U. P.; Araújo, E. L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006.

MORAES, J. O.; PERTUZZATI, P. B. Estudo do mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) no processamento de produtos alimentícios. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.27, p.18-22, 2007.

MORAZZONI, P.; BOMBARDELLI, E. *Vaccinium Myrtillus L.* **Reviews Fitoterapia**, Milan, v. 67, n. 1, p. 3,29, 1996.

MOSS, J.W.; RAMJI, D. P. Interferon-gamma: Promising therapeutic target in atherosclerosis. **World Journal of Experimental Medicine**, v. 5, n. 3, p. 154-159, 2015.

MOURA, C. **Potencial antioxidante de extratos hidroalcoólicos de mirtilo, polpa de açaí e goji berry: efeito na estabilidade oxidativa e sensorial em queijo petit suisse**. 109f. 2016. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco/PR, 2016.

MURPHY, R. R.; RENFROE, M. H.; BREVARD, P. B.; LEE; R. E; GLOECKNER, J. W. Cooking does not decrease hydrophilic antioxidant capacity of wild blueberries **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 60, n. 2, p. 88-98, 2009.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 95-111, 2004.

NAKAISHI, H.; MATSUMOTO, H.; TOMINAGA, S.; HIRAYAMA, M. Effects of black currant anthocyanoside intake on dark adaptation and VDT work-induced transient refractive alteration in healthy humans. **Alternative Medicine Review**, v. 5, n. 6, p. 553-562, 2000.

NAVARRETE, S.; ALARCON, M.; PALOMO, I. Aqueous Extract of Tomato (*Solanum lycopersicum L.*) and Ferulic Acid Reduce the Expression of TNF-alpha and IL-1beta in LPS-Activated Macrophages. **Molecules**, v. 20, n. 8, p. 15319-15329, 2015.

NESTERENKO, A.; ALRIC, I.; SILVESTRE, F.; DURRIEU, V. Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 42, p. 469–479, 2013.

NICHENAMETLA, S. N.; TARUSCIO, T. G.; BARNEY, D.L.; EXON, J.H. A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.46, n.2, p.161-83, 2006.

NICORESCU, I.; LOISEL, C.; VIAL, C.; RIAUBLANC, A.; DJELVEH, G.; CUVELIER, G.; et al. Combined effect of dynamic heat treatment and ionic strength on the properties of whey protein foams - part II. **Food Research International**, Essex, v. 41, p. 980-988, 2008.

NIJDAM, J. J.; LANGRISH, T. A. G. The effect of surface composition on the functional properties of milk powders. **Journal of Food Engineering**, v. 77, n. 4, p. 919-925, 2005.  
NIKI, E. Antioxidant activity: are we measuring it correctly? **Nutrition**, v. 18, n. 6, p. 524-525, 2002.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.1, Botucatu, 2015.

OLIVEIRA, G. R.; VIEIRA, L. M.; DE BARCELLOS, M. D.; HOPPE, A. Relações interorganizacionais no desenvolvimento de produtos inovadores: o caso dos alimentos funcionais. **Análise**, Porto Alegre-RS, v. 23, n. 3, p. 284-292, 2012.

OLIVEIRA, T. P. Mirtilo: caracterização e aplicação da polpa e da fruta em pó em frozen yogurt funcional linha clean label. 2014. 44 f. **Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Alimentos)**, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2014.

OLIVEIRA, T. P.; PANTE, G. C.; TOSONI, N. F.; SEREIA, M. J.; JÚNIOR, B. D. Caracterização e aplicação da polpa de mirtilo (*Vaccinium sp.*) in natura e em pó em frozen yogurt. **Brazilian Journal of Food Research**, v. 6, n. 3, p. 23-31, 2015.

ONWULATA, C.; SMITH, W.; CRAIG, J. C.; JR.; HOLSINGER, V. H. Physical properties of encapsulated spray-dried milk fat. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 59, p. 316–320, 1994.

OPREA, E.; RUTA, L. L.; NICOLAU, I.; POPA, C. V.; NEAGOE, A. D.; FARCASANU, I. C. *Vaccinium corymbosum* L. (blueberry) extracts exhibit protective action against cádmium toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Food Chemistry**, v. 152, p. 516-521, 2014.

OSORIO, C.; ACEVEDO, B.; HILLEBRAND, S.; CARRIAZO, J.; WINTERHALTER, P.; MORALES, A. L. A. Microencapsulation by spray-drying of anthocyanin pigments from corozo (*Bactris guineensis*) fruit. **Journal of agricultural and food chemistry**. v. 58, n 11, p. 6977–6985, 2010.

OSORIO, C.; FORERO, D. P.; CARRIAZO, J. G. Characterisation and performance assessment of guava (*Psidium guajava* L.) microencapsulates obtained by spray-drying. **Food Research Internacional**, n. 44, 2011.

OSZMIANSKI, J.; WOJDYLO, A.; LAMER-ZARAWSKA, E.; SWIADER, K. Antioxidant tannins from Rosaceae plant roots. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 579-83, 2007.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; MERTENS-TALCOTT, S.; TALCOTT, S. T. Chemical composition, antioxidant properties, and thermal stability of a phytochemical enriched oil from açai (*Euterpe oleracea* Mart.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, n.12, p.4631-4636, 2008.

PAGANI, M. M. **Obtenção de suco de acerola (*Malpighia emarginata d.c.*) concentrado e pós estáveis através da integração dos processos de separação por membranas e microencapsulação por atomização**. 2010. 183f. Tese de doutorado (Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

PANTE, G. C. Desenvolvimento, encapsulação e caracterização da polpa integral de amora-preta (*Rubus* sp.) aplicada em frozen yogurt. 52 f. 2014. **Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Alimentos)** Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão. 2014.

PARANÁ, R. Mecanismos de hepatotoxicidade medicamentosa: o exemplo do acetaminofeno/paracetamol. **Revista Suplemento Hepatotoxicidade**, v.30, p. 10-13, 2011.

PASCUAL-TERESA, S.; 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. 1679-703, 2010.

PAZ, M.; GÚLLON, P.; BARROSO, F. M.; CARVALHO, A. P.; DOMINGUES, V. P.; GOMES, A. M.; BECKER, H.; LONGHINOTTI, E.; DELERUE-MATOS, C. Brazilian fruit



pulps as functional foods and additives: Evaluation of bioactive compounds. **Food Chemistry**, v. 172, p. 462–468, 2015.

PELEG, H.; BODINE, K. K.; NOBLE, A. C. The influence of acid on adstringency of alum and phenolic compounds. **Chemical Senses Journal**, v. 23, n. 3, p. 371-378, 1998.

PÉREZ, A. C. Estimation of the activation energy of carbohydrate polymers blends as selection criteria for their use as wall material for spray-dried microcapsules. **Carbohydrate polymers**, v.53, n.2, p.197-203, 2003.

PERMYAKOV, E. A; BERLINER, L. J.  $\alpha$ -lactalbumin: structure and function. **FEBS lett**, v. 473, p. 269–274, 2000.

PERTUZATTI, P. B. **Compostos bioativos em diferentes cultivares de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade)**. 2009. 86f. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS, 2009.

PERTUZATTI, P. B.; JACQUES, A. C.; ZAMBIASI, R. C. **Relação de fitoquímicos na casca e polpa de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade)**. 2007. Congresso de Iniciação Científica, Faculdade de Agronomia Elizeu Maciel, Pelotas, 2007.

PERTUZATTI, P.B.; BARCIA, M.T.; RODRIGUES, D.; DA CRUZ, P.N.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I.; SMITH, R.; GODOY, H.T. Antioxidant activity of hydrophilic and lipophilic extracts of Brazilian blueberries. **Food Chemistry**, v. 164, p. 81-88, 2014.

PERVIN, M.; HASNAT, M. A.; LIM, J. H.; LEE, Y. M.; KIM, E. O.; UM, B. H.; LIM, B. O. Preventive and therapeutic effects of blueberry (*Vaccinium corymbosum*) extract against DSS-induced ulcerative colitis by regulation of antioxidant and inflammatory mediators. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 28, p. 103-113, 2016.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Productes**, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.

PIMENTEL, C. V. M. B.; FRANCKI, V. M.; GOLLÜCKE, A. P. B. **Alimentos funcionais: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos**. São Paulo: Varela, 2005.

PONTES, L. V. **Avaliação sensorial e instrumental da cor de misturas em pó para refresco, bebida isotônica e gelatina utilizando corantes naturais**. 2003, 97f. Tese de doutorado (Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG, 2004.

PORTER, L. G. Tannins. In: Harborne J. B, editor. **Methods in plant biochemistry**: volume 1 Plant phenolics. London: Academic Press, p. 389-419, 1989.

PRIOR, R. L.; CAO, G.; MARTIN, A.; SOFIC, E.; McEWEN, J.; O'BRIEN, C.; LISCHENER, N.; MARK, E.; KALT, W.; KREWER, G.; MAINLAND, C. M. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity and variety of *Vaccinium* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 2686-2693, 1998.

RAMAKRISHNAN, A.; PANDIT, N.; BADGUJAR, M.; BHASKAR, C.; RAO, M. Encapsulation of endoglucanase using a biopolymer Gum Arabic for its controlled release. **Bioresource Technology**, v.98, p.368-372, 2007.

RASCÓN, M. P.; BERISTAIN, C. I.; GARCÍA, H. S.; SALGADO, M. A. Carotenoid retention and storage stability of spray-dried encapsulated paprika oleoresin using gum Arabic and Soy protein isolate as wall materials. **Food Science and Technology**, v.44, p.549-557, 2011.

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

REQUE, P. M.; STEFFENS, R. S.; JABLONSKI, A.; FLÔRES, S. H.; DE RIOS, A. O.; DE JONG, E.V. Cold storage of blueberry (*Vaccinium* spp.) fruits and juice: anthocyanin stability and antioxidant activity. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 33, p. 111-116, 2014.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de alimentos**. 1.ed. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2004. 184p.

RIBEIRO, S. M. R.; BARBOSA, L. C. A.; QUEIROZ, J. H.; KNODLER, M.; SCHIEBER, A. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. **Food Chemistry**, v. 110, p. 620-626, 2008.

RIBÉREAU-GAYON, P. **Les composés phénoliques des végétaux**. Paris: Dunod, 1968.

RICHARDSON, P. M. The taxonomic significance of C-glycosylxanthones in flowering plants. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 11, p. 371-375, 1983.

RIIHINEN, K.; JAAKOLA, L.; KÄRENLAMP, S.; HOHTOLA, A. Organ-specific distribution of phenolic compounds in bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and 'northblue' blueberry (*Vaccinium corymbosum* x *V. angustifolium*). **Food Chemistry**, v.110, p.156-160, 2008.

RISTOW, M.; SCHMEISSER, S. Extending life span by increasing oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 51, n. 2, p. 327-336, 2011.

ROCHA, F. I. G. **Avaliação da cor e da atividade antioxidante da polpa e extratos de mirtilo (*Vaccinium Myrtillus*) em pó**. 2009. 105f. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG, 2009.

RODARTE CASTREJÓN, A. D.; EICHHOLZ, I.; ROHN, S.; KROH, L.W.; HUYSKENS-KEIL, S. Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during fruit maturation and ripening. **Food Chemistry**, v. 109, p. 567-572, 2008.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado Antioxidant activity of cerrado fruits. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 53-60, 2007.

ROVER JÚNIOR, L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; AND KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, p. 112-119, 2001.

SALMINEN, L. E.; PAUL, R. H. Oxidative stress and genetic markers of suboptimal antioxidant defense in the aging brain: a theoretical review. **Reviews in the neurosciences**, v. 25, n. 6, p. 805-819, 2014.

SAMPAIO, R. C.; MORAES, C. Estresse oxidativo e envelhecimento: papel do exercício físico. **Motriz**, v. 16, n. 2, p. 506- 515, 2010.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. **Food Science and Technology International**, v. 8, n. 3, 2002.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, n. 2, p. 270-276, 1998.

SEERAM, N. P.; AVIRAM, M.; ZHANG, Y.; HENNING, S. M.; FENG, L.; DREHER, M.; HEBER, D. Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-Rich Beverages in the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, n.4, p.1415-22, 2008.

SEGUENKA, B. **Produção de concentrado proteico e lactose de soro de leite por processos de separação por membranas**. 2016. 86f. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-graduação em ciência e tecnologia de alimentos), Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo/RS, 2016.

SEVERO, J.; GALARÇA, S. P.; AIRES, R. F.; CANTILLANO, R. F. F.; ROMBALDI, C. V.; SILVA, J. A. Avaliação de compostos fenólicos, antocianinas, vitamina C e capacidade antioxidante em mirtilo armazenado em atmosfera controlada. **Brazilian Journal of Food Technology**, 2009.

SGARBIERI, V.C. Review: Structural and Physicochemical Properties of Milk Proteins. **Brazilian Journal of Food Technologies**, Campinas, v. 8, p. 43-56, 2005.

SHAHIDI, F.; HAN, X. Q. Encapsulation of food ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, London, v. 33, n. 6, p. 501-547, 1993.

SIGLER, K.; CHALOUPEK, J.; BROZMANOVA, J.; STADLER, N.; HOFER, M. Oxidative stress in microorganisms - I - Microbial vs. higher cells - Damage and defenses in relation to cell aging and death. **Folia Microbiologica**, v. 44, n. 6, p. 587-624, 1999.

SILVEIRA, N. G. A.; VARGAS, P. N.; ROSA, C. S. Teor de polifenóis e composição química do mirtilo do grupo Highbush. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 18, n. 4, p. 365-370, 2007.

SKREDE, G.; WROLSTEAD, R. E. Flavonoids from berries and grapes. In: **Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects**. CRC Press, v.2, p. 71-33, 2002.

SLATNAR, A.; JAKOPIC, J.; STAMPAR, F.; VEBERIC, R.; JAMNIK, P. The Effect of Bioactive Compounds on *In Vitro* and *In Vivo* Antioxidant Activity of Different Berry Juices. **Plos One**, v. 7, n. 10, 2012.

SOARES, D. G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. Sequestering ability of butylated hydroxytoluene, propyl gallate, resveratrol, and vitamins C and E against ABTS, DPPH, and hydroxyl free radicals in chemical and biological systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n. 4, p.1077-1080, 2003.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Nutrition Reviews**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SONG, Y.; HUANG, L.; YU, J. Effects of blueberry anthocyanins on retinal oxidative stress and inflammation in diabetes through NRF2/HO-1 signaling. **Journal of Neuroimmunology**, v. 15, n. 301, p. 1-6, 2016.

SOUSA, M. B. Mirtilo: qualidade pós colheita. **Divulgação Agro**, v. 556, n. 8, P. 1-33, 2007.

SOUZA, V. R.; PEREIRA, P. A. P.; SILVA, T. L. T.; LIMA, L. C. O.; PIO, R.; QUEIROZ, F. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. **Food Chemistry**, v. 156, p. 362-368, 2014.

SPECIALE, A.; CIMINO, F.; SAIJA, A.; CANALI, R.; VIRGILI, F. Bioavailability and molecular activities of anthocyanins as modulators of endothelial function. **Genes & Nutrition**, v.9, n. 404, 2014.

SUN, J.; CHU, Y. F.; WU, X.; LIU, R. H. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 25, p. 7449-7454, 2002.

SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica* i.- The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of Science and Food Agriculture**. Washington, v. 10, p. 63-68, 1959.

TAN, S. P.; KHA, T. C.; PARKS, S.; STATHOPOULOS, C.; ROACH, P.D. Optimising the Encapsulation of an Aqueous Bitter Melon Extract by Spray-Drying. **Foods**, v. 4, n. 3, p. 400-419, 2015.

TATAR TURAN, F.; CENGIZ, A. A.; SANDIKÇI, A. D.; DERVISOGLUA, M.; KAHYAOGlua, T. Influence of an ultrasonic nozzle in spray-drying and storage on the properties of blueberry powder and microcapsules. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 12, p. 4062-4076, 2016.

TEIXEIRA, L. N.; STRINGHETA, P. C.; OLIVEIRA, F. A. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. **Revista Ceres**, v. 55, n. 4, p. 297-304, 2008.

TONON, R.V.; BRABET, C.; HUBINGER, M. D. Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleraceae* mart.) powder produced by spray drying. **Journal of Food Engineering**, v. 88, p. 411-418, 2008.

TONON, R.V.; BRABET, C.; HUBINGER, M. D. Influência da temperatura do ar de secagem e da concentração de agente carreador sobre as propriedades físico-químicas do suco de açai em pó. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 444-450, 2009.

TOSONI, N. F. **Encapsulação e caracterização do extrato aquoso de framboesa (*rubus idaeus*) para aplicação como corante**. 35f. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Alimentos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão/RS. 2015.

TSUDA, T. Dietary anthocyanin-rich plants: biochemical basis and recent progress in health benefits studies. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 56, p. 159–170, 2012.

URSINI, F., AND MAIORINO, M. **Glutathione Peroxidases**. In "Encyclopedia of Biological Chemistry" (W. J. Lennarz and M. D. Lane, eds.). Academic Press, Waltham, p. 399-404, 2013.

USDA - Departamento of Agriculture Nacional Nutrient Database Standart Reference. **Nutrient Content Charts for frozen and canned blueberries**. 2011. Disponível em: <[https://www.nass.usda.gov/Publications/Ag\\_Statistics/2011/](https://www.nass.usda.gov/Publications/Ag_Statistics/2011/)>. Acesso em: 20 abr 2016.

VALDUGA, E.; LIMA, L.; PRADO, R.; PADILHA, F. F.; TREICHEL, H. Extração, secagem por atomização e microencapsulamento de antocianinas do bagaço da uva isabel (*Vitis labrusca*). **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 5, p. 1568-1574, 2008.

VAN DER HORST, H. C, (2000), 'Membrane processing', in Tamime A Y and Law B A, Mechanisation and Automation in Dairy Technology, **Sheffield Academic Press**, Sheffield, UK.

VARGAS, P. N.; HOELZEL, S. C.; ROSA, C. S. Determinação do teor de polifenóis totais e atividade antioxidante em sucos de uva comerciais. **Araraquara**, v. 19, n. 1, p. 11-15, 2008.

VIDAL, A. M.; DIAS, D. O.; MARTINS, E. S.; OLIVEIRA, R. S.; NASCIMENTO, R. M.; CORREIA, M. G. S. A ingestão de alimentos funcionais e sua contribuição para a diminuição da incidência de doenças. **Cadernos de Graduação - Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 1, n.15, p. 43-52, 2012.

WANASUNDARA, U.; AMAROWICZ, R.; SHAHIDI, F. Isolation and identification of an antioxidative component in canola. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 6, p. 1285-1290, 1994.

WANG, L. J.; WU, J.; WANG, H. X.; LI, S. S.; ZHENG, X. C.; DU, H.; XU, Y. J.; WANG, L. S. Composition of phenolic compounds and antioxidant activity in the leaves of blueberry cultivars. **Journal of Functional Foods**, v. 16, p. 295–304, 2015.

WANG, S.; LANGRISH, T. A review of process simulations and the use of additives in spray drying. **Food Research International**, v. 42, p. 13-25, 2009.

WANG, S.Y.; ZHENG, W. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 2, p.873-878, 2003.

WU, T.; TANG, Q.; GAO, Z.; YU, Z.; SONG, H.; ZHENG, X.; CHEN, W. Blueberry and mulberry juice prevent obesity development in C57BL/6 mice. **Plos One**, v. 8, 2013.

XAVIER, M.F. **Estudo da extração de antocianinas em colunas recheadas**. Florianópolis, 2004, 120f. Dissertação de mestrado (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC, 2004.

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, v. 75, n. 1, 1995.

ZADERNOWSKI, R.; NACZK, M.; NESTEROWICZ, J. Phenolic acid profiles in some small berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 2118-2124, 2005.

ZADERNOWSKI, R.; NACZK, M.; NESTEROWICZ, J. Phenolic acid profiles in some small berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, p. 2118-2124, 2005.

ZAKRAJSEK, T.; RASPOR, P.; JAMNIK, P. *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase as a model organism - characterization at cellular and proteome level. **Journal Proteomics**, v. 74, p. 2837–2845, 2011.

ZEN, F. G. **Estudo da secagem convectiva do bagaço do mirtilo visando minimizar a perda de compostos antociânicos**. Trabalho de conclusão de curso (Faculdade de engenharia química), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 2010.

ZHANG, Y.; VAREED, S. K.; NAIR, M. G. Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables. **Life Sciences**, v. 76, n. 13, p. 1465-1472, 2005.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, n. 555-559, 1999.



## APÊNDICE A – Artigo científico

### **Comportamento funcional de extrato encapsulado de mirtilo (*Vaccinium* sp.) em células de *Saccharomyces cerevisiae* e sua estabilidade durante a vida de prateleira**

Ana Paula Bianchi<sup>a</sup>, Vera Maria Rodrigues<sup>b</sup>

<sup>a</sup> BIANCHI, AP. Endereço de e-mail: anapaula.bianchi@hotmail.com. Fundação Universidade de Passo Fundo - UPF, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos - PPGCTA. UPF Campus I, BR 285, Km 292,7 - Bairro São José, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil. CEP: 99.052-900.

<sup>b</sup> RODRIGUES, VM. Endereço de e-mail: veramro@upf.br. Fundação Universidade de Passo Fundo - UPF, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos - PPGCTA. UPF Campus I, BR 285, Km 292,7 - Bairro São José, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil. CEP: 99.052-900.

#### **Resumo**

Uma nova tendência alimentar e de cuidados com saúde vem sendo evidenciada hoje em dia, isso devido a um aumento nos casos de doenças crônicas e problemas relacionados à má alimentação, observados nas últimas décadas. O consumidor busca por uma alimentação que, além de ter praticidade de consumo, possa proporcionar benefícios à saúde e prevenção de doenças. A indústria de alimentos, atenta a este novo e crescente segmento de mercado tem investido na busca de substâncias que contenham compostos bioativos, com interesse para o desenvolvimento de alimentos funcionais. O mirtilo (*Vaccinium* spp.) é uma fruta que está ganhando destaque neste segmento da indústria, ocasionado pelo reconhecimento das suas propriedades terapêuticas. Estas se devem, sobretudo, pela presença de compostos fenólicos, os quais desempenham atividade antioxidante capaz de contribuir para a prevenção de doenças. Por ser uma fruta de pequena produção e de curta vida útil, torna-se necessário a aplicação de tecnologias de processamento. A técnica de secagem por atomização associada a encapsulação tem por finalidade fornecer a proteção das substâncias de interesse, pois evita o contato direto delas com a luz e o calor, já que estão protegidas, envoltas pelo encapsulante. Isto tem possibilitado uma maior oferta de alimentos com potencial funcional e com maior vida de prateleira, ao mesmo tempo em que agrega maior valor comercial aos produtos desenvolvidos. O domínio das técnicas de processamento para o mirtilo, e o conhecimento da manutenção das propriedades funcionais de produtos elaborados é de suma importância para a indústria que deseja se destacar no ramo de alimentos funcionais. Este trabalho visou o estudo das propriedades morfológicas, sensoriais e funcionais de um extrato encapsulado de mirtilo, assim como a manutenção de suas propriedades funcionais durante a vida de prateleira. Por meio das análises realizadas obtivemos um extrato com cor semelhante ao da fruta, o qual pode ser utilizado também como corante natural; obtivemos através da análise de morfologia externa das microcápsulas por (MEV), partículas esféricas, sem poros e rachaduras; quando verificamos o poder antioxidante do nosso extrato em células de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*

estressadas com íons de ferro, obtivemos redução da peroxidação lipídica pelo método TBARS e aumento da atividade enzimática da glutathione. Nosso extrato, quando armazenado por 10 meses à 4°C, mostrou diminuição significativa da atividade antioxidante e do teor de fenóis e flavonoides totais já no 5º mês de armazenamento, contudo, não observamos diferenças estatísticas do 5º até o 10º mês. Nosso estudo comprovou que o extrato de mirtilo encapsulado com goma arábica desempenha função protetora da saúde e pode ser um ingrediente promissor no desenvolvimento de produtos alimentícios com fins terapêuticos. Contudo, as indústrias de interesse devem assegurar a conservação deste extrato sob baixas temperaturas para evitar a degradação dos compostos bioativos e garantir assim, maior vida de prateleira ao produto.

Palavras-chave: Frutas vermelhas. Microencapsulação. Nutracêuticos.

## **Introdução**

Observamos nas últimas décadas o aumento de doenças crônicas não transmissíveis, ocasionadas não somente pelo envelhecimento populacional, mas também pelas mudanças no estilo de vida, como a maneira de se alimentar e sedentarismo. Diante disso, uma nova tendência alimentar e de cuidados com saúde vem sendo evidenciada nos dias de hoje. O consumidor busca por uma alimentação que, além de ter praticidade de consumo, possa proporcionar benefícios à saúde e prevenção de doenças.

A indústria de alimentos, atenta a este novo e crescente segmento de mercado, tem investido na busca de substâncias que contenham compostos bioativos, com interesse para o desenvolvimento de alimentos funcionais. Produtos enriquecidos de frutas que desempenham atividade antioxidante, por exemplo, podem incrementar o mercado e garantir boas perspectivas financeiras à indústria.

O mirtilo (*Vaccinium* spp. ou *blueberry* em inglês) é uma fruta que tem se destacado no mercado mundial pelo reconhecimento da sua composição, rica em compostos fenólicos como as antocianinas. Estes pigmentos, além de conferirem a cor arroxeada-escura à fruta, são responsáveis pela atividade antioxidante, associada a neutralização de radicais livres.

Por ser uma fruta muito sensível, com uma curta vida útil, torna-se viável a aplicação de processos tecnológicos que visem prolongar a validade deste produto, na forma *in natura* ou mesmo, no desenvolvimento de novos produtos a fim de aproveitar os seus benefícios para atender à exigência do mercado consumidor.

No entanto, ao submeter o mirtilo ao processamento industrial, pode-se haver perdas nutricionais e de compostos bioativos frente às condições de processo (luz, temperatura, oxigênio, etc.).

Uma técnica que vem sendo bastante utilizada neste segmento, com o intuito de preservar a funcionalidade de alimentos com propriedades bioativas, é a encapsulação seguida da secagem por atomização. Esta técnica evita o contato direto das substâncias de interesse com a luz e o calor, já que estão protegidas, envoltas pelo encapsulante. Manter a funcionalidade da fruta, mesmo com a aplicação desses processos é o grande desafio para a indústria de alimentos que deseja se destacar no ramo de alimentos funcionais.

Buscando o aperfeiçoamento da indústria de alimentos que se propõe a desenvolver produtos com atributos funcionais ou terapêuticos, este trabalho visou a elaboração de um

extrato encapsulado de mirtilo e o estudo de suas propriedades morfológicas, sensoriais e funcionais em células de *Saccharomyces cerevisiae*, bem como avaliar a manutenção das propriedades funcionais durante a vida de prateleira.

## **Materiais e métodos**

Os frutos de mirtilo utilizados nesta pesquisa foram adquiridos de um produtor residente no município de Erechim-RS. Os mesmos eram da espécie *Vaccinium ashei*, grupo *Rabbiteye* e variedade “*Climax*”, colhidos no mês de janeiro de 2016.

### *Elaboração do extrato encapsulado de mirtilo*

Inicialmente preparou-se um extrato bruto (EB) pesando-se 100 g de mirtilo previamente descongelados, os quais foram submersos em 100 mL de uma solução etanólica 70% para a extração dos compostos bioativos. Esta mistura foi acondicionada em béquer envolto com papel alumínio para evitar a fotodegradação. O pH da mistura foi ajustado para 4,0 com ácido cítrico (1 mol/L) e a mistura foi deixada em repouso por 12 h sob refrigeração (4°C) ao abrigo da luz. Decorridas as 12 horas a mistura foi então triturada em liquidificador (marca Poli, modelo TR-02), durante 5 min. para a completa dissolução dos frutos e então, deixada em repouso por mais 12 h. Após este período a amostra foi filtrada em tecido de *nylon* seguido de papel filtro, o grau Brix foi aferido com o auxílio de um aparelho refratômetro digital (marca Atago, modelo PAL-1) e, então, o pH foi corrigido para 5,5 com hidróxido de sódio 1 M.

### *Preparo do material encapsulante*

Seguiu-se a metodologia descrita por Valduga et al. (2008). A Goma Arábica (GA) utilizada era de marca comercial (Audaz Brasil), adquirida no comércio local e continha teor mínimo de pureza de 99,5%. Dissolveu-se 90g de GA em 300mL de água deionizada e homogeneizou-se com o auxílio de um agitador magnético por 10 min. a uma temperatura de 30°C para a total solubilização. Então acrescentou-se 100 mL de EB, representando 400 mL de líquido a serem secos. A proporção da concentração final de EB e material encapsulante foi de 1:4.

### *Encapsulação em spray dryer*

A mistura contendo EB e material encapsulante foi então, colocadas no *spray dryer* (marca Labmaq, modelo MDS 1.0). O ar na câmara de secagem operou na temperatura de entrada em 120°C, vazão de ar em torno de 4 m<sup>3</sup>/min, e vazão de alimentação de 0,4 m<sup>3</sup>/min L. O bico atomizador utilizado foi o de número 2, possuindo micragem de 1,0 µm.

Durante o período de sucção pela bomba do aparelho, manteve-se a homogeneização constante por agitador magnético da amostra líquida. Tomou-se o cuidado de não expor as misturas e os extratos em pó à luz, para evitar fotodegradação.

Ao final do processo de secagem, obteve-se então, o extrato de mirtilo encapsulado com goma arábica (E1)

#### *Morfologia externa das microcápsulas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)*

Para o preparo da amostra inicialmente realizou-se uma metalização com ouro na qual se utilizou um aparelho metalizador (marca Quoron, modelo Q150R ES). O mesmo operou com corrente de 50 mA durante 100 seg., obtendo-se uma camada de ouro com espessura de 5 nm. O extrato (E1) foi então submetido a fotomicrografia eletrônicas em um microscópio eletrônico de varredura de bancada (marca Tescan, modelo Veja 3), utilizando uma aceleração de voltagem de 20 kV. Através disso, foi possível visualizar a morfologia da amostra e obter os diâmetros das cápsulas.

#### *Estudo in vivo com o modelo *Saccharomyces cerevisiae**

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi obtida da Euroscarf, Frankfurt, Alemanha. A linhagem utilizada nos experimentos foi a Cepa BY 4741, genótipo MAT A; his 3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0.

Como meio de cultivo utilizou-se o YPD 2% líquido (glicose, peptona e extrato de levedura). As culturas foram incubadas a 30°C, em agitador orbital ajustado para 90 rpm até a primeira fase exponencial de crescimento (0,3 mg de peso seco de células/mL).

O fator de conversão em peso seco foi calculado a partir da filtração de um volume adequado da suspensão de células em filtro Millipore (0,45  $\mu$ m), que, posteriormente, foi seco em estufa a 60 °C até atingir o peso constante e a construção de uma curva de calibração ( $y = 0,732x - 0,061$ ). Após o crescimento, as células de levedura foram centrifugadas e submetidas ao tratamento com sulfato ferroso (4,0 Mm) de acordo com Benetti (2013).

O extrato de mirtilo encapsulado com goma arábica (E1) foi então preparado para ser utilizado nos testes. Seguiu-se a metodologia de Oprea et al. (2014), com modificações, na qual dissolveu-se o pó do extrato de mirtilo em água a uma concentração de 10 mg/mL. Após este processo, realizou-se a filtração e esterilização da amostra que ocorreu em capela de fluxo laminar para a posterior utilização nos meios de cultivo com *Saccharomyces cerevisiae*. O processo foi realizado através do uso de filtros de seringa do tipo Minisart RC20 com membranas hidrofílicas de celulose de 0,2  $\mu$ m.

As células então, foram submetidas ao tratamento com o extrato de mirtilo encapsulado com goma arábica (E1), as quais foram incubados a 30°C em erlenmeyers de 50 mL, com agitação orbital à 90 rpm. Ao longo de 24 h de tratamento, em concentração de 0,8  $\mu$ L de proteínas por mL de solução, foram realizadas 2 lavagens com 5 mL de água destilada estéril e as células, centrifugadas por 5 min. a 1500 rpm para a obtenção da massa celular para as análises (BENETTI, 2013).

#### *Avaliação da peroxidação lipídica pelo método de ácido tiobarbitúrico (TBARS)*

A avaliação da lipoperoxidação foi realizada incubando-se a 100°C durante 15 minutos 250 µL de amostra, 250 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% e 500 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67%. O produto formado foi medido a 535 nm (OHKAWA, OHISHI, YAGI, 1979).

A curva de calibração foi obtida com soluções de malondialdeído 0,75 - 9 µmol/L ( $y = 0,1127x - 0,0258$ ) e a unidade expressa em µM MDA.

#### *Dosagem da atividade enzimática da glutathione*

Inicialmente foi pipetado uma quantidade equivalente a 2 mL da amostra em tubos de parede grossa e centrifugado a 2000 rpm por 10 min. Após foi retirado o sobrenadante e adicionado 1,3 mL de TCA 10% para reagir, sendo novamente centrifugado a 2000 rpm por 20 min, e então o sobrenadante foi retirado.

Ao sobrenadante foi adicionado 130 µL de DTNB e realizada a homogeneização. A leitura foi realizada em 412 nm, sendo que o cálculo final das amostras foi obtido a partir da construção de uma curva padrão com cisteína 0,5 mmol, TFK 0,05 mol, pH 6,8, DTNB 10 mmol e H<sub>2</sub>O ( $y = 0,005x + 0,1501$ ). O resultado final foi expresso em µM.

#### *Análise de cor*

A análise de cor foi realizada utilizando-se o aparelho espectrofotômetro (marca HunterLab®, modelo ColorQuest II Sphere), com sensor ótico geométrico de esfera. Foram obtidos valores de L\*, -a\*/+a\* e -b\*/+b\*.

Para avaliar a manutenção da cor do produto durante a vida de prateleira, repetiu-se a avaliação de cor após 5 meses de armazenamento a 4°C protegido da luz.

#### *Manutenção das propriedades funcionais durante a vida de prateleira*

Com o intuito de verificar a manutenção das propriedades funcionais durante a vida de prateleira do E1, os testes de atividade antioxidante, fenóis e flavonoides totais foram realizadas imediatamente após a sua produção e após o armazenamento por 5 e 10 meses à 4°C.

#### *Atividade antioxidante (AA) por DPPH*

O extrato foi preparado utilizando-se 0,5 g de pó dissolvidas em 100 mL de água. A avaliação da AA por meio da capacidade sequestrante de radicais 2,2-difenil-1 picrilhidrazil (DPPH) foi realizada de acordo com Brand-Williams et al. (1995) com algumas modificações.

Os resultados foram expressos em percentual de inibição (% de inibição) (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995; SÁNCHEZ-MORENO; LARRAURI; SAURA-CALIXTO, 1998; KARADAQ, et al., 2009; OLIVEIRA, 2015). Tal método de interpretação foi escolhido em função de que em extratos encapsulados a liberação de compostos bioativos e, portanto, atividade antioxidante, geralmente ocorre constantemente por um determinado

período de tempo, até atingir o seu pico máximo de liberação, para então haver o decréscimo dessa atividade. Os resultados do % de inibição foram interpretados da seguinte forma: >70% = eficiência em sequestrar o radical livre; 60-70% = ação antioxidante moderada; e <60% = fraca capacidade em sequestrar o radical DPPH (MELO, et al., 2006).

#### *Fenóis totais*

A quantificação de fenóis totais foi realizada por Folin-Ciocalteu, método que envolve a redução do reagente pelos compostos fenólicos da amostra com concomitante formação de um complexo azul cuja intensidade aumenta linearmente a 760 nm, conforme descrito por Roesler et al. (2007).

A quantificação foi realizada por meio de uma curva padrão preparada com ácido gálico e expressa como equivalente de ácido gálico (GAE). O extrato de mirtilo foi preparado utilizando a concentração de 10mg/mL, sendo filtrado em filtro de seringa 0,45µm. Para reação colorimétrica, uma alíquota de 0,5 mL do extrato foi adicionada 2,5 mL solução aquosa do reativo de Folin-Ciocalteu a 10% e 2,0 mL de carbonato de sódio 7,5%. A mistura foi incubada por 5 minutos em banho-maria a 50 °C e, posteriormente, a quantificação foi medida usando-se branco como referência.

#### *Flavonoides totais*

O teor de flavonoides totais foi determinado de acordo com o método proposto por Zhishen, Mengcheng e Jianming (1999), através de um ensaio colorimétrico que consiste na adição de cloreto de alumínio ( $AlCl_3$ ) e nitrito de sódio ( $NaNO_2$ ) à amostra. O intuito do teste é promover a formação do complexo flavonóide-alumínio (grupamento carbonila + ion  $Al^{+3}$ ) que, em meio alcalino, apresenta coloração rosa com leitura de absorbância em espectrofotômetro a 510 nm.

A amostra foi preparada a uma concentração de 10 mg/mL e o resultado, obtido por meio da curva padrão preparada com catequina e expressa como equivalentes de catequina.

#### *Análise estatística*

Os resultados obtidos neste estudo foram representados como a média e desvio padrão de pelo menos três triplicatas, e então avaliados por análise de variância ANOVA e teste de Tukey a 5% de significância ( $p < 0,05$ ), utilizando-se o programa SASM Agri.

## **Resultados**

#### *Obtenção do extrato em pó de mirtilo*

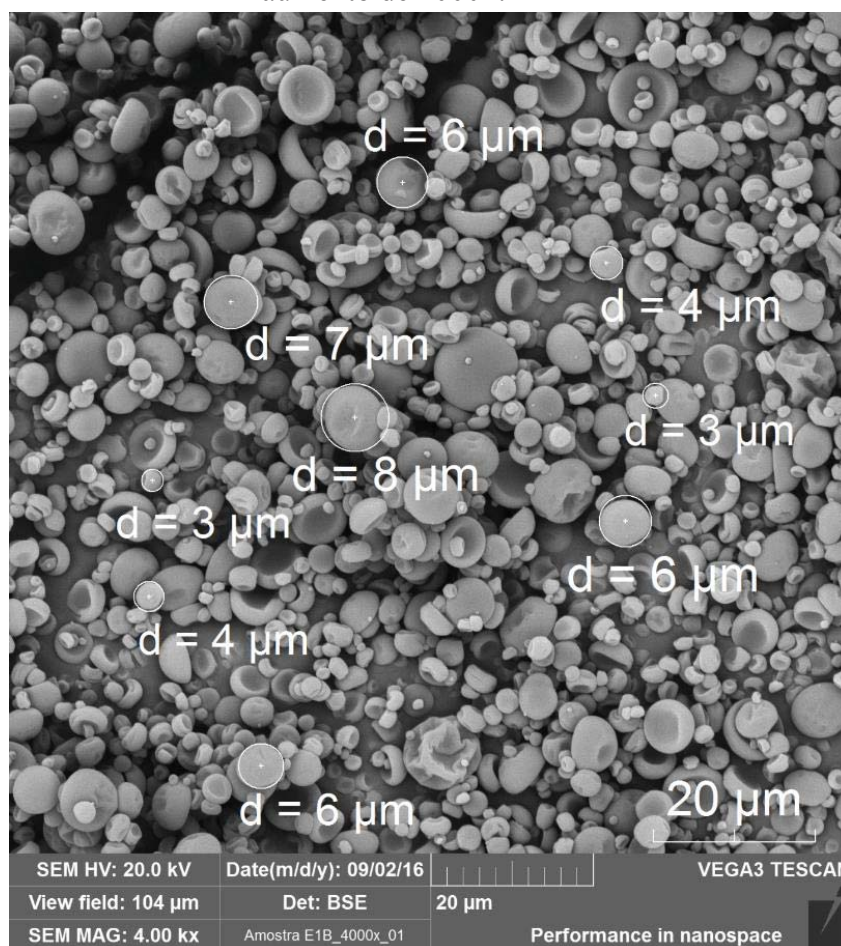
O extrato em pó de mirtilo encapsulado com goma arábica (E1) saiu da câmara de secagem numa temperatura de 86,5°C e o processo inteiro levou 1h e 30 minutos. Os 400 mL

de solução colocados para secar (20,3°Brix) renderam 60g de pó seco. O extrato foi imediatamente acondicionado em recipiente de polietileno de cor escura, armazenado sob refrigeração (4°C).

*Morfologia externa das microcápsulas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)*

Os aspectos microestruturais das partículas do extrato foram analisadas por MEV e observadas sob ampliação de 4000 vezes, por um campo de visão de 104µm e distância de trabalho (MD) de 15 mm, conforme é possível observar nas Figura 01.

Figura 01 - Fotomicrografia do extrato encapsulado de mirtilo obtida por MEV, aumento de 4000x.



A partir da imagem observam-se partículas esféricas de diferentes tamanhos, com um leve grau de aglomeração entre elas, uma característica bem conhecida de pós secos por atomização (KHA; NGUYEN; ROACH, 2010). De um modo geral, a maioria das microcápsulas apresentou tamanho na faixa de 3 a 8 µm. Foi possível observar também que o extrato se encontra livre de rachaduras e poros, o que é muito importante para evitar que o extrato de mirtilo seja exposto ao ambiente e degradado através da oxidação. Osorio; Forero;

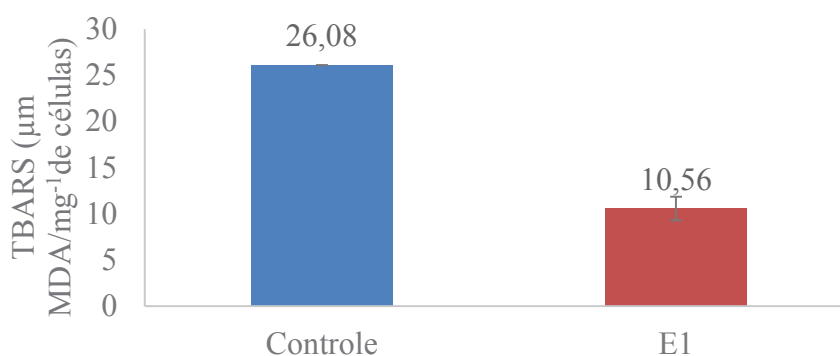
Carriazo (2011) citam que a obtenção de partículas esféricas na microencapsulação demonstra um sucesso no processo.

#### *Estudo in vivo com Saccharomyces cerevisiae*

#### *Peroxidação lipídica pelo método de TBARS*

Os resultados que estão apresentados na Figura 02 são relativos à peroxidação lipídica - TBARS frente à toxicidade de ferro em *Saccharomyces cerevisiae*. Verificamos que o tratamento com extrato encapsulado de mirtilo diminuiu significativamente os níveis de peroxidação lipídica nas cepas ( $10,56b \pm 1,27$ ), quando comparamos com as cepas não tratadas com o extrato de mirtilo ( $26,08a \pm 0,01$ ).

Figura 02 - Valores médios de peroxidação frente à toxicidade de ferro com e sem tratamento com extrato de mirtilo



Um dos principais mecanismos de lesão causada pelo estresse oxidativo como resultado da geração de radicais livres é a oxidação da camada lipídica da membrana celular, podendo levar a danos celulares (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; FRANÇA et al., 2013). Os nossos resultados relativos aos níveis de peroxidação lipídica nos revelam que o extrato de mirtilo encapsulado com goma arábica diminuiu de forma significativa os níveis de peróxidos nas células em estudo.

Salientamos que independentemente do extrato de mirtilo agir sobre a toxicidade de ferro, ele também mostra ação antioxidante nas cepas que não apresentam a expressão do ferro, efetivando seu poder protetor frente a peroxidação lipídica. Os estudos com antioxidantes têm evidenciado benefícios no uso de nutrientes isolados no tratamento e prevenção de doenças. Estes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células dificultando o ataque das espécies reativas sobre os lipídeos (BERTOLIN et al., 2009).

A levedura *Sacharomyces cerevisiae* é um modelo de organismo apropriado para processos celulares eucarióticos fundamentais, como a atividade antioxidante celular relacionada a compostos bioativos (CIGUT, et al. 2011; ZAKRAJSEK; RASPOR; JAMNIK; 2011). Nestes organismos os danos oxidativos de proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e outros componentes celulares, bem como sistemas de defesa contra o estresse oxidativo são



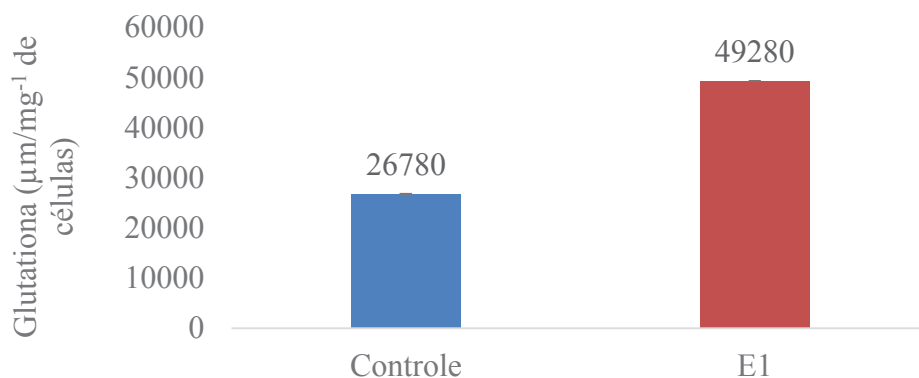
semelhantes ao organismo humano em quase todos os níveis de organização celular. Assim sendo, os microrganismos são modelos úteis para estudar vários aspectos do estresse oxidativo nos níveis bioquímico, biológico molecular e celular (SIGLER, et al. 1999; SLATNAR et al., 2012).

Partindo-se da ideia de que o organismo da *Saccharomyces cerevisiae* apresenta semelhança com o organismo humano em termos de oxidação e peroxidação lipídica, este resultado abre novos caminhos de oportunidades para o desenvolvimento de terapias preventivas ou de reversão contra os danos causados pela toxicidade celular de ferro a partir da utilização do extrato de mirtilo.

#### *Atividade enzimática da glutatona*

Os resultados da Figura 3 representam a dosagem da atividade da glutatona peroxidase (GPX) em *Saccharomyces cerevisiae* frente à toxicidade com ferro. O tratamento com extrato de mirtilo mostrou aumento significativo nos índices de GPX. 7

Figura 3 - Valores médios da dosagem da atividade enzimática da GPX por DTNB frente à toxicidade de ferro com e sem tratamento de extrato de mirtilo



Nossos achados através da quantificação da atividade da enzima GPX revelaram que o extrato de mirtilo foi capaz de modular os parâmetros enzimáticos aumentando significativamente os níveis de atividade da GPX frente à toxicidade por ferro. Outros estudos encontrados da literatura (GUO; KIM; LEE, 2017; SONG; HUANG; YU, 2016) apontam o aumento da atividade enzimática da GPX com o uso de extratos de mirtilo em testes *in vivo*.

As enzimas GPX, juntamente com as SOD e CAT fornecem a primeira linha de defesa antioxidante contra espécies reativas de oxigênio através da desmutação catalisada por enzimas de  $O_2$  - para  $H_2O_2$ , que é ainda reduzida a oxigênio e água (SALMINEN; PAUL, 2014). Estas desempenham papel importante no processo metabólico da detoxificação eletrofílica, sendo considerado um fiável índice de estressor oxidativo (CHIOU; TZENG, 2000; HATEM et al., 2014; JAMIESON, 1998; ROVER JÚNIOR et al., 2001).

#### *Análise de cor*

O extrato em pó foi avaliado logo após a sua elaboração e, novamente após 5 meses de armazenamento. A diferença de cor pode ser verificada na Tabela 01.

Tabela 01 - Análise de cor do extrato encapsulado de mirtilo em 0 e 5 meses de armazenamento à 4°C.

Tempo de armazenamento	L*	a*	b*
0 meses	71,7 a ±0,1	15,23 a ±0,04	-4,12 a ±0,17
5 meses	71,7 a ±0,08	15,21 a ±0,01	-4,10 a ±0,04

Médias de três repetições ± estimativa de desvio padrão. As médias seguidas de uma mesma letra não variaram estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Não se verificou modificações significativas de cor em nosso extrato após o armazenamento por 5 meses. Através das coordenadas L\*, a\* e b\*, nota-se que o extrato assumiu uma cor mais clara que a fruta *in natura* devido à presença do encapsulante. Contudo, o valor de a\*, indica que o extrato, mesmo encapsulado manteve de forma apropriada a cor vermelha-arroxeadada da fruta.

Segundo Pontes (2004), o uso de corantes naturais em produtos alimentícios é uma tendência atual, pelo seu forte apelo de marketing, em razão dos consumidores demandarem cada vez mais produtos que tragam benefícios a saúde. Os corantes naturais vêm sendo altamente aplicáveis, porque além de conferirem cor a alimentos, podem contribuir com propriedades sensoriais, antioxidantes, antimicrobianas e farmacológicas, como anticarcinogênico, por exemplo. Desta forma, acredita-se que o nosso extrato de mirtilo pode ser usado também como corante natural na formulação de novos alimentos.

#### *Propriedades funcionais (AA, fenóis e flavonoides totais)*

Com o intuito de avaliar a estabilidade da atividade antioxidante, fenóis e flavonoides presentes no EI em relação ao tempo de armazenamento, verificou-se o conteúdo cujo os resultados estão representados na Tabela 02, sendo que o extrato foi avaliado logo após a sua elaboração, e após 5 e 10 meses de armazenamento sob refrigeração (4°C).

Tabela 02 - Atividade antioxidante, fenóis e flavonoides totais presentes no extrato de mirtilo durante o armazenamento por até 10 meses

Análise	0 meses	5 meses	10 meses
AA (% de inibição)	80,54 a ± 2,56	66,32 b ± 3,51	38,04 c ± 1,22
Fenóis totais (µg/mL ác. gálico)	6,89 a ± 0,81	2,82 b ± 1,26	1,58 b ± 1,44
Flavonóides totais (µg/mL catequina)	17,84 a ± 1,12	8,73 b ± 1,33	8,62 b ± 1,74

Médias de três repetições ± estimativa de desvio padrão. As médias seguidas de uma mesma letra não variaram estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Por meio da tabela acima, verifica-se coerência entre as análises, onde pode-se observar diminuição significativa no resultado das três análises logo no armazenamento por 5 meses. Contudo, não houve diferença significativa entre o armazenamento por 5 e 10 meses nas análises de fenóis e flavonoides totais, ocorrendo uma estabilização na degradação dos compostos analisados.

A atividade antioxidante, tanto em 0 como em 5 e 10 meses de armazenamento apresentou % de inibição máximo do radical DPPH em 150 min. Por meio deste dado, pode-se afirmar que, embora o armazenamento do E1 ocasionou diminuição significativa da atividade antioxidante, o tempo de pico máximo de inibição manteve-se igual. Este dado sugere êxito no processo de encapsulação.

## Conclusão

O extrato de mirtilo encapsulado com goma arábica apresentou características morfológicas adequadas e exibiu atributo sensorial (cor) semelhante a fruta de mirtilo, o que favorece o seu uso como corante natural no desenvolvimento de novos alimentos enriquecidos deste extrato.

Quando aplicamos o E1 em células de levedura *Sacharomyces cerevisiae* estressadas com íons de ferro, obtivemos redução significativa da peroxidação lipídica assim como um aumento na atividade enzimática da glutatona. Este resultado sugere que alimentos enriquecidos com extrato de mirtilo parecem desempenhar proteção de saúde, uma vez que o modelo *in vivo* utilizado em nosso trabalho assemelha-se ao organismo humano em termos de oxidação e destoxificação.

Nossos testes de estabilidade funcional durante a vida de prateleira evidenciaram que o E1 mantido sob refrigeração (4°C) por 10 meses sofreu uma diminuição significativa de seus compostos bioativos e atividade antioxidante logo no 5º mês de armazenamento e após este período, estes compostos tendem a se estabilizar. Sugere-se que novas pesquisas de estabilidade sejam desenvolvidas utilizando-se diferentes temperaturas para assegurar melhor preservação de compostos bioativos desse extrato durante a vida de prateleira.

## REFERÊNCIAS

BERTOLIN, T. E.; PILATTI, D.; BAVARESCO, K.; GIACOMINI, A. C.; COLLA, L. M., COSTA, J. A. V. Effect of microalga *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) on hippocampus lipoperoxidation and lipid profile in rats with induced hypercholesterolemia. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 1253- 1259, 2009.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

CHIOU, T. J.; TZENG, W.F. The roles of glutathione and antioxidant enzymes in menadione-induced oxidative stress. **Toxicology**, v. 154, p. 75-84, 2000.

CIGUT, T.; POLAK, T.; GASPERLIN, L.; RASPOR, P.; JAMNIK, P. Antioxidative Activity of Propolis Extract in Yeast Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p.11449–11455, 2011.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, Botucatu, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FRANÇA, B. K.; ALVES, M. R. M.; SOUTO, F. M. S.; TIZIANE, L.; BOAVENTURA, R. F.; GUIMARÃES, A.; ALVES JR, A. Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **Jornal Português de Gastrenterologia**, v. 20. n. 5, p. 199-206, 2013.

GUO, Q.; KIM, Y. N.; LEE, B. H. Protective effects of blueberry drink on cognitive impairment induced by chronic mild stress in adult rats. **Nutrition research and practice**, v. 11, n. 1, p. 25-32, 2017.

HALLIWELL, B. E.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals**. In: *Biology and Medicine*. 3.ed. New York: Oxford University Press, p. 936, 1999.

HATEM, E.; BERTHONAUD, V.; DARDALHON, M.; LAGNIEL, G.; BAUDOUIN-CORNU, P.; HUANG, M. E.; LABARRE, J.; AND CHÉDIN, S. Glutathione is essential to preserve nuclear function and cell survival under oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 67, p. 103-114, 2014.

JAMIESON, D. J. Oxidative stress responses of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 14, v. 16, p. 1511-1527, 1998.

KARADAG, A.; OZCELIK, B.; SANER, S. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. **Food Analytical Methods**, v. 2, n. 1, p. 41-60, 2009.

KHA, T.C.; NGUYEN, M. H.; ROACH, P. D. Effects of spray drying conditions on the physicochemical and antioxidant properties of the gac (*Momordica cochinchinensis*) fruit aril powder. **Journal of Food Engineering**, v. 98, n. 3, p. 385-392, 2010.

MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. A. G.; LEAL, F. L. L.; CAETANO, A.C. S.; NASCIMENTO, R. J. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 639-644, 2006.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.1, Botucatu, 2015.

OPREA, E.; RUTA, L. L.; NICOLAU, I.; POPA, C. V.; NEAGOE, A. D.; FARCASANU, I. C. *Vaccinium corymbosum* L. (blueberry) extracts exhibit protective action against cádmium toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Food Chemistry**, v. 152, p. 516-521, 2014.

OSORIO, C.; FORERO, D. P.; CARRIAZO, J. G. Characterisation and performance assessment of guava (*Psidium guajava* L.) microencapsulates obtained by spray-drying. **Food Research Internacional**, n. 44, 2011.

PONTES, L. V. **Avaliação sensorial e instrumental da cor de misturas em pó para refresco, bebida isotônica e gelatina utilizando corantes naturais**. 2003, 97f. Tese de doutorado (Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG, 2004.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado Antioxidant activity of cerrado fruits. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 53-60, 2007.

ROVER JÚNIOR, L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; AND KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutathiona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, p. 112-119, 2001.

SALMINEN, L. E.; PAUL, R. H. Oxidative stress and genetic markers of suboptimal antioxidant defense in the aging brain: a theoretical review. **Reviews in the neurosciences**, v. 25, n. 6, p. 805-819, 2014.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, n. 2, p. 270-276, 1998.

SIGLER, K.; CHALOUPKA, J.; BROZMANOVA, J.; STADLER, N.; HOFER, M. Oxidative stress in microorganisms - I - Microbial vs. higher cells - Damage and defenses in relation to cell aging and death. **Folia Microbiologica**, v. 44, n. 6, p. 587-624, 1999.

SLATNAR, A.; JAKOPIC, J.; STAMPAR, F.; VEBERIC, R.; JAMNIK, P. The Effect of Bioactive Compounds on *In Vitro* and *In Vivo* Antioxidant Activity of Different Berry Juices. **Plos One**, v. 7, n. 10, 2012.

SONG, Y.; HUANG, L.; YU, J. Effects of blueberry anthocyanins on retinal oxidative stress and inflammation in diabetes through NRF2/HO-1 signaling. **Journal of Neuroimmunology**, v. 15, n. 301, p. 1-6, 2016.

VALDUGA, E.; LIMA, L.; PRADO, R.; PADILHA, F. F.; TREICHEL, H. Extração, secagem por atomização e microencapsulamento de antocianinas do bagaço da uva isabel (*Vitis labrusca*). **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 5, p. 1568-1574, 2008.

YILDIRIM, A. KOTAN, D.; YILDIRIM, S.; AYGÜL, R.; AKÇAY, F. Increased lipid peroxidation and decreased antioxidant response in serum and cerebrospinal fluid in acute ischemic stroke. **Turkey Journal Medicine Science**, v. 37, n. 2, p. 3-7, 2007.

ZAKRAJSEK, T.; RASPOR, P.; JAMNIK, P. *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase as a model organism - characterization at cellular and proteome level. **Journal Proteomics**, v. 74, p. 2837-2845, 2011.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, n. 555-559, 1999.