

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ENGENHARIA QUÍMICA
BACHARELADO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

CRISIANE IOZWIAK DE SOUZA

**EXTRAÇÃO AQUOSA DE COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES
EM FOLHAS DE AMOREIRA PRETA (*Morus nigra* L) E
ENCAPSULAMENTO EM ESFERAS DE ALGINATO DE CÁLCIO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO 2

PONTA GROSSA

2018

CRISIANE IOZWIAK DE SOUZA

**EXTRAÇÃO AQUOSA DE COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES
EM FOLHAS DE AMOREIRA PRETA (*Morus nigra L*) E
ENCAPSULAMENTO EM ESFERAS DE ALGINATO DE CÁLCIO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial à
obtenção do título de Bacharel em
Engenharia Química do Departamento de
Engenharia Química da Universidade
Tecnológica Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Alessandra
Cristine Novak Sydney

Coorientadora: Mestranda Kathlyn
Schafranski

PONTA GROSSA

2018



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Ponta Grossa



Departamento Acadêmico de Engenharia Química

TERMO DE APROVAÇÃO

Extração aquosa de compostos fenólicos presentes em folhas de amoreira preta (*Morus nigra L*) e encapsulamento em esferas de alginato de cálcio.

por

Crisiane Iozwiak de Souza

Monografia apresentada no dia 21 de novembro de 2018 ao Curso de Engenharia Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Ponta Grossa. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Profa. Dra. Rosilene Aparecida Prestes
(UTFPR)

Prof. Dr. Marcos André Bechlin
(UTFPR)

Mestranda Kathlyn Schafranski
(UTFPR)

Profa. Dra. Alessandra Cristine Novak Sydney
(UTFPR)
Orientadora

Profa. Dra. Juliana de Paula Martins
Responsável pelo TCC do Curso de Engenharia Química

A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso.

RESUMO

SOUZA, Crisiane Iozwiak. **Extração aquosa de compostos fenólicos presentes em folhas de amoreira preta (*Morus nigra L*) e encapsulamento em esferas de alginato de cálcio**. 2018. 51 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Química) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, 2018.

O chá de folhas da amoreira preta é amplamente utilizado na medicina tradicional por possuir efeitos antioxidantes. Estes efeitos podem estar relacionados com a presença de compostos fenólicos na planta. Por serem altamente reativos, suscetíveis à ação de enzimas, apresentarem baixa solubilidade e possuírem baixa meia vida no sistema gastrointestinal, é necessário extrair rapidamente os compostos fenólicos e evitar sua degradação antes de começarem a ser absorvidos pelo organismo. Uma solução para isto é a extração por infusão e em seguida encapsulamento. O encapsulamento é um processo no qual filmes finos, geralmente de materiais poliméricos, são aplicados a pequenas partículas sólidas, líquidos ou gotículas de gases. Esse método é usado para interceptar componentes ativos e liberá-los sob condições controladas. Neste aspecto, este trabalho tem como objetivo a otimização do processo de extração aquosa e o encapsulamento dos compostos fenólicos presentes nas folhas de amoreira preta. Esferas de alginato de cálcio úmido e seco foram avaliadas e comparadas em relação à sua eficiência do conteúdo fenólico total (TPC), com base nos efeitos causados pelas condições de armazenamento. Altos valores de eficiência de encapsulamento foram obtidos para as esferas úmidas (83,5%) e secas (92,5%). A secagem, afetou significativamente o tamanho e a morfologia das esferas e provou ser um método apropriado para a preservação de polifenóis encapsulados. A liberação de fenólicos encapsulados em água foi medida para analisar a difusão e o comportamento cinético do sistema. Quanto à estabilidade, analisada por 28 dias, as esferas de alginato de cálcio úmidas armazenadas em frascos contendo o extrato otimizado apresentaram TPC significativamente maior quando comparadas ao mesmo tipo de esferas armazenadas em água. Pelo presente estudo pode-se verificar que a técnica de encapsulamento de extrato de *Morus nigra L* em esferas de alginato de cálcio é altamente eficaz para aprisionar os bioativos desejados e retardar seu perfil de liberação.

Palavras-Chave: Compostos fenólicos. Encapsulamento. Alginato de sódio. Esferas alginato de cálcio. Antioxidantes. *Morus nigra L*.

ABSTRACT

SOUZA, Crisiane Iozwiak. **Extração aquosa de compostos fenólicos presentes em folhas de amoreira preta (*Morus nigra L*) e encapsulamento em esferas de alginato de cálcio**. 2018. 51 f. Work of Conclusion Course (Graduation in Chemical Engineering) – Federal University of Technology. Ponta Grossa, 2018.

The black mulberry, belong to the genus *Morus*, which has secondary metabolites, mainly phenolic compounds. These compounds are known to act in the inhibition of oxidation reactions, having antioxidant properties. They are highly reactive, susceptible to enzyme action, had low solubility and have a half-life gastrointestinal system. It is necessary to quickly extract the phenolic compounds and to avoid their degradation before starting to be absorbed by the body. One solution to this is an infusion extraction and followed encapsulation. Encapsulation is a process in which thin films, usually of polymeric materials, are applied to small solid particles, liquids or droplets of gases. This method is used to intercept active components and release them under controlled conditions. This work aims to optimize the process of extracting and encapsulating phenolic compounds from black mulberry leaves. Wet and dried calcium alginate beads were examined and compared in relation to their total phenolic compounds (TPC) and entrapment efficiency based on the effects caused by storage conditions. High encapsulation efficiency values were obtained for the wet (83.5%) and for the dried (92.5%) beads. Drying significantly affected bead size and morphology and proved to be an appropriate method for preservation of encapsulated polyphenols. Release of encapsulated polyphenols in water was measured to analyse the diffusion and kinetic behaviour of the system. Regarding of the stability, analyzed for 28 days, wet calcium alginate beads stored in flasks containing the optimized extract showed significantly higher TPC when compared to the same type of beads stored in water. By the present study it can be verified that the encapsulation technique of *Morus nigra L* extract in calcium alginate spheres is highly effective in capturing the desired bioactives and delaying their release profile.

Key words: Phenolic compounds. Encapsulation. Sodium alginate. Calcium alginate beads. Antioxidants. *Morus nigra L*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos compostos fenólicos de acordo com o número de átomos de carbono.....	16
Tabela 2 - Análise estatística das temperaturas de infusão	29
Tabela 3 - Análise estatística dos tempos de infusão	31
Tabela 4 - Análise estatística da concentração de alginato	32
Tabela 5 - Eficiência do encapsulamento.....	33

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Frutos e folhas de <i>Morus nigra</i> L.	11
Figura 2 - Estrutura geral de um flavonoide com os anéis A, B e C e sistema de numeração para diferenciação das posições dos carbonos.....	17
Figura 3 - Diagrama esquemático de dois tipos representativos de encapsulamento	20
Figura 4 - Estrutura química do alginato de sódio	21
Figura 5 - Unidades monoméricas do alginato de sódio	21
Figura 6 - Estrutura dos blocos de alginato	22
Figura 7 - Rearranjo das cadeias de alginato com cálcio	23
Figura 8 - Efeito da temperatura de extração no conteúdo de compostos fenólicos totais.....	30
Figura 9 - Efeito do tempo de extração no conteúdo de compostos fenólicos totais.....	31
Figura 10 - Efeito da concentração de alginato de sódio no conteúdo de compostos fenólicos totais.....	32
Figura 11 - Imagens microscópicas esferas sem extrato	35
Figura 12 - Imagens microscópicas esferas com extrato	36
Figura 13 - Esferas úmidas	37
Figura 14 - Liberação de compostos fenólicos em esferas secas e úmidas	38
Figura 15 - Esferas úmidas e secas	39
Figura 16 - Efeito do tempo e temperatura na estabilidade em esferas de alginato secas.....	40
Figura 17 - Efeito do tempo e temperatura na estabilidade em esferas de alginato mantidas em extrato aquoso das folhas de amoreira e em água.....	40

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	OBJETIVOS	9
2.1	OBJETIVO GERAL	9
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
3	REVISÃO TEÓRICA	10
3.1	AMORA PRETA (<i>Morus nigra L</i>)	10
3.2	ANTIOXIDANTES	12
3.3	COMPOSTOS FENÓLICOS	15
3.4	ENCAPSULAMENTO	19
3.4.1	Alginato de sódio	21
4	MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1	MATERIAL BOTÂNICO	24
4.2	PREPARO DO EXTRATO BRUTO	24
4.3	EXTRAÇÃO POR INFUSÃO	25
4.4	DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL	25
4.5	ENCAPSULAMENTO	26
4.6	EFICIÊNCIA ENCAPSULAMENTO	26
4.7	CARACTERIZAÇÃO DO ENCAPSULADO	27
4.8	LIBERAÇÃO	27
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	29
5.1	DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL	29
5.1.1	Efeito da temperatura de extração	29
5.1.2	Efeito do tempo na extração	30
5.2	ENCAPSULAMENTO	32
5.3	EFICIÊNCIA DO ENCAPSULAMENTO	33
5.5	LIBERAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS	37
5.6	ESTABILIDADE DO CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL	39
6	CONCLUSÃO	42
	REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

A amoreira preta, pertencente ao gênero *Morus*, possui diversos metabólitos secundários, principalmente os compostos fenólicos (NOMURA; HANO, 1994). O chá das folhas da amoreira preta tem sido amplamente utilizado na medicina tradicional como repositor hormonal na menopausa e também ajuda nas dores de cabeça e irritação do período pré-menstrual. Estes benefícios estão relacionados com a presença de alguns tipos de compostos fenólicos (MIRANDA et al. 2010).

Compostos fenólicos atuam na inibição de reações de oxidação, dispondo de propriedades antioxidantes por possuírem em sua forma estrutural um ou mais grupamentos hidroxila e/ou metoxila (FERGUSON; HARRIS, 1999).

Por serem altamente reativos, suscetíveis à ação de enzimas, apresentarem baixa solubilidade e possuírem baixa meia vida no sistema gastrointestinal, é necessário extrair rapidamente os compostos fenólicos e evitar sua degradação antes de começarem a ser absorvidos pelo organismo. Uma solução para isto é a extração por infusão e em seguida encapsulamento, que será abordada neste trabalho.

Atualmente, o processo mais utilizado para extração de compostos fenólicos é feito por intermédio de solventes. Mas por apresentar pouco gasto com reagentes extratores, não possuir natureza tóxica, a extração por infusão em água se torna economicamente e ambientalmente mais vantajoso. Após a extração, o encapsulamento cria uma barreira que dificulta a degradação e evita que reações químicas ocorram nestes compostos, preservando suas propriedades e aumentando sua biodisponibilidade.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o processo de extração aquosa de compostos fenólicos presentes nas folhas da amoreira preta (*Morus nigra L*) para posterior encapsulamento.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Otimizar as condições experimentais para a extração aquosa de compostos fenólicos totais;

Quantificar a concentração e proporção de compostos fenólicos totais;

Encapsular os extratos em esferas de alginato de cálcio em diferentes concentrações de alginato de sódio;

Caracterizar as esferas de alginato por intermédio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV);

Realizar testes de liberação dos compostos fenólicos imobilizados.

3 REVISÃO TEÓRICA

3.1 AMORA PRETA (*Morus nigra* L)

A *Morus nigra* L, também conhecida como amoreira preta, espécie que pertence ao gênero *Morus*, família *Moraceae*, e possui cerca de 24 espécies e uma subespécie, com aproximadamente 100 variedades conhecidas (TUTIN, 1996).

Tem origem na Ásia, mais especificamente no Irã, podendo ser encontrada de regiões temperadas a subtropicais no Hemisfério Norte, amplamente cultivada na Europa Central, e nos trópicos do Hemisfério Sul (ERCISLI; ORHAN, 2007). No Brasil começou a ser introduzida em 1972 pela Estação Experimental de Pelotas, atual Embrapa Clima Temperado, no Rio Grande do Sul, e desde então seu cultivo vem crescendo nos Estados do Rio Grande do Sul, São Paulo e Minas Gerais, com a introdução e adaptação de novas cultivares (ANTUNES, 2002).

Suas árvores crescem em variadas condições climáticas, dos trópicos ao subártico, de topografia, do nível do mar até altitudes até 4000 m (TUTIN, 1996). A amoreira-preta possui folhas verde escuras bastante grossas, largas na base, ovaladas a cordiformes, de margens serrilhadas ou dentadas e recobertas por pecíolos curtos que as torna ásperas ao toque, podendo alcançar de 5 a 10 m de altura. As inflorescências de flores bem pequenas são em geral masculinas ou femininas, em plantas separadas (dioica), raramente na mesma planta (monoica). Os frutos são compostos por drupas de sabor agridoce que variam de coloração de roxa a preta no estágio máximo de maturação (FIGURA 1) (MORGAN, 1982).

Figura 1 - Frutos e folhas de *Morus nigra* L.



Fonte: http://www.hedging.co.uk/acatalog/pics_10581.html

O fruto da amoreira preta, altamente nutritivo, contém 10 % de carboidratos, alta quantidade de minerais, vitaminas do complexo B, vitamina A e cálcio (POLING, 1996). As frutas da amoreira-preta contêm ainda ácidos graxos essenciais, como o linoléico e o linolênico, importantes compostos que regulam pressão arterial, viscosidade sanguínea, imunidade e resposta inflamatória (PAWLOSKY et al., 1996). Como sua comercialização é difícil devido à fragilidade dos frutos e ao curto período de colheita, de aproximadamente dois meses, a melhor forma de garantir os frutos por um tempo maior é o processamento. Estes podem ser consumidos na forma de subprodutos como geleias, sucos, componente em sorvetes e iogurtes (HASSIMOTTO et al., 2007).

A amora preta é bastante utilizada na medicina tradicional chinesa como anti-inflamatório, hepatoprotetor, hipotensor, antitérmico, analgésico, diurético, expectorante, antidiabético (NOMURA, 1988) e para o tratamento de anemia e artrite (OZGEN et al., 2009).

As folhas da amoreira preta, por possuírem um potente inibidor de α -glicosidase (1-desoxinojirimicina), são consumidas no Japão e Coréia como agentes antihiperlipidêmicos por pacientes com diabetes mellitus (KIM et al., 2003), e também servem como alimento para o bicho-da-seda (NOMURA, 1988).

Além dos valores nutricionais obtidos pelo consumo do fruto, todas as partes da planta são usadas na medicina popular, tanto os frutos como caule, raízes e folhas. Os frutos para inflamação, estancar sangramentos e por possuírem uma ação protetora contra o dano peroxidativo de biomembranas e biomoléculas (NOMURA, 1988; ÖZGEN et al., 2009), o caule e as raízes para dor de dente, e as folhas como redutoras de glicose e colesterol sanguíneo (VOLPATO et al., 2011). No Brasil, o chá de folhas de amora é amplamente utilizado na medicina tradicional como repositor hormonal na menopausa, para aliviar os calorões ocorridos neste período, também ajudam nas dores de cabeça e irritação do período pré-menstrual. Estes benefícios estão relacionados com a presença de isoflavonas (MIRANDA et al., 2010).

O gênero *Morus*, além dos nutrientes essenciais contém uma variedade de metabólitos secundários, principalmente os compostos fenólicos, como flavonóides isoprenilados, ácido gálico, ácido cafeico, ácido clorogênico, rutina, quercetina, entre outros (NOMURA; HANO, 1994). São esses compostos os responsáveis pela adstringência e sabor ácido que o fruto apresenta (ÖZGEN et al., 2009). Um derivado do ácido gálico presente na amora preta é o ácido elágico, que possui funções anti-mutagênica, anticancerígena, antiinflamatória e de inibição da indução química de vários tipos de câncer (ANTUNES, 2002). Junto com alguns elagitatinos, o ácido gálico tem apresentado propriedades inibidoras da replicação do vírus HIV transmissor da Aids (MAAS et al., 1991).

3.2 ANTIOXIDANTES

A principal causa da deterioração que ocorre nos alimentos é devido às reações oxidantes, sendo estas responsáveis por perdas de nutrientes, declínio no aroma, sabor e textura (BABBAR et al., 2011). A oxidação é importante para o funcionamento do metabolismo humano, atuando na produção de energia, fagocitose, ajuste do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias

biológicas (MANACH et al., 2005); conseqüentemente, produz radicais livres naturalmente ou por alguma disfunção biológica.

Para prevenir o dano oxidativo, podem ser empregados na indústria alimentícia antioxidantes naturais ou até mesmo sintéticos. De acordo com Moon e Shibamoto (2009) um antioxidante pode ser definido como uma molécula capaz de retardar ou prevenir a oxidação de outras moléculas.

Os radicais livres são moléculas altamente reativas capazes de reagir com qualquer composto próximo, instáveis por possuírem número ímpar de elétrons, estão presentes no organismo humano e desempenham um papel importante nos processos degenerativos ou patológicos de várias doenças graves, incluindo câncer, doenças coronárias, doença de Alzheimer (DIAZ et al., 1997), envelhecimento (BURNS et al., 2001), dentre outras.

Quando seu elétron desemparelhado se encontra centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio, os radicais livres são denominados ERO (espécies reativas de oxigênio) ou ERN (espécies reativas de nitrogênio), e pelo do desequilíbrio entre a sua geração e a capacidade de neutralização antioxidante das células surge o estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO/ERN), em concentrações fisiológicas, são necessárias para o funcionamento das células, mas em excesso podem atacar o DNA causando danos moleculares, distúrbios e doenças (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Os radicais livres são eliminados ao receberem hidrogênio dos antioxidantes, assim são produzidos radicais antioxidantes com baixo potencial de redução padrão e relativamente estáveis devido à localização da ressonância na estrutura do anel fenólico (CHOE; MIN, 2005). Frankel (1980), apresentou o mecanismo de ação de acordo com as equações 1 e 2.



Onde ROO^{\bullet} e R^{\bullet} são os radicais livres, AH é o antioxidante com um átomo de hidrogênio ativo e A^{\bullet} é um radical inerte.

O átomo de hidrogênio ativo do antioxidante é extraído pelos radicais livres R^{\bullet} e ROO^{\bullet} com maior facilidade do que os hidrogênios alílicos das moléculas insaturadas.

Assim, formam-se as espécies inativas para a reação em cadeia e um radical inerte (A[•]) proveniente do antioxidante. Este radical, estabilizado por ressonância, não tem a capacidade de iniciar ou propagar as reações oxidativas (FRANKEL, 1980).

O aumento da estabilidade do radical antioxidante está relacionado à menor energia de dissociação da ligação O-H. Dessa forma, segundo Amorati et al., (2007) os antioxidantes com baixa energia de dissociação de ligação possuem maior capacidade de doar hidrogênio e são melhores antioxidantes.

Segundo seu mecanismo de ação, os antioxidantes podem ser classificados em primários ou secundários. Os antioxidantes primários são bloqueadores de cadeia, promovem a remoção ou inativação dos radicais livres pela doação de elétrons ou átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a cadeia da reação (SIMIC; JAVANOVIC, 1994). Já os antioxidantes secundários atuam na complexação com metais, sequestro de oxigênio por meio de reações químicas estáveis, impedindo-os de atuarem como propagadores da autoxidação e decomposição de hidroperóxidos (um dos principais iniciadores da reação de degradação), e absorção da radiação ultravioleta (DECKER, 2002).

Devido à associação de antioxidantes sintéticos com reações adversas em seres humanos e também com efeito cancerígeno e inchaço do fígado (MARTIN; GILBERT, 1968). Atualmente, há uma tendência maior em incluir antioxidantes naturais na dieta e conseqüentemente uma maior pesquisa em seus efeitos benéficos na saúde.

De acordo com estudos feitos por Siddhuraju e Klaus (2003) várias substâncias antioxidantes ocorrem naturalmente em plantas. Dentre essas, compostos fenólicos se destacam pois inibem peroxidação lipídica (KRISTINOVA et al., 2009) e lipo-oxigenação *in vivo* devido às propriedades redutoras das estruturas químicas que permitem a neutralização ou o sequestro de radicais livres. Além de possuírem efeitos biológicos, incluindo ações antibacterianas, antivirais, anti-inflamatórias, antialérgicas, antitrombóticas e vasodilatadoras (COOK; SAMMON, 1996).

3.3 COMPOSTOS FENÓLICOS

O metabolismo vegetal é dividido em primário e secundário. O metabolismo primário é responsável pela produção de compostos essenciais para os seres vivos, como os lipídios, proteínas, carboidratos e clorofila (nas plantas) (MARTINS et al., 2015). Esses metabólitos possuem propriedades bioativas como antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias e antitumorais, principalmente os lipídios (ácidos graxos poliinsaturados), proteínas, carotenóides, vitaminas e carboidratos (polissacarídeos e glicosídeos) (KSOURI et al., 2012).

O metabolismo secundário atua na biossíntese de compostos orgânicos que derivam dos metabólitos primários. Os metabólitos secundários possuem propriedades antimicrobianas contra uma grande variedade de agentes patogênicos (SALEEM et al., 2010).

O estresse do vegetal direciona seu metabolismo para a via secundária, podendo ser biótico, como ataque de patógenos e competição entre plantas, ou abióticos, como alterações de temperatura, disponibilidade de água, níveis de luz, exposição à radiação ultravioleta e deficiência de nutrientes (VICKERY; VICKERY, 1981).

Em sua forma estrutural, são compostos aromáticos que apresentam um ou mais grupamentos hidroxila e/ou metoxila na molécula, o que lhes confere propriedades antioxidantes (FERGUSON; HARRIS, 1999). Os compostos fenólicos além de serem encontrados nas plantas em sua forma livre, estão comumente ligados a outras moléculas, como por exemplo aos açúcares e proteínas. Em sua forma livre, são tóxicos, e perdem essa propriedade, pelo menos em parte, quando ligados a alguma molécula (GIADA, 2013).

Os compostos fenólicos são derivados de plantas e estão presentes em várias partes, como cascas, folhas, caule, sementes e polpas de frutas. Podem ser um agente antioxidante alternativo contra a deterioração oxidativa de alimentos (BABBAR et al., 2011).

Os compostos fenólicos presentes nos alimentos podem ser divididos em várias classes de diferentes compostos. Vermerris e Nicholson (2008) classificaram esses compostos em grupos de acordo com o número de carbonos presentes no núcleo da molécula (TABELA 1).

Tabela 1 - Classificação dos compostos fenólicos de acordo com o número de átomos de carbono

Estrutura	Classe
C ₆	Fenólicos simples
C ₆ -C ₁	Ácidos fenólicos e compostos relacionados
C ₆ -C ₂	Ácidos cinâmico, aldeídos cinamilo e álcoois cinamilo
C ₆ -C ₃	Cumarinas, isocumarinas e cromonas
C ₆ -C ₃	Chalconas, aurones, dihidrocalcolonas
C ₁₅	Flavanas
C ₁₅	Flavonas
C ₁₅	Flavanonas
C ₁₅	Flavanonol
C ₁₅	Antocianidinas
C ₁₅	Antocianinas
C ₁₅	Biflavonils
C ₆ -C ₁ -C ₆ , C ₆ -C ₂ -C ₆	Benzofenonas, xantonas, estilbenos
C ₆ , C ₁₀ , C ₁₄	Quinonas
	Betacianinas
C ₁₈	
Lignanas, neolignanas	Dímeros ou oligômeros
Ligninas	Polímeros
Taninos	Oligômeros ou polímeros
Flobacenos	Polímeros

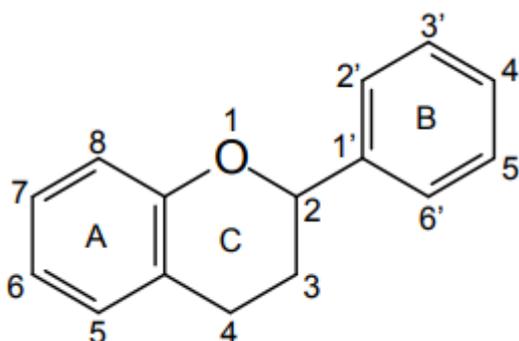
Fonte: Vermerris e Nicholson (2008)

A categoria de compostos fenólicos é dividida em grupos de acordo com o número de subunidades de fenol presentes: polifenóis e fenóis simples ou ácidos. Dessa forma, os polifenóis que possuem pelo menos duas subunidades de fenol são classificados como flavonoides, e os compostos que possuem três ou mais subunidades de fenol são chamados de taninos (hidrolisáveis e não hidrolisáveis) (GIADA, 2013).

Os flavonoides constituem o maior grupo de compostos fenólicos, com mais de 4000 compostos identificados. Possuem 15 átomos de carbono em sua cadeia C₆-C₃-C₆, consistindo em dois anéis aromáticos ligados entre si por três carbonos formando uma estrutura heterocíclica oxigenada. São os compostos fenólicos mais estudados por serem os mais abundantes em alimentos vegetais (BRAVO, 1998).

A presença de hidroxilas nas posições 3' e 4' do anel B (FIGURA 2) conferem alta estabilidade ao radical formado, tornando os flavonoides um dos antioxidantes mais potentes presente nas plantas (SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

Figura 2 - Estrutura geral de um flavonoide com os anéis A, B e C e sistema de numeração para diferenciação das posições dos carbonos



Fonte: Adaptado de BRAVO, 1998

Os flavonoides se apresentam sob a forma de flavonas, flavononas, flavonóis, catequinas, antocianinas, isoflavonas e chalconas por causa dos diferentes níveis de oxidação. Estão amplamente distribuídos em plantas e vegetais, sendo conhecidos como os principais responsáveis pela antioxição, por possuir elevado potencial de oxidação e redução da estrutura química atuando como agentes redutores e como quelante de metais (IGNAT et al., 2011).

A estrutura das antocianinas deriva de glucosídeos do cátion flavílio com diferentes graus de hidroxilação e metoxilação. É atribuído a elas a pigmentação em frutas, flores, sementes e folhas, apresentando tonalidades que variam de vermelho a roxo e de azul a preto (YOSHIDA et al., 2009), enquanto, a hidroxilação aumenta a tonalidade azul, a metoxilação valoriza a tonalidade vermelha. Agem nas plantas, assim como os flavonóis, atraindo polinizadores (WINKEL-SHIRLEY, 2001). Os flavonoides também atuam no trato gastrointestinal como agente antiulceroso, antiespasmódicos e antidiarreicos (CARLO et al., 1993; CAPASSO et al., 1991).

Taninos são compostos hidrossolúveis que podem formar complexos com proteínas, gelatinas e alcaloides (MELLO; SANTOS, 2003). Acumulam-se consideravelmente no caule, folhas, frutas, sementes e raízes (HASLAM, 2007). Em sua estrutura física, apresentam-se como sólidos amorfos ou cristalinos de coloração amarela ou branca, são responsáveis pelo sabor adstringente de alguns frutos devido à perda do poder lubrificante causada pela precipitação de glucoproteínas salivares (BRUNETON, 1995). Possuem ação antisséptica e favorecem a regeneração de tecidos que sofreram ferimentos ou queimaduras (GONÇALVES, 2007).

Podem ser divididos em taninos hidrolisáveis e taninos condensados (VICKERY; VICKERY, 1981). Os taninos hidrolisáveis são constituídos por ácido fenólico, ácido gálico e ácido elágico ligados a uma molécula de açúcar (OKUDA et al., 1995). Os taninos condensados, também chamados proantocianidinas, são polímeros de flavan-3-ol (catequina) e/ou flavan-3,4-diol (leucocianidina), produtos do metabolismo do fenilpropanol (HELDT, 1997).

De acordo com Gonçalves, (2007) do total de compostos fenólicos consumidos diariamente, mais da metade corresponde aos taninos condensados, pois os taninos possuem grande abundância em vegetais e frutas. Segundo pesquisas feitas por Scalbert (1991), os taninos apresentam importante ação contra determinados microrganismos e fungos; apresentam propriedades anticarcinogênicas (mama, próstata, pele e estômago) e agentes antihepatotóxicos (DE BRUYNE et al., 1999). Podem agir também como anti-inflamatórios e cicatrizantes (MELLO; SANTOS, 2003); apresentam atividade contra o reumatismo, problemas renais e processos inflamatórios em geral (GINDRI et al., 2010).

Os ácidos fenólicos são um grupo de ácidos orgânicos que podem ser subdivididos, de acordo com a característica das estruturas carbônicas, em três tipos: ácidos benzoicos, que possuem sete átomos de carbono em sua estrutura (C_6-C_1), ácidos cinâmicos com nove átomos de carbono (C_6-C_3) e pelas cumarinas que são derivadas do ácido cinâmico por ciclização da cadeia lateral do ácido o-cumárico (SOARES, 2002). Os principais derivados dos ácidos hidroxicinâmicos são os ácidos ferúlico, caféico e cumárico, e entre os derivados dos ácidos hidroxibenzoicos pode-se citar os ácidos salicílicos, elágico, gálicos, protocatéico e vanílico (BELITZ; GROSCH, 2004).

De acordo, com estudos feitos por Sánchez-Moreno (2002), os ácidos fenólicos e seus ésteres têm uma alta atividade antioxidante, que é determinada pelo

número de grupos hidroxilo encontrados na sua molécula, principalmente o ácido hidroxibenzoico, o ácido hidroxicinâmico, o ácido cafeico e o ácido clorogênico.

3.4 ENCAPSULAMENTO

A tecnologia de micro encapsulamento começou a ser desenvolvida há 70 anos (DESAI; PARK, 2005) com a necessidade de estabilizar e preservar as propriedades de compostos naturais e sintéticos purificados (VILSTRUP, 2001). A microencapsulação cria uma barreira que evita reações químicas e permite a liberação de forma controlada dos ingredientes, além de mascarar aromas (como o sabor amargo de compostos polifenólicos) e garantir que os compostos sejam mantidos de forma bioativa no trato gastrointestinal (STOJANOVIC et al., 2012).

Devido à sua instabilidade no processamento e armazenamento, tempo de resistência gástrica limitada (pH, enzimas e presença de outros nutrientes), baixa permeabilidade e solubilidade em água, durante o processo de digestão apenas uma pequena porção dos compostos fenólicos são absorvidos, diminuindo seus benefícios à saúde (WILDMAN, 2006).

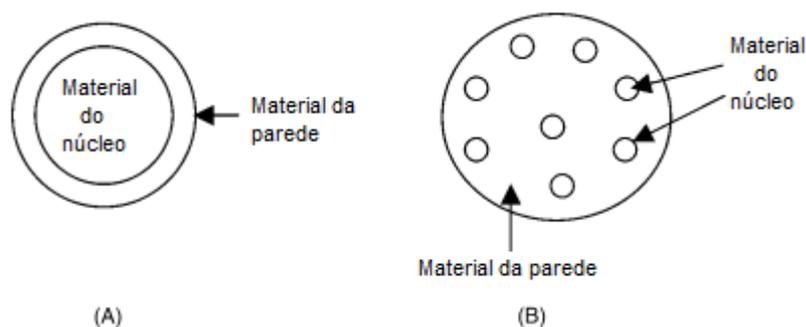
Para melhorar a absorção são necessárias formas de proteção para manter sua integridade química, pois esses compostos são sensíveis às condições físicas e químicas, como luz, calor e oxidação (MUNIN; EDWARDS-LEVY, 2011).

As microcápsulas são pequenas partículas que contêm no núcleo um agente ativo revestido por materiais como polímeros, carboidratos, gorduras e ceras (VILSTRUP, 2001) que podem variar de tamanho, desde submicrométrico a milimétrico, possuindo várias formas que dependem dos materiais e métodos utilizados em seu processo de fabricação (DZIEZAK, 1998). Denomina-se recheio ou núcleo o material a ser encapsulado, e encapsulante, cobertura ou parede o material que forma a cápsula (GIBBS et al. 1999).

O encapsulamento pode possuir várias formas em sua aparência externa, as mais comuns são: as cápsulas mononucleares, esse é o encapsulamento mais simples, no qual o núcleo está concentrado na região central e é envolto em uma parede ou membrana de espessura uniforme (FIGURA 3A); e a estrutura agregada,

onde as microcápsulas possuem vários núcleos distintos dentro da mesma matriz (FIGURA 3B) (FANG; BANDHARI, 2010; DESAI; PARK, 2005).

Figura 3 - Diagrama esquemático de dois tipos representativos de encapsulamento



Fonte: Adaptado de DESAI; PARK, 2005

As cápsulas mononucleares são classificadas como sistema do tipo reservatório, caracterizando as “verdadeiras” microcápsulas, as de estrutura agregada são classificadas como sistema matricial formando microesferas (RÉ, 1998). A principal diferença entre essas duas formas de encapsulamento, é que uma pequena parte do material encapsulado permanece exposto na superfície das microesferas, o que não acontece nas microcápsulas, por isso são chamadas de verdadeira encapsulação. Contudo, o termo encapsulação abrange um sentido mais amplo, englobando tanto a formação de microcápsulas quanto de microesferas (DEPYPERE, 2003).

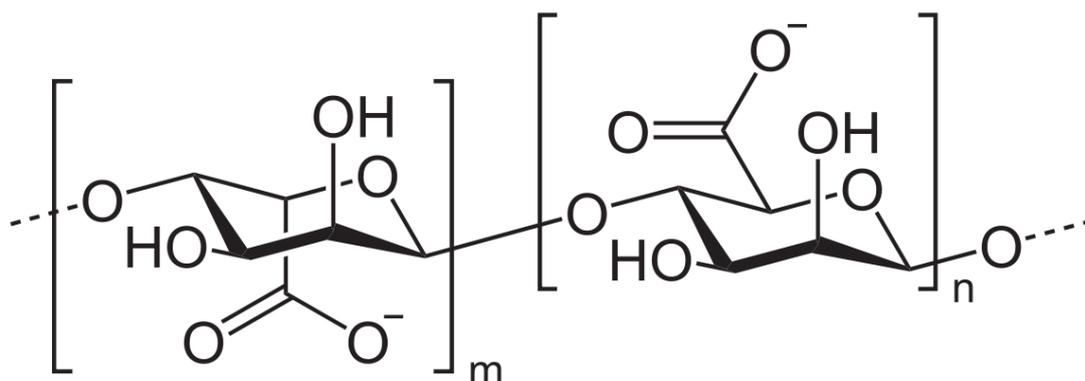
Várias técnicas são usadas para encapsulamento, entre elas secagem por pulverização (spray drying), arrefecimento/refrigeração por pulverização (spray cooling/chilling), coacervação, emulsões, aprisionamento de lipossomas, micelas, nanopartículas, liofilização, cocristalização, extrusão, revestimento de leito fluidizado, complexação de inclusão e separação por suspensão centrífuga (FANG; BANDHARI, 2010; MUNIN; EDWARDS-LEVY, 2011; GIBBS et al. 2009).

Todas possuem pontos fracos e fortes com relação ao encapsulamento, proteção, custo, facilidade de uso biodegradabilidade e biocompatibilidade. Em todas as técnicas utilizadas, são necessárias três etapas para um melhor encapsulamento dos agentes bioativos, a formação de uma parede em torno do material a ser encapsulado, o não vazamento de materiais, e manter afastado materiais reativos ou incompatíveis (GIBBS et al., 1999).

3.4.1 Alginato de sódio

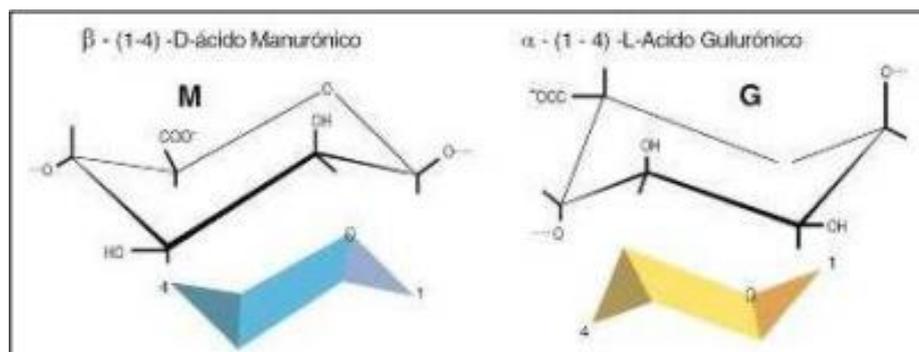
O alginato de sódio (FIGURA 4) é um biopolímero natural, extraído de algas marrons, constituído de unidades monoméricas, o ácido β -D-manurônico (M) e o ácido α -L-gulurônico (G), que estão representados na FIGURA 5.

Figura 4 - Estrutura química do alginato de sódio



Fonte: https://www.researchgate.net/figure/Figura-2-Estrutura-do-alginato-de-sodio_fig1_328351811

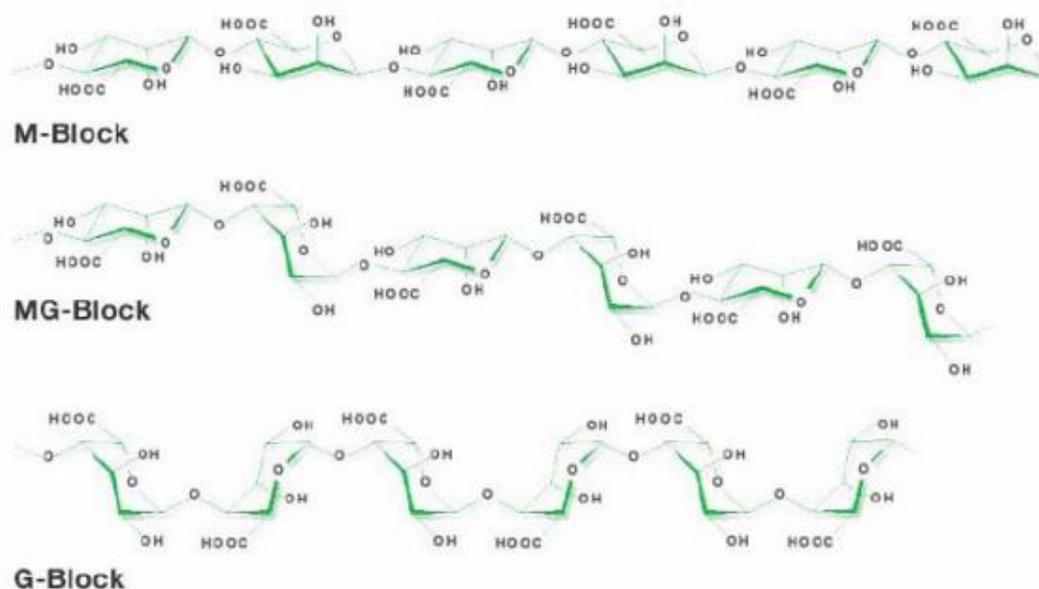
Figura 5 - Unidades monoméricas do alginato de sódio



Fonte: Adaptado de TEIXEIRA (2011).

Estas unidades se agrupam em blocos sequenciais MM, MG e GG (FIGURA 6). As configurações especiais que os blocos M e G adotam, devido as diferentes ligações glicosídicas entre os carbonos C-1 e C-4 das unidades monoméricas, juntamente com a proporção, distribuição e comprimento destes blocos, determinam as propriedades químicas e físicas da molécula de alginato.

Figura 6 - Estrutura dos blocos de alginato

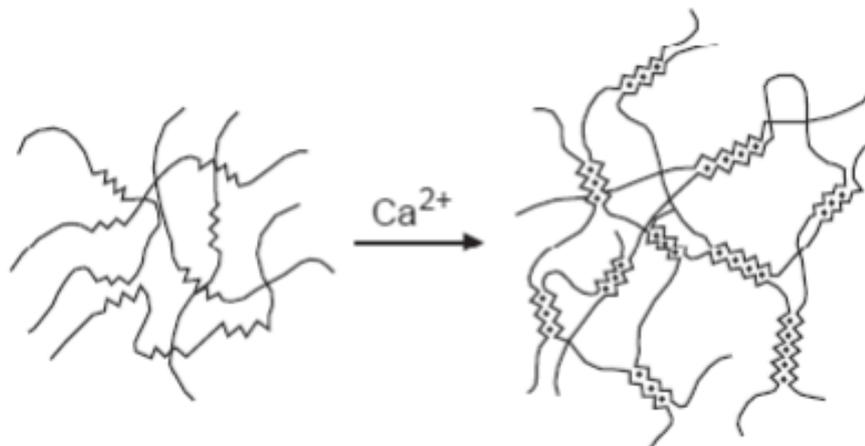


Fonte: Adaptado de BRESSEL (2007).

Para formar um gel, o alginato deve conter um número suficiente de monômeros gulurônicos para poder reagir com um cátion (normalmente Ca^{2+}). Quando as cadeias de blocos G se alinham lado a lado formando um “berço” em forma de diamante, o qual tem a dimensão ideal para acomodar em seu interior um íon cálcio, gerando uma estrutura dimérica (BRESSEL, 2007) .

Os géis de alginato de cálcio são obtidos quando a solução de alginato de sódio entra em contato com uma solução hipercatiônica de Ca^{2+} , e os blocos MM, MG e GG formam redes tridimensionais, gelificando então a solução de alginato. O efeito dos íons de cálcio é estabelecer ligação entre as cadeias de alginato através de interações iônicas. Essa estrutura reticulada formada tem uma grande capacidade de reter água, formando assim um gel muito estável (TEIXEIRA, 2011). Um modelo utilizado para descrever a formação do gel de alginato de cálcio é o modelo “caixa de ovo”, que considera a associação de duas ou mais cadeias resultando em uma estrutura bidimensional similar a uma caixa de ovo, como descrita na FIGURA 7, onde nos interstícios encontram-se os íons cálcio (GRANT et al., 1973).

Figura 7 - Rearranjo das cadeias de alginato com cálcio



Fonte: Adaptado de TEIXEIRA (2011).

O alginato de cálcio (CaAlg) tem sido considerado um dos biopolímeros mais adequados para a produção de esferas, devido à sua composição, estrutura sequencial (tem uma grande importância para a sua função como material de encapsulamento, já que depende geralmente de espessamento, de formação de gel e de estabilização) (ROY, I. et al., 2005).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios ocorreram em duas etapas. Na primeira etapa, foi feita a otimização do processo de extração de compostos fenólicos, no qual foram utilizados diferentes tempos e temperaturas de extração em infusão, para obtenção de extratos com altos teores de compostos fenólicos. Na segunda etapa, o extrato otimizado foi submetido a encapsulamento por meio da tecnologia de extrusão com alginato de sódio como material de revestimento.

4.1 MATERIAL BOTÂNICO

Folhas de *Morus nigra* L coletadas no período da manhã, com tempo nublado e temperatura de aproximadamente 25°C, em 18 de outubro de 2017 na cidade de Ponta Grossa, no estado do Paraná. As folhas foram previamente selecionadas e lavadas, e em seguida secas com papel toalha e levadas para ultrafreezer para posterior desidratação.

4.2 PREPARO DO EXTRATO BRUTO

Para melhor conservação e manutenção dos compostos fenólicos presentes na amostra, as folhas foram liofilizadas imediatamente após coletadas. Primeiramente, as folhas foram conduzidas em ultrafreezer (LIOBRAS, São Carlos, SP) por 24 horas, em seguida, para o liofilizador (LIOBRAS, São Carlos, SP) onde permaneceram por 24 horas. Após liofilização, as amostras foram trituradas em moinho analítico (QUIMIS, Diadema, SP) até obtenção de um pó fino, depois peneiradas e embaladas em frascos âmbar e armazenadas em local escuro até o momento das análises.

4.3 EXTRAÇÃO POR INFUSÃO

Os extratos foram preparados utilizando uma relação amostra:água na proporção de 0,5:25 (m/v) adaptado de Pavlovic et al., 2006. As extrações foram realizadas em banho ultratermostático (Solab SL 152, Brasil) nos tempos de 5, 10, 20 e 30 minutos e em temperaturas de 40, 60, 80 e 100°C. A água ultrapura utilizada possui resistividade de 18 MΩ cm, produzida em purificador Master All 2000 (Gehaka). Em seguida, centrifugados por 5 minutos a 4000 rpm (LAB 1000, DM0412S, Piracicaba, SP), o sobrenadante armazenado em estufa em temperatura ambiente para posteriores análises.

4.4 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL

O conteúdo fenólico total (*total phenolics compounds* – TPC) nos extratos foi determinado seguindo o procedimento de Folin-Ciocalteu, de acordo com Singleton et al., (1999), com modificações. A uma alíquota de 1000 µL do extrato aquoso, foram adicionados 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu diluída (1:3 v/ v), após 5 minutos, 4000 µL de uma solução de Na₂CO₃ (10%) e 50 µL de água ultrapura, a mistura resultante foi protegida da luz por 60 minutos.

A absorbância na região do UV foi medida em espectrofotômetro (FEMTO, 800XI, São Paulo, SP) com comprimento de onda a 720 nm, utilizando ácido gálico como padrão de referência, com grau de pureza de 99%. A linha de base do equipamento foi registrada utilizando uma solução com todos os reagentes nas proporções utilizadas com exceção da amostra, substituída por água ultrapura. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados expressos em mg de ácido gálico equivalente por g de amostra seca (mg GAE/ g).

4.5 ENCAPSULAMENTO

Primeiro realizadas as condições ótimas de concentração de alginato e depois escolhida a melhor conforme o conteúdo de TPC, as esferas de alginato foram obtidas dissolvendo diferentes concentrações de alginato de sódio (1, 1,5 e 2%) em 100 mL de extrato aquoso otimizado das folhas da amoreira preta. Uma vez homogeneizada, para a formação das microcápsulas, solução de alginato/ extrato, foi gotejada com o auxílio de uma bomba peristáltica (Watson Marlow Pumps, Cornwall, UK) e uma ponteira de micropipeta, sobre uma solução de cloreto de cálcio.

As esferas foram mantidas no banho gelificante de cloreto de cálcio para endurecer durante 24 horas e depois filtradas e lavadas com água destilada. Finalmente, foram pesadas e armazenadas.

Para analisar o TPC do extrato encapsulado, 1 grama de esferas foi dissolvida em uma solução de citrato de sódio (5 g/ 100 mL), sob agitação vigorosa num misturador Vortex (KASVI basic, Brasil), como proposto por Deladino et al., (2008) apud Arriola et al. (2016). Os resultados expressos como os equivalentes de ácido gálico (GAE) (mg de ácido gálico por g do peso seco de esferas). Parte das esferas foi desidratada em estufa a temperatura de aproximadamente $40\pm 1^{\circ}\text{C}$.

4.6 EFICIÊNCIA ENCAPSULAMENTO

A porcentagem de eficiência de encapsulamento (EE) foi calculada usando a equação 3:

$$EE (\%) = (L/L_0) \times 100 \quad (3)$$

onde L é o TPC na solução de citrato de sódio de esferas de alginato dissolvido e L_0 é o TPC no extrato otimizado inicial, chamado carga teórica. O EE das esferas de alginato de cálcio molhado foi determinado imediatamente após a encapsulação e antes do processo de liofilização.

4.7 CARACTERIZAÇÃO DO ENCAPSULADO

As dimensões e a forma das esferas de alginato de cálcio foram avaliadas utilizando um microscópio óptico (LUMEN, Brasil). A morfologia e o tamanho de partícula das esferas secas foram avaliados utilizando um microscópio eletrônico de varredura (MEV Oxford instrumentos X-ACT Vega 3 LMV).

4.8 LIBERAÇÃO

A liberação de compostos fenólicos das esferas de alginato de cálcio foi realizada avaliando o conteúdo fenólico total liberado em água utilizando o ensaio Folin-Ciocalteu descrito anteriormente.

Resumidamente, 1 grama de esferas foi suspensa em 10 mL de água destilada sob agitação constante. Durante uma hora, nos períodos de 5, 15, 30, 45 e 60 minutos, uma alíquota do sobrenadante foi tomada para análise e substituída pela mesma quantidade de água ultrapura. Os experimentos foram realizados em triplicata. A porcentagem de TPC liberada foi calculada pela equação 4

$$\text{TPC liberado (\%)} = (M_t / M_\infty) \times 100 \quad (4)$$

Onde (M_t / M_∞) representa a fração de massa liberada no tempo t (M_t) em relação à massa máxima de polifenóis que seria liberada no tempo $t=\infty$.

4.9 ESTABILIDADE DO CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL

Para avaliar a estabilidade do TPC, amostras de esferas de alginato de cálcio úmidas e secas foram armazenadas durante 28 dias a 4 e 25°C. As amostras úmidas foram armazenadas e divididas em frascos com água e com extrato aquoso das folhas de amoreira preta. Triplicatas de cada amostra foram analisadas

espectrofotometricamente a cada 7 dias e o tempo 0 correspondente ao TPC logo após o encapsulamento. Todas as amostras foram protegidas da luz até a análise.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL

A determinação do conteúdo fenólico total (TPC) foi obtida por meio do ensaio colorimétrico que utiliza o reagente Folin-Ciocalteu.

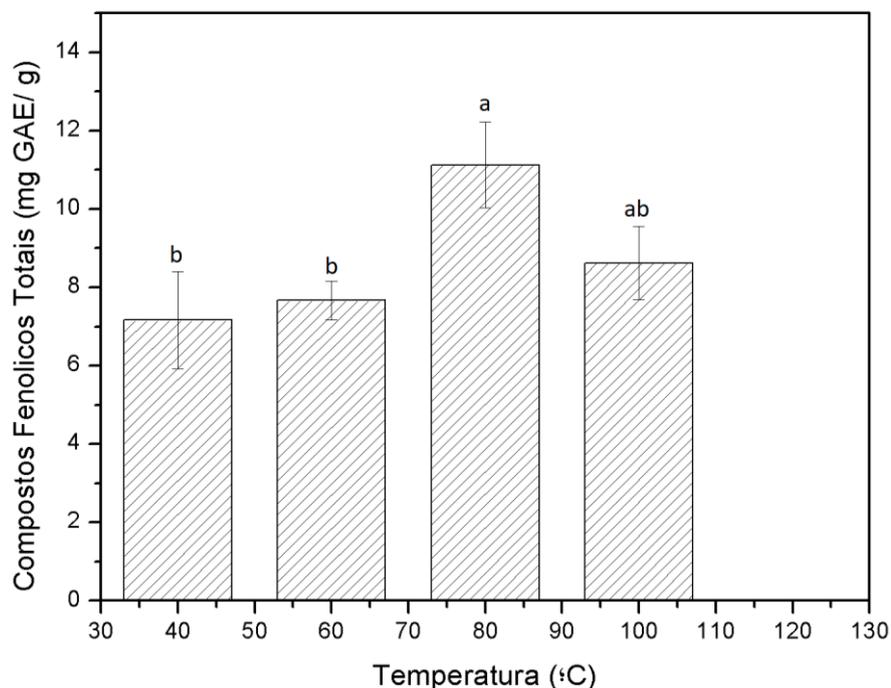
5.1.1 Efeito da temperatura de extração

Os ensaios foram realizados em triplicata e apresentados como valores médios. Os gráficos foram obtidos em software OriginPro 8 e teste de comparação múltipla (Tukey's Honestly Significant Difference test) para avaliar se as diferenças eram significativas. A análise estatística foi feita com um nível de confiança de 95% ($p > 0.05$). A quantidade de compostos fenólicos está descrita na TABELA 2 e ilustrada na FIGURA 8.

Tabela 2 - Análise estatística das temperaturas de infusão

Tratamento (°C)	Média Fenólicos Totais (mg GAE/ g)
40	7,16 ± 1,24
60	7,67 ± 0,50
80	11,12 ± 1,10
100	8,62 ± 0,93

Fonte: Autoria própria

Figura 8 - Efeito da temperatura de extração no conteúdo de compostos fenólicos totais

Resultados expressos como média \pm desvio padrão (triplicata). Média seguida da mesma letra não difere estatisticamente pelo teste de Tuckey ($p < 0,05$)

Fonte: Autoria própria

Observou-se que com o aumento da temperatura, houve um aumento na quantidade de compostos fenólicos extraídos, mas que em uma temperatura mais elevada a extração é menor, comprovando que compostos fenólicos são suscetíveis a variação de temperatura e sensíveis a altas temperaturas se degradando (VICKERY; VICKERY, 1981). Utilizando como parâmetro o Teste de Tuckey (análise estatística), observou-se uma variação significativa entre as temperaturas, dessa forma escolheu-se a temperatura de 80°C, pois apresentou maior quantidade de conteúdo fenólico total.

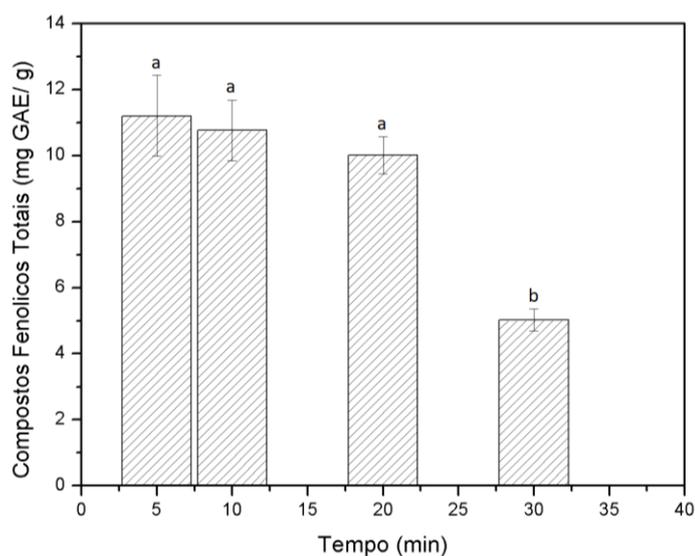
5.1.2 Efeito do tempo na extração

A partir da temperatura escolhida, variou-se o tempo de infusão em 5, 10, 20 e 30 minutos.

Tabela 3 - Análise estatística dos tempos de infusão

Tratamento (tempo em min)	Média Fenólicos Totais (mg GAE/ g)
5	11,205 ± 1,23 ^a
10	10,765 ± 0,92 ^a
20	10,021 ± 0,56 ^a
30	5,024 ± 0,33 ^b

Fonte: Autoria própria

Figura 9 - Efeito do tempo de extração no conteúdo de compostos fenólicos totais

Resultados expressos como média ± desvio padrão (triplicata). Média seguida da mesma letra não difere estatisticamente pelo teste de Tuckey ($p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria

A partir do TABELA 3 e da FIGURA 9 é possível observar que não houve uma diferença estatisticamente significativa entre os tempos 5, 10 e 20 minutos, por esse motivo, escolheu-se a utilização do tempo de 5 minutos, já que um tempo de infusão menor implica em um menor custo de energia.

Na FIGURA 9 nota-se que no tempo de 30 minutos, houve uma redução pela metade da eficiência de extração, isso pode ser devido também à temperatura, pois como já foi observado a temperatura tem grande efeito sobre a degradação dos compostos fenólicos, e com um maior tempo de extração, mesmo a uma temperatura menor, ela ainda tem efeitos sobre os compostos fenólicos.

5.2 ENCAPSULAMENTO

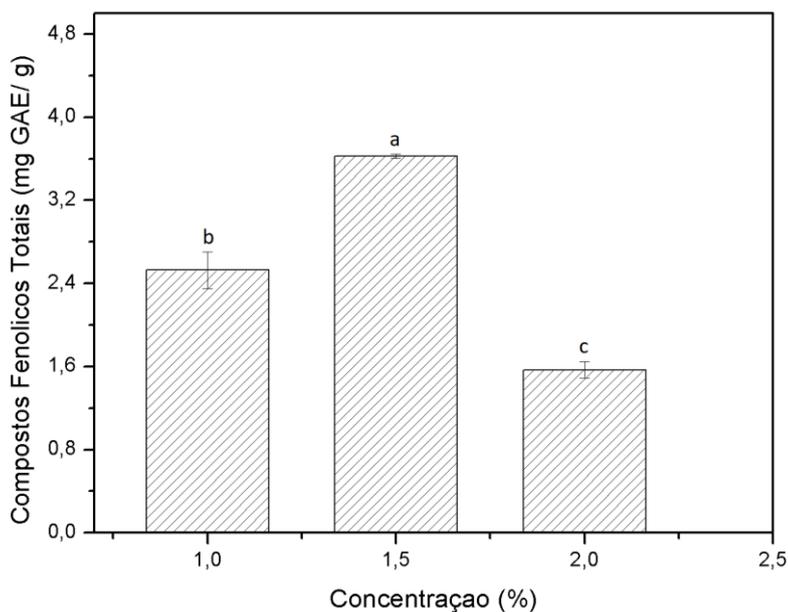
Com a temperatura e tempo de infusão escolhidos, variou-se a concentração de alginato de sódio no encapsulamento.

Tabela 4 - Análise estatística da concentração de alginato

Tratamento (% de alginato)	Média Fenólicos Totais
1	2,528 ± 0,17b
1,5	3,626 ± 0,02 ^a
2	1,568 ± 0,08c

Fonte: Autoria própria

Figura 10 - Efeito da concentração de alginato de sódio no conteúdo de compostos fenólicos totais



Resultados expressos como média ± desvio padrão (triplicata). Média seguida da mesma letra não difere estatisticamente pelo teste de Tuckey ($p < 0,05$)

Fonte: Autoria própria

Como é possível observar na FIGURA 10 e TABELA 4, a concentração de 1,5 % de alginato apresentou maior quantidade de compostos fenólicos totais, assim

como no trabalho de Belščak-Cvitanović et al., (2010), a porcentagem escolhida de alginato de sódio foi de 1,5 %.

O alginato de sódio forma uma rede que aprisiona os íons de cálcio, quanto maior a concentração de alginato, maior a força dessas redes. Para o extrato de folhas de amora, uma concentração média foi suficiente para uma encapsulamento satisfatório, uma concentração menor teria um aprisionamento menor dos íons de cálcio, não encapsulando assim de forma a obter esferas uniformes. Da mesma forma, uma concentração maior formaria uma rede mais forte, não liberando uma quantidade suficiente de compostos fenólicos.

5.3 EFICIÊNCIA DO ENCAPSULAMENTO

Para 1 mL de extrato com alginato obteve-se 55 esferas. Como pode ser visto na TABELA 5, a eficiência de encapsulação (EE) das esferas de alginato de cálcio secas foi aumentada em aproximadamente 10% em relação ao EE das esferas úmidas, indicando que a secagem em estufa provou ser um método apropriado para a preservação dos fenólicos encapsulados.

Tabela 5 - Eficiência do encapsulamento

	Eficiência de encapsulamento %*	
	Esferas úmidas	Esferas secas
Folhas liofilizadas	83,5 ± 0,6	92,5 ± 1,0

* Média dos valores ± de desvio padrão das determinações em triplicata.

Fonte: Autoria própria

O alto EE obtido para as esferas de alginato de cálcio úmidas e secas (TABELA 5) possui um comportamento semelhante ao encontrado por Belščak-Cvitanović et al., (2010) em que foram relatados valores de EE acima de 80% no encapsulamento de compostos fenólicos de plantas com alginato de sódio.

A eficiência não alcança 100%, devido à perda dos compostos fenólicos que ocorreu provavelmente durante o processo de encapsulamento, especificamente durante a imersão das esferas na solução gelificante de cloreto de cálcio. Esse comportamento foi observado por Deladino et al. (2008), o qual atribui esse

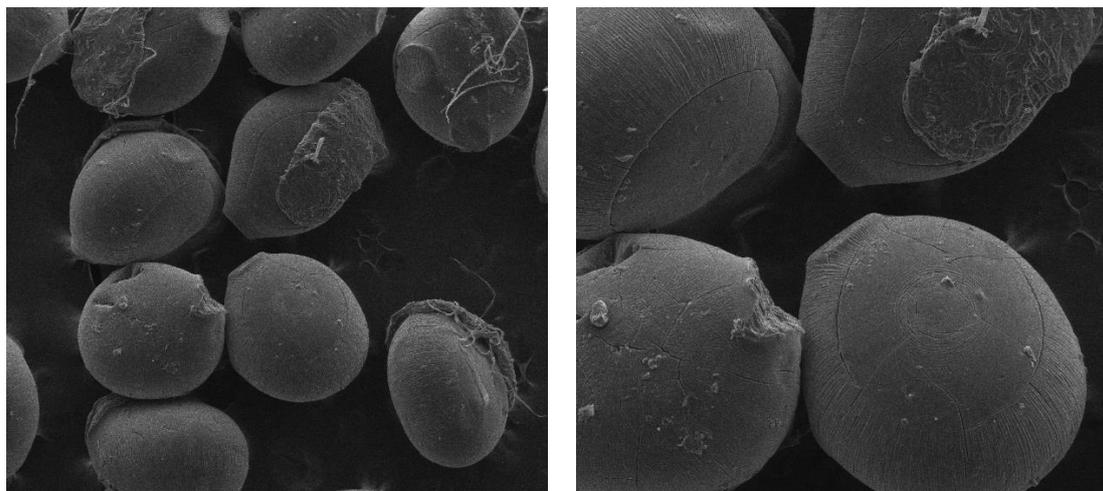
comportamento à estrutura porosa das esferas de alginato de cálcio, derivadas dos compostos de baixo peso molecular do polímero.

Portanto, os resultados vistos na TABELA 5 demonstram que a escolha dos procedimentos de encapsulamento e das condições de armazenamento das esferas podem influenciar significativamente no TPC aprisionado dentro das esferas e também na eficiência de encapsulamento do processo.

5.4 CARACTERIZAÇÃO DOS ENCAPSULADOS

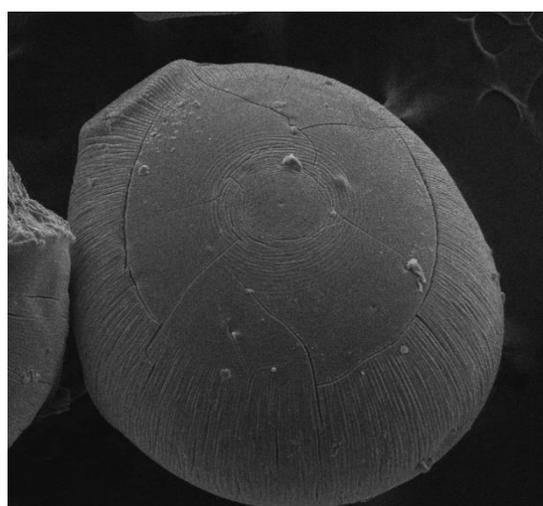
Com o auxílio do microscópio eletrônico de varredura (MEV), obteve-se as imagens das esferas desidratadas sem extrato e com extrato. O MEV pode ser realizado apenas nas esferas desidratadas pois a camada de ouro utilizada na dispersão dos elétrons, não fixa nas paredes das esferas úmidas.

Figura 11 - Imagens microscópicas esferas sem extrato



(a)

(b)

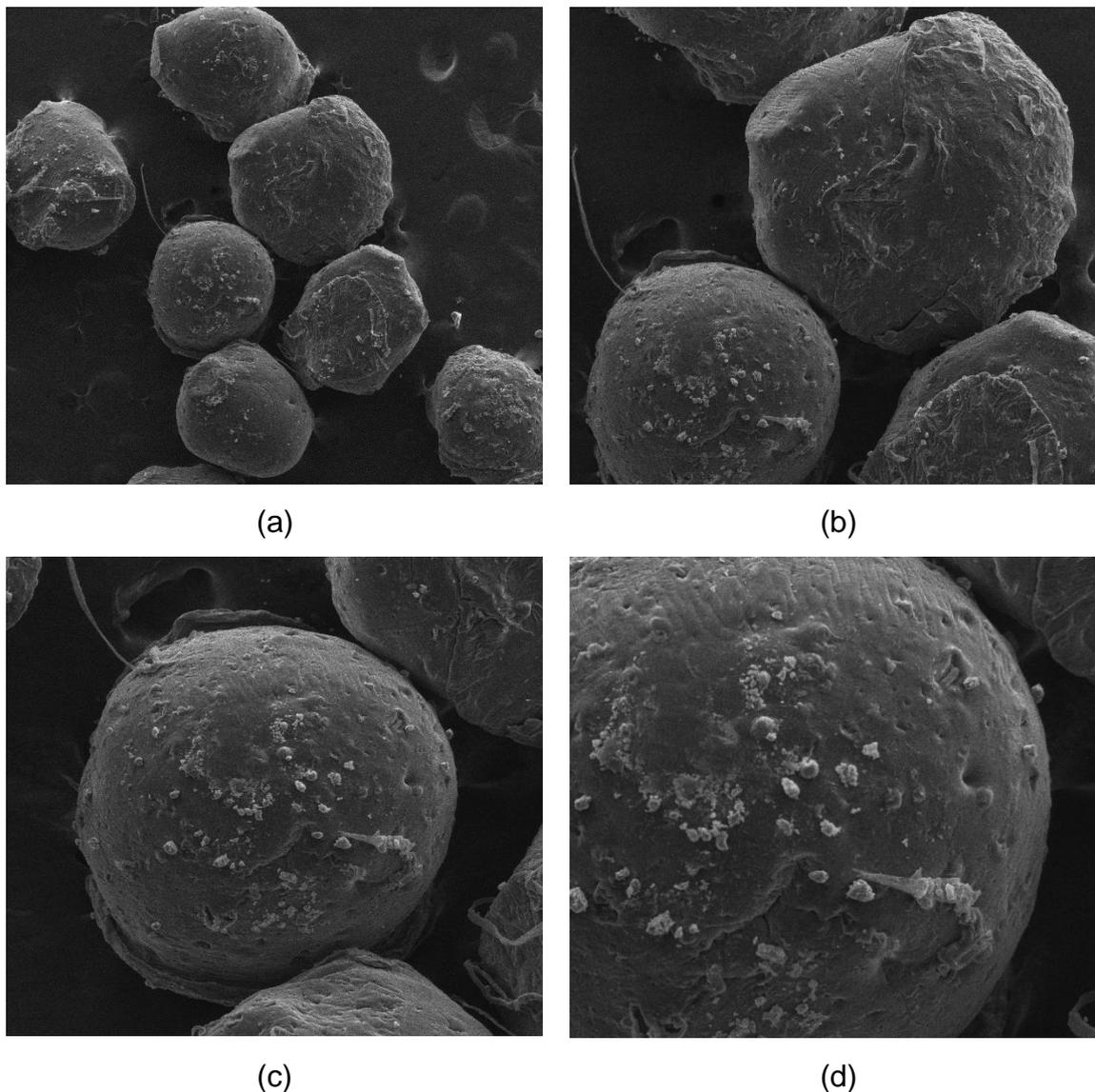


(c)

(a) Aumento de 50x. (b) Aumento de 100x. (c) Aumento de 150x.

Fonte: UTFPR (2018)

Observações microscópicas de esferas sem extrato (FIGURA 11) mostram que são esféricas com superfície lisa e distribuição de tamanho homogênea. Na FIGURA 11 (c) há uma parte achatada, que pode ser resultado, no momento da secagem, das esferas estarem muito próximas e se unirem.

Figura 12 - Imagens microscópicas esferas com extrato

(a) Aumento de 50x. (b) Aumento de 100x. (c) Aumento de 150x. (d) Aumento de 200x.
Fonte: UTFPR (2018)

Na FIGURA 12 (a) é possível observar que as esferas não são totalmente uniformes, apresentando variação em sua forma e tamanho, possuem poros, cavidades externas e superfície rugosa por causa do extrato. O processo de encapsulação resultou na formação de microesferas, onde uma pequena parte do extrato permanece exposto na superfície. Há também a presença de cristais que podem ser atribuídos ao cloreto de sódio. Durante a formação da esfera, os íons de cálcio interagem com o alginato de sódio para formar a matriz, enquanto, os íons de sódio estão livres para interagir com os íons cloreto do banho de gelificação

(DELADINO et al. 2008). Após a secagem das cápsulas, os cristais de cloreto de sódio poderiam ter permanecido sobre a superfície.

Pode-se observar algumas fibras que podem ser resultado da secagem com folhas de papel antes de levar à estufa, resquícios que não foram percebidos a olho nu. As esferas secas apresentaram tamanho de $0,9 \pm 0,2$ milímetros. As esferas úmidas com extrato (FIGURA 13 a) e sem extrato (FIGURA 13 b) apresentaram tamanhos de aproximadamente $2 \pm 0,3$ milímetros.

Figura 13 - Esferas úmidas



(a)



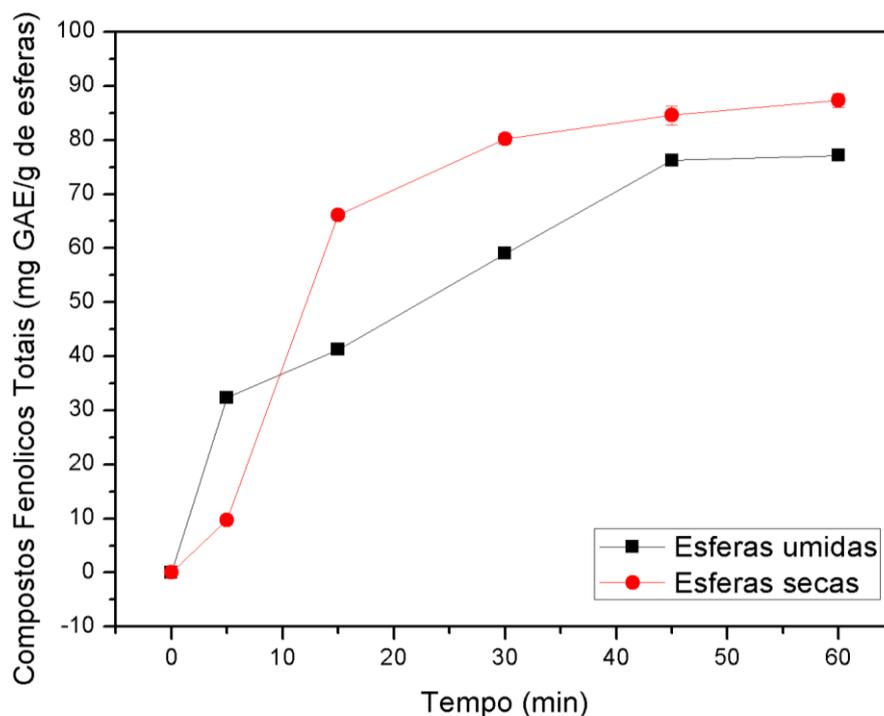
(b)

Fonte: Autoria própria

5.5 LIBERAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

Os perfis de liberação foram investigados depois de colocar as esferas em meio aquoso sob agitação intensa. De acordo com Belščak-Cvitanović et al., 2010, a liberação dos compostos fenólicos usando o ensaio de Folin-Ciocalteu, segue um padrão onde o conteúdo principal destas substâncias é liberado nos primeiros 20 a 30 minutos, após é atingido um estado estacionário.

Figura 14 - Liberação de compostos fenólicos em esferas secas e úmidas



Fonte: Autoria própria

De acordo com a FIGURA 14, para as esferas secas, a estabilização começa a partir dos 30 minutos e para as esferas úmidas a partir dos 45 minutos, pois por possuírem alto teor de água em sua composição, as esferas úmidas liberam maior quantidade de compostos nos primeiros minutos, mas demoram mais para estabilizar.

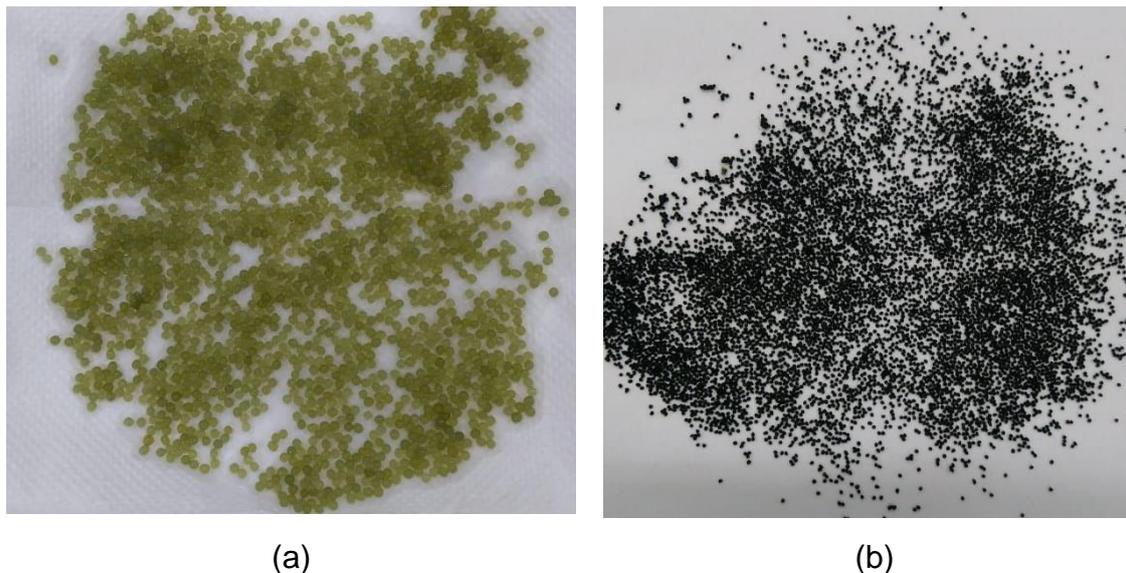
Segundo Huang e Brazel (2001), a água se desloca para a superfície durante a desidratação, promovendo assim a difusão e a migração dos compostos encapsulados. Portanto, uma maior quantidade de compostos solúveis pode se difundir por convecção com água, levando a uma distribuição desigual dos compostos e produzindo concentrações mais altas na superfície da esfera. Assim, esta teoria poderia explicar a rápida liberação fenólica nos primeiros minutos do perfil cinético das esferas secas.

Mudanças no perfil de captação de água devem levar a mudanças no perfil de liberação do composto ativo, no caso das esferas secas, a liberação do composto ativo é amplamente controlada pelo inchaço das esferas, que é menos significativo no caso das esferas úmidas quando em contato com a água (WU; BRAZEL, 2008), o que pode ser verificado pela observação da FIGURA 14.

5.6 ESTABILIDADE DO CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL

Para o cálculo da estabilidade, utilizou-se esferas úmidas (FIGURA 15 a) e esferas secas (FIGURA 15 b).

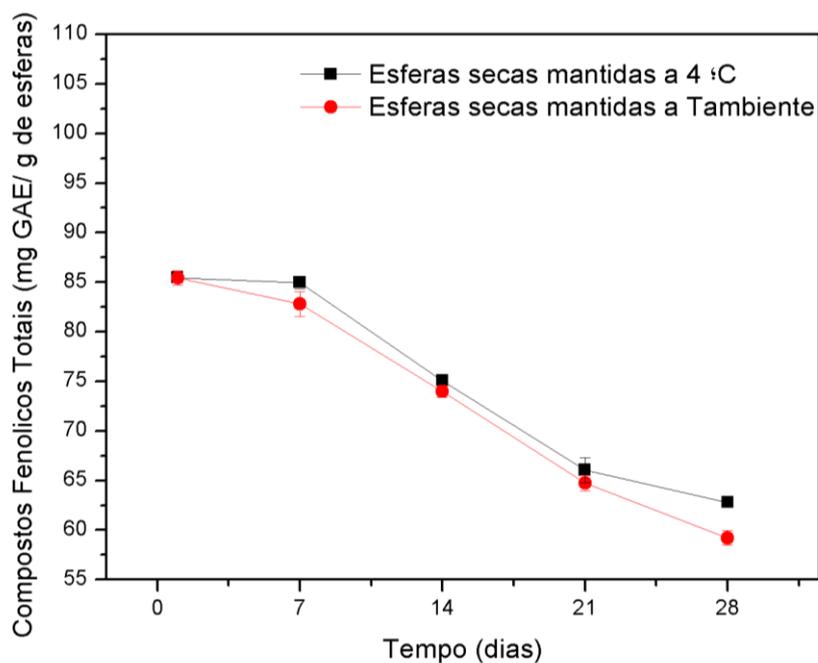
Figura 15 - Esferas úmidas e secas



Fonte: Autoria própria

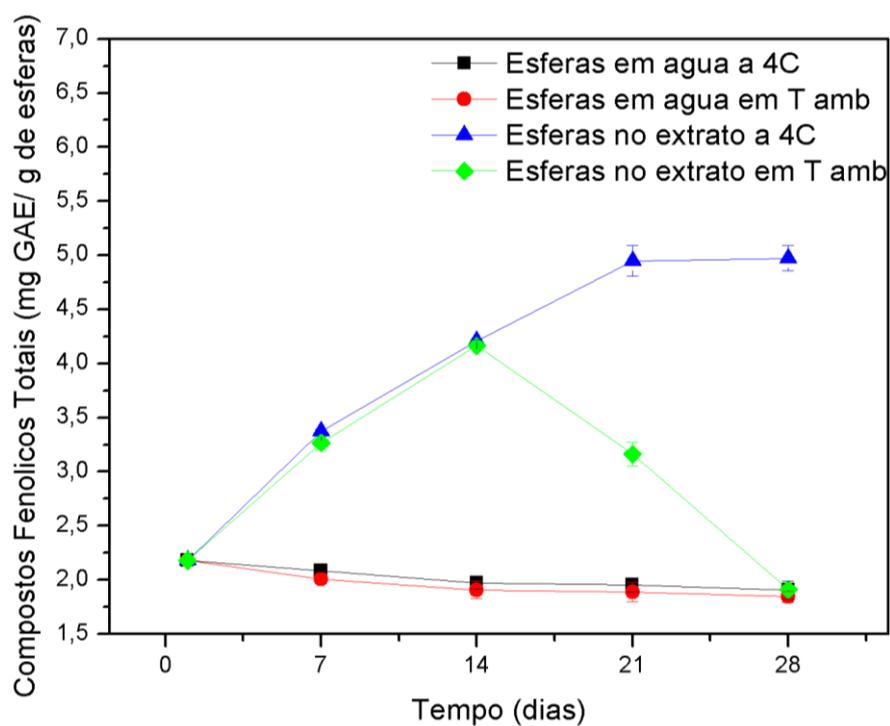
As Figuras 16 e 17 mostram o efeito das condições de armazenamento no TPC das esferas de alginato de cálcio úmidas e secas obtidas por extrusão. As esferas foram armazenadas em tubos falcon recobertos por fita isolante para evitar o contato com a luz, por 28 dias.

Figura 16 - Efeito do tempo e temperatura na estabilidade em esferas de alginato secas



Fonte: Autoria própria

Figura 17 - Efeito do tempo e temperatura na estabilidade em esferas de alginato mantidas em extrato aquoso das folhas de amoreira e em água



Fonte: Autoria própria

Após os 28 dias de análise, é possível observar na FIGURA 17 que as soluções que ficaram no extrato permaneceram constantes até o dia 14, mas que a partir desse dia a temperatura desempenhou papel importante na variação da concentração, onde a amostra que permaneceu em menor temperatura apresentou maior concentração com o passar dos dias, já a amostra que estava a temperatura ambiente teve sua concentração diminuída com o passar dos dias.

Para prazos maiores, a tendência da concentração da amostra que permaneceu no extrato é diminuir, assim como a que permaneceu na água.

As esferas úmidas armazenadas em frascos contendo o extrato otimizado mostraram TPC significativamente maior quando comparadas ao mesmo tipo de esferas armazenadas sem o extrato. Chan et al., (2009) afirmaram que esse fenômeno ocorre porque os compostos ativos solúveis em água, como os polifenóis, podem facilmente se difundir para dentro e para fora da solução de armazenamento.

Belščak-Cvitanović et al. (2010) avaliaram a estabilidade dos extratos de seis diferentes plantas medicinais encapsuladas com alginato de sódio e descobriram que sua estabilidade diminuiu significativamente após duas semanas de armazenamento a 25°C. Essa diminuição foi atribuída ao alto teor de água nas esferas de alginato. Estando de acordo com os dados encontrados neste trabalho.

As esferas secas apresentaram maior quantidade de compostos fenólicos (FIGURA 17) pois no momento da secagem, com a diminuição a perda de massa das esferas, devido à evaporação da água, a quantidade de compostos fenólicos ficou concentrada, não havendo também difusão com o meio externo, mantendo assim o TPC estável durante o tempo de análise.

6 CONCLUSÃO

O uso de compostos biologicamente ativos de várias ervas medicinais como ingredientes funcionais em aplicações de alimentos, bebidas e cosméticos vem ganhando crescente interesse nos últimos anos, principalmente por fornecer ingredientes naturais, diminuindo o consumo de produtos industrializados. E para manter estes compostos ativos, mesmo após a digestão, o encapsulamento se torna uma solução para criar uma barreira e evitar a degradação dos compostos fenólicos.

Estas esferas podem ser utilizadas em cosméticos, utilizando o efeito antioxidante na pele, e também como suplemento alimentar, tanto desidratado, em barrinhas de cereal, por exemplo, como úmido, com maior concentração de compostos fenólicos quando armazenado em seu extrato aquoso.

Analisando os dados apresentados, observa-se que a temperatura de extração apresenta efeito significativo no teor dos compostos fenólicos totais em extrato aquoso das folhas de amora. Enquanto que o efeito do tempo não influenciou de forma significativa na extração. Para o fator de concentração de alginato, notou-se que uma concentração 1,5 % foi suficiente para uma alta porcentagem de encapsulamento, diminuindo assim os gastos com reagentes.

A secagem, afetou significativamente o tamanho e a morfologia das esferas, apresentando uma maior quantidade de compostos fenólicos e provou ser um método apropriado para a preservação de fenólicos encapsulados.

Quanto à estabilidade, analisada por 28 dias, as esferas úmidas armazenadas em frascos contendo o extrato otimizado apresentaram TPC significativamente maior quando comparadas ao mesmo tipo de esferas armazenadas em água. Pelo presente estudo pode-se verificar que a técnica de encapsulamento de extrato de *Morus nigra* L em esferas de alginato de cálcio é altamente eficaz para aprisionar os bioativos desejados e retardar seu perfil de liberação.

REFERÊNCIAS

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, p. 232-240, 2007.

ANTUNES, L.E.C. Amora-preta: nova opção de cultivo no Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.1, p.151-158, 2002.

AMORATI R. et al. Kinetic and thermochemical study of the antioxidant activity of sulfur-containing analogues of vitamin E. **Chemistry - A European Journal**, v. 13, p. 8223–30, 2007.

ARRIOLA N.D.A. et al. Encapsulation of aqueous leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bertoni with sodium alginate and its impact on phenolic content. **Food Bioscience**, v.13, p. 32-40, 2016.

BABBAR, N. et al. Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. **Food Research International**, v.44, n.1, p. 391-396, 2011.

BAKOWSKA-BARCZAK, A.M.; KOLODZIEJCZYK, P. Black Currant Polyphenols: Their Storage Stability and Microencapsulation. **Industrial Crops and Products**, v. 34, p. 1301-1309, 2011.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W. **Food chemistry**. 4. ed. New York: Springer Verlag, 2004, 744 p.

BELŠČAK-CVITANOVIĆ et al. Encapsulation of polyphenols from *Rubus idaeus* L. leaves extract by electrostatic extrusion. **Book of Full Papers of the 5th Central European Congress on Food**, v. 44, p. 8–14, 2010.

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

BRESSEL, T.A.B. **Sistema gerador de microcápsulas de alginato**. 70 f. Tese (Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular). Departamento de Ciências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

BRUNETON, J. **Pharmacognosy, Phychemistry, Medicinal Plants**. New York: Intercept, 1995, 499 p.

BURNS, J. et al. Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 9, p. 5797–5808, 2001.

CAPASSO, A. et al. Reduction of agonist-induced contractions of guinea-pig isolated ileum by flavonoids. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 34, p. 279-281, 1991.

CARLO, G. et al. Inhibition of intestinal motility and secretion by flavonoids in mice and rats: structure-activity relationships. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 45, p. 1054-1059, 1993.

CHAN, E. S. et al. Prediction models for shape and size of ca-alginate macrobeads produced through extrusion–dripping method. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 338, p. 63–72, 2009.

CHOE, E.; MIN D.B. Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods. **Journal of Food Science**, v. 70, p. 142–59, 2005.

COOK, N. C.; SAMMON, S. Flavanoids chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Nutritional Biochemistry**, v. 7, p. 66–76, 1996.

DE BRUYNE, T. et al. Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, p. 445-459, 1999.

DECKER, E.A. Antioxidant mechanisms. **Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 2002, 500 p.

DELADINO, L. et al. Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, p.126–134, 2008.

DEPYPERE, F. et al. Food powder microencapsulation: principles, problems and opportunities. **The Food Science and Biotechnology**, v.1, n.2, p.75-94, 2003.

DESAI, K. G. H., PARK, H. J., Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, v. 23, p. 1361-1394, 2005.

DIAZ, M. N. et al. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. **Journal of Medicine and Nutrition England**, v. 337, p. 408–416, 1997.

DZIEZAK, J. D., Microencapsulation and encapsulated food ingredients. **Food Technology**, v. 42, p. 136-151, 1998.

ERCISLI, S.; ORHAN, E. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. **Food Chemistry**, v.103, p.1380-1384, 2007.

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

FERGUSON, L.R., HARRIS, P.J. Protection against cancer by wheat bran: role of dietary fibre and phytochemicals. **European Journal of Cancer Prevention, Oxford**, v.8, n.1, p.17-25, 1999.

FRANKEL, E. N. Lipid Oxidation. **Progress in Lipid Research**, v.19, p. 1-22, 1980.

GIADA, M.L.R. Food phenolic compounds: main classes, sources and their antioxidant power. **Oxidative stress and chronic degenerative diseases—A role for antioxidants**, 1. ed. Croácia, 112 p., 2013.

GIBBS, B.F., KERMASHA, S. Encapsulation in the food industry: a review.

International Journal of Food Sciences and Nutrition, v. 50, p. 213 -224, 1999.

GINDRI, A.L., SILVA, M., MARCHI, M.B., BRUM, L.S., ATHAYDE, M.L., HOELZEL, S.C.S.M. Análise fitoquímica das cascas e do miolo da raiz de *Urerabaccifera* (L.) Gaudich (urticaceae). **Saúde (Santa Maria)**, v. 36, n. 2, p. 63-69, 2010.

GONÇALVES R. **Estudo da inibição de tripsina por compostos fenólicos isolados de fontes naturais. Efeito anti nutricional de bebidas comuns.** 2007. 78 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ciência e Segurança Alimentar). Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Escola de Engenharia da Universidade do Minho, Porto, 2007.

GRANT, G. T. et al. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model, **Febs Letters**, v. 32, p. 195-198, 1973.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Lipid peroxidation: a radical chain reaction. **Arch Biochem Biophys**, v. 280, p.189- 276, 1999.

HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Identification and characterisation of anthocyanins from wild mulberry (*Morus nigra* L.) growing in Brazil. **Food Science and Technology International**, v. 13, n. 1, p. 17-25, 2007.

HASLAM, E. Vegetable tannins – Lessons of a phytochemical lifetime. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2713 - 2721, 2007.

HUANG, X., BRAZEL, C. S. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 73, p. 121–136, 2001.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry, Barking**, v. 126, n. 4, p. 1821-1835, 2011.

KING, A.H. **Brown Seaweed Extraxts (Alginates)**. The National Agricultural Library, v. 3, p. 110-115, 1983.

KIM,C.K.; LEE, E.J. **The controlled release of blue dextran from alginate beads**. International Journal of Pharmaceutics, v. 79, p. 11–19, 1992.

KIM, E.S. et al. Purification and characterization of Moran 20K from Morus alba. **Archives of Pharmaceutical Research**, v. 22, p. 9-12, 1999.

KRISTINOVA, V. et al. Antioxidant Activity of Phenolic Acids in Lipid Oxidation Catalyzed by Different Prooxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 10377-10385, 2009.

KSOURI, R., KSOURI, W.M., JALLALI, I., DEBEZ, A., MAGNÉ, C., HIROKO, I., ABDELLEY, C. Medicinal halophytes: potent source of health promoting biomolecules with medical, nutraceutical and food applications. **Reviews in Biotechnology**, v. 32, p. 289–326, 2012.

MAAS, J. L.; GALLETTA, G. J.; STONER, G. D. Ellagic acid, na anticarciogen in fruits, especially in strawberry: a review. **HortScience, Alexandria**, v. 26, n. 1, p. 10-14. 1991.

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

MARTIN, A. D.; GILBERT, D. Enzyme changes accompanying liver enlargement in rats treated with 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole. **Journal of Biochemistry**, V. 106, p. 22–23, 1968.

MARTINS, N., BARROS, L., HENRIQUES, M., SILVA, S., FERREIRA, I.C.F.R.

Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida* species. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 648-670, 2015.

MELLO, J. C. P.; SANTOS, S. C. Taninos. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, v. 5, p. 615 - 656, 2003.

MIRANDA, M.A. et al. Uso etnomedicinal do chá de *Morus nigra* L. no tratamento dos sintomas do climatério de mulheres de Muriaé, Minas Gerais, Brasil. **HU Revista**, n. 1, v. 36, p. 8-61, 2010.

MORGAN R. **Enciclopédia das ervas e Plantas Medicinais**. São Paulo: Hemus editora, p. 555, 1982.

MOON, J. K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1655-1666, 2009.

MUNIN, A.; EDWARDS-LEVY, F. Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. **Pharmaceutics**, v. 3, p. 793-829, 2011.

NOMURA, T. Phenolic compounds of the mulberry tree and related plants. **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**, v. 53, p. 87-201, 1988.

NOMURA, T; HANO, Y. Isoprenoid-substituted phenolic- compounds of Moraceous Plants. **Natural Product Reports**, v. 11, p. 205, 1994.

OKUDA, T., YOSHIDA, T., HATANO, T. Hidrolyzable tannins and related polyphenols. **Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe**, v. 66, p. 1-117, 1995.

OZGEN, M.; SERÇE, S.; KAYA, C. Phytochemical and antioxidant properties of anthocyanin-rich *Morus nigra* and *Morus rubra* fruits. **Scientia Horticulturae**, v. 119, p. 275-279, 2009.

PAWLOSKY, R.J.; WARD G.; SALEM JR, N. Essential fatty acid uptake and metabolism in the developing rodent brain. **Lipids**, v. 31, p. 103-107, 1996.

POLING, E. B. Blackberries. **Journal of Small Fruit and Viticulture, Baton Rouge**, v. 14, n. 2, p. 38-69. 1996.

RÉ, M.I. Microencapsulation by spray drying. **Drying Technology**, v. 16, p. 1195-1236, 1998.

ROY, I. et al. **Cross-linked alginate-guar gum beads as fluidized bed affinity media for purification of jacalina**. *Biochemical Engineering Journal*, v. 23, p. 193-198, 2005.

SAÉNZ, C. et al. Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). **Food Chemistry**, p. 616–622, 2009.

SALEEM, M. et al. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. **Natural Products Reports**, v.27, p. 238–254, 2010.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Compuestos polifenólicos: efectos fisiológicos: actividad antioxidante. **Alimentaria**, v. 329, p. 29-40, 2002.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3875-3883, 1991.

SIDDHURAJU, P.; KLAUS, B. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2144–2155, 2003.

SIMIC, M. G.; JAVANOVIC, S. V. Inactivation of oxygen radicals by dietary phenolic compounds in anticarcinogenesis; **Food Phytochemicals for Cancer Prevention: Washington**, p. 20, 1994.

SINGLETON V.L.; ORTHOFER R.; LAMUELA-RAVENTÓS R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidants. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

STOJANOVIC, R., BELSCAK-CVITANOVIC, A., MANOJLIVIC, V., KOMES, D., NEDOVIC, V., BUGARSKI, B. Encapsulation of thyme (*Thymus serpyllum* L.) aqueous extract in calcium alginate beads. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, p. 685–696, 2012.

TEIXEIRA, V.F.T. **Estudo da obtenção de biocatalisadores com matrizes de alginato de cálcio visando a produção de biodiesel**. 88 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Departamento de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Universidade Estadual no Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2011.

TUTIN, G. T. *Morus* L. **In Flora Europa**. Australia: Cambridge University Press, 1996, 456 p.

VICKERY, M.L.; VICKERY, B. Secondary plant metabolism. **Macmillan Publishers**, v. 2, p. 156-185, 1981.

VILSTRUP, P., Microencapsulation of food ingredients. **Surrey: Leatherhead Pub**, v. 1, p. 85-96, 2001.

VOLPATO, G. T.; CALDERON, I. M. P.; SINZATO, S. et al. Effect of *Morus nigra* aqueous extract treatment on the maternal – fetal outcome , oxidative stress status and lipid profile of streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal Ethnopharmacology**, v. 138, n. 3, p. 691-696, 2011.

WILDMAN, R. E. C. **Handbook of nutraceuticals and functional foods**. Boca Raton: CRC Press, 2006, 345 p.

WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. **Plant Physiology**, v. 126, p. 485-493, 2001.

WU, L., BRAZEL, C. S. Mathematical model to predict drug release, including the early-time burst effect, from swellable homogeneous hydrogels. **Industrial Engineering Chemistry Research**, v. 47, n. 5, p. 1518–1526, 2008.

YOSHIDA, K.; MORI, M.; KONDO, T. Blue flower color development by anthocyanins: from chemical structure to cell physiology. **Natural Products Reports**, v. 26, p. 884–915, 2009.