

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

Cintia Cassia Tonieto Gris

**Proteção antioxidante do extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis*)
veiculado em partículas lipídicas sólidas**

**Passo Fundo
2018**

Cintia Cassia Tonteio Gris Nutricionista

**Proteção antioxidante do extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis*)
veiculado em partículas lipídicas sólidas**

Dissertação de Mestrado apresentada
para obtenção do título de Mestre em
Ciência e Tecnologia de Alimentos
Orientador: Telma Elita Bertolin
Coorientador: Jorge Alberto Vieira da
Costa
Linha de pesquisa: Qualidade e
Propriedades Funcionais de Alimentos

**Passo Fundo
2018**

Cintia Cassia Tonieto Gris
Nutricionista

**Proteção antioxidante do extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis*)
em partículas lipídicas sólidas**

Dissertação de Mestrado apresentada
para obtenção do título de Mestre em
Ciência e Tecnologia de Alimentos
Orientador: Telma Elita Bertolin
Coorientador: Jorge Alberto Vieira da
Costa
Linha de pesquisa: Qualidade e
Propriedades Funcionais de Alimentos

Passo Fundo, 20 de março de 2018

Banca Examinadora

Profa. Dra. Telma Elita Bertolin – UPF – Orientador

Prof. Dra Charise Dallazem Bertol – UPF

Prof. Dra. Neila Silvia Pereira dos Santos – UPF

CIP – Catalogação na Publicação

G869p Gris, Cintia Cassia Tonteio
Proteção antioxidante do extrato de erva-mate (*Ilex
paraguariensis*) veiculado em partículas lipídicas sólidas /
Cintia Cassia Tonieto Gris. – 2018.
126 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientadora: Telma Elita Bertolin.
Coorientador: Jorge Alberto Vieira da Costa.
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de
Alimentos.) – Universidade de Passo Fundo, 2018.

1. Erva-mate. 2. Antioxidantes. 3. Compostos bioativos.
4. Alimentos-Indústria. I. Bertolin, Telma Elita, orientadora.
II. Costa, Jorge Alberto Vieira, coorientador. III. Título.

CDU: 664

Bibliotecário Luís Diego Dias de S. da Silva – CRB 10/2241

Dedico esse trabalho aos meus pais que sempre incentivaram o meu bater de asas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por ter guiado meus passos até aqui e colocado pessoas tão especiais no meu caminho.

A minha orientadora Profa Dra. Telma Elita Bertolin pela paciência e dedicação com que me orientou durante este trabalho.

A minha xará Cintia Guarienti, pelas orientações e dicas, por ouvir minhas aflições, dar os melhores conselhos e por me motivar a cada conversa.

A todos os colegas e amigos do laboratório de fermentações em especial a Ana Cláudia Margarites, Bruna K. Vargas, Elionio Frota, Janayna Monroe, Alan Rempel, Francine Sossella, Cindieli K. Zen, Lara Franco, Naiara Kreling, Luana Garbin Cardoso e Larrisa Perreira que tornaram a rotina de trabalho mais leve e meus dias mais alegres.

As alunas em iniciação científica Julia Gutkoski, Letícia Bender e Thanise Pagnini por toda ajuda na execução prática deste trabalho.

A Matheus Tumelero Crestani, namorado e amigo, pela compreensão da ausência de casa, pelo carinho e apoio.

As amigas Caroline Silvestro e Giseli Furlani, pela amizade (de anos), companheirismo, ombro amigo e por terem me acolhido em sua casa nos dias de aula e trabalho.

Ao meu cachorro Stallone pela fidelidade, por nunca reclamar da minha ausência e sempre me esperar com alegria na volta para casa.

Aos meus colegas de trabalho do CETAP (Centro de Tecnologias Alternativas Populares), pelo apoio incondicional.

A minha mãe Elaine Tonieto Gris e ao meu pai Ademar Gris pelo incentivo durante toda minha vida acadêmica e também profissional.

"Sempre que houver alternativas, tenha cuidado. Não opte pelo conveniente, pelo confortável, pelo respeitável, pelo socialmente aceitável, pelo honroso. Opte por aquilo que faz o seu coração vibrar. Opte pelo que gostaria de fazer, apesar de todas as consequências."

(Osho)

RESUMO

A crescente preocupação com a qualidade de vida e bem-estar é observada em diversos segmentos da sociedade contemporânea, o que traduz o interesse por alimentos que sejam sinônimo de praticidade, sabor e segurança alimentar. A erva-mate (*Ilex paraguariensis*), planta nativa da região sul do continente americano, possui potencial nutricional e antioxidante pouco explorado, estando seu consumo basicamente restrito às bebidas tradicionais. O uso de compostos bioativos para o desenvolvimento de alimentos, carece de pesquisas quanto a suas aplicabilidades e funcionalidades. As partículas lipídicas sólidas são uma tecnologia capaz de proteger os bioativos das mais diversas condições de exposição. Do ponto de encapsulação, as microemulsões são um sistema atraente para a veiculação de compostos ativos. Objetivamos a proteção do potencial antioxidante do extrato liofilizado de erva-mate utilizando partículas lipídicas sólidas (PLS) e sua aplicação em iogurte natural. O extrato de erva-mate liofilizado, foi caracterizado e submetido à testes de microencapsulação por PLS, utilizando cera de abelha como agente encapsulante. Obtivemos partículas lipídicas sólidas insolúveis em água, esta apresentou eficiência de encapsulação de 92,73% para um extrato liofilizado de erva-mate com concentração de 40%. A técnica de microemulsão protegeu o potencial antioxidante do extrato liofilizado durante 45 dias de armazenamento e o teste de digestibilidade mostrou o rompimento da microcápsula em condições entéricas, sugerindo a liberação do ativo no sítio de absorção. As microcápsulas adicionadas ao iogurte natural não afetaram a contagem de bactérias lácticas e não interferiram na aceitabilidade e intenção de compra do produto, perante análise sensorial. Diante destes resultados concluímos que o extrato liofilizado de erva-mate é uma alternativa para expandir os benefícios antioxidantes dessa planta para outros alimentos e públicos, além do consumo cultural. O desenvolvimento de PLS apresenta-se como uma alternativa eficiente para preservação do potencial antioxidante do extrato liofilizado de erva-mate durante o armazenamento, permitindo que este chegue até seus sítios de absorção e exerça sua ação biológica, ademais, quando adicionadas em iogurte natural as PLS carregadas de extrato liofilizado de erva-mate não interferiram na viabilidade das bactérias lácticas e na aceitabilidade e intenção de compra do produto.

Palavras-chave: Erva-mate, antioxidantes, compostos bioativos, microemulsão, partículas lipídicas sólidas

ABSTRACT

The growing concern with quality of life and well-being is observed in several segments of contemporary society, which reflects the interest in food that is synonymous with practicality, taste and food safety. *Ilex paraguariensis*, native to the southern region of the American continent, has a great nutritional and antioxidant potential, but poorly explored and its consumption is basically restricted to traditional beverages. The use of bioactive compounds for food development lacks research on their applicability and functionalities. Solid lipid particles are a technology capable of protecting the bioactive from the most diverse exposure conditions. From the point of encapsulation, microemulsions are an attractive system for the delivery of active compounds. We aimed to protect the antioxidant potential of lyophilized extract of yerba mate using solid lipid particles (PLS) and its application in natural yogurt. The lyophilized yerba mate extract was characterized and submitted to PLS microencapsulation tests using beeswax as an encapsulating agent. We obtained water insoluble solid lipid particles, which presented a 92.73% encapsulation efficiency for a lyophilized extract of yerba mate with 40% concentration. The microemulsion technique protected the antioxidant potential of the lyophilized extract during 45 days of storage and the digestibility test showed rupture of the microcapsule under enteric conditions, suggesting the release of the active at the absorption site. The microcapsules added to the natural yoghurt did not affect the lactic acid count and did not interfere in the acceptability and intention to purchase the product, through sensorial analysis. In view of these results we conclude that lyophilized extract of yerba mate is an alternative to expand the antioxidant benefits of this plant for other foods and public, as well as cultural consumption. The development of PLS presents itself as an efficient alternative for the preservation of the antioxidant potential of the lyophilized extract of yerba mate during storage, allowing it to reach its sites of absorption and exercise its biological action, in addition, when added in natural yoghurt PLS carried by lyophilized extract of mate did not interfere in the viability of lactic acid bacteria and in the acceptability and intention to purchase the product.

Key words: Yerba mate, antioxidants, bioactive compounds, microemulsion, solid lipid particles

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Vendas anuais <i>per capita</i> de alimentos e bebidas ultraprocessados e a relação com Índice de Massa Corporal (IMC) em 12 países da América Latina, 2000-2009.....	28
Figura 2- Estrutura molecular - 1 Cafeína; 2 Teobromina; 3 Teofilina.....	31
Figura 3 - Estrutura química básica dos Terpenos	31
Figura 4- Estrutura química dos fenólicos.....	32
Figura 5 – Folhas, frutos e flores da <i>Ilex paraguariensis</i> St. Hill (erva-mate).....	34
Figura 6 - Principais compostos orgânicos do extrato de erva-mate.....	35
Figura 7 - Representação esquemática das vias gerais de metabolismo dos ácidos clorogênicos	42
Figura 8 - Representação esquemática dos sistemas de encapsulação	44
Figura 9 - Figura Esquemática de diferentes sistemas de entrega à base de emulsão.....	47
Figura 10 - Fluxograma de ordem metodológica de execução do trabalho.....	53
Figura 11 –Extrato liofilizado de erva-mate.....	66
Figura 12 - Microcápsulas de extrato liofilizado de erva-mate utilizando cera de abelha como agente encapsulante (tamanho não padronizado)	70
Figura 13- Sobreposição das análises de FTIR do extrato liofilizado, cera de abelha e microcápsulas	71
Figura 14 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura do extrato liofilizado (a) – 100 vezes de aumento e (b) – 1200 vezes de aumento) e das microcápsulas (c) – 100 vezes de aumento e (d)-1200 vezes de aumento).....	73
Figura 15 - Termograma de calorimetria exploratória diferencial do extrato liofilizado,.....	76
microcápsulas e agente encapsulante	76
Figura 16 - Potencial antioxidante do encapsulado em PLS ao longo do tempo	77
Figura 17 – Imagem das formulações de iogurtes.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições de temperatura e tipo de secagem dos extratos de erva-mate para avaliação de potencial antioxidante	54
Tabela 2 - Potencial antioxidante de extratos submetidos a diferentes métodos de secagem ..	65
Tabela 3- Resultados da avaliação do potencial antioxidante e fenólicos totais do extrato liofilizado.....	66
Tabela 4 – Potencial antioxidante do extrato de erva mate submetido a diferentes pHs	67
Tabela 5- Eficiência de microencapsulação das microcápsulas com diferentes concentrações de extrato	70
Tabela 6 – Resultados da composição química das microcápsulas de erva-mate, do extrato liofilizado e do agente encapsulante	74
Tabela 7 - Temperaturas dos fluxos de calor das amostras	76
Tabela 8 - Análise de cor das formulações de iogurte.....	79
Tabela 9 - Contagem de bactérias lácticas UFC/g nas amostras de iogurte	81
Tabela 10-Teste de aceitabilidade das formulações de iogurte	82
Tabela 11- Teste de intenção de compra das formulações de iogurte	83

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
2.1	Contexto epidemiológico.....	27
2.2	Ingredientes funcionais.....	29
2.2.1	<i>Metabólitos secundários.....</i>	<i>30</i>
2.3	<i>Ilex paraguariensis St. Hill</i>	<i>33</i>
2.3.1	<i>Importância histórica e econômica da Ilex paraguariensis.....</i>	<i>33</i>
2.3.2	<i>Composição química e funcional da erva-mate</i>	<i>35</i>
2.3.3	<i>Utilização da erva-mate na alimentação.....</i>	<i>39</i>
2.3.4	<i>Metabolismo de compostos bioativos de fontes alimentares.....</i>	<i>40</i>
2.4	Encapsulação	43
2.4.1	<i>Encapsulação por emulsão – Partículas Lipídicas Sólidas (PLS)</i> <i>.....</i>	<i>46</i>
2.4.2	<i>PLS de cera de abelha.....</i>	<i>48</i>
2.5	Desenvolvimento de novos produtos: iogurte com extrato de erva-mate.....	50
3	MATERIAL E MÉTODOS	53
3.1	Matéria-Prima	53
3.2	Obtenção e avaliação do extrato	54
3.2.1	<i>Avaliação do potencial antioxidante e fenólicos totais do</i> <i>extrato de erva-mate.....</i>	<i>55</i>
3.2.2	<i>Avaliação do potencial hidrogeniônico (pH) do extrato e</i> <i>comportamento do potencial antioxidante em diferentes pHs</i>	<i>56</i>
3.2.3	<i>Teor de sólidos solúveis.....</i>	<i>56</i>
3.2.4	<i>Determinação de cor</i>	<i>57</i>
3.3	Obtenção e avaliação das PLS	57
3.3.1	<i>Avaliação da Eficiência de Encapsulação</i>	<i>58</i>
3.3.2	<i>Avaliação por Espectroscopia na Região do Infravermelho</i> <i>com Transformada de Fourier (FTIR).....</i>	<i>58</i>
3.3.3	<i>Avaliação Morfológica.....</i>	<i>58</i>
3.3.4	<i>Caracterização química</i>	<i>59</i>
3.3.5	<i>Análises de comportamento térmico das micropartículas</i>	<i>59</i>
3.3.6	<i>Solubilidade das PLS em água.....</i>	<i>59</i>

3.3.7	<i>Proteção antioxidante ao longo do tempo</i>	59
3.3.8	<i>Digestibilidade in vitro</i>	60
3.4	Elaboração e avaliação de iogurte natural com extrato de <i>Ilex paraguariensis</i>	60
3.4.1	<i>Determinação de cor</i>	61
3.4.2	<i>Potencial hidrogeniônico (pH) e acidez titulável do iogurte</i>	61
3.4.3	<i>Quantificação de bactérias lácticas no iogurte</i>	62
3.4.4	<i>Análise Sensorial do iogurte natural enriquecido com extrato de erva-mate</i>	62
3.5	Análise dos dados.....	63
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4.1	Obtenção e caracterização do extrato de erva-mate	65
4.1.1.	<i>Avaliação do potencial antioxidante e fenólicos totais do extrato liofilizado</i>	66
4.1.2	<i>Comportamento do potencial antioxidante do extrato em diferentes pHs</i>	67
4.1.3	<i>Determinação de cor do extrato</i>	69
4.2	Microencapsulação do extrato.....	69
4.2.1	<i>Obtenção das microcápsulas</i>	69
4.2.2	<i>Avaliação das microcápsulas</i>	70
4.2.2.1	<i>Avaliação da Eficiência de Encapsulação (EE%)</i>	70
4.2.2.2	<i>Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i>	71
4.2.2.3	<i>Avaliação Morfológica</i>	72
4.2.2.4	<i>Composição química das PLS de erva-mate</i>	74
4.2.2.5	<i>Análises de comportamento térmico das PLS</i>	75
4.2.2.6	<i>Solubilidade das microcápsulas em água</i>	77
4.2.2.7	<i>Avaliação do potencial antioxidante do encapsulado ao longo do tempo</i>	77
4.2.2.8	<i>Digestibilidade in vitro</i>	78
4.3	Iogurte natural com PLS contendo extrato de erva-mate	79
4.3.1	<i>Avaliação de iogurte natural PLS contendo extrato liofilizado de erva-mate</i>	79
4.3.1.1	<i>Determinação de cor</i>	79
4.3.1.2	<i>Potencial hidrogeniônico (pH) e acidez titulável do iogurte</i>	80
4.3.1.3	<i>Contagem de bactérias lácticas do iogurte</i>	80

4.3.2	<i>Análise Sensorial do Iogurte</i>	82
5	CONCLUSÕES	85
	REFERÊNCIAS	87
	APÊNDICE A – Artigo Científico	102

1 INTRODUÇÃO

O atual cenário epidemiológico é caracterizado por um quadro crescente e contínuo de transição nutricional, evidenciado por mudanças no padrão alimentar e nos níveis de atividade física. Este quadro tem consequências negativas no estado nutricional da população (BRASIL, 2016), por conseguinte, faz-se necessário a valorização e a utilização de alimentos que, além de nutrir de forma balanceada o organismo, promova saúde e funcionalidade (POPKIN; KENAN JR., 2016).

Dentre esses alimentos destaca-se um alimento tradicional dos países da América do Sul, considerado sinônimo de hospitalidade, tradição e saúde, a erva-mate. *Ilex paraguariensis* St. Hil (erva-mate) é amplamente consumida e produzida no sul do Brasil, na Argentina, Uruguai e Paraguai. Esta planta, é rica em diferentes biocompostos, tais como, fenóis, metilxantinas, terpenos, saponinas, flavonoides, entre outros que denotam atividade antioxidante. Seu consumo está associado a redução de peso corpóreo, da gordura corporal e de marcadores de risco cardiometabólico (SCHINELLA; FANTINELLI; MOSCA, 2005) efeito hipocolesterolêmico, hipoglicemiante (FERNANDES et al., 2016) e hepatoprotetor (SCALBERT et al., 2005).

A erva-mate, pertencendo ao grupo dos produtos não madeireiros de extrativismo vegetal, pode ser coletada da floresta, produzida em plantio ou sistemas agroflorestais, representando uma forma ambientalmente sustentável de geração de renda e uma alternativa de diversificação econômica para a agricultura familiar. O consumo da erva-mate ainda é fortemente ligado a hábitos culturais o que apresenta-se como limitação na sua utilização (EMBRAPA, 2000; LUZ, 2011a). Neste sentido, investigações que valorizem outras formas de consumo é de grande importância para a valorização da erva-mate.

A utilização da *Ilex paraguariensis* em alimentos prontos apresenta-se como uma das possibilidades de ampliação do mercado da erva-mate e para que isto seja possível é necessário que se estabeleçam técnicas que permitam a garantia da manutenção dos compostos bioativos e que sejam sensorialmente aceitáveis.

A encapsulação é uma tecnologia capaz de proteger os bioativos das mais diversas condições de exposição, pois permite o revestimento de partículas sólidas, gotas de líquidos e dispersões, com um “filme protetor”, é um meio de embalagem, separação e

armazenamento de materiais em cápsulas para posterior liberação (SOBEL; VERSIC; GAONKAR, 2014). A utilização de partículas lipídicas sólidas (PLS) para encapsulação têm certas vantagens em relação às outras técnicas, como o aumento da estabilidade física e química, a possibilidade de obter maior eficiência de encapsulação, controle mais preciso sobre as propriedades de liberação dos ativos encapsulados, possibilidade de produção em grande escala e esterilização (FATHI; MOZAFARI; MOHEBBI, 2012), estas vantagens também permitem que sejam uma opção interessante de proteção de materiais com bioatividade (BAZZARELLI; PIACENTINI; GIORNO, 2017).

A Universidade de Passo Fundo, Centro de Pesquisa em Alimentação (Cepa) e curso de Engenharia de Alimentos, atuam em pesquisas com erva-mate desde 1997, quando da aprovação de diferentes projetos junto a Fapergs e Secretaria de Ciência e Tecnologia do estado do RS. Na atualidade, o curso de Engenharia de Alimentos e o Programa de Pós-Praduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) aprovaram o projeto “Erva-mate como componente funcional no desenvolvimento de processos e produtos alimentares”, que visa utilizar a erva-mate, como componente funcional, para o desenvolvimento de processos e produtos visando fomentar a indústria alimentícia do Polo Corede da Produção.

Neste contexto, objetivamos o estudo da proteção do extrato de folhas de erva-mate através da técnica de microencapsulação e sua utilização em iogurte natural como matriz alimentícia.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Contexto epidemiológico

Os resultados de diferentes estudos epidemiológicos vêm confirmando um quadro contínuo e crescente de transição nutricional caracterizada por mudanças no padrão alimentar e nos níveis de atividades física com consequência direta no estado nutricional da população (BRASIL, 2016). Cerca de 53,9 % dos brasileiros encontram-se acima do peso e 18,9 % da população brasileira encontra-se em quadro de obesidade, sobrepeso e obesidade são fatores de risco para doenças crônicas como hipertensão, diabetes, doenças cardiovasculares e câncer, que respondem por 72 % dos óbitos no país (BRASIL, 2016).

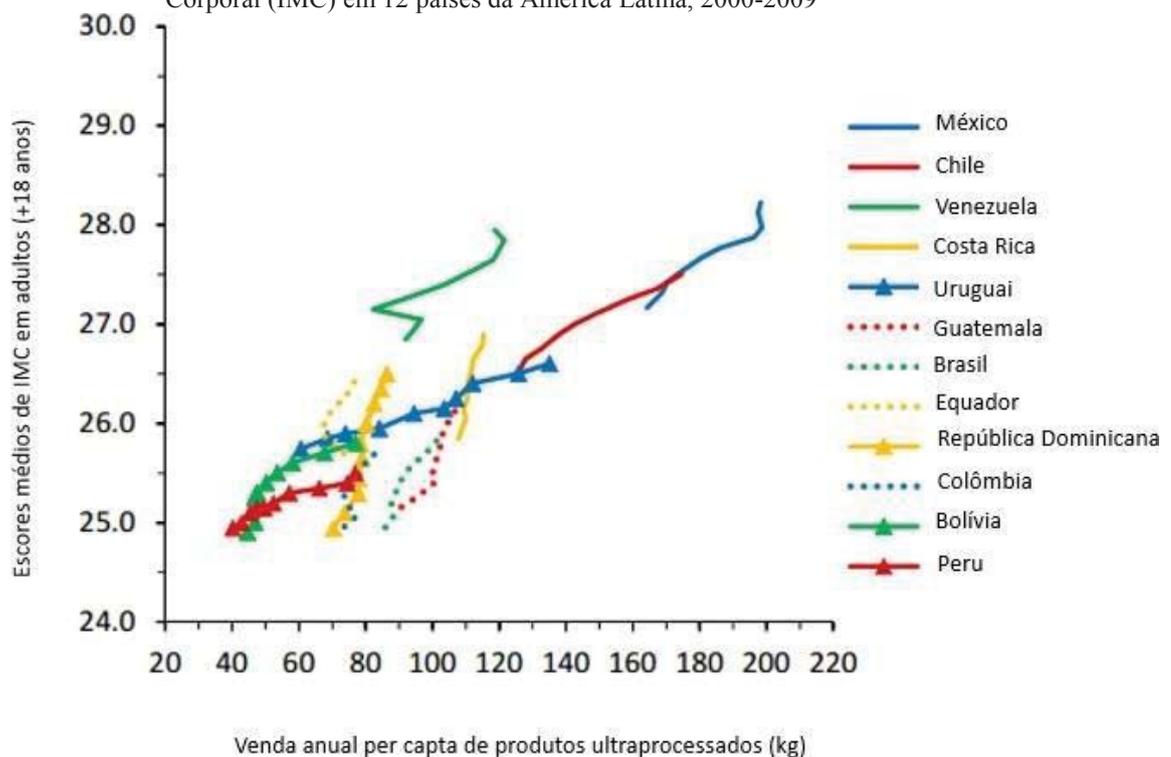
Este contexto de transição nutricional pode ser uma consequência de fatores como a urbanização e a globalização: as grandes redes de supermercados têm contribuído para facilitar o acesso a alimentos pré-cozidos, salgados, açucarados e gordurosos o que associados ao pouco tempo dedicado à alimentação e o sedentarismo justificam a queda na qualidade alimentar e as prevalências atuais de excesso de peso (POPKIN, 2001; POPKIN; KENAN JR., 2016).

Karanja et al. (2007) reforçam que a aceleração do ritmo urbano e da inserção da mulher no mercado de trabalho, ocasionam uma busca evidente por alimentos industrializados que não demandem muito tempo para o preparo, porém, muitos destes alimentos apresentam uma composição nutricional desbalanceada: baixo teor de fibras, vitaminas, minerais e compostos bioativos e altos teores de gorduras saturadas, sódio e açúcares.

É importante ressaltar que um alimento não pode ser considerado saudável ou não simplesmente por ser industrializado, algumas formas de processamento são essenciais, benéficas ou inofensivas. Porém, muitas características nutricionais dos alimentos ultraprocessados apresentam-se como uma grande problemática: possuem baixa qualidade nutricional, apresentam-se hiperpalatáveis causando uma quase dependência, são agressivamente anunciados e comercializados e normalmente derivam de um sistema cultural, social e ambientalmente insustentável (CAYON, 2015). Um estudo realizado pela Organização da Saúde Pan Americana (Figura 1), que associou os dados de volume de vendas de produtos ultraprocessados com as alterações no Índice de Massa Corporal (IMC) de adultos (+ 18 anos) entre 2000 e 2009 em 12 países da América Latina (exceto Argentina), dá suporte à influência que os hábitos alimentares exercem sobre o estado nutricional dos indivíduos (PAHO, 2015).

Nos países onde as vendas de produtos ultraprocessados são baixas e as dietas tradicionais ainda prevalecem, como Bolívia e Peru, teve-se menor média de IMC, ao contrário de países onde as vendas destes produtos são superiores, como México e Chile, que tiveram maior média de massa corporal (PAHO, 2015).

Figura 1- Vendas anuais *per capita* de alimentos e bebidas ultraprocessados e a relação com Índice de Massa Corporal (IMC) em 12 países da América Latina, 2000-2009



Produtos ultra-processados aqui incluem refrigerantes, lanches doces e salgados, cereais matinais, confeitaria (doces), sorvete, biscoitos, suco de frutas e legumes não naturais, bebidas esportivas e energéticas, chá ou café pronto para beber, molhos e refeições prontas. Quantidade em litros convertidos em quilogramas. Os valores de venda são do euromonitor Passport Database (2014) (38). Os valores do IMC são dados da infobase global da OMS (42).

Fonte: Pan American Health Organization (PAHO, 2015)

O olhar mais atento de nutricionistas e outros especialistas da área tem orientado a diminuição do consumo de alimentos industrializados e apontado os lapsos da indústria de alimentos em relação à saúde do público consumidor. No entanto, a rotina de trabalho e o estilo de vida iminente acabaram por ocasionar uma dependência de alimentos prontos para consumo, o que aponta para poucas soluções, sendo a mais interessante delas a adequação da indústria de alimentos para melhora dos produtos industrializados (POKIN, 2016).

Recentes esforços da indústria alimentar mostram seu interesse em investir em alimentos industrializados que também sejam sinônimos de saúde, não apenas para atender a demanda do público consumidor, mas para contribuir com a melhora da qualidade alimentar que é uma questão de saúde pública (POKIN; KENAN, 2016). Além da redução dos teores de açúcares, sódio e gorduras saturadas, o aumento do teor de fibras e a incorporação de ingredientes funcionais nos alimentos têm se mostrado estratégias eficazes para melhorar o impacto dos alimentos industrializados na saúde do consumidor (BOTELHO; CANAS; LAMEIRAS, 2017).

2.2 Ingredientes funcionais

O fator saúde tem se tornado uma das principais motivações e justificativas nas escolhas alimentares do consumidor mundial e é neste contexto que se reconhece a importância dos alimentos funcionais (MARTINS; BARROS; FERREIRA, 2016).

Os alimentos funcionais podem ser definidos como alimentos ou ingredientes que produzem efeitos benéficos à saúde, além de suas funções nutricionais básicas e tem apresentado grande importância para o setor comercial em todo o mundo (BRASIL, 2008). Segundo o Ministério da Saúde do Governo Brasileiro (2008) os alimentos funcionais caracterizam-se por oferecer vários benefícios à saúde, além do valor nutritivo inerente à sua composição química, podendo desempenhar um papel potencialmente benéfico na redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis e doenças degenerativas, como câncer e diabetes, dentre outras, porém, é necessário que o consumo destes alimentos seja regular a fim de que seus benefícios sejam alcançados.

Como maneira de facilitar a inclusão de alimentos funcionais na dieta da população tem-se a inclusão de ingredientes funcionais em alimentos prontos para consumo através da indústria e da tecnologia de alimentos (MAHALIK; NAMBIAR, 2010). Além de dar uma “nova face” aos alimentos industrializados fazendo com que sejam promotores de saúde e bem-estar a inclusão de ingredientes funcionais em alimentos industrializados vai de encontro ao estilo de vida do consumidor do século XXI: pouco tempo dedicado à alimentação, porém desejo de melhorar o consumo alimentar (POPKIN; KENAN JR., 2016).

Entre os compostos que conferem a um alimento a alegação funcional, tem-se os compostos bioativos que são em sua maioria metabólitos secundários de plantas e vegetais.

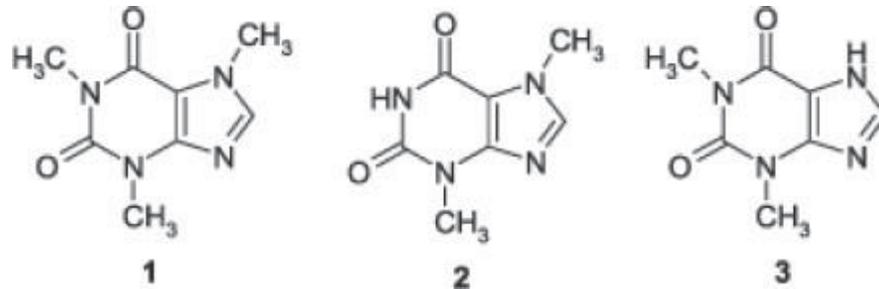
Geralmente, estão relacionados com os sistemas de defesa das plantas contra a radiação ultravioleta ou as agressões de insetos ou patógenos (JIMENEZ-GARCIA et al., 2013). A ingestão insuficiente de compostos bioativos constitui componente de risco para doenças crônicas não transmissíveis, sendo que estes compostos interferem em alvos fisiológicos específicos, modulando a defesa antioxidante, defesa frente a processos inflamatórios e mutagênicos os quais estão relacionados a várias doenças e não há dúvidas de que sejam essenciais para a manutenção da saúde (ADAM et al., 2002).

2.2.1 *Metabólitos secundários*

Apesar de no passado já terem sido considerados como produtos de excreção do reino vegetal, os metabólitos secundários atualmente despertam grande interesse pela imensa atividade farmacológica que possuem, além disso, possuem importância comercial para a indústria de alimentos, agrônômica, farmacêutica, perfumaria, entre outras (JIMENEZ-GARCIA et al., 2013). Um critério para classificação dos metabólitos secundários com função bioativa é relativamente complicado de ser estabelecido quando se consideram suas particularidades. Porém podem ser citadas três principais classes desses metabólitos: a classe dos alcaloides, onde se encontram as metilxantinas; a classe dos terpenos, que incluem os óleos essenciais e a classe dos compostos fenólicos, que envolve os taninos, flavonoides e ácidos fenólicos (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 1992).

O precursor dos aminoácidos, são alcaloides que em geral estão relacionados à um efeito antiplaquetário, anticolinérgico, analgésico e antitússico, dentre as principais classes de alcaloides destacam-se as xantinas que incluem a cafeína, teobromina e a teofilina (Figura 2) (SPEED et al., 2015). São atribuídas às metilxantinas várias propriedades farmacológicas, que incluem estimulação do sistema nervoso central, vasoconstrição periférica, relaxamento do músculo liso e estimulação do miocárdio (LORIST; TOPS, 2003). Podem ser encontradas em muitos alimentos e bebidas, incluindo os chás, o café e o chocolate (SPEED et al., 2015).

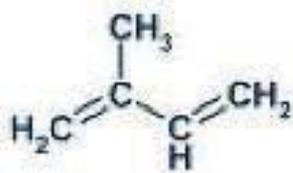
Figura 2- Estrutura molecular - 1 Cafeína; 2 Teobromina; 3 Teofilina



Fonte: King; Young (1999)

Os terpenos (Figura 3) constituem o grupo mais abundante dos metabólitos secundários e possuem valor agregado pela alta aplicabilidade e utilização, seja na indústria de alimentos, farmacêutica ou cosméticos (LIMA et al., 2016). Apresentam propriedades antineoplásicas, analgésicas, anti-inflamatórias, neuroprotetoras, moduladores imunológicos e pelo seu auxílio na cicatrização de feridas (ALI et al., 2013).

Figura 3 - Estrutura química básica dos Terpenos



Fonte: King; Young (1999)

Os compostos fenólicos são um grupo muito diversificado de fitoquímicos derivados de fenilalanina e tirosina, são essenciais no crescimento e reprodução dos vegetais, além de atuarem como agentes antipatogênicos e contribuírem na pigmentação, em alimentos, são responsáveis pela cor, adstringência, aroma e pela estabilidade oxidativa (SHAHIDI, 1997). Englobam desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização e são encontrados na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (SHAHIDI, 1997). São formados por anéis aromáticos ligados a um ou mais grupos hidroxila e são subdivididos em grupos pelo número de anéis:

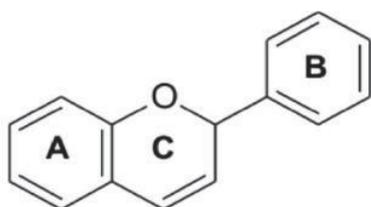
- 1) Ácidos fenólicos (Figura 4a) com subclasses derivadas do ácido hidroxibenzoico como o ácido gálico e do ácido hidroxicinâmico, como o cafeico, ferrúlico e cumárico;

- 2) Flavonóides que incluem os flavonóis, as flavonas, as isoflavonas, as flavononas, as antocianidinas e flavonóis (Figura 4b);
- 3) Estilbenos (Figura 4c);
- 4) Lignanas e ligninas poliméricas (Figura 4d) (SHAHIDI, 1997).

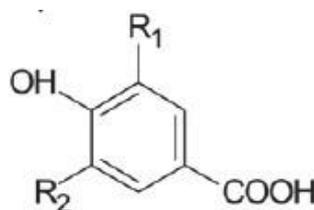
Na saúde humana, os compostos fenólicos têm sido associados a propriedades antioxidantes, antivirais, hipoglicemiantes, hepatoprotetoras, cardioprotetoras, antirreumáticas, anti-inflamatórias, diuréticas, controle de peso e atividade anticarcinogênica relacionada à inibição dos cânceres de cólon, esôfago, pulmão, fígado, mama e pele (ANGELO; JORGE, 2007; GARAMBONE; ROSA, 2008; PIETTA, 2000). Além disso, evidências sugerem que estes compostos podem atuar por meio de outros mecanismos além da capacidade antioxidante, como a modulação da atividade de diferentes enzimas como telomerase, lipoxigenase e ciclooxigenase, interações com receptores e vias de transdução de sinais, regulação do ciclo celular, entre outras, essenciais para a manutenção da homeostase dos organismos vivos (D'ARCHIVIO et al., 2007).

Figura 4- Estrutura química dos fenólicos

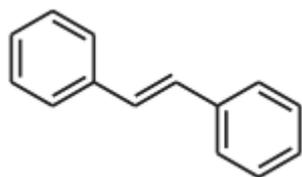
a) Estrutura química dos ácidos fenólicos



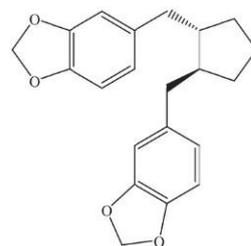
b) Estrutura química dos flavonoides



c) Estrutura química dos estilbenos



d) Estrutura química da lignana



Fonte: King; Young (1999)

Alimentos de cores mais fortes tendem a apresentar maior atividade antioxidante que os demais, dentre esses destacam-se o chá verde, cerejas, amoras, framboesas, mirtilo, uva roxa (MARTINS; BARROS; FERREIRA, 2016; SHAHIDI, 1997). Além desses, alimentos típicos de determinadas regiões pouco conhecidos mundialmente também destacam-se como

fontes de compostos bioativos, como é o caso da erva-mate (*Ilex Paraguariensis*), planta típica de alguns países da América do Sul (PANG; CHOI; PARK, 2008).

2.3 Ilex paraguariensis St. Hill

2.3.1 Importância histórica e econômica da Ilex paraguariensis

A *Ilex paraguariensis*, popularmente conhecida como erva-mate é da família Aquifoliacea, nativa das regiões subtropicais, incluindo a região sul do continente americano (Figura 5). Seu consumo foi iniciado pelos povos indígenas Guaranis e do Guáira por volta de 1554, e logo foi adotado pelos colonizadores da época sendo plenamente incorporada aos hábitos alimentares dos brasileiros, em particular no sul do Brasil (LUZ, 2011a). No Brasil, seu consumo se destaca na forma de chimarrão, chá mate e tererê (BASTOS et al., 2007).

As formas mais comuns de utilização da erva-mate são as bebidas tradicionais (BRASIL, 2003). O chimarrão é uma infusão parcial em que a erva-mate é parcialmente imersa em água quente e servido em um artefato típico chamado de cuia; o tererê, por sua vez, consiste de uma infusão tradicional na qual as folhas de erva mate são totalmente imersas em água fria, utilizando uma cuia, frasco ou copo comum, já o chá de erva-mate é preparado pela infusão total de folhas de erva-mate torradas em água quente, além da infusão da erva (LUZ, 2011b). Hoje já podem ser encontrados produtos de *Ilex paraguariensis* na forma de bebidas “energizantes”, substituindo até mesmo o consumo do café, um dos estimulantes mais empregados (BASTOS et al., 2007).

Figura 5 – Folhas, frutos e flores da *Ilex paraguariensis* St. Hill (erva-mate)



Fonte: Página Líder Agronomia

Segundo Manoelito Savaris, presidente da Fundação Instituto Gaúcho de Tradição e Folclore (IGTF), o consumo de erva-mate, que integra os costumes sulinos há séculos, é atualmente o hábito típico mais difundido entre os gaúchos e ainda considerado sinônimo de hospitalidade, tradição e saúde. Além disso, através das migrações, o consumo de erva-mate acabou por difundir-se para outras regiões do país (IGTF, 2016).

A erva-mate pode ser coletada da floresta, pois pertence ao grupo dos produtos não madeireiros de extrativismo vegetal, além de ser produzida em plantio ou sistemas agroflorestais representando uma forma ambientalmente sustentável de geração de renda (SANTOS et al., 2003).

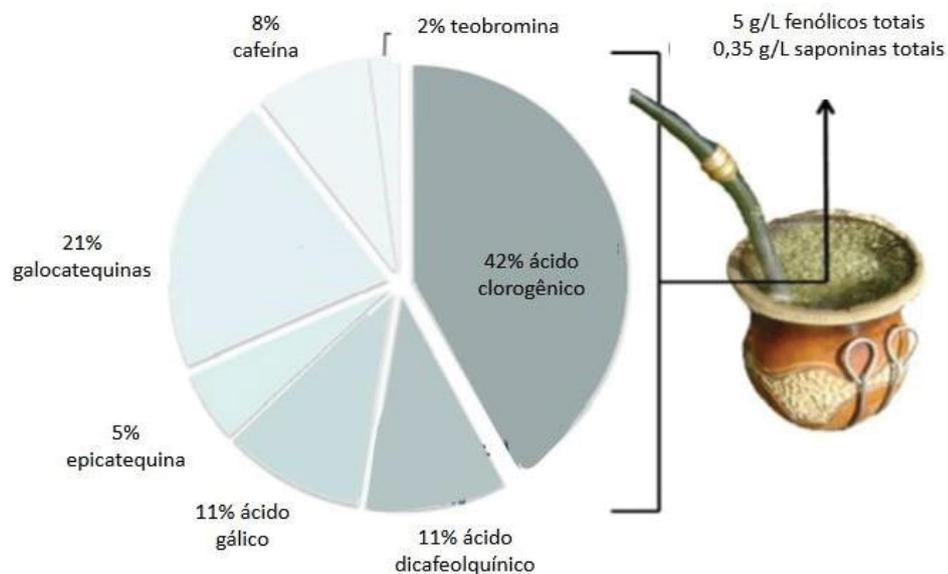
A exploração de erva-mate com finalidade comercial, difundida no século XIX, atualmente representa grande importância socioeconômica para países como Brasil, Argentina e Paraguai, uma vez que a produção é realizada por um grande número de pequenos produtores, comunidades indígenas e por ervateiras (LUZ, 2011b). Além disso, a erva-mate é uma das espécies que sofre pouco com as oscilações climáticas, quando comparada aos cultivos agrícolas em geral, apresentando, portanto, grande relevância para a fixação do homem ao campo (SANTOS et al., 2015).

2.3.2 Composição química e funcional da erva-mate

A erva-mate tem sido amplamente utilizada pela medicina popular para o tratamento de várias enfermidades, porém, estudos científicos sobre suas propriedades biológicas tornaram-se mais frequentes a partir da década de 1990 (BRACESCO et al., 2011).

A erva-mate apresenta em sua composição compostos bioativos (Figura 6), como os compostos fenólicos (ácido clorogênico e pequenas quantidades de quercetina e rutina), metilxantinas (cafeína e teobromina) e saponinas (BRACESCO et al., 2011; DELADINO et al., 2015; FERNANDES et al., 2016; HECK; DE MEJIA, 2007). Compostos minerais como potássio, magnésio e manganês e demais micronutrientes com importância na dieta também são encontrados (DELADINO et al., 2015).

Figura 6 - Principais compostos orgânicos do extrato de erva-mate



Fonte: Adaptado de Bracesco et al. (2011).

Os compostos fenólicos são largamente distribuídos na natureza e encontrados principalmente em alimentos de origem vegetal, sendo os ácidos clorogênicos os mais abundantes nos alimentos. Na erva-mate os ácidos mono e dicafeoliquínicos pertencentes ao grupo dos ácidos clorogênicos, apresentam-se como os principais compostos fenólicos encontrados. O ácido 5-cafeolquínico é o mais comum dos ácidos clorogênicos e o mais

conhecido dos fenóis dietéticos biologicamente ativos (JOHNSTON; CLIFFORD; MORGAN, 2003; OLTHOF et al., 2003). Devido a sua riqueza em derivados cafeoilquínicos, bebidas à base de erva-mate têm um perfil de polifenóis muito semelhante ao café (*Coffea arabica*). A predominância e diversidade de ácidos cafeoilquínicos são uma peculiaridade de produtos de erva-mate (JAISWAL et al., 2010). Butiuk et al. (2016), ao analisar o teor de ácido clorogênico em erva-mate encontraram uma variação de $45,8 \pm 0,4$ a $80,8 \pm 1,0$ g de ácido clorogênico kg^{-1} de folhas e de $31,6 \pm 0,6$ a $78,9 \pm 5,3$ g . kg^{-1} de caule, valores próximos ao encontrados por Lima et al. (2016). Souza et al. (2011), que utilizou métodos cromatográficos para análises de compostos presentes na erva-mate obteve maiores concentrações de teobromina, ácido neoclorogênico, ácido clorogênico, ácido criptoclorogênico, cafeína, ácido feruloiquínico e rutina, além destes, muitos outros compostos foram encontrados em picos menores, ou seja, em menor abundância, como ésteres de cafeína, ésteres de ácido ferúlico e químico, ácido dicafeíco e quercetina.

A principal fonte de ácidos clorogênicos na dieta ocidental, de acordo com algumas revisões publicadas sobre o assunto, é o café (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009). No entanto, bebidas de consumo regional como o chimarrão, constituem a principal fonte dietética desses compostos na dieta (GONTHIER et al., 2003; LIMA et al., 2016a). Estudos *in vivo* e estudos epidemiológicos sugerem que uma dieta rica em ácidos clorogênicos, pode regular o metabolismo de glicose e lipídios e melhorar a sensibilidade à insulina, além de ser capaz de prevenir e tratar obesidade, diabetes mellitus e síndrome metabólica (MENG et al., 2013; TAJIK et al., 2017).

Os estudos epidemiológicos vêm confirmando os efeitos protetores do consumo de compostos fenólicos, através da dieta e/ou suplementação, contra os danos e doenças cuja etiologia está ligada aos radicais livres, como doenças cardiovasculares, cânceres (OLTHOF et al., 2003) doenças neurodegenerativas, entre outras (LORIST; TOPS, 2003; SCALBERT et al., 2005). As reações biológicas que envolvem radicais livres têm um importante papel no dano tecidual, responsável por desenvolver doenças (SCHINELLA; FANTINELLI; MOSCA, 2005).

O excesso de radicais livres está envolvido, por exemplo, com o câncer, a aterosclerose, lesão por toxicidade de ROS no pulmão e na retina, lesão pós isquemia, coração, pele, intestino, pâncreas, fígado, músculo, rins e pulmões, síndrome demencial, artrite reumatoide, disfunção renal pós transplante, hemotomacrose transfuncional, doenças autoimunes, toxicidade decorrente de exposição a xenobióticos e envelhecimento (COLLINS, 2005). Aos compostos fenólicos atribuem-se os principais benefícios associados ao consumo

de erva-mate. Estudos *in vivo* em animais mostraram eficácia da erva-mate na redução de peso, da gordura corporal e de marcadores de risco cardiometabólico, efeito hipocolesterolêmico, hipoglicemiante e hepatoprotetor (SCALBERT et al., 2005).

Às xantinas, comumente encontradas em chás, café e chocolate, são atribuídos os efeitos estimulantes da erva-mate, as encontradas no mate são teofilina, teobromina e cafeína (ATHAYDE; COELHO; SCHENKEL, 2000). Dessas três substâncias, a cafeína é a encontrada na maior concentração, 1 % a 2 % do peso seco, seguida por teobromina 0,3 % a 0,9 % do peso seco (ITO; CROZIER; ASHIHARA, 1997). Vale ressaltar que os teores de cafeína e teobromina da erva-mate variam significativamente conforme sua origem geográfica, o que torna o controle de qualidade química de ingredientes à base de plantas muito desafiador em razão da maioria das plantas utilizadas como matéria-prima ou como extratos são nativas e são coletadas de diferentes regiões (PINTO et al., 2015; STREIT et al., 2007).

As saponinas, são altamente solúveis em água, propriedade que confere às bebidas à base de erva-mate o gosto amargo e a formação de espuma, estima-se que podem ser responsáveis pelas propriedades coleréticas e parte dos efeitos hipocolesterolêmicos (BALZAN et al., 2013) anti-inflamatórios e antiobesogênicos (ARÇARI et al., 2009; BAISCH; JOHNSTON; STEIN, 1998; CLIFFORD, 2004). Propriedades que podem ser explicadas pela inibição da difusão passiva do ácido cólico, além da formação de micelas com o colesterol e com os sais biliares que impedem sua absorção, diminuindo assim, o colesterol circulante no sangue (FERREIRA et al., 1997).

Estudos têm apontado efeitos neuroprotetores da utilização de erva-mate comercial, através da prevenção de lesões oxidativas em diversos tecidos cerebrais (BRANCO et al., 2013). Reis et al. (2014), ao testarem possíveis efeitos da infusão de erva-mate no sistema nervoso central em ratos Wistar, sugerem efeito antidepressivo da planta. Santos et al. (2015), estudaram o efeito do consumo regular de extrato de erva-mate na memória e na ansiedade em camundongos Swiss, confirmando o efeito neuroprotetor da erva-mate e reforçando o potencial de seu uso na prevenção de déficits de memória relacionados a idade, além disso, verificou-se efeito ansiolítico e estimulante do consumo do extrato nos camundongos.

Para avaliar o poder antioxidante da erva-mate durante o período da perimenopausa Pereira et al. (2017), realizaram um estudo com ratos que após receberem 20 mg/kg de peso corporal/dia de chá mate, obtiveram redução no estresse oxidativo, com aumento de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase e glutathione peroxidase e redução da malondialdeído, demonstrando que a suplementação com da *Ilex paraguariensis* pode ser uma abordagem eficaz para minimizar esse estresse e melhorar a defesa antioxidante enzimática durante este

período. O consumo de erva-mate também está relacionado a efeitos positivos na prevenção e controle de doenças crônicas não transmissíveis como a obesidade (ARÇARI et al., 2009, 2011, 2013; LIMA et al., 2014a).

Um estudo realizado com ratos Wistar comprovou os efeitos antiinflamatórios da erva-mate e por consequência, a prevenção do acúmulo de gordura e obesidade nos ratos, além disso, a erva-mate também atuou diminuindo a resistência à ação da leptina (LIMA et al., 2014b). Machado et al. (2014), avaliaram o efeito do consumo de erva-mate sobre o ganho de peso e a glicemia de jejum em ratos, e observaram que os ratos alimentados com dieta hiperlipídica contendo infusão de erva-mate apresentaram menor ganho de peso e tendência a menores níveis de glicemia de jejum em relação aos outros grupos. Da mesma forma, Meneses Fujii et al. (2014) mostraram que a suplementação de erva-mate em ratos, resultou em uma redução do ganho de peso e melhora no perfil lipídico dos animais e Bravo et al. (2014), ao tratar ratos hipercolesterolêmicos com erva mate observou acentuada diminuição de colesterol total e LDL, triglicerídeos e níveis séricos de malondialdeído, mas concluiu que a capacidade de enzimas antioxidante não foi afetada.

Em outro estudo realizado com animais, Resende et al. (2015), examinaram a influência do extrato de erva-mate e duas de suas frações no metabolismo lipídico de ratos alimentados com uma dieta rica em gordura, e observaram que o extrato de erva-mate induziu reduções no ganho de peso de gordura intra-abdominal e no nível de LDL plasmático. A fração de metilxantinas reduziu os níveis plasmáticos de colesterol, LDL e triglicerídeos, além de aumentar a síntese de glicogênio hepático e a lipólise no tecido adiposo. Já as saponinas aumentaram a lipogênese no tecido adiposo e a excreção de gordura fecal.

Em humanos, um estudo realizado com indivíduos obesos durante doze semanas, mostrou que a suplementação de erva-mate foi capaz de diminuir significativamente a massa corporal e o percentual de gordura corporal em relação ao grupo controle (KIM et al., 2015). Outro estudo em humanos, que avaliou 142 indivíduos com alta viscosidade sanguínea, demonstrou que o consumo de chá de erva-mate gerou melhora na viscosidade sanguínea e nos parâmetros microcirculatórios com 6 semanas de tratamento. Demonstrando que a erva mate pode ser consumida para reduzir alguns fatores de risco de doença cardiovascular (YU et al., 2015)

Gambero e Ribeiro (2015), ao abordarem uma revisão sobre os efeitos positivos da erva-mate no organismo, concluíram que a erva-mate possa ser um importante aliado contra a obesidade, estando ela associada a melhora dos parâmetros lipídicos nos seres humanos e animais, além disso, a erva-mate atua modulando a expressão de genes que são alterados no

estado obeso e restaurando-os a níveis normais de expressão.

Propriedade antigenotóxicas e anticarcinogênicas também são conferidas ao consumo de erva-mate (PÉREZ et al., 2014; PUANGPRAPHANT, et. al. 2011). Em um estudo realizado por Barg et al. (2014), a erva-mate foi capaz de reduzir significativamente os danos causados ao DNA de ratos Wistar pela exposição de radiação ultravioleta. No entanto, estudos de longo prazo são necessários para demonstrar um efeito antioxidante *in vivo* mais consistente de *Ilex paraguariensis* (BREMER BOAVENTURA et al., 2015).

2.3.3 Utilização da erva-mate na alimentação

O consumo tradicional de erva-mate ainda está fortemente ligado a hábitos culturais, o que pode representar limitações para a sua aceitação por parte de novos públicos consumidores (LUZ, 2011b). Bremer Boaventura et al. (2015) sugerem que a erva-mate possa ser utilizada pela indústria de alimentos e farmacêutica para aumentar o valor nutricional de produtos alimentares ou na formulação de nutracêuticos e suplementos dietéticos, fazendo com que a utilização da erva-mate ultrapasse a barreira de consumo tradicional, atingindo um público para além da América Latina.

Na última década, *Ilex paraguariensis* tem sido usada na formulação de cervejas, cremes, doces além de outros usos não tradicionais (VIEIRA et al., 2008). Recentemente, tem atingido supermercados na forma de bebidas energéticas na Califórnia e está sendo vendida na Europa em combinação com outras ervas como um chá energético ou como auxiliar na redução do peso (BRACESCO et al., 2011).

De acordo com a literatura, produtos à base de erva-mate como pães (FACCIN et al., 2015), por exemplo, além de apresentarem uma boa aceitação do público consumidor, tiveram maior vida de prateleira devido a ação antifúngica da erva mate. Berté et al (2011), ao acrescentar extrato aquoso de erva-mate em diferentes formulações de gelatina também tiveram boa aceitação da mesma e ainda conseguiram manter as substâncias bioativas da erva-mate no produto final. Balas contendo o extrato de erva-mate tiveram um aumento significativo em polifenóis e minerais, a incorporação do extrato também aumentou a dureza dos doces e produziu os resultados desejados em termos de características nutricionais; testes sensoriais indicaram que as balas de erva-mate eram aceitáveis e tiveram aprovação em relação à intenção de compra (VIEIRA et al., 2008). Chiesa, Schlabit e Souza (2012) e Mello et al. (2009), através da avaliação das características sensoriais e físico-químicas do acréscimo de erva-mate em

barras de cereal e da elaboração de bebida gaseificada de erva-mate comprovaram a viabilidade de uso deste ingrediente no desenvolvimento de novos produtos alimentícios.

No entanto, para ampliação de formas de consumo, fazem-se necessárias técnicas de melhoramento e seleção de matéria-prima e técnicas de desenvolvimento de produtos aprimoradas que assegurem a melhor composição química possível, para otimizar as atividades biológicas induzidas pelo consumo da erva-mate (CARDOZO JUNIOR; MORAND, 2016). Atualmente as técnicas de processamento da folha de erva-mate têm desvantagens relacionadas com a sua exigência de alta energia e dificuldades no controle e na padronização do produto final, além disso outro aspecto negativo que pode ser encontrado na utilização da erva-mate em novos produtos alimentícios, refere-se à perda de compostos fenólicos presentes na matéria prima (CARDOZO JUNIOR; MORAND, 2016). Para que um composto químico, como os compostos fenólicos, possa exercer atividade biológica, este deve atingir o alvo fisiológico numa concentração mínima que induza o efeito biológico e o mecanismo de ação (HOLST; WILLIAMSON, 2008). Os compostos fenólicos mais comuns nos alimentos nem sempre são os mais ativos biologicamente, por diferentes razões, como a baixa atividade intrínseca, baixa absorção intestinal ou rápida metabolização e excreção (BOWLES et al., 2017; MANACH et al., 2005).

2.3.4 *Metabolismo de compostos bioativos de fontes alimentares*

A ingestão diária de compostos bioativos não necessariamente reflete a dose absorvida. Para que um composto químico possa exercer atividade biológica, ele deve atingir o alvo fisiológico numa concentração mínima que determina tanto este efeito biológico quanto o mecanismo de ação (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009).

A biodisponibilidade de compostos bioativos presentes nos alimentos pode ser alterada por vários fatores: a complexidade da matriz alimentícia, a forma química do composto de interesse, estrutura e quantidade de outros compostos ingeridos concomitantemente (fatores exógenos) e ainda o tempo de trânsito intestinal, esvaziamento gástrico, metabolismo do composto e grau de conjugação, possíveis interações com proteínas na circulação sanguínea e tecidos, composição da microbiota intestinal e o perfil genético do indivíduo (fatores endógenos) (D'ARCHIVIO et al., 2007).

Pérez-vicente; Gil-Izquierdo; García-Viguera (2002), ao estudarem os efeitos da digestão gastrointestinal *in vitro* para antocianinas, vitamina C e compostos fenólicos do suco de romã perceberam que as mudanças de pH do trato gastrintestinal influenciaram na

biodisponibilidade dos compostos. Rodríguez-Roque et al. (2013) ao analisarem os efeitos da digestão gastrointestinal em compostos fenólicos, isoflavonas e atividade antioxidante de extrato de soja, também perceberam que a digestão gástrica melhorou a liberação de compostos fenólicos e isoflavonas da matriz, mas que em contraste, a concentração destes compostos diminuiu significativamente durante a digestão intestinal, tendo-se valores mais baixos de biodisponibilidade, inclusive os ácidos fenólicos não apresentaram-se bioacessíveis nas condições do ensaio. Chen et al. (2017), analisaram a influência da digestão gastrointestinal *in vitro* sobre a atividade antioxidante e a disponibilidade de polifenóis de folhas de batata doce e concluíram que os compostos fenólicos foram estáveis durante a digestão gástrica, mas que houve redução na quantidade de compostos fenólicos durante a transição do ambiente ácido do estômago para o ambiente intestinal alcalino. Esses resultados sugerem baixa estabilidade de compostos fenólicos à mudanças de pH, principalmente por apresentarem perdas de bioatividade ao saírem do ambiente ácido e entrarem no pH alcalino do trato intestinal. Apesar da absorção e o metabolismo dos compostos bioativos, em especial dos compostos fenólicos não ainda bem elucidada, sabe-se que além das mudanças de pH do trânsito gastrointestinal, a microbiota do cólon exerce um papel essencial no metabolismo dos compostos fenólicos em geral por consequência na sua biodisponibilidade (MANACH et al., 2005). Por exemplo, quanto aos ácidos clorogênicos, um importante ácido fenólico encontrado na erva-mate, sabe-se que sua maior parte é metabolizada e absorvida no cólon, onde estes compostos sofrerão hidrólise por esterases de origem microbiana e subsequente absorção ou metabolização adicional dos ácidos fenólicos livres (quínico, cumárico, cafeico e ferúlico) (Figura 7) (GONTHIER et al., 2003; OLIVEIRA; BASTOS, 2011; OLTROF et al., 2003). A maior parte dos ácidos clorogênicos ingeridos é encontrada no plasma e na urina na forma de metabólitos formados pela ação da microbiota e posterior metabolização tecidual (MANACH et al., 2005). Informações como essas ressaltam a importância da matriz alimentícia escolhida para ser enriquecida com compostos bioativos e as técnicas utilizadas para tanto, pois sabe-se que determinados alimentos contribuem ou não para a saúde da microbiota intestinal e que determinadas técnicas de desenvolvimento de produtos tendem a preservar de forma mais eficiente os compostos bioativos até o momento da sua absorção (ANWAR et al., 2012; DE VOS; DE VOS, 2012; ZUR MÜHLEN; SCHWARZ; MEHNERT, 1998)

Desta forma, pensando na melhor utilização e aplicabilidade em alimentos e na melhor absorção e biodisponibilidade no organismo, identifica-se a necessidade de processos tecnológicos que visem a preservação e a liberação controlada de compostos fenólicos da erva-mate buscando ampliação das formas de suas formas de consumo e a promoção de seus para uma maior gama da população (CARDOZO JUNIOR; MORAND, 2016).

Um dos métodos tecnológicos que pode ser utilizados para aprimorar a aplicação de extratos de erva-mate em alimentos, preservando suas características nutricionais e funcionais, é a microencapsulação, que possui como finalidades: diminuição das interações da substância encapsulada em relação aos fatores ambientais, impedindo perdas sensoriais e nutricionais; mascarar substâncias com sabores indesejáveis; melhorar a solubilidade da substância encapsulada e a sua incorporação em sistemas secos; permitir que a liberação da substância encapsulada seja modificada, ocorrendo de forma lenta ou a partir de determinado estímulo; reduzir a velocidade de evaporação de substâncias voláteis e aumentar o tempo de armazenamento das substâncias a encapsular (AL-KASMI et al., 2017; NUNES et al., 2015).

2.4 Encapsulação

A encapsulação trata-se de uma tecnologia que permite o revestimento de partículas sólidas, gotas de líquidos e dispersões, com um “filme protetor”, é um meio de embalagem, separação e armazenamento de materiais em cápsulas microscópicas para posterior liberação, essa técnica tem solucionado algumas limitações no emprego de ingredientes, extratos e compostos, sendo que pode suprimir ou atenuar *flavors* indesejáveis, reduzir a reatividade e a volatilidade e aumentar a estabilidade do “ingrediente” em condições ambientais adversas, como na presença de luz, oxigênio e pH extremos (SOBEL; GUNDLACH; SU, 2014; SOBEL; VERSIC; GAONKAR, 2014).

A encapsulação, geralmente, é empregada para melhorar a performance do material ou criar novas aplicações, mas, existem muitas razões para encapsular ingredientes, de modo geral, os ingredientes são ou podem ser encapsulados por três grandes motivos: proteger o ingrediente em si, melhorar o produto final como um todo, ou facilitar o processo de produção (SOBEL; VERSIC; GAONKAR, 2014).

O material a ser encapsulado é chamado de núcleo, e o material que forma a cápsula, de encapsulante, cobertura ou parede (VASISHT, 2014). Como núcleo pode-se ter pigmentos,

compostos de sabor, nutrientes, enzimas, conservantes, acidulantes, entre outros. Como encapsulante tem-se os carboidratos, ácidos graxos, alginatos, amidos, carragenas, caseinatos, celulose, ceras comestíveis, gelatina, gorduras, lipídios, pectinas, polietilenoglicol, quitosana entre outros (KAPUŚNIAK; TOMASIK, 2006; VASISHT, 2014).

Os diversos processos de microencapsulação podem produzir dois principais tipos de micropartículas, de acordo com a distribuição e o perfil de liberação de seu recheio. Os sistemas tipo “reservatório”, também chamados de mononucleados, são aqueles em que o recheio fica coberto por uma parede inerte. Micropartículas como estas são chamadas de microcápsulas. Nos sistemas do tipo “matriz”, ou multinucleados, o recheio fica disperso no agente encapsulante. As micropartículas com esta característica são designadas como microesferas. Um terceiro tipo é gerado pela combinação dos dois anteriores, no qual uma matriz multinucleada fica envolvida por um material de parede, sendo chamado de tipo “combinado” (Figura 8) (WANG; JIANG; HUANG, 2007).

Figura 8 - Representação esquemática dos sistemas de encapsulação



Fonte: Wang; Jiang; Huang (2007)

Os métodos de encapsulação podem ser divididos em físicos, químicos e físico-químicos. Nos métodos físicos encontramos o *spray drying*, *spray cooling*, pulverização em banho térmico, leito fluidizado, extrusão, cocristalização e liofilização. Como métodos químicos temos inclusão molecular e polimerização interfacial. E nos métodos físico-químicos temos: coacervação, emulsificação seguida de evaporação do solvente, microemulsão, pulverização em agente formador de reticulação e envolvimento lipossômico (BENITA, 2006). Uma das grandes importâncias e relevâncias das técnicas de encapsulação tem sido a preservação do potencial antioxidante de determinados alimentos/ingredientes e a viabilidade de sua aplicação em alimentos prontos para consumo o que representa um grande passo na indústria alimentar, bem como na alimentação humana (BOTELHO; CANAS;

LAMEIRAS,

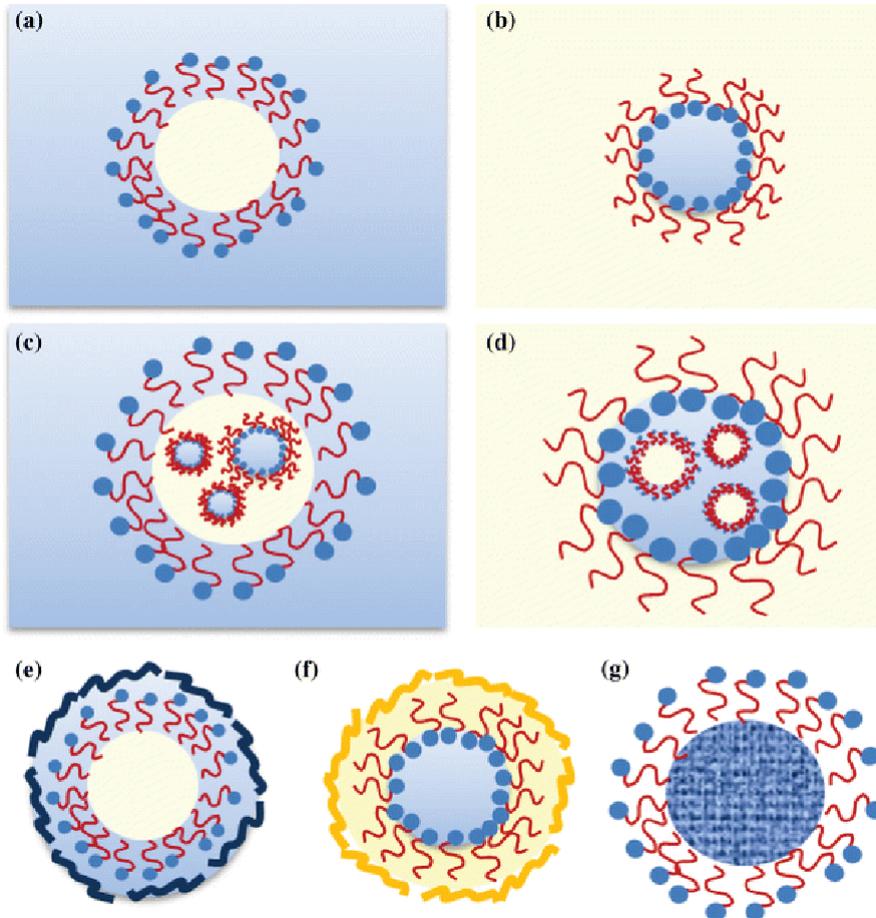
2017). Paini et al. (2015), ao encapsular polifenóis extraído do bagaço da azeitona utilizando maltodextrina como agente encapsulante encontrou o efeito da proteção térmica de maltodextrina para compostos fenólicos. O mesmo foi encontrado por Nunes et al. (2015), que ao microencapsular o extrato aquoso de folhas de *Ilex paraguariensis* com maltodextrina 20 %, 30 % e 40 % avaliou que as concentrações 30 % e 40 % foram capazes de reduzir a degradação de polifenóis durante a secagem por pulverização e aumentar sua estabilidade durante o armazenamento. Consoli et al. (2016), realizaram a encapsulação de ácido gálico utilizando lipídio como agente encapsulante e *spray chilling* como método de encapsulação e obtiveram resultados satisfatórios e boa eficácia de encapsulação. Outros estudos que testaram a conservação do potencial antioxidante e do teor de fenólicos totais de diferentes fontes por microencapsulação tiveram resultados favoráveis a sua utilização (COMUNIAN et al., 2016; KLEIN et al., 2015; NAUFALIN; RUKMINI, 2016; PALUPI; PRAPTININGSIH, 2016).

2.4.1 Encapsulação por emulsão – Partículas Lipídicas Sólidas (PLS)

Do ponto de encapsulação, as emulsões são um sistema atraente para a distribuição de compostos ativos, tanto lipofílicos como hidrofílicos (POOL et al., 2013).

As emulsões são sistemas de entrega coloidal, que basicamente consistem em um óleo, surfactante e água, elas podem ser classificadas de acordo com o tamanho de partícula em emulsões ou macroemulsões, microemulsões ou nanoemulsões (ĐORĐEVIĆ et al., 2015) ou de acordo com seus sistemas de entrega (Figura 9).

Figura 9 - Figura Esquemática de diferentes sistemas de entrega à base de emulsão



(a) emulsão óleo-em-água; (b) emulsão água-em-óleo; (c) emulsão dupla de água-em-óleo-em-água; (d) emulsão dupla óleo-em-água-em-óleo; (e) óleo de emulsão multicamada em água; (f) emulsão multicamada em óleo; (g) emulsões de partículas lipídicas sólidas (PLS)

As emulsões são amplamente utilizadas para proteção de fármacos (NARANG; DELMARRE; GAO, 2007) por oferecerem a vantagem de uma capacidade de carga de fármaco melhorada, maior estabilidade de armazenamento (PEDRO et al., 2016), formação espontânea, facilidade de fabricação e aumento de escala e biodisponibilidade do fármaco (TENJARLA, 1999). Sua utilização em alimentos também é considerada interessante, principalmente pelo fato de que o aprisionamento de ativos dentro das emulsões pode superar os problemas relacionados à baixa solubilidade e biodisponibilidade, bem como a baixa estabilidade dos ativos (ĐORĐEVIĆ et al., 2015). Cornacchia; Roos (2011), comprovaram a eficácia de emulsões para diminuir a degradação de β -caroteno. Pedro et al. (2016), utilizou PLS para proteger os compostos sensíveis de curcumina contra a oxidação do armazenamento.

Em geral, PLS têm certas vantagens em relação às emulsões convencionais, como o aumento da estabilidade física e química, a possibilidade de obter maior eficiência de encapsulamento, controle mais preciso sobre as propriedades de liberação dos ativos encapsulados, possibilidade de produção em grande escala e esterilização (FATHI; MOZAFARI; MOHEBBI, 2012), estas vantagens também permitem que sejam uma opção interessante de proteção de materiais com bioatividade (BAZZARELLI; PIACENTINI; GIORNO, 2017). No entanto, o carregamento do ativo e sua estabilidade dentro do lipídio é dependente do tipo de lipídio utilizado, ponto de fusão deste lipídio e o tipo de rede de cristal formada no resfriamento (AUGUSTIN; HEMAR, 2009).

As PLS são formadas quando a fase de óleo e água é homogeneizada a uma temperatura acima do ponto de fusão da fase lipídica para evitar a solidificação da gordura durante a homogeneização, posteriormente, o arrefecimento (quando os lipídios cristalizam) precisa ser cuidadosamente controlado para obter um tamanho pequeno das gotículas da emulsão e evitar a agregação das partículas e vazamento indesejável dos ativos a partir delas (ĐORĐEVIĆ et al., 2015). Um dos problemas que pode ocorrer na entrega de ativos usando PLS é um efeito de liberação de explosão causado pela presença de ativos no invólucro exterior, para diminuir o efeito da explosão, diminui-se a concentração de surfactante e a temperatura de armazenamento (FATHI; MOZAFARI; MOHEBBI, 2012), neste sentido, a utilização de PLS para transporte e proteção de ativos em alimentos que se mantenham sob refrigeração, é uma estratégia interessante.

2.4.2 *PLS de cera de abelha*

O agente encapsulante deve ser escolhido considerando as características físico-químicas do composto ativo a ser encapsulado, o tipo de aplicação pretendida e o método de microencapsulação selecionado (VASISHT, 2014). Os lipídios consistem em um amplo grupo de compostos solúveis em solventes orgânicos e pouco solúveis ou insolúveis em água, assim seu uso como agente encapsulante tende a retardar a liberação do ingrediente ativo, quando comparado com compostos hidrofílicos. Podem ser usados como materiais de parede a parafina, tristearina, ácido esteárico, monoglicerídeos, diglicerídeos, cera de abelha, óleos e gorduras (CONSOLI et al., 2016; GONÇALVES; ESTEVINHO; ROCHA, 2016).

A cera de abelha é uma mistura complexa formada por hidrocarbonetos, ésteres, ácidos, álcoois e substâncias exógenas, no entanto sua composição pode variar dependendo da família e do perfil genético das abelhas, bem como de sua dieta (FRATINI et al., 2016). Inicialmente, pesquisadores foram capazes de caracterizá-la apenas pelo tamanho das cadeias de carbono, descobrindo que poderiam conter hidrocarbonetos de cadeia média com 16 carbonos até cadeias muito longas de 30 carbonos (TULLOCH, 1970). Entretanto, com os avanços nos estudos descobriu-se que os hidrocarbonetos representam apenas 14 % aproximadamente da composição da cera, esta ainda possui diversos elementos como ácidos graxos livres (12-14 %), grupamentos ésteres que incluem monoésteres e hidroximonoésteres (35 % -45 %) derivados de ácidos palmítico e oleico e ésteres complexos (15 %-27 %) ligados a outras moléculas de ácidos graxos. Ademais, em menor quantidade podem ser encontrados álcoois graxos livres, alguns resíduos de pólen, própolis e substâncias aromáticas (FRATINI et al., 2016; TULLOCH, 1970).

Há muitos anos é feita a utilização da cera de abelha, seu uso foi reportado desde 1500 a.C. no Antigo Egito onde esta matéria-prima era um item essencial para muitas preparações como cremes e pomadas com a finalidade de tratar queimaduras, feridas e dores. Atualmente, o aproveitamento da cera de abelha é amplo e engloba diversas áreas como a de alimentos, medicamentos, inclusive a medicina alternativa (BOGDANOV, 2004; FRATINI et al., 2016; ڤانغ, 2011).

Um componente da cera de abelha com grande interesse em medicina é D-002. Este componente é uma mistura alcoólica natural de alto peso molecular que foi isolada e purificada a partir da cera de abelha de *Apis mellifera*. O D-002, apresenta atividade antiúlcera, atividade antiinflamatória, ação protetora para a mucosa gastrointestinal – aumento da secreção de muco gástrico melhora na sua composição (aumento do teor de proteínas mucosas, glicoproteínas e macromoléculas sulfatadas) (CARBAJAL et al., 1995) - efeito positivo no tratamento de pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica e sintomas de osteoartrite (ILLNAIT et al., 2005) e, em estudos realizados em modelos de animais murinos, foi particularmente eficaz no refluxo gastroesofágico e problemas intestinais de acidez (RAVELO et al., 2011; ZAMORA et al., 2014).

O uso da cera de abelha como agente encapsulante se dá em grande parte pela indústria farmacêutica, no entanto, estudos *in vivo* vêm abordando seu potencial antimicrobiano e seus efeitos benéficos a saúde humana, o que tem despertado maior interesse da indústria de

alimentos em expandir sua aplicabilidade (FRATINI et al., 2016; MARTÍNEZ-ABAD; LAGARÓN; OCIO, 2014).

Como agentes encapsulantes as ceras incluem vantagem como boa estabilidade em diferentes níveis de pH e umidade, aplicação segura bem estabelecida (biocompatível e não imunogênica) em seres humanos, natureza insolúvel em água, efeito mínimo nos alimentos no trato gastrointestinal (OBAIDAT; OBAIDAT, 2001; RANJHA; KHAN; NASEEM, 2010). Além disso PLS em geral, aparecem como sistemas transportadores muito atraentes quando a proteção dos ativos contra a degradação química ou quando a liberação prolongada é necessária, também apresentam as vantagens de baixa citotoxicidade e custos relativamente baixos (RANJHA; KHAN; NASEEM, 2010).

Varshosaz; Keihanfar (2001) e Ranjha; Khan; Naseem (2010) ao realizarem testes de microencapsulação dos fármacos propranolol e flurbiprofeno, respectivamente, utilizando a cera de abelha atestaram seu potencial para formulação de microesferas insolúveis em água e com liberação controlada. Da mesma forma Chitprasert; Sutaphanit (2014), obtiveram sucesso na microencapsulação e liberação controlada (intestino de suínos) de óleo essencial de manjeriço utilizando gelatina, carboximetil celulose e cera de abelha e Polkovnikova; Slivkin (2016), obtiveram liberação controlada do fármaco vinpocetine ao realizarem sua microencapsulação com cera de abelha e óleo de cacau.

2.5 Desenvolvimento de novos produtos: iogurte com extrato de erva-mate

A demanda do público consumidor por produtos prontos para consumo e com efeitos benéficos à saúde (POPKIN; KENAN JR., 2016), pode ser atendida através da utilização de alimentos acessíveis e fonte de compostos bioativos, como, por exemplo, a erva-mate (DELADINO et al., 2015), utilizando técnicas seguras de aplicabilidade e preservação da funcionalidade dos produtos como a microencapsulação (SOBEL; VERSIC; GAONKAR, 2014) é um dos caminhos para o desenvolvimento de novos produtos alimentícios que busquem reverter o quadro contínuo e crescente de transição nutricional da população.

Muitos alimentos têm surgido com a proposta de facilitar a vida do consumidor fornecendo nutrientes importantes para sua saúde e bem-estar de forma rápida e fácil. Porém, além da facilidade e funcionalidade os novos produtos lançados no mercado precisam cair no

gosto e no hábito alimentar do consumidor (STEWART-KNOX; MITCHELL, 2003). Um exemplo de alimento que pode ser considerado saudável e nutritivo, pronto para consumo e que se encontra no mercado, disponível em diferentes tipos, marcas, sabores e preços, cujo consumo faz parte da rotina do consumidor são as bebidas lácteas e iogurtes. O iogurte lidera a categoria de produtos lácteos cultivados em termos de volume de produção nos Estados Unidos e atividade de pesquisa (ARYANA; OLSON, 2017). O grande interesse de estudo e o aumento no consumo de iogurtes, se deve principalmente à suas propriedades nutricionais benéficas à saúde, além de ser considerado equilibrado e adequado a qualquer dieta (GHARIBZAHEDI; CHRONAKIS, 2018). Este tipo de produto, de uma forma geral, contém a mesma quantidade de nutrientes que o leite processado, apesar que durante a fermentação ocorre um aumento na biodisponibilidade de cálcio, lipídeos e proteína e uma redução no teor de lactose (ARYANA; OLSON, 2017)

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados especifica que se entende por Leites Fermentados os produtos adicionados ou não de outras substâncias alimentícias, obtidas por coagulação e diminuição do pH do leite, ou reconstituído, adicionado ou não de outros produtos lácteos, por fermentação láctica mediante ação de cultivos de microrganismos específicos. Estes microrganismos específicos devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante seu prazo de validade. Entende-se por Iogurte, Ygor ou Yoghurt um leite fermentado cuja fermentação se realiza com cultivos protosimbióticos de *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, aos quais se podem acompanhar, de forma complementar, outras bactérias ácido-lácticas que, por sua atividade, contribuem para a determinação das características do produto final (BRASIL, 2005).

Os produtos lácteos fermentados, além de boa aceitabilidade contêm níveis adequados de certas culturas vivas e ativas, a saber, probióticos que ajudam a melhorar o equilíbrio das bactérias "benéficas" *versus* "indesejáveis" no trato intestinal (LEITE; BARROZO; RIBEIRO, 2012). Pesquisas sobre produtos lácteos fermentados mostraram seu efeito sobre o sistema imunológico, além de promover a saúde intestinal (HASHEMI GAHRUIE et al., 2015; RAMOS et al., 2016). O impacto do consumo de produtos fermentados como o iogurte na melhoria da função de imunidade no organismo contra substâncias cancerígenas e toxinas nocivas é alvo de estudo e curiosidade (HASHEMI GAHRUIE et al., 2015). Além disso Cilla et al. (2012) ao estudar a influência da matriz alimentícia na biodisponibilidade de compostos

antioxidantes (tocoferóis, carotenoides e ácido ascórbico), concluíram que a matriz a base de leite influencia positivamente na bioacessibilidade dos compostos estudados.

Os estudos que buscaram o desenvolvimento de novas bebidas lácteas com apelo funcional através do acréscimo de outros componentes como extrato de orégano, óleo essencial de orégano (BOROSKI et al., 2012), soja, cereais, concentrado de uva (CODA et al., 2012) polpa de acerola, farinha de linhaça (SILVA et al., 2015) avaliaram o resultado final obtido como positivo na formulação e aceite de iogurtes e bebidas lácteas.

Nesta perspectiva, este trabalho busca o desenvolvimento de um iogurte com extrato microencapsulado de erva-mate, objetivando expandir os benefícios nutricionais e funcionais desta planta para um maior número de pessoas, incidindo positivamente no perfil de saúde da população.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia deste trabalho seguiu a ordem disposta no fluxograma da Figura 10.

Figura 10 - Fluxograma de ordem metodológica de execução do trabalho



3.1 Matéria-Prima

As folhas *in natura* de erva-mate foram cedidas pela empresa INOVAMATE, do município de Ilópolis - RS. A amostragem de folhas foi coletada em três áreas de cultivo diferentes, através de quatro subamostras por planta orientadas pelos quadrantes Norte, Leste, Sul e Oeste. As subamostras foram então reunidas em uma única amostra, amostra composta.

As folhas foram submetidas à secagem em estufa por 20 h em temperatura de 50 ± 2 °C. Após a secagem, as folhas de erva-mate foram trituradas em moinho de facas até atingir tamanho de partícula menor que 3,5 mm. Em seguida, a amostra foi embalada à vácuo e mantida sobre congelamento à -18 ± 2 °C até a utilização.

3.2 Obtenção e avaliação do extrato

O extrato de erva-mate foi preparado na concentração de 20 % em água destilada, devido a ensaios preliminares e de acordo com adaptações do método descrito por Murakami et al. (2011). O material foi aquecido por 5 min à 90 ± 2 °C e posteriormente foi realizada a filtração em tela de nylon utilizando uma bomba a vácuo.

Após obtidos os extratos, estes foram encaminhados para processos de secagem e análise de potencial antioxidante conforme descrito na Tabela 1, juntamente com uma amostra de erva-mate não submetida à alta temperatura.

Tabela 1 – Condições de temperatura e tipo de secagem dos extratos de erva-mate para avaliação de potencial antioxidante

Amostra	Temperatura de extração	Tratamento de secagem	Avaliação Potencial Antioxidante
Erva-mate moída	Ambiente	-	ABTS
Erva-mate moída	90 ± 2 °C	-	ABTS
Erva-mate moída	90 ± 2 °C	<i>Spray dryer</i>	ABTS
Erva-mate moída	90 ± 2 °C	Liofilização	ABTS

Fonte: Autor (2018)

O extrato submetido a secagem por *spray dryer* utilizou temperatura de 120 ± 2 °C e vazão de 0,64 L/h. O extrato submetido a liofilização foi levado ao ultra freezer permanecendo por 48 h à -80 ± 2 °C para posterior processo de liofilização por 60 h à -40 ± 2 °C. Após, foram realizadas análises de potencial antioxidante (Item 3.2.1) dos extratos e de erva-mate não submetida à extração com alta temperatura, objetivando a escolha do melhor método de secagem do extrato, visando a manutenção de seu potencial antioxidante. O extrato que melhor manteve sua bioatividade após a secagem foi ressuspenso em água destilada (40 %),

submetido a avaliação e caracterização e então encaminhado para realização dos testes de microencapsulação através de microemulsão.

3.2.1 Avaliação do potencial antioxidante e fenólicos totais do extrato de erva-mate

O extrato obtido foi avaliado em relação a atividade antioxidante utilizando o método ABTS (2,2 – azinobis - 3- etil – benzotiazolina –6- ácido sulfônico) de Re et al. (1999), com adaptações e o método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) proposto por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), com adaptações.

Para realização dos testes de ABTS, uma solução estoque de ABTS foi preparada utilizando-se 0,0384 g de radical ABTS e água destilada, esta foi acondicionada sob refrigeração e ao abrigo da luz. Após, preparou-se a solução estoque de persulfato de potássio onde 0,0427 g de foram dissolvidos em 100 mL de água destilada. Na sequência, sob abrigo da luz, misturou-se 50 mL de solução estoque de ABTS e 50 mL da solução de persulfato. A mistura (radical ABTS) foi armazenada em temperatura ambiente, em local escuro por 16 h. Após o tempo estabelecido ajustou-se o radical ABTS à absorvância de 0,695 a 0,705 em 734 nm e em tubos de ensaio acrescentou-se 20 µl de amostra e 980 µl de radical ABTS ajustado. Os tubos foram agitados e permaneceram sob abrigo da luz por 6 min. A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro em 734 nm. A atividade antioxidante determinada pelo método ABTS foi expressa em mmol de Trolox/g de amostra de acordo com uma curva de calibração previamente construída.

Para realização dos testes de DPPH, foi preparada uma solução 0,1 mM de DPPH com etanol absoluto e esta solução foi ajustada entre 0,500 e 0,600 de absorvância em 515 nm. Em tubos de ensaio foi acrescentado 0,1 mL da amostra e uma alíquota de 2 mL da solução ajustada. Os tubos foram agitados por 3 segundos e acondicionados ao abrigo de luz por 30 minutos. A medida da absorvância em espectrofotômetro foi a 515 nm. A atividade antioxidante determinada pelo método DPPH foi expressa em mmol de Trolox/g de amostra de acordo com uma curva de calibração previamente construída.

A análise de fenólicos totais foi realizada segundo metodologia de Souza e Correia (2012), com adaptações. Em tubos de ensaio foram adicionados 1mL de amostra, 1 mL de etanol 95 %, 5 mL de água destilada e 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteau 50 % (v/v). Os

tubos foram agitados em vórtex por 30 segundos e após foi adicionado 1 mL da solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 5 % e agitados por mais 3 segundo. Os tubos foram deixados em repouso na ausência de luz por 60 minutos. A amostra em branco foi preparada nas mesmas condições que a amostra, contanto que o volume da amostra foi substituído por 1 mL do solvente na qual esta foi preparada. Os resultados de fenólicos totais foram apresentados em mg ácido gálico/ml de amostra de acordo com uma curva de calibração previamente construída.

3.2.2 Avaliação do potencial hidrogeniônico (pH) do extrato e comportamento do potencial antioxidante em diferentes pHs

Para avaliação do potencial hidrogeniônico (pH) do extrato utilizou-se pHmetro digital (marca Digimed, modelo DM-22) calibrado com soluções-tampão nas faixas de pH 7,0 e 4,0, de acordo com as instruções do fabricante.

O comportamento do potencial antioxidante do extrato perante diferentes pHs foi realizado segundo método proposto por Chen et al. (2017), submetendo o extrato a 4 condições diferentes: em pH ácido (2,2), utilizando ácido clorídrico (HCl) para ajuste; em pH básico (8,12) utilizando bicarbonato de sódio (NaHCO_3) para o ajuste; em transição de pH ácido para pH básico (2,2 – 8,12) utilizando HCl e NaHCO_3 , respectivamente; e em pH 4,3 também utilizando HCl e NaHCO_3 para o ajuste. Para os testes de pH ácido e básico, os extratos ajustados foram mantidos em *shaker* por 2 h à 37 °C sob agitação de 100 rpm. No teste de transição, de pH ácido para básico, o extrato foi mantido em pH ácido por 2 h no *shaker* e depois de seu pH ajustado para básico, foi mantido por mais 2 h no *shaker*. Esses três ensaios foram motivados pela busca de mimetizar os pHs do trato digestivo *in vivo*. No quarto teste, ajustou-se o pH do extrato para 4,3 e este permaneceu sob refrigeração (4 °C) por 2 h, simulando a adição do extrato em iogurtes e bebidas lácteas fermentadas. Posteriormente, foi realizada análise do potencial antioxidante de cada um dos extratos pelo método ABTS (Item 3.2.1).

3.2.3 Teor de sólidos solúveis

A avaliação do teor de sólidos solúveis do extrato foi determinada usando-se refratômetro digital (ATAGO, modelo Pocket PAL-J) calibrado com água destilada, de acordo com as instruções do fabricante. O resultado foi expresso em °Brix.

3.2.4 Determinação de cor

A avaliação da cor do extrato de erva-mate foi realizada utilizando colorímetro (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 ($+b^*$).

3.3 Obtenção e avaliação das PLS

A microencapsulação do extrato de erva-mate foi realizada com base no método de microemulsão de Gifani et al. (2009), com adaptações. O agente encapsulante utilizado foi cera de abelha, adquirida na empresa Fenix Ceras e o núcleo utilizado foi extrato liofilizado de erva-mate resuspendido em diferentes concentrações. A proporção de encapsulante:núcleo, selecionada em ensaios preliminares, foi de 1:1.

A cera de abelha foi aquecida em banho termostático (MA 127, MARCONI) à 75 °C até estar completamente fundida. O extrato liofilizado foi resuspendido nas concentrações 5%, 10%, 20%, 30% e 40% e acrescido de Tween 80 (1%). Após, aquecidos à mesma temperatura da cera, o extrato aquoso e o Tween 80 foram vertidos sobre a cera de abelha fundida e a mistura agitada com agitador mecânico (713, FISATOM) à 10.000 rpm por 2 min. Em seguida, a mistura foi arrefecida rapidamente com adição de 100 mL de água gelada sob agitação contínua, sob mesma agitação. As PLS resultantes foram recolhidas por filtração e lavadas com água para remoção do extrato não encapsulado e resíduo de surfactante. A secagem foi realizada em temperatura ambiente por 72 h. As PLS foram padronizadas por granulometria, através de uma peneira de 25 mesh. As PLS que apresentaram melhor eficiência de encapsulação, considerando as diferentes concentrações do núcleo, foram selecionadas para a continuidade dos ensaios.

3.3.1 Avaliação da Eficiência de Encapsulação

A solução coletada na filtração após a formação das PLS foi submetida a avaliação antioxidante pelo método de ABTS. Através da relação entre o potencial antioxidante do extrato *in natura* e do potencial antioxidante da solução residual não encapsulada foi avaliada a eficiência da encapsulação (EE) (Equação 1).

$$EE\% = \frac{AA_0 - AA_R}{AA_0} * 100/ \quad (1)$$

Em que:

AA₀: Atividade
antioxidante do extrato
inicial; AA_r: Atividade
antioxidante do resíduo.

3.3.2 Avaliação por Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

O extrato de erva-mate, o agente encapsulante (cera de abelha) e as PLS foram analisados por espectroscopia na região do infravermelho para identificar os grupamentos funcionais presentes. As condições operacionais foram região de varredura 4000 a 650 cm⁻¹, resolução de 4 cm⁻¹, e o registro dos espectros se deu através de Transmitância (%T). Os espectros foram obtidos por FTIR, utilizando equipamento Cary 630 FTIR, Agilent Technologies.

3.3.3 Avaliação Morfológica

As características superficiais (externas) foram avaliadas através do uso de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para MEV, foram realizadas micrografias das amostras, após serem colocadas sobre *stubs* e recobertas com camada de ouro. As observações foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura com aceleração de 20 kV.

3.3.4 Caracterização química

A composição química centesimal das PLS contendo de extrato de erva-mate quanto à aos teores de umidade, cinzas, proteína (PTN), carboidratos (CHO), lipídeos (LIP) e valor calórico total (VCT) foi realizada segundo os métodos propostos por Adolf Lutz (2008).

3.3.5 Análises de comportamento térmico das micropartículas

O comportamento térmico das PLS foi avaliado por análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), equipamento Shimadzu modelo DSC-60. A análise consistiu no aquecimento de 5 mg de amostra na faixa de 25 °C a 300 °C, utilizando atmosfera de nitrogênio e uma taxa de aquecimento de 10 °C/min. Os cálculos de entalpia e as temperaturas de transição foram analisados usando o software Universal Analysis (TA Instruments).

3.3.6 Solubilidade das PLS em água

A solubilidade das PLS foi determinada segundo a metodologia descrita por Canochauca et al. (2005), com adaptações. Para as análises utilizou-se 1 g de cada amostra adicionada à 100 mL de água destilada, obtendo-se uma suspensão. A mesma foi agitada em manta de aquecimento, por 5 min em velocidade máxima em temperatura ambiente. Posteriormente ela foi filtrada em tela de nylon utilizando bomba de vácuo e em seguida colocado 25 mL do filtrado em placa de Petri seca e vazia, com massa conhecida a qual foi levada à estufa a 105 °C, por 5 h. A solubilidade das PLS em água foi calculada pela diferença de massa e os resultados foram expressos em percentual.

3.3.7 Proteção antioxidante ao longo do tempo

A atividade antioxidante do encapsulado foi avaliada ao longo de 45 dias para averiguar se a PLS foi capaz de manter o potencial antioxidante do extrato de erva-mate. Em um erlenmeyer colocou-se 5 g de cápsula em contato com 30 mL de água. A mistura foi agitada com bastão de vidro e acondicionada sob refrigeração (4°C) por 45 dias. Após, 7, 20, 30 e 45 dias, a

cápsula foi rompida em banho termostático a 65 °C. A mistura foi filtrada e o filtrado foi submetido a análise de potencial antioxidante pelo método de ABTS.

3.3.8 Digestibilidade *in vitro*

As PLS foram submetidas a teste *in vitro* de digestibilidade segundo método de Hu et al. (2010), com adaptações. Para a análise foram utilizadas 0,5 g de PLS. A pancreatina (0,060g) foi preparada com 1,5 mL de solução tampão fosfato de potássio e os extratos biliares (0,188g) foram preparados com 0,5 mL do mesmo tampão. A amostra de microcápsulas e as enzimas tiveram seu pH ajustado para 7 e foram submetidos a agitação em *shaker* por 2 h a 37 °C.

Posteriormente, as enzimas foram inativadas com adição de 4 mL de acetona. Foram acrescentadas 3 gotas de fenolftaleína 1% e foi realizada a titulação com NaOH. Calculou-se o percentual de ácidos graxos livres (% AGL) através da equação 2:

$$\%AGL = 100 \times \frac{V_{NaOH} \cdot M_{NaOH} \cdot M_{lipidio}}{W_{lipidio}^2} \quad (2)$$

Sendo:

V_{NaOH} : volume do NaOH M_{NaOH} : molaridade do NaOH

$M_{lipidio}$: massa molar do lipídio de referência $W_{lipidio}^2$: massa total do lipídio²

3.4 Elaboração e avaliação de iogurte natural com extrato de *Ilex paraguariensis*

Foram elaboradas três formulações de iogurte natural, sendo uma padrão (leite e fermento), uma enriquecida com extrato liofilizado de erva-mate (leite, fermento e extrato liofilizado) e a última enriquecida PLS (leite, fermento e PLS de extrato de erva-mate).

Para a elaboração dos iogurtes naturais foram utilizados, leite integral pasteurizado UHT e realizada a inoculação da cultura láctea composta por *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*. A fermentação ocorreu no período de aproximadamente 6 h em estufa de fermentação com controle da temperatura em 45 °C e até a mistura atingir pH 4,5. Após completado o processo de fermentação, o iogurte foi separado em 3 porções, sendo uma porção padrão (sem nenhuma adição), uma com 1% extrato liofilizado de erva-mate e com microcápsulas (quantidade equivalentes à 1% do extrato liofilizado). O iogurte foi acondicionando sob refrigeração (4 °C). Este resfriamento, por sua vez, tem por objetivo cessar o processo fermentativo e evitar a queda excessiva do pH. O iogurte foi então, homogeneizado (agitação manual) e envasado em embalagens assépticas, ficando armazenado sob refrigeração (4°C) até o momento das demais análises.

3.4.1 Determinação de cor

As avaliações de cor das formulações de iogurtes foram realizadas conforme descrito no Item 3.2.4.

3.4.2 Potencial hidrogeniônico (pH) e acidez titulável do iogurte

A avaliação do pH do iogurte seguiu o método descrito no Item 3.2.3 e foi realizada ao final da elaboração do iogurte e após 7 dias de armazenamento.

Para a análise de acidez titulável utilizou-se a metodologia proposta pelo Instituto Adolfo Lutz (2008), com adaptações. Utilizou-se 10 mL de amostra de iogurte diluído em 10 mL de água destilada e 4 gotas de fenolftaleína. Posteriormente a amostra foi titulada com solução de hidróxido de sódio (0,1 M), sob agitação constante, até coloração rósea persistente por trinta segundos. A acidez foi calculada através da Equação 3:

$$\text{Acidez em solução molar \% (v/n)} = \frac{V.F. \cdot 100}{P. 10} \quad (3)$$

Sendo:

V = Volume de NaOH gasto na titulação

F = Fator de correção de NaOH

P = gramas de amostra

3.4.3 *Quantificação de bactérias lácticas no iogurte*

Foi realizada a quantificação de bactérias lácticas nos iogurtes após 7 dias de armazenamento. Para tal, inoculou-se as amostras em placas contendo o meio Agar MRS (De Man, Rogosa e Sharpe), com sobrecamada, com incubação a $32\pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 horas, conforme metodologia descrita por Silva et al. (2010). No final da análise foi realizada contagem das colônias.

3.4.4 *Análise Sensorial do iogurte natural enriquecido com extrato de erva-mate*

A análise sensorial do iogurte formulado foi realizada no Laboratório de Análise Sensorial do CEPA - Universidade de Passo Fundo, que possui cabines sensoriais próprias e individuais sob condições adequadas de luz, som e isolamento. Os testes realizados foram teste afetivo de aceitação e atitude de compra.

Os testes de aceitação e intenção de compra foram realizados com 60 provadores não treinados, verbalmente recrutados. Foram excluídos provadores com intolerância a lactose e diabéticos. Os participantes foram orientados sobre os procedimentos da análise sensorial aplicada e preencheram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Amostras de 20 g das formulações, em temperatura de aproximadamente 4°C , foram apresentadas aos provadores em cabines, de forma aleatória, servidas em copos plásticos descartáveis, codificados com números de três dígitos, os dados foram coletados através do preenchimento das fichas visando informar, aceitação (cor, sabor, textura e impressão global: escala hedônica de 9 pontos ancorados aos extremos 'desgostei muitíssimo' e 'gostei muitíssimo') e intenção de compra (escala de 5 pontos ancorados nos extremos 'compraria sempre' a 'nunca compraria') (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 2007).

A realização desta análise foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Passo Fundo, sob número CAAE 70617417.0.0000.5342.

3.5 Análise dos dados

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística através da Análise de Variância (ANOVA), utilizando o Software ESTATISTICA 7, seguido pelo teste de comparação de médias de Tukey, a 5% de significância.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção e caracterização do extrato de erva-mate

A Tabela 2 apresenta os resultados do potencial antioxidante dos extratos aquosos de erva-mate (20 %) secos em *spray dryer* e por liofilização, extrato não submetido a secagem (extrato *in natura*).

Tabela 2 - Potencial antioxidante de extratos submetidos a diferentes métodos de secagem

Amostra	Temperatura de extração	Tratamento de secagem	ABTS (mmol Trolox/g)
Erva-mate moída	90 ± 2 °C	-	13,96 ± 0,29 ^b
Erva-mate moída	90 ± 2 °C	<i>Spray dryer</i>	14,88 ± 0,19 ^b
Erva-mate moída	90 ± 2 °C	Liofilização	15,05 ± 0,06 ^b

Os resultados expressam a média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo Teste Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Autor (2018)

Os extratos submetidos a secagem por *spray dryer* e liofilização não apresentaram perdas em seu potencial antioxidante quando comparados ao extrato *in natura* (não submetido a secagem). Este resultado nos mostra que nas condições testadas ambos, *spray dryer* e liofilização, poderiam ser utilizados para secagem do extrato sem que haja perdas no potencial antioxidante. Ratti (2001), realizou um estudo de revisão sobre a secagem com ar quente e liofilização em alimentos. O autor verificou que apesar da liofilização possuir restrições de aplicação na indústria de alimentos devido seu alto custo de operação, é uma tecnologia considerada adequada para diferentes alimentos. Ciurzyńska; Lenart (2011), concordam que a aplicação da liofilização na indústria de alimentos ainda é restrita devido ao seu valor de utilização, mas também mencionam que a liofilização é um método de secagem que permite a obtenção de materiais secos com características típicas da matéria-prima e que é utilizada para a preservação confiável de uma ampla variedade de produtos, além de exigir os mais altos padrões de confiabilidade e controle. Os produtos liofilizados são muito estáveis e são fáceis de transportar e armazenar (MORAIS et al., 2016).

Considerando a preservação do potencial antioxidante por ambas as técnicas de secagem testadas e as vantagens apontadas pela literatura, optou-se pela continuidade dos nossos ensaios

utilizando a técnica de liofilização. A Figura 11 apresenta uma imagem do extrato liofilizado.

Figura 11 – Extrato liofilizado de erva-mate



Fonte: Autor

4.1.1. Avaliação do potencial antioxidante e fenólicos totais do extrato liofilizado

Os resultados do potencial antioxidante e fenólicos totais do extrato liofilizado estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3- Resultados da avaliação do potencial antioxidante e fenólicos totais do extrato liofilizado

Método de avaliação	Resultados
DPPH (mmol equivalente a Trolox/g)	10,50 ± 0,18
ABTS (mmol equivalente a Trolox/g)	14,88 ± 0,19
FENÓIS (mg equivalente a ácido gálico/g)	11,51 ± 1,36

Os resultados expressam a média ± desvio padrão.

Fonte: Autor (2018)

Os resultados de potencial antioxidante e fenólicos totais (Tabela 3) caracterizam e confirmam o potencial bioativo e funcional do extrato liofilizado de erva-mate. Os resultados indicam a presença de compostos bioativos antioxidantes.

O potencial antioxidante e o teor de fenóis totais dos extratos de erva-mate têm atraído a atenção da população mundial e expandido o consumo de chá mate para continentes onde culturalmente não existia o hábito de consumo (CARDOZO JUNIOR; MORAND, 2016). Os antioxidantes naturais são conhecidos por retardar o dano oxidativo causado pela produção de espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio. A oxidação de constituintes celulares e outros componentes podem levar a modificações estruturais e conseqüentemente causar perda de sua atividade biológica. Esse fenômeno, está associado à ocorrência de várias patologias, como câncer, cardiopatia e diabetes (BRACESCO et al., 2011). Cardozo Junior;

Morand (2016), mencionam que, com base na composição fitoquímica da erva-mate e nos dados trazidos por outros estudos sobre os efeitos biológicos associados a esses bioativos, os produtos de erva-mate podem representar fontes alimentares interessantes para a nutrição humana relacionada à saúde cardiovascular. De forma semelhante, os fitoquímicos presentes na erva-mate, em especial os polifenóis, são apontados como responsáveis pelos efeitos hipoglicemiantes e antiobesogênicos (GAMBERO; RIBEIRO, 2015).

Riachi; De Maria (2017), em uma revisão de literatura mostram que se os resultados positivos e consistentes em relação à ação dos fitoquímicos da erva-mate *in vivo* forem confirmados ao longo do tempo, ela pode ser reconhecida como um alimento funcional.

4.1.2 Comportamento do potencial antioxidante do extrato em diferentes pHs

A Tabela 4 apresenta os resultados do comportamento do potencial antioxidante do extrato de erva-mate submetido a diferentes pHs.

Tabela 4 – Potencial antioxidante do extrato de erva mate submetido a diferentes pHs

Condições de pH da amostra	ABTS (mmol Trolox/g)
pH 5,3	11,18±0,06 ^a
pH 2,2	9,66±0,27 ^c
pH 8,16	10,78±0,20 ^a
pH 2,2 + transição para pH 8,12	6,79±0,62 ^d
pH 4,38	8,45±0,14 ^b

Os resultados expressam a média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo Teste Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Autor (2018)

O extrato liofilizado de erva-mate apresentou pH inicial de 5,3 e mostrou perda de atividade antioxidante quando submetido ao pH que mimetiza o pH estomacal. A perda de atividade antioxidante também ocorreu quando simulada a passagem do extrato do pH estomacal para o pH intestinal e quando simulada a adição do extrato em pH de iogurtes e bebidas lácteas fermentadas. Esses resultados nos mostram que mudanças de pH podem prejudicar o mecanismo de ação e, por consequência, a atividade biológica do extrato liofilizado de erva-mate, limitando sua aplicabilidade em alimentos.

Os benefícios dos compostos antioxidantes para a saúde dependem da quantidade ingerida e da biodisponibilidade destes nos tecidos alvos. Apesar de não serem utilizadas enzimas digestivas nesta análise, nossos resultados mostram que o destino gastrointestinal dos compostos não só é comprometido pela sua quantidade/natureza química, mas também pelo ambiente físico-químico específico em cada estágio de digestão. Villacís-Chiriboga et al. (2017), que averiguaram mudanças na composição fitoquímica, bioatividade e digestibilidade *in vitro* de folhas de guayusa (*Ilex guayusa Loes*) também perceberam que durante a digestão gastrointestinal *in vitro*, a capacidade antioxidante medida pelo método ABTS diminuiu de forma significativa. Além disso, mencionam que é possível que o pH possa exercer um efeito sobre a estrutura dos compostos fenólicos ao longo da digestão, o que também pode afetar sua capacidade antioxidante. Esta característica é atribuída, principalmente, às estruturas particulares e grupos funcionais de compostos fenólicos. (TAGLIAZUCCHI et al., 2010).

Koehnlein et al. (2016), mostraram que após a digestão *in vitro*, cereais, legumes, vegetais, tubérculos, chocolates e frutos apresentaram maior conteúdo fenólico e atividades antioxidantes superiores às obtidas por extração aquosa. Ao contrário, a digestão causou redução nos conteúdos fenólicos e nas atividades antioxidantes das bebidas como vinho tinto, café e erva-mate. O autor ainda sugeriu que os fenólicos de grupos de alimentos com matriz sólida e complexa são protegidos contra a ação enzimática e alteração no pH durante a digestão, o que não ocorre em matrizes de alimentos líquidos, como as bebidas. Friedman; Jürgens (2000) submeteram diferentes polifenóis a diferentes pHs e concluíram que cada composto pode se comportar de maneira diferente diante das mudanças de pHs. Os autores também mencionam que as transformações ocorridas não são reversíveis, o que pode explicar a maior perda de atividade do extrato submetido à transição de pH.

O fato do extrato também apresentar perdas quando submetido ao pH de iogurtes e bebidas lácteas (4,3), nos leva a crer que se adicionado nesses alimentos, o extrato diminuirá significativamente sua atividade antioxidante até o momento do consumo. Se forem consideradas as perdas acarretadas pelo pH de iogurtes, mais as perdas que poderão ocorrer durante o trato digestivo, podemos afirmar que a ação benéfica dos compostos antioxidantes da erva-mate no organismo humano poderá ficar comprometida.

Uma alternativa que pode auxiliar na manutenção do potencial antioxidante do extrato até o momento da absorção em seus sítios alvos é a microencapsulação (MASSOUNGA BORA

et al., 2018). O aprisionamento de ativos dentro de PLS pode superar os problemas relacionados à baixa estabilidade de ativos durante ao armazenamento e a mudanças de pH (ĐORĐEVIĆ et al., 2015).

4.1.3 Determinação de cor do extrato

A análise de cor do extrato liofilizado de erva-mate (40 %) apresentou valores de $L^* = 25,39 \pm 0,13$ significando que sua cor apresenta-se mais próxima de tons escuros, sendo que o valor de zero significa cor preta e que este aumenta em até 100 quando a cor tem brilho intenso; valores de $a^* = 0,39 \pm 0,06$ o que mostra uma leve tendência ao vermelho, sendo que este parâmetro quando negativo representa tendência à cor verde e quando positivo tendência às cores vermelhas e valores de $b^* = 1,7 \pm 0,18$ mostrando pequena tendência à cor amarela, sendo que este parâmetro quando negativo indica cor azul e quando positivo cor amarela.

Os tons escuros e as tendências as tonalidades escuras do extrato podem ser explicadas devido à alta atividade enzimática da polifenol oxidase e da peroxidase presentes nas folhas de erva-mate (CENI et al., 2008). Como não foi realizado nenhum processo de inativação enzimática neste trabalho, as folhas de erva-mate apresentaram o escurecimento refletido na cor do extrato.

4.2 Microencapsulação do extrato

4.2.1 Obtenção das microcápsulas

Obtivemos PLS contendo extrato em diferentes concentrações (Figura 12). Em nossas microcápsulas temos uma região não polar (cera de abelha), uma região polar (extrato liofilizado ressuspendido) e uma região anfifílica (Tween 80). A simples mistura destas fases formam as microcápsulas pela autoreunião espontânea de moléculas por meio de interações hidrofóbicas, que conduzem as moléculas hidrofílicas para formar um núcleo e uma parte hidrofóbica que acaba formando um invólucro orientado para a fase externa do sistema (OELHKE et al., 2014).

Em geral, PLS possuem certas vantagens em relação às emulsões convencionais, como o aumento da estabilidade física e química, a possibilidade de obter maior eficiência de encapsulação, controle mais preciso sobre as propriedades de liberação dos ativos encapsulados, possibilidade de produção em grande escala e esterilização (ĐORĐEVIĆ et

Figura 12 - Microcápsulas de extrato liofilizado de erva-mate utilizando cera de abelha como agente encapsulante (tamanho não padronizado)



Fonte: Autor (2018)

4.2.2 Avaliação das microcápsulas

4.2.2.1 Avaliação da Eficiência de Encapsulação (EE%)

A EE (%) das microcápsulas com variações nas concentrações do extrato liofilizado (núcleo) pode ser acompanhada na Tabela 5. A EE avalia qual o percentual do ativo (extrato liofilizado de erva-mate) foi incorporado na microencapsulação.

Tabela 5- Eficiência de microencapsulação das microcápsulas com diferentes concentrações de extrato

Concentrações do extrato/núcleo (%)	Eficiência de Encapsulação (EE%)
5	86,1 ± 1,14 ^b
10	78,69 ± 1,52 ^c
20	95,58 ± 0,54 ^a
30	92,48 ± 0,54 ^a
40	92,73 ± 0,51 ^a

Os resultados expressam a média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo Teste Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Autor (2018)

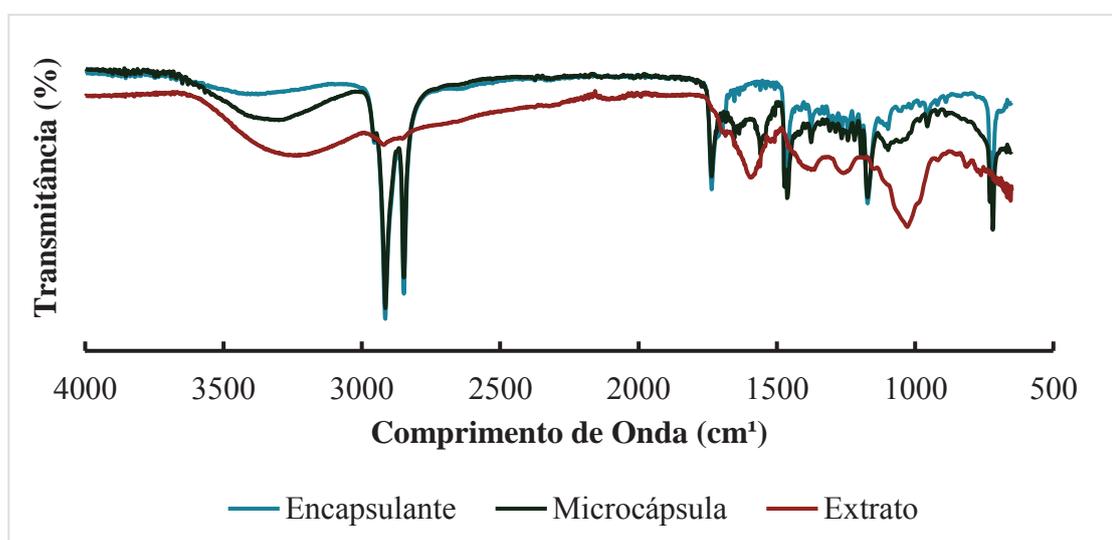
Os extratos liofilizados mais concentrados (20 %, 30 % e 40 %) apresentaram maior eficiência de encapsulação. Sugerimos que o aumento da EE (%) à medida que a concentração do extrato aumenta, é explicada pela diminuição da quantidade de água na mistura. Nas misturas mais concentradas, a quantidade de água utilizada na diluição era menor, o que pode ter

facilitado as interações hidrofóbicas, melhorando a EE (%). Mouri et al. (2014), mostraram que após a diluição com água, sua microemulsão tornou-se muito mais estruturada do que o sistema puro e que os domínios foram melhores definidos após a adição de moléculas de água. No entanto, os autores ressaltam que a mudança de comportamento das microemulsões com acréscimo de água se aproxima da linha de separação de fases, neste sentido, sugerimos que o acréscimo demasiado de água torna-se prejudicial para a eficiência de microencapsulação de microemulsões. A maior concentração de extrato representa também maior concentração de potencial antioxidante na microcápsula. Desta forma, optamos por prosseguir os ensaios utilizando microcápsulas com extrato liofilizado 40 %.

4.2.2.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A Figura 13 apresenta o resultado da avaliação por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

Figura 13- Sobreposição das análises de FTIR do extrato liofilizado, cera de abelha e microcápsulas



Fonte: O autor (2018)

A PLS apresenta em seu exterior/superfície vibrações características das moléculas encontradas no agente encapsulante (cera de abelha), o que nos leva a concluir que o extrato liofilizado encontra-se no interior da cápsula e o encapsulante na parte externa da mesma, significando que a microencapsulação ocorreu de forma eficiente.

O espectro do extrato liofilizado nos permite verificar bandas característica do grupo funcional hidroxil associado ($3235,32\text{ cm}^{-1}$), grupamento este que pode ser encontrado em água, álcoois e compostos fenólicos. Considerando a amostra em questão, sugere-se que esse pico seja referente aos compostos fenólicos. Também nos foi possível perceber a banda característica de C=C de aromáticos ($1595,30\text{ cm}^{-1}$), grupamento encontrado em alguns compostos antioxidantes como, ácidos fenólicos, por exemplo. Os grupamentos CH_3 com deformação angular e o grupamento C-O de fenóis também podem ser identificados (bandas $1364,20\text{ cm}^{-1}$ e $1256,11\text{ cm}^{-1}$, respectivamente).

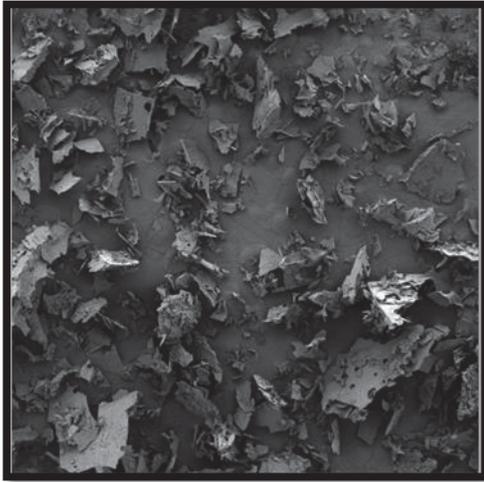
Observando o espectro do encapsulante (cera de abelha) verifica-se a banda característica de C-H alifáticos ($2914,77\text{ cm}^{-1}$), a mesma banda é percebida na PLS, no entanto não foi identificada no extrato liofilizado de erva-mate. O mesmo acontece com a banda característica do grupamento de C=O de aldeídos ($1735,07\text{ cm}^{-1}$).

A semelhança nas bandas encontradas no encapsulante e nas PLS pode ser explicado pelo fato do FTIR ser um tipo de espectroscopia de absorção, onde as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibração específicas, as quais correspondem a níveis de energia da molécula, no entanto a identificação das vibrações ocorre na superfície da amostra (LEE; LIONG; JEMAIN, 2017).

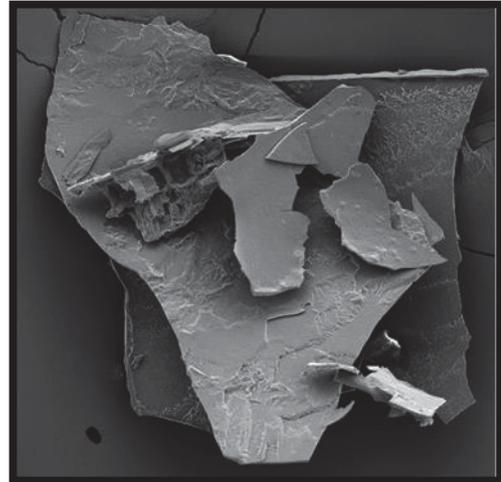
4.2.2.3 Avaliação Morfológica

A Figura 14, apresenta as imagens da microscopia eletrônica de varredura (MEV) do extrato liofilizado e das PLS confirma-se a eficiência de encapsulação do método utilizado devido a nítida diferença entre as características do extrato e das microcápsulas. As imagens mostram PLS com formato e superfície irregulares e diferentes tamanhos.

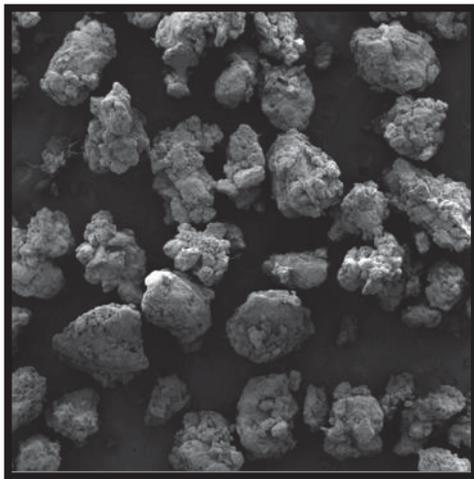
Figura 14 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura do extrato liofilizado (a) – 100 vezes de aumento e (b) – 1200 vezes de aumento) e das microcápsulas (c) – 100 vezes de aumento e (d)-1200 vezes de aumento)



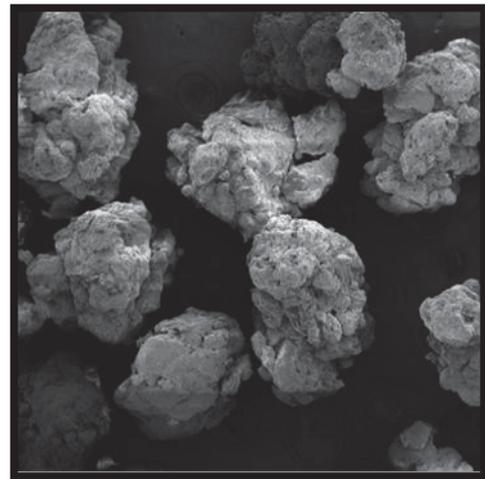
(a)



(b)



(c)



(d)

Fonte: Autor (2018)

Nossas PLS apresentam superfície rugosa e com características de aglomerados, essas características podem ser explicadas pelo método de secagem utilizado. Como as microcápsulas foram secas em temperatura ambiente, a evaporação da água acontecia de forma lenta resultando em microcápsulas com formato e superfície irregular (MEYAGUSKU, 2014).

4.2.2.4 Composição química das PLS de erva-mate

A composição química das PLS, do encapsulante e do extrato liofilizado podem ser acompanhadas na Tabela 6.

Tabela 6 – Resultados da composição química das microcápsulas de erva-mate, do extrato liofilizado e do agente encapsulante

Amostra	PTN	LIP	CHO	Cinzas	Umidade
Extrato	7,06±0,12	8,44±1,28	56,33±1,15	9,16±0,10	19,01±0,21
Cera	0,83±0,19	69,64±0,84	7,01±0,70	ND	22,52±0,50
Microcápsula	4,0±0,90	52,23±2,36	28,09±2,38	3,64±0,10	12,02±2,89

PTN: proteínas; LIP: Lipídios; CHO: Carboidratos ND: Não detectado
Fonte: Autor (2018)

Nas microcápsulas, devido ao agente encapsulante, o teor de lipídios destaca-se perante os demais macronutrientes. No entanto, ressalta-se que apesar de adaptações em muitos organismos que permitem eficiente utilização de ceras e seus componentes como fontes de energia metabólica (organismos e aves marinhas), o ser humano não possui especificidades para utilizar grande percentual de ceras como fonte de energia (HARGROVE; GREENSPAN; HARTLE, 2004). A *European Food Safety Authority*, (2007) menciona que segundo limitada literatura disponível, os ésteres de cera intactos, como os encontrados na cera de abelha, são mal absorvidos em mamíferos. Os constituintes de ésteres na cera de abelha podem ser hidrolisados no lúmen intestinal para os seus álcoois e ácidos correspondentes, que são então absorvidos e incorporados nas vias metabólicas celulares normais (PLACE, 1992). Este processo, envolve a libertação de ácidos graxos e álcoois de cadeia longa por lipases, tais como uma hidrolase de éster carboxílico na presença de sais biliares, seguida de uma absorção passiva ou mediada pelo transportador da célula epitelial da mucosa. As enzimas envolvidas na hidrólise de cera são amplamente distribuídas em tecidos de vários mamíferos, incluindo o homem (HARGROVE; GREENSPAN; HARTLE, 2004) e alguma hidrólise e absorção de constituintes de cera de abelha nos seres humanos parece plausível após a ingestão. No entanto, a taxa de hidrólise no trato gastrointestinal pareceu ser baixa em cães e pode muito bem ser o passo limitante na absorção de constituintes de cera de abelha por mamíferos (PLACE, 1992). Devido a literatura escassa sobre digestão, absorção e metabolismo de ceras, não se sabe

exatamente o percentual metabolização deste ingrediente. Neste sentido, pode-se afirmar que nem todos os lipídios presentes na microcápsula serão metabolizados o que não representará um acréscimo na ingestão de lipídios e de calorias para o consumidor.

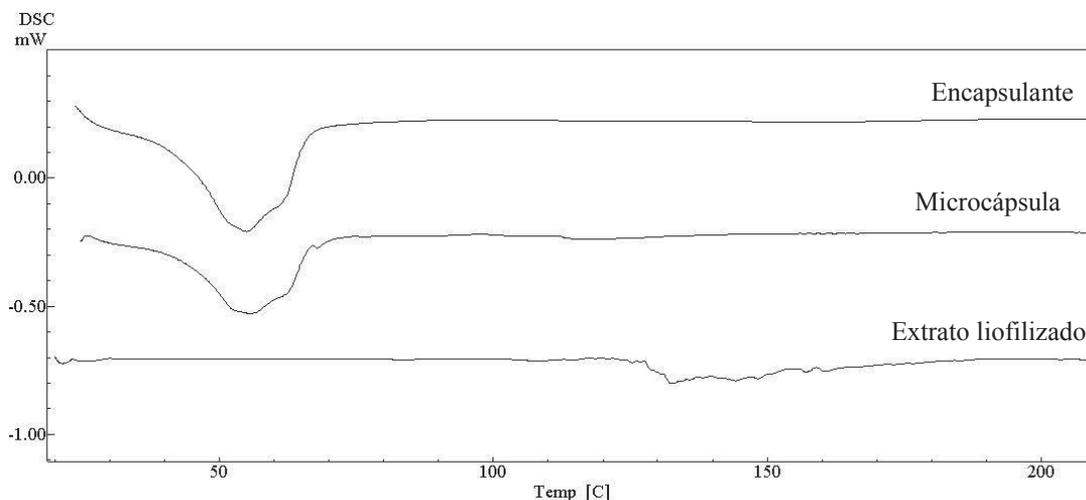
O *Scientific Opinion of the Panel on Food additives, Flavourings, Processing aids and Materials in Contact with Food (AFC)* ressalta que o uso de cera de abelha como aditivo para os usos alimentares existentes e novos usos propostos de alimentos não é preocupante para a segurança alimentar e nutricional (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2007). Além disso, ressaltamos que a cera de abelha é um produto de origem natural. O D-002, um de seus componentes apresenta atividade antiúlcera, atividade antiinflamatória, ação protetora para a mucosa gastrointestinal (CARBAJAL et al., 1995), efeito positivo no tratamento de pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica e sintomas de osteoartrite (ILLNAIT et al., 2005) e, em estudos realizados em modelos de animais murinos, foi particularmente eficaz no refluxo gastroesofágico e problemas intestinais de acidez (RAVELO et al., 2011; ZAMORA et al., 2014).

A informação sobre a composição dos alimentos é de grande importância para cientistas e profissionais que trabalham nos campos da nutrição e saúde pública (ELMADFA; MEYER, 2010). Dados precisos sobre a composição química dos alimentos são cruciais para qualquer pesquisa nutricional quantitativa e indispensáveis para avaliação e planejamento de cardápio e planos alimentares. Além disso, a composição química dos alimentos é de extrema importância na composição de dietas específicas que podem ser baixas em certos nutrientes essenciais (OREŠKOVIĆ; KLJUSURIĆ; ŠATALIĆ, 2015). A análise da composição química das microcápsulas proporciona conhecimentos essenciais para que estas possam ser incluídas de uma forma segura e recomendável na alimentação humana.

4.2.2.5 Análises de comportamento térmico das PLS

A Figura 15 apresenta o termograma de calorimetria exploratória diferencial do extrato liofilizado, encapsulante (cera de abelha) e das PLS respectivamente. A análise de DSC fornece ainda a temperatura e a entalpia de fusão das partículas. Os ensaios correspondentes as temperaturas iniciais, finais, de pico e entalpia das amostras podem ser acompanhados na Tabela 7.

Figura 15 - Termograma de calorimetria exploratória diferencial do extrato liofilizado, microcápsulas e agente encapsulante



Fonte: O autor (2018)

Tabela 7 - Temperaturas dos fluxos de calor das amostras

Amostras	Ti °C	Tp °C	Tf °C	ΔH J/g
Extrato Liofilizado	127,82	132,79	150,01	-3,23
Encapsulante	44,19	55,01	65,81	-12,83
Microcápsulas	44,58	55,67	66,48	-9,27

Ti – temperatura inicial; Tp – temperatura de pico; Tf – temperatura final; ΔH – entalpia.

Fonte: Autor (2018)

As curvas de fusão para as microcápsulas mostram-se semelhantes as curvas do encapsulante (Figura 21), bem como a temperatura do pico, sugerido como pico de fusão (Tabela 7). Neste sentido, devido as características do encapsulante, sugere-se que a microcápsula possua um ponto de fusão de 55,67 °C garantindo a proteção do ativo até a temperatura inicial do pico 44,58 °C, não sendo recomendada sua incorporação em matrizes alimentares que passem por processos de aquecimento e altas temperaturas.

Asumadu-Mensah; Smith; Ribeiro (2013) ressalta que por ser um lipídio complexo, composto e de cadeia longa uma mesma amostra de cera pode apresentar formas polimórficas com temperaturas de cristalização diferentes. Müller; Radtke; Wissing (2002), relataram que o uso de lipídeos compostos tem melhores perspectivas para maior carga de ativos, isto porque esses lipídios possuem uma maior distância entre as cadeias de ácidos graxos dos glicerídeos, bem como as imperfeições no cristal, proporcionando mais espaço para incorporação de compostos ativos.

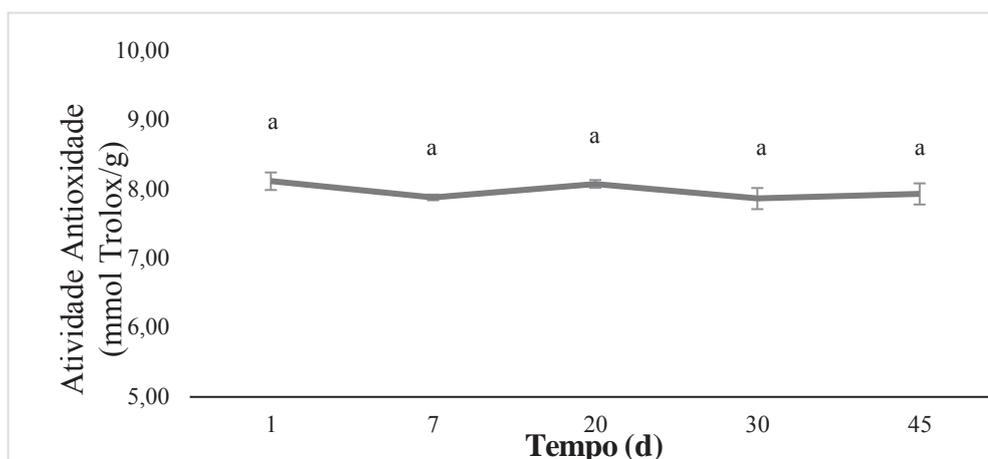
4.2.2.6 Solubilidade das microcápsulas em água

A solubilidade calculada caracterizou a microcápsula com $99,99 \pm 5.10^{-5}$ % insolúvel em água. Microcápsulas insolúveis em água possibilitam a aplicação e proteção de núcleos em meios com alto teor de água (ĐORĐEVIĆ et al., 2015). Neste trabalho, insolubilidade das cápsulas em meio aquoso garante que o núcleo não será liberado no iogurte e que desta forma sua ação antioxidante só acontecerá no organismo humano devido à ação enzimática.

4.2.2.7 Avaliação do potencial antioxidante do encapsulado ao longo do tempo

Os resultados da atividade antioxidante do encapsulado armazenado por 45 dias, podem ser acompanhados na Figura 16.

Figura 16 - Potencial antioxidante do encapsulado em PLS ao longo do tempo



Os resultados expressam a média \pm desvio padrão. Letras diferentes significam que diferem significativamente pelo Teste Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Autor (2018)

A PLS preservou o potencial antioxidante do extrato microencapsulado ao longo de 45 dias de armazenamento.

É característico e esperado que as microemulsões sejam dispersões homogêneas e termodinamicamente estáveis capazes de proteger compostos, como antioxidantes, por exemplo (ĐORĐEVIĆ et al., 2015). Pedro et al. (2016), utilizaram PLS para microencapsular curcumina e Bazzarelli; Piacentini; Giorno (2017) utilizaram PLS para microencapsular biofenóis, os autores utilizaram métodos diferentes para formação das PLS, porém, ambos, concordaram que

microcápsulas no formato de PLS são veículos interessantes de transporte de partículas. Além disso, a literatura mostra que transportadores protegem o núcleo da degradação no trato gastrointestinal, garantindo sua atividade nos sítios alvos (CHRISTOPHERSEN et al., 2014; ZHANG et al., 2006; ZUR MÜHLEN; SCHWARZ; MEHNERT, 1998).

Considerando nossos resultados, podemos afirmar que os antioxidantes das PLS permaneceram estáveis durante o armazenamento em água sob refrigeração até o momento do consumo e que este método de proteção pode ser eficaz para proteção de compostos antioxidantes em alimentos líquidos ou pastosos.

4.2.2.8 *Digestibilidade in vitro*

O percentual de ácidos graxos livres das microcápsulas não submetidas a digestibilidade *in vitro* foi $7,7 \pm 0,51\%$ enquanto que o percentual de ácidos graxos livres das microcápsulas que passaram pelo ensaio de digestibilidade foi $33,33 \pm 0,51\%$. Esses resultados confirmam que haverá o rompimento da microcápsula durante o processo de digestão possibilitando a absorção e ação do extrato de erva-mate.

Sabe-se que os flavonoides e os ácidos fenólicos são amplamente metabolizados após ingestão, sendo geralmente transformados em metabólitos plasmáticos com menor atividade antioxidante do que as moléculas precursoras. Estudos que mimetizam o processo de digestão mostraram que o conteúdo de compostos bioativos é modificado ao passar pelos vários compartimentos do trato gastrointestinal como consequência de alterações de pH, ações enzimáticas e atividade metabólica da microbiota intestinal (BOAVENTURA et al., 2015; KOEHNLEIN et al., 2016). O fato das PLS de cera de abelha serem estáveis em condições estomacais, ajuda a garantir que o encapsulado ultrapasse a barreira gástrica sem sobre modificações, o que leva a garantir uma melhor absorção e ação antioxidante quando liberado nas condições intestinais (OBAIDAT; OBAIDAT, 2001; RANJHA; KHAN; NASEEM, 2010).

No entanto, é de suma importância que no ambiente intestinal, mediante as lipases e demais condições do intestino delgado, ocorra o rompimento das microcápsulas e consequente liberação do encapsulado para que os compostos com potencial antioxidante possam ser absorvidos, e atingir o alvo fisiológico numa concentração mínima que induza o efeito biológico e o mecanismo de ação.

4.3 Iogurte natural com PLS contendo extrato de erva-mate

4.3.1 Avaliação de iogurte natural PLS contendo extrato liofilizado de erva-mate

4.3.1.1 Determinação de cor

As análises de cor das formulações de iogurte podem ser acompanhadas na tabela 8.

Tabela 8 - Análise de cor das formulações de iogurte

Amostra	L*	a*	b*
IN	73,62±0,29	-0,96±0,03	5,27±0,04
IEL	62,1±0,15	0,68±0,01	14,71±0,14
IEM	67,5±0,37	-0,42±0,07	7,60±0,12

IN – Iogurte Natural; IEL - Iogurte com extrato liofilizado de erva-mate; IEM – Iogurte com extrato microencapsulado de erva-mate.

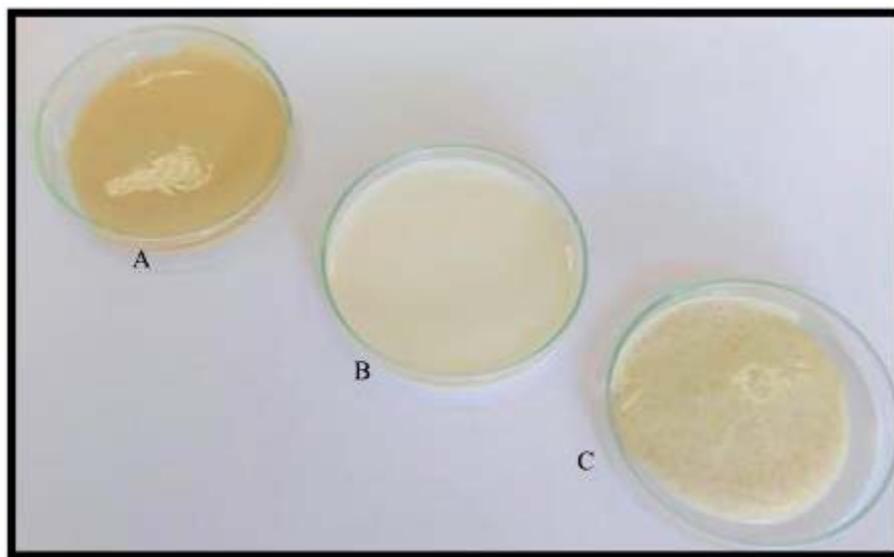
Fonte: Autor (2018)

As análises de cor das formulações de iogurtes variaram com o acréscimo do extrato liofilizado e das microcápsulas, em relação ao iogurte padrão.

Percebe-se que a adição tanto do extrato quanto das microcápsulas proporcionou diminuição da luminosidade do iogurte, apesar de o extrato livre ter influenciado mais nesse parâmetro. Quanto aos valores de a*, as microcápsulas mantiveram a tendência a cor verde apresentada pelo iogurte padrão, ao contrário do iogurte com extrato livre que apresentou tendência a cores vermelhas. Os valores de b* mostram que todas as amostras possuem tendência à cor amarela, no entanto, novamente a formulação com PLS se aproxima mais da formulação padrão.

As três formulações de iogurtes podem ser visualizadas na Figura 17.

Figura 17 – Imagem das formulações de iogurtes



A – Iogurte com extrato liofilizado de erva-mate; B – iogurte natural padrão; C – iogurte com PLS contendo extrato de erva-mate

4.3.1.2 *Potencial hidrogeniônico (pH) e acidez titulável do iogurte*

O iogurte elaborado apresentou pH de 4,3 e acidez titulável de 0,97 % ácido láctico, apresentando-se dentro do aceito pela legislação brasileira. Segundo a legislação brasileira iogurtes devem apresentar de 0,6 a 1,5g de ácido láctico por 100g do produto, por consequência o pH deve estar entre 3,5 e 4,6 (BRASIL, 2007; BRASIL, 2005). Valores de referência para o pH do iogurte foram descritos ainda em 1921 por Heineman, juntamente com o método inicial de fabricação deste leite fermentado. O pH e a acidez dos iogurtes são responsáveis, inclusive, por conferirem características sensoriais específicas às formulações, como maior viscosidade (ARYANA; OLSON, 2017), além de implicarem ainda na atividade metabólica das bactérias, o que pode favorecer um grupo de microrganismos em detrimento do outro (MOREIRA et al., 1999).

4.3.1.3 *Contagem de bactérias lácticas do iogurte*

A contagem de bactérias lácticas das formulações de iogurtes foi analisada após sete dias de armazenagem. Os resultados podem ser acompanhados na Tabela 9.

Tabela 9 - Contagem de bactérias lácticas UFC/g nas amostras de iogurte

Amostras	UFC/ml
Iogurte natural padrão	9×10^3 ^b
Iogurte natural + extrato liofilizado de erva-mate	<10 ^a
Iogurte natural + microcápsulas de erva-mate	$1,5 \times 10^4$ ^b

Os resultados expressam a média. Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo Teste Tukey ($P > 0,05$).

Fonte: Autor (2018)

A análise dos resultados nos permite observar que o iogurte com extrato liofilizado de erva-mate apresentou menor contagem de bactérias lácticas que as demais formulações. Isso pode ser explicado pelo fato dos extratos de erva-mate apresentarem-se como uma boa fonte de compostos antimicrobianos (VIEITEZ et al., 2018). Burris et al. (2011), demonstraram atividade bactericida contra Gram-positivo (*S. aureus*) e Gram-negativo (*E. coli*) com concentrações relativamente baixas de extrato aquoso de erva-mate e ainda ressaltaram que os compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana da erva-mate parecem ser muito estáveis, uma vez que esses resultados foram encontrados utilizando matérias primas que foram submetidas à preparação comercial de branqueamento, secagem, moagem e envelhecimento. Esses resultados podem significar novas aplicabilidades para extratos de erva-mate.

No entanto, no nosso caso, ressaltamos que as bactérias lácticas são benéficas para o organismo humano de diversas formas. Kumar et al. (2018) demonstrou que bactérias lácticas seriam uma opção ideal para prevenir a toxicidade de metais pesados e reduzir a absorção no corpo humano. Nuraida (2015), demonstrou efeitos hipocolesterolêmicos, a estimulação do sistema imunológico e a prevenção da diarreia por bactérias lácticas. Evivie et al. (2017), sugeriram que as bactérias lácticas possuam efeito antiobesogênico e antidiabético. A perda das bactérias lácticas pela ação antimicrobiana do extrato de erva-mate é um resultado negativo para a saúde do consumidor. Neste caso, encapsulação do extrato por PLS apresenta-se como uma boa alternativa para a manutenção da viabilidade das bactérias lácticas no iogurte, sendo que devido a insolubilidade da PLS o extrato não foi liberado no iogurte e a contagem de bactérias não apresentou diferença para o iogurte com PLS e o iogurte padrão.

4.3.2 Análise Sensorial do Iogurte

O resultado do teste de aceitabilidade pode ser acompanhado na Tabela 10. Percebe-se que não houveram diferenças estatísticas entre as amostras quanto a aceitabilidade da cor, do sabor e do aspecto global avaliado.

Tabela 10-Teste de aceitabilidade das formulações de iogurte

Amostras	Cor	Sabor	Aspecto Global
IN	6,98±1,54 ^a	5,7±1,91 ^a	5,6±1,68 ^a
IEL	6,01±2,02 ^a	4,9±2,13 ^a	5,6±1,88 ^a
IEM	6,51±1,82 ^a	5,35±1,85 ^a	6,01±1,64 ^a

IN – Iogurte Natural; IEL - Iogurte com extrato liofilizado de erva-mate; IEM – Iogurte com extrato microencapsulado de erva-mate. Os resultados expressam a média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo Teste Tukey ($p < 0,05$).

A microencapsulação do extrato não prejudicou a aceitabilidade do produto.

As notas recebidas para todas as amostras ficaram relativamente baixas considerando que os parâmetros eram avaliados de 1 a 9, sendo 1 a nota mínima e 9 a nota máxima. Além disso, muitos provadores deixaram comentários nas fichas de avaliação sugerindo a adição de açúcares ao produto. A preferência da população por produtos alimentícios adoçados pode vir a explicar a baixa nota recebida pelas amostras, mesmo as não acrescidas com extrato livre ou microencapsulado de erva-mate. Sabendo que dietas com alto teor de açúcar podem gerar distúrbios metabólicos drásticos, muitas vezes interpolados com distúrbios afetivos (CODELLA; TERRUZZI; LUZI, 2017). Os resultados ressaltam a importância de estratégias de educação alimentar e nutricional para a população que busque promover escolhas e hábitos alimentares mais saudáveis (ANARI; AMANI; VEISSI, 2017; KENDIG, 2014). Hábitos alimentares saudáveis assim como a diminuição do consumo de alimentos açucarados são iniciativas importantes para promoção do bem estar e saúde (CODELLA; TERRUZZI; LUZI, 2017; HAGGER et al., 2017). Levar informações sobre consumo alimentar e saúde pode interferir na aceitabilidade de determinados alimentos, iogurtes naturais são preferidos por pessoas que possuem conhecimento de seus benefícios para a saúde (ARYANA; OLSON, 2017).

Na Tabela 11 são encontrados os resultados referentes a intenção de compra dos provadores.

Tabela 11- Teste de intenção de compra das formulações de iogurte

Amostras	CC (%)	PC (%)	DC (%)	PNC (%)	JM (%)
IN	6,7	15	37	35	5
IEL	11,67	15	31,67	28,33	11,67
IEM	5	30	33,33	25	5

IN – Iogurte Natural; IEL - Iogurte com extrato liofilizado de erva-mate; IEM – Iogurte com extrato microencapsulado de erva-mate. CC - Eu certamente compraria este produto; PC - Eu provavelmente compraria este produto; DC- Eu tenho dúvidas se compraria este produto; PNC- Eu provavelmente não compraria este produto; JM - Eu jamais compraria este produto.

Percebe-se que a intenção de compra dos julgadores não difere, em grandes proporções, dos iogurtes com extrato livre e/ou com PLS do iogurte tido como padrão, o que, novamente, nos leva a crer que houveram poucas interferências do extrato e das PLS nas avaliações dos julgadores. O que ocorre na verdade é o baixo hábito e preferência de consumo de iogurtes naturais.

Considerando as proporções de julgadores que ficaram em dúvida se comprariam ou não os iogurtes submetidos à avaliação, pode-se inferir que se os consumidores tivessem maiores informações sobre os benefícios do consumo de iogurtes naturais e extrato de erva-mate (livre ou microencapsulado) para a saúde, provavelmente a intenção de compra seria maior.

Os índices de obesidade, sobrepeso e doenças crônicas não transmissíveis que abalam o cenário de saúde mundial estão diretamente ligadas à estilo de vida e escolhas alimentares (WILSON et al., 2016). Promover escolhas alimentares saudáveis seja através de intervenções legais, envolvimento governamental, intervenções educacionais ou marketing são estratégias vistas como eficazes seja do ponto de vista dos consumidores (BOS et al., 2013) ou de estudos científicos. Hoek et al. (2017), ao estudar ações realizadas em pontos de venda/compra para instigar escolhas alimentares mais saudáveis, concluiu que as ações realizadas nestes locais, como mudanças nos preços, nos logotipos (citando saúde e/ou meio ambiente), nos rótulos, podem contribuir parcialmente para promover a aceitação de alternativas alimentares saudáveis e sustentáveis. Mhurchu et al. (2018), ao estudar rotulagem nutricional, conclui que os rótulos presentes nos alimentos podem influenciar em escolhas alimentares mais saudáveis. Suzuki; Park (2018), avaliaram o efeito de informações positivas no “pós-sabor” de alimentos saudáveis e tidos como “desagradáveis” e concluíram que aprender informações positivas sobre alimentos considerados com sabor desagradável, particularmente sobre seus benefícios para a saúde,

podem minimizar o impacto emocional negativo dessa experiência, influenciando positivamente na avaliação do produto. Neste sentido, concluímos que produtos como iogurtes naturais que se apresentam como um alimento saudável e nutritivo (FERNANDEZ et al., 2017), podem ter sua aceitabilidade melhorada se mais informações sobre os benefícios de seu consumo chegarem à população, por consequência, o acréscimo de microcápsulas de erva-mate torna-se uma medida interessante para aumentar ainda mais os benefícios do consumo desse produto para a saúde.

Uma indústria de alimentos que vise contínuas técnicas de aperfeiçoamento em iogurte e outros produtos lácteos, bem como maior conhecimento de seus benefícios para a saúde são preponderantes na atualidade visando a saúde do consumidor (ARYANA; OLSON, 2017).

5 CONCLUSÕES

O extrato liofilizado de erva-mate é uma alternativa para expandir os benefícios antioxidantes dessa planta para outros alimentos e públicos para além do consumo cultural. O desenvolvimento de partículas lipídicas solidas (PLS) apresenta-se como uma alternativa eficiente para preservação do potencial antioxidante do extrato liofilizado de erva-mate. Ademais, quando adicionadas em iogurte natural as PLS carregadas de extrato liofilizado de erva-mate mantiveram a viabilidade das bactérias lácticas e a aceitabilidade e intenção de compra do produto foi similar à fórmula padrão.

REFERÊNCIAS

ADAM, A. et al. The bioavailability of ferulic acid is governed primarily by the food matrix rather than its metabolism in intestine and liver in rats. **The Journal of Nutrition**, v. 132, n. 7, p. 1962–1968, jul. 2002.

ALI, A. et al. Modulation of LPS induced inflammatory response by Lawsonyl monocyclic terpene from the marine derived *Streptomyces* sp. **Immunology Letters**, v. 150, n. 1–2, p. 79–86, fev. 2013.

AL-KASMI, B. et al. Mechanical microencapsulation: The best technique in taste masking for the manufacturing scale - Effect of polymer encapsulation on drug targeting. **Journal of Controlled Release**, v. 260, p. 134–141, 28 ago. 2017.

ANARI, R.; AMANI, R.; VEISSI, M. Sugar-sweetened beverages consumption is associated with abdominal obesity risk in diabetic patients. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, SI: Online Supplement - 2. v. 11, p. S675–S678, 1 dez. 2017.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.

ANWAR, H. et al. Effect of protein, probiotic, and symbiotic supplementation on serum biological health markers of molted layers. **Poultry Science**, v. 91, n. 10, p. 2606–2613, out. 2012.

ARÇARI, D. P. et al. Antiobesity effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 17, n. 12, p. 2127–2133, dez. 2009.

ARÇARI, D. P. et al. Anti-inflammatory effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) ameliorate insulin resistance in mice with high fat diet-induced obesity. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 335, n. 2, p. 110–115, 30 mar. 2011.

ARÇARI, D. P. et al. The in vitro and in vivo effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract on adipogenesis. **Food Chemistry**, v. 141, n. 2, p. 809–815, 15 nov. 2013.

ARYANA, K. J.; OLSON, D. W. A 100-Year Review: Yogurt and other cultured dairy products. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 9987–10013, 1 dez. 2017.

ASUMADU-MENSAH, A.; SMITH, K. W.; RIBEIRO, H. S. Solid lipid dispersions: potential delivery system for functional ingredients in foods. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 7, p. E1000-1008, jul. 2013.

ATHAYDE, M. L.; COELHO, G. C.; SCHENKEL, E. P. Caffeine and theobromine in epicuticular wax of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 853–857, dez. 2000.

AUGUSTIN, M. A.; HEMAR, Y. Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 4, p. 902–912, abr. 2009.

BAISCH, A. L. M.; JOHNSTON, K. B.; STEIN, F. L. P. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* on mesenteric arterial bed of rats. 1998.

BALZAN, S. et al. Lipid-lowering effects of standardized extracts of *Ilex paraguariensis* in high-fat-diet rats. **Fitoterapia**, v. 86, p. 115–122, abr. 2013.

BARG, M. et al. Evaluation of the protective effect of *Ilex paraguariensis* and *Camellia sinensis* extracts on the prevention of oxidative damage caused by ultraviolet radiation. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 37, n. 1, p. 195–201, jan. 2014.

BASTOS, D. H. M. et al. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from Yerba maté (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camellia sinensis*) extracts. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 3, p. 423–432, 2007.

BAZZARELLI, F.; PIACENTINI, E.; GIORNO, L. Biophenols-loaded solid lipid particles (SLPs) development by membrane emulsification. **Journal of Membrane Science**, v. 541, p. 587–594, 1 nov. 2017.

BENITA, S. (ED.). **Microencapsulation: methods and industrial applications**. 2nd ed ed. New York: Taylor & Francis, 2006.

BERTÉ, K. A. S. et al. Development of functional yerba-mate jelly. **Ciência Rural**, v. 41, n. 2, p. 354–360, fev. 2011.

BOAVENTURA, B. C. B. et al. Effect of in vitro digestion of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) extract on the cellular antioxidant activity, antiproliferative activity and cytotoxicity toward HepG2 cells. **Food Research International**, FOOD BIOACTIVE COMPOUNDS: QUALITY CONTROL AND BIOACTIVITY. v. 77, p. 257–263, 1 nov. 2015.

BOGDANOV, S. Beeswax: quality issues today. **Bee World**, v. 85, n. 3, p. 46–50, 1 jan. 2004.

BOROSKI, M. et al. Use of oregano extract and oregano essential oil as antioxidants in functional dairy beverage formulations. **LWT - Food Science and Technology**, v. 47, n. 1, p. 167–174, jun. 2012.

BOS, C. et al. Understanding consumer acceptance of intervention strategies for healthy food choices: a qualitative study. **BMC public health**, v. 13, p. 1073, 13 nov. 2013.

BOTELHO, G.; CANAS, S.; LAMEIRAS, J. 14 - Development of phenolic compounds encapsulation techniques as a major challenge for food industry and for health and nutrition fields A2 - Grumezescu, Alexandru Mihai. In: **Nutrient Delivery**. Nanotechnology in the Agri-Food Industry. [s.l.] Academic Press, 2017. p. 535–586.

BOWLES, S. L. et al. Intestinal transport and absorption of bioactive phenolic compounds from a chemically characterized aqueous extract of *Athrixia phylicoides*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 200, p. 45–50, 22 mar. 2017.

BRACESCO, N. et al. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 3, p. 378–384, 14 jul. 2011.

BRANCO, C. D. S. et al. Anticonvulsant, neuroprotective and behavioral effects of organic and conventional yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) on pentylenetetrazol-induced seizures in Wistar rats. **Brain Research Bulletin**, v. 92, p. 60–68, mar. 2013.

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

BRASIL, M. D. A., PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 46, DE 23 DE OUTUBRO DE 2007**, 24 out. 2007.

BRASIL, M. DA S. Vigitel Brasil 2016: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal, 2016.

BRASIL; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas**, 2005. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/servlet/INPDFViewer?jornal=1&pagina=7&data=24/08/2005&captchafield=firistAccess>>

BRASIL, S. DA C.-E. DO P. Histórico da Erva-mate. 2003.

BRAVO, L. et al. Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in high-cholesterol fed rats. **Fitoterapia**, v. 92, p. 219–229, jan. 2014.

BREMER BOAVENTURA, B. C. et al. Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) infusion obtained by freeze concentration technology on antioxidant status of healthy individuals. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, n. 2, p. 948–954, jul. 2015.

BURRIS, K. P. et al. Antimicrobial activity of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) aqueous extracts against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 6, p. M456-462, ago. 2011.

BUTIUK, A. P. et al. Study of the chlorogenic acid content in yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): Effect of plant fraction, processing step and harvesting season. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 3, n. 1, p. 27–33, mar. 2016.

CANO-CHAUCA, M. et al. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 6, n. 4, p. 420–428, 1 dez. 2005.

CARBAJAL, D. et al. Anti-ulcer Activity of Higher Primary Alcohols of Beeswax. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 47, n. 9, p. 731–733, 1 set. 1995.

CARDOZO JUNIOR, E. L.; MORAND, C. Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health – A review. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 440–454, mar. 2016.

CAYON, A. PAHO WHO | Ultra-processed food and drink products in Latin America: Trends, impact on obesity, policy implications. Disponível em:

<http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11153%3Aultra-processed-food-and-drink-products&catid=4999%3Adocuments&Itemid=0&lang=en>.

Acesso em: 16 ago. 2016.

CENI, G. C. et al. Oxidases from mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*): extraction optimization and stability at low and high temperatures. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 31, n. 6, p. 541–550, 1 out. 2008.

CHEN, Y. et al. Influence of in vitro gastrointestinal digestion on the bioavailability and antioxidant activity of polyphenols from Ipomoea batatas leaves. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 52, n. 5, p. 1131–1137, 1 maio 2017.

CHIESA, L.; SCHLABITZ, C.; SOUZA, C. F. V. DE. Effect of yerba mate on the sensory and physicochemical characteristics of cereal bars. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 71, n. 1, p. 105–110, 2012.

CHITPRASERT, P.; SUTAPHANIT, P. Holy basil (*Ocimum sanctum* Linn.) essential oil delivery to swine gastrointestinal tract using gelatin microcapsules coated with aluminum carboxymethyl cellulose and beeswax. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 52, p. 12641–12648, 31 dez. 2014.

CHRISTOPHERSEN, P. C. et al. Solid lipid particles for oral delivery of peptide and protein drugs II--the digestion of trilaurin protects desmopressin from proteolytic degradation. **Pharmaceutical Research**, v. 31, n. 9, p. 2420–2428, set. 2014.

CILLA, A. et al. Bioaccessibility of tocopherols, carotenoids, and ascorbic acid from milk- and soy-based fruit beverages: influence of food matrix and processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 29, p. 7282–7290, 25 jul. 2012.

CIURZYŃSKA, A.; LENART, A. Freeze-Drying - Application in Food Processing and Biotechnology - A Review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 61, n. 3, p. 165–171, 2011.

CLIFFORD, M. N. Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health. **Planta Medica**, v. 70, n. 12, p. 1103–1114, dez. 2004.

CODA, R. et al. Yogurt-like beverages made of a mixture of cereals, soy and grape must: Microbiology, texture, nutritional and sensory properties. **International Journal of Food Microbiology**, v. 155, n. 3, p. 120–127, 16 abr. 2012.

CODELLA, R.; TERRUZZI, I.; LUZI, L. Sugars, exercise and health. **Journal of Affective Disorders**, Nutrition And Exercise In Affective Disorders. v. 224, p. 76–86, 15 dez. 2017.

COLLINS, A. R. Assays for oxidative stress and antioxidant status: applications to research into the biological effectiveness of polyphenols. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, n. 1 Suppl, p. 261S–267S, jan. 2005..

COMUNIAN, T. A. et al. Protection of echium oil by microencapsulation with phenolic

compounds. **Food Research International**, DOF2015, 6th Edition of the International Symposium on Delivery of Functionality in Complex Food Systems: Physically inspired approaches from the nano scale to the micro scale. v. 88, Part A, p. 114–121, out. 2016.

CONSOLI, L. et al. Gallic acid microparticles produced by spray chilling technique: Production and characterization. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 79–87, jan. 2016.

CORNACCHIA, L.; ROOS, Y. H. State of dispersed lipid carrier and interface composition as determinants of beta-carotene stability in oil-in-water emulsions. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 8, p. C1211-1218, out. 2011.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 8, p. 1001–1043, ago. 2009.

D'ARCHIVIO, M. et al. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Annali dell'Istituto Superiore Di Sanita**, v. 43, n. 4, p. 348–361, 2007.

DE MENESES FUJII, T. M. et al. Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) modulates NF-kappaB pathway and AKT expression in the liver of rats fed on a high-fat diet. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 65, n. 8, p. 967–976, dez. 2014.

DE RESENDE, P. E. et al. Influence of crude extract and bioactive fractions of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (yerba mate) on the Wistar rat lipid metabolism. **Journal of Functional Foods**, v. 15, p. 440–451, maio 2015.

DE SOUZA, L. M. et al. Comprehensive analysis of maté (*Ilex paraguariensis*) compounds: development of chemical strategies for matesaponin analysis by mass spectrometry. **Journal of Chromatography. A**, v. 1218, n. 41, p. 7307–7315, 14 out. 2011.

DE VOS, W. M.; DE VOS, E. A. J. Role of the intestinal microbiome in health and disease: from correlation to causation. **Nutrition Reviews**, v. 70 Suppl 1, p. S45-56, ago. 2012.

DELADINO, L. et al. Corn starch systems as carriers for yerba mate (*Ilex paraguariensis*) antioxidants. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 463–472, abr. 2015.

DORĐEVIĆ, V. et al. Trends in Encapsulation Technologies for Delivery of Food Bioactive Compounds. **Food Engineering Reviews**, v. 7, n. 4, p. 452–490, 1 dez. 2015.

DOS SANTOS, A. J. et al. PRODUTOS NÃO MADEIREIROS: CONCEITUAÇÃO, CLASSIFICAÇÃO, VALORAÇÃO E MERCADOS. **FLORESTA**, v. 33, n. 2, 31 ago. 2003.

ELMADFA, I.; MEYER, A. L. Importance of food composition data to nutrition and public health. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 64 Suppl 3, p. S4-7, nov. 2010.

EMBRAPA. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E RENDA DA ERVA-MATE CULTIVADA. 2000.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. **Beeswax (E 901) as a glazing agent and as carrier for flavours - Scientific Opinion of the Panel on Food additives, Flavourings,**

Processing aids and Materials in Contact with Food (AFC), 2007. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/615.pdf>. Acesso em: 17 fev. 2018

EVIVIE, S. E. et al. Some current applications, limitations and future perspectives of lactic acid bacteria as probiotics. **Food & Nutrition Research**, v. 61, n. 1, p. 1318034, 2017.

FACCIN, C. et al. Bread with Yerba Mate Aqueous Extract (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.). **American Journal of Food Technology**, v. 10, n. 5, p. 206–214, 1 maio 2015.

FATHI, M.; MOZAFARI, M. R.; MOHEBBI, M. Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. **Trends in Food Science & Technology**, v. 23, n. 1, p. 13–27, 1 jan. 2012.

FERNANDES, C. E. F. et al. Phytochemical profile, antioxidant and hypolipemiant potential of *Ilex paraguariensis* fruit extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 81, p. 139–146, mar. 2016.

FERNANDEZ, M. A. et al. Chapter 13 - Yogurt and Health. In: FRIAS, J.; MARTINEZ-VILLALUENGA, C.; PEÑAS, E. (Eds.). . **Fermented Foods in Health and Disease Prevention**. Boston: Academic Press, 2017. p. 305–338.

FERREIRA, F. et al. Inhibition of the passive diffusion of cholic acid by the *Ilex paraguariensis* St. Hil. saponins. **Phytotherapy Research**, v. 11, n. 1, p. 79–81, 1 fev. 1997.

FRATINI, F. et al. Beeswax: A minireview of its antimicrobial activity and its application in medicine. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 9, p. 839–843, set. 2016.

FRIEDMAN, M.; JÜRGENS, H. S. Effect of pH on the Stability of Plant Phenolic Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2101–2110, jun. 2000.

GAMBERO, A.; RIBEIRO, M. L. The positive effects of yerba maté (*Ilex paraguariensis*) in obesity. **Nutrients**, v. 7, n. 2, p. 730–750, 22 jan. 2015.

GARAMBONE, E.; ROSA, G. Possíveis benefícios do ácido clorogênico à saúde. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 18, n. 2, p. 229–235, 18 nov. 2008.

GHARIBZAHEDI, S. M. T.; CHRONAKIS, I. S. Crosslinking of milk proteins by microbial transglutaminase: Utilization in functional yogurt products. **Food Chemistry**, v. 245, p. 620–632, 15 abr. 2018.

GIFANI, A. et al. Preparation and investigation the release behaviour of wax microspheres loaded with salicylic acid. **Journal of Microencapsulation**, v. 26, n. 6, p. 485–492, set. 2009.

GONÇALVES, A.; ESTEVINHO, B. N.; ROCHA, F. Microencapsulation of vitamin A: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 51, p. 76–87, maio 2016.

GONTHIER, M.-P. et al. Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 6, p. 1853–1859, jun. 2003.

HAGGER, M. S. et al. Predicting sugar consumption: Application of an integrated dual-process, dual-phase model. **Appetite**, v. 116, p. 147–156, 1 set. 2017.

HARGROVE, J. L.; GREENSPAN, P.; HARTLE, D. K. Nutritional significance and metabolism of very long chain fatty alcohols and acids from dietary waxes. **Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)**, v. 229, n. 3, p. 215–226, mar. 2004.

HASHEMI GAHRUIE, H. et al. Scientific and technical aspects of yogurt fortification: A review. **Food Science and Human Wellness**, v. 4, n. 1, p. 1–8, 1 mar. 2015.

HECK, C. I.; DE MEJIA, E. G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. R138-151, nov. 2007.

HEINEMAN, P. G. **Milk**. Universidade de Michigan: W. B. Saunders, 1921.

HOEK, A. C. et al. Healthy and environmentally sustainable food choices: Consumer responses to point-of-purchase actions. **Food Quality and Preference**, v. 58, p. 94–106, jun. 2017.

HOLST, B.; WILLIAMSON, G. Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 73–82, abr. 2008.

HU, M. et al. Role of calcium and calcium-binding agents on the lipase digestibility of emulsified lipids using an in vitro digestion model. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 8, p. 719–725, 1 nov. 2010.

ILLNAIT, J. et al. Effects of D-002, a product isolated from beeswax, on gastric symptoms of patients with osteoarthritis treated with piroxicam: a pilot study. **Journal of Medicinal Food**, v. 8, n. 1, p. 63–68, 2005.

Instituto Gaúcho de Tradição e Folclore. , [s.d.]. Disponível em:
<<http://www.igt.rs.gov.br/>>. Acesso em: 20 out. 2016

ITO, E.; CROZIER, A.; ASHIHARA, H. Theophylline metabolism in higher plants. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1336, n. 2, p. 323–330, 29 ago. 1997.

JAISWAL, R. et al. Profiling and characterization by LC-MSn of the chlorogenic acids and hydroxycinnamoylshikimate esters in maté (*Ilex paraguariensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 9, p. 5471–5484, 12 maio 2010.

JENSEN, S.; ZANOELO, É. F. Kinetics of Aqueous Extraction of Mate (*Ilex Paraguariensis*) Leaves. **Journal of Food Process Engineering**, v. 36, n. 2, p. 220–227, 1 abr. 2013.

JIMENEZ-GARCIA, S. N. et al. Current Approaches for Enhanced Expression of Secondary Metabolites as Bioactive Compounds in Plants for Agronomic and Human Health Purposes – a Review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 63, n. 2, p. 67–78, 2013.

JOHNSTON, K. L.; CLIFFORD, M. N.; MORGAN, L. M. Coffee acutely modifies

gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78, n. 4, p. 728–733, out. 2003.

KAPUŚNIAK, J.; TOMASIK, P. Lipid microencapsulation in starch. **Journal of Microencapsulation**, v. 23, n. 3, p. 341–348, 1 jan. 2006.

KARANJA, N. et al. Acceptability of Sodium-Reduced Research Diets, Including the Dietary Approaches to Stop Hypertension Diet, among Adults with Prehypertension and Stage 1 Hypertension. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 107, n. 9, p. 1530–1538, set. 2007.

KENDIG, M. D. Cognitive and behavioural effects of sugar consumption in rodents. A review. **Appetite**, v. 80, p. 41–54, 1 set. 2014.

KIM, S.-Y. et al. Anti-obesity effects of Yerba Mate (*Ilex Paraguariensis*): a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, p. 338, 25 set. 2015.

KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and Occurrence of Phenolic Phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 99, n. 2, p. 213–218, fev. 1999.

KLEIN, T. et al. Microparticles containing guaraná extract obtained by spray-drying technique: development and characterization. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 3, p. 292–300, maio 2015.

KOEHNLEIN, E. A. et al. Analysis of a whole diet in terms of phenolic content and antioxidant capacity: effects of a simulated gastrointestinal digestion. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 67, n. 6, p. 614–623, set. 2016.

KUMAR, N. et al. Bio-prospectus of cadmium bioadsorption by lactic acid bacteria to mitigate health and environmental impacts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 4, p. 1599–1615, fev. 2018.

LEE, L. C.; LIONG, C.-Y.; JEMAIN, A. A. A contemporary review on Data Preprocessing (DP) practice strategy in ATR-FTIR spectrum. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 163, p. 64–75, 15 abr. 2017.

LEITE, M. T.; BARROZO, M. A. DE S.; RIBEIRO, E. J. Canonical Analysis Technique as an Approach to Determine Optimal Conditions for Lactic Acid Production by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2012, p. e303874, 19 fev. 2012.

LIMA, J. DE P. et al. Distribution of Major Chlorogenic Acids and Related Compounds in Brazilian Green and Toasted *Ilex paraguariensis* (Maté) Leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 11, p. 2361–2370, 23 mar. 2016a.

LIMA, N. DA S. et al. *Ilex paraguariensis* (yerba mate) improves endocrine and metabolic disorders in obese rats primed by early weaning. **European Journal of Nutrition**, v. 53, n. 1, p. 73–82, fev. 2014a.

LIMA, N. DA S. et al. Effects of *Ilex paraguariensis* (yerba mate) treatment on leptin resistance and inflammatory parameters in obese rats primed by early weaning. **Life Sciences**, v. 115, n. 1–2, p. 29–35, 12 out. 2014b.

LIMA, P. S. S. et al. Inclusion of terpenes in cyclodextrins: Preparation, characterization and pharmacological approaches. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 965–987, 20 out. 2016b.

LIU, M. J. et al. Preparation of novel butyryl galactose ester-modified coix component microemulsions and evaluation on hepatoma-targeting in vitro and in vivo. **Drug Delivery**, v. 23, n. 9, p. 3444–3451, nov. 2016.

LORIST, M. M.; TOPS, M. Caffeine, fatigue, and cognition. **Brain and Cognition**, Event-Related Potentials and Everyday Drugs. v. 53, n. 1, p. 82–94, out. 2003.

LUZ, M. DA. Carijos e barbaquás no Rio Grande do Sul : resistência camponesa e conservação ambiental no âmbito da fabricação artesanal de erva-mate. 2011a.

LUZ, M. DA. Carijos e barbaquás no Rio Grande do Sul : resistência camponesa e conservação ambiental no âmbito da fabricação artesanal de erva-mate. 2011b.

MACHADO, A. D. et al. Efeito do consumo de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) sobre o ganho de peso e a glicemia de jejum em ratos alimentados com uma dieta hiperlipídica. **Ciência & Saúde**, v. 7, n. 2, p. 71–75, 11 set. 2014.

MAHALIK, N. P.; NAMBIAR, A. N. Trends in food packaging and manufacturing systems and technology. **Trends in Food Science & Technology**, Advances in Food Processing and Packaging Automation. v. 21, n. 3, p. 117–128, mar. 2010.

MANACH, C. et al. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, n. 1 Suppl, p. 230S–242S, jan. 2005.

MARTÍNEZ-ABAD, A.; LAGARÓN, J. M.; OCIO, M. J. Antimicrobial beeswax coated polylactide films with silver control release capacity. **International Journal of Food Microbiology**, v. 174, p. 39–46, 17 mar. 2014.

MARTINS, N.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F. R. In vivo antioxidant activity of phenolic compounds: Facts and gaps. **Trends in Food Science & Technology**, v. 48, p. 1–12, fev. 2016.

MASSOUNGA BORA, A. F. et al. Application of microencapsulation for the safe delivery of green tea polyphenols in food systems: Review and recent advances. **Food Research International**, v. 105, p. 241–249, 1 mar. 2018.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory evaluation techniques**. 4th ed ed. Boca Raton: Taylor & Francis, 2007.

BEBIDA GASEIFICADA DE ERVA-MATE VERDE. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 27, n. 1, 12 ago. 2009.

MENDES, G. et al. Alkaloidal metabolites from *Aspergillus felis* and their activities against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Phytochemistry Letters**, v. 17, p. 28–35, set. 2016.

MENG, S. et al. Roles of chlorogenic Acid on regulating glucose and lipids metabolism: a review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, v. 2013, p. 801457, 2013.

MEYAGUSKU, V. M. DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CONTENDO CIPROFLOXACINO. Araraquara – SP: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL. **Alimentos Funcionais**, 5 jun. 2008. Disponível em: <bvsms.saude.gov.br/bvs/dicas/220_alimentos_funcionais.html>. Acesso em: 16 ago. 2016

MORAIS, A. R. DO V. et al. Freeze-drying of emulsified systems: A review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 503, n. 1, p. 102–114, 30 abr. 2016.

MOREIRA, S. R. et al. Microbiological and chemical analysis of yoghurts marketed in Lavras - MG. **Food Science and Technology**, v. 19, n. 1, p. 147–152, jan. 1999.

MOURI, A. et al. Water solubilization capacity of pharmaceutical microemulsions based on Peceol®, lecithin and ethanol. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 475, n. 1, p. 324–334, 20 nov. 2014.

MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Human skin: the Medium of Touch. v. 54, p. S131–S155, 1 nov. 2002.

NARANG, A. S.; DELMARRE, D.; GAO, D. Stable drug encapsulation in micelles and microemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 345, n. 1, p. 9–25, 10 dez. 2007.

NAUFALIN, R.; RUKMINI, H. S. Antioxidant Activity and Physicochemical Properties of Nicolaia Speciosa Flower Extract. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, International Conference on Food, Agriculture and Natural Resources, IC-FANRes 2015. v. 9, p. 297–303, 1 jan. 2016.

NEGRÃO MURAKAMI, A. N. et al. Concentration of phenolic compounds in aqueous mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil) extract through nanofiltration. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 10, p. 2211–2216, dez. 2011.

NIMHURCHU, C. et al. Do nutrition labels influence healthier food choices? Analysis of label viewing behaviour and subsequent food purchases in a labelling intervention trial. **Appetite**, v. 121, p. 360–365, 1 fev. 2018.

NUNES, G. L. et al. Microencapsulation of freeze concentrated *Ilex paraguariensis* extract by spray drying. **Journal of Food Engineering**, v. 151, p. 60–68, abr. 2015.

NURAIIDA, L. A review: Health promoting lactic acid bacteria in traditional Indonesian fermented foods. **Food Science and Human Wellness**, v. 4, n. 2, p. 47–55, 1 jun. 2015.

OBAIDAT, A. A.; OBAIDAT, R. M. Controlled release of tramadol hydrochloride from

matrices prepared using glyceryl behenate. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.**, v. 52, n. 2, p. 231–235, set. 2001.

OLIVEIRA, D. M. DE; BASTOS, D. H. M. Phenolic acids bioavailability. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1051–1056, 2011.

OLTHOF, M. R. et al. Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 6, p. 1806–1814, jun. 2003.

OREŠKOVIĆ, P.; KLJUSURIĆ, J. G.; ŠATALIĆ, Z. Computer-generated vegan menus: The importance of food composition database choice. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 37, p. 112–118, 1 fev. 2015.

PAHO, P. A. H. O.; WHO, W. H. O. **Ultra-processed food and drink products in Latin America: Trends, impact on obesity, policy implications**, 2015. Disponível em: <http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/7699/9789275118641_eng.pdf?sequence=5&isAllowed=y&ua=1>

PAINI, M. et al. Microencapsulation of phenolic compounds from olive pomace using spray drying: A study of operative parameters. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, n. 1, Part 1, p. 177–186, jun. 2015.

PALUPI, N. W.; PRAPTININGSIH, Y. Oxidized Tapioca Starch As an Alginate Substitute for Encapsulation of Antioxidant from Coffee Residue. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, International Conference on Food, Agriculture and Natural Resources, IC-FANRes 2015. v. 9, p. 304–308, 1 jan. 2016.

PANG, J.; CHOI, Y.; PARK, T. Ilex paraguariensis extract ameliorates obesity induced by high-fat diet: potential role of AMPK in the visceral adipose tissue. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 476, n. 2, p. 178–185, 15 ago. 2008.

PEDRO, A. S. et al. Curcumin-loaded solid lipid particles by PGSS technology. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 107, p. 534–541, 1 jan. 2016.

PEREIRA, A. A. F. et al. Ilex paraguariensis supplementation may be an effective nutritional approach to modulate oxidative stress during perimenopause. **Experimental Gerontology**, v. 90, p. 14–18, abr. 2017.

PÉREZ, J. M. et al. Comparative Antioxidant, Antiproliferative and Apoptotic Effects of Ilex laurina and Ilex paraguariensis on Colon Cancer Cells. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 8, p. 1279–1286, 1 jan. 2014.

PÉREZ-VICENTE, A.; GIL-IZQUIERDO, A.; GARCÍA-VIGUERA, C. In vitro gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 8, p. 2308–2312, 10 abr. 2002.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035–

1042, jul. 2000.

PINTO, R. M. C. et al. DETECTION AND QUANTIFICATION OF PHYTOCHEMICAL MARKERS OF *Ilex paraguariensis* BY LIQUID CHROMATOGRAPHY. **Química Nova**, v. 38, n. 9, p. 1219–1225, nov. 2015.

PLACE, A. R. Comparative aspects of lipid digestion and absorption: physiological correlates of wax ester digestion. **The American Journal of Physiology**, v. 263, n. 3 Pt 2, p. R464-471, set. 1992.

POLKOVNIKOVA, Y. A.; SLIVKIN, A. I. Vinpocetine Release From a Microencapsulated Form. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 50, n. 8, p. 553–555, 1 nov. 2016.

POOL, H. et al. Encapsulation and release of hydrophobic bioactive components in nanoemulsion-based delivery systems: impact of physical form on quercetin bioaccessibility. **Food & Function**, v. 4, n. 1, p. 162–174, jan. 2013.

POPKIN, B. M. The nutrition transition and obesity in the developing world. **The Journal of Nutrition**, v. 131, n. 3, p. 871S–873S, mar. 2001.

POPKIN, B. M.; KENAN JR., W. R. Preventing type 2 diabetes: Changing the food industry. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, Diabetes prevention. v. 30, n. 3, p. 373–383, jun. 2016.

PRAKASH, B. et al. Nanoencapsulation: An efficient technology to boost the antimicrobial potential of plant essential oils in food system. **Food Control**, v. 89, p. 1–11, jul. 2018.

PUANGPRAPHANT, S.; BERHOW, M. A.; DE MEJIA, E. G. Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) saponins induce caspase-3-dependent apoptosis in human colon cancer cells in vitro. **Food Chemistry**, v. 125, n. 4, p. 1171–1178, 15 abr. 2011.

RAMOS, O. L. et al. Whey and Whey Powders: Production and Uses. In: **Encyclopedia of Food and Health**. Oxford: Academic Press, 2016. p. 498–505.

RANJHA, N. M.; KHAN, H.; NASEEM, S. Encapsulation and characterization of controlled release flurbiprofen loaded microspheres using beeswax as an encapsulating agent. **Journal of Materials Science. Materials in Medicine**, v. 21, n. 5, p. 1621–1630, maio 2010a.

RANJHA, N. M.; KHAN, H.; NASEEM, S. Encapsulation and characterization of controlled release flurbiprofen loaded microspheres using beeswax as an encapsulating agent. **Journal of Materials Science. Materials in Medicine**, v. 21, n. 5, p. 1621–1630, maio 2010b.

RATTI, C. Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review. **Journal of Food Engineering**, Drying. v. 49, n. 4, p. 311–319, 1 set. 2001.

RAVELO, Y. et al. Evaluation of anti-inflammatory and antinociceptive effects of D-002 (beeswax alcohols). **Journal of Natural Medicines**, v. 65, n. 2, p. 330–335, abr. 2011.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biología de las plantas**. Barcelona: Reverté, 1992.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, maio 1999.

REIS, E. D. M. et al. Antidepressant-Like Effect of *Ilex paraguariensis* in Rats. **BioMed Research International**, v. 2014, p. e958209, 4 maio 2014.

RIACHI, L. G.; DE MARIA, C. A. B. Yerba mate: An overview of physiological effects in humans. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 308–320, 1 nov. 2017.

RODRÍGUEZ-ROQUE, M. J. et al. Soymilk phenolic compounds, isoflavones and antioxidant activity as affected by in vitro gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 136, n. 1, p. 206–212, 1 jan. 2013.

SANTOS, E. C. S. et al. Anxiolytic-like, stimulant and neuroprotective effects of *Ilex paraguariensis* extracts in mice. **Neuroscience**, v. 292, p. 13–21, 30 abr. 2015.

SCALBERT, A. et al. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, n. 4, p. 287–306, 2005.

SCHINELLA, G.; FANTINELLI, J. C.; MOSCA, S. M. Cardioprotective effects of *Ilex paraguariensis* extract: evidence for a nitric oxide-dependent mechanism. **Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)**, v. 24, n. 3, p. 360–366, jun. 2005.

SEYMOUR, G. B. (ED.). **The molecular biology and biochemistry of fruit ripening**. Ames, Iowa, USA: Wiley-Blackwell, 2013.

SHAHIDI, F. **Natural Antioxidants: Chemistry, Health Effects, and Applications**. [s.l.] The American Oil Chemists Society, 1997.

SHINDE, R. L.; DEVARAJAN, P. V. Docosahexaenoic acid-mediated, targeted and sustained brain delivery of curcumin microemulsion. **Drug Delivery**, v. 24, n. 1, p. 152–161, nov. 2017.

SILVA, B. et al. A influência da concentração de acerola (*malpighia*, ssp.) no teor de vitamina c em bebida láctea adicionada de farinha de linhaça dourada (*linum usitatissimum* L.). Editora Edgard Blücher, fev. 2015 Disponível em: <<http://www.proceedings.blucher.com.br/article-details/17049>>. Acesso em: 17 set. 2016

SILVA, N. DA et al. **Manual de métodos de análise Microbiológica de Alimentos e água**. 4. ed. São Paulo: [s.n.].

SOBEL, R.; GUNDLACH, M.; SU, C.-P. Chapter 33 - Novel Concepts and Challenges of Flavor Microencapsulation and Taste Modification. In: **Microencapsulation in the Food Industry**. San Diego: Academic Press, 2014. p. 421–442.

SOBEL, R.; VERSIC, R.; GAONKAR, A. G. Chapter 1 - Introduction to Microencapsulation and Controlled Delivery in Foods. In: **Microencapsulation in the Food Industry**. San Diego: Academic Press, 2014. p. 3–12.

SPEED, M. P. et al. Coevolution can explain defensive secondary metabolite diversity in plants. **The New Phytologist**, v. 208, n. 4, p. 1251–1263, dez. 2015.

STEWART-KNOX, B.; MITCHELL, P. What separates the winners from the losers in new food product development? **Trends in Food Science & Technology**, v. 14, n. 1–2, p. 58–64, jan. 2003.

STREIT, N. M. et al. Relation among taste-related compounds (phenolics and caffeine) and sensory profile of erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Food Chemistry**, v. 102, n. 3, p. 560–564, 1 jan. 2007.

SUZUKI, S.; PARK, J. Consumer Evaluation of Healthy, Unpleasant-Tasting Food and the Post-Taste Effect of Positive Information. **Food Quality and Preference**, 31 jan. 2018.

TAGLIAZUCCHI, D. et al. In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. **Food Chemistry**, v. 120, n. 2, p. 599–606, 15 maio 2010.

TAJIK, N. et al. The potential effects of chlorogenic acid, the main phenolic components in coffee, on health: a comprehensive review of the literature. **European Journal of Nutrition**, 8 abr. 2017.

TENJARLA, S. Microemulsions: an overview and pharmaceutical applications. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 16, n. 5, p. 461–521, 1999.

TULLOCH, A. P. The composition of beeswax and other waxes secreted by insects. **Lipids**, v. 5, n. 2, p. 247–258, 1 fev. 1970.

VARSHOSAZ, J.; KEIHANFAR, M. Development and evaluation of sustained-release propranolol wax microspheres. **Journal of Microencapsulation**, v. 18, n. 3, p. 277–284, jun. 2001.

VASISHT, N. Chapter 16 - Selection of Materials for Microencapsulation. In: **Microencapsulation in the Food Industry**. San Diego: Academic Press, 2014. p. 173–180.

VIEIRA, M. A. et al. Chemical characterization of candy made of Erva-Mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) residue. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 12, p. 4637–4642, 25 jun. 2008.

VIEITEZ, I. et al. Antioxidant and antibacterial activity of different extracts from herbs obtained by maceration or supercritical technology. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 133, p. 58–64, 1 mar. 2018.

VILLACÍS-CHIRIBOGA, J. et al. Changes in phytochemical composition, bioactivity and in vitro digestibility of guayusa leaves (*Ilex guayusa* Loes.) in different ripening stages. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 14 set. 2017.

WANG, X.; JIANG, Y.; HUANG, Q. Encapsulation Technologies for Preserving and Controlling the Release of Enzymes and Phytochemicals. In: LAKKIS, J. M. (Ed.). **Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems**. [s.l.] Blackwell Publishing, 2007. p. 135–147.

WILSON, A. L. et al. Nudging healthier food and beverage choices through salience and priming. Evidence from a systematic review. **Food Quality and Preference**, v. 51, p. 47–64, 1 jul. 2016.

YU, S. et al. Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves microcirculation of volunteers with high blood viscosity: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Experimental Gerontology**, v. 62, p. 14–22, fev. 2015.

ZAMORA, Z. et al. Protective effects of D-002 on experimentally induced gastroesophageal reflux in rats. **World Journal of Gastroenterology : WJG**, v. 20, n. 8, p. 2085–2090, 28 fev. 2014.

ZHANG, N. et al. Lectin-modified solid lipid nanoparticles as carriers for oral administration of insulin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 327, n. 1–2, p. 153–159, 11 dez. 2006.

ZUR MÜHLEN, A.; SCHWARZ, C.; MEHNERT, W. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – Drug release and release mechanism. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 45, n. 2, p. 149–155, 1 mar. 1998.

أ. ب. ن. غان. The Antimicrobial Activity of Some Honey Bee Products and Some Saudi Folkloric Plant Extracts. **Journal of King Abdulaziz University: Science**, v. 23, n. 2, p. 47–62, jun. 2011.

APÊNDICE A – Artigo Científico

Proteção antioxidante de extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) em partículas lipídicas sólidas

Cintia C. T. Gris^a, Telma Elita Bortolin^b, Cintia Guarienti^c

^aGRIS, C.T.G. Endereço de e-mail: cctgris@gmail.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.

^bBERTOLIN, T. E. Endereço de e-mail: telma@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.

^cGUARIENTI, C. Endereço de e-mail: cintia.guarienti@iffarroupilha.edu.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

A crescente preocupação com a qualidade de vida e bem-estar é observada em diversos segmentos da sociedade contemporânea, o que traduz o interesse por alimentos que sejam sinônimo de praticidade, sabor e segurança alimentar. A erva-mate (*Ilex paraguariensis*), planta nativa da região sul do continente americano, possui potencial nutricional e antioxidante pouco explorado, estando seu consumo basicamente restrito às bebidas tradicionais. O uso de compostos bioativos para o desenvolvimento de alimentos, carece de pesquisas quanto a suas aplicabilidades e funcionalidades. Partículas Lipídicas Sólidas (PLS) são capazes de proteger os bioativos das mais diversas condições de exposição. Objetivamos a proteção do potencial antioxidante do extrato liofilizado de erva-mate através de PLS. O extrato de erva-mate liofilizado, foi caracterizado e submetido à testes de elaboração de PLS, utilizando cera de abelha como agente encapsulante. Obtivemos PLS insolúveis em água e de fluxo livre, esta apresentou eficiência de encapsulação de 92,73 % para um extrato liofilizado de erva-mate com 40% de concentração. As PLS protegeram o potencial antioxidante do extrato liofilizado durante 45 de armazenamento e o teste de digestibilidade mostrou o rompimento das PLS em condições entéricas, sugerindo a liberação do ativo no sítio de absorção. Diante destes resultados concluímos que o extrato liofilizado de erva-mate é uma alternativa para expandir os benefícios antioxidantes dessa planta para outros alimentos e públicos para além do consumo cultural. O desenvolvimento de PLS apresenta-se como uma alternativa eficiente para preservação do potencial do extrato liofilizado de erva-mate durante o armazenamento, permitindo que este chegue até seus sítios de absorção e exerça sua ação biológica.

Palavras-chave: Erva-mate, antioxidantes, compostos bioativos, microemulsão, partículas lipídicas sólidas.

ABSTRACT

The growing concern with quality of life and well-being is observed in several segments of contemporary society, which reflects the interest in food that is synonymous with practicality, taste and food safety. *Ilex paraguariensis*, native to the southern region of the American continent, has a great nutritional and antioxidant potential, but poorly explored and its consumption is basically restricted to traditional beverages. The use of bioactive compounds for food development lacks research on their applicability and functionalities. Solid Lipid Capsules (PLS) are able to protect bioactives from the most diverse exposure conditions. We aimed to protect the antioxidant potential of the lyophilized extract of yerba mate through PLS. The extract of lyophilized yerba mate was characterized and submitted to PLS elaboration tests, using beeswax as an encapsulating agent. We obtained PLS insoluble in water and free flow, this presented encapsulation efficiency of 92.73% for a freeze-dried extract of yerba mate with 40% concentration. PLS protected the antioxidant potential of the lyophilized extract during storage and the digestibility test showed the PLS disruption under enteric conditions, suggesting the release of the active at the absorption site. In light of these results, we conclude that lyophilized extract of yerba mate is an alternative to expand the antioxidant benefits of this plant to other foods and public beyond cultural consumption. The development of PLS presents itself as an efficient alternative to preserve the potential of lyophilized extract of yerba mate during storage, allowing it to reach its absorption sites and exert its biological action.

Keywords: Yerba-mate, antioxidants, bioactive compounds, microemulsion, microencapsulation.

1. INTRODUÇÃO

O atual cenário epidemiológico é caracterizado por um quadro crescente e contínuo de transição nutricional, evidenciado por mudanças no padrão alimentar e nos níveis de atividade física. Este quadro tem consequências negativas no estado nutricional da população (BRASIL, 2016), por conseguinte, faz-se necessário a valorização e a utilização de alimentos que, além de nutrir de forma balanceada o organismo, promova saúde e funcionalidade (POPKIN; KENAN JR., 2016).

Dentre esses alimentos destaca-se um alimento tradicional dos países da América do Sul, considerado sinônimo de hospitalidade, tradição e saúde, a erva-mate. *Ilex paraguariensis* St. Hil (erva-mate) é amplamente consumida e produzida no sul do Brasil, na Argentina, Uruguai e Paraguai. Esta planta, é rica em diferentes biocompostos, tais como, fenóis, metilxantinas, terpenos, saponinas, flavonóides, entre outros que denotam atividade antioxidante. Seu consumo está associado a redução de peso corpóreo, da gordura corporal e de marcadores de risco cardiometabólico (SCHINELLA; FANTINELLI; MOSCA, 2005) efeito hipocolesterolêmico, hipoglicemiante (FERNANDES et al., 2016) hepatoprotetor (SCALBERT et al., 2005).

A erva-mate, pertencendo ao grupo dos produtos não madeireiros de extrativismo vegetal, pode ser coletada da floresta, produzida em plantio ou sistemas agroflorestais, representando uma forma ambientalmente sustentável de geração de renda e uma alternativa de diversificação econômica para a agricultura familiar (LUZ, 2011).

A utilização da *Ilex paraguariensis* em alimentos prontos para consumo apresenta-se como uma das possibilidades de ampliação do mercado da erva-mate e para que isto seja possível é necessário que se estabeleçam técnicas que permitam a garantia da manutenção dos compostos bioativos e que sejam sensorialmente aceitáveis.

A encapsulação é uma tecnologia capaz de proteger os bioativos das mais diversas condições de exposição, pois permite o revestimento de partículas sólidas, gotas de líquidos e dispersões, com um “filme protetor”, é um meio de embalagem, separação e armazenamento de materiais em cápsulas para posterior liberação (SOBEL; VERSIC; GAONKAR, 2014). A utilização de partículas lipídicas sólidas (PLS) para encapsulação têm certas vantagens em relação às outras técnicas, como o aumento da estabilidade física e química, a possibilidade de obter maior eficiência de encapsulação, controle mais preciso sobre as propriedades de liberação dos ativos encapsulados, possibilidade de produção em grande escala e esterilização

(FATHI; MOZAFARI; MOHEBBI, 2012), estas vantagens também permitem que sejam uma opção interessante de proteção de materiais com bioatividade (BAZZARELLI; PIACENTINI; GIORNO, 2017).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATÉRIA PRIMA

As folhas *in natura* de erva-mate foram cedidas pela empresa INOVAMATE, do município de Ilópolis - RS. As folhas foram submetidas à secagem em estufa por 20 h em temperatura de 50 ± 2 °C. Após a secagem, as folhas de erva-mate foram trituradas em moinho de facas até atingir tamanho de partícula menor que 3,5 mm. Em seguida, a amostra foi embalada à vácuo e mantida sobre congelamento à -18 ± 2 °C até a utilização.

2.2 OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DO EXTRATO

O extrato de erva- mate foi preparado na concentração de 20 % em água destilada, devido a ensaios preliminares e de acordo com adaptações do método descrito por Murakami et al. (2011). O material foi aquecido por 5 min à 90 ± 2 °C e posteriormente foi realizada a filtração em tela de nylon utilizando uma bomba a vácuo.

O extrato submetido a secagem por *spray dryer* utilizou temperatura de 120 ± 2 °C e vazão de 0,64 L/h. O extrato submetido a liofilização foi levado ao ultra freezer permanecendo por 48 h à -80 ± 2 °C para posterior processo de liofilização por 60 h à -40 ± 2 °C. Após, foram realizadas análises de potencial antioxidante dos extratos e de erva-mate não submetida à secagem, objetivando a escolha do melhor método de secagem do extrato, visando a manutenção de seu potencial antioxidante. Após obtidos os extratos, estes foram encaminhados para processos de secagem e análise de potencial antioxidante por ABTS de Re et al. (1999).

O extrato que melhor manteve sua bioatividade após a secagem foi ressuspenso em água destilada (40 %), submetido a avaliação e caracterização e então encaminhado para realização dos testes de elaboração de PLS.

2.2.1 Avaliação do potencial antioxidante e fenólicos totais do extrato de erva-mate

A atividade antioxidante do extrato selecionado foi analisada segundo o método ABTS (2,2 – azinobis - 3- etil – benzotiazolina –6- ácido sulfônico) de Re et al. (1999), com adaptações e o método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) proposto por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). A atividade antioxidante determinada pelo método ABTS e DPPH foi expressa em mmol de Trolox/g de amostra de acordo com uma curva de calibração previamente construída. A análise de fenólicos totais foi realizada segundo metodologia de Souza e Correia (2012). Os resultados de fenólicos totais foram apresentados em mg ácido gálico/ml de amostra de acordo com uma curva de calibração previamente construída.

2.2.1 *Potencial antioxidante em diferentes pHs*

O comportamento do potencial antioxidante do extrato perante diferentes pHs foi realizado segundo método proposto por Chen et al. (2017). Posteriormente, foi realizada análise do potencial antioxidante de cada um dos extratos pelo método ABTS.

2.3 OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS

A microencapsulação do extrato de erva-mate foi realizada com base no método de microemulsão de Gifani et al. (2009), com adaptações. O agente encapsulante utilizado foi cera de abelha, adquirida na empresa Fenix Ceras (São Paulo-BR) e o núcleo utilizado foi extrato liofilizado de erva- mate resuspendido em diferentes concentrações. A proporção de encapsulante:núcleo, selecionada em ensaios preliminares, foi de 1:1.

O extrato liofilizado foi resuspendido nas concentrações 5%, 10%, 20%, 30% e 40% e acrescido de Tween 80 (1% da fase lipídica). A secagem foi realizada em temperatura ambiente por 72 h. As PLS foram padronizadas por granulometria, através de uma peneira de 710 µm. As PLS sólidas que apresentaram melhor eficiência de encapsulação, considerando as diferentes concentrações do núcleo, foram selecionadas para a continuidade dos ensaios.

2.3.1 Avaliação da Eficiência de Encapsulação

A solução coletada na filtração após a formação das cápsulas foi submetida a avaliação antioxidante pelo método de ABTS. A EE foi calculada através da relação entre o potencial antioxidante do extrato in natura e do potencial antioxidante da solução residual não encapsulada.

2.3.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

O extrato de erva-mate, o agente encapsulante (cera de abelha) e as PLS foram analisados por FTIR para identificar os grupamentos funcionais presentes. As condições operacionais foram região de varredura 4000 a 650 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} , e o registro dos espectros se deu através de Transmitância (%T). Os espectros foram obtidos por FTIR, utilizando equipamento Cary 630 FTIR, Agilent Technologies.

2,3.3 Avaliação Morfológica

As características superficiais (externas) foram avaliadas através do uso de microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura (MEV), marca Tescan, modelo VEGA 3, com aceleração de 20 kV. Para MEV, foram realizadas micrografias das amostras, após serem colocadas sobre *stubs* e recobertas com camada de ouro.

2.3.4 Comportamento térmico das micropartículas

O comportamento térmico das microcápsulas foi avaliado por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), equipamento Shimadzu modelo DSC-60. A análise consistiu no aquecimento de 5 mg de amostra na faixa de 25 °C a 300 °C, utilizando atmosfera de nitrogênio (50 ml/min) e uma taxa de aquecimento de 10 °C/min. A entalpia e as temperaturas de transição foram analisadas usando o software Universal Analysis (TA Instruments).

2.3.5 Solubilidade das PLS em água

A solubilidade das PLS foi determinada segundo a metodologia descrita por Cano-Chauca et al. (2005), com adaptações. Para as análises utilizou-se 1 g de cada amostra adicionada a 100 mL de água destilada, obtendo-se uma suspensão. A mesma foi agitada em manta de aquecimento, por 5 min em velocidade máxima em temperatura ambiente.

2.3.6 Proteção antioxidante ao longo do tempo

A atividade antioxidante do encapsulado foi avaliada ao longo de 45 dias para averiguar se a PLS foi capaz de proteger o potencial antioxidante do extrato de erva-mate. Em um erlenmeyer colocou-se 5 g de PLS em contato com 30 mL de água. A mistura foi agitada com bastão de vidro e acondicionada sob refrigeração por 45 dias. Após, 7, 20, 30 e 45 dias, a cápsula foi rompida em banho termostaticado a 65 °C. A mistura foi filtrada e o filtrado foi submetido a análise de potencial antioxidante pelo método de ABTS.

2.3.7 Digestibilidade *in vitro*

As PLS foram submetidas a teste *in vitro* de digestibilidade segundo método de Hu et al. (2010), com adaptações. Para a análise foram utilizadas 0,5 g de microcápsulas. A pancreatina (0,060g) foi preparada com 1,5 mL de solução tampão fosfato de potássio e os extratos biliares (0,188g) foram preparados com 0,5 mL do mesmo tampão. A amostra de microcápsulas e as enzimas tiveram seu pH ajustado para 7 e foram submetidos a agitação em shaker por 2 h a 37 °C. Posteriormente, foi realizada a quantificação de ácidos graxos livres de acordo com Hu et al. (2010).

2.4 ANÁLISE DOS DADOS

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística através da Análise de Variância (ANOVA), seguido pelo teste de comparação de médias de Tukey, a 5% de significância.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DO EXTRATO

A Tabela 1 apresenta os resultados do potencial antioxidante dos extratos aquosos de erva mate (20 %) secos em *spray dryer* e por liofilização em comparação com o extrato submetido à extração pelo método de Murakami et al. (2011) não submetido a secagem (extrato *in natura*).

Tabela 1 - Potencial antioxidante de extratos submetidos diferentes métodos de secagem

Amostra	Temperatura de extração	Tratamento de secagem	ABTS (mmol Trolox/g)
Erva-mate moída	90 ± 2 °C	-	13,96 ± 0,29 ^a
Erva-mate moída	90 ± 2 °C	<i>Spray dryer</i>	14,88 ± 0,19 ^a
Erva-mate moída	90 ± 2 °C	Liofilização	15,05 ± 0,06 ^a

Os resultados expressam a média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo Teste Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Autor (2018)

Os extratos submetidos a secagem por *spray dryer* e liofilização não apresentaram perdas em seu potencial antioxidante quando comparados ao extrato *in natura* (não submetido a secagem). Este resultado nos mostra que nas condições testadas ambos, *spray dryer* e liofilização poderiam ser utilizados para secagem do extrato sem que haja perdas no potencial antioxidante. Ratti (2001), realizou um estudo de revisão sobre a secagem com ar quente e liofilização em alimentos. O autor verificou que apesar da liofilização não ser amplamente utilizada na indústria de alimentos devido seu alto custo de operação, a secagem por vácuo é a tecnologia considerada adequada para de diferentes alimentos. Cieurzyńska; Lenart (2011), concordam que a aplicação da liofilização na indústria de alimentos ainda é restrita devido ao seu valor de utilização, mas também mencionam que a liofilização é um método de secagem que permite a obtenção de materiais secos com características típicas da matéria-prima e que é utilizada para a preservação confiável de uma ampla variedade de produtos, além de exigir os mais altos padrões de confiabilidade e controle. Os produtos liofilizados são muito estáveis e são fáceis de transportar e armazenar (MORAIS et al., 2016).

Considerando a preservação do potencial antioxidante por ambas as técnicas de secagem testadas e as vantagens apontadas pela literatura, optou-se pela continuidade dos ensaios

utilizando a técnica de liofilização.

3.1.1 Avaliação do potencial antioxidante e fenólicos totais do extrato liofilizado

Os resultados do potencial antioxidante e fenólicos totais do extrato liofilizado está apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 - Avaliação do potencial antioxidante e fenólicos totais do extrato liofilizado

Método de avaliação	Resultados
DPPH (mmol equivalente a Trolox/g)	10,50 ± 0,18
ABTS (mmol equivalente a Trolox/g)	14,88 ± 0,19
FENÓIS (mg equivalente a ácido gálico/g)	11,51 ± 1,36

Os resultados expressam a média ± desvio padrão.

Fonte: Autor (2018)

Os resultados de potencial antioxidante e fenólicos totais (Tabela 3) caracterizam o potencial bioativo e funcional das folhas de erva-mate.

O potencial antioxidante e o teor de fenóis totais dos extratos de erva-mate têm atraído a atenção da população mundial e expandido o consumo de chá mate para continentes onde culturalmente não existe seu hábito de consumo (CARDOZO JUNIOR; MORAND, 2016). Os antioxidantes naturais são conhecidos por retardar o dano oxidativo causado pela produção de espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio. A oxidação de constituintes celulares e outros componentes podem levar a modificações estruturais e conseqüentemente causar perda de sua atividade biológica. Esse fenômeno está associado à ocorrência de várias patologias, como câncer, cardiopatia e diabetes (BRACESCO et al., 2011). Cardozo Junior; Morand (2016), mencionam que, com base na composição fitoquímica da erva-mate e nos dados trazidos por outros estudos sobre os efeitos biológicos associados a esses bioativos, os produtos de erva-mate podem representar fontes alimentares interessantes para a nutrição humana relacionada à saúde cardiovascular. De forma semelhante os fitoquímicos presentes na erva-mate, em especial os polifenóis, são apontados como responsáveis pelos efeitos hipoglicemiante e antiobesogênico (GAMBERO; RIBEIRO, 2015).

Riachi; De Maria (2017), ressaltam que se os resultados positivos e consistentes, em relação a ação dos fitoquímicos da erva-mate, forem confirmados ao longo do tempo, ela pode ser reconhecida como um alimento funcional.

3.1.2 Comportamento do potencial antioxidante do extrato em diferentes pHs

A Tabela 3 apresenta os resultados do comportamento do potencial antioxidante do extrato de erva mate submetido a diferentes pHs.

Tabela 3 - Comportamento do potencial antioxidante do extrato de erva mate submetido a diferentes pHs

Condições de pH da amostra	ABTS (mmol Trolox/g)
pH 5,3	11,18±0,06 ^a
pH 2,2	9,66±0,27 ^b
pH 8,16	10,78±0,20 ^a
pH 2,2 + transição para pH 8,12	6,79±0,62 ^c

Os resultados expressam a média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo Teste Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Autor (2018)

O extrato liofilizado de erva-mate apresentou pH inicial de 5,3 e mostrou-se estável ao pH intestinal (8,16), no entanto mostrou perda de atividade antioxidante quando submetido ao pH que mimetiza o pH estomacal (2,2), quando simulada à passagem do extrato do pH estomacal para o pH intestinal (2,2-8,12) e à armazenagem em pH de iogurtes e bebidas lácteas fermentadas. Esses resultados mostram que a aplicabilidade do extrato liofilizado de erva-mate em alimentos tende a ser limitada e que mudanças de pH podem prejudicar seu mecanismo de ação e, conseqüentemente, sua atividade biológica.

Os benefícios dos compostos antioxidantes para a saúde dependem da quantidade ingerida e da biodisponibilidade destes nos tecidos alvos. Apesar de não serem utilizadas enzimas digestivas nesta análise, nossos resultados mostram que o destino gastrointestinal dos compostos não só é comprometido pela sua quantidade/natureza química, mas também pelo ambiente físico-químico específico em cada estágio de digestão. Villacís-Chiriboga et al. (2017), que averiguaram mudanças na composição fitoquímica, bioatividade e digestibilidade *in vitro* de folhas de guayusa (*Ilex guayusa* Loes) também perceberam que durante a digestão gastrointestinal *in vitro*, a capacidade antioxidante medida pelo método ABTS diminuiu significativamente. Além disso, mencionam que é possível que o pH possa exercer um efeito sobre a estrutura dos compostos fenólicos ao longo da digestão, o que também pode afetar sua capacidade antioxidante. Esta característica é atribuída, principalmente, às estruturas particulares e grupos funcionais de compostos fenólicos, e não tanto às quantidades totais desses componentes (TAGLIAZUCCHI et al., 2010). Koehnlein et al. (2016), mostraram que após a digestão *in vitro*, cereais, legumes, vegetais, tubérculos,

chocolates e frutos apresentaram maior conteúdo fenólico e atividades antioxidantes superiores às obtidas por extração aquosa.

Ao contrário, a digestão causou redução nos conteúdos fenólicos e nas atividades antioxidantes das bebidas como vinho tinto, café e erva-mate. O autor ainda sugeriu que os fenólicos de grupos de alimentos com matriz sólida e complexa são protegidos contra a ação enzimática e alteração no pH durante a digestão, o que não ocorre em matrizes de alimentos líquidos, como as bebidas. Friedman; Jürgens (2000) submeteram diferentes polifenóis a diferentes pHs e concluíram que cada composto pode se comportar de maneira diferente diante das mudanças de pHs. Os autores também mencionam que as transformações ocorridas não são reversíveis, o que pode explicar a maior perda de atividade no extrato submetido à transição de pH.

Uma alternativa que pode auxiliar na manutenção do potencial antioxidante do extrato até o momento da absorção em seus sítios alvos é a proteção desses compostos por técnicas de encapsulação (MASSOUNGA BORA et al., 2018). O aprisionamento de ativos dentro de PLS pode superar os problemas relacionados à baixa estabilidade de ativos durante ao armazenamento e a mudanças de pH (ĐORĐEVIĆ et al., 2015).

3.2 ELABORAÇÃO DE PLS

3.2.1 Obtenção das PLS

Obtivemos PLS contendo extrato em diferentes concentrações. Em nossas PLS temos uma região não polar (cera de abelha), uma região polar (extrato liofilizado ressuspenso) e uma região anfifílica (Tween 80). A simples mistura destas fases formam as microcápsulas pela auto-reunião espontânea de moléculas por meio de interações hidrofóbicas, que conduzem as moléculas hidrofílicas para formar um núcleo e uma parte hidrofóbica que acaba formando um invólucro orientado para a fase externa do sistema (OELHKE et al., 2014).

Em geral, as PLS possuem certas vantagens em relação às emulsões convencionais, como o aumento da estabilidade física e química, a possibilidade de obter maior eficiência de encapsulação, controle mais preciso sobre as propriedades de liberação dos ativos encapsulados, possibilidade de produção em grande escala e esterilização (ĐORĐEVIĆ et al., 2015).

3.2.1 Avaliação das PLS

3.2.1.1 Avaliação da Eficiência de Encapsulação (EE%)

A EE (%) das PLS com variações nas concentrações do extrato liofilizado (núcleo) pode ser acompanhada na Tabela 4. A EE avalia qual o percentual do ativo (extrato liofilizado de erva-mate) foi incorporado e encontra-se nas PLS.

Tabela 4- EE (%) das microcápsulas com diferentes concentrações de extrato

Concentrações do extrato/núcleo (%)	Eficiência de Encapsulação (EE%)
5	86,1 ± 1,14 ^b
10	78,69 ± 1,52 ^c
20	95,58 ± 0,54 ^a
30	92,48 ± 0,54 ^a
40	92,73 ± 0,51 ^a

Os resultados expressam a média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo Teste Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Autor (2018)

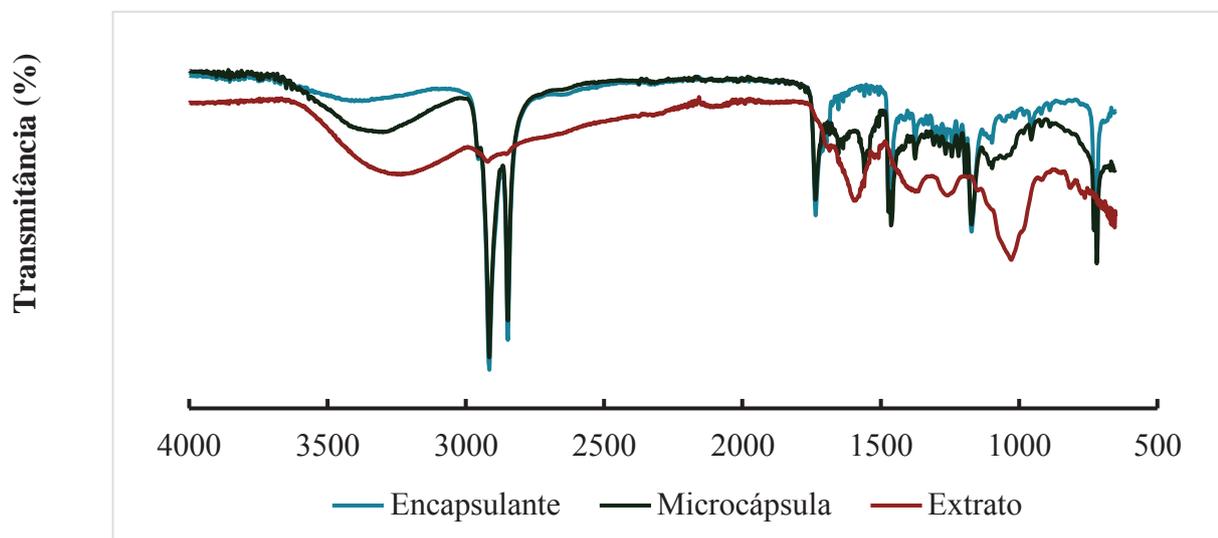
Extratos liofilizados mais concentrados (20 %, 30 % e 40 %) apresentaram maior eficiência de encapsulação. Sugerimos que o aumento da EE (%) à medida que a concentração do extrato aumentava, é explicada pela diminuição da quantidade de água na mistura. Nas misturas mais concentradas, a quantidade de água utilizada na diluição era menor, o que pode ter facilitado as interações hidrofóbicas, melhorando a EE (%). Mouri et al. (2014), mostraram que após a diluição com água, sua emulsão tornou-se muito mais estruturada do que o sistema puro e que os domínios foram melhores definidos após a adição de moléculas de água. No entanto, os autores ressaltam que a mudança de comportamento das emulsões com acréscimo de água se aproxima da linha de separação de fases, neste sentido, sugerimos que o acréscimo demasiado de água torna-se prejudicial para a eficiência de microencapsulação de emulsões. Como maior concentração de extrato representa também maior concentração de potencial antioxidante na PLS, optamos por prosseguir os ensaios utilizando PLS com extrato liofilizado com 40 % de concentração.

3.2.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As imagens de FTIR referentes ao extrato liofilizado, encapsulante e PLS estão

disponíveis na Figura 1.

Figura 1- Sobreposição das análises de FTIR do extrato liofilizado, encapsulante e PLS



As PLS apresentam em seu exterior/superfície vibrações características das moléculas encontradas no agente encapsulante (cera de abelha), o que nos leva a concluir que o extrato liofilizado encontra-se no interior da cápsula e o encapsulante na parte externa da mesma, significando que a microencapsulação ocorreu da maneira esperada. A semelhanças nas bandas encontradas no encapsulante e nas microcápsulas pode ser explicado pelo fato do FTIR ser um tipo de espectroscopia de absorção, onde as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibração específicas, as quais correspondem a níveis de energia da molécula, no entanto a identificação das vibrações ocorre na superfície da amostra (LEE; LIONG; JEMAIN, 2017).

O espectro do extrato liofilizado nos permite verificar bandas característica do grupo funcional hidroxil associado ($3235,32\text{ cm}^{-1}$), grupo este que pode ser encontrado em água, álcoois e compostos fenólicos. Considerando a amostra em questão, sugere-se que esse pico seja referente aos compostos fenólicos. Também é possível perceber a banda característica de $\text{C}=\text{C}$ de aromáticos ($1595,30\text{ cm}^{-1}$), grupo encontrado alguns compostos antioxidantes como alguns ácidos fenólicos, por exemplo. Os grupos CH_3 com deformação angular e o grupo $\text{C}-\text{O}$ de fenóis também podem ser identificados (bandas $1364,20\text{ cm}^{-1}$ e $1256,11\text{ cm}^{-1}$, respectivamente).

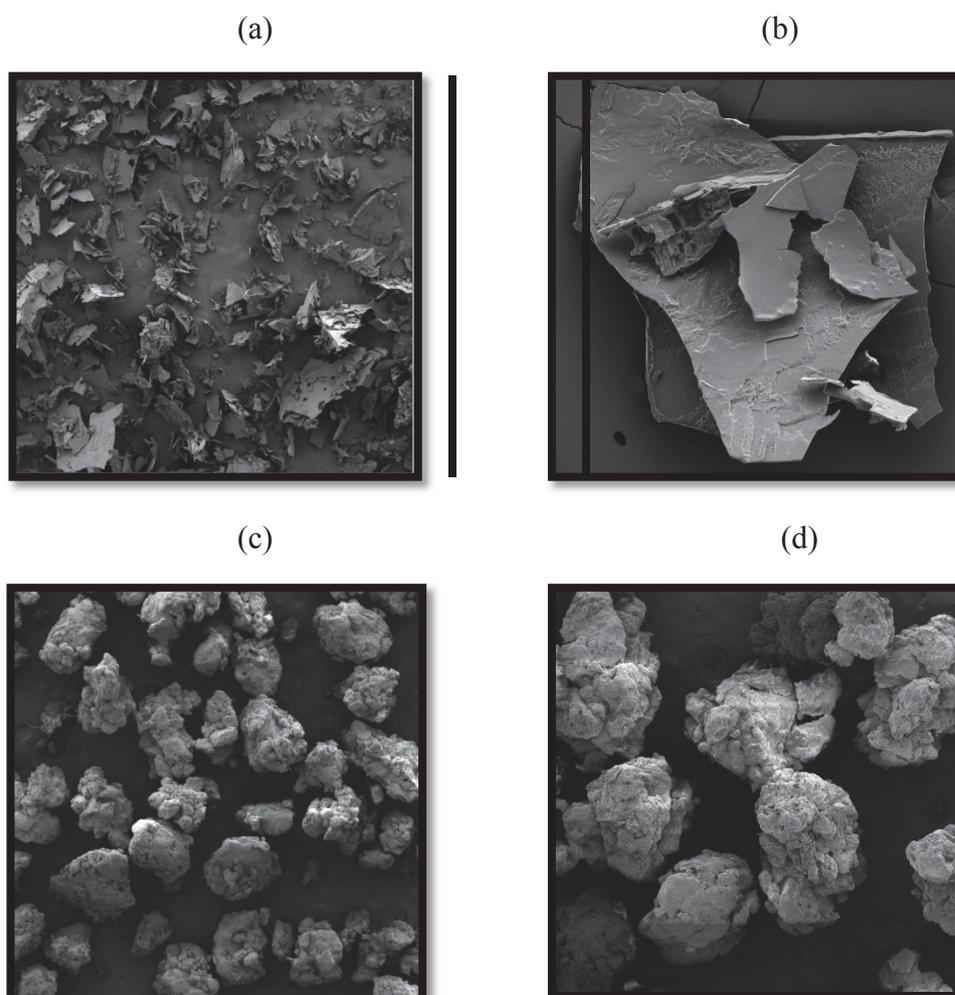
Observando o espectro do encapsulante (cera de abelha) verifica-se a banda característica de $\text{C}-\text{H}$ alifáticos ($2914,77\text{ cm}^{-1}$), a mesma banda é percebida nas PLS, no

entanto não foi identificada no extrato liofilizado de erva-mate. O mesmo acontece com a banda característica do grupamento de C=O de aldeídos ($1735,07\text{ cm}^{-1}$) e com a banda do grupamento C=C de aromáticos ($1462,98\text{ cm}^{-1}$).

3.2.3 Avaliação Morfológica

Na Figura 2, encontra-se as imagens da microscopia eletrônica de varredura (MEV) do extrato liofilizado e das microcápsulas e confirma-se a eficiência de encapsulação do método utilizado devido a nítida diferença entre as características do extrato e das PLS. As imagens mostram PLS com formato e superfície irregulares e diferentes tamanhos.

Figura 2 - Microscopia eletrônica de varredura do extrato liofilizado (a – 100 vezes de aumento e b – 1200 vezes de aumento) e das PLS (c – 100 vezes de aumento e d-1200 vezes de aumento)



Fonte: Autor (2018)

Nossas PLS apresentam superfície rugosa e com características de aglomerados, essas características podem ser explicadas pelo método de secagem utilizado. Como PLS foram secas em temperatura ambiente, a evaporação da água acontecia de forma lenta resultando em microcápsulas com formato e superfície irregular (MEYAGUSKU, 2014).

3.2.3.1 Análises de comportamento térmico das PLS

A Figura 3 apresenta o termograma de calorimetria exploratória diferencial (DSC) do extrato liofilizado, encapsulante (cera de abelha) e das PLS, respectivamente. A análise de DSC fornece ainda a temperatura e a entalpia de fusão das partículas. Os ensaios correspondentes as temperaturas iniciais, finais, de pico e entalpia das amostras podem ser acompanhados na Tabela 5.

Figura 3 - Termograma de calorimetria exploratória diferencial do extrato liofilizado, microcápsulas e agente encapsulante

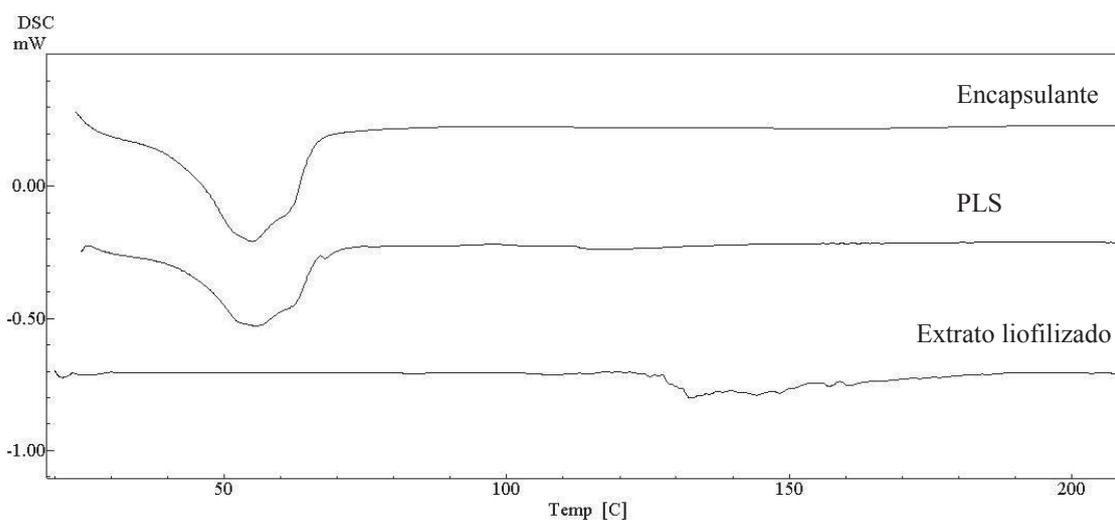


Tabela 5 - Temperaturas dos fluxos de calor das amostras

Amostras	Ti °C	Tp °C	Tf °C	ΔH J/g
Extrato Liofilizado	127,82	132,79	150,01	-3,23
Encapsulante	44,19	55,01	65,81	-12,83
PLS	44,58	55,67	66,48	-9,27

Ti – temperatura inicial; Tp – temperatura de pico; Tf – temperatura final; ΔH – entalpia.

Fonte: Autor (2018)

As diferenças nos valores entalpia das amostras, sugere que ocorreu um novo arranjo entre a estrutura do encapsulante e a estrutura do ativo.

As curvas de fusão para as microcápsulas mostram-se semelhantes as curvas do encapsulante (Figura 21), bem como a temperatura do pico, sugerido como pico de fusão (Tabela 7). Neste sentido, devido as características do encapsulante, sugere-se que a microcápsula possua um ponto de fusão de 55,67 °C garantindo a proteção do ativo até a temperatura inicial do pico 44,58 °C, não sendo recomendada sua incorporação em matrizes alimentares que passem por processos de aquecimento e altas temperaturas.

Asumadu-Mensah; Smith; Ribeiro (2013) ressalta que por ser um lipídio complexo, composto e de cadeia longa uma mesma amostra de cera pode apresentar formas polimórficas com temperaturas de cristalização diferentes. Müller; Radtke; Wissing (2002), relataram que o uso de lípidos compostos tem melhores perspectivas para maior carga de ativos, isto porque esses lípidos possuem uma maior distância entre as cadeias de ácidos graxos dos glicerídeos, bem como as imperfeições no cristal, proporcionando mais espaço para incorporação de compostos ativos.

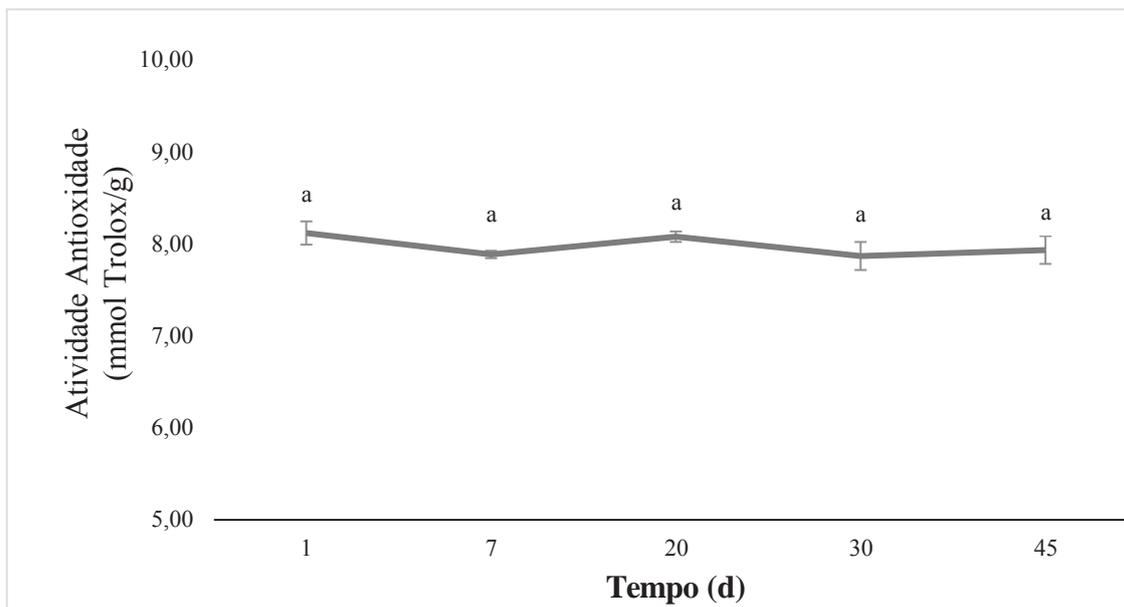
3.2.3.2 Solubilidade das PLS em água

A solubilidade calculada caracterizou as PLS com $99,99 \pm 5.10^{-5}$ % insolúvel em água. PLS insolúveis em água possibilitam a aplicação e proteção de núcleos em meios com alto teor de água (ĐORĐEVIĆ et al., 2015). Neste trabalho, insolubilidade das cápsulas em meio aquoso garante que o núcleo não será liberado no iogurte e que desta forma sua ação antioxidante só acontecerá no organismo humano por meio de ação enzimática.

3.2.3.3 Avaliação do potencial antioxidante do encapsulado protegido por PLS ao longo do tempo

Os resultados da atividade antioxidante do encapsulado armazenado por 45 dias, podem ser acompanhados na Figura 4.

Figura 4 - Potencial antioxidante do encapsulado ao longo do tempo



Os resultados expressam a média \pm desvio padrão. Letras diferentes significam que diferem significativamente pelo Teste Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Autor (2018)

A microcápsula preservou o potencial antioxidante do extrato microencapsulado ao longo de 45 dias de armazenamento.

Pedro et al. (2016), utilizaram PLS para microencapsular curcumina e Bazzarelli; Piacentini; Giorno (2017) utilizaram PLS para microencapsular biofenóis, os autores utilizaram métodos diferentes para formação das PLS, porém, ambos, concordaram que PLS veículos interessantes de transporte de partículas. Além disso, a literatura mostra que transportadores protegem o núcleo da degradação no trato gastrointestinal, garantindo sua atividade nos sítios alvos (CHRISTOPHERSEN et al., 2014; ZHANG et al., 2006; ZUR MÜHLEN; SCHWARZ; MEHNERT, 1998).

Considerando nossos resultados, podemos concordar que PLS são eficientes na proteção de compostos bioativos do extrato de erva-mate, em alimentos líquidos ou pastosos, ao longo de 45 dias (vida de prateleira de alimentos como iogurtes, por exemplo).

Os antioxidantes protegidos por PLS permanecerão estáveis durante o armazenamento sob refrigeração até o momento do consumo.

3.2.3.4 Digestibilidade *in vitro*

O percentual de ácidos graxos livres das PLS não submetidas a digestibilidade *in vitro* foi $7,7 \pm 0,51\%$ enquanto que o percentual de ácidos graxos livres das PLS que passaram pelo ensaio de digestibilidade foi $33,33 \pm 0,51\%$. Esses resultados confirmam que haverá o rompimento das PLS durante o processo de digestão possibilitando a absorção e ação do extrato de erva-mate.

Sabe-se que os flavonóides e os ácidos fenólicos são amplamente metabolizados após ingestão, sendo geralmente transformados em metabólitos plasmáticos com menor atividade antioxidante do que as moléculas precursoras. Estudos que mimetizam o processo de digestão mostraram que o conteúdo de compostos bioativos é modificado ao passar pelos vários compartimentos do trato gastrointestinal como consequência de alterações de pH, ações enzimáticas e atividade metabólica da microbiota intestinal (BOAVENTURA et al., 2015; KOEHNLEIN et al., 2016). O fato das PLS de cera de abelha serem estáveis em condições estomacais, ajuda a garantir que o encapsulado ultrapasse a barreira gástrica sem sobre modificações, o que leva a garantir uma melhor absorção e ação antioxidante quando liberado nas condições intestinais (OBAIDAT; OBAIDAT, 2001; RANJHA; KHAN; NASEEM, 2010).

No entanto, é de suma importância que no ambiente intestinal, mediante as lipases e demais condições do intestino delgado, ocorra o rompimento das PLS e consequente liberação do encapsulado para que os compostos com potencial antioxidante possam ser absorvidos, e atingir o alvo fisiológico numa concentração mínima que induza o efeito biológico e o mecanismo de ação.

4. CONCLUSÕES

O desenvolvimento de PLS apresenta-se como uma alternativa eficiente para preservação do potencial do extrato liofilizado de erva-mate durante o armazenamento, permitindo que este chegue até seus sítios de absorção e exerça sua ação biológica além de ser uma alternativa para expandir os benefícios antioxidantes dessa planta para outros alimentos e públicos para além do consumo cultural.

REFERÊNCIAS

- ASUMADU-MENSAH, A.; SMITH, K. W.; RIBEIRO, H. S. Solid lipid dispersions: potential delivery system for functional ingredients in foods. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 7, p. E1000-1008, jul. 2013.
- BAZZARELLI, F.; PIACENTINI, E.; GIORNO, L. Biophenols-loaded solid lipid particles (SLPs) development by membrane emulsification. **Journal of Membrane Science**, v. 541, p. 587–594, 1 nov. 2017.
- BOAVENTURA, B. C. B. et al. Effect of in vitro digestion of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) extract on the cellular antioxidant activity, antiproliferative activity and cytotoxicity toward HepG2 cells. **Food Research International**, FOOD BIOACTIVE COMPOUNDS: QUALITY CONTROL AND BIOACTIVITY. v. 77, p. 257–263, 1 nov. 2015.
- BRACESCO, N. et al. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 3, p. 378–384, 14 jul. 2011.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1 jan. 1995.
- BRASIL, M. DA S. Vigitel Brasil 2016: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal, 2016.
- CANO-CHAUCA, M. et al. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 6, n. 4, p. 420–428, 1 dez. 2005.
- CARDOZO JUNIOR, E. L.; MORAND, C. Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health – A review. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 440–454, mar. 2016.
- CHEN, Y. et al. Influence of in vitro gastrointestinal digestion on the bioavailability and antioxidant activity of polyphenols from *Ipomoea batatas* leaves. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 52, n. 5, p. 1131–1137, 1 maio 2017.
- CHRISTOPHERSEN, P. C. et al. Solid lipid particles for oral delivery of peptide and protein drugs II--the digestion of trilaurin protects desmopressin from proteolytic degradation. **Pharmaceutical Research**, v. 31, n. 9, p. 2420–2428, set. 2014.
- CIURZYŃSKA, A.; LENART, A. Freeze-Drying - Application in Food Processing and Biotechnology - A Review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 61, n. 3, p. 165–171, 2011.
- DORĐEVIĆ, V. et al. Trends in Encapsulation Technologies for Delivery of Food Bioactive Compounds. **Food Engineering Reviews**, v. 7, n. 4, p. 452–490, 1 dez. 2015.

FERNANDES, C. E. F. et al. Phytochemical profile, antioxidant and hypolipemiant potential of *Ilex paraguariensis* fruit extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 81, p. 139–146, mar. 2016.

FRIEDMAN, M.; JÜRGENS, H. S. Effect of pH on the Stability of Plant Phenolic Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2101–2110, jun. 2000.

GAMBERO, A.; RIBEIRO, M. L. The positive effects of yerba maté (*Ilex paraguariensis*) in obesity. **Nutrients**, v. 7, n. 2, p. 730–750, 22 jan. 2015.

GIFANI, A. et al. Preparation and investigation the release behaviour of wax microspheres loaded with salicylic acid. **Journal of Microencapsulation**, v. 26, n. 6, p. 485–492, set. 2009.

HU, M. et al. Role of calcium and calcium-binding agents on the lipase digestibility of emulsified lipids using an in vitro digestion model. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 8, p. 719–725, 1 nov. 2010.

KOEHNLEIN, E. A. et al. Analysis of a whole diet in terms of phenolic content and antioxidant capacity: effects of a simulated gastrointestinal digestion. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 67, n. 6, p. 614–623, set. 2016.

LEE, L. C.; LIONG, C.-Y.; JEMAIN, A. A. A contemporary review on Data Preprocessing (DP) practice strategy in ATR-FTIR spectrum. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 163, p. 64–75, 15 abr. 2017.

LIU, M. J. et al. Preparation of novel butyryl galactose ester-modified coix component microemulsions and evaluation on hepatoma-targeting in vitro and in vivo. **Drug Delivery**, v. 23, n. 9, p. 3444–3451, nov. 2016.

LUZ, M. DA. Carijos e barbaquás no Rio Grande do Sul: resistência camponesa e conservação ambiental no âmbito da fabricação artesanal de erva-mate. 2011.

MASSOUNGA BORA, A. F. et al. Application of microencapsulation for the safe delivery of green tea polyphenols in food systems: Review and recent advances. **Food Research International**, v. 105, p. 241–249, 1 mar. 2018.

MEYAGUSKU, V. M. Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas contendo ciprofloxacino. Araraquara – SP: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, 2014.

MORAIS, A. R. DO V. et al. Freeze-drying of emulsified systems: A review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 503, n. 1, p. 102–114, 30 abr. 2016.

MOURI, A. et al. Water solubilization capacity of pharmaceutical microemulsions based on Peceol®, lecithin and ethanol. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 475, n. 1, p. 324–334, 20 nov. 2014.

MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Human skin: the Medium of Touch. v. 54, p. S131–S155, 1 nov. 2002.

NEGRÃO MURAKAMI, A. N. et al. Concentration of phenolic compounds in aqueous mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil) extract through nanofiltration. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 10, p. 2211–2216, dez. 2011.

OBAIDAT, A. A.; OBAIDAT, R. M. Controlled release of tramadol hydrochloride from matrices prepared using glyceryl behenate. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.**, v. 52, n. 2, p. 231–235, set. 2001.

PEDRO, A. S. et al. Curcumin-loaded solid lipid particles by PGSS technology. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 107, p. 534–541, 1 jan. 2016.

POPKIN, B. M.; KENAN JR., W. R. Preventing type 2 diabetes: Changing the food industry. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, Diabetes prevention. v. 30, n. 3, p. 373–383, jun. 2016.

PRAKASH, B. et al. Nanoencapsulation: An efficient technology to boost the antimicrobial potential of plant essential oils in food system. **Food Control**, v. 89, p. 1–11, jul. 2018.

RANJHA, N. M.; KHAN, H.; NASEEM, S. Encapsulation and characterization of controlled release flurbiprofen loaded microspheres using beeswax as an encapsulating agent. **Journal of Materials Science. Materials in Medicine**, v. 21, n. 5, p. 1621–1630, maio 2010.

RATTI, C. Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review. **Journal of Food Engineering**, Drying. v. 49, n. 4, p. 311–319, 1 set. 2001.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, maio 1999.

RIACHI, L. G.; DE MARIA, C. A. B. Yerba mate: An overview of physiological effects in humans. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 308–320, 1 nov. 2017.

SCALBERT, A. et al. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, n. 4, p. 287–306, 2005.

SCHINELLA, G.; FANTINELLI, J. C.; MOSCA, S. M. Cardioprotective effects of *Ilex paraguariensis* extract: evidence for a nitric oxide-dependent mechanism. **Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)**, v. 24, n. 3, p. 360–366, jun. 2005.

SHINDE, R. L.; DEVARAJAN, P. V. Docosahexaenoic acid-mediated, targeted and sustained brain delivery of curcumin microemulsion. **Drug Delivery**, v. 24, n. 1, p. 152–161, nov. 2017.

TAGLIAZUCCHI, D. et al. In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. **Food Chemistry**, v. 120, n. 2, p. 599–606, 15 maio 2010.

VILLACÍS-CHIRIBOGA, J. et al. Changes in phytochemical composition, bioactivity and in vitro digestibility of guayusa leaves (*Ilex guayusa* Loes.) in different ripening stages. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 14 set. 2017.

ZHANG, N. et al. Lectin-modified solid lipid nanoparticles as carriers for oral administration of insulin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 327, n. 1–2, p. 153–159, 11 dez. 2006.

ZUR MÜHLEN, A.; SCHWARZ, C.; MEHNERT, W. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – Drug release and release mechanism. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 45, n. 2, p. 149–155, 1 mar. 1998.