

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS FACULDADE DE AGRONOMIA
“ELISEU MACIEL”**

**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**



Tese

Obtenção de extratos de amora-preta (*Rubus* sp.), ricos em antocianinas e estabilizados por liofilização ou microencapsulação por *spray-drying*, e avaliação de seus potenciais de utilização como corantes naturais para alimentos

Fernanda Izabel Garcia da Rocha Concenço

Pelotas/RS, 2021

FERNANDA IZABEL GARCIA DA ROCHA CONCENÇO

Obtenção de extratos de amora-preta (*Rubus* sp.), ricos em antocianinas e estabilizados por liofilização ou microencapsulação por *spray-drying*, e avaliação de seus potenciais de utilização como corantes naturais para alimentos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Comitê de orientação:

Professor PhD. Leonardo Nora

Pesquisadora PhD. Márcia Vizzotto

Pelotas/RS, 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

C744o Concenco, Fernanda Izabel Garcia da Rocha

Obtenção de extratos de amora-preta (*Rubus sp.*), ricos em antocianinas e estabilizados por liofilização ou microencapsulação por spray-drying, e avaliação de seus potenciais de utilização como corantes naturais para alimentos / Fernanda Izabel Garcia da Rocha Concenco ; Leonardo Nora, orientador ; Márcia Vizzotto, coorientadora. — Pelotas, 2021.

81 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. Antocianinas. 2. Microencapsulação. 3. Corante. 4. Amora-preta. 5. Alimentos. I. Nora, Leonardo, orient. II. Vizzotto, Márcia, coorient. III. Título.

CDD : 664

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

FERNANDA IZABEL GARCIA DA ROCHA CONCENÇO

Obtenção de extratos de amora-preta (*Rubus* sp.), ricos em antocianinas e estabilizados por liofilização ou microencapsulação por *spray-drying*, e avaliação de seus potenciais de utilização como corantes naturais para alimentos

Tese aprovada como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 02 de setembro de 2021.

Banca examinadora:

.....
Professor PhD. Leonardo Nora – DCTA/FAEM/UFPEL

.....
Pesquisadora PhD. Márcia Vizzotto - Embrapa Clima Temperado

.....
Professora Dr.^a Márcia Arocha Gularte - CCQFA/UFPEL

.....
Professora Dr.^a Elessandra da Rosa Zavareze – DCTA/FAEM/UFPEL

.....
Professor Dr. Euclésio Simionatto - PGRN/UEMS

Dedico este trabalho aos meus pais João Darcy e Ernestina (*In Memoriam*), pelo amor e dedicação à família.

Meu esposo Germani e à minha filha Elisa, pelo incentivo e compreensão em muitos momentos em que estive ausente.

Aos meus irmãos José, Mario e Maria pelo incentivo e apoio em todos os momentos.

Agradecimentos

A Deus por sua presença, seu conforto e por transformar minhas idealizações em sua vontade.

A toda minha família, em especial aos meus pais (*In Memoriam*), sempre presentes em minha vida, fornecendo minha base de princípios éticos, oferecendo carinho, amor e paciência, não medindo esforços para que eu pudesse realizar os meus sonhos, que, por seus exemplos, me guiam em todos os momentos!

Aos meus irmãos por me motivarem e sempre torcerem pelo meu sucesso.

Ao meu esposo Germani, por toda paciência, amor, amizade, companheirismo, e por sempre me acalmar nos momentos mais difíceis.

À minha filha Elisa, por entender minha ausência em muitos momentos importantes da sua vida, na busca de lhe oferecer um mundo e futuro bem melhores.

Ao meu orientador, professor Dr. Leonardo Nora, e a minha coorientadora, Dra. Márcia Vizzotto, pela oportunidade e confiança na realização deste trabalho. Agradeço imensamente pelo tempo de orientação, dedicação e ensinamentos valiosos para vida profissional e pessoal repassados nestes anos de convivência, principalmente pela tranquilidade com que ambos conduziram nossas interações.

A Embrapa Clima Temperado, pelas amostras de frutas e pelo acesso aos laboratórios do núcleo de alimentos.

À UFPEL e ao PPGCTA pela oportunidade de realizar este trabalho. Ao CAVG-IFSUL pela disponibilidade do *spray-drying*, ao CCQFA/UFPEL pelo apoio na aplicação da análise sensorial, e ao CEME-SUL FURG pelo fornecimento das micro imagens dos corantes.

À Capes pela concessão da bolsa.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, auxiliaram para a concretização deste trabalho, os meus profundos sentimentos de gratidão e respeito.

Resumo

CONCENÇO - Fernanda Izabel Garcia da Rocha. Obtenção de extratos de amora-preta (*Rubus* sp.), ricos em antocianinas e estabilizados por liofilização ou microencapsulação por *spray-drying*, e avaliação de seus potenciais de utilização como corantes naturais para alimentos. 2021. 81f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A amora-preta, em função da sua elevada taxa respiratória e estrutura frágil, apresenta uma vida pós-colheita curta, sendo necessária a utilização de cuidados especiais na conservação pós-colheita. A microencapsulação por *spray-drying* e a liofilização protegem os compostos bioativos da degradação, aumentando sua solubilidade. Neste contexto, objetivou-se avaliar o processo de obtenção de extratos ricos em antocianinas de amora-preta, liofilizados e microencapsulados por *spray-drying*, e também o potencial de utilização destes extratos como corante natural para alimentos. Os extratos, obtidos de duas variedades de amora-preta (Guarany e Tupy), foram analisados quantitativamente quanto aos compostos bioativos e a variedade com a maior concentração de antocianinas foi utilizada para o teste como corante natural em iogurte sem coloração. A microencapsulação por *spray-drying* mostrou-se promissora na obtenção de um extrato rico em antocianinas, dentre outros compostos fenólicos, com elevada atividade antioxidante e com potencial para ser utilizado como corante natural em iogurtes. A morfologia das microcápsulas produzidas consistiu em estruturas semelhantes e esféricas. A estrutura das partículas obtidas após secagem do extrato aquoso por liofilização foi majoritariamente do tipo placa, com formatos irregulares, o que é típico de extratos obtidos por liofilização. O corante natural oriundo de amora-preta apresentou estabilidade intermediária em modelos *in vitro* simulando os processos de digestão. A aplicação do corante natural antociânico a amostras de iogurte natural conferiu coloração vermelho rósea aceitável com elevada intenção de compra. As técnicas de liofilização e microencapsulação por *spray-drying* foram eficientes na proteção das antocianinas presentes nos extratos.

Palavras-chave: antocianinas; microencapsulação; corante; amora-preta.

Abstract

CONCENÇO - Fernanda Izabel Garcia da Rocha. Obtaining blackberry (*Rubus* sp.) extracts, rich in anthocyanins and stabilized by lyophilization or microencapsulation by *spray-drying*, and evaluating their potential use as natural food colorings. 2021. 81p. Thesis (Doctorate) – Postgraduate Program in Food Science and Technology. Federal University of Pelotas, Pelotas.

Blackberry, due to its high respiratory rate and fragile structure, has a short post-harvest life, requiring special care in post-harvest conservation. Microencapsulation by *spray-drying*, and lyophilization (*freeze-drying*), protect bioactive compounds from degradation, increasing their solubility. In this context, the objective was to evaluate the process of obtaining blackberry extracts rich in anthocyanins, either lyophilized or microencapsulated by *spray-drying*, and also the potential of using these extracts as natural food dye. The extracts, obtained from two blackberry varieties (Guarany and Tupy), were quantitatively analyzed for bioactive compounds and the variety with the highest concentration of anthocyanins (Guarany) was used for the test as dye in natural yogurt. Microencapsulation by *spray-drying* proved to be promising to obtain an extract rich in anthocyanins, among other phenolic compounds, with high antioxidant activity and with potential to be used as natural dye in yogurts. The morphology of the produced microcapsules consisted of similar and spherical structures. The structure of particles obtained by *freeze-drying* was mostly plate-like, with irregular shapes, which is typical for the method, while those obtained by *spray-drying* presented spherical-like shape. The natural dye from blackberry showed intermediate stability in *in vitro* models simulating digestive processes. The application of the natural dye from blackberry to natural yogurt samples provided an acceptable pinkish red color with high consumer purchase intent. The lyophilization and *spray-drying* microencapsulation were efficient in protecting the anthocyanins naturally present in blackberry extracts.

Keywords: anthocyanins; microencapsulation; dye; blackberry.

Lista de Figuras

Figura 01. Estrutura básica de uma molécula de antocianina.....	9
Figura 02. Esquema básico de encapsulação por <i>spray-drying</i>	14
Figura 03. Liofilizador de bancada e transformações no processo de liofilização.....	17
Figura 04. Fluxograma de obtenção do corante seco.....	24
Figura 05. Fluxograma de obtenção do corante seco.....	25
Figura 06. Modelo de ficha de avaliação usado na análise sensorial.....	28
Figura 07. Teores de massa seca (%) e umidade (%) em amostras de frutas de amora-preta (média das variedades BRS Guarani e BRS Tupy), bem como dos extratos aquosos e extratos desidratados obtidos por liofilização e encapsulados por <i>spray-drying</i>	32
Figura 08. Concentração de Compostos Fenólicos (A), Atividade Antioxidante (B) e Antocianinas (C) em amostras de extrato aquoso de amora-preta (<i>Rubus</i> sp.) das cultivares BRS Guarani e BRS Tupy. São apresentados a significância do efeito pelo teste F, e os intervalos de confiança a 95 %.....	33
Figura 09. Concentração de Compostos Fenólicos (A), Atividade Antioxidante (B) e Antocianinas (C) em amostras de extratos secos de amora-preta (<i>Rubus</i> sp.) das cultivares BRS Guarani e BRS Tupy obtidos por liofilização (L) ou <i>spray-drying</i> (S), adicionados de 15 % ou 20 % de maltodextrina. São apresentadas as significâncias dos efeitos pelo teste F, e os intervalos de confiança a 95 %.....	36
Figura 10. Concentração residual de cianidina-3-glucosídeo em amostras de extrato aquoso (A), extrato seco obtido por liofilização e encapsulado por <i>spray-drying</i> (B) e de iogurte natural (C) adicionado de 4 % do extrato seco de amora-preta (<i>Rubus</i> sp.) da cultivar BRS Guarani. São apresentadas também as concentrações residuais em extrato aquoso, seco e no iogurte adicionado das amostras, após simulação da digestão na boca, no estômago e no intestino. São apresentadas as significâncias dos efeitos pelo teste F, e os intervalos de confiança a 95 %.....	41
Figura 11. Concentração residual de cianidina-3-rutinosídeo em amostras de extrato aquoso (A), extrato seco obtido por liofilização e encapsulado por <i>spray-drying</i> (B) e de iogurte natural (C) adicionado de 4 % do extrato seco de amora-preta (<i>Rubus</i> sp.) da cultivar BRS Guarani. São apresentadas também as concentrações residuais no extrato aquoso, seco e no iogurte adicionado das amostras, após simulação da digestão na boca, no estômago e no intestino. São apresentadas as significâncias dos efeitos pelo teste F, e os intervalos de confiança a 95 %.....	42
Figura 12. Concentração residual de cianidina-O-malonilhexosídeo em amostras de extrato aquoso (A), extrato seco obtido por liofilização e encapsulado por <i>spray-drying</i> (B) e de iogurte natural (C) adicionado de 4 % do extrato seco de amora-preta (<i>Rubus</i> sp.) da cultivar BRS Guarani. São apresentadas também as concentrações residuais no extrato aquoso, seco e no iogurte adicionado das amostras, após simulação da digestão na boca, no estômago e no intestino. São apresentadas as significâncias dos efeitos pelo teste F, e os intervalos de confiança a 95 %.....	43
44	
Figura 13. Concentração residual de pelargonidina-O-glucosídeo em amostras de extrato aquoso (A), extrato seco obtido por liofilização ou <i>spray-drying</i> (B) e de iogurte	

natural (C) adicionado de 4 % do extrato seco de amora-preta (<i>Rubus</i> sp.) da cultivar BRS Guarani. São apresentadas também as concentrações residuais no extrato aquoso, seco e no iogurte adicionado das amostras, após simulação da digestão na boca, estômago e intestino. São apresentadas as significâncias dos efeitos pelo teste F, e os intervalos de confiança a 95 %.....	44
Figura 14. Diâmetro de partícula ($d = 2r$) (A) e respectiva área de superfície de partícula ($A = 4\pi r^2$) (B) de amostras de corante natural extraído de amora-preta (<i>Rubus</i> sp.), contendo 20 % de maltodextrina na composição, em função do método de secagem. A maltodextrina de referência avaliada corresponde ao pó original, conforme fornecido pelo fabricante. São apresentadas as significâncias dos efeitos pelo teste-F, e os intervalos de confiança a 95 %. Colunas com letras distintas, na mesma figura, diferem de acordo com o teste de agrupamento de Scott-Knott a 5 % de probabilidade. (C); (D); (E) = figuras ilustrativas das estruturas resultantes dos processos de secagem, obtido em microscópio eletrônico de varredura (MEV), com a respectiva magnificação da imagem. ** = como recebido da indústria.....	50
Figura 15. Coloração das amostras estudadas de acordo com as coordenadas L-a-b sobrepostas ao sistema de cores CIE1931, sendo: (A) = BRS Guarani (●) vs. BRS Tupy (■); (B) = BRS Tupy liofilizado 15 % (■) vs. 20 % (●); (C) = BRS Guarani liofilizado 15 % (■) vs. 20 % (●); (D) = BRS Guarani <i>spray-drying</i> (15 + 20) % (●) vs. BRS Tupy <i>spray-drying</i> (15 + 20) % (■). Números próximos a cada ponto representam a ordem de avaliação, entre a data da aplicação, e até após 15 dias de armazenamento.....	52
Figura 16. Coloração das amostras estudadas de acordo com as coordenadas L-a-b sobrepostas ao sistema de cores CIE 1931, sendo: (A) = iogurte sem aplicação dos corantes naturais (●), iogurte natural adicionado de 2 % de corante natural (■) seco obtido por <i>spray-dryign</i> , com 20 % de maltodextrina (SD20m), iogurte natural adicionado de 4 % de corante natural (■) seco obtido por <i>spray-drying</i> , com 20 % de maltodextrina (SD20m); (B) = espectro pleno do sistema de cores CIE 1931.....	53
Figura 17. Análise sensorial das amostras de iogurte coloridas com extratos naturais antocianínicos de amora-preta. (A) = distribuição percentual dos provadores por faixa etária (n = 60); (B) = nota atribuída ao produto de acordo com a aceitação – partes mais largas das colunas indicam maior proporção de avaliadores que atribuíram aquela nota; (C) = preferência de compra do produto, sendo: não compraria (- -), compraria ocasionalmente (-), compraria (+), compraria frequentemente (+ +), e compraria sempre que fosse comprar iogurte (+ + +).....	54
Figura 18. Perfil de Dominância Temporal das Sensações de iogurte natural adicionada de 6 % de corante natural extraído de amora-preta, preparada com 20 % de maltodextrina e processado por <i>spray-drying</i>	57
Figura 19. Perfil de Dominância Temporal das Sensações de iogurte natural adicionada de 6 % de corante natural extraído de amora-preta, preparada com 20 % de maltodextrina e processado por liofilização.....	57

Lista de Tabelas

Tabela 01. Perfil LC-ESI-MS / MS de antocianinas.....	22
---	----

Índice

1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	4
2.1 Objetivo geral.....	4
2.2 Objetivos específicos.....	5
3. Revisão bibliográfica.....	5
3.1 Amora-preta (<i>Rubus spp.</i>).....	5
3.2 Compostos Bioativos e Saúde.....	8
3.4 Encapsulação por <i>Spray-drying</i>	11
3.5 Secagem por liofilização.....	14
4. Materiais e métodos.....	18
4.1 Material.....	18
4.2 Preparo dos extratos.....	19
4.3 Caracterização dos extratos de amora-preta das variedades Tupy e Guarani.....	19
4.3.1 Determinação de antocianinas totais.....	19
4.3.2 Determinação de compostos fenólicos.....	20
4.3.3 Determinação da capacidade antioxidante.....	20
4.3.4 Determinação de antocianinas individuais.....	20
4.3.5 Parâmetros de cor.....	22
4.3.6 Determinação de umidade.....	23
5.4 Encapsulação dos extratos por <i>spray-drying</i> e secagem por liofilização.....	23
5.5 Microscopia eletrônica de varredura acoplada a sistema de espectroscopia de energia dispersiva (MEV).....	24
5.6 Simulação da digestão biológica.....	25
5.6.1 Preparo da amostra.....	25
5.6.2 Simulação da digestão na boca.....	26
5.6.3 Simulação da digestão no estômago.....	26
5.6.4 Simulação da digestão no intestino.....	26
5.6.5 Avaliação da digestão biológica.....	26
6. Análise Sensorial.....	27

7. Análises Estatísticas.....	28
8. Resultados e Discussão.....	31
8.1 Umidade.....	31
8.2 Compostos Fenólicos, atividade antioxidante e antocianinas.....	33
8.3 Simulação da digestão biológica <i>in vitro</i>	39
8.4 Avaliação Morfológica.....	47
8.5 Coloração.....	51
8.6 Análise Sensorial.....	53
9. Considerações finais.....	58
10. Referências bibliográficas.....	59