

### UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS



#### CRISTIANE DE MOURA

# POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE MIRTILO, POLPA DE AÇAÍ E *GOJI BERRY*: EFEITO NA ESTABILIDADE OXIDATIVA E SENSORIAL EM QUEIJO *PETIT*SUISSE

DISSERTAÇÃO

PATO BRANCO 2016

#### CRISTIANE DE MOURA

# POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE MIRTILO, POLPA DE AÇAÍ E *GOJI BERRY*: EFEITO NA ESTABILIDADE OXIDATIVA E SENSORIAL EM QUEIJO *PETIT*SUISSE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do título de "Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos" - Área do conhecimento: Química de Alimentos.

Professor Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Solange

**Teresinha Carpes** 

Co-orientador: Prof.ª Dra. Celeide Pereira

#### M865p

Moura, Cristiane de.

Potencial antioxidante de extratos hidroalcoólicos de mirtilo, polpa de açaí e *goji berry*: efeito na estabilidade oxidativa e sensorial em queijo *petit suisse* / Cristiane de Moura. -- 2016.

108 f.: il.; 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Solange Teresinha Carpes Coorientadora: Profa. Dra. Celeide Pereira

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Pato Branco, PR, 2016.

Bibliografia: f. 96 - 107.

1. Fenóis. 2. Antioxidantes. 3. Compostos bioativos. 4. Alimentos funcionais. I. Carpes, Solange Teresinha, orient. II. Pereira, Celeide, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. IV. Título.

CDD (22. ed.) 660.281

Ficha Catalográfica elaborada por Suélem Belmudes Cardoso CRB9/1630 Biblioteca da UTFPR Campus Pato Branco



## MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Câmpus Pato Branco
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de
Processos Químicos e Bioquímicos



## TERMO DE APROVAÇÃO Nº 40

## Título da Dissertação "POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE MIRTILO, POLPA DE AÇAÍ E *GOJI BERRY*: EFEITO NA ESTABILIDADE OXIDATIVA E SENSORIAL EM QUEIJO *PETIT SUISSE"*Autora

#### **CRISTIANE DE MOURA**

Esta dissertação foi apresentada às 14 horas do dia 31 de março de 2016, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS – Linha de pesquisa em Química de Alimentos – no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. A autora foi arguida pela Banca Examinadora abaixo assinada, a qual, após deliberação, considerou o trabalho aprovado.

Profa. Dra. Solange Teresinha Carpes

UTFPR/PB

Presidente

UTFPR/CM

Examinador

Profa. Dra. Marina Leite Mitterer Daltoé

UTFPR/PB

Examinadora

Visto da Coordenação

Prof. Dra. Cristiane Regina Budziak
Parabocz

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos - PPGTP

O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do PPGTP

#### **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus primeiramente, pelo dom da vida e por ter me concedido força, coragem e fé para chega até o final desse trabalho.

Aos meus pais, Samuel de Moura e Elizabete Maria Kruger e minhas irmãs Hellen Moura e Isabella Moura por me proporcionar todo apoio, amor e por sempre acreditarem em mim.

Ao meu companheiro para toda a vida Ricardo Guz, por toda paciência, amor, compreensão e companheirismo, tanto nos momentos de lazer quanto nos momentos de trabalho, análises e escrita.

À minha orientadora Prof. Dra. Solange Teresinha Carpes, pelos ensinamentos, conselhos e principalmente por toda amizade durante todos esses anos de trabalho.

À minha co-orientadora Celeide Pereira, por toda paciência, ensinamentos proporcionados e pelo acolhimento em sua residência com todo amor e dedicação para realização do projeto.

Aos meus amigos e colegas de mestrado por ter dividido a amizade, as conquistas, as frustrações e por toda experiência compartilhada, em especial as amigas Barbara Arruda Nogueira e Camila Moresco, que estiveram ao meu lado nos melhores e piores momentos, e a Patricia de Lima que mesmo não estando presente, foi essencial para conclusão desse trabalho.

Ao grupo de pesquisa coordenado pela Prof. Dra. Solange Teresinha Carpes, em especial aos amigos Amália Soares dos Reis, Renan Augusto Weschenfelder Tavares, Leticia Dangui da Silva e Daiane Pereira, por toda a ajuda concedida e trabalhos realizados em conjunto.

À Roberta Roncatti, responsável pelo Laboratório de Qualidade Agroindustrial, por toda ajuda nas análises de caracterização físico-química.

À amiga Rafaela Candido da Silva e Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Tatiane Oldoni pela ajuda na realização da cromatografia líquida de alta eficiência.

À central de análises por disponibilizar tempo e espaço para a realização das análises.

Aos professores Vanderlei Aparecido de Lima e Marina L. Mitterer Daltoé, por toda ajuda e ideias durante o desenvolvimento do trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Bioquímicos e do Departamento de Química, da UTFPR campus Pato Branco, por todo ensinamento repassado.

A UTFPR Câmpus Medianeira pela acolhida ao ceder seu espaço.

A CAPES pelo incentivo financeiro da bolsa de pesquisa.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desta pesquisa, meus singelos agradecimentos.

"Tente uma, duas, três vezes e se possível tente a quarta, a quinta e quantas vezes for necessário. Só não desista nas primeiras tentativas, a persistência é amiga da conquista. Se você quer chegar aonde a maioria não chega, faça o que a maioria não faz!"

Bill Gates

#### **RESUMO**

MOURA, Cristiane de. **Potencial antioxidante de extratos hidroalcoólicos de mirtilo, polpa de açaí e goji berry: efeito na estabilidade oxidativa e sensorial em queijo petit suisse.** 2016. 108f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, PR, 2016.

O interesse do consumidor por alimentos saudáveis, ricos em compostos antioxidantes é um dos fatores importantes para a redução de riscos de doenças e vem incentivando os pesquisadores e a indústria a desenvolver produtos e ingredientes inovadores e funcionais. Com esse intuito, o objetivo do trabalho foi determinar as melhores condições de extração de compostos bioativos presentes nas amostras polpa de açaí, mirtilo e goji berry utilizando a metodologia de superfície de resposta (RSM); avaliar a atividade antioxidante e antimicrobiana; identificar e quantificar os compostos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE); avaliar a estabilidade oxidativa e sensorial do queijo petit suisse contendo os extratos liofilizados das amostras estudadas. Delineamento fatorial 23 foi usado para analisar o efeito do solvente (etanol e água), tempo (30 e 60 min) e temperatura (30 °C e 60 °C) na extração e na determinação de compostos fenólicos totais (TCF) e atividade antioxidante (AA). As variáveis, tempo e temperatura apresentaram efeito positivo na AA em seus maiores níveis, 60 min e 60 °C, respectivamente. O solvente etanol 80 % se mostrou mais eficiente na extração de TCF com AA em todas as matrizes. A identificação de compostos fenólicos realizada por CLAE revelou a presença de categuina, epicateguina, rutina, miricetina, ácido caféico, ácido ferrúlico e ácido cumárico. A polpa de açaí apresentou maior atividade antioxidante in vitro quando extraída a 60 °C por 60 min, porém nenhum dos três extratos analisados nestas condições apresentaram atividade antibacteriana contra as bactérias Staphylococcus aureus e Salmonella bongori nas concentrações testadas (95,00 a 2,34 mg/mL). A oxidação lipídica dos petit suisse foi inibida pela adição dos extratos liofilizados, revelando hihgiggredução na produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e proporcionando a estabilidade da cor dos produtos durante o tempo de estocagem. O queijo petit suisse contendo extrato liofilizado de goji berry obteve maior aceitação sensorial entre os julgadores (75,67 %). Com estes resultados a substituição de antioxidantes e ingredientes sintéticos por extratos liofilizados pode ser uma alternativa para a elaboração de alimentos mais saudáveis e nutritivos, ricos em compostos fenólicos.

**Palavras-chave:** Compostos fenólicos. Atividade antioxidante. Delineamento fatorial Frutas. Queijo *petit suisse*.

#### **ABSTRACT**

MOURA, Cristiane de. Antioxidant potential of hydroalcoholic extracts from blueberry, acai pulp and goji berry: effect on oxidative and sensory stability in petit suisse cheese. 2016. 108p. Master's Dissertation (Master's degree in Technology Chemical and Biochemical Process) - The Federal University of Technology - Paraná, Pato Branco, PR, 2016.

The consumer interest in healthy foods with high amounts of antioxidants is one of the important factors for reducing the risk of disease and it has encouraged researchers and industry to develop innovative and functional products and ingredients. To that end, the objective of this research was to study the bioactive compounds present in the acai pulp, blueberry and goji berry samples, as well as the phenolic compounds form of extraction using the response surface methodology (RSM), antioxidant and antimicrobial activity of it, identification and quantification of compounds by highperformance liquid chromatography (HPLC) and, at the end, the development of petit suisse cheeses added with freeze-dried extracts of the samples. A 23 factorial design was used to analyze the solvent effect (ethanol and water), time (30 and 60 min) and temperature (30 °C and 60 °C) on the extraction and determination of total phenolic compounds (TPC) and antioxidant activity (AA). The variables time and temperature had a positive effect on the antioxidant activity (AA) in their highest levels with 60 min and 60 °C respectively. The ethanol solvent 80 % is more efficient in TPC extraction with AA in all arrays. The identification of phenolic compounds performed by HPLC revealed the presence of catechin, epicatechin, rutin, myricetin, chlorogenic acid, coumaric acid and ferulic acid. Regarding the AA the acai pulp showed higher activity in vitro when extracted by 60 °C for 60 min, but none of the three extracts analyzed under these conditions showed antibacterial activity against Staphylococcus aureus and Salmonella bongori in the concentrations tested (95.00 to 2.34 mg/mL. For petit suisse cheeses added with phenolic extract of the samples, the sample containing goji berry achieved greater sensory acceptance among judges (75.67%), second only to the commercial sample used for comparison with 91.56 % of acceptance. In relation to the storage time, the oxidation was evaluated by the level of thiobarbituric acid reactive substances and color analysis. Both analysis were satisfactory, making the extracts addition an alternative to preserve the product properties and give it a high content of bioactive and nutritive compounds.

**Keywords:** Phenolic compounds. Antioxidant activity. Factorial design. Fruits. *Petit suisse* cheeses.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Açaizeiro	20
Figura 2 - Açaí	21
Figura 3 - Árvore frutífera de mirtilo (esquerda); Fruto mirtilo (direta)	23
Figura 4 - Goji berry	24
Figura 5 - Ácido fenólico (a) e Ácido tânico (b)	26
Figura 6 - Estrutura básica de ácidos fenólicos: (A) benzoico, (B) cinâmicos e (C)	
cumarinas	27
Figura 7 - Estrutura básica de flavonoides	27
Figura 8 - Reação do radical DPPH frente ao composto fenólico Quercetina.	
Diferença na coloração entre o início e final da reação, após os radicais serem	
estabilizados	
Figura 9 - Reação de oxirredução do radical ABTS	
Figura 10 - Redução do complexo Fe <sup>3+</sup> a Fe <sup>2+</sup>	
Figura 11: Fluxograma das atividades a partir da matéria-prima	
Figura 12 - Fluxograma para elaboração do queijo petit suisse	
Figura 13 - Perfis espectrais em éter de petróleo das amostras polpa de açaí (A),	
berry (B) e Mirtilo (C)	
Figura 14 - Açaí: polpa especial e polpa liofilizada	
Figura 15 - Mirtilo: in natura, triturado e liofilizado	
Figura 16 - Goji berry: Desidratado e triturado	
Figura 17 - Extratos para delineamento fatorial: Goji berry	
Figura 18 - Extratos para delineamento fatorial: Mirtilo	
Figura 19 - Extratos para delineamento fatorial: Polpa de açaí	
Figura 20 - Gráfico de Pareto para a amostra mirtilo e variáveis dependentes: teor	
compostos fenólicos (A) e atividade antioxidante (B);	63
Figura 21 - Gráfico de Pareto para a amostra polpa de açaí e variáveis dependent	
teor de compostos fenólicos (A) e atividade antioxidante (B);	63
Figura 22 - Gráfico de Pareto para a amostra <i>goji berry</i> e variáveis dependentes:	
de compostos fenólicos (A) e atividade antioxidante (B);	64
Figura 23 - Gráfico de Superfície referente à resposta Compostos fenólicos e	66
atividade antioxidante para a polpa de açaí	66
Figura 24 - Gráfico de Superfície referente à resposta Compostos fenólicos e	67
Atividade antioxidante para o extrato de <i>goji berry</i>	67
Figura 25 - Gráfico de Superfície referente à resposta Compostos fenólicos e	60
Atividade antioxidante para o extrato de mirtilo	00 72
Figura 27 – Gráfico da análise de componentes principais: (a) Escores da ativida	
antioxidante e teor de antocianinas totais; (b) Projeção das amostras de polpa de	ue
	7/
açaí, mirtilo e <i>goji berry.</i> Figura 28 - Cromatograma obtido por CLAE (λ = 360) para o extrato liofilizado de	/ 4
	76
polpa de açaíFigura 29 - Cromatograma obtido por CLAE (λ = 360) para o extrato liofilizado de	, 0
mirtilo	
Figura 30 - Cromatograma obtido por CLAE (λ = 360) para o extrato liofilizado de	
berry	-
~~~,	

Figura 31 - Placa de 96 poços após ser adicionado corante Resazurina para a	
análise de CIM	.78
Figura 32 - Elaboração do queijo petit suisse	
Figura 33 - Queijo petit suisse adicionados extratos fenólicos liofilizados de polpa	de
açaí (A), mirtilo (B) e goji berry (C)	.81
Figura 34: Diferença total de cor (ΔE) entre o período de armazenamento em rela	ção
ao tempo inicial (tempo o)	.84
Figura 35 - Frequência de consumo de queijo petit suisse pelos julgadores (%)	.87
Figura 36 – Índice de aceitabilidade para as amostras de queijo petit suisse	.88
Figura 37 – Teste de intenção de compra dos diferentes tratamentos	.90
Figura 38 – Gráfico box plot referente aos atributos sensoriais: sabor, aparência,	
sabor e cor referentes a impressão global.	.92
Figura 39 - Gráfico box plot referente as características demográficas idade,	
frequência de consumo e gênero referentes a impressão global	93

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Planejamento Fatorial 23 para extração de compostos antioxidantes em
polpa de açaí, mirtilo e <i>goji berry</i> 40
Tabela 2 - Condições e Variáveis utilizadas para extração de compostos antioxidantes
em polpa de açaí, mirtilo e <i>goji berry</i> 41
Tabela 3 - Gradiente de concentração para eluição dos compostos, constituído de
Fase A e Fase B46
Tabela 4 - Composição centesimal das frutas mirtilo, goji berry e polpa de açaí em
base seca53
Tabela 5 - Resultados referentes ao delineamento fatorial para compostos fenólicos e
DPPH determinados em polpa de açaí, mirtilo e <i>goji berry</i> 59
Tabela 6 - Análise de Variância (ANOVA) para as variáveis dependentes TCF e AA
em polpa de açaí, mirtilo e <i>goji berry</i> 62
Tabela 7 - Modelos gerados por regressão linear múltipla para as variáveis
dependentes, compostos fenólicos e DPPH em função dos fatores; solvente, tempo
e temperatura64
Tabela 8 - Quantificação de Antocianinas totais expressas em cianidina-3-glicosídio
nas amostras de polpa de açaí, mirtilo e <i>goji berry.</i> 70
Tabela 9 - Resultados referentes a atividade antioxidante pelos métodos DPPH,
FRAP, ABTS e β-caroteno para as amostras polpa de açaí, mirtilo e <i>goji berry</i> 71
Tabela 10 - Compostos fenólicos identificados por CLAE-FR em extratos fenólicos de
polpa de açaí, mirtilo e <i>goji berry</i>
Tabela 11 - Análise físico-química do creme de leite
Tabela 12 - Análises físico-química do leite
Tabela 13 - Análise microbiológica para queijos de muita alta umidade com bactérias
lácteas em forma viável e abundante81
Tabela 14 - Composição físico química do queijo petit suisse com adição de extratos
de compostos fenólicos liofilizados81
Tabela 15 - Análise de cor de queijo petit suisse com extratos liofilizados das amostras,
polpa de açaí, mirtilo, <i>goji berry</i> e controle83
Tabela 16 - Valores médios referentes à análise TBARS nos diferentes tratamentos e
durante o período de armazenamento do produto85
Tabela 17 - Média das notas dadas pelos julgadores para avaliação das amostras.87
Tabela 18 - Módulos das diferenças entre os pares da soma total da ordenação da
preferência
Tabela 19 - Variáveis utilizadas para avaliação do queijo <i>petit suisse</i> divididas em
subgrupos para análise de Wald
Tabela 20 - Análise de regressão logística multivariada de Wald91

#### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A\* Radical inerte

Absa Absorbância da amostra
Absb Absorbância do branco
Absc Absorbância do controle

ABTS•+ 2,2´-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

ACP Análise de Componentes principais

%AA Atividade Antioxidante (%)

CLAE/FR Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase

Reversa

CIM Concentração Inibitória Mínima
CBM Concentração Bactericida Mínima

DPPH• 2,2 difenil-1-picridrazina

DRc Taxa de degradação da amostra controle

DRs Taxa de degradação da amostra contento a substância

teste

EAG/g Equivalente em ácido gálico por grama de amostra

FRAP Poder antioxidante de redução do ferro

IAL Instituto Adolfo Lutz EC50 Coeficiente de inibicão

MDA Malonaldeído

PSA Petit suisse adicionado de extrato liofilizado de polpa de

açaí

PSG Petit suisse adicionado de extrato liofilizado de goji berry PSM Petit suisse adicionado de extrato liofilizado de mirtlilo

PSSA Petit suisse adicionado de sorbato de potássio

PSC Petit suisse adquirido do comercio local

TBA Ácido tiobarbitúrico TCA Ácido tricloroacético

TBARS Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TPTZ Tripiridiltriazina

UFC/g Unidades formadoras de colônia por grama

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	
2 OBJETIVOS	
2.1 OBJETIVO GERAL	
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 REFERENCIAL TEÓRICO	
3.1 CONSUMO DE FRUTAS	19
3.2 AÇAÍ	
3.3 MIRTILO	
3.4 GOJI BERRY	
3.5 ALIMENTOS FUNCIONAIS	
3.6 COMPOSTOS BIOATIVOS	
3.7 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS	
3.8 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	
3.9 MÉTODOS DE ANÁLISE DOS COMPOSTOS BIOATIVOS E ATIV	
ANTIOXIDANTE IN VITRO	
3.10 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	
3.11 QUEIJO PETIT SUISSE	
4 MATERIAS E MÉTODOS	
4.1 MATERIAIS	
4.2 MÉTODOS	
4.2.1 Caracterização Físico-Química	
4.2.2 Perfil espectral de carotenoides	
4.2.3 Extração e delineamento fatorial	
4.2.4 Teor de Compostos fenólicos	
4.2.5 Teor de Antocianinas totais	
4.2.6.1 Atividade de sequestro do radical DPPH•	
4.2.6.2 Atividade antioxidante pela oxidação acoplada do beta-caroteno linoleico	e acido 43
4.2.6.3 Atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro - FRAF	
Reducing Antioxidant Power)	
4.2.6.4 Atividade antioxidante frente ao ABTS+	
4.2.7 Identificação e Quantificação de Compostos Fenólicos Individuais	45
4.2.8 Atividade Antibacteriana dos Extratos	
4.2.8.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)	
4.2.8.2 Concentração Bactericida Mínima (CBM)	
4.2.9 Elaboração de <i>petit suisse</i>	
4.2.10 Analise Microbiológica do queijo tipo <i>Petit Suisse</i>	48
4.2.11 Substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS)	49
4.2.12 Análise de cor	
4.2.13 Avaliação hedônica	
4.2.14 Analise Estatística	
5 RESULTADOS	
5.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL	
5.2 CAROTENOIDES TOTAIS	
5.3 PREPARAÇÃO DO EXTRATO E DESENHO EXPERIMENTAL	56

5.4 TEOR DE ANTOCIANINAS TOTAIS, ATIVIDADE ANTIOXIDA	
ANTIBACTERIANA E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS	NAS
MELHORES CONDIÇÕES	69
5.4.1 TEOR DE ANTOCIANINAS TOTAIS	
5.4.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	70
5.4.3 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS	74
5.4.4 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E CONCENTRAÇÃO BACTERI	CIDA
MÍNIMA	78
5.5 CARACTERIZAÇÃO DO QUEIJO PETIT SUISSE	79
5.5.1 COMPOSIÇÃO FÍSICO QUÍMICA DO LEITE E CREME DE LEITE	79
5.5.2 ELABORAÇÃO DO QUEIJO PETIT SUISSE	80
5.5.3 ANÁLISE DE COR	82
5.5.4 SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO 2-TIOBARBITÚRICO (TBARS)	84
5.5.5 AVALIAÇÃO HEDÔNICA	86
6 CONCLUSÃO	94
REFERÊNCIAS	

### 1 INTRODUÇÃO

A função dos alimentos vai além de apenas nutrir (MORAES et al., 2007; KANG, et al., 2012; SILVA et al., 2014), mas também pode estar relacionado com a prevenção de doenças (CASTREJÓN et al., 2008; PAZ et al., 2015), levando o consumidor a optar cada vez mais por alimentos mais saudáveis (SWIECA, 2015). As frutas podem ser uma opção frente a essas questões, por serem fontes naturais de antioxidantes como as vitaminas (OLIVEIRA et al., 2011; LEONG; OEY, 2012), carotenoides (SOUZA et al., 2014; VALDIVIELSO et al., 2015) e compostos fenólicos (KUSKOSKI et al., 2006; KANG et al., 2012; PAZ et al., 2015) com expressiva atividade antioxidante (CASTREJÓN et al., 2008; KOCA; KARADENIZ, 2009; KANG et al., 2012). A ação antioxidante desses compostos pode atuar em diferentes estágios no processo de oxidação, diminuindo a concentração de radicais livres, quelando íons e até mesmo decompondo produtos primários e levando à compostos não radicalares (BRAVO, 1998; SOARES, 2002) que auxiliam o equilíbrio do sistema imunológico (SIES; STAHL, 1995).

O açaí e o mirtilo se destacam principalmente pela presença de pigmentos com origem antociânica (SU; CHIEN, 2007; KANG et al., 2011; RODRIGUES et al., 2011; GORDON et al., 2012). Além das antocianinas, o mirtilo é uma excelente fonte de quercetina, campeferol, miricetina, procianidinas, catequina, epicatequina, resveratrol e vitamina C, que contribuem para a atividade antioxidante e benefícios à saúde das pessoas (RODRIGUES et al., 2011; NORBERTO et al., 2013). O açaí da Amazônia é amplamente conhecido no Brasil, mas já faz parte do hábito alimentar da grande maioria da população mundial pelas suas propriedades farmacológicas e medicinais, como, atividade anticarcinogênica (PORTINHO; ZIMMERMANN; BRUCK, 2012), anti-inflamatória (FAVACHO et al., 2011; KANG et al., 2012) e antimicrobiana (BELDA-GALBIS et al., 2015). O açaí da Amazônia, além de suas qualidades nutricionais tem grande importância para o desenvolvimento da região amazônica (GORDON et al., 2012).

O *goji berry,* fruta originada de países asiáticos, como China e Tibet, é utilizada há muitos anos na fitoterapia (LI; LI; ZHOU, 2007). Esta fruta é um alimento funcional de grande importância para a região, especialmente para China, porém tem se tornado cada vez mais conhecida na Europa e América de Norte (LI, LI, & ZHOU,

2007; DONG et al., 2009). O *goji berry* ganhou destaque nos últimos anos na comunidade científica por apresentar atividade anti-inflamatória (POTTERAT, 2010; WANG et al., 2010) e diversos benefícios a saúde, incluindo os efeitos sobre o envelhecimento, neuroproteção, como estimulador do metabolismo humano, controle da glicose em diabéticos, controle de glaucomas, e por apresentar propriedades antioxidantes e atividade antitumoral (AMAGASE; FARNSWORTH, 2011; DONNO et al., 2014).

Englobar compostos bioativos à produtos já existentes no mercado pode ser uma excelente alternativa para o aumento de produtos que contenham em sua composição propriedades funcionais (PRUDENCIO et al., 2008; SAITO, 2014). O queijo *petit suisse* é um produto obtido pela coagulação do leite, porém a alta quantidade de aditivos sintéticos como corantes e conservantes, tem prejudicado a qualidade nutricional do produto (CARDARELLI et al., 2008; BOATTO et al., 2010).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência dos fatores: tempo, temperatura e natureza de solventes na extração de compostos bioativos, por MSR, bem como avaliar o perfil cromatográfico desta classe de compostos, atividade antioxidante e antibacteriana, e elaborar um queijo *petit suisse* com aplicação de seus extratos, e posterior avaliação de parâmetros físico-químicos, microbiológicos e sensoriais.

#### 2 OBJETIVOS

#### 2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo definir a melhor metodologia de extração dos compostos fenólicos, em polpa de açaí, mirtilo e *goji berry*, com atividade antioxidante para aplicação dos extratos liofilizados em queijo *petit suiss*e, avaliando as propriedades físico químicas, oxidativas e sensoriais do produto.

#### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a composição centesimal das amostras mirtilo, polpa de açaí e goji berry;
- Otimizar o método de extração dos compostos fenólicos nos extratos das amostras mirtilo, polpa de açaí e goji berry;
- Determinar o teor de antocianinas totais na melhor condição de extração de compostos antioxidantes nas amostras mirtilo, polpa de açaí e goji berry;
- Identificar e quantificar compostos fenólicos nos extratos por Cromatografia
   Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Avaliar o perfil espectral de carotenoides por varredura em espectrofotômetro
   UV-Vis de extrato etéreo em mirtilo, polpa de açaí e goji berry.
- Avaliar as propriedades antioxidantes pelo método de sequestro do radical livre DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidrazina) e ABTS° (2,2'azino-bis-(3etilbenzotiazolina-6-acido sulfônico)), auto-oxidação do sistema βcaroteno/ácido linoleico e método da redução do Ferro (FRAP - Ferric Reducing Antioxidant Power) em extratos das amostras extraídas na melhor condição de extração determinada pela MSR.
- Determinar a atividade antibacteriana pelos métodos de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) nos extratos de mirtilo, polpa de açaí e goji berry;

- Elaborar um queijo *petit suisse* enriquecido com extratos de compostos fenólicos liofilizados de mirtilo, polpa de açaí e *goji berry*;
- Avaliar a oxidação lipídica e a coloração do queijo petit suisse em diferentes tempos de armazenamento;
- Verificar os parâmetros microbiológicos e físico-químicos do queijo petit suisse segundo legislação vigente.
- Avaliar a aceitação sensorial do queijo petit suisse.

#### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 CONSUMO DE FRUTAS

A dieta pouco saudável dos brasileiros tem sido um dos fatores mais importantes para ocorrência de problemas de saúde (SAMUELSON, 2004). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) o recomendado de ingestão diária de frutas e hortaliças é de 400 g, porém estudos tem demonstrado que apenas 12,8 % dos brasileiros ingerem esta quantidade recomendada. Pode-se dizer que essa porcentagem é pequena, visto que o Brasil é o terceiro maior produtor de frutas do mundo, ficando apenas atrás da Índia e China (BRASIL, 2014).

Sendo assim, o consumo de frutas não é apenas um resultado de sabor e preferência pessoal, mas sim uma preocupação de saúde devido ao alto conteúdo de nutrientes. Além de micronutrientes, tais como minerais, fibras, vitaminas, as frutas também apresentam altos teores de compostos bioativos, que tem sido associados à redução de doenças, tais como, câncer, problemas cardiovasculares e cataratas. Portanto, a identificação e quantificação de fitoquímicos em frutas, polpas e subprodutos são de extrema importância para fundamentar seus benefícios à saúde (CLERICI; CARVALHO-SILVA, 2011; SILVA et al., 2014).

## 3.2 AÇAÍ

O açaí tem se destacado, como uma das frutas mais consumidas e exportadas no Brasil, ganhou importância devido seus benefícios à saúde, associados à sua composição química e a capacidade antioxidante (PORTINHO; ZIMMERMANN; BRUCK, 2012).

O açaizeiro (Figura 1) é uma palmeira nativa da Amazônia pertencente à família *Arecaceae* e ocorre naturalmente nos estados do Pará, Amazonas, Maranhão, Amapá e nos países como Colômbia, Equador, Guianas, Venezuela e atualmente é cultivado em diversos estados brasileiros (OLIVEIRA et al., 2002)



**Figura 1 - Açaizeiro** Fonte: Carvalho (2011).

No Brasil as espécies nativas mais importantes de açaizeiro são *Euterpe* oleracea, *Euterpe edulis* e *Euterpe precatoria*. Todas essas espécies se destacam no setor agroindustrial como a principal fonte de extração de palmito através do caule e pela utilização de seus frutos, o açaí (OLIVEIRA; CARVALHO; NASCIMENTO, 2000).

A palavra açaí é de origem tupi – *ya-çai* – que significa fruto que chora, pelo fato de que durante o processo de extração da polpa, esta flui lentamente. Embora a terminologia vulgar seja mais conhecida como açaí, outras denominações são de uso frequente, como açaí do pará, açaí do baixo amazonas, açaí de touceira, açaí de planta, juçara, juçara de touceira, entre outras (KANG et al., 2012).

O açaí é uma drupa globosa (fruto carnoso com uma única semente) variando de 1 a 2 cm de diâmetro e peso médio de 1,5 g (Figura 2). O epicarpo na maturação apresenta cor roxa ou verde, sendo chamado de açaí roxo e açaí branco, respectivamente. O mesocarpo é uma polpa oleaginosa e comestível, e a semente possui o endocarpo volumoso, duro e fibroso. Quando completamente maduro é recoberto por uma capa branco-acinzentada (FAVACHO et al., 2011).



Figura 2 - Açaí Fonte: Martins (2013).

A floração e frutificação do açaí ocorrem durante todo o ano, porém com maior frequência, nos períodos de janeiro a maio e setembro a dezembro, respectivamente. Em relação ao clima, é necessário que seja quente e úmido, com pequenas amplitudes térmicas, com temperatura mínima de 22 °C e umidade relativa do ar variando entre 71% e 91% (ALVES; COHEN, 2006).

O fruto do açaizeiro normalmente só é consumido após seu processamento, devido ao rendimento escasso da parte comestível e sabor relativamente insípido (SANTOS et al., 2008). Sua polpa é o principal subproduto, entretanto, dependendo da quantidade de água utilizada no processo de extração é classificada, segundo as normas do Ministério da Agricultura e do Abastecimento (OLIVEIRA et al., 2002) como:

- a) Açaí grosso ou especial, quando apresenta teor de sólidos totais superior a 14%;
- b) Açaí médio ou regular, quando apresenta teor de sólidos totais entre 11% e 14%;
- c) Açaí fino ou popular é o produto com teor de sólidos totais entre 8% e 11%.

Quando o despolpamento é efetuado sem a adição de água, obtém-se a polpa integral de açaí, que deve conter, no mínimo, 40 % de sólidos totais (OLIVEIRA et al., 2002). Essa forma de obtenção do produto é raramente encontrada no comércio e visa basicamente o atendimento de mercados distantes devido aos maiores custos de congelamento e de transporte. No entanto, todas as despolpadoras disponíveis no mercado necessitam de água para que se processe com eficiência (ALVES; COHEN, 2006).

O açaí, principalmente pelo seu alto valor energético vem sendo considerado na atualidade como superfruta, principalmente pelo elevado teor de lipídios, como os ácidos graxos essenciais Ômega 6 e Ômega 9, carboidratos, fibras, vitaminas E,

proteínas e minerais como manganês, ferro, zinco, cobre e cromo (FAVACHO et al., 2011).

Os polifenóis são outra classe de compostos presentes no açaí, merecem destaque as antocianinas, responsáveis pela forte atividade antioxidante envolvendo a eliminação direta ou extinção de radicais livres, bem como, a inibição de enzimas oxidativas que geram essas espécies reativas de oxigênio (KANG et al., 2011).

#### 3.3 MIRTILO

O Mirtilo (Vaccinium), também conhecido como Blueberry, é pertencente à família Ericaceae, subfamília Vaccinoideae e gênero Vaccinium; é nativo de várias regiões da Europa e dos Estados Unidos (FACHINELLO, 2008; NORBERTO et al., 2013). No Brasil, a sua introdução foi realizada no ano de 1983, através de uma coleção de plantas trazidas pela Embrapa Clima Temperado (Pelotas-RS) do grupo Rabbiteye, realizada pelo pesquisador Alverides Machado dos Santos, e a primeira iniciativa comercial no País deu-se a partir de 1990, em Vacaria (RS) (HOFFMANN, 2014).

Diversas variedades de mirtilo podem ser encontradas, entretanto, as variedades "Highbush" doméstico (Vaccinium corymbosium), "Lowbush" (Vaccinium angustifolium), "Rabbiteye" (Vaccinium ashei) e Mirtilo nativo europeu (Vaccinium myrtillus) são as mais conhecidas. A principal diferença entre essas variedades é o tamanho dos arbustos (WANG et al., 2012; NORBERTO et al., 2013).

O Rio Grande do Sul é apontado como o estado com maior número de produtores rurais de mirtilo e o estado de São Paulo como o maior consumidor dessa fruta (FACHINELLO, 2008).

Para o cultivo é necessário solo ácido (pH 4,0 a 5,2), com alto teor de matéria orgânica (superior a 5 %), boa retenção de umidade e drenagem. A temperatura ideal é com temperaturas menores ou iguais a 7,2 °C, conforme a espécie e a cultivar. O fruto é uma baga de cor azul-escura, de formato achatado, com aproximadamente 1 a 2,5 cm de diâmetro e 1,5 a 4 g de peso (Figura 3) (FACHINELLO, 2008; PERTUZATTI et al., 2014).



Figura 3 - Árvore frutífera de mirtilo (esquerda); Fruto mirtilo (direta). Fonte: Antunes, (2007).

O mirtilo é um fruto constituído por mais de 80% de água, açúcares, principalmente glicose e frutose, compostos orgânicos, como o ácido cítrico e o ácido málico, vitaminas A e C e minerais (manganês, potássio e ferro) encontrados também em maior quantidade (WANG; CAMP; EHLENFELDT, 2012).

Pode ser classificado como uma das frutas mais ricas em antioxidantes e tem chamado atenção pela elevada concentração de antocianinas e outros compostos fenólicos tanto na casca quanto em sua polpa (SOUZA, 2013; DENG et al., 2014).

#### 3.4 GOJI BERRY

O *goji berry*, é o nome dado ao fruto da planta *Lycium barbarum*, pertencente a família *Solanaceae*, sendo encontrada naturalmente na China, Tibet e outras partes da Ásia. Diversas espécies de *Lycium* são encontradas, porém existe ainda uma dificuldade para identificação de cada espécie, sendo utilizada a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier como uma técnica para identificação (DONG et al., 2009; POTTERAT, 2010).

A planta *Lycium barbarum* cresce até 3 m de altura, suas bagas tem 1 a 2 cm de comprimento, são brilhantes e apresentam coloração vermelho-alaranjado (Figura 4). Os frutos são colhidos no verão e outono e secos a sombra até que a pele se contraia. Após essa pré-secagem os frutos são expostos ao sol tornando-o seco, porém sua polpa ainda é mole (POTTERAT, 2010; AMAGASE; FARNSWORTH, 2011).



**Figura 4 -** *Goji berry* Fonte: Amagase; Farnsworth, (2011).

As propriedades medicinais presentes em *goji berry*, são oferecidas principalmente pelo elevado teor de polissacarídeos com atividades farmacológicas já comprovadas. Essas características têm tornado o *goji berry* conhecido atualmente por pessoas do mundo todo (AMAGASE; FARNSWORTH, 2011). Os principais carotenoides, esses responsáveis pela cor característica das bagas (vermelho-alaranjado) presentes em altas concentrações, são a zeaxantina, a beta-criptoxantina e o beta-caroteno. Compostos fenólicos também já foram identificados tanto nas bagas como nas folhas da planta. Nas bagas, a quercetina é o flavonoide de maior destaque, enquanto que nas folhas a rutina está presente em maior quantidade. Minerais como, potássio, cálcio, zinco, ferro, cobalto e magnésio também são encontrados (LI; LI; ZHOU, 2007; WANG et al., 2010).

O *goji berry* desempenha um papel importante na medicina tradicional chinesa, principalmente por melhorar o sistema imunológico, ajudar a visão, proteger o fígado e melhorar a circulação do sistema circulatório em humanos (WANG et al., 2010). O fruto é isento de toxicidade e diversos pesquisadores vêm estudando o fruto, caule e raiz de *goji berry* e desenvolvendo procedimentos para seu controle de qualidade (AMAGASE; FARNSWORTH, 2011).

#### 3.5 ALIMENTOS FUNCIONAIS

Na década de 80, o Japão lançou o termo "alimentos funcionais", com objetivo de se desenvolver alimentos mais saudáveis, que consistiam na adição de determinados compostos bioativos em alimentos que contenham pouca ou nenhuma quantidade, para assim melhorar o envelhecimento da população. Porém, o

significado de alimentos funcionais se torna abrangente e discutido por diversos autores (SIBBEL, 2007; ZERAIK et al., 2010; HENRY, 2010).

Henry (2010) sugeriu três grupos que podem ser considerados como alimentos funcionais, o primeiro podem ser considerados todos os alimentos que contenham em sua composição compostos bioativos, também os alimentos que tenham sido modificados, podendo ser enriquecidos com tais compostos e por fim os ingredientes alimentares sintetizados. Sendo assim, um alimentos funcional pode ser natural, modificado com a adição ou remoção de algum composto, alimentos onde um ou mais compostos foram modificados, um alimento que a biodisponibilidade foi alterada ou qualquer combinação das citadas acima.

Diversos estudos estão sendo realizados e produtos elaborados com a finalidade de se ter alimentos funcionais. Paz et al., (2015) estudou 8 polpas de frutas tropicais no Brasil, relacionando suas atividades antioxidantes e antimicrobianas, enquanto Ramful et al., (2010) estudaram 21 variedades de frutas cítricas para a elaboração de produtos funcionais. Kazeem e Davies, (2015) desenvolveram um estudo relacionando diversas frutas que podem ter ação frente a secreção de insulina para melhor tratamento da diabetes, para que com as informações fornecidas incentivem futuras pesquisas com o objetivo de isolar os componentes ativos para ingredientes funcionais de alimentos.

#### 3.6 COMPOSTOS BIOATIVOS

Nos vegetais existe a presença de dois tipos de metabólitos, primários e secundários. Os metabólitos primários participam de processos de fotossíntese, respiração e assimilação de nutrientes, zelando então pela sobrevivência do vegetal. Os metabólitos secundários, por sua vez, são comumente chamados de fitoquímicos, e estão associados à estratégias de defesa das plantas, além disso, apresentam alta atividade biológica (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996; SILVA et al., 2010).

Os compostos fenólicos possuem ao menos um grupo hidroxila ligado ao anel aromático e podem variar de moléculas simples tais como os ácidos fenólicos (Figura 5a), para compostos altamente polimerizados, tais como taninos (Figura 5b). Essa classe de compostos apresenta mais de 8.000 substâncias já descritas e sua

classificação é realizada conforme sua estrutura, número e posição dos seus grupos hidroxilas e outros grupos substituintes (BRAVO, 1998).

Figura 5 - Ácido fenólico (a) e Ácido tânico (b) Fonte: Bravo, (1998).

Diversas são as formas antioxidantes que os compostos fenólicos podem atuar, entre elas estão, agentes redutores, sequestrantes de radicais livres, quelantes de metais e desativadores do oxigênio singlete. Esses compostos também desempenham um importante papel na natureza, auxiliando na maturação dos frutos, proteção contra bactérias e insetos e também no desenvolvimento sensorial como a cor e sabor dos alimentos (PAZ et al., 2015).

Na natureza os compostos são encontrados na forma de ésteres ou heterosídeos, sendo então solúveis em água e solventes orgânicos (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996). Porém, nos animais existe uma maior dificuldade para sintetizar esses compostos, já que são incapazes de sintetizar o anel aromático, assim a síntese dos compostos fenólicos é feita apenas com os anéis aromáticos ingeridos pela alimentação (SIMÕES et al., 2001 *apud* CARPES, 2008).

Podem-se destacar duas classes principais de fenólicos, os ácidos fenólicos e os flavonoides. Os ácidos fenólicos se dividem em três principais grupos principais, os ácidos benzoicos, ácidos cinâmicos e cumarinas (Figura 6). A variedade desses compostos é devido ao extenso número de grupos funcionais que podem ser ligados à cadeia principal (SOARES, 2002).

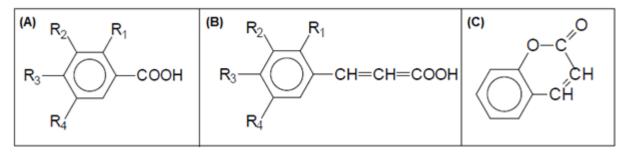


Figura 6 - Estrutura básica de ácidos fenólicos: (A) benzoico, (B) cinâmicos e (C) cumarinas. Fonte: Soares, (2002).

Os flavonoides possuem como estrutura básica C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (Figura 7) e fazem parte de uma das classes mais diversificadas do reino vegetal. Nesse grupo as classes mais comuns são as flavonas, flavononas, flavonolóis, isoflavonas, flavanois e antocianinas (DAMODORAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

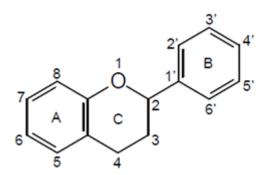


Figura 7 - Estrutura básica de flavonoides

Fonte: Bravo, (1998)

Diversos autores vêm estudando a composição fenólica em produtos naturais, como frutas, plantas, subprodutos e resíduos. Prado (2009) estudou a composição fenólica de frutas como acerola, abacaxi, manga, maracujá, goiaba, pitanga e demonstrou que todas estas frutas apresentaram boa atividade antioxidante podendo ser excelentes fontes naturais de antioxidantes em alimentos. Autores como Pertuzatti (2009), Reque (2012), Jesus (2013), Souza (2013), estudaram a atividade antioxidante do mirtilo e outras pequenas frutas vermelhas, confirmando a elevada concentração de compostos fenólicos e antocianinas totais, juntamente com a presença de carotenoides.

Melo et al. (2008), avaliaram o potencial antioxidante de polpas congeladas de abacaxi, acerola, cajá, caju, ciriguela, goiaba, graviola, manga, maracujá, pitanga, tangerina e uva, pelos métodos de quantificação de compostos fenólicos e sequestro

do radical DPPH, e tiveram como conclusão que as polpas congeladas de frutas podem ser vistas com uma importante fonte de antioxidante.

Souza et al. (2014) tiveram como objetivo em seus estudos, avaliar a composição química, identificar os compostos fenólicos e verificar a atividade antioxidante presente em pequenos frutos produzidos nas áreas subtropicais do Brasil. As análises foram realizadas por métodos de quantificação de compostos fenólicos, flavonoides, antocianinas, ácido ascórbico e determinação da atividade antioxidante pelos métodos de sequestro dos radicais ABTS e DPPH e também pelo método de inibição da oxidação do sistema beta-caroteno/ácido linoleico. Na maioria das análises a amora-preta foi superior as outras frutas, porém todas apresentaram valores positivos, concluindo que todos frutos podem ser fontes potenciais de antioxidantes naturais.

Santos et al. (2008) caracterizaram polpas comerciais de açaí, correlacionando com a contribuição da vitamina C, carotenoides totais e compostos fenólicos com a atividade antioxidante. Como resultados, os autores demostraram que o açaí pode ser considerado uma importante fonte de vitamina C, bem como uma grande fonte de antioxidantes. Em relação à correlação com a atividade antioxidante, somente as antocianinas totais e os carotenoides totais apresentaram correlação positiva e significativa.

Kuskoski et al. (2006), estudaram algumas propriedades de frutos tropicais silvestres *in natura* e polpas de frutos comercializados congelados, como atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH e quantificação de compostos fenólicos e antocianinas. Neste estudo os autores encontraram em ordem decrescente de capacidade antioxidante das frutas acerola> manga> morango> uva> açaí> goiaba> amora> graviola> maracujá> cupuaçu> abacaxi.

## 3.7 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS

Diversos são os autores que estudam a identificação e quantificação de compostos fenólicos, atividade antioxidante e antimicrobiana em diversos frutos, porém cada autor desempenha suas análises com métodos específicos, tanto de extração como identificação e quantificação. A etapa de extração é a etapa mais

importante em um trabalho de pesquisa, pois os resultados das análises que são realizadas posteriormente à extração, seja de quantificação ou determinação da atividade, são obtidos em função do conteúdo extraído e presente no extrato.

Para a extração, existe uma diversidade de opções, não necessariamente existindo um método ideal para se trabalhar, pois cada amostra tem uma composição distinta e diversificada, podendo um determinado solvente ser adequado em um caso e não em outro. Fatores como solvente, pH, temperatura, número de etapas da extração, volume de solvente e tamanho das partículas das amostras são os que mais se alteram de um trabalho para outro (PRADO, 2009).

Kuskoski et al. (2006) extraiu os compostos bioativos de polpas de frutas de acordo com a indicação para consumo, sendo 100 g para 250 mL de água destilada. Reque (2012) utilizou uma extração utilizando metanol e acetona, seguido de centrifugação, para avaliar a atividade antioxidante, porém para quantificação de antocianinas optou em utilizar uma solução metanólica acidificada com 1 % de HCI.

A extração realizada por Rodrigues et al. (2011), foi realizada apenas com metanol como solvente e deixada em ultrassom por 15 minutos a 20 °C. Após, foi centrifugado por 10 minutos e o sobrenadante utilizado para as análises.

Souza et al. (2014) realizou a extração em duas etapas, utilizando o mesmo procedimento apenas variando os solventes, primeiramente utilizando metanol e depois acetona. As amostras foram deixadas em contato com o solvente durante 1 hora e após centrifugadas durante 15 minutos a 25.400 x g e o sobrenadante foi utilizado para próxima etapa. O sobrenadante final foi utilizado para as análises.

#### 3.8 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Antioxidantes podem ser considerados como aqueles compostos que são capazes de diminuir ou prevenir significativamente a oxidação de outra substância, sendo que este deve ser encontrado em menor quantidade que a substância a ser oxidável. Dente os diversos compostos que podem atuar nessa atividade, podem-se citar os compostos fenólicos, enzimas antioxidantes, ligações de ferro, proteínas transportadoras e outros compostos que afetam o sinal de expressão gênica (BRAVO, 1998; SOARES, 2002).

Os antioxidantes fenólicos atuam normalmente como sequestradores de radicais, pela rápida doação de um átomo de hidrogênio aos radicais lipídicos, podendo agir tanto na fase de iniciação quanto na propagação do processo oxidativo em alimentos (BRAVO, 1998).

Os radicais livres são moléculas altamente reativas e instáveis. Podem ser definidos como moléculas ou átomos que possuem um ou mais elétrons desemparelhados. Essas moléculas encontram-se envolvidas em processos de produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, entre outros. Mas quando em excesso, ocorre um estresse oxidativo alterando funções fisiológicas normais do organismo, como a peroxidação de lipídeos de membrana, a agressão às proteínas, enzimas, carboidratos e DNA, o qual pode contribuir para doenças e envelhecimento, assim a utilização de antioxidantes são fundamentais para que prevenir e/ou diminuir todos os riscos causados por estes radicais livres (LI; LI; ZHOU, 2007; PORTINHO; ZIMMERMANN; BRUCK, 2012).

Além dos diversos problemas a saúde, os radicais livres podem interferir na qualidade sensorial e nutricional de diversos alimentos, por atuarem principalmente na oxidação de matérias facilmente oxidáveis, como óleos e gorduras (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

A defesa antioxidante é realizada por compostos enzimáticos produzidos no organismo, como superóxido dismutase, glutationa peroxidase e catalases, que removem o oxigênio ou compostos altamente reativos e assim protegem as células e os tecidos contra o estresse oxidativo. Outro método de defesa são os compostos não enzimáticos, dentre esses, destacam-se algumas vitaminas, minerais, carotenoides e compostos fenólicos, encontrados principalmente em vegetais e frutas (RAMALHO; JORGE, 2006; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; SILVA et al., 2010).

Indústrias de alimentos utilizam antioxidantes para evitar a deterioração dos produtos, aumentando a vida de prateleira dos mesmos e mantendo o seu valor nutricional, mas também são de grande interesse na área da saúde, pois ajudam na proteção das células e tecidos contra danos oxidativos (WANG; CAMP; EHLENFELDT, 2012). Porém, a indústria acaba optando em utilizar antioxidantes sintéticos pelos custos e maior facilidade, apesar da eficácia desses compostos na ação antioxidante, os mesmos vêm sendo questionados, uma vez que estes compostos podem fornecer efeitos tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (MERCADANTE et al., 2010).

## 3.9 MÉTODOS DE ANÁLISE DOS COMPOSTOS BIOATIVOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

Para a determinação dos teores de compostos fenólicos, antocianinas e avaliação da atividade antioxidante, análises colorimétricas através de leituras em espectrofotômetros podem ser utilizadas.

A quantificação dos compostos fenólicos totais se baseia nas reações de oxiredução entre os compostos fenólicos e íons metálicos. Dois métodos podem ser utilizados para tal objetivo, o método espectrofotométrico de *Folin-Ciocalteu* ou do azul da Prússia modificado. O primeiro utiliza o regente de *Folin-Ciocalteu*, onde em presença de fenóis em meio alcalino reduz o *fosfomolibdato-fosfotungstato*, a molibdênio, resultando em uma coloração azul, onde a intensidade varia dependendo do teor desses compostos. O método azul da Prússia também utiliza a redução de compostos, pelos grupos hidroxi-fenólicos, de íons Fe<sup>+3</sup> a Fe<sup>+2</sup>, formando complexos com ferrocianeto, produzindo pigmentos de coloração azul (SILVA et al., 2010).

A quantificação de antocianinas totais é realizada através do método do pH diferencial. Os pigmentos de antocianina sofrem transformações estruturais reversíveis com uma alteração no pH. A forma oxônio colorido predomina no pH 1,0 e a forma de hemicetal incolor no pH 4,5. O método diferencial de pH baseia-se nesta reação e permite a quantificação precisa e rápida das antocianinas totais (GIUSTI; WROLSTAD, 2000).

As capacidades antioxidantes de amostras como plantas e frutas podem ser influenciadas por muitos fatores, tais como métodos de extração e/ou médodos utilizados para quantificação, portanto é necessário executar diferentes avaliações para avaliar os diversos mecanismos de ação que esses podem desenvolver. A maioria das análises realizadas utiliza processos oxidativos, os quais envolvem a adição de um agente iniciador para acelerar o processo, como temperatura, agitação, disponibilidade de oxigênio, metal de transição ou mesmo exposição à luz (ANTOLOVICH et al., 2002).

Existem quatro passos essenciais que devem ser seguidos ao avaliar a atividade antioxidante de substâncias: a primeira etapa é a quantificação e identificação de compostos fenólicos; a segunda etapa avalia a atividade de sequestro

do radical livre e na terceira etapa deve ser feita a avaliação da habilidade do antioxidante inibir ou retardar a oxidação lipídica. Por fim, a última e quarta etapa depende do objetivo do estudo, podendo ser dividida em (a) e (b). A etapa (a) sugerese a aplicação em alimentos com análises específicas e (b) avaliação dos efeitos antioxidantes da dieta no corpo humano (BECKER et al., 2004).

A atividade antioxidante de sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrihidrazil) pode ser expressa de duas formas, utilizando uma curva padrão com o antioxidante sintético Trolox, composto análogo a vitamina E, porém, solúvel em substâncias polares, ou através de equações para determinação da atividade antioxidante, porém o princípio da reação em ambas às análises é o mesmo (BRAND-WILLIAMS et al.,1995).

O DPPH é um radical de nitrogênio orgânico, estável de cor violeta e possui absorção máxima na faixa de 515-520 nm. Na presença de um doador de hidrogênio, esse radical é reduzido e a intensidade de absorção diminui. Quanto maior a presença de compostos com o poder de doar esse hidrogênio maior é a perda de coloração, transformando a solução de coloração violeta a amarela (Figura 8) (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

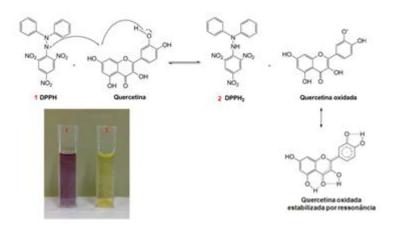


Figura 8 - Reação do radical DPPH frente ao composto fenólico Quercetina. Diferença na coloração entre o início e final da reação, após os radicais serem estabilizados. Fonte: Teixeira; Silva, (2013).

O método ABTS (2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico) determina a atividade antioxidante total pela captura do radical ABTS<sup>-+</sup>. O princípio de reação é semelhante ao método DPPH, porém o radical ABTS<sup>-+</sup> é formado ao início da análise (Figura 9), ao contrário do DPPH<sup>-+</sup> que já é adquirido na sua forma radicalar. A principal diferença entre os dois radicais, é que o radical DPPH é solúvel em

solventes orgânicos, enquanto o ABTS<sup>\*\*</sup> é solúvel tanto em água como em solventes orgânicos, permitindo a análise de amostras tanto hidrofílicas como lipofílicas (RUFINO et al., 2007).

HO<sub>3</sub>S 
$$\longrightarrow$$
 S  $\longrightarrow$  N  $\longrightarrow$ 

Figura 9 - Reação de oxirredução do radical ABTS Fonte: Rufino et al. (2007).

O método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), também está sendo muito utilizado entre as análises antioxidantes por ser uma análise que envolve a redução do Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup>. Essa reação ocorre na presença de 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ) em condições ácidas, onde ocorre a formação de um complexo corado. Assim este complexo férrico-tripiridiltriazina (Fe<sup>III</sup>-TPZ) é reduzido ao complexo ferroso (Fe<sup>II</sup>-TPZ) na presença de um antioxidante (Figura 10) (RUFINO et al., 2006).

**Figura 10 - Redução do complexo Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup>** Fonte: Rufino et al. (2006).

Por fim, o método de descoloramento do β-caroteno/ácido linoleico é avaliado pela adição de uma amostra que contenha compostos antioxidantes que reagem com

o radical peroxil. O resultado é a peroxidação do ácido linoleico devido às condições favoráveis, e assim previne que esse radical abstraia o hidrogênio da molécula instaurada do β-caroteno, contribuindo para retardar o decaimento da coloração do β-caroteno, consequentemente se defendendo contra o ataque dos radicais livres. Sendo assim, quanto menor for a queda de coloração maior será a atividade antioxidante da amostra analisada (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

#### 3.10 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A resistência dos microrganismos frente a agentes antibacterianos tem se tornado um problema global. Em resposta a essa resistência, a procura por novos compostos com propriedades antibacterianas tem chamado a atenção das principais indústrias farmacêuticas, juntamente com estudos em Universidades para isolar e identificar esses compostos (CABRAL, 2008).

Os estudos relacionados a identificação e isolamento de compostos com atividades antimicrobianas tiveram início na década de 1940, onde o pesquisador Osborn, avaliou a atividade de 2300 plantas contra bactérias como *Staphylococcus* aureus e *Escherichia coli* (OSBORN, 1943).

Muitos compostos fenólicos podem possuir esta ação antimicrobiana, que está principalmente relacionada à inativação das enzimas celulares, além de mudanças na permeabilidade das membranas celulares (SHEN et al., 2014; BELDA-GALBIS et al., 2015).

Estudos recentes também vêm destacando a atividade antimicrobiana de produtos naturais. Cabral (2008) teve como objetivo fracionar e isolar compostos com atividade antibacteriana da própolis vermelha brasileira, demostrando sua atividade antibacteriana tornando a própolis vermelha uma importante fonte de agentes antibacterianos naturais. Deng et al. (2014) analisou a atividade antimicrobiana de extratos de folhas de mirtilo colhidos em três estágios de maturação da fruta (imaturo, semi-maduros, e maduro), utilizando dois tipos de bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*), duas gram-negativas (*Salmonella Typhimurium* e *Escherichia coli*) e o fungo *Monilina Vaccinii-corybosi*. Os extratos utilizados tiveram ação antimicrobiana em todos as bactérias e fungos testados.

Sampaio et al. (2009), Mariem et al. (2014) e Belda-Galbis et al. (2015), também estudaram a atividade antimicrobiana de produtos naturais tais como açaí e mirtilo e bioensaios contra bactérias gram-positivas e negativas. Seus resultados mostraram o efeito inibidor contra o crescimentos de diversas bactérias testadas como, por exemplo, *S. typhimurium*, *B. thuringiensis* e *K. pneumoniae*.

#### 3.11 QUEIJO PETIT SUISSE

"Petit Suisse", um tipo de queijo francês, apresenta consistência de creme, muito macio e normalmente sabor doce. No Brasil, o produto é consumido como sobremesa e as vendas são direcionadas principalmente para as crianças (PRUDENCIO et al., 2008).

O queijo *petit suisse* é caracterizado como queijo fresco, não maturado, obtido por coagulação do leite com coalho e/ou de enzimas específicas e/ou de bactérias específicas, adicionado ou não de outras substâncias alimentícias. É um queijo de altíssima umidade, a ser consumido fresco, podendo ser adicionado no máximo 30% (m/m) de ingredientes não lácteos, sendo assim classificado como queijo "*Petit Suisse*" com adições (BRASIL, 2000).

Como ingredientes obrigatórios têm-se o leite e/ou leite reconstituído e bactérias lácteas específicas e/ou coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas. Os ingredientes opcionais são leite concentrado, creme, manteiga, gordura anidra, caseinatos alimentícios, proteínas lácteas, outros sólidos de origem láctea, soros lácteos, concentrados de soros lácteos, ainda pode ser utilizada frutas em forma de pedaços, polpa, suco e outros à base de frutas, além de outras substâncias alimentícias como: mel, cereais, vegetais, frutas secas, chocolate; especiarias, café e outras, sós ou combinadas; açúcares e/ou glicídios (exceto poliálcoois); amidos e gelatina e cloreto de sódio (BRASIL, 2000).

As principais características sensoriais do queijo *petit suisse* são a sua consistência pastosa, branda ou "mole" de coloração branca ou de acordo com as substâncias a ser adicionadas. O sabor e odor são próprios do produto ou de acordo com substâncias adicionadas como aromas de frutas. Devido ao alto teor de proteínas lácteas (mínimo 6,0 %) e vitaminas lipossolúveis, cálcio e fósforo o queijo "*Petit*"

Suisse" é considerado um queijo com alto valor nutricional (BRASIL, 2000; PRUDENCIO et al., 2008). O queijo necessita ser envasado em materiais adequados e conservado e comercializado à temperatura não superior a 10 °C (BRASIL, 2000).

Devido ao uso de corantes artificiais nesse tipo de produto e por serem destinados principalmente às crianças, existe a possibilidade de ocorrer alergias alimentares (PRUDENCIO et al., 2008). Sendo assim, a procura por compostos naturais que substituam esses compostos, pode ser uma alternativa ideal para uma alimentação mais saudável e sem riscos à saúde.

Saito (2014) teve como objetivo o estudo da avaliação do efeito da adição de prebióticos (inulina e oligofrutose) e corante natural (extrato de casca de jabuticaba) nas características de queijo petit suisse. Prudencio et al. (2008) elaboraram queijos petit suisse com e sem soro de queijo retido e avaliaram as características físico-químicas e a estabilidade dos extratos adicionados de antocianinas provenientes da uva e beterraba vermelha.

# **4 MATERIAS E MÉTODOS**

As etapas referentes ao desenvolvimento do projeto de estudo estão descritas

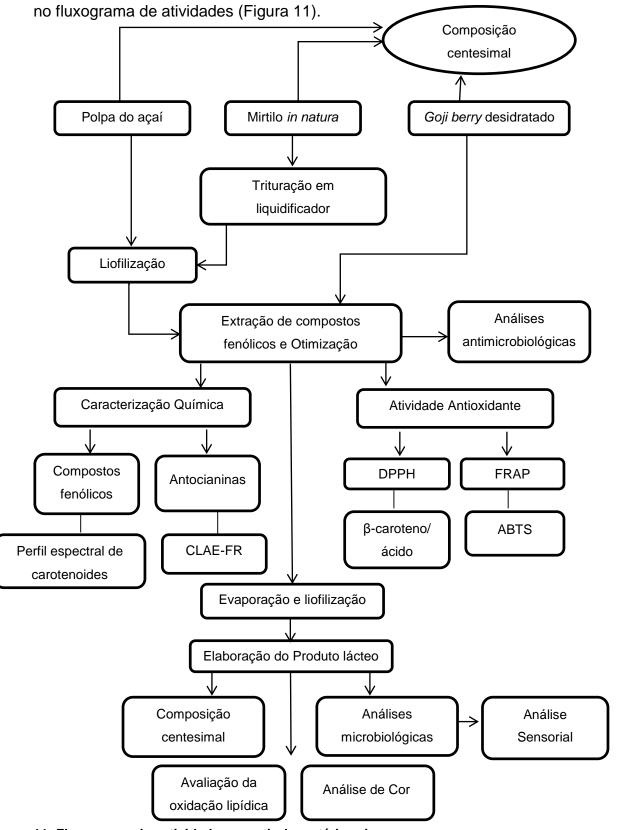


Figura 11: Fluxograma das atividades a partir da matéria-prima

#### 4.1 MATERIAIS

As amostras foram obtidas no Mercado Municipal de Curitiba - PR e transportadas em caixas de isopor com gelo para o laboratório de Bromatologia na UTFPR, campus Pato Branco - PR. A escolha dos cultivares foi conforme a disponibilidade no mercado de cada uma das frutas, bem como a sua forma de consumo. O açaí na forma de polpa especial e o mirtilo *in natura* foram adquiridos na forma congelada, enquanto o *goji berry* na sua forma desidratada.

O *goji berry* e o mirtilo foram submetidos a trituração em liquidificador para homogeneização da amostra. O mirtilo após trituração e a polpa de açaí foram liofilizados em Liofilizador (Liotop - L1019, São Paulo, Brasil). As três amostras após serem processadas, foram embaladas em plásticos devidamente selados e armazenadas em freezer à - 5 °C.

## 4.2 MÉTODOS

# 4.2.1 Caracterização Físico-Química

Para a caracterização físico-química, foi utilizado a polpa de açaí, o mirtilo *in natura* e o *goji berry* desidratado. A caracterização físico-química do produto (*petit suisse*) seguiu a mesma metodologia realizada com as amostras, diferindo apenas em relação a açúcares totais que foram quantificados por diferença. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

As análises de umidade, cinzas, lipídios totais, proteína, açúcares totais, redutores e não redutores foram realizados a partir de metodologias reconhecidas e preconizadas pelo Instituto Adolfo Lutz (2008).

As fibras foram quantificadas utilizando do kit de ensaio para fibras dietéticas totais (Total dietary fiber assay Kit – Sigma Aldrich - Código TDF –100A). Inicialmente as amostras foram desengorduras, desidratadas e adicionadas juntamente com tampão fosfato e α-amilase, incubadas em banho-maria por 15 min a 95 °C e logo

após resfriadas. Após esse processo o pH foi ajustado (pH 7,5) e adicionado protease, incubado em banho-maria por 30 min a 60 °C, resfriado e ajustado o pH novamente (pH 4,5), a amiloglucosidase foi adicionada e seguido a mesmo procedimento anterior. Por fim, 150 mL de etanol 95% foram adicionado para precipitação e colocado em repouso à temperatura ambiente por aproximadamente 12 horas.

Após a precipitação, foi realizada a filtração em cadinho ambientado com celite e utilizado etanol 78%, 95% e acetona para eliminação de todos os interferentes. Os cadinhos foram secos em estufa a 105 °C e após incinerados a 525 °C por 5 horas. Cadinhos apenas secos em estufas foram utilizados para quantificação de proteínas. A quantificação de fibras dietéticas totais foi calculada pela equação 1:

$$\% FDT = \left[ \frac{R_{amostra} - P_{amostra} - A_{amostra} - B}{Sw} \right] x 100$$
 (1)

Onde, R é a média dos pesos dos resíduos calculados pela diferença entre o peso dos cadinhos secos em estufas e o peso do cadinho preparado com celite, P é o peso médio de proteínas, A é a média do peso incinerado calculado pela diferença entre o peso do cadinho incinerado e o peso do cadinho preparado com celite, B é o branco e Sw é o peso médio das amostras.

## 4.2.2 Perfil espectral de carotenoides

A avaliação de carotenoides totais foi realizada conforme Porcu; Rodriguez-Amaya (2004). Inicialmente, as amostras desidradatas foram maceradas com celite e acetona gelada, em seguida realizada a filtração à vácuo. Esse processo foi repetido até que a solução filtrada não apresentasse coloração. O extrato cetônico extraído da filtração foi adicionado em funil de decantação, juntamente com água, éter de petróleo e éter etílico, até que toda transferência dos pigmentos seja transferida para o extrato etéreo. Para retirar toda água presente do extrato, sulfato de sódio anidro foi adicionado ao extrato etéreo e transferido para um balão volumétrico. A medida da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Evolution 60s – Thermo Scientific, Massachusetts, EUA), no intervalo de comprimento de onda de 300 a 600 nm, com

intervalo de 10 nm. O teor de carotenoides foi obtido pela equação 2 e expressos em µg/g de amostra.

Carotenoides totais 
$$(\mu g/g) = \frac{Am\acute{a}x \ x \ 10^4 \ x \ V}{\varepsilon \frac{1\%}{1cm} \ x \ m}$$
 (2)

onde, Amáx é a absorbância máxima obtida do perfil espectral, V é o volume do balão volumétrico adicionado,  $\varepsilon \frac{1\%}{1cm}$  é coeficiente de absorção e m é a massa utilizada da amostra.

## 4.2.3 Extração e delineamento fatorial

Foi utilizado delineamento fatorial 2³, totalizando-se 8 corridas em triplicata (Tabela 1), para verificar os efeitos das variáveis como solvente (água e etanol), tempo (30 e 60 min) e temperatura (30 e 60 °C) de extração sobre o teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante. As variáveis independentes foram X1 o solvente, variável X2 o tempo de extração (min) e a variável X3 a temperatura de extração (°C) (Tabela 2), enquanto as variáveis dependentes utilizadas foram atividade antioxidante através do método do sequestro do radical DPPH e a quantificação de compostos fenólicos.

Tabela 1 - Planejamento Fatorial 2<sup>3</sup> para extração de compostos antioxidantes em polpa de açaí, mirtilo e *goji berry*.

Ensaios	Solvente	Tempo	Temperatura
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1

Tabela 2 - Condições e Variáveis utilizadas para extração de compostos antioxidantes em polpa de açaí, mirtilo e *goji berry.* 

Variável		ariável (-1)	
X1	Solvente	Água pura	Etanol 80 %
X2	Tempo	30 min	60 min
Х3	Temperatura	30 °C	60 °C

A extração dos compostos antioxidantes foi realizada conforme Prado (2009), com pequenas modificações. Os solventes selecionados para o estudo de otimização foram o etanol 80 % (v/v) e a água. A escolha do solvente se deve principalmente a facilidade de manipulação, à baixa toxicidade e à necessidade de aplicação em alimentos. Para a extração, 3 g das amostras liofilizadas foram transferidas para erlenmeyers e adicionados 30 mL dos solventes separadamente e submetidos a agitação em *Shaker* (SL 222, Piracicaba, Brasil) à 200 rpm segundo o delineamento experimental demonstrado na Tabela 1. Em seguida, os extratos foram transferidos para tubo *Falcon* e centrifugados a 6000 rpm (*Hermle* Z 200 A) durante 15 minutos. Na sequência os extratos foram filtrados e armazenados em frascos hermeticamente fechados, sob abrigo de luz e em *freezer* a - 5 °C para posterior análise. Cada extração foi realizada em triplicata, totalizando 24 ensaios para cada fruta.

## 4.2.4 Teor de Compostos fenólicos

A determinação de compostos fenólicos foi realizada em triplicata de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocateau, descrito por Singleton et al. (1999). Os respectivos extratos foram transferidos para tubos de ensaio e adicionados 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocateau (1:10). Após 5 minutos de repouso da mistura, foram adicionados 2,0 mL de uma solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 4%. As soluções foram incubadas em local escuro, à temperatura ambiente e após 2 horas, foi realizada a leitura da absorbância à 740nm. O padrão utilizado para curva padrão foi o ácido gálico e os resultados expressos em mg equivalente em ácido gálico (EAG) /g de amostra.

#### 4.2.5 Teor de Antocianinas totais

As antocianinas foram determinadas pelo método descrito pela AOAC (2005), através da diferença de pH. A reação ocorreu transferindo 0,5 mL de amostra para tubo de ensaio contendo 2,0 mL de solução tampão cloreto de potássio (pH 1,0) e uma alíquota de 0,5 mL de amostra para outro tubo de ensaio contendo 2,0 mL de solução tampão acetato de sódio (pH 4,5). Após 20 minutos realizou-se a leitura das absorbâncias das amostras dos dois tampões nos comprimentos de onda 520 e 700 nm em espectrofotômetro Bel Photonics (Modelo 2000 UV, Osasco, Brasil). Os ensaios foram realizados em triplicata.

Os resultados foram expressos em mg/100g e calculados pela equação a seguir.

Antocianinas 
$$\left(\frac{mg}{100g}\right) = \frac{A \times MW \times DF \times 10^3}{\varepsilon \times 1}$$
 (3)

Onde, MW é o peso molecular para a cianidina-3-glicosídio (449,2 g/mol); DF a diluição da amostra; ε = absortividade molar da cianidina-3-glicosídio (26900 L/mol.cm); 10³ = fator de conversão de g para mg; A é representado na equação 4, que segue abaixo:

$$A = (Abs 520 - Abs 700) pH 1,0 - (Abs 520 - Abs 700) pH 4,5$$
 (4)

#### 4.2.6 Atividade Antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada por métodos distintos descritos a seguir para as amostras polpa de açaí, mirtilo, *goji berry* e para o antioxidante sintético eritorbato de sódio.

## 4.2.6.1 Atividade de sequestro do radical DPPH•

A medida da atividade sequestrante do radical DPPH foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Brand-Williams et al. (1995). Para avaliação da atividade antioxidante os extratos foram reagidos com o radical estável DPPH em uma solução de etanol. Na forma de radical, o DPPH• possui uma absorção característica a 517 nm. A mistura de reação foi constituída da adição das amostras, etanol anidro e a solução alcoólica do radical DPPH 0,3 mM. Os resultados foram expressos em duas maneiras distintas, uma através do EC50 que é a quantidade de antioxidante necessária para reduzir a concentração inicial do radical DPPH em 50% e expressa também em µmol de trolox / g de amostra. A primeira é realizada com uma curva cinética, avaliando o tempo de estabilização do radical DPPH e a porcentagem de atividade antioxidante (%AA) calculada a partir da equação 5. Já a segunda é realizada através da curva padrão utilizando o antioxidante trolox como padrão e com tempo de reação de 30 min. Os ensaios foram realizados em triplicata.

$$\% AA = 100 - \left[ \frac{\left( Abs(amostra) - Abs(branco) \right) x \ 100}{Abs(controle)} \right]$$
 (5)

4.2.6.2 Atividade antioxidante pela oxidação acoplada do beta-caroteno e ácido linoleico

A medida da atividade antioxidante foi determinada pela oxidação acoplada do β-caroteno e do ácido linoleico, de acordo com Ahn et al. (2004). Uma solução de β-caroteno foi preparada em clorofórmio, e 3 mL desta solução foi homogeneizada com 40 mg de ácido linoleico e 400 mg de Tween 40 e em seguida, o clorofórmio foi removido com a utilização de uma corrente de gás nitrogênio, e o resíduo obtido redissolvido em 100 mL de água aerada por 30 min. Alíquotas da emulsão β-caroteno/ácido linoleico foram misturadas com os extratos e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 470 nm, no tempo inicial e em intervalos de 20 minutos durante 2 horas com incubação a 50 °C, para a reação de oxidação. A amostra controle foi realizada com etanol a 80% e a emulsão preparada anteriormente. Os ensaios foram realizados em triplicata. A atividade antioxidante foi

expressa pela porcentagem de inibição relativa em relação ao controle depois de 120 min de incubação, usando a equação (6):

$$AA(\%) = \frac{DRc - DRs}{DRc \times 100} \tag{6}$$

onde AA representa a atividade antioxidante,  $DR_C$  a taxa de degradação da amostra controle (ln(a/b)/120);  $DR_S$  a taxa de degradação da amostra contento a substância teste (ln(a/b)/120); a a absorbância inicial no tempo 0 e b a absorbância depois de 100 min.

4.2.6.3 Atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro - FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

Para a determinação da atividade antioxidante por meio da redução do ferro (FRAP) foi utilizada a metodologia descrita por Kukic et al. (2008), com pequenas modificações. O reagente FRAP foi preparado no momento da análise, através da mistura de 25 mL de tampão acetato (300 mM, pH 3,6), 2,5 mL de solução TPTZ (10 mM TPTZ em 40 mM HCl) e 2,5 mL de FeCl<sub>3</sub> (20mM) em solução aquosa. Uma alíquota de 100μL dos extratos foram adicionados a 3 mL do reagente FRAP e incubado a 37 °C em banho-maria por 30 minutos. As absorbâncias foram medidas após esse tempo e o espectrofotômetro zerado com a solução FRAP. A curva de calibração foi desenvolvida com sulfato ferroso (200-2000 μM), e os resultados expressos em μmol Fe<sup>2+</sup>/mg. Os ensaios foram realizados em triplicata.

#### 4.2.6.4 Atividade antioxidante frente ao ABTS+

A capacidade de sequestrar o radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-acido sulfônico (ABTS+\*) foi determinada segundo o método descrito por Re et al. (1999). O radical ABTS+\* é gerado a partir da reação da solução aquosa de ABTS+\* (7

μmol) com persulfato de potássio 140 mM. Esta solução foi mantida ao abrigo da luz, em temperatura ambiente por 16 h e em seguida, diluída em etanol até obter, em comprimento de onda de 734 nm, uma medida de absorbância de 0,7 ± 0,05. Os extratos foram adicionados a solução do ABTS+\*, e a absorbância registrada, em comprimento de onda de 734 nm, após 6 minutos de repouso. A capacidade antioxidante da amostra é calculada em relação à atividade do antioxidante sintético Trolox (6- hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico), nas mesmas condições, e os resultados expressos em capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (μmol TEAC/q). Os ensaios foram realizados em triplicata.

# 4.2.7 Identificação e Quantificação de Compostos Fenólicos Individuais

Os extratos preparados na melhor condição do delineamento fatorial, foram rotaevaporados a 40 °C em evaporador rotativo (Fisatom® 802, São Paulo, Brazil) e liofilizados para assim serem ressuspendidos na fase móvel na proporção de 0,1 g em 1,0 mL de acetonitrila:água:ácido acético (40:58:2). Para eliminação de impurezas, a amostra foi adicionada em cartucho Chromafix C18 previamente pré ativado com 4,0 mL de metanol e 4,0 mL de água acidificada (pH 2). Para eliminação dos ácidos orgânicos simples foram adicionados 4,0 mL de água deionizada acidificada e por fim 2,0 mL de metanol ao cartucho para extração de ácidos fenólicos e flavonoides (WANG et al., 2010).

Alíquotas de 10 μL foram injetadas em um cromatógrafo à líquido (Varian, model 920-LC, Walnut Creek, C.A, US) e para separação foi utilizada uma coluna de fase reversa C-18 (Varian, 250 mm × 4.6 mm, 5 μm). Um sistema de gradiente binário foi utilizado para o fracionamento (Tabela 3), o qual foi constituído de fase movel "A" contendo água:ácido acético (98:2) e a fase "B" acetonitrila:água:ácido acético (40:58:2).

A taxa de fluxo da fase móvel foi de 1 mL/min e a temperatura durante a análise foi mantida a 30 °C. Para a detecção dos compostos fenólicos um detector de arranjos de diodos foi utilizado, com comprimentos de onda ajustados para 280 e 360 nm, já o software Galaxie foi utilizado para adquirir e gerar os dados.

Tabela 3 - Gradiente de concentração para eluição dos compostos, constituído de Fase A e Fase B

Tempo	% de Fase A*	% de Fase B**
00 – 02 min	95	5
02 – 15 min	80	20
15 – 25 min	75	25
25 – 32 min	15	85
32 – 36 min	5	95
36 – 45 min	95	5

<sup>\*</sup>Fase A: água:ácido acético (98:2); \*\*Fase B: acetonitrila:água:ácido acético (40:58:2)

As curvas de calibração e de regressão linear com base nas áreas dos picos foram utilizadas para identificar e quantificar os picos correspondentes aos 12 padrões externos (grau cromatográfico), sendo eles: ácido gálico, catequina, ácido vanílico, ácido caféico, epicatequina, ácido cumárico, ácido ferrúlico, rutina, ácido salicílico, miricetina, resveratrol e quercetina. Todos os padrões foram diluídos na fase "B" (acetonitrila:água:ácido acético) nas seguintes concentrações: 2 μg/mL; 4 μg/mL; 8 μg/mL; 16 μg/mL; 30 μg/mL. O teor de compostos fenólicos foi expresso para cada composto identificado em mg/g de amostra. A determinação dos compostos fenólicos foi realizada em triplicata.

#### 4.2.8 Atividade Antibacteriana dos Extratos

## 4.2.8.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Esse método foi realizado por microdiluição em placa de 96 poços de acordo com a metodologia de CLSI, 2005. Os micro-organismos utilizados para a determinação da atividade antimicrobiana foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Salmonella Bongori* (ATCC 43975), ambas foram adquiridas liofilizadas e reativadas em caldo BHI (*Brain heart infusion*) por incubação de 4 horas e passadas para ágar BHI por mais 24 horas de incubação.

Após a preparação das bactérias, colônias foram ressuspendidas em tubos de ensaios contendo soro fisiológico esterilizado, para padronizar essa solução o valor de absorbância foi ajustado para 0,135 a 660 nm em espectrofotômetro, o que equivale a 1 – 2x10<sup>8</sup> UFC/mL na escala de *Mc Farland*, (UFC = Unidade formadora

de colônias). Com a concentração já ajustada, um volume de 50 µL das suspensões bacterianas foi inoculado em 50 mL de caldo BHI devidamente esterilizado.

Para iniciar o procedimento da reação nas placas de 96 poços, foram pipetados 190 μL de caldo BHI inoculado, e em seguida adicionado 10 μL dos extratos, com diversas concentrações, em seguidas incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas. Para confirmação dos testes, o caldo BHI inoculado foi adicionado na placa juntamente com etanol 80% v/v, etanol P.A. e o antibiótico clorafenicol 0,12 % m/v, como controles positivos e negativos.

Passadas às 24 horas de incubação, foram adicionados 30 μL do corante resazurina (0,01 % m/v). Nos poços onde houve mudança na coloração, isto é, mudança de azul para qualquer outra cor, o resultado é negativo, ou seja, houve crescimento bacteriano já nos poços que a coloração permaneceu inalterada, o resultado é positivo, ou seja, não houve crescimento bacteriano.

# 4.2.8.2 Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Essa análise foi realizada com base nos resultados obtidos no teste da CIM, onde uma alíquota de 10 µL provenientes dos poços onde não houve crescimento bacteriano, ou seja, resultado positivo, foi transferida para placas de Petri contendo meio de cultura ágar BHI e logo após levada a estufa por 24 horas a 37 °C. A CBM foi considerada a menor concentração que causou 99,9 % de morte celular, ou seja, sem crescimento bacteriano visível sobre o ágar (CLSI, 2005).

## 4.2.9 Elaboração de petit suisse

Para a elaboração do queijo *petit suisse* com extratos fenólicos liofilizados das frutas mirtilo, *goji berry* e polpa especial de açaí foi utilizado o Laboratório de laticínios de Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus de Medianeira.

Na elaboração do queijo foram utilizadas duas partes iguais de leite pasteurizado com 3% de gordura e uma parte de creme de leite a 35 a 40% de

gordura. Para a coagulação foi utilizado cloreto de cálcio a 40%, fermento lático (cultura tipo "O" contendo (*Lactococcus lactis ssp. lactis* e *Lactococcus lactis ssp. cremoris*) a base de 2% e coalho líquido (1/20 da dose normal). A coagulação ocorreu em 45 minutos à temperatura de 32 °C. Após a coagulação, a massa foi quebrada lentamente e homogeneizada por 15 minutos até atingir o ponto. A seguir, foi realizada a dessoraragem por 24 horas a temperatura ambiente. Terminada a dessoragem, homogeneizou-se a massa para obter uma aparência pastosa e fina, e adicionou-se o açúcar. A massa foi dividida em quatro partes para condimentação com extratos liofilizados das amostras de polpa de açaí (1%), mirtilo (1%) e *goji berry* (1%) e também adicionado sorbato de potássio (0,03%) sendo a seguir embaladas em frascos de vidro hermeticamente fechados e armazenados a 10 °C. A elaboração do queijo *Petit Suisse*, de acordo com Albuquerque (2002) com adaptações, é apresentado no fluxograma na Figura 12.

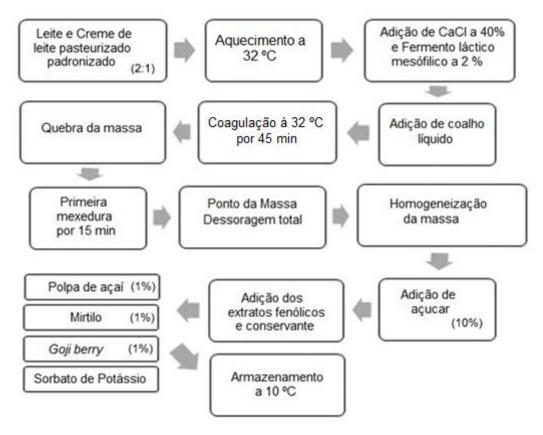


Figura 12 - Fluxograma para elaboração do queijo petit suisse.

## 4.2.10 Analise Microbiológica do queijo tipo Petit Suisse

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório para Garantia de Qualidade (LGQ) localizado em Francisco Beltrão - PR e no Laboratório de Qualidade Agroindustrial localizado em Pato Branco – PR, logo após a elaboração dos produtos. Foram realizadas as análises microbiológicas previstas pelo Regulamento Técnico Geral para Fixação de Requisitos Microbiológicos de Queijos, para queijos de muita alta umidade com bactérias lácteas em forma viável e abundante, de acordo com a RDC nº 12, de 2 de Janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), onde preconiza: Coliformes a 45 °C/g, Estafilococos coagulase positiva/g, Salmonella sp/25g e Listeria monocytogenes/25g.

# 4.2.11 Substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS)

O teste de oxidação lipídica foi realizado através da quantificação das substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS), que está entre as principais metodologias utilizadas para acompanhar o processo de oxidação lipídica em alimentos. O malonaldeído, produto secundário da oxidação de ácido graxos polinsaturados, reage com o ácido 2-tiobarbitúrico formando um complexo cromogênio que apresenta absorção máxima entre 520-532 nm (DAHLE et al., 1962). Este teste foi realizado a cada 7 dias de armazenamento até o período final da vida útil do produto (28 dias).

Em um tubo *Falcon*, 5 g do queijo *petit suisse* e 25 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) foram homogeneizados durante 1 min. Após esse tempo foi realizada a filtração e uma alíquota de 4 mL do filtrado foi transferido para um tubo de ensaio com rosca, com 5 mL de TBA e 1 mL de TCA e incubada em banho-maria por 45 minutos a 100 °C, desenvolvendo a cor característica da reação, resfriado logo em seguida em banho de gelo e realizada a leitura em espectrofotômetro à 532 nm (MIGUEL, 2009).

#### 4.2.12 Análise de cor

Para avaliação no tempo de armazenamento foi realizada a análise de cor no primeiro e último dia da vida útil do queijo *petit suisse* (30 dias) para os queijos com adição dos extratos liofilizados de *goji berry*, mirtilo, polpa de açaí e controle (massa adicionado de sorbato de potássio). Os parâmetros analisados foram L\*,a\*,b\* através do equipamento Colorímetro Konica Minolta (Modelo CR-400 - New Jersey, USA) e afim de se verificar a diferença de coloração o ΔE foi calculado, a partir da seguinte equação:

$$\Delta E = \sqrt[2]{(\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2)}$$
 (7)

Onde:

 $\Delta L$  = variação do L\* no tempo 0 e 30 dias;

 $\Delta a = variação do a^* no tempo 0 e 30 dias;$ 

 $\Delta b$  = variação do b\* no tempo 0 e 30 dias.

## 4.2.13 Avaliação hedônica

A realização desse trabalho foi aprovada pelo Comitê de ética em pesquisa da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), sob parecer nº 1.103.775 com data de relatoria 11 de junho de 2015, sendo conduzido de acordo com as diretrizes estabelecidas da Resolução 466, de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional da Saúde. A análise sensorial foi realizada após a obtenção dos resultados das análises microbiológicas previstas no Regulamento Técnico Geral para Fixação de Requisitos Microbiológicos de Queijos, para queijos de muita alta umidade com bactérias lácteas em forma viável e abundante, de acordo com a RDC nº 12, de 2 de Janeiro de 2001.

Para avaliação sensorial do queijo *petit suisse* foi utilizado o teste de aceitação, utilizando a escala hedônica, teste de preferência através do teste de ordenação e

intenção de compra (Apêndice A). O número de julgadores para os testes foi de 100 julgadores não treinados (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Foram entregues aos julgadores quatro amostras codificadas de *petit suisse* de forma monódica e aleatória para que não houvesse comparação entre as amostras, quando analisados os atributos sensoriais e impressão global. As amostras foram: queijo *petit suisse* adicionado extrato liofilizado de polpa de açaí, queijo *petit suisse* adicionado extrato liofilizado de mirtilo e queijo *petit suisse* adicionado extrato liofilizado de goji berry, e também uma amostra adquirida do mercado local no sabor morango.

Ao iniciar o teste foi solicitado que os julgadores preenchessem sua idade, sexo e frequência de consumo de queijo *petit suisse*, em uma escala de 7 pontos, variando desde "consumo diariamente" até o "nunca consumo".

Na escala hedônica, foi avaliada a aceitação dos atributos sensoriais, sendo eles: cor, odor, aparência, textura e impressão global do produto, com escala de nove pontos, variando de 9 que significa "gostei muitíssimo" até 1 que é "desgostei muitíssimo".

Para o teste de preferência, o julgador foi orientado em ordenar de acordo com a sua preferência, sendo a amostra mais preferida classificada com o número 1, a segunda pelo número 2, e assim até que todas as amostras sejam classificadas. O teste de intenção de compra, o julgador relatou se compraria as amostras, se caso sim, qual ou quais comprariam, se tivesse disponível para venda.

## 4.2.14 Analise Estatística

Todas as determinações foram realizadas em triplicata, os dados foram avaliados através de análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey e teste t de Student, considerando o nível de significância de 5%, utilizando o *software* Statistic® versão 7.7 beta.

Em relação a analise sensorial, os dados referentes aos atributos cor, odor, aparência e sabor foram comparados através de suas médias por teste Tukey considerando nível de significância de 95 %. Para o atributo impressão global, a porcentagem de aceitação foi calculada a partir das médias das notas dadas por todos

os julgadores. Para o teste de ordenação, utilizou-se a tabela de Newel e MacFarlane para os níveis de significância de 5%, para obter a diferença crítica entre os totais de ordenação (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Os testes de análise multivariada e regressão logística multinominal (análise de Wald) também foram utilizados para avaliar o efeito das variáveis sobre a aceitação das amostras de queijo *petit suisse*, utilizando o *software* Statistic® versão 7.7 beta

#### **5 RESULTADOS**

# 5.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

Os valores referentes a composição centesimal da polpa de açaí, mirtilo *in natura* e *goji berry* estão representados na Tabela 4.

Tabela 4 - Composição centesimal das frutas mirtilo, goji berry e polpa de açaí em base seca

Parâmetros	Polpa de Açaí*	Mirtilo	Goji berry
Cinzas (g/100g)	3,651 <sup>b</sup> ± 0,089	$0,956^{\circ} \pm 0,006$	4,695a ± 0,228
Lipídeos (g/100g)	$37,637^a \pm 0,101$	$1,510^{b} \pm 0,008$	$1,296^{\circ} \pm 0,0002$
Proteínas (g/100g)	$1,263^{\circ} \pm 0,006$	$3,987^{b} \pm 0,079$	$17,616^a \pm 0,388$
Fibras dietéticas totais (g/100g)	$41,743^a \pm 0,058$	$19,890^{b} \pm 0,085$	27,331° ± 0,987
Carboidratos totais (g/100g)	$15,605^{\circ} \pm 0,137$	$73,443^a \pm 0,432$	49,117 <sup>b</sup> ± 0,851

Média ± Desvio Padrão. Médias seguidas de letras diferentes em uma mesma linha diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey (p≤0,05).

Ao analisar as respostas obtidas através da Tabela 4, é possível verificar que todas as amostras diferiram significativamente (p≤0,05) em relação a cada análise realizada. Isso pode ser explicado por serem amostras totalmente distintas, com composição e propriedades diferentes. A polpa de açaí na sua forma especial tem parâmetros de umidade, proteínas, lipídeos estabelecidos pela legislação vigente (BRASIL, 2000). A umidade deve ser no máximo de 86%, 5 g/100 gms (grama de matéria seca) de proteína e 20 g/100 gms de lipídeos. Dentre estes parâmetros, apenas a quantidade de lipídeos está de acordo com o que preconiza a legislação, sendo de 37,58 g/100 gms. Já em relação às proteínas os valores estão abaixo no estabelecido sendo de 1,26 g/100 gms e umidade de 87,895%.

Estudos relacionados ao açaí têm mostrado a falta do controle de qualidade de polpas industrializadas, sendo necessário um cuidado maior com os parâmetros utilizados para o despolpamento e comercialização das polpas dessa fruta. Fregonesi et al. (2010) estudaram diferentes marcas de polpa de açaí e a umidade variou de 86,60 a 92,89%, Nascimento et al. (2008), também avaliaram a polpa de açaí e obtiveram umidade de 89,18%, e para lipídeos e proteínas os resultados foram de 4,61% e 0,17%, respectivamente, valores semelhantes ao desse estudo (4,55% e 0,15% para lipídeos e proteínas, respectivamente).

Em relação às cinzas a polpa de açaí apresentou 0,44 %. Apesar de não existirem na legislação, essa análise é muito importante por expressar o teor de substâncias inorgânicas encontradas nas amostras. Valores semelhantes foram encontrados por Fregonesi et al. (2010) e Nascimento et al. (2008), variando de 0,16 a 0,39%.

Em relação aos carboidratos totais e fibras dietéticas totais, a maioria dos trabalhos encontrados na literatura apresentam seus resultados calculados por diferença, porém com a soma desses se assemelha com os encontrados na literatura, como Nascimento et al. (2008).

Para o mirtilo não existem padrões estabelecidos, por se tratar de um alimento *in natura*, porém pode ser caracterizado como um fruto com elevado teor de água, com 81,594%. O valor é próximo ao relatado por Moraes et al. (2007), que estudaram diversas cultivares de mirtilo e seus resultados variaram 81,3 a 83% de umidade e para os resultados de lipídeos, proteínas e cinzas foram de 0,25 a 0,28%, 1,4 a 1,8% e 0,2%, respectivamente. Reque (2012) também avaliou o fruto de mirtilo, com teor de umidade de 85,78% e 0,73% de lipídeos.

Poucos dados sobre a caracterização química de macronutrientes do *goji berry* foram encontrados na literatura. Entretanto, com os resultados apresentados na tabela 4 foi possível verificar alto teor de carboidratos totais e fibras dietéticas totais. Estudos relatados na literatura apontam o *goji berry* como uma fonte rica em polissacarídeos e estes apresentam atividades benéficas a saúde, como antioxidantes e antiinflamatória (DONG et al., 2009; POTTERAT, 2010; AMAGASE; FARNSWORTH, 2011).

#### 5.2 CAROTENOIDES TOTAIS

Os carotenoides totais foram quantificados por espectroscopia na região do ultra-violeta visível na faixa de absorção entre 300 a 600 nm. Os perfis espectrais característicos dos extratos são apresentados na Figura 13 para a polpa de açaí, *goji berry* e mirtilo.

O espectro para a polpa de açaí mostrou absorções nos comprimentos de onda de 406,5 (ombro), 426,5 (Amáx) e 447 nm (Figura 13A), característica do carotenoide

majoritário como sendo provavelmente β-zeacaroteno conforme observado em Goodwin (1976) cujos comprimentos de onda são 406, 428 ( $A_{máx}$ ) e 454. A partir do provável carotenoide majoritário, a quantificação do conteúdo total de carotenoides foi de 564,06  $\pm$  0,670 µg/g de amostra.

Em relação ao espectro obtido para o *goji berry*, este mostrou absorções a 424,5 (ombro), 450 ( $A_{m\acute{a}x}$ ) e 479 nm (Figura 13B). O conteúdo total de carotenoides foi calculado utilizando o carotenoide majoritário identificado como sendo a Zeaxantina, quando comparado aos dados de literatura (424, 449 ( $A_{m\acute{a}x}$ ) e 476 nm) (GOODWIN, 1976) e foi igual a 3758,86  $\pm$  0,890 µg/g de amostra.

Para o mirtilo, a quantificação de carotenoides não foi possível devido ao baixo teor dessa classe de compostos no solvente extrator empregado, como visto na Figura 13C.

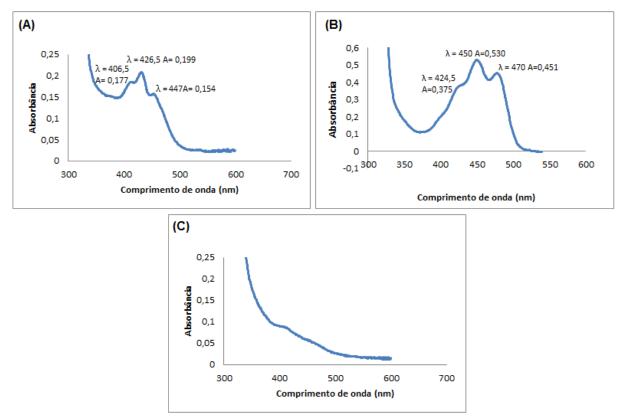


Figura 13 - Perfis espectrais em éter de petróleo das amostras polpa de açaí (A), *goji berry* (B) e Mirtilo (C).

Onde: λ: comprimento de onda; A: absorbância

Os carotenoides são facilmente encontrados na natureza, atuando como pigmentos fotoprotetores na fotossíntese e como estabilizadores de membranas. A forma de quantificação e extração pode ser realizada por diversas maneiras, não

havendo um protocolo único para extração (GOMES, 2007). O método mais utilizado é por cromatografia líquida de alta eficiência, porém são necessários altos custos para tal análise, necessitando de coluna e padrões específicos (JACQUES; PERTUZATTI; BARCIA, 2010; OLIVEIRA et al., 2011). Sendo assim, a quantificação por espectroscopia UV-Vis pode ser uma opção para se avaliar o perfil espectral das amostras analisadas.

Estudos na literatura apontam o açaí como uma excelente fonte de carotenoides, Kang et al. (2012), avaliando a bioatividade do fruto de açaí relataram a presença de compostos como β-caroteno, licopeno, luteína, astaxantina e zeaxantina, totalizando uma concentração de 963,7 μg/g. O valor é superior ao observado nesse estudo, e pode ser explicado pelo método empregado de quantificação e também pela sua matriz de estudo. Santos et al. (2008) observaram em seus estudos o teor de carotenoides de 32,6 μg/g. Esses valores refletem o quanto os resultados podem diferir quando extraídos e/ou analisados de maneiras distintas.

Em estudo com diversas variedades de mirtilo, Pertuzatti et al. (2014) obtiveram o teor de carotenoides totais que variaram de 1,99 a 35,3 µg/g de amostra seca. Estudos poderiam ser realizados utilizando uma maior concentração da amostra e extração com diferentes solventes.

O *goji berry* obteve o maior teor de carotenoides entre as amostras analisadas. Potterat (2010) relata em seus estudos que a classe de carotenoides presente em amostras de *goji berry* é o segundo maior grupo de metabólitos, sendo a zeaxantina o carotenoide majoritário com cerca de 56 %. Wang et al. (2010) isolaram os carotenoides β-caroteno, criptoxantina, neoxantina e zeaxantina e obtiveram um teor de 1510,93 mg/g, sendo a zeaxantina o carotenoide em maior concentração (1326 mg/g), valor este superior ao relatado no presente estudo.

# 5.3 PREPARAÇÃO DO EXTRATO E DESENHO EXPERIMENTAL

As amostras de polpa de açaí, mirtilo e *goji berry* foram desidratadas e moídas, conforme observados nas figuras 14, 15 e 16, respectivamente, para a elaboração dos extratos.



Figura 14 - Açaí: polpa especial e polpa liofilizada



Figura 15 - Mirtilo: in natura, triturado e liofilizado



Figura 16 - Goji berry: Desidratado e triturado

Os extratos em todos os ensaios obtiveram uma coloração específica de cada amostra, apenas diferindo de acordo com os solventes (água e etanol 80%), podendo ser causado pela diversidade de compostos que cada solvente através da sua polaridade pode extrair, dando cores distintas para cada extração. Os extratos também apresentaram aspecto homogêneo e fácil separação do sobrenadante após a centrifugação (Figuras 17 – 19).

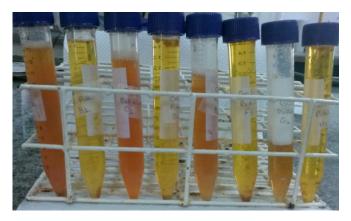


Figura 17 - Extratos para delineamento fatorial: Goji berry

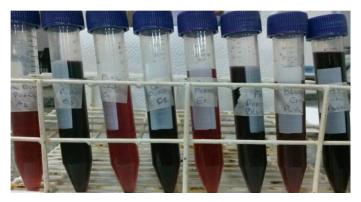


Figura 18 - Extratos para delineamento fatorial: Mirtilo

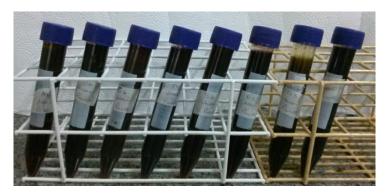


Figura 19 - Extratos para delineamento fatorial: Polpa de açaí.

O teor de compostos fenólicos totais (TCF) e atividade antioxidante (AA) nos respectivos extratos das amostras após serem sujeitos aos vários tratamentos (A1 ao A8) de acordo com o delineamento fatorial (item 4.2.3) estão sumarizados na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultados referentes ao delineamento fatorial para compostos fenólicos e DPPH determinados em polpa de açaí, mirtilo e goji berry

	Variáveis		riáveis Polpa de Açaí		M	lirtilo	Goji berry		
<b>Ensaios</b>	X1	X2	Х3	TCF	AA	TCF	AA	TCF	AA
	٨١	(min)	(°C)	(mg de EAG/g)	(µmol de Trolox/g)	(mg de EAG/g)	(µmol de Trolox/g)	(mg de EAG/g)	(µmol de Trolox/g)
A1	Água	30	30	18,68 <sup>ab</sup> ± 1,74	31,93° ± 0,73	6,01 <sup>e</sup> ± 0,51	9,18° ± 0,36	15,28 <sup>b</sup> ± 0,62	$8,89^{d} \pm 0,57$
A2	Etanol	30	30	14,46° ± 1,13	$45,73^{b} \pm 3,85$	$13,33^{\circ} \pm 0,77$	$30,51^{b} \pm 2,34$	$11,77^{\circ} \pm 0,25$	$14,40^{bc} \pm 0,65$
А3	Água	60	30	19,02 <sup>ab</sup> ± 1,31	$31,60^{\circ} \pm 1,24$	$6,19^{e} \pm 0,38$	$8,89^{\circ} \pm 0,53$	$15,74^{b} \pm 1,04$	$9,36^{d} \pm 0,78$
A4	Etanol	60	30	$15,55^{bc} \pm 0,3$	$52,44^{ab} \pm 0,52$	$15,04^{bc} \pm 0,61$	$32,96^{b} \pm 0,67$	$15,28^{b} \pm 0,60$	$15,39^{b} \pm 0,67$
A5	Água	30	60	17,90 <sup>abc</sup> ± 1,76	$31,77^{c} \pm 2,07$	$6,93^{e} \pm 0,35$	$10,40^{\circ} \pm 0,62$	$16,59^{b} \pm 0,30$	$9,79^{d} \pm 0,57$
A6	Etanol	30	60	$15,60^{bc} \pm 0,26$	$47,14^{b} \pm 2,55$	$15,76^{ab} \pm 0,62$	32,87 <sup>b</sup> ± 1,41	13,84 <sup>bc</sup> ± 1,08	$16,29^{b} \pm 1,28$
A7	Água	60	60	21,31a ± 1,08	$27,22^{\circ} \pm 0,95$	$8,98^{d} \pm 0,81$	$12,43^{\circ} \pm 1,06$	$21,62^a \pm 2,02$	$11,86^{cd} \pm 0,99$
A8	Etanol	60	60	18,69 <sup>ab</sup> ± 1,45	$57,91^a \pm 4,18$	$16,91^a \pm 0,35$	$49,53^a \pm 3,42$	$16,59^{b} \pm 1,08$	$19,40^a \pm 1,66$

Médias ± desvio padrão. Ensaios A1 a A8 – combinação de solventes, tempo e temperatura; X1: variável solvente; X2: variável tempo (min); X3: variável temperatura (°C); TCF: Teor de compostos fenólicos totais; AA: Atividade antioxidante pelo método sequestro do radical DPPH; EAG: equivalente em ácido gálico; Médias seguidas de letras iguais em uma mesma coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey (p≥0,05);

A média total do TCF nos extratos de polpa de açaí variou de 14,46 a 21,31 mg de EAG/g de amostra e atividade antioxidante (AA) de 27,22 a 57,91 µmol de Trolox/g de amostra. O TCF da polpa de açaí extraídos no ensaio A1 (água, 30°C, 30 min), A3 (água, 60°C, 30 min), A5 (água, 30°C, 60 min), A7 (água, 60°C, 60 min) e A8 (etanol, 60°C, 60 min) não diferiram estatisticamente pelo teste de Tukey. O menor teor de TCF foi encontrado no ensaio A2 (etanol, 30°C, 30 min) e não diferiu significativamente dos ensaios A4 (etanol, 60°C, 30 min), A5 (água, 30°C, 60 min) e A6 (etanol, 30°C, 60 min). O maior teor de TCF nas amostras de polpa de açaí foi encontrado no ensaio A7, porém com a menor AA (Tabela 5).

Kuskoski et al. (2006) estudaram diversas frutas e para o extrato de açaí o resultado para compostos fenólicos foi de 1,36 mg EAG/g de amostra fresca de açaí e 6,9 μmol de trolox / g peso da matéria fresca de açaí. Paz et al. (2015) encontraram valores de 1,808 mg EAG/g de amostra e 1,574 mg de Trolox/ g de amostra seca de açaí, para compostos fenólicos e atividade antioxidante, respectivamente. Kang et al. (2012) estudando a bioatividade do açaí obtiveram como resultado de 73,0 a 31,2 mg EAG/g de amostra seca e 133,4 a 320,3 μmol de trolox/g de amostra para atividade antioxidante pelo método DPPH

O extrato de mirtilo apresentou uma variação de 6,01 a 16,91 mg de EAG/g de amostra e 8,89 a 49,53 µmol de trolox/g de amostra para TCF e AA, respetivamente. O maior teor de compostos fenólicos totais encontrado no mirtilo foi no tratamento A8 e não diferiu estatisticamente do tratamento A6. Nessa condição (ensaio A8) os compostos extraídos do mirtilo apresentaram a maior AA e o valor diferiu significativamente dos demais tratamentos (Tabela 5).

Castrejón et al. (2008) estudando variedades de mirtilo em diferentes estágios de amadurecimento, obtiveram teores de compostos fenólicos que variaram entre 17,3 a 52,6 mg EAG/g de amostra, enquanto Pertuzatti et al. (2014), também avaliando diversas variedades de mirtilo, tiveram suas respostas para compostos fenólicos variando de 1,622 a 3,457 mg EAG/g de amostra. Em relação a atividade antioxidante para o mirtilo, Rodrigues et al. (2011) obtiveram resultados que variaram de 10,142 a 20,55 µmol de trolox/g.

Já o extrato de *goji berry* apresentou uma variação de 11,77 a 21,62 mg de EAG/g de amostra e a atividade antioxidante de 8,89 a 19,40 µmol de Trolox/g de amostra. O tratamento A7 apresentou o maior TCF e diferiu significativamente dos demais tratamentos. No entanto, os maiores valores de AA para essa amostra foram

encontrados no ensaio A8 (Tabela 5). Estudando a atividade antioxidante e compostos fenólicos do *goji berry*, Donno et al. (2014) determinaram em seus estudos, teores de compostos fenólicos que variaram de 255,87 a 281,81 mg EAG/g de amostra de *goji berry*.

Comparando os resultados com os apresentados nesse estudo, muitos acabam sendo distintos pela diversidade de extrações e solventes utilizados para o mesmo. Sendo assim, resultados encontrados na literatura são difíceis de comparar devido à diversidade de extrações que podem ser realizadas. Contudo, os resultados apresentados encontram-se satisfatórios e as frutas podem ser classificadas como fontes de compostos bioativos e atividade antioxidante.

## 5.3.1 Análise de variância (ANOVA) Superfície de resposta

A metodologia de superfície de resposta foi realizada através de delineamento fatorial 2³, utilizando-se três fatores, solvente, tempo e temperatura de extração. Os efeitos de cada variável independente (fatores) foram analisados por análise de variância (ANOVA). A tabela 6 apresenta a análise de variância (ANOVA) utilizada para validação estatística e verificação do modelo. É possível verificar que na maioria dos casos, principalmente quando tratadas as variáveis isoladas, isto é, sem a interação entre pelo menos duas delas, houve significância variando a temperatura, tempo e solvente. A única variável independente não significativa, foi a temperatura para a amostra polpa de açaí e resposta AA.

Os resultados significativos são possíveis de serem observados a partir do p-valor, onde todos os valores menores que 0,05, são significativos ao nível de significância de 5%. A análise do p-valor é um instrumento útil para avaliar a significância dos coeficientes, de maneira que quanto menor o p-valor, maior a significância do coeficiente de variação correspondente.

O teste F também pode ser utilizado para verificação da diferença significativa. O F<sub>calc</sub> foi superior ao F<sub>tabelado</sub> (4.45) nos casos em que houve diferença significativa, e em alguns casos chegando a ser aproximadamente 80 vezes maior que o F<sub>tabelado</sub> (Tabela 6). A menor razão encontrada na análise de variância foi 5,85. Estes resultados mostram que os modelos foram bem ajustados aos dados empíricos.

Tabela 6 - Análise de Variância (ANOVA) para as variáveis dependentes TCF e AA em polpa de açaí, mirtilo e goji berry.

	Amostra: Aça	í* / Vari	ável depender	nte: Compostos	s fenólicos	Amostra:	Açaí* / Va	ariável depend	dente: Atividade	antioxidante
Fatores	Soma dos Quadrados	G.L.	Média dos Quadrados	F-calculado	p-valor	Soma dos Quadrados	G.L.	Média dos Quadrados	F-calculado	p-valor
Solvente (X1)	59,7242	1	59,72415	39,54818	0,000008	2442,325	1	2442,325	350,8172	0,000000
Tempo (X2)	23,6017	1	23,60167	15,62857	0,001026	59,633	1	59,633	8,5657	0,009414
Temperatura (X3)	12,4993	1	12,49927	8,27677	0,010461	2,026	1	2,026	0,2910	0,596571
X1;X2	0,0661	1	0,06615	0,04380	0,836708	187,416	1	187,416	26,9206	0,000074
X1;X3	2,8704	1	2,87042	1,90073	0,185869	48,932	1	48,932	7,0286	0,016800
X2;X3	9,6774	1	9,67740	6,40819	0,021515	0,010	1	0,010	0,0014	0,970142
Resíduo	25,6728	17	1,51016			118,351	17	6,962		
Total	134,1118	23				2858,692	23			
Fatores	Amostra: Mirti	lo /Vari	ável dependen	te: Compostos	fenólicos	Amostra: I	Mirtilo / Va	ariável depend	dente: Atividade	antioxidante
Solvente (X1)	412,4275	1	412,4275	1108,144	0,000000	4132,223	1	4132,223	730,878	0,000
Tempo (X2)	8,8452	1	8,8452	23,766	0,000142	163,104	1	163,104	28,849	0,000
Temperatura (X3)	19,2425	1	19,2425	51,702	0,000002	210,326	1	210,326	37,201	0,000
X1;X2	0,0176	1	0,0176	0,047	0,830418	113,144	1	113,144	20,012	0,000
X1;X3	0,0513	1	0,0513	0,138	0,714928	75,275	1	75,275	13,314	0,002
X2;X3	0,8932	1	0,8932	2,400	0,139755	102,308	1	102,308	18,096	0,001
Resíduo	6,3270	17	0,3722			96,114	17	5,654		
Total	447,8044	23				4892,494	23			
Fatores	Amostra: Goji be	erry / Va	ariável depend	ente: Compost	os fenólicos	Amostra: Go	oji berry /	Variável depe	ndente: Atividad	de antioxidante
Solvente (X1)	51,8322	1	51,83220	32,09225	0,000028	245,504	1,000	245,504	276,756	0,000
Tempo (X2)	51,8910	1	51,89100	32,12866	0,000028	16,537	1,000	16,537	18,642	0,000
Temperatura (X3)	41,8968	1	41,89684	25,94070	0,000090	32,313	1,000	32,313	36,426	0,000
X1;X2	0,2262	1	0,22620	0,14006	0,712853	0,910	1,000	0,910	1,026	0,325
X1;X3	5,4626	1	5,46260	3,38221	0,083437	2,331	1,000	2,331	2,628	0,123
X2;X3	5,4435	1	5,44354	3,37040	0,083932	5,191	1,000	5,191	5,852	0,027
Resíduo	27,4567	17	1,61510			15,080	17,000	0,887		
Total	184,2091	23				317,867	23,000			

G.L. = Graus de liberdade; Resultados em negrito referem-se a diferenças significativos (p≤0,05);

Os efeitos de cada variável independente foram calculados pela análise de variância e exemplificados pelo gráfico de Pareto. Os efeitos significativos para o mirtilo foram todos positivos, tanto para a TCF (Figura 20.a) quanto para a variável AA (Figura 20.b).

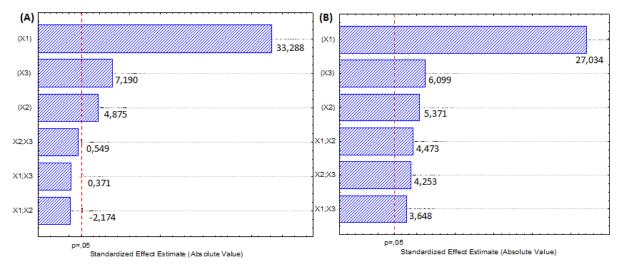


Figura 20 - Gráfico de Pareto para a amostra mirtilo e variáveis dependentes: teor de compostos fenólicos (A) e atividade antioxidante (B);

X1: Solvente; X2: tempo; X3: temperatura. Xa;Xb: interação entre as variáveis.

Para a polpa de açaí, as variáveis independentes em relação à resposta compostos fenólicos tiveram um efeito positivo e significativo nas variáveis tempo, temperatura e a interação tempo e temperatura. Para a variável solvente, esta também foi significativa, porém com efeito negativo. A resposta AA apresentou efeitos positivos e significativos para as variáveis independentes solvente, tempo, e interação entre solvente e tempo e solvente e temperatura (Figura 21).

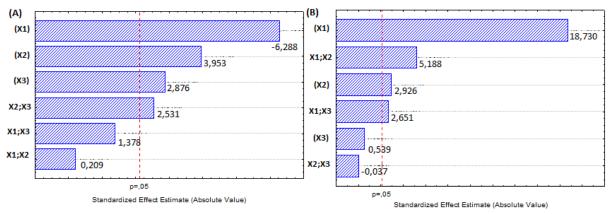


Figura 21 - Gráfico de Pareto para a amostra polpa de açaí e variáveis dependentes: teor de compostos fenólicos (A) e atividade antioxidante (B);

X1: Solvente; X2: tempo; X3: temperatura. Xa;Xb: interação entre as variáveis.

Para o goji berry, as variáveis independentes (fatores) solvente, tempo e temperatura foram significativos sobre a atividade antioxidante. Porém, o solvente apresentou um efeito negativo sobre a resposta compostos fenólicos, enquanto que tempo e temperatura obtiveram um efeito positivo. Para a variável dependente atividade antioxidante, as variáveis tempo, solvente, temperatura e a interação entre solvente e temperatura apresentaram efeito positivo e significativo (Figura 22).

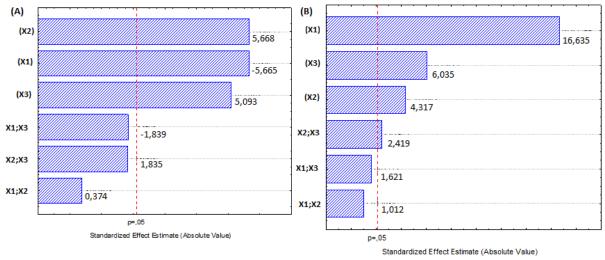


Figura 22 - Gráfico de Pareto para a amostra goji berry e variáveis dependentes: teor de compostos fenólicos (A) e atividade antioxidante (B);

X1: Solvente; X2: tempo; X3: temperatura; Xa;Xb: interação entre as variáveis.

Os dados obtidos foram analisados por regressão linear múltipla e os modelos matemáticos que representam os teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante pelo método DPPH foram expressos pelas equações 8 a 13, levando-se em consideração somente os termos significativos (Tabela 7).

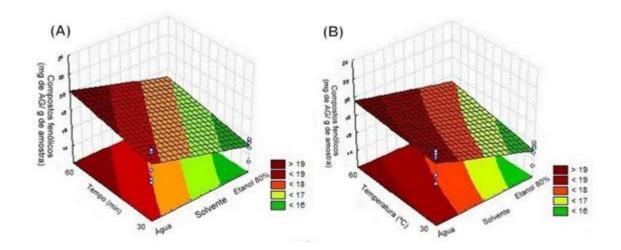
Tabela 7 - Modelos gerados por regressão linear múltipla para as variáveis dependentes, compostos fenólicos e DPPH em função dos fatores; solvente, tempo e temperatura

Equação	Modelo Gerado	Coeficiente de Correlação (R²)
8	$TCF \ a cai = 17,655 - 1,578x1 + 0,992x2 + 0,722x3 + 0,635x1x2$	0,8085
9	$AA \ a $ ç $a$ í = $40.717 + 10.088x1 + 1.57x2 + 2.794x1x2 + 1.428x2x3$	0,9439
10	$TCF \ mirtilo = 11,255 + 4,145x1 + 0,607x2 + 0,895x3$	0,9808
11	$AA \ mirtilo = 23,345 + 13,122x1 + 2,607x2 + 2,960x3 + 2,171x1x2 + 1,771x1x3 + 2,065x2x3$	0,9734
12	$TCF\ goji\ berry = 15,840 - 1,470x1 + 1,470x2 + 1,321x3$	0,8509
13	$AA\ goji\ berry = 13,172 + 3,198x1 + 0,830x2 + 1,160x3 + 0,312x1x3$	0,9358

Respostas: TCF: Teor de compostos fenólicos; AA: atividade antioxidante -  $X_1$ : solvente;  $X_2$ : tempo;  $X_3$ : temperatura.

Para cada equação é possível verificar os altos coeficientes de correlação, indicando um bom ajuste do modelo aos dados experimentais. Os coeficientes de variação se apresentaram na faixa entre de 0,8085 e 0,9808, o que denota que 80% a 98% das variações dos dados podem ser explicadas pelo modelo para cada caso analisado. Cada modelo de regressão linear múltipla pode gerar uma superfície de resposta (Figuras 23 - 25). Nas superfícies de resposta, a variável dependente analisada, compostos fenólicos e atividade antioxidante estão mostradas (eixo z) em função das variáveis independentes (fatores) tipo de solvente, tempo e temperatura de extração.

Para a polpa de açaí, relacionando o tempo e o solvente, a água e o tempo de 60 minutos foram superiores, observado pelo tom avermelhado (Figura 23.a), já avaliando temperatura e solvente, a água e o temperatura de 60 °C apresentaram os melhores valores. Ao avaliar tempo e temperatura, ambos obtiveram melhores resultados nos níveis superiores (60 °C e 60 min) (Figura 23.c). No entanto, para a variável dependente atividade antioxidante em polpa de açaí, as melhores condições de extração foram a temperatura de 60 °C, tempo de 60 minutos, porém utilizando-se etanol a 80 % em todas as condições estudadas, como observadas nas superfícies de respostas (Figuras 23d, 23e, 23f).



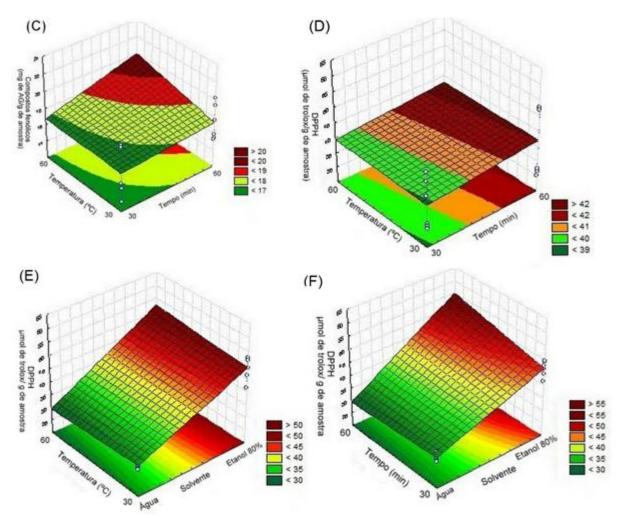


Figura 23 - Gráfico de Superfície referente à resposta Compostos fenólicos e atividade antioxidante para a polpa de açaí.

Variáveis em relação ao TCP: tempo e solvente (A); temperatura e solvente (B); temperatura e tempo (C). Variáveis em relação a AA: temperatura e tempo (D); temperatura e solvente (E); tempo e solvente (F).

Observando as superfícies de resposta para o *goji berry* (Figura 24), um aumento dos teores de compostos fenólicos em *goji berry* foi observado para tempo de extração de 60 minutos, temperatura de 60°C e utilizando-se água como solvente extrator (Figura 24 A, B, C). Por outro lado, os melhores níveis de atividade antioxidante pelo método DPPH para o *goji berry*, foram determinados nas seguintes condições: temperatura de 60 °C, tempo de extração de 60 minutos e utilizando-se etanol 80% com solvente extrator (Figura 24 D, E, F).

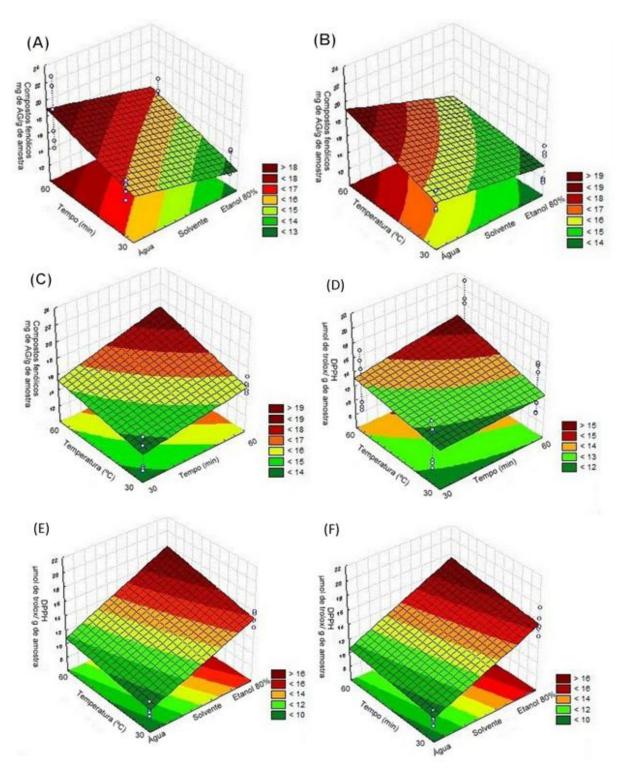


Figura 24 - Gráfico de Superfície referente à resposta Compostos fenólicos e Atividade antioxidante para o extrato de *goji berry*.

Variáveis em relação a TCP: tempo e solvente (A); temperatura e solvente (B); temperatura e tempo (C). Variáveis em relação a AA: temperatura e tempo (D); temperatura e solvente (E); tempo e solvente (F).

As melhores condições para extração de compostos fenólicos em mirtilo foram obtidas quando o etanol 80 % foi utilizado como solvente extrator com temperatura de 60°C em 60 minutos de extração (Figura 25 a, b, c). Por fim, os melhores resultados

de atividade antioxidante pelo método de DPPH em mirtilo foram obtidos pelas variáveis superiores, temperatura de 60°C, tempo de extração 60 minutos, porém utilizando-se etanol 80 % como solvente extrator (Figura 25 d, e, f).

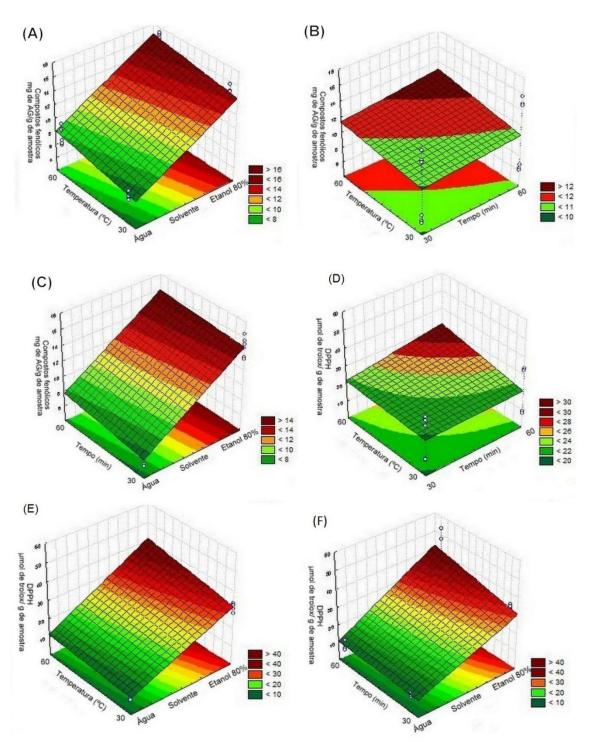


Figura 25 - Gráfico de Superfície referente à resposta Compostos fenólicos e Atividade antioxidante para o extrato de mirtilo.

Variáveis em relação a TCP: temperatura e solvente (A), temperatura e tempo (B) e tempo e solvente (C). Variáveis em relação a AA: temperatura e tempo (D), temperatura e solvente (E) e tempo e solvente (F).

Analisando-se as respostas dos teores de compostos fenólicos e DPPH nas amostras polpa de açaí, mirtilo e *goji berry*, as melhores condições de extração podem ser consideradas em temperatura de 60 °C, com tempo de extração de 60 minutos e como solvente extrator a solução etanólica 80%, por ter sido o melhor solvente para extrair compostos com alta atividade antioxidante, mesmo que em alguns casos a extração com água resultaram em uma quantificação maior do teor de compostos fenólicos.

Oldoni et al. (2015) estudando as condições de extração de compostos bioativos de própolis com diferentes concentrações de etanol, tempo e temperatura, obtiveram como melhores variáveis no processo a extração com etanol 80 % na temperatura de 70 °C durante 45 min de extração, enquanto Melo et al., (2015) avaliaram subprodutos de vinícolas a melhor proporção de etanol e tempo de extração, e concluíram que em concentrações moderadas de etanol (43 % e 57 %), combinado com as alta temperaturas (96 °C) foram as melhores condições para a extração de compostos antioxidantes. Estes estudos corroboram com os resultados apresentados e confirmam a alta efetividade do etanol e altas temperaturas na extração de compostos bioativos, como os compostos fenólicos.

Dada a importância econômica e nutricional das espécies, estudos referentes ao processo de extração e otimização das condições de extração fazem-se necessários, pois a obtenção de compostos biologicamente ativos envolve vários fatores e o delineamento experimental é uma ótima metodologia de auxílio a experimentação que permite a redução do número de ensaios sem prejuízo qualidade da informação.

5.4 TEOR DE ANTOCIANINAS TOTAIS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIBACTERIANA E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS NAS MELHORES CONDIÇÕES

Nas análises de determinação de antocianinas totais, atividade antioxidante, identificação e quantificação de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência, concentração inibitória mínima e bactericida mínima foram utilizados

extratos elaborados nas melhores condições: temperatura de 60 °C, tempo de extração de 60 minutos e como solvente extrator a solução etanólica 80%.

#### 5.4.1 Teor de Antocianinas totais

A quantificação de antocianinas totais nas amostras polpa de açaí, mirtilo e *goji* berry, estão apresentadas na Tabela 8. Os resultados referentes a quantificação variam de 864,167 mg/100g de amostra para o mirtilo a 4,175 mg/100g de amostra para o *goji berry*. Esses resultados diferem significativamente (p ≤ 0,05) entre si, apesar da polpa de açaí e o mirtilo apresentarem coloração semelhante, característica da presença de antocianinas, a polpa de açaí passou por processos industriais para elaboração de sua polpa, enquanto que o mirtilo foi utilizado *in natura*. O *goji berry* apresentou os menores valores no teor de antocianinas. Esse resultado é coerente, visto que a presença de carotenoides é predominante.

Tabela 8 - Quantificação de Antocianinas totais expressas em cianidina-3-glicosídio nas amostras de polpa de açaí, mirtilo e *goji berry*.

Amostras	Antocianinas (mg/100g de amostra)
Polpa de Açaí	410,236 <sup>b</sup> ± 1,181
Mirtilo	864,167° ± 3,615
Goji berry	$4,175^{\circ} \pm 0,835$

Média ± Desvio Padrão. Médias seguidas de letras diferentes em uma mesma coluna diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey (p≤0,05);

Alguns autores também avaliaram o teor de antocianinas em frutas utilizadas no presente estudo, Rodrigues et al. (2011) em seu estudo, verificaram a concentração de 40,62 a 378,31 mg/100g para diversas variedades de mirtilo. Já para o açaí, autores como Santos et al. (2008) e Kuskoski et al. (2006), obtiveram teores de antocianinas de 22,8 a 54,18 mg/100g. Valores superiores foram encontrados no presente estudo, isto se deve principalmente pelo método empregado para extração.

#### 5.4.2 Atividade Antioxidante

Os resultados referentes a atividade antioxidante pelos quatro métodos empregados estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9 - Resultados referentes a atividade antioxidante pelos métodos DPPH, FRAP, ABTS e

β-caroteno para as amostras polpa de açaí, mirtilo e goji berry.

Amostras	DPPH/EC <sub>50</sub>	FRAP	ABTS	β-caroteno
Polpa de Açaí	0,621 <sup>b</sup> ± 0,011	106,347a ± 0,613	15,285° ± 0,163	74,659 <sup>a</sup> ± 0,627*
Mirtilo	$0,501^a \pm 0,027$	$99,376^{b} \pm 0,763$	$13,106^{b} \pm 0,040$	$66,285^{b} \pm 0,289^{*}$
Goji berry	$2,479^{\circ} \pm 0,022$	$47,543^{\circ} \pm 0,546$	$10,675^{\circ} \pm 0,030$	47,141° ± 0,459**

<sup>±</sup> Desvio Padrão. Unidades: EC<sub>50</sub>: mg/mL; FRAP: μmol de Fe<sup>2+</sup>/g de amostra); ABTS: umol Trolox/g de amostra; β-caroteno: % de Atividade antioxidante; \* Concentração utilizada: \*0,01 g/mL \*\*0,025 g/mL. Médias seguidas de letras diferentes em uma mesma coluna diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey (p≤0,05);

Neste estudo o antioxidante comercial eritorbato de sódio foi utilizado para comparação com as amostras polpa de açaí, mirtilo e *goji berry*. A atividade antioxidante pelo método DDPH/EC $_{50}$ , FRAP, ABTS e  $\beta$ -caroteno foi: 0,049 ± 0012 mg/mL, 2871,97+26,97  $\mu$ mol de Fe $^{2+}$ /g de amostra, 4777,93 ± 206,00  $\mu$ mol Trolox/g de amostra e 77,274 ± 0,066 %, respectivamente. Esses valores foram superiores à das amostras analisadas, mas é aceitável visto que o eritorbato de sódio é  $\mu$ ma substância pura quando comparada com as frutas que contém diversos compostos que podem ser extraídos no método de extração.

O método DPPH/EC $_{50}$  é realizado a partir da curva cinética da porcentagem de atividade antioxidante, observada na Figura 26. É possível observar que com o aumento da concentração, ocorre um aumento da porcentagem da atividade antioxidante e com passar do tempo ocorre a estabilização, onde todos os radicais foram reduzidos durante a análise. A partir do tempo de estabilização é calculado a porcentagem de atividade antioxidante e a concentração necessária de amostra para reduzir a presença do radical DPPH em 50 % (EC $_{50}$ ), a partir das equações da reta y = 20,303x - 0,7711 (R $^2$  = 0,9966), y = 79,141x + 10,647(R $^2$  = 0,9903) e y = 60,808x + 12,292 (R $^2$  = 0,9905), para *goji berry*, mirtilo e polpa de açaí, respectivamente.

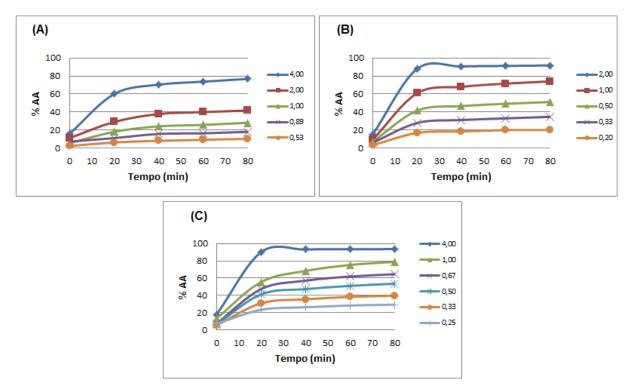


Figura 26 - Curva cinética da atividade antioxidante para a análise DPPH/EC<sub>50</sub>.

Goji berry (A); polpa de açaí (B); mirtilo (C); % AA: Porcentagem de atividade antioxidante; Cores distintas nas linhas representam as concentrações dos extratos utilizados (4 mg/mL a 0,20 mg/mL).

Os resultados variaram de 0,501 a 2,479 mg/mL (mirtilo e *goji berry*, respectivamente), sendo que como se trata da concentração necessária mínima para diminuir a presença o radical DPPH, quanto menor for essa concentração maior será o poder antioxidante.

O método ABTS é semelhante ao método de DPPH, onde ambos trabalham com a redução dos radicais presentes. O cálculo para ABTS foi realizado a partir da equação da reta y = -11,244x + 0,6891 (R² = 0,9977) utilizando o antioxidante trolox (antioxidante sintético, análogo a vitamina E). A concentração de trolox variou de 10,675 umol Trolox/g de amostra para o *goji berry* a 15,285 umol Trolox/g de amostra para a polpa de açaí. Os resultados expressos na atividade antioxidante pelo método ABTS neste trabalho são semelhantes aos encontrados por Santos et al. (2008) que obtiveram uma resposta 10,21 a 52,47 μmol de Trolox/g de amostra. Já Pertuzatti et al. (2014) que estudaram variedades de mirtilo, apresentaram uma concentração de 40,30 a 260,80 μmol Trolox/g.

Para a analise FRAP, onde verifica-se o poder de redução do Fe<sup>3+</sup> para o Fe<sup>2+</sup>, a equação da reta utilizada para os cálculos foi y = 32,991x - 0,0507 com R<sup>2</sup> de 0,9997 em função de sulfato ferroso. O teor de Fe<sup>2+</sup> reduzido durante a reação variou de 47,543 (*goji berry*) a 106,347 µmol de Fe<sup>2+</sup>/g de amostra para a polpa de açaí.

Em relação ao método β-caroteno, os resultados são obtidos a partir da equação 6, descrita no item 4.2.6.2, e seu resultado é expresso em % de atividade antioxidante, variando de 74,659 a 47,141 % (polpa de açaí e *goji berry*, respectivamente).

Avaliando a atividade antioxidante do *goji berry*, Donno et al. (2014), obtiveram uma resposta de 20,89 μmol de Fe<sup>2+</sup>/g de amostra para o *goji berry* pelo método FRAP, inferior ao encontrado nesse estudo. Para a análise de β-caroteno/ácido linoleico, Pertuzatti et al. (2014) obtiveram uma porcentagem de atividade antioxidante de 60,9 % para extratos de mirtilo, resultado semelhante ao presente estudo.

Em relação aos resultados obtidos, as amostras diferiram significativamente nos quatro métodos realizados. O resultado para polpa de açaí foi superior nas análises FRAP, ABTS e β-caroteno, enquanto o resultado para o mirtilo foi superior apenas no ensaio DPPH. O *goji berry* em todos os ensaios obteve a menor atividade antioxidante comparado a polpa de açaí e mirtilo.

A análise de componentes principais (ACP) foi realizada sobre o conjunto de dados dos teores de antocianinas e de atividade antioxidante. Duas componentes principais foram identificadas, apresentando 99,50 % da variância explicada, PC1 com 88,16 % de variação, e PC2 com 11,33 % (Figura 27AB). Houve a formação de três grupos representados pelas amostras analisadas (polpa de açaí, mirtilo e goji berry) e distribuídos nos quadrantes do gráfico de escores do ACP (Figura 27A). O primeiro grupo é representado pela polpa de açaí (segundo quadrante Figura 27B), o qual apresenta alta atividade antioxidante por ABTS, β-caroteno e FRAP. O extrato de mirtilo (terceiro quadrante/ Figura 27b) apresentou altos teores de antocianinas. O outro grupo, também como representante único foi o grupo do goji berry (quadrantes 1 e 4), que apresentou altos valores de EC<sub>50</sub> e foi a amostra mais diferente entre as demais compravado pelos resultados. As duas variáveis dependentes mais importantes na formação e ocorrência dos grupos foram a atividade antioxidante por FRAP e EC<sub>50</sub>, levando-se em conta, suas comunalidades. A variável menos importante na classificação dos grupos foi o teor de antocianinas totais. Os agrupamentos dos extratos das amostras polpa de açaí, mirtilo e goji berry em função de suas atividades antioxidantes e do teor de antocianinas totais foram passíveis de serem analisados por ACP.

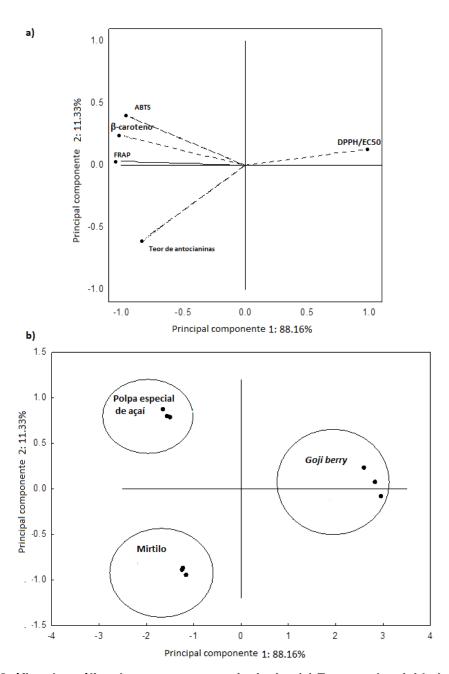


Figura 27 – Gráfico da análise de componentes principais: (a) Escores da atividade antioxidante e teor de antocianinas totais; (b) Projeção das amostras de polpa de açaí, mirtilo e *goji berry*.

#### 5.4.3 Identificação e Quantificação de Compostos Fenólicos

A identificação de compostos fenólicos nos extratos fenólicos das amostras polpa de açaí, mirtilo e *goji berry* foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência, por comparação com os tempos de retenção, similaridade espectral e comprimento de onda de maior absorção, em canais distintos com comprimentos de

onda de 280 nm e 360 nm. Já as quantificações dos mesmos foram calculadas a partir das respectivas curvas de calibração.

Os compostos fenólicos identificados e quantificados estão apresentados da Tabela 10. É possível visualizar a presença dos compostos catequina e rutina nas três amostras estudadas. Os compostos identificados para as três amostras, mirtilo, polpa de açaí e *goji berry* apresentaram diferença significativa em relação à quantificação dos mesmos.

Tabela 10 - Compostos fenólicos identificados por CLAE-FR em extratos fenólicos de polpa de açaí, mirtilo e *goji berry*.

Compostos	TR (min)	λ (nm)	Polpa de Açaí (µg/g)	Mirtilo (μg/g)	Goji berry (µg/g)
Catequina	11.64	277	$22,76^{\circ} \pm 0,001$	55,91a ± 0,001	$50,06^{b} \pm 0,002$
Ácido caféico	15.68	321	n.d.	$16,58^{b} \pm 0,001$	$150,52^a \pm 0,002$
Epicatequina	17.77	277	$30,38^a \pm 0,001$	$7,69^{b} \pm 0,001$	n.d.
Ácido cumárico	22.07	308	n.d.	n.d.	$122,90 \pm 0,005$
Ácido ferrúlico	23.71	321	n.d.	$118,61^a \pm 0,002$	$69,02^{b} \pm 0,001$
Rutina	24.89	353	$1,29^{\circ} \pm 0,000$	$91,45^{b} \pm 0,000$	$325,62^a \pm 0,001$
Miricetina	27.95	371	$54,21 \pm 0,001$	n.d.	n.d.

Média  $\pm$  Desvio Padrão. TR: tempo de retenção; CF: Compostos fenólicos identificados por CLAE.  $\lambda$ : comprimento de onda. Médias seguidas de letras diferentes em uma mesma linha diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey e teste T de Student (p  $\leq$  0,05).

As amostras diferiram significativamente em todos os compostos quando identificados o mesmo compostos em duas ou três amostras. Para a polpa de açaí, os compostos identificados foram a catequina, epicatequina, rutina e miricetina dentre os padrões utilizados, sendo a miricetina (54,21 µg/g) presente em maior quantidade, enquanto em menor concentração a rutina, com 1,29 µg/g (Figura 28).

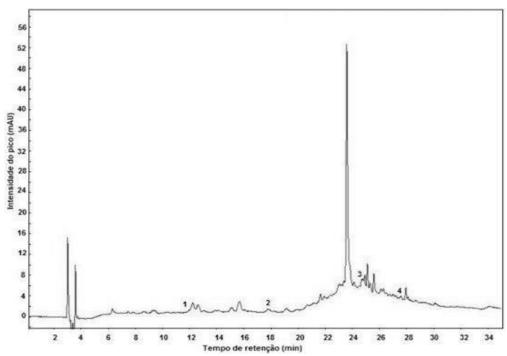


Figura 28 - Cromatograma obtido por CLAE (λ = 360) para o extrato liofilizado de polpa de açaí. Picos identificados: (1) Catequina; (2) Epicatequina; (3) Rutina; (4) Miricetina.

Os compostos catequina, ácido caféico, epicatequina, ácido ferrúlico e a rutina foram identificados no extrato de mirtilo, variando de 7,69 µg/g (epicatequina) a 118,61 µg/g (ácido ferrúlico) (Figura 29).

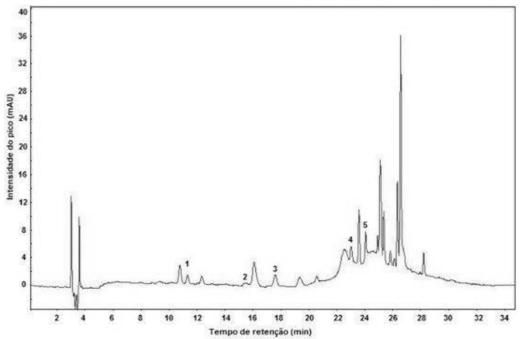


Figura 29 - Cromatograma obtido por CLAE (λ = 360) para o extrato liofilizado de mirtilo. Picos identificados: (1) Catequina; (2) Ácido cafeico; (3) Epicatequina; (4) Ácido ferrúlico; (5) Rutina.

No extrato de *goji berry* foram identificados 5 compostos dentre os 12 padrões utilizados, sendo eles: catequina, ácido cafeico, ácido cumárico, ácido ferrúlico e rutina. As concentrações variaram de 50,06 µg/g para a catequina e rutina na concentração de 325,62 µg/g (Figura 30).

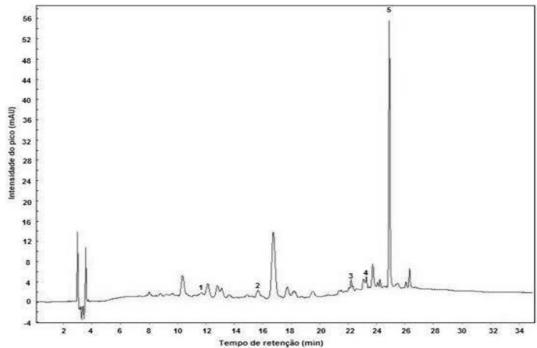


Figura 30 - Cromatograma obtido por CLAE (λ = 360) para o extrato liofilizado de *goji berry*. Picos identificados: (1) Catequina; (2) Ácido Cafeico; (3) Ácido cumárico; (4) Ácido ferrúlico; (5) Rutina.

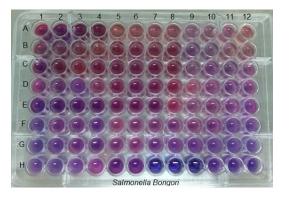
Estudos com identificação e quantificação de compostos fenólicos podem ser encontrados na literatura, porém o método empregado, equipamento e condições para separação e identificação são distintos. Wang et al., (2010) identificaram em seus trabalhos com o *goji berry* flavonoides como rutina, quercetina e o ácido cafeico em maiores concentrações. Já Donno et al. (2014) identificaram o ácido cafeico, cumárico, ferrúlico e a epicatequina em concentrações superiores. Em estudos com o açaí, compostos como ácido gálico, ácido cafeico, ácido vanílico já foram identificados por Gordon et al. (2012).

As divergências entre os valores encontrados neste trabalho frente aos de outros pesquisadores, quantidades variadas, presença ou ausência de alguns compostos nos extratos, podem estar associadas a diferenças na extração, sensibilidade do equipamento, solventes e metodologias distintas, onde a temperatura, tempo de eluição, coluna, e também fatores associados as amostras,

como cultivar, forma de cultivo, entre outros, podem ser os aspectos para essas diferenças nos resultados.

#### 5.4.4 Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima

A concentração inibitória mínima foi realizada com as bactérias *Staphylococcus* aureus (ATCC 25923) e *Salmonella Bongori* (ATCC 43975). Os extratos das amostras, polpa de açaí, mirtilo e *goji berry*, foram preparados nas concentrações de 95,00 mg/mL a 2,34 mg/mL. Em nenhuma das concentrações testadas ocorreu inibição no crescimento bacteriano, visualizado nos poços A à G, conforme a Figura 31. Os poços localizados na linha H foram utilizados para os controles positivos e negativos, utilizando etanol P.A. (poços 1, 2, 3), etanol 80 % (poços 4, 5, 6), antibiótico clorofenicol 0,12 % nos poços 7, 8, 9 e por fim nos poços 10, 11 e 12 apenas o meio contento a bactéria. Visualmente é possível observar que o etanol P.A. e etanol 80 % não apresentaram inibição contra as bactérias testadas, enquanto o antibiótico clorofenicol 0,12 % apresentou inibição visualizado pela forte coloração azul, característica da inibição bactericida.





**Figura 31 - Placa de 96 poços após ser adicionado corante Resazurina para a análise de CIM.** Placa à direita contendo bactéria *Salmonella bongori e a* esquerda *Staphylococcus aureus*. Poços <u>1, 2, 3 e 4</u> contento extrato de polpa de açaí, <u>5, 6, 7 e 8</u> extratos de mirtilo e <u>9, 10, 11 e 12</u> extratos de *goji berry*. Concentrações variando de 95 mg.mL<sup>-1</sup> a 2,34 mg.mL<sup>-1</sup> nos poços <u>A à G, respectivamente</u>. Linha H: controle negativo (Poços 1 a 6) e positivo (7 a 9), poços 10 a 12 contento apenas a bactéria.

Estudos realizados com amostras de açaí e mirtilo já foram relatados na literatura contra bactérias gram positivas e gram negativas e seus resultados

mostram-se satisfatórios contra diversas bactérias (SHEN et al., 2014; MARIEM et al., 2014; BELDA-GALBIS et al., 2015).

Apesar da ausência da ação bactericida das amostras testadas nesse estudo, não se pode afirmar que as amostras estudas não apresentem essa atividade. Demais estudos devem ser realizados diversificando a concentração dos extratos e maneira de extração desses compostos, pois é possível verificar que nas concentrações testadas os compostos extraídos não foram capazes na inibição do crescimento das bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Salmonella bongori* (ATCC 43975).

### 5.5 CARACTERIZAÇÃO DO QUEIJO PETIT SUISSE

#### 5.5.1 Composição Físico Química do Leite e creme de leite

As análises realizadas como controle do creme de leite e do leite utilizadas para fabricação do queijo *petit suisse*, estão descritas nas Tabelas 11 e 12, respectivamente.

Tabela 11 - Análise físico-química do creme de leite

Análises	Valor Prático	Valor teórico
Acidez (ac. láctico/100mL)	$0,062 \pm 0,001$	Máximo: 0,20
Matéria Gorda (g/100g)	$48,872 \pm 0,317$	Mínimo: 45

Tabela 12 - Análises físico-química do leite

7 than 555 holds quilled do lotts		
Análises	Valor Prático	Valor teórico
рН	6,8	6,6 - 6,8
Acidez (ac. láctico/100mL)	0,15	0,14 a 0,16
Crioscopia (⁰H)	- 0,533	0,530 a -0,550
Densidade (15/15 °C, g/mL)	1,032	1,028 a 1,034
Proteína (g/100g)	3,2	Mínimo de 2,9
Gordura (g/100g)	3,2	Mínimo de 3,0
Peroxidase	+	+
Fosfatase	-	-
EST( Extrato seco total) (%)	11,22	Mínimo 11,5
ESD (Extrato seco desengordurado) (%)	8,92	Mínimo 8,4

Todos os resultados foram comparados com a legislação vigente e encontramse de acordo com os parâmetros estabelecidos para o leite (BRASIL, 2002) e para o creme de leite (BRASIL, 2012), sendo assim em qualidade satisfatória para elaboração do queijo *petit suisse*.

#### 5.5.2 Elaboração do Queijo Petit Suisse

A elaboração do queijo *petit suisse* ocorreu através da coagulação curta de 45 minutos, obtendo massa lisa e homogênia. A quebra da massa foi realizada durante 15 minutos para melhor eliminação do soro, obtendo assim a massa base para o queijo *petit suisse* (Figura 32).



Figura 32 - Elaboração do queijo *petit suisse*.

(A): Homogeneização e coagulação da massa; (B): Corte da massa; (C): Quebra da massa; (D) Dessoragem.

Após adição dos extratos liofilizados das amostras mirtilo, polpa de açaí e *goji* berry, obtiveram-se os produtos com cores distintas e massa característica do queijo petit suisse (Figura 33).

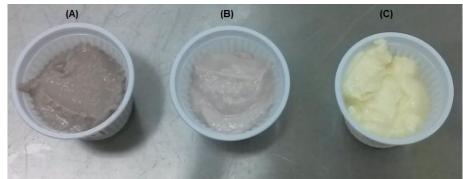


Figura 33 - Queijo petit suisse adicionados extratos fenólicos liofilizados de polpa de açaí (A), mirtilo (B) e goji berry (C).

As análises microbiológicas foram realizadas conforme legislação vigente e os resultados estão apresentados na Tabela 13. Todos os resultados referentes as análises microbiológicas estão de acordo com a legislação vigente, sendo assim, em ótima qualidade para a realização da análise sensorial.

Tabela 13 - Análise microbiológica para queijos de muita alta umidade com bactérias lácteas em forma viável e abundante

Análises	Resultados	Padrões da Legislação
Coliformes (NMP¹/mL) (44,5 °C)	<3,0 NMP¹/mL	5 x 10 <sup>2</sup>
Estafilococos/coag. Pos	<1,0 UFC <sup>2</sup> g/mL	$5 \times 10^{2}$
Salmonelas sp/25g	Ausente	Ausente
Listeria monocytongenes 25g	Ausente	Ausente

<sup>(1)</sup> UFC: Unidade formadora de colônias.

A composição centesimal do queijo *petit suisse* elaborado com extratos liofilizados das amostras polpa de açaí, mirtilo e *goji berry* esta apresenta na Tabela 14.

Tabela 14 - Composição físico química do queijo petit suisse com adição de extratos de compostos fenólicos liofilizados

Análises	PSA	PSM	PSG
Umidade (%)	53,144a ± 1,018	53,691a ± 0,085	53,478a ± 0,725
Cinzas (%)	$0,680^a \pm 0,004$	$0,626^a \pm 0,026$	$0,644^a \pm 0,035$
Lipídeos (%)	$20,395^a \pm 0,443$	20,073a± 0,044	$20,190^{a} \pm 0,427$
Proteína (%)	$6,306^a \pm 0,410$	$6,292^a \pm 0,743$	$6,507^a \pm 0,886$
Fibra Bruta (%)	$5,082^a \pm 0,662$	$5,092^a \pm 0,315$	$5,173^a \pm 0,251$
Carboidratos totais* (%)	$14,393^a \pm 0,278$	$14,226^a \pm 0,123$	$14,008^a \pm 0,225$
Extrato Seco Total (%)	$46,856^a \pm 0,159$	$46,809^a \pm 0,085$	$46,522^a \pm 0,725$
Gordura no Extrato Seco (%)	$43,201^a \pm 0,653$	42,882° 0,067	$43,298 \pm 0,654$
Acidez (°D)	$0,296^a \pm 0,003$	$0.321^a \pm 0.036$	$0.324^a \pm 0.004$

<sup>\*</sup>Carboidratos totais calculados por diferença. PSA: petit suisse com extrato de açaí; PSG: petit suisse com extrato de goji berry; PSM: petit suisse com extrato de mirtilo. Médias seguidas de letras iguais em uma mesma linha não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey (p≥0,05);

<sup>(2)</sup> NMP: Número mais provável

Os resultados apresentados não diferem significativamente em todos os tratamentos e em todas as análises. Esse resultado é explicado pelo fato de ter sido elaborado apenas uma massa e serem separados os tratamentos, onde apenas diferiu o extrato liofilizado das respectivas amostras. Conclui-se, portanto, não haver alteração de composição química dos produtos em função dos extratos adicionados.

De acordo com o regulamento Técnico de Identidade de Qualidade de Leite e Derivados (BRASIL, 2000) o queijo *petit suisse* é um queijo de muita alta umidade (superior a 55%). No presente estudo, a umidade permaneceu em torno de 53%, esse resultado pode ser explicado pela adição do extrato liofilizado e não de uma polpa que contém alta umidade, proporcionando o queijo *petit suisse* o alto teor de umidade citado na legislação. A matéria gorda no extrato seco é outro aspecto importante, onde os queijos que contenham entre 25,0 a 44,9% são classificados em queijo semigordo, como o queijo elaborado no presente estudo, variando de 42,9 a 43,3%. A porcentagem de proteínas também é preconizada no regulamento técnico de identidade de Qualidade de leite e derivados com o mínimo de 6%, os três produtos elaborados dentro do padrão estabelecido.

As demais análises não têm seus padrões estabelecidos pelo regulamento, apesar de terem importância para conhecer as propriedades nutricionais do produto.

#### 5.5.3 Análise de Cor

A cor na maioria dos alimentos pode ser fator essencial para aceitação ou rejeição pelo consumidor frente ao um novo produto. Quando a cor agrada dificilmente este alimento não será consumido ou pelo menos provado. Porém, dizer qual a cor de um respectivo produto, pode ser um trabalho um pouco mais complexo, pelo fato de que muitas pessoas acabam tendo perspectivas de cores diferentes, além que diversas condições podem afetar a tonalidade da cor.

O parâmetro L\* indica a luminosidade, podendo variar de zero (preto) a 100 (branco). Os parâmetros a\* e b\* representam as coordenadas cromáticas. A coordenada a\* varia do +a\* (vermelho) ao -a\* (verde), enquanto a coordenada b\* varia do +b\* (amerelo) ao -b\* (azul) (KONICA MINOLTA, 1998). Sendo assim, o espaço de cores L\*,a\*,b\*, ou também chamado de Espaço CIE Lab, foi criado pela CIE

(Comission Internacionale de L'Eclairage) em 1976 para reduzir problemas do espaço de cor (KONICA MINOLTA, 1998; QUEK et al., 2007).

Os valores referentes aos parâmetros L\*a\*b\* para as amostras de queijo *petit suisse* estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 15 - Análise de cor de queijo *petit suisse* com extratos liofilizados das amostras, polpa de açaí, mirtilo, *goji berry* e controle

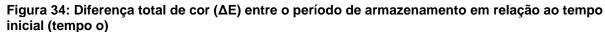
	Trotomontos	0 dias	30 dias
	Tratamentos		
	PSG	$55,60^{Aa} \pm 0,01$	$54,67^{\text{Bb}} \pm 0,04$
1*	PSM	$47,33^{Ca} \pm 0,01$	$46,88^{Cb} \pm 0,01$
L	PSA	$38,61^{Da} \pm 0,01$	$38,53^{Db} \pm 0,01$
	PSSP	$55,11^{Bb} \pm 0,01$	$55,19^{Aa} \pm 0,01$
	PSG	-2,11 <sup>Cb</sup> ± 0,01	-1,50 <sup>Ca</sup> ± 0,00
<b>*</b>	PSM	$0.92^{\text{Bb}} \pm 0.01$	$1,25^{Ba} \pm 0,01$
a*	PSA	$2,74^{Ab} \pm 0,04$	$3,49^{Aa} \pm 0,00$
	PSSP	$-2,30^{Da} \pm 0,01$	$-2,46^{Db} \pm 0,01$
	PSG	12,55 <sup>Ab</sup> ± 0,01	12,75 <sup>Aa</sup> ± 0,01
<b>6</b> *	PSM	$3,94^{Db} \pm 0,01$	$5,49^{Da} \pm 0,00$
b*	PSA	$5,28^{Cb} \pm 0,02$	$6,40^{Ca} \pm 0,01$
	PSSP	$11,47^{Ba} \pm 0,01$	$11,02^{\mathrm{Bb}} \pm 0,00$

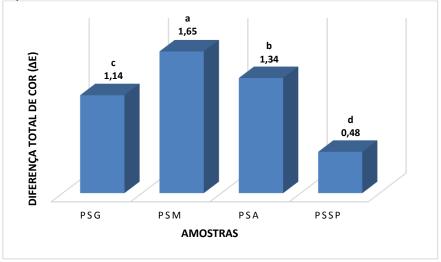
Valores das médias das triplicatas ± desvio padrão. Médias seguidas de letras iguais maiúsculas em uma mesma coluna e parâmetro não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey (p>0,05); Médias seguidas de letras iguais minúsculas em uma mesma linha não diferem estatisticamente entre si, pelo teste t de Student (p>0,05); PSA: petit suisse com extrato de polpa de açaí; PSG: petit suisse com extrato de goji berry; PSSP: queijo petit suisse adicionado de sorbato de potássio. PSM: petit suisse com extrato de mirtilo.

As amostras nos parâmetros L\*, a\*,b\* nos tempos 0 e 30 dias diferiram significativamente, confirmando a diferença na coloração das amostras adicionados dos extratos liofilizados. Isso confirma a existência de diferentes tipos de compostos que podem ser extraídos no processo e que dão cores características para cada amostra. O extrato liofilizado de polpa de açaí e mirtilo, apresentam grande variedade de compostos, como as antocianinas, que apresentam coloração azul-roxo, proporcionando uma luminosidade mais baixa comparada com as demais amostras. Saito (2014), observou em seus estudos uma forte correlação entre as variáveis luminosidade (L\*) e teor de antocianinas totais ao adicionar extratos de jabuticaba ao queijo *petit suisse*. O alto valor de L\* referente ao *petit suisse* adicionado de extrato de *goji berry* também é esperado pela tonalidade do extrato obtido.

Em relação aos dias de armazenamento, os parâmetros L\*, a\*, b\*, apresentaram diferença significativa em todas as amostras. Isso se deve possivelmente pela degradação de alguns compostos presentes, que podem ser influenciados pela presença de luz, oxigênio, embalagem, pH, entre outros.

Para a avaliação do tempo de armazenamento, o cálculo do  $\Delta E$  foi realizado, utilizando as variáveis  $\Delta L^*$ ,  $\Delta a^*$  e  $\Delta b^*$ . De acordo com Martínez et al. (2001), para que diferenças de cor sejam percebidas visualmente, os valores de  $\Delta E$  devem ser maiores que 2,7. Takatsui (2011) afirma que os estudos referentes ao limite da diferença euclidiana ( $\Delta E$ ) são escassos e necessitam de cautela para cada caso, para o mesmo autor valores iguais ou inferiores a 3,7 não podem ser perceptíveis a visão humana. Já para Stokes et al. (1992), valores de  $\Delta E$  superiores a 2,15 são percebido a olho nú. Apesar dos distintos valores relatados na literatura, todos os valores apresentados são inferiores a 1,65 (Figura 34) e diferem estatisticamente entre si, para os tempos 0 e 30 dias de armazenamento, sendo assim não perceptíveis ao olho humano, apesar da diferença significativa apontada nos parâmetros L\*, a\*, b\*.





PSA: queijo *petit suisse* adicionado de extrato de compostos fenólicos de polpa de açaí. PSM: queijo *petit suisse* adicionado de extrato de compostos fenólicos de mirtilo. PSG: queijo *petit suisse* adicionado de extrato de compostos fenólicos de *goji berry*. PSSP: queijo *petit suisse* adicionado de sorbato de potássio

## 5.5.4 Substâncias Reativas ao Ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS)

A análise do ácido 2-tiobarbitúrico se baseia na reação entre o ácido com os produtos de decomposição, sendo o malonaldeído o principal composto formado durante a oxidação. Assim a molécula de malonaldeído reage com duas moléculas de

acido 2-tiobarbiturico, formando um complexo de coloração avermelhada, observada no comprimento de onda de 532 nm.

A análise da reação do ácido tiobarbitúrico foi realizada para quatro os tratamentos do queijo *petit suisse* (mirtilo, polpa de açaí, *goji berry* e controle), durante o tempo 0, 7, 14, 21 e 28 dias, conforme Tabela 16.

Tabela 16 - Valores médios referentes à análise TBARS nos diferentes tratamentos e durante o período de armazenamento do produto.

Dias -	TBAR	TBARS (mg de malonaldeído/100 g de amostra)						
Dias	PSA	PSM	PSG	PSSP				
0	$0.05^{b,C} \pm 0.01$	$0,14^{a,B} \pm 0,01$	$0,21^{ab,A} \pm 0,04$	$0.13^{a,B} \pm 0.03$				
7	$0,10^{a,C} \pm 0,02$	$0,14^{a,B} \pm 0,03$	$0,23^{a,A} \pm 0,03$	$0,15^{a,B} \pm 0,02$				
14	$0.07^{b,C} \pm 0.01$	$0,15^{a,B} \pm 0,02$	$0,18^{b,A} \pm 0,01$	$0,14^{a,B} \pm 0,01$				
21	$0.06^{b,C} \pm 0.01$	$0,13^{a,B} \pm 0,01$	$0,17^{bc,A} \pm 0,01$	$0,12^{a,B} \pm 0,01$				
28	$0.06^{b,C} \pm 0.03$	$0,10^{b,BC} \pm 0,01$	$0,13^{c,AB} \pm 0,02$	$0,15^{a,A} \pm 0,05$				

± desvio padrão. Letras minúscula diferentes na mesma coluna diferem significativamente (p≤0,05) pelo teste Tukey. Letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem significativamente (p≤0,05) pelo teste Tukey. PSA: queijo *petit suisse* adicionado de extrato de compostos fenólicos de polpa de açaí. PSM: queijo *petit suisse* adicionado de extrato de compostos fenólicos de mirtilo. PSG: queijo *petit suisse* adicionado de extrato de compostos fenólicos de *goji berry*. PSSP: queijo *petit suisse* adicionado de sorbato de potássio.

Em relação ao tempo 0, isto é, ao primeiro dia após a elaboração do produto, a amostra PSG apresentou a maior concentração de malonaldeído por 100 gramas de amostra, diferindo significativamente entre as demais O PSM e PSSP (amostra adicionada de apenas sorbato de potássio), não diferiram significativamente e por fim o PSA obteve a menor concentração de malonaldeído. Com 7 dias de armazenamento até 21 dias, o mesmo perfil foi observado, permanecendo o *PSG* com a maior concentração de malonaldeído e o PSA com a menor proporção. No 28º dia, o *PSG* não diferiu significativamente do PSM e do PSSP e novamente o PSA diferiu significativamente entre os demais, tendo a menor concentração de malonaldeído.

Em relação a cada amostra e os dias de armazenamento, o comportamento do PSA, PSM e PSG apresentou características semelhantes. Ocorreu um aumento na concentração de malonaldeído no 7º dia para a amostra contendo PSA e PSG. Já para o PSM, a maior concentração foi no 14º dia. Após os respectivos dias ocorre o decaimento na concentração até o 28º dia, último dia de análise. Na amostra PSSP mostrou um aumento nos 7º e 28º dias, porém não houve diferença significativa em todos os dias de armazenamento.

São escassos os trabalhos apresentados na literatura que utilizam o TBARS para avaliar a oxidação em queijo *petit suisse*, contudo, trabalhos que avaliam a estabilidade oxidativa de produtos lácteos são relatados. Valor próximo ao relatado nesse estudo foi obtido por Ünalan et al. (2013) que avaliaram a estabilidade oxidativa em queijo fresco Kashar e obtiveram como resultado aos 35 dias de armazenamento a 4 °C a concentração de 0,125 mg MDA/100 g de queijo. Já Miguel, Valdez e Rossi, (2004) desenvolveram um sorvete de iogurte e aos 30 dias obtiveram uma concentração de 4,32 mg de malonaldeído/g de amostra.

Contudo, é possível verificar a eficácia na adição de compostos bioativos extraídos das amostras, mirtilo, *goji berry* e polpa de açaí em queijo *petit suisse*, obtendo um produto de excelente qualidade nutricional e funcional além de não conter compostos sintéticos para conservação do mesmo.

#### 5.5.5 Avaliação hedônica

A avaliação hedônica foi realizada no dia 15/09/2015 das 8 h às 12 h no Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR – Campus Pato Branco), com aprovação do comitê de ética sob parecer nº 1.103.775, divulgado pelo comitê de ética em Pesquisa (CEP) na data de 11/06/2015. Os julgadores receberam quatro amostras de queijo *petit suisse*, três elaboradas no laboratório de laticínios da UTFPR – Campus Medianeira e adicionados extratos liofilizados das amostras polpa de açaí, mirtilo e *goji berry*, e uma quarta amostra foi adquirida no mercado local, de sabor morango.

A análise foi realizada com 100 julgadores não treinados, sendo esses 52 do sexo feminino e 48 do sexo masculino. A idade média dos julgadores foi de 22 anos, contudo 90% dos julgadores presentes tinham idade entre 18 a 29 anos, 6% de 30 a 39 anos, 2% de 40 a 49 anos e 2% de 50 a 59 anos. O perfil das idades é resultado do local de realização dos testes hedônica.

Em relação a frequência de consumo do queijo *petit suisse*, os julgadores em sua maioria consomem esse produto "nem todo o mês", correspondendo a 41% do total de julgadores presentes. Nenhum dos julgadores presentes consomem esse produto diariamente e "nunca consome" foi a segunda maior porcentagem (19%) de

consumo (Figura 35). Isso é coerente devido a idade dos julgadores, já que a mídia/marketing expõe esse produto destinado para crianças e não à jovens e/ou adultos.

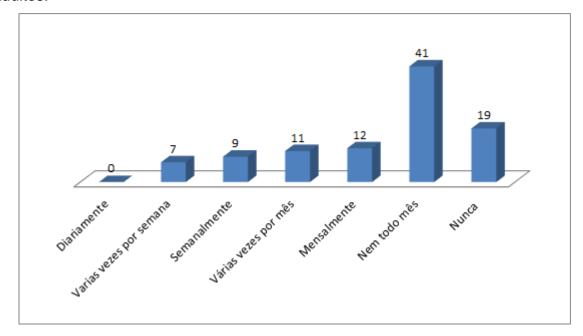


Figura 35 - Frequência de consumo de queijo petit suisse pelos julgadores (%).

Para cada produto, atributos de cor, odor, aparência e sabor foram analisados por cada julgador através de escala estrutural de 9 pontos, variando desde "desgostei muitíssimo" (nota 1) até "gostei muitíssimo" (nota 9) (Tabela 17).

Tabela 17 - Média das notas dadas pelos julgadores para avaliação das amostras

Atributos	PSA	PSM	PSG	PSC
Cor	4,13 <sup>dC</sup>	4,74 <sup>cB</sup>	7,20 <sup>bA</sup>	8,32 <sup>aA</sup>
Odor	5,71 <sup>cA</sup>	5,68cA	6,37 <sup>bC</sup>	7,91 <sup>aB</sup>
<b>Aparência</b>	4,15 <sup>dC</sup>	4,81 <sup>cB</sup>	7,08 <sup>bAB</sup>	8,32 <sup>aA</sup>
Sabor	4,85 <sup>dB</sup>	5,71 <sup>cA</sup>	6,65 <sup>bBC</sup>	8,23 <sup>aAB</sup>

\*Escala hedônica: 1: desgostei muitíssimo; 2: desgostei muito; 3: desgostei regularmente; 4: desgostei ligeiramente; 5: indiferente; 6: gostei ligeiramente; 7: gostei regularmente; 8: gostei muito; 9: gostei muitíssimo/ Médias seguidas de letras iguais minúsculas na mesma linha não diferem significativamente. Médias seguidas de letras iguais maiúsculas na mesma coluna não diferem significativamente (p<0,05). PSA: petit suisse com extrato de polpa de açaí; PSG: petit suisse com extrato de goji berry; PSC: petit suisse adquirido no comercio local; PSM: petit suisse com extrato de mirtilo.

Em análise a escala hedônica para os atributos odor, cor, sabor e aparência, a amostra comercial (PSC) apresentou-se superior e diferente das demais amostras (p ≤ 0,05). Entre as amostras elaboradas com extratos liofilizados, o queijo *petit suisse* com extrato de *goji berry* (PSG), também diferiu significativamente das demais e

obteve maior nota em relação a todos os atributos avaliados, seguido do queijo *petit suisse* com extrato de mirtilo (PSM) e queijo *petit suisse* com extrato de polpa de açaí (PSA) com as menores notas atribuídas pelos julgadores. O único atributo que não apresentou diferença significativa foi o odor para as amostras PSA e PSM.

Para as amostras analisadas individualmente em relação aos atributos, é possível avaliar quais foram significativos para a avaliação global do julgador. Em todas as amostras, a cor e aparência não tiveram diferença significativa entre si e diferiram-se entre os demais atributos. Para as amostras PSG e PSC, a cor e a aparência, obtiveram as maiores notas na avaliação, porém para o PSA e PSM essas notas foram as menores comparadas aos demais atributos, ressaltando a importância da qualidade visual do produto. Avaliando a amostra PSA, o atributo odor obteve maior nota entre os demais, já para a amostra PSM o odor e o sabor foram superiores.

A impressão global foi outro atributo utilizado para avaliar as amostras individualmente, onde o cálculo da aceitação do consumidor para cada amostra foi realizado e seu resultado expresso em porcentagem de aceitação (Figura 36). A amostra comercial obteve aceitação de 91,56% enquanto o PSA obteve a menor porcentagem de aceitação (55,78%) e todas diferiram significativamente entre si.

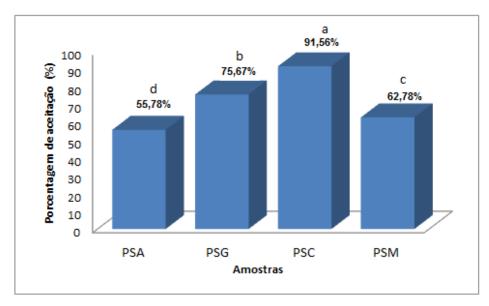


Figura 36 – Índice de aceitabilidade para as amostras de queijo petit suisse. PSA: petit suisse com extrato de polpa de açaí; PSG: petit suisse com extrato de goji berry; PSC: petit suisse adquirido no comercio local; PSM: petit suisse com extrato de mirtilo. Médias seguidas de letras diferentes minúsculas diferem significativamente ( $p \le 0,05$ ).

Segundo Dutcosky (2007), a repercussão é favorável quando o índice de aceitabilidade for maior ou igual 70%, sendo assim, apenas a amostra contendo

extrato liofilizado de *goji berry* foi aceita pelo consumidor entre as elaboradas e a comercial que já é reconhecida e aprovada pelos consumidores em geral.

A porcentagem de aceitação das amostras pode ser esclarecida por diferentes questões que podem ter prejudicado a aceitação dos consumidores quando recebiam os queijos com adição dos extratos liofilizados. É possível que se os julgadores soubessem o que realmente estavam provando, não teria um impacto negativo em relação a aparência e coloração da amostra, onde as mesmas apresentaram-se diferentes das amostras comerciais já aceitas pelo consumidor, por serem isentas de corantes, aromas e espessantes. Saito (2014), avaliou em seus estudos a aceitabilidade de queijo *petit suisse* sem a informação do produto e com as informações nutricionais necessárias, e obteve um aumento significativo em relação as notas referentes a cor e consistência, e concluiu que a disponibilização de informações sobre o produto ao consumidor pode influenciar positivamente na sua aceitação e escolha no momento da compra. Veiga et al., (2000) avaliaram 6 amostras comerciais de queijo *petit suisse* e obtiveram como índices de aceitação 43,66 a 84%, os autores acreditam que as menores notas sejam causadas pela alta sinérese visual e sabor desagradável.

Afim de se verificar a preferência entre as amostras aplicou-se o teste de ordenação e a partir da soma dos valores atribuídos pelos julgadores, representados pela Tabela 18.

Tabela 18 - Módulos das diferenças entre os pares da soma total da ordenação da preferência

Amostras	PSA	PSG	PSC	PSM
Somatório	358ª	<b>226</b> <sup>c</sup>	119 <sup>d</sup>	296 <sup>b</sup>
Diferença Versus PSA	-	132	239	62
Diferença Versus PSG	-	-	107	70
Diferença Versus PSC	_	-	-	177

PSA: petit suisse com extrato de polpa de açaí; PSG: petit suisse com extrato de goji berry, PSC: petit suisse adquirido no comercio local; PSM: petit suisse com extrato de mirtilo. Pares de soma de ordens seguidas pela mesma letra não diferem entre si (quanto à preferência), pelo teste de Friedman (T<sub>tabelado</sub> = 47), a 5 % de probabilidade.

É possível verificar a partir da Tabela 18, que as amostras diferiram significativamente entre si em relação a preferência do consumido. Isso é possível concluir a partir da diferença do somatório entre duas amostras e comparadas ao valor crítico de diferença de soma de ordens (diferença mínima significativa) obtido na Tabela de Newell e Macfarlane (IAL, 2008).

Com a diferença significativa comprovada em todas as amostras, é possível afirmar que a amostra PSC obteve maior preferência pelos julgadores, seguida do PSG. Entretanto, a amostra menos preferida, que obteve maior somatória, foi a PSA. Estes resultados corroboram com a porcentagem de aceitação obtida através da impressão global, onde as maiores porcentagens de aceitação foram para o PSC e PSG.

Outro importante aspecto a ser abordado é a intenção de compra pelo consumidor. Os resultados evidenciaram que 98% dos julgadores comprariam um ou mais produtos analisados. A partir desses julgadores, a porcentagem de intenção de cada produto foi analisada (Figura 37). O tratamento *petit suisse* comercial obteve a maior intenção de compra (58,97%), seguida do *petit suisse* com extrato de *goji berry* (22,44%), do *petit suisse* com extrato de mirtilo (14,74%) e do *petit suisse* com extrato de polpa de açaí (3,85%).

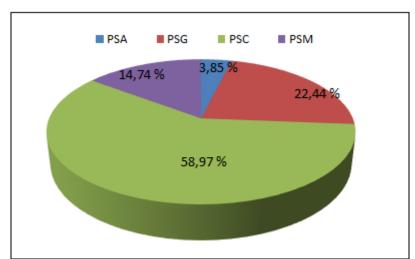


Figura 37 – Teste de intenção de compra dos diferentes tratamentos.

PSA: petit suisse com extrato liofilizado de polpa de açaí; PSG: petit suisse com extrato liofilizado de goji berry; PSC: petit suisse adquirido no comercio local; PSM: petit suisse com extrato liofilizado de mirtilo.

A partir dos dados analisados, é possível verificar que as amostras PSA e PSM apresentaram baixos índices de aceitação pelo julgador em todos os testes utilizados. Novos estudos podem ser realizados variando a concentração dos extratos para verificar qual porcentagem o julgador aceitaria e correlacionando com a oxidação lipídica e conservação do produto. Ao início da análise seria necessário comunicar ao julgador sobre a amostra que ele irá provar, ressaltando que o mesmo é um produto funcional, com alta qualidade nutricional, sem conservantes, corantes e espessantes,

para que o mesmo compreenda que o produto apresenta características diferentes do produto fornecido no comércio.

Com o objetivo de verificar as variáveis influentes na aceitação global do queijo petit suisse, aplicou-se a análise multivariada regressão logística multinomial. Para realização do teste, cada variável, como idade, sexo, frequência de consumo, cor, odor, sabor, aparência e impressão global foi dividida em três subgrupos, como apresentado na Tabela 19.

Tabela 19 - Variáveis utilizadas para avaliação do queijo *petit suisse* divididas em subgrupos para análise de Wald.

a anance as maia.			
Variável	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Idade	18 a 20 anos	21 – 25 anos	26 – 30 anos
Frequência de consumo	Diariamente até mensalmente	Nem todo mês	Nunca
Variáveis*	Notas 1 a 3	Notas 4 a 6	Notas 7 a 9

<sup>\*</sup>Cor; Odor; Aparência; Sabor; Impressão Global. Variáveis: 1: desgostei muitíssimo; 2: desgostei muito; 3: desgostei regularmente; 4: desgostei ligeiramente; 5: indiferente; 6: gostei ligeiramente; 7: gostei regularmente; 8: gostei muito; 9: gostei muitíssimo.

A tabela 20 apresenta a significância estatística para cada variável independente, pelo teste de Wald.

Tabela 20 - Análise de regressão logística multivariada de Wald

Variáveis	Wald	p-valor*
Idade	0,07627	0,962581
Frequência de consumo	1,25778	0,868497
Cor	3,50413	0,173416
Odor	12,63543	0,001804
<b>Aparência</b>	14,67334	0,000651
Sabor	80,01851	0,000000
Gênero	1,03887	0,594857

<sup>\*</sup>p-valor ≥ 0,05 não interferem nos resultados referentes a impressão global.

Os atributos sensoriais sabor, aparência e odor, nessa ordem de importância, foram os únicos a apresentar efeito significativo na impressão global de queijo *petit suisse* (Tabela 20). A fim de melhor compreender o efeito dessas variáveis na aceitação, fez análise por *box plot* (Figura 38). Em relação a cor, outro atributo sensorial avaliado, não foi verificada interferência nos resultados de impressão global.

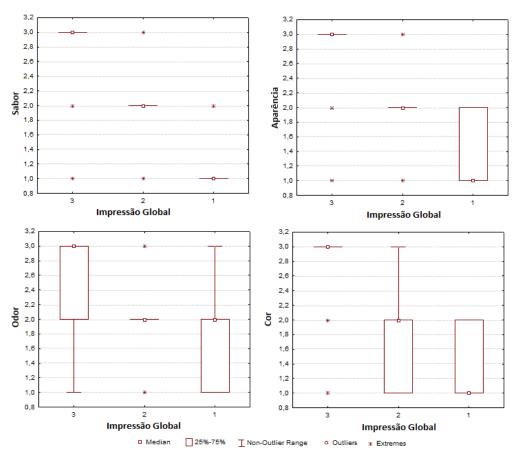


Figura 38 – Gráfico *box plot* referente aos atributos sensoriais: sabor, aparência, sabor e cor referentes a impressão global.

Notas 1 a 3 da escala hedônica refere-se ao 1, notas 4 a 6 da escala hedônica refere-se ao 2, notas 7 a 9 da escala hedônica refere-se ao 3.

A análise por *box plot* sugere relação entre: efeito significativo; linearidade entre atributo e aceitação; e densidade das respostas. Observa-se claramente a julgar pelos valores da mediana, linearidade entre as notas do atributo sabor e impressão global, além de alta densidade. O mesmo ocorre para aparência, segunda variável com maior efeito na aceitação. A partir do atributo odor, as notas passam a ter valores menos densos e a linearidade entre as notas desse atributo e impressão global diminuem. Em paralelo verifica-se redução da significância de Wald. Comportamento semelhante ao odor é possível verificar no atributo cor, onde a linearidade entre a cor e impressão global é baixo, ocasionando na ausência na significância de Wald.

Os resultados significativos na análise sequencial de Wald para o sabor e aparência são satisfatórios, visto que são os principais parâmetros em que os consumidores levam em consideração ao avaliar e/ou adquirir produtos alimentícios. A aparência de uma amostra acaba sendo o primeiro contato do consumidor com o produto a ser adquirido, apesar da cor não apresentar significância na análise, ela

pode ser englobada na aparência, assim é possível verificar que apenas a cor não faz com que o consumidor goste ou não do produto, mas sim um conjunto de atributos, para que a ideia do gostar ou desgostar seja evidenciada.

É possível verificar que pelo coeficiente logístico de Wald (Tabela 20), os atributos relacionados com as características demográficas dos julgadores não interferiram (p ≥ 0,05) nos resultados referentes a impressão global, indicando que a faixa de idade dos participantes, o gênero e que a frequência de consumo do queijo petit suisse não interferem na aceitação global do produto. A partir da análise por box plot, é possível verificar a falta de linearidade entre as características demográficas em relação a impressão global (Figura 39). Esse resultado é fundamental, visto que os produtos quando são lançados para a venda, tem a intenção de englobar o maior número de consumidores possíveis, independente de idade, gênero e a frequência que esses consumidores possam consumir os produtos já existentes do mercado.

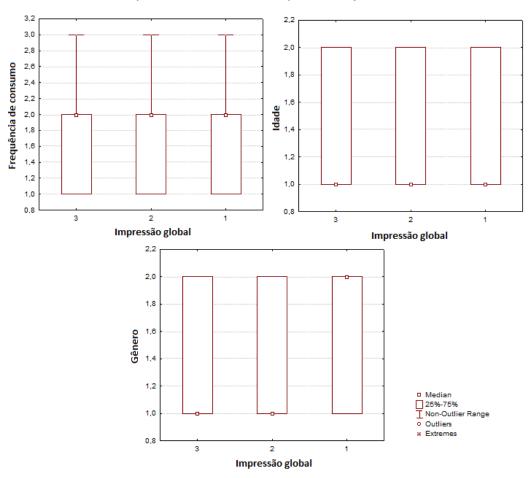


Figura 39 - Gráfico *box plot* referente as características demográficas idade, frequência de consumo e gênero referentes a impressão global.

\*Notas 1 a 3 da escala hedônica refere-se ao 1, notas 4 a 6 da escala hedônica refere-se ao 2, notas 7 a 9 da escala hedônica refere-se ao 3. Idade: 1 = 18 a 20 anos; 2 = 21 – 25 anos; 3 = 26 – 30 anos. Frequência de consumo: 1 = diariamente até mensalmente, 2 = nem todo mês; 3 = nunca. Gênero: 1 = masculino; 2 = feminino.

#### 6 CONCLUSÃO

Entre as amostras estudadas, foi possível observar o alto teor lipídico e de fibras dietéticas totais presentes na polpa de açaí e também um elevado teor de carboidratos totais nas amostras de mirtilo e *goji berry*.

O modelo gerado pelo delineamento experimental e metodologia de superfície de resposta (MSR) demonstrou que o tipo de solvente, a temperatura e o tempo de extração influenciam na extração dos compostos fenólicos com atividade antioxidante. A melhor condição de extração dos compostos bioativos recomendado pelo modelo foi a utilização do etanol 80% como solvente extrator, em temperatura de 60 °C durante 60 min de extração. Nesta melhor condição foi possível extrair compostos reconhecidamente bioativos como os ácidos fenólicos (ácido cafeico, ácido cumárico e ácido ferrúlico) e flavonoides (catequina, epicatequina, rutina e miricetina).

O goji berry apresentou valores inferiores de atividade antioxidante e antocianinas totais e a polpa de açaí obteve os melhores resultados de atividade antioxidante em três dos quatro métodos avaliados, enquanto o mirtilo apresentou o maior teor de antocianinas totais.

Os extratos nas concentrações testadas, não apresentaram inibição contra as bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Salmonella bongori* (ATCC 43975), sendo considerado os mesmos valores de CIM > 95,00 mg/mL para as três amostras, polpa de açaí, mirtilo e *goji berry*.

Os resultados da análises físico-químicas demonstraram que o produto elaborado, queijo *Petit suisse*, estava dentro dos padrões estabelecidos pela legislação brasileira, com exceção do teor de umidade, com valores abaixo do adequado. A análise de cor realizada para avaliação da estabilidade do produto não apresentou diferença perceptível ao olho humano na tonalidade entre o primeiro e último dia de vida útil do produto. Na análise de TBARS, o queijo *petit suisse* adicionado de extrato liofilizado de polpa de açaí apresentou as menores concentrações de malonaldeído/100 g de amostra, corroborando com os altos valores de atividade antioxidante encontrados para este extrato. Aos 28 dias de armazenamento, os *petit suisse* contendo os extratos liofilizados das amostras apresentaram um poder de inibição da oxidação lipídica superior as amostras que continham apenas o conservante sorbato de potássio, exceto para o *goji berry*, que

não obteve diferença significativa. Isso demostra a eficiência da adição dos extratos liofilizados em produtos lácteos, como o queijo *petit suisse*.

O queijo petit suisse contendo extrato liofilizado de *goji berry* obteve a segunda maior aceitação (75,67%) entre os avaliadores. Os queijos adicionados de extratos de polpa de açaí e mirtilo apresentaram as menores aceitações, 55,78 e 62,78%, respectivamente, ficando com valores de aceitação abaixo do recomendado para a elaboração de um novo produto.

Os resultados apresentados nesse estudo podem ser úteis para se obter extratos ricos em compostos fenólicos com alta atividade antioxidante visando a elaboração de produtos lácteos funcionais.

#### REFERÊNCIAS

AHN, M. R.; KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; BANG, K. S.; NAKAYAMA, T. Antioxidant Activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 7286-7292, 2004.

ALBUQUERQUE, L. C. **Os queijos no mundo:** origem e tecnologia. Juiz de Fora: Templo, v. 2, 2002.

ALVES, S. M.; COHEN, K. O. **Sistema de Produção do Açaí.** Embrapa Amazônia Oriental, dez. 2006. Disponível em: <a href="http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Acai/SistemaProducaoAcai\_2ed/paginas/processamento.htm">http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Acai/SistemaProducaoAcai\_2ed/paginas/processamento.htm</a> Acesso em: 25 jan. 2015.

AMAGASE, H.; FARNSWORTH, N. R. A review of botanical characteristics, phytochemistry, clinical relevance in efficacy and safety of *Lycium barbarum* fruit (Goji). **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1702–1717, ago. 2011.

ANTUNES, L. E. C. Sistema de Produção do Mirtilo. Embrapa Clima Temperado, nov. 2007. Disponível em: < http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mirtilo/SistemaProducao Mirtilo/descricao.htm> Acesso em: 25 jan. 2015

AOAC. Association of Official Analytical Chemist International. **Official Methods of Analysis of AOAC International.** 17.ed. Gaithersburg (MD), 170p. 2000.

AOAC. Association of Official Analytical Chemist International. Total monomeric anthocyanin pigment contento f fruit juices, beverages, natural colorants, and wines. pH differential method. **Official Method 2005.02**. 2005.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, v.127, p.183–198, 2002.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quimica Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.

BELDA-GALBIS, C. M.; JIMÉNEZ-CARRETON, A.; PINA-PÉREZ, M. C.; MARTÍNEZ, A.; RODRIGO, D. Antimicrobial activity of açaí against Listeria innocua. **Food Control**, v. 53, p. 212–216, jul. 2015.

BECKER, E. M; NISSEN, L. R; SKIBSTED, L. H. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 219, p. 561-571, 2004

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft Und-technologie**, v.28, p.25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 53, de 29 de Dezembro de 2000. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo "Petit Suisse". **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 29 DE DEZEMBRO DE 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução - RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 de janeiro de 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 51, de 18 de Setembro de 2002. Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade de leite tipo B. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 de Setembro de 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 51, de 30 de agosto de 2012. Regulamento técnico de identidade e qualidade de nata. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 31 de agosto de 2012.

BRASIL. Consumo de frutas no Brasil está abaixo do recomendado pela OMS, mostra pesquisa. **Portal Brasil**. Jul., 2014. Disponível em: http://www.brasil.gov.br/saude/2011/08/consumo-de-frutas-no-brasil-esta-abaixo-do-recomendado-pela-oms-mostra-pesquisa Acesso em: 30 jan. 2015.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317–333, 1998.

BOATTO, D. A.; MESOMO, M. C.; MADRONA, G. S.; BRANCO, I. G.; MATUMOTO-PINTRO, P. T. Desenvolvimento e caracterização de queijo tipo petit suisse de soja

- comum e de soja livre de lipoxigenase, enriquecidos com cálcio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 766–770, 2010.
- CABRAL, I. S. R. Isolamento e identificação de compostos com atividade antibacteriana da própolis vermelha brasileira. 2008. 94f. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.
- CARVALHO, J. E. U. Árvore do conhecimento. Agencia Embrapa de Informação Tecnológica. 9 fev. 2011. Disponível em: <a href="http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/acai/Abertura.html">http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/acai/Abertura.html</a>. Acesso em: 30 jan. 2015.
- CARDARELLI, H. R.; BURITI, F. C. A.; CASTRO, I. A.; SAAD, S. M. I. Inulin and oligofructose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially synbiotic petit-suisse cheese. **LWT Food Science and Technology**, v. 41, n. 6, p. 1037–1046, jul. 2008.
- CARPES, S. T. Estudo das características físico-químicas e biológicas do Pólen apícola de Apis Mellifera I . da região sul do brasil. 2008. 255f. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.
- CASTREJÓN, A. D. R.; EICHHOLZ, I.; ROHNB S.; KROHB, L. W., HUYSKENS-KEIL, S. Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum L.*) during fruit maturation and ripening. **Food Chemistry**, v. 109, n. 3, p. 564–572, ago. 2008.
- CLERICI, M. T. P. S.; CARVALHO-SILVA, L. B. Nutritional bioactive compounds and technological aspects of minor fruits grown in Brazil. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1658–1670, ago. 2011.
- CLSI. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada Sexta Edição. **Norma M7-A6.** Vol. 23, 2005.
- DAHLE, L. K.; HILL, E. G.; HOLMAN, R. T. The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.98, p.253-261, 1962.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010, 900p.

DENG, Y.; YANG, G.; YUE, J.; QIAN, B.; LIU, Z.; WANG, D.; ZHONG, Y.; ZHAO, Y. Influences of ripening stages and extracting solvents on the polyphenolic compounds, antimicrobial and antioxidant activities of blueberry leaf extracts. **Food Control**, v. 38, p. 184–191, abr. 2014.

DONG, J. Z.; GAO, W. S.; LU, D. Y.; WANG, Y. Simultaneous Extraction and Analysis of Four Polyphenols From Leaves of Lycium barbarum L. **Journal of Food Biochemistry**, v. 35, n. 3, p. 914–931, 7 jun. 2009.

DONNO, D.; BECCARO, G. L.; MELLANO, M. G.; CERUTTI, A. K.; BOUNOUS, G. Goji berry fruit (*Lycium spp.*): antioxidant compound fingerprint and bioactivity evaluation. **Journal of Functional Foods**, p. 6–20, jun. 2014.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno / ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH •. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446–452, 2006.

DUTCOSKY, S. D. **Análise Sensorial de Alimentos**. 2 ed. rev. e ampl. Curitiba, PR: Champagnat, 2007, p. 239.

FACHINELLO, J. Mirtilo. **Revista Brasileira De Fruticultura.** Pelotas, v.30 n. 2, p 285-576, 2008.

FAVACHO, H. A. S.; OLIVEIRA, B. R.; SANTOS, K. C.; MEDEIROS, B. J. L.; SOUSA, P. J. C. PERAZZO, F. F. CARVALHO, J. C. T. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Euterpe oleracea Mart.*, Arecaceae, oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 1, p. 105–114, fev. 2011.

REGONESI, B. M.; YOKOSAWA, C. E.; OKADA, I. A.; MASSAFERA, G.; BRAGA COSTA, T. M.; PRADO, S. de P. T. Polpa de açaí congelada: características nutricionais, físico-químicas, microscópicas e avaliação da rotulagem. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 69, n. 3, p. 387–395, 2010.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD R. E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry.** 2000.

GOMES, S. Carotenóides: uma possível proteção contra o desenvolvimento de câncer Carotenoids: a possible protection against. **Revista de Nutrição**, v. 20, n. 5, p. 537–548, 2007.

GOODWIN, T. W. **Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments**. 2 ed. New York: Academic Press Inc., 1976.

GORDON, A.; CRUZ, A. P. G.; CABRAL, L. M. C.; FREITAS, S. C.; TAXI, C. M. A. D.; DONANGELO, C. M.; MATTIETTO, R. A.; FRIEDRICH, M.; MATTA, V. M.; MARX, F. Chemical characterization and evaluation of antioxidant properties of Açaí fruits (*Euterpe oleraceae Mart.*) during ripening. **Food chemistry**, v. 133, n. 2, p. 256–63, 15 jul. 2012.

HENRY, C. J. Functional foods. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 64, n. 7, p. 657–659, 2010.

HOFFMANN, A. **Mirtilo: Aspectos gerais da cultura.** Embrapa Uva e Vinho, abr. 2014. Disponível em: <a href="http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/mirtilo.html">http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/mirtilo.html</a> Acesso em: 30 jan. 2015.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ - IAL. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos, Versão eletrônica, 4. ed. São Paulo: IAL, 2008.

JACQUES, A.; PERTUZATTI, P.; BARCIA, M. Estabilidade de compostos bioativos em polpa congelada de amora-preta (Rubus fruticosus) cv. Tupy. **Quim. Nova**, v. 33, n. 8, p. 1720–1725, 2010.

JESUS, T. F. P. **O Mirtilo e suas Propriedades Terapêuticas.** 2013. 77f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2013.

KANG, J.; XIE, C.; LI, Z.; NAGARAJAN, S.; SCHAUSS, A.G.; WU, T.; WU, X. Flavonoids from acai (*Euterpe oleracea Mart.*) pulp and their antioxidant and anti-inflammatory activities. **Food Chemistry**, v. 128, n. 1, p. 152–157, set. 2011.

KANG, J.; THAKALI, K. M.; XIE, C.; KONDO, M.; TONG, Y.; OU, B.; JENSEN, G.; MEDINA, M. B.; SCHAUSS, A. G.; WU, X. Bioactivities of açaí (*Euterpe precatoria Mart.*) fruit pulp, superior antioxidant and anti-inflammatory properties to Euterpe oleracea Mart. **Food Chemistry**, v. 133, n. 3, p. 671–677, ago. 2012.

KAZEEM, M. I.; DAVIES, T. C. Anti-diabetic functional foods as sources of insulin secreting, insulin sensitizing and insulin mimetic agents. **Journal of Functional Foods**, v. 20, p. 122–138, 2015.

KOCA, I.; KARADENIZ, B. Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in the Black Sea Region of Turkey. **Scientia Horticulturae**, v. 121, n. 4, p. 447–450, ago. 2009.

KONICA MINOLTA S. Inc. Comunicação precisa da cor. 1998. 57 p.

KUKIC, J.; POPOVIC, V.; PETROVIC, S.; MUCAJI, P.; CIRIC, A.; STOJKOVIC, D.; SOKOVIC, M. Antioxidant and antimicrobial activity of *Cynara cardunculus* extracts. **Food Chemistry**, v. 107, n. 2, p. 861-868, 2008.

KUSKOSKI, E. M.; AGUSTÍN, G. A.; MORALES, M. T.; FETT, R. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, v. 36, n. 4, p. 1283–1287, 2006.

LEONG, S. Y.; OEY, I. Effects of processing on anthocyanins, carotenoids and vitamin C in summer fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 133, n. 4, p. 1577–1587, ago. 2012.

LI, X. M.; LI, X. L.; ZHOU, A. G. Evaluation of antioxidant activity of the polysaccharides extracted from Lycium barbarum fruits in vitro. **European Polymer Journal**, v. 43, n. 2, p. 488–497, fev. 2007.

MARIEM, C. et al. Antioxidant and antimicrobial properties of the extracts from Nitraria retusa fruits and their applications to meat product preservation. **Industrial Crops and Products**, v. 55, p. 295–303, abr. 2014.

MARTÍNEZ, J.A.; MELGOSA, M.; PÉREZ, M. M.; HITA, E.; NEGUERUELA A.I. Visual and instrumental color evaluation in red wines. **Food Science and Technology International**, v. 7, p. 439–444, 2001.

MARTINS, F. S. **Cacho de açaí**. EMBRAPA, Amapá 12 set. 2013. Disponível em: < https://www.embrapa.br/busca-de-imagens/-/midia/1038002/cacho-de-acai> Acesso em: 30 jan. 2015.

- MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G. ARAÚJO, C. R. TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS E CAPACIDADE. **Alim. Nutr.**, v. 19, n. 1, p. 67–72, 2008.
- MELO, P. S.; MASSARIOLI, A. P.; DENNY, C.; SANTOS, L. F.; FRANCHIN, M.; PEREIRA, G. E.; SOUZA, T. M. F.; ROSALEN, P. L.; ALENCAR, S. M. Winery by-products: Extraction optimization, phenolic composition and cytotoxic evaluation to act as a new source of scavenging of reactive oxygen species. **Food Chemistry**, v. 181, p. 160–169, 2015.
- MERCADANTE, A. Z.; CAPITANI, C. D.; DECKER, E. A.; CASTRO, I. A. Effect of natural pigments on the oxidative stability of sausages stored under refrigeration. **Meat Science**, v. 84, p. 718-726, 2010.
- MIGUEL, D. P. Desenvolvimento de sorvete de "iogurte" simbiótico à base de extrato aquoso de soja e de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) fermentado com *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014. (Doutor em Alimentos e Nutrição). Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araquara SP, 2009.
- MIGUEL, D. P.; VALDEZ, G. F. DE; ROSSI, E. A. Sensory and chemical aspects of frozen soy yogurt fermented with *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus jugurti*\*. **Alim. Nutr**, v. 15, n. 3, p. 197–201, 2004.
- MORAES, J. O.; PERTUZATTI, P. B.; CORRÊA, F. V.; SALAS-MELLADO, M. D. L. M. Estudo do mirtilo (Vaccinium ashei Reade) no processamento de produtos alimentícios. **18 Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 27, p. 18–22, 2007.
- NASCIMENTO, R. J. S.; COURI, S.; ANTONIASSI, R.; FREITAS, S. P. Composição em ácidos graxos do óleo da polpa de açaí extraído com enzimas e com hexano. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 30, n. 2, p. 498–502, 2008.
- NORBERTO, S.; SILVA, S.; MEIRELES, M.; FARIA, A.; PINTADO, M.; CALHAU, C. Blueberry anthocyanins in health promotion: A metabolic overview. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 4, p. 1518–1528, out. 2013.
- OLDONI, T. L. C.; OLIVEIRA, S. C.; ANDOLFATTO, S.; KARLING, M.; CALEGARI, M. A.; SADO, R. Y., MAIA, F. M. C.; ALENCAR, S. M.; LIMA V. A. Chemical Characterization and Optimization of the Extraction Process of Bioactive Compounds from Propolis Produced by Selected Bees. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 26, n. 10, p. 2054–2062, 2015.

OLIVEIRA, M. S. P.; CARVALHO, J. E. U.; NASCIMENTO, W. M. O.; MÜLLER, C. H. Cultivo do Açaizeiro para Produção de Frutos. Circular técnica 26, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, p. 1–18, 2002.

OLIVEIRA, M. DO S. P. DE; CARVALHO, J. E. U. DE; NASCIMENTO, W. M. O. DE. AÇAÍ (Euterpe oleracea Mart.). **Funep**, p. 1–49, 2000.

OLIVEIRA, S.; AQUINO, P. P.; MACHADO, S.; RIBEIRO, R.; PACHECO, R.; MARIA, H. Vitamina C, carotenoides, fenólicos totais e atividade antioxidante de goiaba, manga e mamão procedentes da Ceasa do Estado de Minas Gerais. **Acta Scientiarum. Health Science**, v. 33, n. 1, p. 89–98, 2011.

OSBORN, E. M. On the occurence of antibacterial substances in green plants. Br. J. Exp. Pathol., London, v. 24, n. 6, p. 227-231, 1943.

PAZ, M.; GÚLLON, P.; BARROSO, M. F.; CARVALHO, A. P.; DOMINGUES, V. F.; GOMES, A. M.; BECKER, H.; LONGHINOTTI, E.; DELERUE-MATOS, C. Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: Evaluation of bioactive compounds. **Food chemistry**, v. 172, p. 462–8, 1 abr. 2015.

PERTUZATTI, P. B. Compostos bioativos em diferentes cultivares de mirtilo (vaccinium ashei Reade). 2009. 60f. Dissertação. (Mestre em Ciências) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2009.

PERTUZATTI, P. B.; BARCIA, M. T.; RODRIGUES, D.; CRUZ, P. N.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I.; SMITH, R.; GODOY, H. T. Antioxidant activity of hydrophilic and lipophilic extracts of Brazilian blueberries. **Food chemistry**, v. 164, p. 81–8, 1 dez. 2014.

PORCU, O. M. Fatores que influenciam na composição de carotenoides em goiaba, acerola, pitanga e seus produtos processados. 2004. 131 f. Tese. (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

PORTINHO, J. A.; ZIMMERMANN, L. M.; BRUCK, M. R. Efeitos Benéficos do Açaí. **International Journal of Nutrology**, v. 5, p. 15–20, 2012.

- POTTERAT, O. Goji (*Lycium barbarum* and *L. chinense*): Phytochemistry, pharmacology and safety in the perspective of traditional uses and recent popularity. **Planta medica**, v. 76, n. 1, p. 7–19, jan. 2010.
- PRADO, E. **Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais**. 2009. 106f. Dissertação (Mestre em Ciências). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.
- PRUDENCIO, I. D.; PRUDÊNCIO, E. S.; GRIS, E. F.; TOMAZI, T.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Petit suisse manufactured with cheese whey retentate and application of betalains and anthocyanins. **LWT Food Science and Technology**, v. 41, n. 5, p. 905–910, jun. 2008.
- QUEK, S.Y.; CHOK, N.K.; SWEDLUND, P. The physicochemical properties of spray-dried watermelon powder. **Chemical Engineering and Processing**, v.46, n.5, p.386-392, 2007.
- RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Quimica Nova**, v. 29, n. 4, p. 755–760, 2006.
- RAMFUL, D.; BAHORUN, T.; BOURDON, E.; TARNUS, E.; ARUOMA, O. I. Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of Mauritian citrus fruits: Potential prophylactic ingredients for functional foods application. **Toxicology**, v. 278, n. 1, p. 75–87, 2010.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICEEVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radicals Biology and Medicinal**, v.26, p.1231-1237, 1999.
- REQUE, P. M. Frutos de Mirtilo (*Vaccinium spp.*) e produtos derivados: caracterização e estabilidade de suas propriedades bioativas. 2012. 121f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.
- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. STRUCTURE-ANTIOXIDANT ACTIVITY RELATIONSHIPS OF FLAVONOIDS AND PHENOLIC ACIDS. Free Radical Biology & Medicine, v. 20, n. 7, p. 933–956, 1996.
- RODRIGUES, E.; POERNER, N.; ROCKENBACH, I. I.; GONZAGA, L. V.; MENDES, C. R.; FETT, R. Phenolic compounds and antioxidant activity of blueberry cultivars grown in Brazil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 4, p. 911–917, 2011.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS•+. **Comunicado Técnico 128**, Embrapa - Fortaleza, CE, 2007.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). **Comunicado Técnico 125**, Embrapa - Fortaleza, CE, 2006.

SAITO, T. Efeito da adição de extrato de casca de jabuticaba nas características físico-químicas e sensoriais de queijo petit suisse. 2014. 99f. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2014.

SAMPAIO, F. C.; PEREIRA, M. D. S. V.; DIAS, C. S.; COSTA, V. C. O.; CONDE, N. C. O.; BUZALAF, M. A. R. In vitro antimicrobial activity of Caesalpinia ferrea Martius fruits against oral pathogens. **Journal of ethnopharmacology**, v. 124, n. 2, p. 289–94, 15 jul. 2009.

SAMUELSON, G. Global strategy on diet, physical activity and health. **Scandinavian Journal of Nutrition**, v. 48, n. 2, p. 57–57, 1 jun. 2004.

SANTOS, G. M.; MAIA, G. A.; SOUZA, P. H. M.; COSTA, J. M. C. D.; FIGUEIREDO, R. W.; PRADO, G. M. Correlação entre atividade antioxidante e compostos bioativos de polpas comerciais de açaí ( *Euterpe oleracea Mart* ). **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 58, n. 2, p. 187–192, 2008.

SHEN, X.; SUN, X.; XIE, Q.; LIU, H.; ZHAO, Y.; PAN, Y.; HWANG, C.; WU, V. C. H. Antimicrobial effect of blueberry (Vaccinium corymbosum L.) extracts against the growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Enteritidis*. **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 159–165, jan. 2014.

SIBBEL, A. The sustainability of functional foods. **Social Science & Medicine**, v. 64, p. 554–561, 2007.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, a-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, p. 1315S–1321S, 1995.

- SILVA, L. M. R.; FIGUEIREDO, E. A. T.; RICARDO, N. M. P. S.; VIEIRA, I. G.; FIGUEIREDO, R. W.; BRASIL, I. M.; GOMES, C. L. Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. **Food chemistry**, v. 143, p. 398–404, 15 jan. 2014.
- SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina:** Ciências Agrárias, v. 31, n. 3, p. 669–682, 2010.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteau reagent. **Methods of Enzymology,** v. 299, p. 152–178, 1999.
- SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71–81, 2002.
- SOUZA, V. R. Compostos bioativos e o processamento de pequenas frutas vermelhas cultivadas em clima subtropical. 2013. 195f. Tese (Doutor em Ciência dos Alimentos,) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.
- SOUZA, V. R.; PEREIRA, P. A. P.; SILVA, T. L. T.; LIMA, L. C. DE O.; PIO, R.; QUEIROZ, F. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. **Food chemistry**, v. 156, p. 362–8, 1 ago. 2014.
- SU, M.-S.; CHIEN, P.-J. Antioxidant activity, anthocyanins, and phenolics of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) fluid products as affected by fermentation. **Food Chemistry**, v. 104, n. 1, p. 182–187, jan. 2007.
- STOKES, M.; FAIRCHILD, M. D.; BERNS, R. S. Precision requirements for digital color reproduction. **ACM Transactions on Graphics**, v.11, p.406–422, 1992.
- SWIECA, M. Potentially bioaccessible phenolics, antioxidant activity and nutritional quality of young buckwheat sprouts affected by elicitation and elicitation supported by phenylpropanoid pathway precursor feeding. **Food Chemistry**, v. 192, p. 625–632, 2015.
- TAKATSUI, F. **Sistema CIE LAB: analise computacional de fotografia.** 2011. 99f. Dissertação (Mestre em Ciências Odontológicas). Universidade Estadual Paulista, 2011.

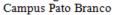
- TEIXEIRA, FELIPE DE A.; SILVA, CARMELIRA G. DA,.**DPPH. Química Nova Interativa**. Disponível em: <a href="http://qnint.sbq.org.br/qni/popup\_visualizarMolecula.php?id=4J4NcOscwSWQozPv\_U900znaLVcJT9yuEtosdRR6-OUaLje9-uzD1r0zo9HWIFgxKcELr89FjeGeQhTJYPGT2Q">http://qnint.sbq.org.br/qni/popup\_visualizarMolecula.php?id=4J4NcOscwSWQozPv\_U900znaLVcJT9yuEtosdRR6-OUaLje9-uzD1r0zo9HWIFgxKcELr89FjeGeQhTJYPGT2Q</a> Acesso em: 17 jul. 2013
- ÜNALAN, İ. U.; ARCAN, I.; KOREL, F.; YEMENICIO, A. Application of active zein-based fi lms with controlled release properties to control Listeria monocytogenes growth and lipid oxidation in fresh Kashar cheese. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 20, p. 208–214, 2013.
- VALDIVIELSO, I.; BUSTAMANTE, M. Á.; GORDOA, J. C. R.; NÁJERA, A. I.; RENOBALES, M.; BARRON, L. J. R. Simultaneous analysis of carotenoids and tocopherols in botanical species using one step solid-liquid extraction followed by high performance liquid chromatography. **Food chemistry**, v. 173, p. 709–17, 15 abr. 2015.
- VEIGA, P. G.; CUNHA, R. L.; VIOTTO, W. H.; PETENATE, A. J. Caracterização química, reológica e aceitação sensorial do queijo petit suisse brasileiro. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.20, n.3. Campinas, 2000.
- VIEIRA, L. M.; SOUSA, M. S. B.; MANCINI-FILHO, J.; LIMA, A. Fenólicos totais e capacidade antioxidante. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 33, n. 3, p. 888–897, 2011.
- WANG, C. C.; CHANG, S. C.; INBARAJ, B. S.; CHEN, B. H. Isolation of carotenoids, flavonoids and polysaccharides from *Lycium barbarum L*. and evaluation of antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 120, n. 1, p. 184–192, maio 2010.
- WANG, S. Y.; CHEN, H.; CAMP, M. J.; EHLENFELDT, M. K. Flavonoid constituents and their contribution to antioxidant activity in cultivars and hybrids of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei Reade*). **Food Chemistry**, v. 132, n. 2, p. 855–864, maio 2012.
- WANG, S. Y.; CAMP, M. J.; EHLENFELDT, M. K. Antioxidant capacity and α-glucosidase inhibitory activity in peel and flesh of blueberry (*Vaccinium spp.*) cultivars. **Food Chemistry**, v. 132, n. 4, p. 1759–1768, jun. 2012.
- ZERAIK, M. L.; PEREIRA, C. A. M.; ZUIN, V. G.; YARIWAKE, J. H. Maracujá: um alimento funcional. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. March, p. 459–471, 2010.

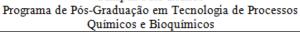
# APÊNDICE A - TESTE DE ACEITAÇÃO UTILIZADA NA ANÁLISE SENSORIAL



#### Ministério da Educação

## Universidade Tecnológica Federal do Paraná







			TESTE	DE ACEITAÇÃO	)			
Nome	(opcional):							
IDAD		SEX	KO:(_) F	( ) M	DA	ATA//		
	Você está recebendo amostras de queijo petit suisse (tipo Danoninho®). Você será orientado antes de iniciar a análise sensorial. CASO TENHO ALERGIA OU INTOLERÂNCIA A PRODUTOS LÁCTEOS, NÃO REALIZAR A ANÁLISE.							
FREQ Com q	UÊNCIA DE CO ual frequência vo	ONSUMO cê consum	DE QUEIJ e esse produ	O PETIT SUISSE to?	(Tipo Danonin	ho®)		
caract			ase na escal	AÇÃO SENSORIA a hedônica realize impressão global.		produto quanto à	is suas	
1	ariamente	dor, aparci	icia e sacoi e	mpressao groom.				
( Va	rias vezes por sen	iana						
	manalmente							
( Vá	rias vezes por mê msalmente	S						
	m todo mês							
( ) Nu								
****	LA HEDÔNICA							
1)	Desgostei muitís							
2)	Desgostei muito							
3)	Desgostei regula							
4)	Desgostei ligeira	amente;						
5)	Indiferente;							
6)	Gostei ligeirame							
7)	Gostei regulame Gostei muito:	ente;						
8) 9)	Gostei muitissin	10						
)	Goster murussin							
	AMOSTRAS	COR	ODOR	APARËNCIA	SABOR	Impressão Global		
	932							
	289 456							
	734							
	134	l						
Orden	e as amostras de a	cordo com	ı sua preferêr	icia. Atribua o nº 1	para a amostra d	e maior preferênci	a. 2	
	segunda mais pre							
()9	()932 ( )289 ( )456 ( )734							
TEST	E DE INTENÇÃ	O DE CO	MPRA					
IESI.	Você compraria			alisados?				
	() sim ( ) na		Produces di					
	· / / / /							
•	Se você respond			to (s) compraria?				