UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MARIANA ALEJANDRA ECHALAR BARRIENTOS

Obtenção, caracterização, encapsulação e aplicação do extrato de vitex (*Vitex agnus castus* L.)

Pirassununga

2017

MARIANA ALEJANDRA ECHALAR BARRIENTOS

Obtenção, caracterização, encapsulação e aplicação do extrato de vitex (*Vitex agnus castus* L.)

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Orientadora: Profª. Drª. Carmen Sílvia Fávaro Trindade.

Pirassununga
2017

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Echalar Barrientos, Mariana Alejandra
EE18o Obtenção, caracterização, encapsulação e aplicação do extrato de vitex (Vitex agnus castus L.) / Mariana Alejandra Echalar Barrientos ; orientadora Carmen Sílvia Fávaro Trindade. -- Pirassununga, 2017.
127 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Spray drying. 2. Compostos fenólicos. 3. Casticina. 4. Tensão pré-menstrual. 5. Chocolate funcional. I. Fávaro Trindade, Carmen Sílvia , orient. II. Título.

Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte - o autor

É com muita alegria que dedico este trabalho a minha família.

Aos meus pais, Alberto e Katye, e meus irmãos, Carlos, Estefanía e Nicolás.

Sempre me deram apoio incondicional, incentivo, carinho e amor, apesar da distância.

São minha inspiração.

Biografia

Mariana Alejandra Echalar Barrientos, filha de Katye E. Barrientos Patiño e Alberto L. Echalar Ascarrunz, nasceu na cidade de La Paz na Bolívia em 5 de junho de 1990. Cresceu em La Paz e estudou no Colegio Alemán Mariscal Braun. Finalizando a escola decidiu sair do seu país para fazer a faculdade.

Graduou-se em Engenharia de Alimentos na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA/USP) em dezembro de 2014 com a segunda maior média ponderada da turma. Durante a graduação realizou estágio no Laboratório Integrado de Biocatálise e Sintese e Iniciação Científica na área de microbiologia: atividade antifúngica de extrato de plantas. Também realizou um intercambio em Werne – Alemanha com bolsa empreendedorismo da USP para fazer um estágio na área de P&D na empresa Uniferm. Após a graduação inicio o curso de Mestrado na área de Ciências da Engenharia de Alimentos na FZEA/USP.

Em pesquisa tem experiência com microbiologia, encapsulação por spray chilling e secagem por spray drying, caracterização de pós e análise sensorial de alimentos. Durante o mestrado também realizou estágio PAE nas disciplinas Análise de Alimentos II, Processamento e Tecnologia de Alimentos e Química dos Alimentos.

Após a conclusão do mestrado irá aventurar-se pelo mercado industrial. Futuramente, pretende dar continuidade aos estudos com o doutorado e se mudar para Alemanha.

Agradecimentos

Aos meus pais e irmãos, que sempre me deram apoio e suporte durante todos estes anos de estudo. Só tenho a dizer que cada lágrima derramada nos aeroportos está simbolicamente representada neste trabalho. O sacrifício da distância não é nada em comparação à alegria de tê-los em minha vida. Sempre serei grata por tudo. Amo vocês!

A meu namorado, Rafael, pelo impulso para empreender este sonho. Obrigada pelo apoio, amor e confiança. Nada seria igual sem você do meu lado.

À minha orientadora, Profª Carmen, pelo apoio incondicional, compreensão, paciência, carinho e ensinamentos passados nestes anos. Você é um exemplo de mulher e profissional. Espero continuar trabalhando no futuro juntas.

Ao técnico especialista do Laprof, Marcelo Thomazini, muito muito obrigada por passar teus conhecimentos e tempo ao longo destes dois anos.

A Juliana Maeda, Isabela Chaves e Juliana Peralta, obrigada meninas pelo trabalho e tempo dedicado no meu projeto como se fosse próprio. Não teria conseguido sem vocês.

Aos amigos de laboratório que fizeram do trabalho uma família: Jenny, Talita, Marcella, Augusto, Clitor Junior, Fabiana. Em especial, Volnei e Fabrício, por passar um pouco do seu conhecimento e me ajudar incontáveis vezes durante o mestrado, e Marluci pela matéria prima para a produção do chocolate e o apoio. São pessoas muito queridas e especiais. Muito Obrigada por tudo! Vou sentir saudades.

Agradeço a minha família, tios, avó, primos pela torcida durante todos estes anos. Com muito carinho agradeço a minha família política também, Katy, Pedro e Marina, por me tratarem como família.

A todos os professores do Departamento de Engenharia de Alimentos que contribuíram por meio das disciplinas para o ensinamento e desenvolvimento intelectual e científico. Especialmente à profa. Giovanna pelo espectrômetro, profa. Vivian e familia pela torcida amorosa, conselhos e risadas.

Aos funcionários da FZEA, em especial os funcionários do Departamento de Engenharia de Alimentos e da pós-graduação.

Ao ITAL por permitir produzir os chocolates na planta piloto.

À CAPES, pelas bolsas de mestrado e PAE concedidas.

Enfim, meu muito obrigado a todos que fizeram parte de uma etapa mais!!

RESUMO

ECHALAR-BARRIENTOS, M. A. **Obtenção, caracterização, encapsulação e aplicação do extrato de vitex (*Vitex agnus castus* L.)** 2017. 127 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

O fruto de vitex (*Vitex agnus castus* L.) é muito aromático, picante e amargo pelo alto teor de compostos fenólicos. É utilizado como pimenta na gastronomia e seu extrato como medicamento fitoterápico para combater os sintomas da tensão pré-menstrual (TPM), síndrome que acomete cerca de 80% das mulheres na idade reprodutiva. Assim, para a aplicação do extrato, com vistas à obtenção de um chocolate funcional para o público feminino, foi proposta sua encapsulação por *spray drying* visando mascarar ou atenuar o seu sabor desagradável e proteger os compostos fenólicos da oxidação. Portanto, o objetivo deste projeto foi à obtenção em condições otimizadas, caracterização, encapsulação por *spray drying* e aplicação em chocolate meio amargo do extrato concentrado dos frutos secos e maduros de vitex. O extrato foi obtido por maceração com solução 60 % etanol, a 60 ˚C e 12 h. Após a concentração do extrato, este foi encapsulado por *spray dryer* com 4 concentrações de carreador goma arábica e 2 temperaturas de ar de entrada diferentes. Os pós foram caracterizados fisicamente e em relação ao teor dos compostos bioativos. O tratamento com melhores propriedades (T6) foi aplicado em chocolate meio amargo e foi realizada a caracterização do produto. (I) Foi possível obter um extrato rico em compostos fenólicos, com alta atividade antioxidante. (II) A encapsulação foi possível, protegeu os compostos fenólicos da degradação, porém não foi eficiente para mascarar o sabor do extrato. Contudo, (III) a aplicação desse extrato, na forma livre e encapsulada, em chocolate meio amargo foi bem sucedida, pois os produtos obtidos tiveram uma boa aceitação sensorial e a casticina, um dos compostos bioativos responsáveis pela ação terapêutica do extrato, (IV) manteve-se estável durante o período de estocagem. Neste contexto, este trabalho representou uma (V) inovação na área de alimentos funcionais com apelo à manutenção da qualidade de vida de mulheres em período reprodutivo. Ainda, destaca-se a relevância deste trabalho devido à escassez de trabalhos acadêmicos que abordam a encapsulação e aplicação deste extrato em alimentos.

Palavras-chave: *spray drying*, compostos fenólicos, casticina, tensão pré-menstrual, chocolate funcional.

ABSTRACT

ECHALAR-BARRIENTOS, M. A. **Obtention, characterization, encapsulation and application of chasteberry extract (*Vitex agnus castus* L.)** 2017. 127 f. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

Chasteberry (*Vitex agnus castus* L.) is very aromatic, spicy and bitter by the content of phenolic compounds. It is used as pepper in gastronomy and its extract as an herbal medicine to combat the symptoms of premenstrual syndrome (PMS), syndrome that affects 80% of women in reproductive age. Thus, for an application of the extract, with goal to obtain a functional chocolate for the female public, its encapsulation was proposed by spray-drying in order to mask or attenuate its unpleasant taste and to protect the phenolic compounds from oxidation. Therefore, the aim of this project was to obtain an extract of chasteberry in optimized conditions, its characterization, encapsulation by spray drying and application in semisweet chocolate. The extract was obtained by maceration with a 60% ethanol solution, at 60 ° C for 12 h. After the extract concentration, it was encapsulated by spray drier with 4 different concentrations of gum arabic charcoal and 2 different inlet air temperatures. The powder was characterized physically and in relation to the content of the bioactive compounds. The treatment with better properties (T6) was applied to the semisweet chocolate and a characterization of the product was carried out. (I) It was possible to obtain an extract rich in phenolic compounds, with high antioxidant activity. (II) Encapsulation was possible, it protected the phenolic compounds from degradation, but was not efficient to mask the flavor of the extract. However, (III) the application of the extract in the free and encapsulated form in semisweet chocolate was successful, the products obtained had a good sensory acceptance and casticina, one of the bioactive compounds responsible for the therapeutic action of the extract, (IV) remained stable during the storage period. In this context, this work represents an (V) innovation in the area of functional foods with maintenance in the quality of life of women in the reproductive period. Still, a relevance of this work is highlighted due to the lack of academic papers that approach the encapsulation or application of chasteberry extract in foods.

Keywords: spray drying, phenolic compounds, casticin, premenstrual tension, functional chocolate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fitoterápicos à base de vitex na forma de cápsulas e tinturas encontrados no mercado global. 23
Figura 2. Chocolates para o alívio dos sintomas da tensão pré-menstrual. 25
Figura 3. Vitex. A) Arbusto florido e B) frutos. 25
Figura 4. Estrutura molecular da casticina. 28
Figura 5. Classificação das partículas em função da distribuição do recheio. A) Microcápsula e B) Microesfera 33
Figura 6. Esquema do *spray dryer*. 34
Figura 7. Estrutura química da goma arábica. 36
Figura 8. Fluxograma do processo de elaboração do chocolate. 52
Figura 9. Ficha para o ensaio de aceitação e intenção de compra do chocolate. 55
Figura 10. Ficha para o ensaio de seleção e treinamento de provadores.. 56
Figura 11. Ficha para o ensaio de comparação pareada. 57
Figura 12. Fruto de vitex desidratado. A) Antes de ser moído; B) pó obtido da trituração do fruto de vitex desidratado. 58
Figura 13. Distribuição granulométrica do fruto de vitex e do pó obtido da sua moagem. 58
Figura 14. Extratos obtidos dos frutos de Vitex moídos, obtidos com diferentes solventes hidroalcoólicos (10-99,5 % de etanol). 60
Figura 15. Teor de compostos fenólicos extraídos com diferentes solventes hidroacoólicos. . 61
Figura 16. Cinética de extração de compostos fenólicos dos frutos de vitex a 25, 45 e 60 ˚C com solvente hidroalcoólico 60 % etanol. 63
Figura 17. Extratos etanólico, aquoso e concentrado dos frutos de vitex obtidos a 60 ^{o}C por 12 horas (0,1 mg/mL). 65
Figura 18. Espectro de massas obtidos por LC/MS/MS do íon molecular 375 [MH+] do padrão de casticina (A) e da fração coletada do extrato concentrado dos frutos de vitex (Vitex agnus castus L.) (B). 71
Figura 19. Cromatograma característico dos compostos fenólicos do extrato dos frutos de vitex obtido por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos em 256 nm. 72
Figura 20. Estrutura química do ácido protocatecuico 74
Figura 21. Estutura química do ácido p-Hidroxibenzoico. 74

Figura 22. Estrutura química A) casticina e B) agnusideo. 75
Figura 23. Aparência dos pós obtidos por *spray drying* com goma arábica. 76
Figura 24. Pós obtidos do extrato concentrado de vitex por *spray dryer* sem carreador a 130 e 160 ˚C. 77
Figura 25. Extrato concentrado de vitex logo após ser liofilizado por 48 horas. 77
Figura 26. Visualização dos pós na umidade de equilíbrio submetidos a diferentes umidades relativas. 93
Figura 27. Isotermas de sorção dos pós do extrato de vitex com goma arábica, ajustadas pelo modelo Henderson. 99
Figura 28. Tipos de isoterma de sorção. 99
Figura 29. Interação dos componentes do extrato dos frutos de *Vitex agnus castus* L. com o agente carreador goma arábica pela espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). 100
Figura 30. Distribuição volumétrica de tamanho de partícula das micropartículas à base do extrato dos frutos de vitex (*Vitex agnus castus* L.). 103
Figura 31. Micrografias obtidas por microscopia de varredura das micropartículas do extrato dos frutos de vitex (*Vitex agnus castus* L.) com goma arábica como carreador. 104
Figura 32. Micrografias obtidas por microscopia de varredura das micropartículas obtidas do extrato dos frutos de vitex (*Vitex agnus castus* L.), do extrato liofilizado e da goma arábica. 105
Figura 33. Espectro das partículas e seus controles da análise de difração de raios x. 106
Figura 34. Chocolates meio amargos: controle, adicionado com vitex encapsulado e vitex livre. 107
Figura 35. Dureza e *whiteness index* do chocolate controle e adicionado de vitex na forma livre e encapsulada nos tempos 0 e 60 dias. 109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variáveis e condições estudadas na extração de fenólicos dos frutos de vitex. 40
Tabela 2. Relação entre absorbância e concentração para os microrganismos testados. 43
Tabela 3. Atividade de água (Aw) das soluções salinas utilizadas para determinar as isotermas de sorção. 49
Tabela 4. Modelos para isotermas de sorção em alimentos. 50
Tabela 5. Composição centesimal dos frutos de vitex (*Vitex agnus castus* L). 59
Tabela 6. Teor de compostos fenólicos dos extratos obtidos com solventes hidroalcoólicos com 10-99,5 % de etanol, extraídos a 45 ^{o}C por 1 hora e a constante dielétrica, viscosidade dinâmica e densidade de cada solvente. 60
Tabela 7. Constante dielétrica, viscosidade dinâmica e densidade da solução 60% de etanol nas condições estudadas da cinética de extração. 63
Tabela 8. Caracterização dos extratos produzidos em relação ao teor de fenólicos, casticina, umidade, sólidos totais e pH. 65
Tabela 9. Atividade antioxidante do extrato aquoso, concentrado e liofilizado de vitex pelos métodos DPPH e FRAP expressos em base seca. 67
Tabela 10. Halo de inibição (HI), concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) contra as bactérias testadas utilizando o extrato etanólico e extrato liofilizado (0,204 g/mL) das frutas de *Vitex agnus castus* L. 69
Tabela 11. Identificação dos principais compostos fenólicos presentes no extrato de vitex (*Vitex agnus castus* L.). 73
Tabela 12. Rendimento de processo de secagem, retenção dos compostos fenólicos e da casticina do extrato dos frutos de vitex (Vitex agnus castus L.) secos por *spray drying* e por liofilização. 78
Tabela 13. Efeito das variáveis de processo no teor de fenólicos totais (meq AG/ g amostra em base seca) dos pós obtidos por spray dryer. 80
Tabela 14. Efeito das variáveis de processo no teor de casticina (mg/ g amostra em base seca) dos pós obtidos por spray dryer. 81
Tabela 15. Quantificação de fenólicos totais (mg EAG / g amostra em base seca) durante a estocagem (25 ^{o}C e 32,8% UR). 83
Tabela 16. Quantificação da casticina (mg casticina/ g amostra em base seca) durante a estocagem (25 ^{o}C e 32,8% UR). 84

Tabela 17. Porcentagem de perda nas partículas dos compostos fenólicos e da casticina durante a estocagem, 60 e 120 dias respectivamente. 85
Tabela 18. Caracterização dos pós obtidos pelos processos de secagem em spray-dryer e por liofilização do extrato dos frutos de vitex (*Vitex agnus castus* L.)..... 89
Tabela 19. Umidades de equilíbrio obtidas a 25 ºC dos pós do extrato dos frutos de vitex e do carreador (goma arábica) armazenados em sete soluções salinas saturadas com diferentes atividades de água..... 96
Tabela 20. Parâmetros estimados para cada modelo das isotermas de sorção dos extratos secos dos frutos de vitex e do carreador goma arábica. 98
Tabela 21. Valores dos diâmetros médios volumétricos das micropartículas obtidas secagem por spray dryer..... 102
Tabela 22. Caracterização do chocolate meio amargo controle, adicionado de vitex na forma livre e encapsulada em relação à atividade de água, pH e cor..... 108
Tabela 23. Teor de compostos fenólicos (mg EAG/ g chocolate) ao longo do tempo nos chocolates controle e adicionados de vitex na forma livre e encapsulada, armazenados por 60 dias..... 111
Tabela 24. Teor de casticina (µg casticina/ g chocolate) ao longo do tempo dos chocolates adicionados de vitex na forma livre e encapsulada. 111
Tabela 25. Porcentagem da perda total dos compostos bioativos durante o armazenamento de 60 dias..... 111
Tabela 26. Notas da avaliação sensorial dos chocolates produzidos: controle, adicionados de vitex na forma encapsulada e livre. 115

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Lançamentos de alimentos funcionais por funcionalidade. 19
Quadro 2. Esquema das etapas empregadas na extração sólido-líquido. 31
Quadro 3. Constantes utilizadas para calcular as constantes dielétricas (DI) do etanol e a água. 40

Sumário

1. Introdução 17
2. Revisão Bibliográfica 18
   2.1. Mercado de produtos Funcionais 18
   2.2. Chocolate 20
   2.3. Tensão pré-menstrual (TPM) 21
   2.4. *Vitex agnus castus* L. 25
      2.4.1. Eficácia do extrato de vitex 28
   2.5. Extração 30
   2.6. Microencapsulação 31
      2.6.1. *Spray drying* 33
      2.6.2. Goma arábica como material de parede 35
3. Hipótese 36
4. Objetivos 37
   4.1. Objetivo Geral 37
   4.2. Objetivos Específicos 37
5. Material e Métodos 38
   5.1. Materiais 38
   5.2. Métodos 38
      5.2.1. Caracterização dos frutos de vitex 38
      5.2.2. Obtenção e caracterização do extrato 39
         5.2.2.1. Determinação das melhores condições de extração dos compostos fenólicos 39
         5.2.2.2. Teor de fenólicos totais 41
         5.2.2.3. Teor de casticina 41
         5.2.2.4. Perfil cromatográfico do extrato 42
         5.2.2.5. Preparo do extrato liofilizado 42
         5.2.2.6. Atividade antibacteriana “in vitro” 43

5.2.2.7. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) 44
5.2.2.8. Atividade antioxidante 44
5.2.3. Secagem/Encapsulação 45
5.2.3.1. Processos de secagem do extrato líquido 45
5.2.3.2. Rendimento dos processos de secagem 46
5.2.3.3. Caracterização dos pós obtidos 47
5.2.3.4. Teor de fenólicos totais nos pós e no extrato líquido 47
5.2.3.5. Teor de casticina nos pós e no extrato líquido 48
5.2.3.6. Retenção dos compostos fenólicos e da casticina no processo de secagem 48
5.2.3.7. Estabilidade da casticina e dos compostos fenólicos ao longo do tempo nos pós e no extrato líquido 49
5.2.3.8. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) 49
5.2.3.9. Isotermas de sorção nos pós 49
5.2.3.10. Caracterização das micropartículas 51
5.2.4. Aplicação do extrato na forma livre e encapsulada 51
5.2.4.1. Produção do chocolate meio amargo 51
5.2.4.2. Caracterização dos chocolates adicionados de vitex e controle 53
5.2.4.3. Estabilidade da casticina e os compostos fenólicos ao longo do tempo nos chocolates 54
5.2.4.4. Aceitação sensorial dos chocolates 54
5.2.5. Avaliação do potencial da encapsulação em mascarar ou atenuar a sensação de ardência e o amargor 56
5.2.6. Forma de análise dos resultados 57
6. Resultados e Discussão 57
6.1. Caracterização dos frutos de vitex 57
6.2. Determinação das melhores condições de extração 59
6.2.1. Obtenção do extrato concentrado nas condições otimizadas 64

6.3. Caracterização dos extratos líquidos e liofilizado 65
6.3.1. Caracterização em relação ao teor de fenólicos, casticina, umidade, sólidos totais e pH..... 65
6.3.2. Atividade antioxidante dos extratos líquidos e liofilizado 67
6.3.3. Atividade antibacteriana “in vitro” dos extratos líquidos e liofilizado 69
6.3.4. Confirmação da presença de casticina no extrato otimizado..... 71
6.3.5. Perfil cromatográfico do extrato otimizado..... 72
6.4. Encapsulação/Secagem..... 76
6.4.1. Processos de secagem do extrato líquido e retenção dos compostos bioativos.. 76
6.4.2. Efeito das variáveis do processo de atomizaçao na estabilidade dos compostos bioativos80
6.4.3. Estabilidade dos compostos bioativos durante a estocagem 82
6.4.4. Caracterização dos pós obtidos 88
6.4.5. Caracterização das micropartículas 101
6.5. Aplicação das micropartículas de vitex na forma livre e encapsulada em chocolate meio amargo 106
6.5.1. Caracterização do chocolate meio amargo controle, adicionado de vitex na forma livre e encapsulada..... 106
6.5.2. Estabilidade da casticina e os compostos fenólicos ao longo do tempo nos chocolates..... 110
6.5.3. Aceitação sensorial dos chocolates adicionados de vitex na forma livre e encapsulada e o controle 114
6.6. Avaliação do potencial da microencapsulação em mascarar ou atenuar a sensação de ardência e o amargor..... 116
7. Conclusões 117
8. Referências Bibliográficas 118
Apêndice A – Termo de consentimento livre e esclarecido da Análise Sensorial 126
Apêndice B – Questionário de consumo da Análise Sensorial 127

1. Introdução

Vitex *(Vitex agnus castus* L.) é um arbusto original do mediterrâneo, com flores lilás e frutos pequenos de cor marrom a preto (MAIA; SOARES; JUNIOR, 2001). Estes frutos possuem aroma e sabor semelhantes à pimenta do reino (BARROS et al., 2010) e por essa razão, são utilizados na culinária de alguns países.

Ainda, dos frutos maduros e secos se produz um extrato que é utilizado como fitoterápico. Atualmente, o extrato dos frutos de vitex é comercializado como medicamento fitoterápico para mulheres na forma de cápsulas ou tintura (extrato alcoólico), principalmente na Europa e Estados Unidos, sendo os seus principais propósitos: amenizar os sintomas da menopausa, regular o ciclo menstrual, atenuar os sintomas da tensão pré-menstrual (TPM) e enxaqueca menstrual, sendo que existem diversos estudos comprovando cientificamente a sua eficácia no tratamento dos sintomas da TPM (VAN DIE et al., 2013).

Neste contexto, a elaboração de produtos funcionais contendo o extrato dos frutos de vitex pode ser interessante. “O alimento ou ingrediente que alega propriedade funcional pode além de fornecer nutrientes, quando se tratar de um nutriente, produzir efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde” (BRASIL, 1999). Considerando esta definição, o extrato dos frutos de vitex pode ser considerado um ingrediente funcional com apelo para atenuar os sintomas da TPM.

A despeito de suas propriedades benéficas, o desenvolvimento de alimentos funcionais que contenham o extrato dos frutos de vitex representa um enorme desafio, principalmente devido à sensação de ardência e amargor que este fruto causa, além disso, os flavonoides extraídos do fruto ficariam suscetíveis à degradação por oxidação. Para atenuar estes problemas, uma das propostas deste projeto foi a encapsulação do extrato dos frutos de vitex de forma que seus compostos bioativos fiquem protegidos da degradação por oxidação e sejam liberados após a passagem pela boca.

A microencapsulação visa proteger o material das condições adversas do meio, tais como luz, umidade, oxigênio e interações com outros compostos, estabilizando o produto, aumentando a vida útil e promovendo a liberação controlada da cápsula em condições pré-estabelecidas (SHAHIDI & HAN, 1993; GOUIN, 2004). Na indústria de alimentos, também pode ser empregada na encapsulação de ingredientes funcionais, pois é capaz de mascarar sabores indesejáveis, reduzir sua volatilidade, higroscopicidade e reatividade (GOUIN, 2004), possibilitando aplicações inusitadas para os materiais.

Existem várias técnicas de microencapsulação como *spray drying*, *spray chilling*, gelificação iônica e coacervação complexa. Dentre os métodos, preferiu-se o *spray drying*, por ser um método facilmente aplicável, de baixo custo e com uma vasta utilização na indústria de alimentos. De fato, em outro trabalho realizado pelo grupo de pesquisa, a microencapsulação por *spray drying* mostrou-se efetiva para mascarar o amargor de peptídeos de caseína (ROCHA et al., 2009), o que possibilitou a aplicação destes materiais em barras de proteína (ROCHA et al., 2009) com boa aceitação sensorial. Portanto, é um método promissor para mascarar o amargor e a sensação de ardência de vitex.

Neste contexto, este projeto visou obter dos frutos maduros e secos de vitex o extrato rico em compostos fenólicos, encapsula-lo por *spray drying* e aplicá-lo no desenvolvimento de um chocolate funcional, com potencial para combater ou atenuar os sintomas da tensão pré-menstrual, que logo terá como público alvo mulheres no período reprodutivo.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Mercado de produtos Funcionais

O mercado de alimentos funcionais é relativamente jovem, tendo um alto potencial de crescimento e diversificação. Os consumidores de maneira geral estão mais exigentes e bem informados, portanto, existe a necessidade de apoio científico para comprovar os benefícios alegados, justificando desta maneira, o alto valor agregado destes produtos.

Atualmente, o consumidor tem demonstrado maior interesse em alimentos saudáveis, dentro desta categoria se encontram os alimentos funcionais. Os principais benefícios encontrados no mercado são: apoio ao sistema imunológico, prevenção de alguma doença ou disfunção - destacando-se as doenças degenerativas - melhora do sistema digestivo e retardamento do processo de envelhecimento orgânico (MORAES; IKEDA; MESQUITA, 2010). O interesse pelos alimentos funcionais também é das empresas, pois são uma ótima forma de agregar valor e diferenciar os seus produtos (MORAES; IKEDA; MESQUITA, 2010).

Estima-se que no ano 2005, o mercado mundial de alimentos funcionais mobilizou aproximadamente US$ 60 bilhões na Europa, Estados Unidos e Ásia, já no Brasil, mobilizou aproximadamente US$ 600 milhões (MORAES; IKEDA; MESQUITA, 2010). No ano 2015 o mercado de alimentos funcionais movimentou US$ 20 milhões, mostrando uma taxa de crescimento até 2018 de 14,8 % (Novaprom, 2016). A primeira vista parecesse que entre

o2005 e 2015 o mercado de produtos funcionais decaiu, porém, o que aconteceu foi que em 2005 as regras para registro da ANVISA foram modificadas, sendo mais rígidas e portanto, houve uma perda na quantidade de produtos funcionais registrados (SALLES, 2013). Contudo, o mercado de produtos funcionais continua sendo um mercado interessante.

Em 2010, segundo Moraes, Ikeda e Mesquita (2010) encontravam-se, no mercado de alimentos funcionais, produtos em basicamente cinco segmentos: bebidas, produtos lácteos, produtos de confeitaria, produtos de panificação e cereais matinais. Sobressaem as margarinas e leites que diminuem o colesterol e protegem contra problemas cardíacos, produtos a base de soja que auxiliam na prevenção da osteoporose, iogurtes e bebidas que auxiliam o funcionamento do intestino, produtos de panificação que reduzem triglicérides e combatem a osteoporose, e chocolates que reduzem o colesterol.

Normalmente, estes produtos funcionais alegam seus benefícios à presença de compostos bioativos, como, por exemplo, antioxidantes, que podem ser provenientes da própria matéria-prima ou pela adição destes compostos, previamente extraídos de plantas e frutos em geral. Os fitoterápicos, possíveis ingredientes funcionais, são bem aceitos no mercado mundial, sendo que o mercado mundial de ervas medicinais teve uma expectativa de atingir os 2,500 bilhões de dólares americanos no ano de 2010 (ABAD; BEDOYA; BERMEJO, 2010).

Segundo Moraes, Ikeda e Mesquita (2010), em 2010, no Brasil, estavam registrados aproximadamente 130 alimentos funcionais. O Quadro 1 mostra o número de lançamentos de alimentos funcionais por funcionalidade nos anos de 2002 a 2006 segundo pesquisa realizada pela Mintel Publications (2007), empresa de pesquisa de mercado.

Quadro 1. Lançamentos de alimentos funcionais por funcionalidade.

Funcionalidade	2002	2003	2004	2005	2006
Benefício de beleza	7	6	9	14	28
Saúde dos ossos	7	7	15	16	48
Sistema nervoso	22	14	20	62	66
Cardiovascular	56	74	103	154	247
Digestivo	66	70	134	269	674
Sistema imunológico	38	39	70	89	116
Outros	346	364	605	518	540
TOTAL	542	574	956	1122	1719

Fonte: (MINTEL INTERNATIONAL GROUP, 2007 apud IKEDA et al, 2010)

Observa-se no Quadro 1, o aumento de lançamentos a cada ano, sendo que em quatro anos estes triplicaram. Houve um aumento em todas as funcionalidades, destacando-se digestivo, saúde dos ossos, cardiovascular e benefícios de beleza. A categoria *digestivo* foi a mais explorada até o 2010 (MORAES; IKEDA; MESQUITA, 2010), portanto, a pesquisa de

alimentos funcionais em categorias pouco exploradas é uma das maiores oportunidades em termos de inovação em alimentos para o futuro.

Considerando que as mulheres, geralmente, (I) são as responsáveis por comprar os alimentos no supermercado, (II) são mais conscientes dos benefícios dos alimentos, (III) se informam sobre os benefícios dos fitoterápicos, (IV) preocupam-se mais com o bem estar, (V) não tem produtos funcionais (ou tem muito poucos) direcionados a elas; a elaboração de produtos funcionais visando como publico-alvo as mulheres é interessante.

Uma diferença marcante entre os homens e as mulheres é a presença mensal dos sintomas da tensão pré-menstrual (TPM), os quais são indesejados pelas mudanças físicas e emocionais que causam. Portanto, a elaboração de um produto funcional para mulheres na idade reprodutiva que tenha a capacidade de atenuar ou aliviar os sintomas da TPM é promissora. Levando em consideração que um dos sintomas da TPM é a ansiedade por comer chocolate e que chocolates com alto teor de cacau trazem benefícios à saúde, a incorporação de um ingrediente funcional para combater os sintomas da TPM em chocolate pode ter efeito sinérgico.

2.2. Chocolate

O chocolate é o produto obtido a partir da mistura de derivados do cacau, fruto originário do México, massa de cacau, cacau em pó e/ou manteiga de cacau, com outros ingredientes (açúcar, leite em pó integral, gordura vegetal, emulsificantes e aromatizante). De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (2005), para ser denominado chocolate, deve conter no mínimo 25% (m/m) de sólidos totais de cacau, exceto para o chocolate branco que o mínimo é 20 %.

O chocolate tem benefícios para a saúde, ele é fonte de magnésio e é rico em compostos fenólicos, aproximadamente 6-8 % de massa em base seca da semente de cacau são compostos fenólicos (EFRAIM et al., 2011). No cacau e nos seus derivados, são encontrados taninos e flavonoides, principalmente flavanois como (+)-catequina e (–)-epicatequina, esta última representa 35 % do conteúdo total dos compostos fenólicos (EFRAIM et al., 2011).

Foi demonstrado que o chocolate tem efeitos benéficos cardiovasculares pelo seu conteúdo de compostos fenólicos, de acordo com Schroeter, Heiss e Balzer (2006), e a epicatequina seria a responsável por esses efeitos.

Devido a suas propriedades antioxidantes o cacau e também os seus derivados têm efeito protetor para os neurônios, reduz a fadiga mental, melhora cognição e o humor (SCHOLEY; OWEN, 2013). O chocolate também reduz a ansiedade e a depressão, provavelmente pela produção de serotonina, um neurotransmissor com ação calmante (LATIF, 2013). Contudo, deve-se ressaltar que a quantidade de compostos fenólicos presentes no cacau e nos seus derivados dependem de características genéticas, de cultivo, de clima e, claro, do processamento (EFRAIM et al., 2011).

Já foi estudada e associada à ansiedade que mulheres sentem por comer descontroladamente (*craving*) chocolate e doces no período pré-menstrual, ou seja, na TPM, podendo até ser considerado um sintoma (MICHENER et al., 1999). Mesmo que também seja por doces, existe uma preferência por chocolate, pode ser pelos seus efeitos benéficos e/ou também pelas suas características sensoriais únicas, como o aroma, a textura e o derretimento deste na boca (ZELLNER et al,. 2004).

2.3. Tensão pré-menstrual (TPM)

A tensão pré-menstrual (TPM) é uma síndrome que acomete 80% das mulheres na idade reprodutiva, na qual ocorrem alterações de comportamento, emocionais e físicas, nos 5-10 dias anteriores à fase lútea do ciclo menstrual (MORTOLA, 1994). Entre os sintomas mais relevantes estão: depressão, irritabilidade, ansiedade, confusão, mastalgia (dor nos seios), fadiga, retenção de líquidos e dor de cabeça (MORTOLA, 1994). As mulheres frequentemente utilizam medicina complementar e alternativa para tratar os ‘problemas femininos’, como vitaminas, ervas, minerais, dietas, exercícios, entre outros (FUGH-BERMAN; KRONENBERG, 2003). Segundo uma pesquisa realizada nos Estados Unidos, 80% das mulheres preferem uma intervenção não farmaceutica, como vitaminas ou suplementos, para o tratamento da TPM (JANG; KIM; CHOI, 2014).

Na tentativa de identificar quais os produtos disponíveis para as brasileiras, foi feita uma busca na internet por produtos para o alívio da TPM e se encontrou, em geral, no

mercado brasileiro uma grande variedade de suplementos, a maioria na forma de cápsulas, de magnésio, óleo de primula, óleo de borragem e vitaminas do complexo B, especialmente a vitamina B6 [1]. Também foi encontrado, porém em menor quantidade de produtos/marcas, óleo, sementes e farinha de linhaca [2,3]. Encontra-se, em menor quantidade ainda, suplementos a base de vitex, na forma de cápsulas ou tinturas [4,5,6,7], sendo a marca Tenag a mais conhecida [8].

No mercado alemão e dos Estados Unidos também se encontraram produtos a base dos mesmos principios ativos[9,10], no entanto, foi encontrada repetidamente a recomendação de suplementos a base de vitex[11,12,13,14]. No mercado europeu existem duas marcas bastante conhecidas, com as quais foram feitos estudos clínicos. A tintura, conhecida como *Agnolyt* que contém 9 gramas do fruto em cada 100 mL de solução padronizada e a dose indicada é de 40 gotas com algum líquido pela manhã e as cápsulas da marca *Zeller* que contêm 175 mg do pó com recomendação de uma cápsula por dia. A Figura 1 mostra alguns exemplos de fitoterápicos encontrados à base de vitex na forma de cápsulas e tinturas no mercado global.

[1]Disponível em: http://www.natue.com.br/tensao-pre-menstrual/ Acesso em: 6 feb. 2016.
[2] Disponível em: <http://www.naturaisonline.com.br/tpm> Acesso em: 6 feb. 2016.
[3] Disponível em: <http://loja.newfarma.far.br/produto/agnus-castus-vitex-tratamento-de-menopausa150-mg-60-capsulas.html> Acesso em: 6 feb. 2016.
[4] Disponível em: <http://www.syntoformula.com.br/cuidadosespeciais/vitex-agnus-castus-60mg-30-capsulas.html> Acesso em: 6 feb. 2016.
[5] Disponível em: <http://www.onlinefarma.com.br/vitex-agnus-350mg-c30-caps> Acesso em: 6 feb. 2016.
[6] Disponível em: <http://www.oficinadeervas.com.br/detalhe.php?id_produto=138> Acesso em: 6 feb. 2016.
[7] Disponível em: <http://www.medicinanet.com.br/bula/4972/tenag.htm> Acesso em: 6 feb. 2016.
[8] Disponível em: <http://vitamine-ratgeber.com/vitalstoffe-bei/pms-pramenstruelles-syndrom/#> Acesso em: 6 feb. 2016.Natuerliche_PMS_Behandlung
[9] Disponível em: <http://www.womenshealthmag.com/health/natural-pms-cures> Acesso em: 6 feb. 2016.
[10] Disponível em: <http://www.everydayhealth.com/pms/supplements-that-may-ease-pms-symptoms.aspx> Acesso em: 6 feb. 2016.
[11] Disponível em: <http://www.netdoktor.at/krankheit/pms-6810277> Acesso em: 6 feb. 2016.
[12] Disponível em: <https://www.womentowomen.com/pms/herbal-treatments-for-pms/> Acesso em: 6 feb. 2016.
[13] Disponível em: <http://wellnessmama.com/7199/pms-cramps-remedies/> Acesso em: 6 feb. 2016.
[14] Disponível em: <http://wholehealthchicago.com/2007/11/28/cure-pms-the-natural-way-without-seeing-a-doctor/> Acesso em: 6 feb. 2016.

Figura 1. Fitoterápicos à base de vitex na forma de cápsulas e tinturas encontrados no mercado global.

Fonte:https://www.google.com.br/search?q=fitoterapia+vitex&biw=1366&bih=643&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjc5s3dze_KAhVJmh4KHVHdB78Q_AUIBigB#tbm=isch&q=medicamentos+vitex

Em geral, na busca de suplementos fitoterápicos são encontrados produtos à base principalmente de óleo de prímula (*Evening primrose oil*), black cohosh (*Cimicifuga racemosa*), melissa (*Melissa officinalis*), ginkgo (Ginkgo biloba), maca (*Lepidium meyenii*), ou mistura de vários princípios ativos combinados [15,16,17]. Contudo, em *websites* que mostram fundamentos médicos, os fitoterápicos a base do extrato dos frutos de vitex foram os mais mencionados, junto com a vitamina B6 e o magnésio. Em uma revisão de literatura científica realizada anteriormente para o óleo de prímula, melissa, *black cohosh e ginkgo*, não foram encontrados estudos que demonstrem sua efetividade para atenuar os sintomas da TPM, sendo portanto um uso apenas tradicional [18]. No estudo de Budeiri, Po e Dornan (1996) o óleo de prímula não defiriu com o placebo para aliviar os sintomas da TPM.

[15] Disponível em: <http://wholehealthchicago.com/2007/11/28/cure-pms-the-natural-way-without-seeing-a-doctor/> Acesso em: 6 feb. 2016.
[16] Disponível em: <http://www.amazon.com/BioGenesis-Nutraceuticals-BioFem-PMS-Capsules/dp/B000MDZL4A> Acesso em: 6 feb. 2016.
[17] Disponível em: <http://www.nutriwomen.co.za/Products/Store/tabid/87/ProdID/21/CatID/34/Default.aspx> Acesso em: 6 feb. 2016.
[18] Disponível em: <http://www.webmd.com/vitamins-supplements/condition-1886-PMS.aspx> Acesso em: 6 feb. 2016.

Três produtos se destacaram pela sua inovação, um spray anti estresse e anti TPM a base de Passiflora 5%, Capim Cidreira 5% e Piridoxina (vitamina B6)[19] encontrado no Brasil; um creme com progestorona usado para a TPM e menopausa[20] [21]; e um pão de forma funcional (*nutribread*) que a sua formulação contém óleo de prímula e estrogénios de plantas, uma fatia corresponde a um quinto da dose diária recomendada de óleo de prímula[22] [23], ambos produtos encontrados nos Estados Unidos.

Além disso, foi feita uma busca específica por chocolates para aliviar os sintomas da TPM. Foram encontrados dois chocolates, um no mercado brasileiro e outro no canadense (Figura 2). O chocolate encontrado no Brasil denominado *Activeslim TPM* é feito com 50% cacau, óleo de prímula (500 mg) e hidrolisado de proteína de leite (*Lactium* 150 mg), ainda, não contém glúten nem lactose[24]. Como mencionado anteriormente, o efeito do óleo de prímula não só não esta comprovado, como não diferiu do placebo no estudo realizado por Budeiri, Po e Dornan (1996). O chocolate canadense da marca *Jamieson Smart* foi lançado no mercado em 2007 e atualmente a sua venda foi descontinuada, não sendo possível identificar o motivo. O principio ativo deste chocolate foi a base de salgueiro branco (*Salix alba*), hidrolisado de caseína, alcachofra e vitex[25,26]. Portanto, verificou-se que a elaboração de produtos funcionais que combatam os sintomas da TPM é um mercado a ser amplamente explorado e com muito potencial.

[19] Disponível em: <http://www.artvitta.com.br/produtosnaturais/spray-anti-stress-e-anti-tpm-30ml.html> Acesso em: 6 feb. 2016.
[20] Disponível em: <http://wellnessmama.com/7199/pms-cramps-remedies/> Acesso em: 6 feb. 2016.
[21] Disponível em: <http://www.amazon.com/gp/product/B001R6K51K/ref=as_li_ss_tl?ie=UTF8&camp=1789&creative=390957&creativeASIN=B001R6K51K&linkCode=as2&tag=herbkati-20> Acesso em: 6 feb. 2016.
[22] Disponível em: <http://www.dailymail.co.uk/health/article-43342/A-guide-treating-PMS.html> Acesso em: 6 feb. 2016.
[23] Disponível em: <http://thehealthcareblog2014.blogspot.com.br/2014/03/a-guide-to-treating-pms.html> Acesso em: 6 feb. 2016.
[24] Disponível em: <http://www.naturaisonline.com.br/activeslim-tpm-20g-p244> Acesso em: 6 feb. 2016.
[25] Disponível em: <http://www.shophsg.com/pmssupport.html> Acesso em: 6 feb. 2016.
[26] Disponível em: <https://well.ca/products/jamieson-smartchocolate-pms-support_7028.html> Acesso em: 6 feb. 2016.

Figura 2. Chocolates para o alívio dos sintomas da tensão pré-menstrual.

Fonte: http://www.naturaisonline.com.br/activeslim-tpm-20g-p244 ; https://well.ca/products/jamieson-smartchocolate-pms-support_7028.html

2.4. *Vitex agnus castus* L.

Vitex (*Vitex agnus castus* L.) é um arbusto de 2 a 3 metros de altura, bastante ramificado com folhas muito aromáticas e flores lilás, semelhantes à lavanda (Figura 3 A) (MAIA; SOARES; JUNIOR, 2001). No verão, desenvolve frutos comestíveis de aproximadamente 3,5 mm de diâmetro, de coloração marrom avermelhada quase preta, possuindo sabor e aroma semelhantes à pimenta, quando maduros e secos (Figura 3 B) (BARROS et al., 2010). Vitex pertence à família *Verbenaceae* e à ordem *Lamiales*, é originário da região do mediterrâneo e da Crimeia, e atualmente, encontrado também nas regiões quentes da América, Ásia e África (MAIA; SOARES; JUNIOR, 2001).

Figura 3. Vitex. A) Arbusto florido e B) frutos.

Fonte: http://www.sbs.utexas.edu/bio406d/images/pics/lam/vitex_agnus-castus.htm

O fruto de vitex, também conhecido como alecrim de angola no norte do Brasil, como *chaste berry* nos Estados Unidos ou *Mönchspfefferfrüchte* na Alemanha, teve dois usos importantes, na gastronomia apimentada e foi considerado um fruto medicinal na antiguidade (MAIA; SOARES; JUNIOR, 2001).

Na Alemanha e França o consumo do fruto foi muito popular como substituto da pimenta do reino, por ser considerado picante e aromático, além de promover boa digestão (MAIA; SOARES; JUNIOR, 2001). Nos países do mediterrâneo, de onde o vitex é nativo, utilizou-se o fruto na gastronomia apimentada em geral (HANELT, 2001). Uteush, Borbova e Romanenko (1978) patentearam a utilização do fruto de vitex como tempero substituto de baixo custo da pimenta do reino e do pimentão, produtos importados e de alto custo na época.

O seu uso medicinal popular passa os 2000 anos, sendo reportado pela primeira vez nos escritos de Hipócrates no 4º século a.C e utilizado pelos gregos, pérsias e romanos na Idade média, por ser considerado um remédio feminino, entre as suas aplicações tradicionais encontram-se: para combate da hidropisia, injúrias, inflamação, infertilidade e eliminação da placenta (MAIA; SOARES; JUNIOR, 2001). Mesmo sendo contraditório, acreditava-se que vitex era um anafrodisíaco, ou seja, um supressor do desejo sexual, portanto, os monges da igreja católica colocavam um ramo das flores de vitex em sua túnica, dando origem ao nome popular ‘pimenta do monge’ (*Monk’s pepper*) (MAIA; SOARES; JUNIOR, 2001). No século XV ficou em desuso, porém, no inicio de 1900 foi iniciada a sua investigação química e a partir de 1950 os estudos farmacológicos em clínicas e laboratórios (MAIA; SOARES; JUNIOR, 2001).

Atualmente, o extrato do fruto é comercializado como medicamento fitoterápico para mulheres na forma de cápsulas ou tintura (extrato alcoólico), sendo os seus principais propósitos: amenizar os sintomas da menopausa, regular o ciclo menstrual, controlar os sintomas da TPM e enxaqueca menstrual. Ressalta-se que o seu uso é bem estabelecido apenas para os sintomas da TPM. Na literatura existem diversos estudos científicos comprovando a eficácia do fruto maduro e seco de vitex no tratamento dos sintomas da TPM, alguns destes serão detalhados posteriormente (seção 2.5).

A partir do reporte de avaliação sobre o fruto de *Vitex agnus castus* L. do comitê de produtos de ervas medicinais (HMPC) da agência de medicina da Europa (EMA) (2011), observou-se que na Europa (Austria, Bulgaria, Alemanha, Hungria, Espanha, entre outros) o consumo do fruto de Vitex se dá na forma de tinturas ou cápsulas de diferentes marcas, a maioria desde 1999. Na Alemanha foi consumido desde pelo menos 1976. Todos os produtos

são produzidos a partir dos frutos maduros e secos de vitex, realizando-se uma extração etanólica com porcentagens variando entre 50-70 % de etanol. A EMA (2011) estabeleceu que a posologia aprovada para o uso medicinal é de um extrato seco (6-12:1) obtido a partir de uma extração com solução etanólica 60 % (m/m). Também foi bem estabelecido que a utilização de vitex é apenas para os sintomas da TPM. Segundo a EMA (2011), a dose diária para uma mulher adulta deve ser de 20 mg do extrato equivalente a 180 mg do fruto de vitex, sendo administrados por pelo menos três ciclos para obter um tratamento eficiente, podendo retornar gradualmente os sintomas após o seu desuso.

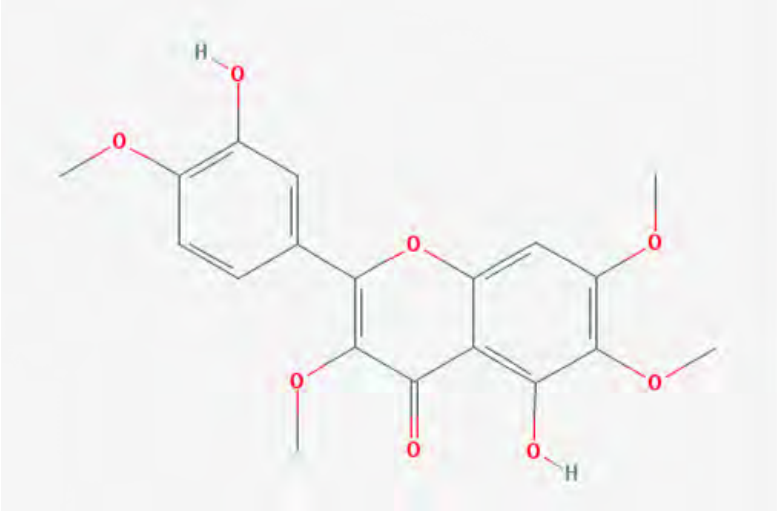
O mecanismo de ação do fruto de vitex ainda não está totalmente esclarecido, porém, a explicação mais provável é que os diterpenos em sinergia com os flavonoides, iridoides e outros constituintes, atuam como antagonistas do neurotransmissor dopamina (CHEN et al., 2011), considerado um fator chave para a regulação da síntese da prolactina, que quando hipersecretada causa os sintomas da TPM (MEIER et al., 2000). O mecanismo de ação dos fitoconstituentes de *Vitex agnus castus* L. e as características dos mesmos foram estudados por: Chen et al. (2011); Meier et al. (2000); Van Die et al. (2013); Webster et al. (2006); Wutke et al. (2003), entre outros.

Existem diversos estudos que identificam os constituintes do fruto de vitex com diversos equipamentos e procedimentos. No estudo realizado por Chen et al. (2011) foram isolados 24 fitoconstituentes dos frutos maduros de vitex, dentre os quais foi identificado pela primeira vez o diterpeno viteagnusin I, e foram isolados 10 flavonoides, 5 terpenoides, 4 compostos fenólicos e 1 glicerídeo. Os fitoconstituintes que sobressaíram foram a casticina, o agnusideo e a aucibinina. A casticina ($C_{19}H_{18}O_8$) (Figura 4) é um flavonol considerado o componente de referência na quantificação do fruto de vitex (CHEN et al., 2011), pouco solúvel em água e moderadamente solúvel em metanol. Já a aucubina ($C_{15}H_{22}O_9$) é um glicosídeo iridoide utilizado como material de referência para o controle de qualidade na fabricação dos extratos dos frutos de Vitex.

Destacam-se compostos agnusideo e casticina na espécie *Vitex*, pois alguns estudos evidenciaram que provavelmente estes compostos apresentam a funcionalidade para combater ou atenuar os sintomas da tensão pré-menstrual (TPM). Segundo estudo de Hu et al. (2007a) o agnusideo apresentou atividade estrogênica, ou seja, pode ter efeito na regulagem hormonal, diminuindo os sintomas da TPM. Já a casticina apresentou propriedades analgésicas e anti-hiperprolactinemias (HU et al., 2007b) e capacidade de se ligar e assim ativar o receptor δ-

opioide (WEBSTER et al., 2010), consequentemente, inibir a liberação da prolactina indicando efeito na redução dos sintomas da TPM.

Figura 4. Estrutura molecular da casticina.



Fonte: Pubchem, 2016.

2.4.1. Eficácia do extrato de vitex

A eficácia do extrato etanoico dos frutos de vitex foi verificada em diferentes estudos clínicos, a seguir serão mencionados apenas alguns dos mais relevantes. Três estudos trabalharam com o extrato *ZE 440* (60% etanol) da empresa alemã *Zeller*. Ressalta-se que este extrato *ZE 440* segue a indicação do HMPC, correspondendo a um extrato seco com relação de 6-12:1, extraído a partir de um solvente 60% etanol m/m, sendo que um tablete de 20 mg corresponde a 180 mg da droga, o que é recomendado (EMA, 2011). No primeiro estudo realizado por Berger et al. (2000), foi fornecido um tablete diário de 20 mg a 50 mulheres com idade (31,3 ± 7,7 anos) e peso (58,9 ± 6,9 kg) similares que sofriam de TPM durante três ciclos menstruais, no entanto, as pacientes foram estudadas durante 8 ciclos, os primeiros dois ciclos foram considerados referência, nos seguintes três foi realizado o tratamento e os últimos três ciclos foram analisados para verificar se o efeito prevaleceu após o tratamento. Os resultados mostraram que o extrato de vitex reduziu a intensidade dos sintomas da TPM em 42,5% em comparação com a referência (primeiros dois ciclos) ($p < 0,001$) e a quantidade de dias que as mulheres sofreram os sintomas de 7,5 para 6. Após o tratamento, os sintomas apareceram gradualmente, sendo que depois de três ciclos havia prevalecido uma redução de 20% ($p < 0,001$). Já o segundo estudo comparou o mesmo extrato *ZE440* (20 mg diários) com

placebo em um ensaio randomizado duplo-cego com 170 mulheres (86 ativas e 84 placebos) com TPM durante três ciclos menstruais. Os resultados mostraram diferença significativa com o placebo ($p < 0,001$), havendo uma redução da intensidade dos sintomas (irritabilidade, raiva, dor de cabeça, dor nos seios, entre outros) em 52 e 24 % para o tratamento com vitex e placebo, respectivamente. Durante o ensaio, sete mulheres reportaram efeitos colaterais não graves (4 vitex e 3 placebo), concluindo assim que o extrato de vitex tem diferença significativa com o placebo e é bem tolerado (SCHELLENBERG, 2001). O terceiro estudo avaliou a relação dose-efeito do extrato, sendo divididos os pacientes em quatro grupos (placebo, 8 mg, 20 mg e 30 mg). Neste, foi realizado um teste duplo-cego com 162 mulheres entre os 18-45 anos de idade por três ciclos. Os resultados mostraram que todos as doses foram bem toleradas, que não houve diferença significativa entre o placebo e o tratamento de 8 mg, nem entre os tratamentos de 20 e 30 mg, portanto a dose preferencial deve ser de 20 mg *ZE 440* (SCHELLENBERG et al., 2012).

O estudo de Lauritzen et al. (1997) é considerado importante porque avalia o efeito de vitex em comparação à piridoxina (vitamina B6), pois esta vitamina já tem o seu efeito em aliviar sintomas da TPM como nervosismo, dor de cabeça, irritibalidade, entre outros, demonstrado (MAIA; SOARES; JUNIOR, 2001). Neste estudo foi avaliada a cápsula da marca Agnolyt (1 cápsula contem: 3.5-4.2 mg de extrato seco do fruto de vitex na relação [9.58-11,5:1]) em um teste duplo cego randomizado por três ciclos menstruais com 90 pacientes. Os resultados mostraram que o tratamento com vitex teve melhores resultados que a piridoxina em atenuar os sintomas da TPM como dor de cabeça, constipação, depressão, entre outros. Nos resultados, observou-se que 24,5 % das pacientes tratadas com vitex avaliaram o tratamento como excelente, já para a piridoxina apenas 12,1%. Ainda, 36 % dos casos para vitex e 21 % para piridoxina indicaram que estavam livres de queixas.

Todos os estudos apresentados trabalharam com mulheres que sofriam da TPM, porém não foi considerado o grau de severidade da TPM. O estudo de Prilepskaya et al. (2006) teve como objetivo verificar a eficiência do extrato de vitex [*BNO 1095*, 70% etanol, equivalente ao extrato comercializado Agnucaston (WUTTKE et al., 2003)] em mulheres que sofrem sintomas moderados a severos. No estudo, 109 mulheres realizaram o tratamento durante três ciclos, os resultados mostraram que o extrato de vitex reduziu mais de 50 % da intensidade dos sintomas (PRILEPSKAYA et al., 2006), portanto, o extrato dos frutos de vitex foi capaz de atenuar os sintomas mesmo se a TPM for considerada moderada a severa.

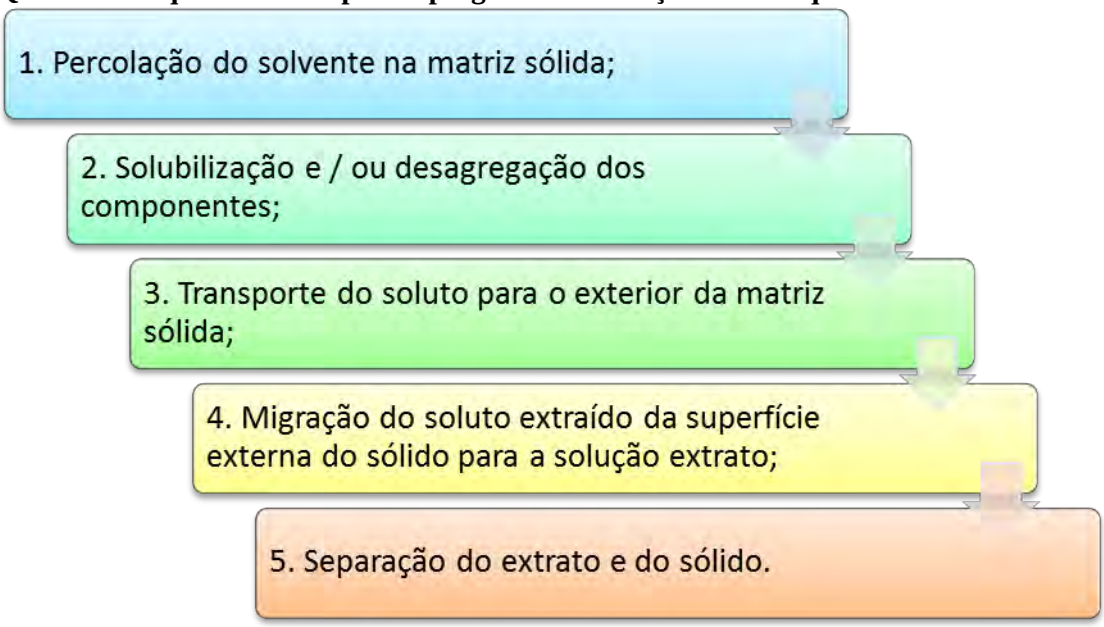
A EMA (2011) determinou que o extrato do fruto de vitex é seguro para a maioria das mulheres em idade fértil, não devendo ser usado durante a gravidez ou lactação. Como não foram feitos estudos em crianças ou idosos, não é recomendado o uso. Em geral, os efeitos colaterais são raros, podendo ser: alergia, dor de cabeça, náusea, diarreia, entre outros. Devido ao possível efeito dopaminérgico, não é recomendado o uso conjuntamente com medicamentos antagonistas da dopamina ou estrogênios, nem com terapia de reposição hormonal.

2.5. Extração

A extração de compostos bioativos de plantas pode ser realizada por diferentes métodos convencionais como a extração por soxhlet, hidrodestilação e maceração. Estas técnicas se baseiam na aplicação de diferentes solventes, calor e/ou agitação (AZMIR et al, 2013). Neste trabalho estudou-se a extração dos compostos bioativos dos frutos de vitex com os solventes água e etanol, pois são solventes considerados *GRAS - Generally Recognized As Safe*, ou seja, reconhecidos como seguros para o uso em alimentos.

A maceração, ou extração sólido-líquido, é uma técnica simples e de baixo custo, consiste na transferência de solutos de uma matriz sólida para um solvente. Esta técnica é utilizada, por exemplo, na extração da sacarose da cana de açúcar, lipídeos de oleaginosas e fitoquímicos de plantas (AGUILERA, 2003). O processo de extração, do ponto de vista prático, é simples, primeiro tritura-se a planta/fruto/semente em partículas muito menores, aumentando desta forma a área superficial de contato entre o material e o solvente, consequentemente, o rendimento. Em seguida, é misturado o material moído com o solvente em um recipiente fechado por determinado tempo e temperatura, o tipo de solvente o tempo e a temperatura são determinadas previamente a fim de otimizar a extração dos compostos de interesse. Normalmente se aplica agitação durante a extração para aumentar o rendimento do processo, pois aumenta a difusão e remove a solução concentrada da amostra trocando por solvente menos concentrado da superfície (AZMIR et al, 2013). Após a extração o material sólido é separado e o líquido remanescente é o extrato. O Quadro 2 mostra um esquema das etapas que ocorrem na transferência de massa na maceração. Ressalta-se que a difusão dos compostos de interesse é dependente da solubilidade destes compostos no solvente, que é consequência da polaridade do mesmo e, também, da viscosidade do solvente e da solução extrato (AGUILERA, 2003).

Quadro 2. Esquema das etapas empregadas na extração sólido-líquido.



Fonte: Aguilera, 2003.

2.6. Microencapsulação

A microencapsulação foi descrita por diversos autores e todos a descreveram como uma tecnologia utilizada para envolver ou embalar o material de interesse (núcleo ou recheio) que pode ser líquido, sólido ou gasoso com materiais poliméricos (material de parede ou carreador), obtendo como produto partículas da ordem de micrômetros, as quais poderão ser liberadas de forma controlada (FÁVARO-TRINDADE, PINHO e ROCHA, 2008). Portanto, a microencapsulação visa proteger o material de interesse das condições adversas do meio, tais como luz, umidade, oxigênio e interações com outros compostos, estabilizando o produto, aumentando a vida útil e promovendo a liberação controlada do ativo presente dentro da partícula em condições pré-estabelecidas (SHAHIDI & HAN, 1993; GOUIN, 2004). Ainda, possibilita melhorar as características do material, pois consegue reduzir a volatilidade, a higrospicidade e reatividade do mesmo (FÁVARO-TRINDADE, PINHO e ROCHA, 2008), possibilitando aplicações inusitadas para os materiais.

Esta tecnologia é muito utilizada pelas indústrias de alimentos, farmacêutica, de cosméticos e de higiene e limpeza. Na área de alimentos, existe uma infinidade de compostos que podem ser encapsulados como: ácidos, bases, óleos, vitaminas, sais, gases, aminoácidos, óleos essenciais, corantes, enzimas e microrganismos (probioticos) (FÁVARO-TRINDADE, PINHO e ROCHA, 2008). Ressalta-se que o desenvolvimento de produtos contendo

ingredientes ativos é um desafio (FÁVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008), pois o alimento é uma matriz complexa, ingerida por via oral, não devendo, portanto, afetar de forma negativa as suas propriedades organolépticas. Por outro lado, a microencapsulação é capaz de mascarar sabores indesejáveis (GOUIN, 2004), permitindo desta forma a aplicação de compostos desagradáveis sensorialmente, porém benéficos, em produtos alimentícios.

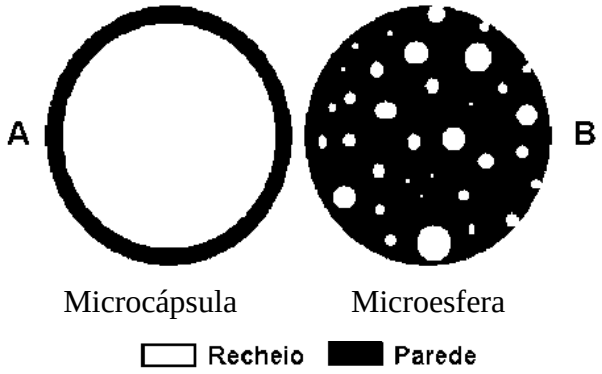
Existem várias técnicas de microencapsulação, que podem ser divididos em 3 grupos básicos segundo o procedimento de obtenção: (a) físico-químicos: coacervação simples e complexa, separação por fase orgânica e envolvimento lipossômico; (b) químicos: polimerização interfacial, inclusão molecular; e (c) físicos: *spray drying*, *spray chilling*, *spray coating*, leito fluidizado, extrusão, entre outros (ALVIM, 2005).

Em geral, poder-se-ia dizer que a formação das partículas seguem os seguintes passos: (I) elaboração de uma solução ou suspensão com o material de interesse e o carreador, (II) homogeneização, (III) deposição do carreador no material de interesse e (IV) fixação ou solidificação da envoltura (ALVIM, 2005). Este último passo é realizado por aquecimento, retirada do solvente ou ligações cruzadas (ALVIM, 2005), dependendo da técnica utilizada para encapsular.

Em função da técnica e das condições de processo se obtêm micropartículas de diferentes características em função da distribuição do recheio, classificadas em microcápsulas e microesferas. As microcápsulas são aquelas do tipo reservatório (Figura 5 A), onde o material de interesse se encontra no núcleo recoberto por uma capa do carreador, já as microesferas são do tipo matriz, ou seja, o material de interesse e o carreador (parede) se encontram distribuídos aleatoriamente por todo o volume da partícula, inclusive na superfície (Figura 5 B) (DESAI; PARK, 2005).

Neste projeto se empregou a técnica de *spray drying* por ser um método facilmente aplicável, de baixo custo, alta retenção do recheio, boa estabilidade quanto à estocagem e com uma vasta utilização na indústria de alimentos.

Figura 5. Classificação das partículas em função da distribuição do recheio. A) Microcápsula e B) Microesfera

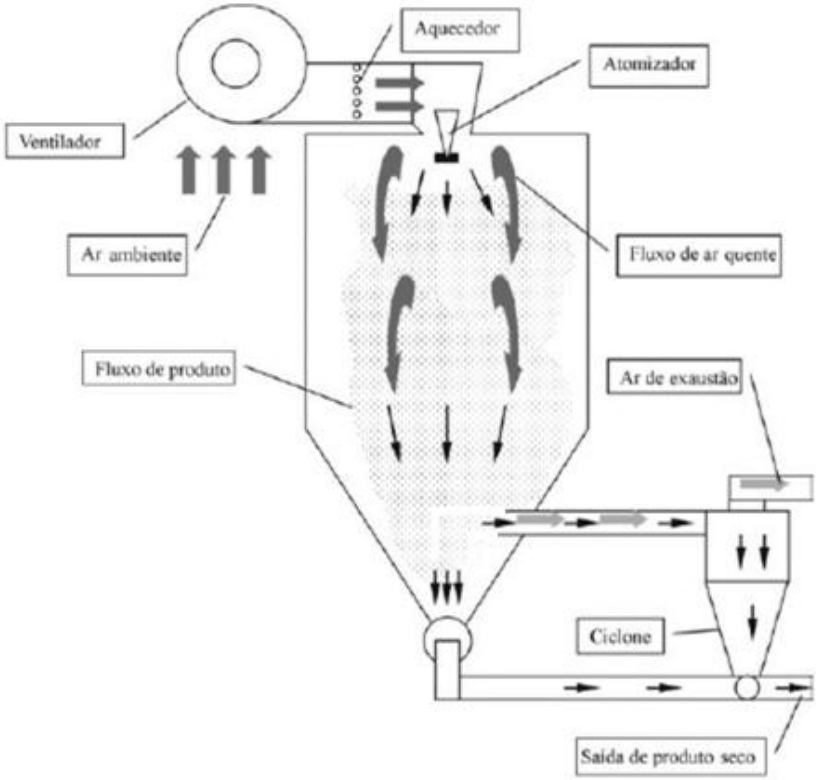


Fonte: Adaptado de Alvim (2005).

2.6.1. *Spray drying*

Spray drying é muito utilizado na indústria de alimentos como um método de secagem, no qual ocorre uma transformação do fluido (solução, dispersão ou pasta) em pó (ALVIM, 2005). Esta técnica, também conhecida como secagem por atomização, ocorre de maneira contínua e consiste basicamente na atomização do fluido em um compartimento que recebe um fluxo de ar quente (acima de 100 ˚C), consequentemente em uma evaporação instantânea da água seguida pela separação do pó obtido em ciclone (TANAKA, 2007), a Figura 6 mostra o esquema de funcionamento do equipamento *spray dryer*. A evaporação da água é rápida porque o fluido ao ser atomizado produz inúmeras gotículas, deste modo aumenta a área superficial de contato entre o fluido e o ar de secagem. Este processo de secagem tem alto rendimento, baixo custo em comparação com a liofilização e pode ser empregado em materiais termosensíveis, pois o fato da evaporação da água ser instantânea permite manter baixa a temperatura das micropartículas, exercendo assim a temperatura do ar de secagem pouca influencia sobre as micropartículas (TANAKA, 2007).

Figura 6. Esquema do *spray dryer*.



Fonte: http://images.slideplayer.com.br/1/84760/slides/slide_22.jpg

No processo de secagem por *spray drying* as micropartículas formadas apresentam um sistema multinucleado, ou seja, são formadas microesferas do tipo esponja (ALVIM, 2005). As partículas obtidas neste processo estão na faixa de 5-150 µm e as suas características dependem de fatores, tais como as características do fluido a ser atomizado (teor de sólidos, viscosidade, tamanho de partículas, etc.), as variáveis operacionais, o agente carreador utilizado no processo, etc (ALVIM, 2005). As principais variáveis operacionais do processo são: temperatura do ar de entrada e saída, fluxo de ar, fluxo de alimentação, geometria da câmera e tipo de atomizador (ALVIM, 2005).

Este método já foi utilizado para encapsular diferentes materiais, incluindo nutracêuticos como vitaminas (DESOBRY; NETTO; LABUZA, 1997; DESAI; PARK, 2005), minerais como cálcio (ONEDA; RÉ, 2003), compostos antioxidantes como polifenólicos ou pigmentos (HERAS-RAMÍREZ et al., 2011; BARBOSA; BORSARELLI; MERCADANTE, 2005), ácidos graxos essenciais (BAE; LEE, 2008; TAN; CHAN; HENG, 2009), assim como extratos de frutas (ERSUS; YURDAGEL, 2007; QUEK; CHOK; SWEDLUND, 2007).

A encapsulação de compostos bioativos é de extrema importância na indústria de alimentos funcionais, nutracêuticos, farmacêuticos e cosméticos, uma vez que o processo de microencapsulação visa proteger e dessa forma transforma estes em compostos estáveis. No caso dos compostos fenólicos, além de protegê-los, visa mascarar o sabor amargo que a maioria destes apresenta, como no caso das catequinas, isoflavonas, ligninas, taninos (FANG; BHANDARI, 2010). A encapsulação por *spray dryer* já se mostrou efetiva em mascarar o amargor de peptídeos de caseína, possibilitando a sua posterior aplicação em barras de proteína com boas aceitações sensoriais (ROCHA et al., 2009). O trabalho de Laokuldilok et al. (2016) também teve sucesso ao mascarar o odor do extrato de cúrcuma, a sua verificação foi realizado pelo cromatografo gasoso. Portanto, esta técnica parece ser promissora para a encapsulação do extrato dos frutos de vitex, protegendo os compostos fenólicos da oxidação e mascarando o seu sabor amargo e picante, possibilitando a sua posterior aplicação como ingrediente funcional em chocolate.

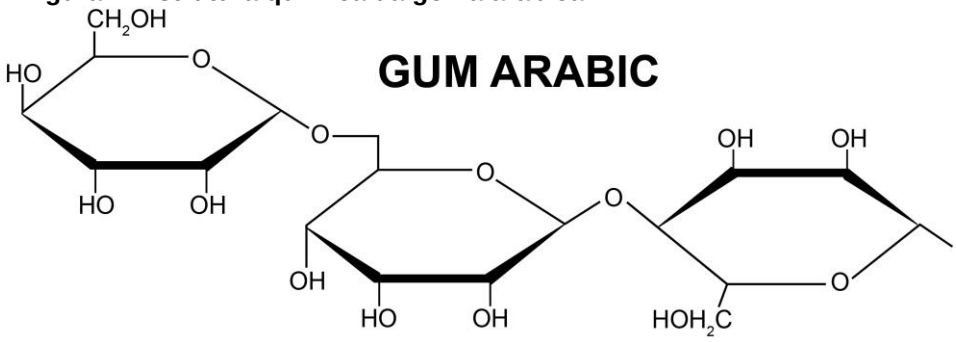
2.6.2. Goma arábica como material de parede

O material de parede, também denominado carreador ou agente encapsulante, é utilizado para cobrir, formar a cápsula, reter o recheio e liberá-lo em condições especificas (ALVIM, 2005). A encapsulação pelo *spray dryer* tem como desvantagem a sua limitação enquanto ao agente encapsulante, pois como o fluido é à base de água, o material de parede deve ser solúvel em água em um grau admissível (DESAI; PARK, 2005). Pode-se dizer que um carreador ideal tem as seguintes características: propriedade emulsificante, baixa viscosidade, baixa higrospicidade, termoresistente, estável, ausência de sabor (ALVIM, 2005). Neste processo de encapsulação, normalmente são utilizados como material de parede: amido, amido modificado, maltodextrina, quitosana, goma arábica, dentre outros (FÁVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008)

A goma arábica é um hidrocoloide natural exsudada a partir da *Acacia,* utilizada na indústria de alimentos como agente emulsificante e estabilizante (ALVIM, 2005), a sua estrutura química pode ser visualizada na Figura 7. A goma arábica tem baixo valor calórico, é inodora e sem sabor. Tem estrutura molecular ramificada, portanto baixa viscosidade, motivo pelo qual é muito utilizada como carreador, sendo especialmente utilizada para proteger voláteis contra a oxidação (ALVIM, 2005; MADENE et al., 2006). Contudo, a sua utilização é limitada pelo seu alto custo em relação à maltodextrina, sendo que o preço e a disponibilidade são flutuantes (MADENE et al., 2006). Neste trabalho adicinou-se

concentrações baixas de goma arábica, variando de 0-15 %, para ter um maior teor dos compostos bioativos, assim ter que adicionar menor quantidade no chocolate, portanto, menor influencia na textura.

Figura 7. Estrutura química da goma arábica.



3. Hipótese

O interesse em alimentos funcionais vem aumentando nos últimos anos, o que tem impulsionado a indústria de alimentos a inovar e tem gerado bilhões em lucro. A elaboração de um produto funcional para mulheres na idade reprodutiva capaz de atenuar ou aliviar os sintomas da TPM é promissora e inovadora. Os chocolates ricos em cacau trazem benefícios à saúde e são muito consumidos durante a TPM, portanto, a incorporação do extrato dos frutos de vitex em chocolate pode ser uma combinação perfeita e talvez ter efeito sinérgico. A eficácia do extrato dos frutos de vitex foi comprovada, contudo a sua aplicação é um desafio por ser rico em compostos fenólicos, compostos na sua maioria amargos, assim foi empregada a técnica de encapsulação/secagem por *spray dryer* para mascarar o gosto indesejado.

Neste contexto, este trabalho representou uma inovação na área de alimentos funcionais com apelo à manutenção da qualidade de vida de mulheres em período reprodutivo. No mercado europeu existe um alto consumo do extrato do fruto de *Vitex Agnus Castus* L. em forma de cápsulas ou tinturas, no entanto, não se encontrou nenhuma aplicação do mesmo em alimentos. Ainda, destaca-se a relevância deste projeto devido à escassez de trabalhos acadêmicos que abordam a extração, encapsulação e aplicação deste extrato em alimentos.

4. Objetivos

4.1. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi a encapsulação do extrato rico em compostos fenólicos dos frutos maduros e secos de vitex (*Vitex agnus castu*s L.), para mascarar a sensação de ardência e o amargor do mesmo, com vistas a sua aplicação no desenvolvimento de chocolate meio amargo com potencial para combater ou reduzir os sintomas da tensão pré-menstrual.

4.2. Objetivos Específicos

a) Caracterizar os frutos maduros e secos de vitex;
b) Determinar as condições ótimas para extração dos compostos fenólicos dos frutos de vitex;
c) Obter o extrato etanólico dos frutos maduros e secos de vitex nas condições otimizadas;
d) Caracterizar o extrato em relação ao seu perfil cromatográfico, pH, sólidos totais, fenólicos totais e casticina;
e) Encapsular o extrato por *spray drying* com diferentes condições de processo;
f) Caracterizar as micropartículas segundo a sua morfologia e tamanho;
g) Caracterizar o pó segundo a sua umidade, atividade de água, densidade, higroscopicidade;
h) Avaliar a estabilidade química dos pós durante o armazenamento por meio da quantificação periódica de casticina e compostos fenólicos totais;
i) Determinar qual condição de processo produziu pós mais estáveis quimicamente;
j) Avaliar o potencial da encapsulação em mascarar ou atenuar a sensação de ardência e o amargor do extrato;
k) Aplicar o tratamento mais estável em chocolate meio amargo e caracterizar o produto;
l) Avaliar a aceitação sensorial do chocolate produzido;
m) Avaliar a estabilidade dos compostos bioativos no chocolate produzido.

5. Material e Métodos

5.1. Materiais

Os frutos maduros e secos de vitex foram obtidos da empresa Chá & Cia - Ervas Medicinais (São Paulo, Brasil). Como material de parede foi utilizado goma arábica (Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Brasil). O reagente Folin–Ciocalteu e o etanol absoluto foram obtidos da empresa Dinâmica (Diadema, Brasil), o padrão de ácido gálico da Acros Organics (New Jersey, Estados Unidos) e o padrão da casticina da Sigma-Aldrich (St. Loius, Missouri, USA).

5.2. Métodos

5.2.1. Caracterização dos frutos de vitex

Os frutos de vitex foram recebidos já maduros e secos. Foram armazenados a temperatura ambiente no escuro até a sua utilização. Foram caracterizados em relação a sua composição centesimal no laboratório de bromatologia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo em duplicata. Também foram caracterizados em relação a sua distribuição granulométrica e diâmetro médio em peneiras Tyler com ajuda de uma mesa agitadora, de acordo com Foust et al. (1982). Após serem moídos, para posterior extração, foram determinados novamente a distribuição granulométrica e o diâmetro médio. A fim de determinar o aumento da área superficial do fruto antes e após ser moído, foram utilizadas as seguintes equações para o fruto desidratado e moído (ALLEN, 2003).

Inicialmente, foi estimado o diâmetro médio dos pós para cada peneira, sendo a média da abertura da peneira em questão e a peneira superior. No caso da primeira peneira foi utilizado o diâmetro real do fruto. A partir deste dado, foi calculado o volume equivalente em mm^3 com a Equação 1, esta e as seguintes equações foram realizadas para cada diâmetro médio..

$$Vi = \pi * dmi^3 * {}^1/_6 \qquad \text{(Equação 1)}$$

Onde: Vi: volume equivalente da partícula, dmi: diâmetro médio da partícula.

Com o volume equivalente e a densidade real, obtida a partir da medição com paquímetro e pesagem em balanca analítica de 10 frutos maduros e secos de vitex, foi encontrada a massa correspondente a cada partícula (Equação 2).

$$mpi = \rho * Vi \qquad \text{(Equação 2)}$$

Onde: mpi: massa da partícula, ρ: densidade do fruto maduro e seco de vitex, Vi: volume equivalente da partícula.

Em seguida, foi determinado o número de partículas em cada peneira (Equação 3) e por último a área superficial equivalente a uma esfera para cada partícula (Equação 4). A multiplicação de ambos e somatória resultou na área superficial total (Equação 5).

$$N = mi/mpi \qquad \text{(Equação 3)}$$

Onde: N: número de partículas, mi: massa do fruto de vitex correspondente a aquela peneira, mpi: massa da partícula.

$$Ai = \pi dmi^2 \qquad \text{(Equação 4)}$$

Onde: Ai: área superficial da partícula, dmi: diâmetro médio.

$$At = \sum Ni * A\,i \qquad \text{(Equação 5)}$$

Onde: At: área superficial total daspartículas, Ni: número de partículas, Ai: área superficial.

5.2.2. Obtenção e caracterização do extrato

5.2.2.1. Determinação das melhores condições de extração dos compostos fenólicos

Os ensaios foram feitos utilizando-se a proporção de sólido (frutos maduros, secos e triturados de *Vitex agnus castus* L.):solvente de 1,5:10, em massa. Primeiro foi realizado um estudo variando a concentração de etanol no solvente, utilizando o binômio tempo-temperatura de 45 ^{o}C por 1 hora. Uma vez escolhido o solvente, foi realizado outro estudo variando o binômio tempo e temperatura de contato entre o soluto e o solvente, a Tabela 1 mostra as variáveis de extração estudadas. Todas as condições foram testadas em triplicata, sendo as médias do teor de compostos fenólicos apresentadas.

Tabela 1. Variáveis e condições estudadas na extração de fenólicos dos frutos de vitex.

Variáveis	Condições estudadas
Concentração de etanol no solvente (% m/m de etanol)	10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 99,5
Temperatura (^{o}C)	25, 45 e 60
Tempo de contato (horas)	2, 6, 12 e 24

Fonte: própria autoria

Para melhor entendimento da influência do solvente na extração dos compostos fenólicos dos frutos de vitex, foram determinadas as densidades, viscosidades e polaridades dos solventes descritos.

A densidade e viscosidade foram medidas no Stabinger Viscosimeter SVM300 G2, da marca Anton Paar para os solventes hidro alcoólicos a 45 ^{o}C.

A polaridade foi determinada a partir do cálculo das constantes dielétricas pelas equações propostas por Wohlfarth (2014) e Tir et al. (2012), Equações 6 e 7, respectivamente. Inicialmente se determinou a constante dielétrica (Di) do etanol e da água pura a 25, 45 e 60 ^{o}C (na Equação 6 a temperatura deve estar em Kelvins), seguindo a equação proposta por Wohlfarth (2014), Equação 6. Em seguida, a partir desses dados, e as frações mássicas de etanol e água para cada solvente foi calculada a Di dos solventes hidro alcoólicos para cada condição utilizada seguindo a equação proposta por Tir et al. (2012), Equação 7.

$$Di = a + bT + cT2 + dT3 \qquad \text{(Equação 6.)}$$

onde T é a temperatura absoluta em K; a, b, c, d são constantes.

$$Di = DiAwA + DiWwW \qquad \text{(Equação 7.)}$$

onde wA e wW são as frações mássicas dos componentes etanol (A) e água (W), respectivamente, DiA e DiW são as constantes dielétricas dos solventes puros (etanol e água).

O Quadro 3 apresenta as constantes utilizadas para os solventes etanol e água.

Quadro 3. Constantes utilizadas para calcular as constantes dielétricas (DI) do etanol e a água.

	a	**b**	**c**	**d**
Etanol	151,45	-0,8702	0,001957	-1,5512E-06
Água	249,21	-0,79069	0,00072997	0

Fonte: Wohlfarth (2014).

5.2.2.2. Teor de fenólicos totais

Este ensaio foi realizado de acordo com Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventos (1999), utilizando-se 0,25 mL do extrato obtido anteriormente adicionados a 2 mL de água destilada e 0,25 mL do reagente de Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos à temperatura ambiente, foram adicionados 0,25 mL de solução saturada de carbonato de sódio, e os tubos foram colocados em banho-maria a 37 °C durante 30 minutos para desenvolvimento de cor. A absorbância foi lida em espectrofotômetro (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech) a 750 nm e o conteúdo de fenólicos totais foi calculado utilizando-se curva-padrão de ácido gálico (Acros Organics, New Jersey, Estados Unidos). Os resultados obtidos foram expressos em mg equivalente de ácido gálico/grama de extrato em base seca.

5.2.2.3. Teor de casticina

A quantificação da casticina foi realizada de acordo com Hoberg, Meier e Sticher (2001) por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com algumas modificações. As amostras foram diluídas em balões de 10 mL colocando 1 mL da amostra, 3 mL de água ultrapura (Direct-Q, Millipore) e completando o volume com metanol (Panreac, Espanha). Foi usado um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (Shimadzu, Japão) com detector de arranjos de diodos e coluna analítica em fase reversa (Shim-Pack VP ODS, 250 x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 µm). A fase móvel, com vazão de 1 mL/min, foi composta por água ultrapura (Direct-Q, Millipore) acidificada com ácido fórmico (Sigma-Aldrich, EUA) a pH 3,0 (A) e metanol (Panreac, Espanha) (B), com gradiente em B feito da seguinte forma: início em 50% com rampa até 80% em 21 min, de 21-24 min (100%), de 24-27 min (50%). O forno da coluna foi mantido a 35°C com injeção de 30 µl da amostra. Os cromatogramas foram adquiridos em 256 e 350 nm e os dados coletados no software LC Solution, versão 1.21. A quantificação foi realizada por padronização externa usando padrão casticina (Sigma-Aldrich, St. Loius, Missouri, USA) no intervalo de 0,78 – 9,8 ug/mL, os resultados obtidos foram expressos em µg casticina/grama de extrato em base seca.

A fim de comprovar se a casticina era mesmo quantificada no extrato, esta fração foi coletada no coletor de frações (Shimadzu, Japão) e analisada no detector de massas triploquadrupolo (Waters, EUA) para identificação molecular, análise realizada no laboratório de Microbiologia e Micotoxicologia de Alimentos da FZEA/USP.. Foi usado o modo de infusão com voltagem do capilar 3 kV, energia de colisão 30 V, dissociação induzida por

colisão (CID) com gás argônio, fluxo de infusão 10 µL/min no modo combinado com fase móvel (50% acetonitrila : 50% ácido fórmico 0,01%) a 0,50 mL/min, temperatura da fonte eletrospray (ESI) 150°C, temperatura de dessolvatação 500°C e fluxo de nitrogênio 800 L/h.

5.2.2.4. Perfil cromatográfico do extrato

Para realização da análise qualitativa dos compostos fenólicos presentes no extrato dos frutos de vitex, as principais frações do extrato nas seguintes condições foram coletadas no coletor de frações (Shimadzu, Japão) nas seguintes condições: fase móvel, com fluxo de 1 mL/min, foi composta de água ultrapura (Direct-Q, Millipore) acidificada com ácido fórmico (Sigma-Aldrich, EUA) a pH 3,0 (A) e metanol (Panreac, Espanha) (B), com gradiente em B feito da seguinte forma: 0 min (5%), de 0,1-3 min (10%), 3,1-7 min (15%), de 7,1-19 min (25%), de 19,1-25 min (27%), de 25,1-30 min (30%), de 30,1-39 min (34%), 39,1-44 min (37), de 44,1-49 min (42%), de 49,1-75 min (50%), 75,1-80 min (100%) e 80,1 min (5%). O forno da coluna foi mantido a 35 °C e foram injetados 30 µL da amostra (FUKAHORI et al., 2014) .

Em seguida, estas frações foram analisadas no detector de massas triploquadrupolo (Waters, EUA) para identificação molecular. Em ensaios preliminares foi definido utilizar o modo de infusão com voltagem do capilar 3 kV, energia de colisão entre 10 a 30 V, dissociação induzida por colisão (CID) com gás argônio, fluxo de infusão 10 µL/min no modo combinado com fase móvel (50% acetonitrila : 50% ácido fórmico 0,01%) a 0,50 mL/min, temperatura da fonte eletrospray (ESI) 150°C, temperatura de dessolvatação 500°C e fluxo de nitrogênio 800 L/h.

Na tentativa de identificação dos principais compostos presentes nas frações coletadas do extrato de vitex os íons moleculares e seus principais fragmentos obtidos na análise de espectrometria de massas foram comparados com dados disponíveis na literatura para identificação dos flavonoides.

5.2.2.5. Preparo do extrato liofilizado

Foram liofilizados 100 mL do extrato aquoso de vitex em liofilizador Terroni LC-1500 (São Carlos, Brazil) por 48 horas para comparar possíveis perdas na hora da concentração dos

extratos pelo uso de altas temperaturas (45 ^{o}C) na atividade antibacteriana e antioxidante do extrato.

5.2.2.6. Atividade antibacteriana “in vitro”

A atividade antimicrobiana “in vitro” do extrato etanólico, do extrato concentrado e do extrato liofilizado (0,204 g/mL) foi avaliada para as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCT 5591 e *Listeria monocytogenes* CCT 7408 e as bactérias Gram-negativas *Salmonella enteritidis* CCT 4475 e *Escherichia coli* CCT 0548. Essas culturas foram gentilmente doadas pela Fundação André Tosello (Campinas, Brasil), de sua Coleção de Culturas Tropicais.

Inicialmente foi realizada a ativação das bactérias em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*), o repique das mesmas em BHI e após 24 horas foi realizada uma estria em ágar nutriente para cada microrganismo. Após 24 horas, foram semeadas colônias das bactérias em soluções salinas 0,9% (m/v) e foi realizada a leitura em espectrofotômetro (modelo DR 2800, HACH, Loveland, Estados Unidos) para obter soluções com concentrações conhecidas das bactérias (NORI et al., 2011), segundo Tabela 2.

Tabela 2. Relação entre absorbância e concentração para os microrganismos testados.

Microrganismo	Comprimento de onda	Absorbância correspondente	UFC/mL
Staphylococcus aureus	660 nm	0,135	$1 – 2 * 10^{8}$
Escherichia coli	660 nm	0,100	$1 – 2 * 10^{7}$
Salmonella enteritidis	660 nm	0,100	$1 – 2 * 10^{6}$
Listeria monocytogenes	600 nm	0,150	$1 * 10^{8}$

UFC= Unidades formadoras de colônia. Fonte: própria autoria.

Posteriormente, foi realizado um *screening* em triplicata através do método de difusão em ágar nutriente, onde 100 µL das soluções com concentrações conhecidas de microrganismos (Tabela 2) foram semeadas em ágar nutriente, após espalhar as soluções com ajuda da alça de Drigalski foram feitos com ponteiras cinco pocinhos, sendo que estes foram preenchidos com 35 µL de: a triplicata do tratamento testado, controle positivo (Tetraciclina 100 mg/mL) e controle negativo (água ou solução etanólica 60 %, segundo o caso).

5.2.2.7. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB)

Para as amostras que apresentaram halo inibitório, foram determinadas as concentrações mínimas inibitória (CMI) e bactericida (CMB) em triplicata em microplacas de 96 poços, segundo metodologia proposta por Silva et al. (2014).

Inicialmente, foram adicionados 100 µL de caldo BHI contendo concentrações na ordem de 10^5 (*S. enteritidis)* e 10^6 UFC/mL (outras bactérias) em duplicata na primeira linha da microplaca. Posteriormente, foram adicionados 100 µL dos tratamentos que deram positivo no *screening* na primeira linha e a partir desta foram feitas oito diluições seriadas. A microplaca foi incubada a 37 ^oC por 24 horas. Após este período, foram adicionados 35 µL de uma solução 0,01% de resazurina (SILVA et al., 2014) que deixou os pocinhos de coloração azul, após 10 minutos, os pocinhos que tivessem a cor alterada para rosa indicariam que houve crescimento bacteriano. Caso os pocinhos ficassem com a coloração roxa indicaria um efeito inibitório e não bactericida. Para verificação dos resultados, 10 µL de cada pocinho foram semeados em placas de ágar nutriente por 24 horas.

5.2.2.8. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante do extrato aquoso, extrato concentrado e do extrato seco por liofilização foi determinada por dois métodos, a capacidade de sequestro do radical DPPH• e Poder redutor do ferro (FRAP).

Capacidade de sequestro do radical DPPH• (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical)

Essa capacidade foi determinada de acordo com o método proposto por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), com algumas modificações. Inicialmente, uma alíquota de 1,0 mL do extrato obtido da amostra previamente diluído foi misturada com 3,0 mL de uma solução metanólica de DPPH• (0,03080 mg/mL). Após homogeneização foram mantidos os tubos por 25 minutos a temperatura ambiente (± 28 °C) sob abrigo da luz, a absorbância foi lida a 517 nm utilizando um espectrofotômetro (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech). Para a curva padrão foi utilizada uma solução metanólica de Trolox, nas seguintes concentrações 20,

40, 60, 80 e 100 µM, sendo os resultados expressos como µmol equivalentes de Trolox/g de amostra em base seca.

Poder redutor do ferro (FRAP)

Esta análise foi realizada de acordo com Benzie e Strain (1996). Inicialmente, uma alíquota de 500 µL do extrato obtido da amostra previamente diluído foi misturada com 3750 µL do reagente FRAP. Em seguida, os tubos foram colocados em banho-maria a 37 °C por 5 minutos para posterior leitura da absorbância a 593 nm em espectrofotômetro (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech). O reagente FRAP é a combinação de 25 mL de tampão acetato 0,3 M, 2,5 mL de solução TPTZ (tripiridiltriazina) 10 mM e 2,5 mL de solução aquosa de cloreto férrico 20 mM. Como curva padrão foi utilizada uma solução metanólica de Trolox (0,25 mg/mL), em diferentes concentrações (0,1; 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 mM), sendo os resultados expressos como µmol equivalentes de Trolox/g de amostra em base seca.

5.2.3. Secagem/Encapsulação

5.2.3.1. Processos de secagem do extrato líquido

Preparo dos pós por *spray-drying*

Para o preparo dos pós, inicialmente o extrato obtido anteriormente foi adicionado de agente carreador goma arábica (GA) em quatro concentrações (0, 5, 10 e 15 g GA /100 g do extrato concentrado) para ser atomizado em *spray-dryer* em duas temperaturas de ar de entrada (130 e 160 ºC). A secagem foi realizada em *spray-dryer* de bancada modelo MSD 1.0 - LabMaq operando com vazão de ar comprimido de 40 L/min no bico e velocidade do ar de secagem de 2,5 m/s. A solução foi bombeada até o bico injetor do equipamento com uma vazão de 10 mL/min.

A Tabela 3 apresenta os oito tratamentos propostos, cujos processos de secagem foram realizados em duplicata.

Tabela 3. Ensaios para secagem do extrato líquido de vitex mostrando as variáveis testadas.

Tratamento	Concentração do agente carreador (g goma arábica/100g do extrato concentrado)	Temperatura de entrada do ar de secagem (^{o}C)
S. 130	0	130
S. 160	0	160
T1	5	130
T2	5	160
T3	10	130
T4	10	160
T5	15	130
T6	15	160

Fonte: própria autoria.

Os pós obtidos foram caracterizados em relação à atividade de água, umidade, densidade aparente, teor de fenólicos totais e casticina, estabilidade ao longo do tempo em relação à casticina e aos compostos fenólicos, espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), higroscopicidade, isotermas de sorção e potencial de mascarar a sensação de ardência e amargor de vitex. Já as microesferas foram caracterizadas em relação à morfologia, tamanho e distribuição e avaliação de formas polimórficas por difração de raios-X

Preparo do extrato liofilizado

Para efeito de controle com o material seco por *spray-drying*, foram liofilizados aproximadamente 200 mL do extrato já concentrado dos frutos de vitex em liofilizador Terroni LC-1500 (São Carlos, Brazil) por 48 horas sem carreador.

5.2.3.2. Rendimento dos processos de secagem

O rendimento dos processos de secagem foi determinado em relação à quantidade do pó obtido após a secagem e a quantidade de sólidos totais na solução antes da secagem (sólidos do extrato e do carreador) segundo a Equação 8.

$$Rendimento\ de\ secagem = \frac{massa\ do\ pó\ obtido}{massa\ de\ sólidos\ totais\ da\ solução}\ x\ 100 \quad (Equação\ 8.)$$

5.2.3.3. Caracterização dos pós obtidos

Atividade de água e umidade dos pós

A atividade de água foi determinada utilizando-se o equipamento AQUALAB (Decagon Devices, Pullman, WA) e a umidade no analisador de umidade modelo MB 35 da marca Ohaus (Ohio, Estados Unidos), ambas análises em triplicata. Ambas foram determinadas logo após a secagem e após o período de estabilidade (120 dias a temperatura ambiente (± 28 °C) e 38% de UR).

Densidade aparente dos pós

Em provetas de 5 mL foram pesados aproximadamente 2 g dos pós, em seguida foram realizados 120 batidas (1 por segundo) para promover compactação e então realizada a leitura do volume que ocupa o pó, em triplicata. Sendo calculada a densidade aparente pelo quociente da massa pelo volume aparente (g/mL).

Higroscopicidade dos pós

Para a determinação da higroscopicidade foi adotada a metodologia utilizada por Cai e Corke (2000) com algumas modificações, 50 mg de amostras (T1-T6, S.130, S.160, extrato liofilizado e GA), em triplicata, foram acondicionadas por duas semanas em dessecador contendo solução saturada de NaCl, que confere ao meio uma umidade relativa de 75%, havendo pesado as amostras cada dois dias para conferir que tenha atingido peso constante. A higroscopicidade foi determinada através da massa de água absorvida por 100 g de amostra.

5.2.3.4. Teor de fenólicos totais nos pós e no extrato líquido

Esta análise foi realizada em triplicata seguindo a metodologia proposta por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventos (1999). Assim, aproximadamente 10 mg dos pós T1-T6, 4 mg dos pós S.130, S.160 e extrato liofilizado, e 50 mg do extrato líquido foram diluídas em 3 mL de água destilada em balões de 10 mL sendo o volume completado com etanol absoluto. Para a reação, foram colocados inicialmente em tubos de vidro 0,250 mL dos extratos obtidos anteriormente, 2 mL de água destilada e 0,250 mL do reagente de Folin-Ciocalteu, homogeneizados no vortex. Após 3 minutos à temperatura ambiente, foram adicionados 0,250 mL de solução saturada de carbonato de sódio anidro e homogeneizados no vortex novamente. Os tubos foram colocados em banho-maria a 37 °C durante 30 minutos para

desenvolvimento de cor, então foi medida a absorbância a 750 nm em espectrofotômetro (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech) e o conteúdo de fenólicos totais foi determinado utilizando-se curva-padrão de ácido gálico. Os resultados obtidos foram expressos em mg equivalente de ácido gálico (EAG) /g de amostra em base seca.

5.2.3.5. Teor de casticina nos pós e no extrato líquido

Para a quantificação da casticina foi utilizada metodologia proposta por Hoberg, Meier e Sticher (2001) com algumas modificações. Aproximadamente 50 mg das amostras T1-T6, 20 mg S.130, S.160 e extrato liofilizado, e 500 mg do extrato líquido foram diluídas em balões de 10 mL colocando 3 mL de água ultrapura (Direct-Q, Millipore) e completando o volume com metanol, em triplicata. O sistema utilizado foi de cromatografia líquida de alta eficiência (Shimadzu, Japão) com detector de arranjos de diodos e coluna analítica em fase reversa (Shim-Pack VP ODS, 250 x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 µm). A fase móvel, com fluxo de 1 ml/min, foi composta de água ultrapura acidificada com ácido fórmico a pH 3,0 (A) e metanol (B), com gradiente em B feito da seguinte forma: início em 50% com rampa até 80% em 21 min, de 21-24 min (100%), de 24-27 min (50%). O forno da coluna foi mantido a 35°C com injeção de 30 µl da amostra. Os cromatogramas foram adquiridos em 256 e 350 nm e os dados coletados no software LC Solution, versão 1.21. A quantificação foi realizada por padronização externa usando padrão casticina no intervalo de 0.78 - 9.8 µg/mL, os resultados obtidos foram expressos em mg casticina/g de amostra em base seca.

5.2.3.6. Retenção dos compostos fenólicos e da casticina no processo de secagem

A quantificação dos compostos fenólicos e da casticina foi realizada como explicado anteriormente nos pós, logo após o processo de secagem em triplicata.

O rendimento foi calculado em relação ao teor dos compostos fenólicos/casticina quantificados em cada um dos tratamentos logo após o processo de secagem e o teor de fenólicos/casticina presentes na solução antes da secagem (Extrato líquido e GA), segundo Equação 9.

$$Retenção = \frac{Teor\ fenólicos/casticina\ nos\ pós}{Teor\ fenólicos/casticina\ presentes\ na\ solução}\ x\ 100 \qquad (Equação\ 9.)$$

5.2.3.7. Estabilidade da casticina e dos compostos fenólicos ao longo do tempo nos pós e no extrato líquido

A estabilidade da casticina e dos compostos fenólicos do extrato presentes nos pós com carreador (T1-T6), em comparação aos presentes no extrato líquido, extrato seco em *spray dryer* sem carreador (S.130 e S.160) e extrato seco em liofilizador sem carreador foi monitorada utilizando os métodos descritos anteriormente para quantifica-los.

As amostras foram armazenadas em triplicata em potes de vidro, protegidos da luz, na presença de O_2, umidade controlada (38 % UR) e à temperatura ambiente (± 25 ºC) (TONON, 2009) e as análises foram realizadas nos tempos 0, 7, 15, 30, 60, 90 e 120 dias após a secagem.

5.2.3.8. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Para avaliar a interação dos componentes ativos do vitex com a goma arábica, foi utilizada a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (espectrômetro Perkin Elmer FT-IR, Walthman, EUA) na região de 4000 a 600 cm^{-1}, conforme proposto por Rocha-Selmi et al. (2013).

5.2.3.9. Isotermas de sorção nos pós

As umidades de equilíbrio das amostras em pó (T1-T6, S.130, S.160, extrato liofilizado e goma arábica pura) foram determinadas pelo método gravimétrico estático (LABUZA, 1984), utilizando-se soluções salinas saturadas em água destilada, para uma faixa de umidade relativa de 0,109-0,843 % (Tabela 3) (TONON, 2009).

Tabela 3. Atividade de água (Aw) das soluções salinas utilizadas para determinar as isotermas de sorção.

Sal	*Aw*
LiCl	0,109
CH3COOK	0,260
MgCl2	0,379
K2CO3	0,455
KI	0,696
NaCl	0,753
KCl	0,843

Fonte: própria autoria.

As amostras foram colocadas em potes de vidro e, em seguida, armazenadas com as respectivas soluções salinas a 25°C. As amostras foram pesadas em balança analítica em intervalos regulares de tempo, até atingirem o equilíbrio (cerca de 3 semanas). Depois de atingido o equilíbrio, a umidade de equilíbrio das amostras foi calculada como descrito na Equação 10.

$$Ueq = \frac{m_{agua}}{m_s} x\ 100 \qquad (Equação\ 10.)$$

Onde: Ueq é a umidade de equilíbrio (% em base seca), $m_{água\ absorvida}$ é a massa total de água (massa água inicial + massa água absorvida) na amostra (g), e m_s é a massa seca da amostra (g).

Os dados experimentais obtidos foram ajustados pelos seguintes modelos encontrados na literatura para isotermas de sorção: GAB, BET modificado, Halsey, Oswin e Henderson, apresentados na Tabela 4. Para a determinação dos parâmetros destes modelos foi realizada uma análise de regressão não linear dos dados experimentais com o auxílio da ferramenta Solver do *software* Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, EUA).

Tabela 4. Modelos para isotermas de sorção em alimentos.

Modelo	Equação	Referência
GAB	$U_{eq} = \frac{X_m . C_{GAB} . K_{GAB} . a_w}{(1 - K_{GAB} . a_w) . (1 - K_{GAB} . a_w + C_{GAB} . K_{GAB} . a_w)}$	VIEIRA; FIGUEIRÊDO; QUEIROZ, 2007.
BET	$U_{eq} = \frac{X_m . C_{BET} . a_w [1 - (N+1) . (a_w)^N + N . (a_w)^{N+1}]}{(1 - a_w) . [1 - (1 - C_{BET}) . a_w - C_{BET} . (a_w)^{N+1}]}$	TONON et al. 2009.
Halsey	$U_{eq} = \left(\frac{-A_{Hal}}{T . ln a_w}\right)^{1/B_{Hal}}$	GOULA et al. 2008.
Oswin	$U_{eq} = A_{Osw} . \left(\frac{a_w}{1 - a_w}\right)^{B_{Osw}}$	VIEIRA; FIGUEIRÊDO; QUEIROZ, 2007.
Henderson	$U_{eq} = \left[\frac{\ln (1 - a_w)}{-A_{Hend}}\right]^{1/B_{Hend}}$	AL-MUHTASEB; McMINN; MAGEE, 2002.

Para escolha dos melhores ajustes foram utilizados dois critérios, o coeficiente de determinação (R^2) e o módulo do desvio relativo médio (*DR*), calculado de acordo com a Equação 11.

$$DR = \frac{100}{N}\ x \sum \frac{[VE - VP]}{VE} \qquad (Equação\ 11.)$$

Onde: DR é o desvio relativo, N o número de observações, VE o valor experimental e VP valor predito pelo modelo.

5.2.3.10. Caracterização das micropartículas

Caracterização morfológica das micropartículas por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A caracterização morfológica das micropartículas dos oito tratamentos e da goma arábica foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) no microscópio Tabletop Microscope Hitachi (Tóquio, Japão) TM 3000, com o programa TM 3000, sem recobrimento de ouro.

Análise do tamanho e distribuição do tamanho das micropartículas

Para obtenção do tamanho e distribuição do tamanho das micropartículas foi utilizado o analisador de partículas por difração a laser SALD- 201V, Shimadzu (Kyoto, Japão). Para essa análise, uma pequena quantidade das micropartículas foi dispersa em etanol absoluto e submetida a três leituras. Esta análise foi realizada logo após a encapsulação e após o período de estabilidade (120 dias a temperatura ambiente e 38% de umidade relativa) em triplicata.

Difração de raios-X

Para a avaliação de formas polimórficas das micropartículas foi utilizada a técnica de difração de raios-X (AXS Analytical X-Ray Systems Siemens D5005, Alemanha). As medidas foram obtidas pelo escaneamento de 2θ na faixa de 5 - 55° com uma rampa de 6° /min conforme descrito por Xiao et al. (2015) em triplicata.

5.2.4. Aplicação do extrato na forma livre e encapsulada

5.2.4.1. Produção do chocolate meio amargo

A fim de se verificar a funcionalidade das partículas obtidas, foi desenvolvido um chocolate meio amargo com a aplicação do extrato dos frutos de vitex na forma livre (amostra contendo o extrato atomizado sem carreador (S.160) e goma arábica, exatamente na mesma proporção em que estes aparecem nas partículas (T6), misturados mecanicamente) e encapsulada (T6: 160 ˚C/ 15 % de goma arábica), como controle foi produzido chocolate meio amargo sem adição de vitex. O chocolate foi desenvolvido nas instalações do Cereal Chocotec do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) em Campinas-SP. Foi elaborada

uma formulação para o desenvolvimento dos chocolates no ITAL, contendo: açúcar (47%), massa de cacau (43%), manteiga de cacau (10%), emulsificantes lecitina de soja (0,3%) e poliglicerol poliricinoleato (PGPR) (0,2%) e as partículas livres e encapsuladas (2,5% da massa do chocolate preparado).

As etapas empregadas para a elaboração do chocolate foram as descritas no fluxograma da Figura 8, sendo que as micropartículas do tratamento T6 foram adicionadas terminando a etapa da temperagem. Os cuidados que foram tomados durante a produção do chocolate foram: (I) o refino foi feita para obter partículas com tamanho na faixa de 20 - 25 µm, (II) a conchagem foi promovida em três etapas, inicialmente a conchagem seca por 15 min a 65 °C, em seguida foi adicionada a manteiga de cacau e realizada a conchagem plástica por 20 horas a 65 °C, após esse período foram adicionados os emulsificantes e esperado mais 4 horas a 65 °C na concha (conchagem úmida), (III) a temperagem foi realizada até atingir temperaturas de 28 °C, sendo adicionado imediatamente as partículas, misturado e feita a moldagem, (IV) o resfriamento foi realizado em túnel de ar frio com perfil de temperatura: temperaturas de entrada – meio – saída de 18 -11 - 18 °C.

Figura 8. Fluxograma do processo de elaboração do chocolate.

Fonte: própria autoria.

Após a produção dos chocolates, estes foram avaliados microbiologicamente seguindo as exigências da Agencia Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, mostrando a ausência de coliformes totais e salmonela em 25 g da amostra de cada batelada produzida (2 bateladas). Finalmente, os chocolates foram caracterizados em relação à dureza, pH, cor, atividade de água e aceitação sensorial. Adicionalmente, foi quantificado o teor de casticina e compostos fenólicos nos chocolates e também foi avaliada a estabilidade desses compostos ao longo de 60 dias, nos tempos 0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias.

5.2.4.2. Caracterização dos chocolates adicionados de vitex e controle

A atividade de água da amostra foi avaliada utilizando o aparelho Decagon Aqualab automático CX-2 em triplicata.

A dureza do chocolate foi determinada por um texturômetro (TA XT Plus Texture Analyser, Extralab, Brasil), utilizando-se uma probe *needle* P/2 como descrito por Afoakwa et al. (2008). Foram padronizadas as velocidades de 0,5 mm/s de prespeed 1 mm/s, test 2 mm/s, postspeed 10 mm/s e penetração de 5 mm. Os ensaios foram feitos em quintuplicata em barras com as dimensões 20 x 25 x 7 mm (L x W x H) no início e no final da estabilidade (tempos 0 e 60 dias).

Para avaliação do pH, 10 g do chocolate de cada tratamento foram trituradas e misturadas em 100 mL de água destilada com agitador magnético por 10 min, após esse período o pH foi medido com um pHmetro (Marte, MB 10, Brasil).

A cor das barras de chocolate foi avaliada com o auxílio de um colorímetro (HunterLab Model MiniScan XE, Reston, USA) no início e final da estabilidade (tempos 0 e 60 dias). A análise determinou a luminosidade (L*), o componente vermelho-verde (a*) e o componente amarelo-azul (b*) em 3 pontos da barra de chocolate , e o índice de brancura (White Index – WI) foi calculado a partir da Equação 12 descrita por Lohman e Hartel (1994). Assim, foi possível correlacionar esta análise com o desenvolvimento de *fat bloom* na superfície das barras do chocolate, quanto maior o valor de WI mais branca é a superfície do chocolate.

$$WI=100-[(100-L)2+a^{*}2+b^{*}2]0.5 \quad \text{(Equação 12.)}$$

Onde WI= Índice de brancura, L= parâmetro de cor luminosidade, a*= parâmetro de cor chroma a* e b*= parâmetro de cor chroma b*.

5.2.4.3. Estabilidade da casticina e os compostos fenólicos ao longo do tempo nos chocolates

A estabilidade da casticina e dos compostos fenólicos dos chocolates, embalados com papel chumbo e armazenados a 22 °C, foi monitorada nos tempos 0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias utilizando-se os métodos descritos anteriormente para quantificar casticina e compostos fenólicos em triplicata.

Para a extração dos compostos fenólicos e da casticina, primeiro se desengordurou a amostra e depois se realizou a extração com uma solução 80 % (v/v) etanol, como descrito por Adamson et al. (1999) e Alañón et al. (2016). Assim, 3 g da amostra de chocolate foi particionada com auxilio de um ralador e misturados com 10 mL de n-hexano, em seguida, a mistura foi homogeneizada usando vórtex e colocada em ultrassom por 5 min, a continuação, a mistura foi centrifugada (2935 x g por 5 min). A seguir, repetiu-se todo o procedimento, porém adicionando-se apenas 5 mL de n-hexano. Em seguida, as amostras foram secas para remoção do n-hexano residual. A extração foi realizada duas vezes para garantir a máxima liberação destes compostos, dessa forma ao chocolate, previamente desengordurado, adicionou-se 2,5 mL de solução alcóolica (80% v/v) e homogeneizou-se com o vortex primeiramente e depois usando ultrassom durante 10 min, sendo em seguida centrifugada (2935 x g por 5 min), totalizando 5 mL do extrato final.

Para a quantificação da casticina, apenas foi filtrado o extrato, já para a quantificação dos compostos fenólicos foi diluído o extrato em uma relação de 0,8:10 em solução 80 % (v/v) de etanol.

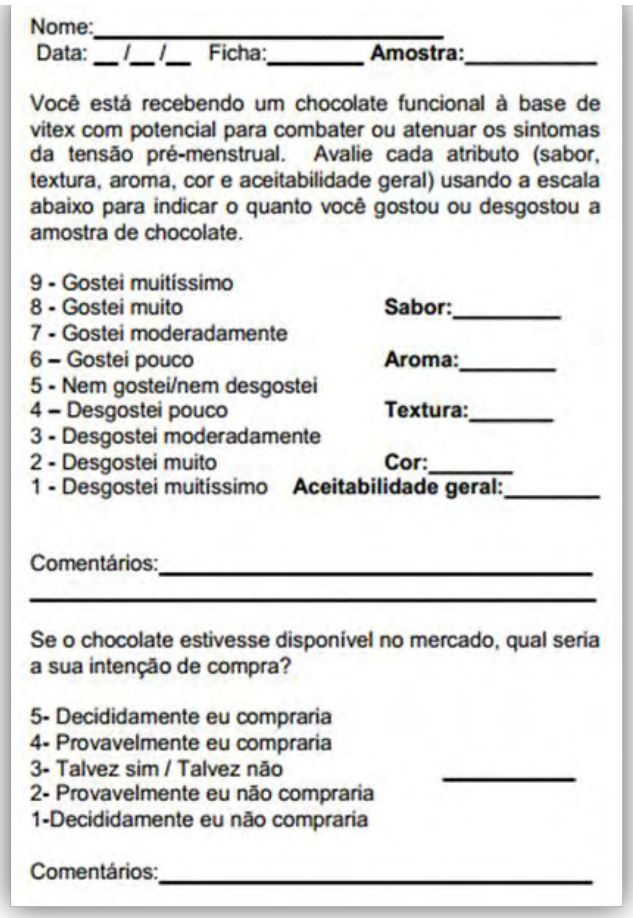
5.2.4.4. Aceitação sensorial dos chocolates

A análise sensorial dos chocolates obtidos foi realizada em cabines individuais, de acordo com a metodologia descrita por Meilgaard et al. (1999). Inicialmente, entregou-se o termo de livre consentimento e um questionário de consumo (Apêndices A e B, respectivamente) para poder conhecer o perfil das participantes. A continuação, as amostras foram apresentadas em copos plásticos de 50 mL, foi servido um copo de água e bolacha de

água e sal, para que os participantes limpassem o palato entre cada amostra. A aceitação dos produtos foi avaliada usando uma escala hedônica de 9 pontos (1 - "desgostei muitíssimo" e 9 – "gostei muitíssimo") para os atributos de sabor, textura, cor, aroma e aceitabilidade geral. Ainda, foi perguntado sobre a intenção de compra do produto (1 - " Decididamente não compraria" e 5 – "Decididamente compraria"). Cento e vinte e duas provadoras do sexo feminino, não treinadas, participaram do teste.

Ressalta-se que as provadoras foram advertidas que em caso de gravidez ou lactação não fizessem o teste. A Figura 9 apresenta a ficha de avaliação de aceitação e intenção de compra que foi utilizada.

Figura 9. Ficha para o ensaio de aceitação e intenção de compra do chocolate.



Nome:_____
Data: __ /__ /__ Ficha:_____ **Amostra:**_____

Você está recebendo um chocolate funcional à base de vitex com potencial para combater ou atenuar os sintomas da tensão pré-menstrual. Avalie cada atributo (sabor, textura, aroma, cor e aceitabilidade geral) usando a escala abaixo para indicar o quanto você gostou ou desgostou a amostra de chocolate.

9 - Gostei muitíssimo
8 - Gostei muito
7 - Gostei moderadamente
6 – Gostei pouco
5 - Nem gostei/nem desgostei
4 – Desgostei pouco
3 - Desgostei moderadamente
2 - Desgostei muito
1 - Desgostei muitíssimo

Sabor:_____
Aroma:_____
Textura:_____
Cor:_____
Aceitabilidade geral:_____

Comentários:_____
_____

Se o chocolate estivesse disponível no mercado, qual seria a sua intenção de compra?

5- Decididamente eu compraria
4- Provavelmente eu compraria
3- Talvez sim / Talvez não
2- Provavelmente eu não compraria
1-Decididamente eu não compraria

_____

Comentários:_____

Fonte: própria autoria.

Esta análise foi realizada no Laboratório de Análise Sensorial da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP), sendo previamente solicitada a autorização ao comitê de ética em pesquisa da FZEA/USP para sua realização (CAAE 56690216.2.0000.5422).

5.2.5. Avaliação do potencial da encapsulação em mascarar ou atenuar a sensação de ardência e o amargor

Inicialmente foi realizada uma seleção de provadoras a partir de um teste de ordenação, seguindo a metodologia proposta por Ferreira et al. (2000), foi realizada a seleção até conseguir pelo menos 15 provadoras para cada atributo.

Foram apresentadas 3 amostras às julgadoras, os pós obtidos com 5, 10, 15% de goma arábica (T2, T4 e T6, respectivamente) de maneira casualizada. A julgadora recebeu duas vezes as amostras, sendo que na primeira vez teve que ordenar as amostras de modo crescente em relação ao atributo amargor e na segunda vez em relação à sensação de ardência.

As amostras foram servidas em bandejas, dentro de copinhos plásticos de 50 mL, junto com uma bolacha de água e sal e um copo de água, foi orientado às provadoras para que limpassem o palato entre a degustação de cada amostra. A orientação da análise foi direcionada pela utilização da ficha apresentada na Figura 10 para o amargor, no entanto, elas receberam junto com novas amostras codificadas uma segunda ficha para a sensação de ardência.

Figura 10. Ficha para o ensaio de seleção e treinamento de provadores..

Nome: _____ Data: __ /__ /__ Ficha:

Você está recebendo 3 amostras codificadas. Por favor, prove as amostras da esquerda para a direita, e ordene-as em ordem crescente em relação ao SABOR AMARGO. Limpe o palato entre a degustação de cada amostra.

_____ _____ _____

menos amarga mais amarga

Comentários:_____

Fonte: própria autoria.

Visando provar a eficiência do processo de microencapsulação em mascarar ou atenuar o amargor e a sensação de ardência causada pelo extrato, foram realizados dois testes de comparação pareada (bicaudal), segundo Meilgaard et. al (1999). No primeiro teste as provadoras previamente selecionadas em função de sua acuidade na percepção da sensação picante (15 provadoras) e amargor (18 provadoras) compararam as seguintes amostras: i) amostra contendo o material encapsulado em pó; ii) amostra contendo o extrato seco e os agentes encapsulantes (exatamente na mesma proporção em que estes aparecem nas partículas) misturados mecanicamente e em pó. Este ensaio foi realizado apenas para o tratamento que apresentou os melhores resultados na caracterização geral (T6). O segundo

teste foi realizada com as mesmas provadoras, só que desta vez foram avaliados os chocolates, assim as provadoras receberam as seguintes amostras: i) chocolate meio amargo adicionado do material encapsulado (tratamento 6); ii) chocolate meio amargo contendo o extrato seco (S.160) e goma arábica (exatamente na mesma proporção em que estes aparecem no tratamento 6) misturados mecanicamente.

As amostras foram servidas em bandejas, dentro de copinhos plásticos de 50 mL codificados, junto com um copo de água e bolacha de água e sal, para que os provadores limpassem o palato entre a degustação de cada amostra. A orientação da análise foi direcionada pela utilização da ficha apresentada na Figura 11.

Figura 11. Ficha para o ensaio de comparação pareada.

Nome: _____ Data: __ /__ /__ Ficha:_____

Você está recebendo 2 amostras codificadas. Por favor, prove as amostras da esquerda para a direita, e escreva o código da amostra mais PICANTE.

_____

mais picante

Comentários:_____

Fonte: própria autoria.

5.2.6. Forma de análise dos resultados

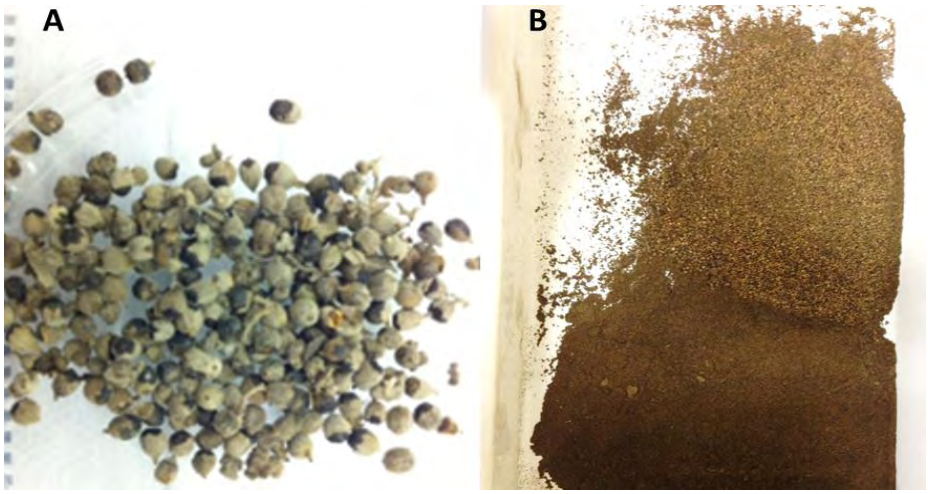
Todos os dados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando-se o programa estatístico SAS (Statistic Analisy System), versão 9.2, por análise de variância ANOVA e teste de Tukey, ao nível de 5%.

6. Resultados e Discussão

6.1. Caracterização dos frutos de vitex

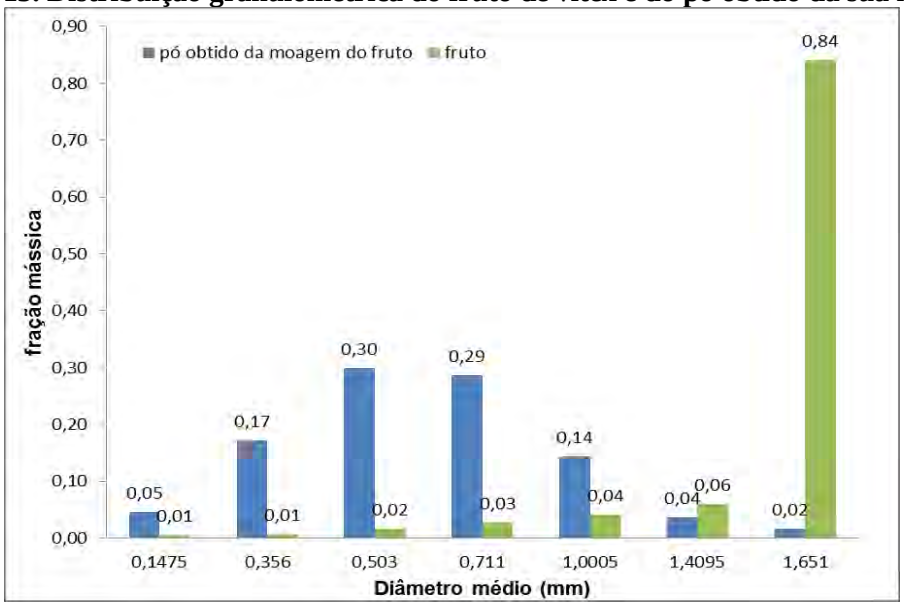
A fruta desidratada e o pó obtido da sua moagem podem ser observados na Figura 12 A e B, respectivamente. As distribuições granulométricas do fruto de vitex desidratado e do pó obtido da sua moagem estão apresentadas na Figura 13.

Figura 12. Fruto de vitex desidratado. A) Antes de ser moído; B) pó obtido da trituração do fruto de vitex desidratado.



Fonte: própria autoria.

Figura 13. Distribuição granulométrica do fruto de vitex e do pó obtido da sua moagem.



Fonte: própria autoria.

Pode ser observado que 84% dos frutos desidratados apresentaram diâmetros médios maiores que 1,651 mm, logo o material em estudo pode ser considerado de tamanho homogêneo. As frações coletadas com diâmetros inferiores a 1,651 mm, correspondentes a 16 % dos frutos, consistiam de partes dos frutos. A presença desses fragmentos pode ser explicada pelo fato de ser um fruto desidratado, que pode ter sofrido dano mecânico no próprio processamento como também durante o transporte, ocasionando a partição do mesmo. Em relação ao pó obtido da moagem do fruto, pode-se observar uma distribuição normal, sendo que a maior parte das partículas (59%) tem diâmetro médio entre 0,503 – 0,711 mm. A partir deste dado pode ser observado que o processo de trituração foi feito apropriadamente,

pois é insignificante a quantidade que permaneceu com diâmetro maior a 1,651 mm, como observado na Figura 13.

A relação entre a área superficial do pó e a área superficial do fruto desidratado é de 3,6, isto quer dizer que pelo processamento de moagem, aumentou em 3,6 vezes a área superficial de contato entre o solvente (etanol 60 %) e o soluto (fruto de vitex moído), lembrando que quanto maior a área de contato, maior o rendimento de extração.

Também foi determinada a composição centesimal do fruto em duplicata, a Tabela 5 apresenta os resultados.

Tabela 5. Composição centesimal dos frutos de vitex (*Vitex agnus castus* L).

Análise	Resultado em % em base seca
Matéria seca	91,19 ± 0,02
Cinzas	4,38 ± 0,03
Proteína bruta	10,3 ± 0,3
Fibra bruta	49,47 ± 0,08
Lipídeos	5,52 ± 0,01
Carboidratos	30,3 ± 0,4

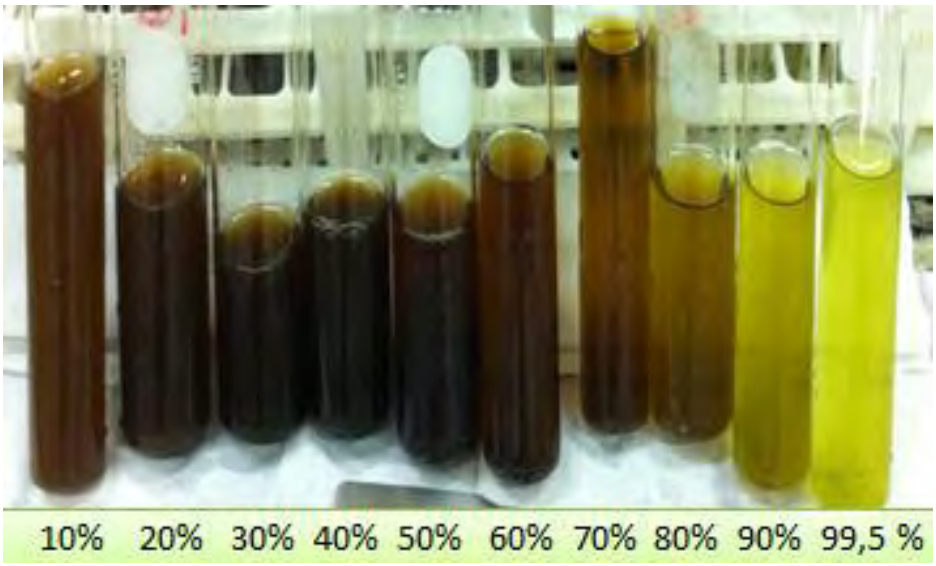
Fonte: própria autoria.

Observa-se que os frutos de vitex por estarem desidratados contém um alto teor de matéria seca e são ricos em fibras e carboidratos, apresentando um teor médio de proteínas e baixo de lipídeos. Em geral pode ser considerado um fruto interessante para aplicação, pelo seu o alto teor de fibras. Na literatura não foi possível encontrar nenhum trabalho que tenha determinado a composição centesimal dos frutos de vitex para efeito de comparação.

6.2. Determinação das melhores condições de extração

Os extratos dos frutos de vitex obtidos a partir da maceração com diferentes solventes hidroalcoólicos são mostrados na Figura 14.

Figura 14. Extratos obtidos dos frutos de Vitex moídos, obtidos com diferentes solventes hidroalcoólicos (10-99,5 % de etanol).



Fonte: própria autoria.

Os extratos apresentaram coloração castanho-esverdeada com diferentes tons dependendo do solvente utilizado.

Os teores dos compostos fenólicos totais, a constante dielétrica, a viscosidade dinâmica e a densidade para cada solvente hidroalcoólico estão apresentados na Tabela 6.

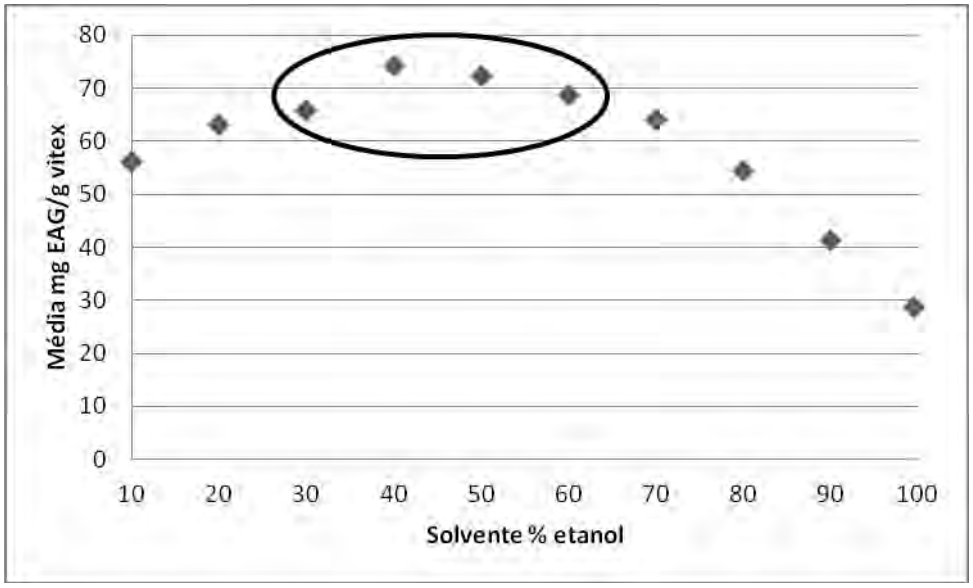
Tabela 6. Teor de compostos fenólicos dos extratos obtidos com solventes hidroalcoólicos com 10-99,5 % de etanol, extraídos a 45 °C por 1 hora e a constante dielétrica, viscosidade dinâmica e densidade de cada solvente.

Solvente (% etanol)	Teor de Compostos fenólicos (mg EAG/mL extrato)	Constante Dielétrica (a 45 ˚C)	Viscosidade dinâmica (mPA.s) (a 45 ˚C)	Densidade (g/cm3) (a 45 ˚C)
10	$0,51 \pm 0,01^{C}$	66.66	$0,881 \pm 0,009^{H}$	$0,9723 \pm 0,0001^{A}$
20	$0,57 \pm 0,03^{BC}$	61.86	$1,046 \pm 0,007^{F}$	$0,9566 \pm 0,0004^{AB}$
30	$0,60 \pm 0,03^{AB}$	56.91	$1,19 \pm 0,02^{D}$	$0,9386 \pm 0,0001^{ABC}$
40	$0,68 \pm 0,02^{A}$	52.11	$1,295 \pm 0,001^{BC}$	$0,9193 \pm 0,0004^{ABC}$
50	$0,66 \pm 0,04^{AB}$	47,21	$1,331 \pm 0,003^{A}$	$0,8973 \pm 0,0001^{ABCD}$
60	$0,62 \pm 0,04^{AB}$	42,43	$1,320 \pm 0,003^{AB}$	$0,8738 \pm 0,0001^{ABCD}$
70	$0,58 \pm 0,03^{BC}$	37,52	$1,286 \pm 0,001^{C}$	$0,8 \pm 0,1^{D}$
80	$0,49 \pm 0,03^{C}$	32,72	$1,133 \pm 0,001^{E}$	$0,8246 \pm 0,0002^{BCD}$
90	$0,37 \pm 0,03^{D}$	27,84	$1,0015 \pm 0,0005^{G}$	$0,8003 \pm 0,0001^{CD}$
99,5	$0,26 \pm 0,01^{E}$	22,97	$0,835 \pm 0,004^{I}$	$0,7727 \pm 0,0001^{D}$

*Média ± desvio padrão (n = 3 replicadas). Diferentes letras na mesma coluna diferem significativamente entre si ($p<0,05$).

Observa-se aumento no teor de compostos fenólicos nos extratos à medida que a concentração de etanol aumentava, até quantidades intermediárias (40%), após isso, havia diminuição no teor dos compostos fenólicos. As soluções aquosas de etanol em concentrações intermediárias entre 30 e 60 % de etanol, apresentaram os maiores valores de teor de compostos fenólicos totais e não diferiram estatisticamente entre si pelo teste de médias de Tukey ($p<0,05$). A Figura 15 ilustra o comportamento da extração dos compostos fenólicos com diferentes solventes hidroalcoólicos.

Figura 15. Teor de compostos fenólicos extraídos com diferentes solventes hidroacoólicos.



Fonte: própria autoria.

Cacace e Mazza (2003) observaram comportamento similar quando estudaram a extração de compostos fenólicos da groselha preta. Esses autores observaram que o coeficiente de difusão e, portanto, a difusividade dos compostos fenólicos, aumentou com o aumento da concentração de etanol no intervalo de 39 até 67%, no entanto, quando a concentração de etanol foi mais elevada (67 – 95%) foi observada uma diminuição.

De maneira geral, pode se considerar que o processo de extração de um soluto de uma matriz sólida por meio de solventes se dá através de duas etapas, uma etapa inicial e rápida de lavagem, através da qual os solutos superficiais são removidos, seguida de uma etapa mais lenta na qual predomina o processo de difusão do soluto para a superfície da matris, atingindo a situação de equilíbrio na qual o máximo rendimento de extração nas condições de processo é obtido (AGUILERA, 2003). A etapa de difusão dos fenólicos é dependente da solubilidade destes compostos no solvente, que é consequência da polaridade do mesmo e, também, da viscosidade do solvente e da solução extrato (AGUILERA, 2003).

A variação na quantidade de etanol nos solventes hidroalcoólicos implica em variação na polaridade dos mesmos, sendo observada uma diminuição da constante dielétrica à medida que a % de etanol aumenta na Tabela 6. Também se observa na Tabela 6, que a viscosidade dinâmica apresentou um platô correspondente às soluções etanolicas entre 40 e 70 %, coincidindo com o platô da extração dos compostos fenólicos. Assim, nota-se que no caso da extração dos compostos fenólicos dos frutos de vitex, nas condições testadas, a viscosidade dinâmica do solvente teve maior influencia.

Em relação à densidade, observa-se que os solventes na faixa de 10-60 % de etanol não apresentaram diferença significativa ($p<0,05$), no entanto, a tendência foi dos valores desse parâmetro diminuírem com o aumento da concentração de etanol na solução hidroalcoólica. Desta forma, pode-se inferir que soluções hidroalcoólicas com 30 a 60% de etanol apresentam polaridade e propriedades físicas, em termos de viscosidade dinâmica e densidade, que maximizam a extração de compostos fenólicos.

Normalmente decide-se trabalhar com o solvente com menor concentração de etanol por razões econômicas e de rendimento, no entanto, a Agência de Medicina Europeia (EMA) (2010) estabeleceu que os fitoterápicos dos frutos de vitex devem ser extraídos a partir de solvente hidroalcoólicos com 60 % (m/m) etanol, assim, com a finalidade de que o extrato preparado esteja dentro do estabelecido pela EMA, optou-se por utilizar o solvente com 60 % de etanol (m/m) o qual, de acordo com a Tabela 6, apresenta teor de 0,62 ± 0,04 mg EAG/mL extrato.

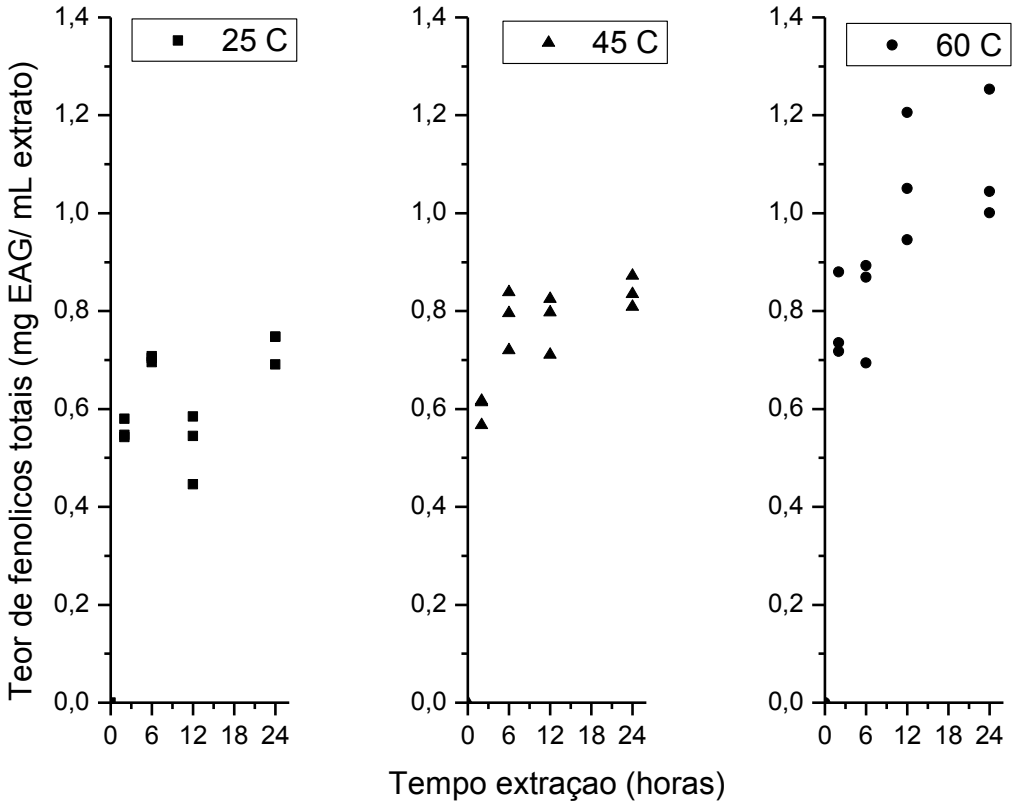
Uma vez determinado o solvente, foi avaliada a cinética de extração em três temperaturas, os resultados estão apresentados na Figura 16. A fim de entender melhor a diferença na extração nessas três condições, para o solvente 60% etanol, foram determinadas a constante dielétrica, a viscosidade dinâmica e a densidade nas três temperaturas de extração estudadas, os resultados estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7. Constante dielétrica, viscosidade dinâmica e densidade da solução 60% de etanol nas condições estudadas da cinética de extração.

Temperatura de extração (˚C)	Constante Dielétrica	Viscosidade dinâmica (mPA.s)	Densidade (g/cm3)
25	45,45	$2,324 \pm 0,004^{A}$	$0,8935 \pm 0,0001^{A}$
45	42,43	$1,320 \pm 0,003^{B}$	$0,8738 \pm 0,0001^{B}$
60	39,72	$0,917 \pm 0,005^{C}$	$0,8614 \pm 0,0001^{C}$

*Média ± desvio padrão (n = 3 replicadas). Diferentes letras na mesma coluna diferem significativamente entre si ($p<0,05$).

Figura 16. Cinética de extração de compostos fenólicos dos frutos de vitex a 25, 45 e 60 ˚C com solvente hidroalcoólico 60 % etanol.



Fonte: própria autoria.

Em relação ao efeito da temperatura, tem-se que a solubilidade das substâncias geralmente aumenta com o aumento deste parâmetro, ou seja, aumenta a taxa de transfusão dos fenólicos. Assim como, a viscosidade, a densidade e a polaridade do solvente de extração diminuem com o aumento da temperatura (Tabela 7), fazendo com que o coeficiente de difusão aumente, ou seja, maior a transferência de massa dos compostos fenólicos do interior

das partículas à solução. O efeito da temperatura teve o resultado esperado, como mostrado nos resultados apresentados na Figura 15, ou seja, quanto maior a temperatura de processo, maior o teor de fenólicos extraído.

Observa-se que, de maneira geral, para as três condições de temperatura avaliadas, a condição de equilíbrio foi alcançada após 12 horas de extração. Assim, determinou-se que a condição ótima para obtenção de extrato mais concentrado em compostos fenólicos foi de 60 ˚C por 12 horas.

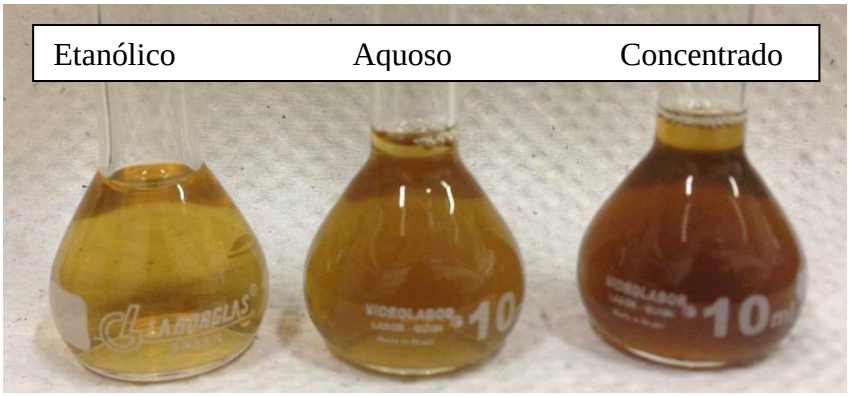
Não foi encontrado nenhum estudo de otimização de extração de fenólicos dos frutos de vitex na literatura, no entanto, o estudo de Latoui et al. (2012) analisou a extração por maceração com metanol e etanol como solventes (30 - 360 minutos, a temperatura ambiente) dos compostos fenólicos das folhas, sementes e raízes de vitex; como não analisaram do fruto, não foi possível uma comparação. Já o estudo de Cujic et al. (2016) otimizou a extração dos compostos fenólicos dos frutos da arônia (*Aronia melanocarpa* L.) por maceração, neste caso foi estudado apenas o tempo (0,25 - 18h) sendo observado que a condição de equilíbrio foi alcançada com 1,3 h. Já no estudo de Dvorackova et al. (2015) foi otimizada a extração dos compostos fenólicos da canela, sendo estudada a influência da temperatura (50, 80 e 110 ^{o}C). Neste trabalho, a menor temperatura (50 ^{o}C) mostrou ser a mais efetiva, sendo esta observação decorrente de uma possível degradação dos compostos fenólicos a temperaturas elevadas.

6.2.1. Obtenção do extrato concentrado nas condições otimizadas

O extrato otimizado foi preparado da seguinte forma: razão sólido-solvente 1,5:10; solvente: solução etanólica 60 % (m/m), binômio tempo-temperatura de 12h-60 ^{o}C e sob agitação mecânica constante. Após a extração, a mistura foi centrifugada a 4 ^{o}C por 5 min a 2935 g e o sobrenadante (extrato etanólico) foi coletado.

O extrato etanólico foi concentrado em rota-evaporador a 45 ^{o}C até a evaporação total do etanol (redução de 60% do volume inicial aproximadamente por 30 min). Mesmo após essa primeira etapa de concentração, o teor de sólidos totais presentes no extrato aquoso ainda era baixo, desta forma, a fim de aumentar o teor de sólidos totais, o extrato foi concentrado novamente a 45 ^{o}C até reduzir 50% do volume, aproximadamente por 45 min, em outras palavras 20% do extrato etanólico. A Figura 17 mostra os extratos etanólico, aquoso e concentrado diluídos (0,1 mg/mL), respectivamente.

Figura 17. Extratos etanólico, aquoso e concentrado dos frutos de vitex obtidos a 60 ^{o}C por 12 horas (0,1 mg/mL).



Fonte: própria autoria.

6.3. Caracterização dos extratos líquidos e liofilizado

6.3.1. Caracterização em relação ao teor de fenólicos, casticina, umidade, sólidos totais e pH

Os resultados do teor de fenólicos totais, casticina, umidade, sólidos totais e pH do extrato etanólico, extrato aquoso (sem etanol) e do extrato concentrado (concentrado 50 % do extrato aquoso) estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Caracterização dos extratos produzidos em relação ao teor de fenólicos, casticina, umidade, sólidos totais e pH.

Extrato	Teor de fenólicos totais (mg EAG/g extrato em BS)	Teor de casticina (mg casticina/g extrato em BS)	Umidade (g/ 100g em BU)	Sólidos Totais (g/ 100g em BU)	pH
Etanólico	132 ± 9 ^{A}	2,162 ± 0,002 ^{A}	98,6 ± 0,4 ^{A}	1,4	N.A.
Aquoso	105 ± 3 ^{B}	1,791 ± 0,004 ^{B}	96,7 ± 0,5 ^{B}	3,3	4,95
Concentrado	81 ± 2 ^{C}	1,295 ± 0,001 ^{C}	92,7± 0,9 ^{C}	7,3	4,93
Liofilizado	109 ± 5 ^{B}	1,111 ± 0,003 ^{D}	5,6 ± 0,4 ^{D}	94,4	4,92

Fonte: própria autoria. Onde N.A = Não se aplica; BS = Base seca; BU = Base úmida. *Média ± desvio padrão (n = 3 replicadas). Diferentes letras na mesma coluna diferem significativamente entre si ($p<0,05$).

O extrato etanólico apresentou maior teor de fenólicos totais e casticina, 132 ± 9 mg EAG/g do extrato em base seca e 2,162 ± 0,002 mg casticina/g do extrato em base seca, respectivamente. Observa-se que à medida que o extrato foi concentrado em rotaevaporador a 45 ^{o}C houve perda dos compostos fenólicos. Considerando que o extrato aquoso foi

submetido ao processo de liofilização e não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) para os teores de fenólicos totais entre o extrato aquoso e o liofilizado, pode-se concluir que as perdas ou degradação destes compostos ocorreram no processo de concentração, provavelmente devido à exposição prolongada do extrato (aproximadamente 30 min para passar do extrato etanólico para o extrato aquoso e mais 45 min do extrato aquoso para o extrato concentrado) à temperatura de 45 ^{o}C e na presença de luz.

No caso do teor da casticina, observa-se que houve perda na concentração do extrato etanólico para o extrato aquoso e extrato concentrado, provocada, possivelmente, pela exposição à temperatura de 45 ^{o}C e a luz por um tempo prolongado no processo de concentração. No entanto, essa perda foi menor que a ocorrida no processo de liofilização. Processo demorado (48 h), onde apesar de empregar baixas temperaturas e o material ficar exposto a baixo teor de oxigênio, este fica exposto à luz e deixa o produto seco bem poroso, facilitando a sua posterior oxidação, podendo ser a casticina mais susceptível à degradação.

Como esperado, o teor de sólidos totais aumentou à medida que o extrato foi concentrado. Os extratos não diferiram em relação ao pH, sendo todos estes considerados pouco ácidos em torno de 4,94. O estudo de Friedman e Jürgens (2000) avaliou o efeito do pH na estabilidade dos compostos fenólicos extraídos de plantas, deve-se ter em consideração que cada composto fenólicos tem sua estrutura química específica e portanto a sua estabilidade, no entanto, em geral, observa-se que estes compostos não são estáveis em pH altos. O estudo de Chen, Kao e Lin (2008) avaliou o efeito do pH nos compostos fenólicos do tubérculo inhame, os resultados mostraram que estes foram mais estáveis em pH de 5, o que poderia sugerir que o pH obtido para os extratos de vitex contribui à estabilidade destes compostos.

Não foi possível encontrar na literatura estudos que avaliaram o teor de compostos fenólicos totais e nem casticina presentes em extratos obtidos nas mesmas condições de extração empregadas, para efeito de comparação. No estudo de Sarikurkcu et al. (2009), quantificou-se o teor de fenólicos dos extratos obtidos a partir dos frutos de vitex, porém, como solventes foram empregados água e metanol, e os resultados foram 112,46 ± 1,22 e 46,50 ± 1,39 mg EAG/ g extrato em base seca, respectivamente. Assim, nota-se que o extrato obtido teve um teor de fenólicos na mesma faixa do que os extratos obtidos por Sarikurkcu et al. (2009). A diferença na extração se dá basicamente pela polaridade do solvente empregado, do método utilizado e das condições deste. No caso de Sarikurkcu et al. (2009) trabalharam com extração por Soxhlet por 5 horas com 250 mL do solvente. Uma comparação direta é impossibilitada pelas diferenças nas condições de extração, no entanto, pode se concluir que o

teor de fenólicos obtidos pela maceração por 12 h a 60 °C foi satisfatório e dentro do esperado.

Cossuta et al. (2008) realizaram extração dos frutos de vitex por Soxhlet com hexano e etanol 96% como solvente, o teor de casticina nesses extratos foram de 247,50 e 225,00 mg de composto ativo 100 g^{-1} base seca, respectivamente. Apesar das técnicas adotadas para extração diferirem, o que torna difícil a comparação, o teor de casticina obtido neste trabalho se assemelha ao reportado por Cossuta et al. (2008), indicando que o resultado obtido está dentro do esperado.

6.3.2. Atividade antioxidante dos extratos líquidos e liofilizado

O extrato seco por liofilização, o concentrado e o aquoso foram analisados em relação a sua atividade antioxidante pelos métodos DPPH e FRAP e os resultados estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Atividade antioxidante do extrato aquoso, concentrado e liofilizado de vitex pelos métodos DPPH e FRAP expressos em base seca.

Amostra	DPPH (% de inibição)	DPPH (µmol eq. de trolox/g de extrato em Bs)	FRAP (µmol eq. de trolox/ g de extrato em Bs)
Extrato aquoso	27 ± 1 [2]	346 ± 19 [C]	233 ± 10 [C]
Extrato concentrado	43,7 ± 0,5 [3]	1664 ± 18 [A]	1840 ± 64 [A]
Extrato liofilizado	25 ± 3 [1]	831 ± 98 [B]	368 ± 11 [B]

Os valores obtidos para a porcentagem de inibição do método DPPH foram obtidos para soluções com as seguintes concentrações: [1] 8,34 µg extrato liofilizado/ mL; [2] 625 µg extrato aquoso/ mL; [3] 263 µg extrato concentrado/ mL. Bs = base seca. Média ± desvio padrão (n = 3 replicadas). Diferentes letras na mesma coluna diferem significativamente entre si ($p<0,05$).

O extrato concentrado apresentou maior atividade antioxidante nos dois métodos testados, seguido pelo extrato liofilizado e por último o extrato aquoso. Estes dados não coincidem com a relação dos compostos fenólicos dos extratos, podem ser atribuídos à presença de outros compostos com capacidade antioxidante que não sejam fenólicos ou também que durante a concentração ou secagem ocorreu perda de compostos fenólicos que tinham menor capacidade antioxidante, concentrando desta forma compostos fenólicos com alto poder antioxidante.

Comparando os dois métodos utilizados para avaliar a atividade antioxidante, observa-se que os valores das atividades antioxidantes dos extratos aquoso e concentrado tem a mesma

magnitude, no entanto, nota-se uma diferença para o extrato liofilizado. Essa diferença pode ser decorrente aos fundamentos de cada método. O método DPPH determina a capacidade das moléculas em doar átomos de hidrogênio ao radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (coloração roxa) convertendo-o em 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine (com descoloração), assim o grau de descoloração indica a atividade antioxidante da amostra (Blois, 1958). Já o método FRAP avalia o poder dos antioxidantes em reduzir o complexo FE(III)/tripiridiltriazina (TPTZ) à sua forma ferrosa. Podendo haver prevalecido no material em apreço compostos antioxidantes com maior capacidade de doar átomos de hidrogênio ao radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl do que reduzir o complexo FE(III).

Na literatura não foi possível encontrar a atividade antioxidante do extrato liofilizado do fruto de vitex, no entanto, encontrou-se a atividade antioxidante de extratos feitos a partir do fruto, porém extraídos com diferentes solventes, o que dificulta a comparação com os resultados obtidos nesse trabalho. Sarikurkcu et al. (2009) obtiveram um extrato dos frutos de vitex com metanol e água como solventes por Soxlhet e determinaram a atividade antioxidante pela capacidade de sequestro DPPH de soluções dos extratos em uma concentração de 1mg/mL; a porcentagem de descoloração nessa concentração foi de 82,72 ± 0,07 % e 46,65 ± 0,62 %, respectivamente. A fim de comparar os resultados de Sarikurkcu et al. (2009) com os obtidos neste trabalho, os resultados da atividade antioxidante também foram expressos pela porcentagem de descoloração, apesar de não ser muito comum, pois a porcentagem de descoloração depende diretamente da concentração utilizada. Embora os resultados nesse trabalho sejam menores do que os obtidos por Sarikurkcu et al. (2009), como foram obtidos de soluções com concentrações menores, pode-se dizer que todos os extratos apresentaram maior atividade antioxidante. Aslantürk e Çelik (2013) obtiveram um extrato dos frutos de vitex após uma extração sequencial por Soxlhet com vários solventes em ordem crescente da polaridade, sendo que 87,60 µg/mL é a concentração necessária do extrato para inibir 50% da capacidade sequestro DPPH (IC_{50}). Estes resultados não podem ser comparados aos obtidos neste trabalho porque não foram obtidos pelo mesmo método de extração e os resultados estão expressos de diferente forma, no entanto, quando observada a porcentagem de descoloração do extrato concentrado de vitex obtido (43,7 %), em uma concentração de 263 µg extrato concentrado/ mL, percebe-se que a IC_{50} do mesmo seria em torno de 3 vezes maior à obtida por Aslantürk e Çelik (2013). Levando em consideração que no estudo de Aslantürk e Çelik (2013) foi possível a extração praticamente total de todos os compostos fenólicos, já que foram utilizados solventes com diferentes polaridades, pode-se concluir que os extratos obtidos neste trabalho apresentam atividade antioxidante satisfatória.

O estudo de Kuskoski et al. (2005) avaliaram a atividade antioxidante de frutas por vários métodos, dentre esses métodos avaliaram por DPPH com 30 minutos de reação e expressaram os dados em atividade antioxidante equivalente ao trolox (µmol eq Trolox / g de amostra). Dentre as frutas avaliadas a acerola e a manga apresentaram maior atividade antioxidante, 53,2 ± 5,3 e 12,9 ± 0,2 µmol eq Trolox / g de amostra, respectivamente. Considerando que os extratos aquoso e concentrado dos frutos de vitex tiveram atividades antioxidantes pelo método DPPH de 30,6 ± 0,3 e 11,4 ± 0,4 µmol eq Trolox / g de amostra (dados não apresentados na Tabela 9), respectivamente, pode-se concluir que o extrato obtido apresenta uma alta atividade antioxidante.

6.3.3. Atividade antibacteriana “in vitro” dos extratos líquidos e liofilizado

No *screening* o extrato etanólico apresentou halo inibitório (HI) para todas as bactérias, o extrato concentrado apenas para a *E. coli* e *L. monocytogenes*, contudo, o extrato liofilizado (0,204 g/mL) não apresentou atividade antimicrobiana para nenhuma das bactérias testadas. Os diâmetros das zonas de inibição estão apresentados na Tabela 10. Das amostras que apresentaram zona de inibição foram determinadas as concentrações mínimas inibitória (CMI) e bactericida (CMB), sendo que os resultados também se apresentam na Tabela 6. Ressalta-se que foi realizado um branco com etanol 60%, o qual não apresentou HI, portanto nem CMI ou CMB.

Tabela 10. Halo de inibição (HI), concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) contra as bactérias testadas utilizando o extrato etanólico e extrato liofilizado (0,204 g/mL) das frutas de *Vitex agnus castus* L.

Extrato	Bactéria	HI (mm)	CMI(µL/mL)	CMB(µL/mL)
Etanolico	*S. aureus*	9 ± 0,1 mm^{C}	250	--
	L. monocytogenes	11 ± 0,2 mm^{B}	125	250
	E. coli	12 ± 0,1 mm^{A}	--	--
	S. enteritidis	9 ± 0,1 mm^{C}	250	--
Concentrado	*L. monocytogenes*	9 ± 0,1 mm^{C}	125	250
	E. coli	10 ± 0,1 mm^{B}	250	--

*Média ± desvio padrão (n = 3 replicatas). Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras ($p < 0.05$). Símbolo ‘‘--‘‘ indica que não foram detectadas as CMI e/ou CMB na concentração testada.

Na Tabela 10 pode se observar que o HI para a *E. coli* do extrato etanólico foi significativamente ($p<0,05$) maior que das outras bactérias pelo teste Tukey, sendo portanto inesperado que este extrato não apresente CMI nem CMB, O que deve ter ocorrido em razão da diluição que ocorre durante o experimento, na microplaca, pois na primeira linha ao

misturar o extrato com o caldo BHI inoculado ocorre uma diluição (1:1), logo a concentração do extrato reduz 50%.

O extrato etanólico apresentou atividade antimicrobiana para todas as bactérias testadas, porém parte dessa atividade foi perdida durante o processo de concentração, já que o extrato concentrado apresentou essa atividade apenas *L. monocytogenes* e *E. coli.* Possivelmente houve perda por volatilização ou mesmo degradação de um ou mais compostos responsáveis por esta atividade durante este processo.

No que diz respeito ao extrato que foi liofilizado, como foi obtido a partir do concentrado, já não se esperava que tivesse atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *S. enteritidis*, contudo, esse não apresentou essa atividade para nenhuma das bactérias testadas. Este resultado negativo pode ser atribuído também à degradação de um ou mais compostos responsáveis por essa atividade, durante o processo de liofilização, pois, apesar desse processo não empregar altas temperaturas, o tempo de exposição das amostras à luz foi relativamente longo, de 48 h. Essa exposição também pode ter deflagrado a oxidação de algum composto que tinha ação antibacteriana; outra hipótese é que a concentração testada, 0,204 g/mL, não tenha sido suficiente para demonstrar atividade antibacteriana. Cabe ressaltar que a alta viscosidade da solução não permitiu o aumento de sua concentração.

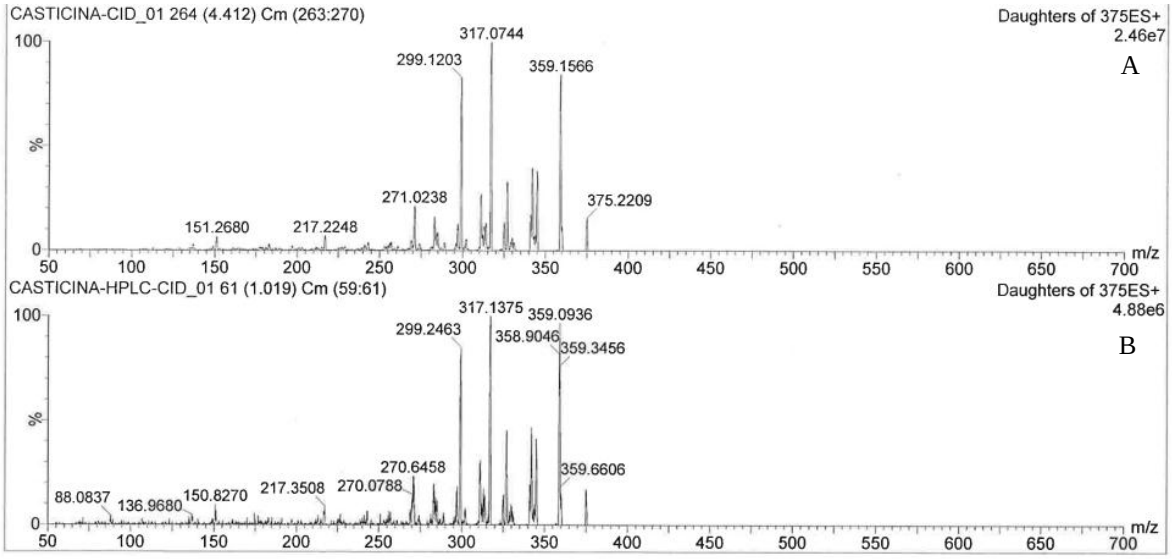
Portanto, os extratos analisados dos frutos de vitex não apresentaram uma atividade antibacteriana muito promissora, porém seria interessante avaliar a sua atividade antifúngica. Neste contexto, Azizuddin et al. (2012) avaliaram a atividade antimicrobiana da casticina, composto principal do extrato etanólico das frutas de vitex (Tabela 11) e mostraram que esse fenólico não apresenta atividade antibacteriana, mas antifúngica.

Não foi possível encontrar um trabalho que tenha avaliado a atividade antibacteriana do extrato etanólico, aquoso ou liofilizado do fruto de vitex. Porém, Maltas et al. (2010) avaliaram a atividade antibacteriana e antifúngica do extrato metanólico das folhas de vitex contra 7 bactérias e 1 levedura, o extrato apenas apresentou atividade contra a levedura. Azizuddin et al. (2011) prepararam extrato metanolico das partes aéreas da planta de vitex e obtiveram efeito antibacteriano apenas para a *Salmonella typhi* (ZI = 12,5mm). Já Stojkovic et al. (2011) e Ghannadi et al. (2012) avaliaram a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais extraídos dos frutos, folhas, e das sementes de *Vitex agnus castus* L., respectivamente, foi observado efeito antimicrobiano para várias bactérias e fungos testados, sendo os componentes 1,8-Pineole e a-Pinene os principais responsáveis por esta atividade (Stojkovic et al., 2011).

6.3.4. Confirmação da presença de casticina no extrato otimizado

A Figura 18 mostra a fragmentação do íon molecular 375 [MH^+] do padrão de casticina (Figura 18A) e da fração coletada correspondente à casticina do extrato concentrado dos frutos de vitex (Figura 18B) obtida por espectrometria de massas.

Figura 18. Espectro de massas obtidos por LC/MS/MS do íon molecular 375 [MH+] do padrão de casticina (A) e da fração coletada do extrato concentrado dos frutos de vitex (Vitex agnus castus L.) (B).



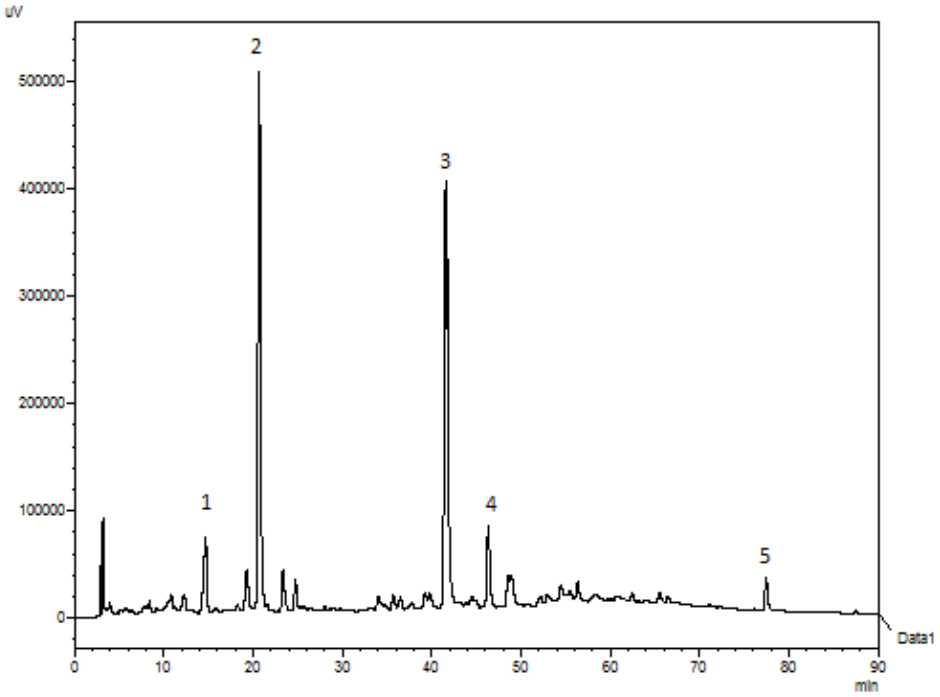
Como é possível observar comparando ambos espectros de massas, as fragmentações do íon molecular 375 [MH^+] do padrão e da fração coletada são muito similares, portanto, pode-se confirmar que a fração coletada tem majoritariamente casticina. Logo, a quantificação da casticina foi realizada seguindo a metodologia proposta por Hoberg, Meier e Sticher (2001) com modificações.

Hoberg et al. (2001) desenvolveram um método para quantificar a casticina por cromatografia líquida de alta eficiência e utilizaram a espectrometria de massas para validar o método. Huang et al. (2015) desenvolveram um método de identificação dos compostos fenólicos em extratos de *Vitex negundo* L. por cromatografia líquida de alta eficiência combinada com espectrometria de massa com analisador quadrupolo. O estudo de Mari et al. (2012) validou o método analítico para determinar marcadores do extrato hidroalcólico dos frutos de vitex por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um electrospray de ionização linear e detector de espectrometria de massa de multi colisão. Foi verificado que os dados obtidos da fragmentação da casticina no presente trabalho foram similares aos obtidos por Hoberg et al. (2001), Huang et al. (2015) e Mari et al. (2012).

6.3.5. Perfil cromatográfico do extrato otimizado

A Figura 19 mostra o cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência a partir da metodologia proposta por Fukahori et al. (2014) para os compostos fenólicos. Foram coletadas cinco frações correspondentes aos picos 1-5, as identificações destas frações podem ser encontradas na Tabela 11, assim como a área relativa dos picos, os principais íons moleculares e suas fragmentações obtidas por espectrometria de massas. As frações correspondentes aos picos 1-3 (ácido protocatecuico, ácido p- hidroxibenzoico e agnusideo, respectivamente) foram identificadas comparando os resultados do espectro de massas com dados disponíveis na literatura em relação massa e carga dos compostos. A fração correspondente ao pico 4 (composto desconhecido) obteve dados em relação a massa/carga do íon molecular presente em maior quantidade similar a um composto desconhecido encontrado no trabalho de Mari et al. (2015). A fração correspondente ao pico 5 foi positivamente identificada através da comparação com padrão externo, sendo a casticina. Em comparação com os compostos encontrados por Fukahori et al. (2014) (metodologia de referência) três compostos foram iguais: o ácido ρ-hidroxibenzoico, agnusideo e casticina.

Figura 19. Cromatograma característico dos compostos fenólicos do extrato dos frutos de vitex obtido por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos em 256 nm.



Fonte: própria autoria.

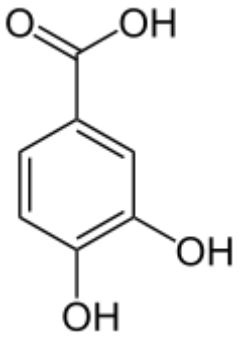
Tabela 11. Identificação dos principais compostos fenólicos presentes no extrato de vitex (*Vitex agnus castus* L.).

Pico	Tempo de retenção (min)	Substâncias*	$[M-H]^+$ (m/z)	$[M-H]^-$ (m/z)	MS/MS (íons positivos) (m/z)	MS/MS (íons negativos) (m/z)
1	14,7	Ácido protocatecuico [1]	-	154	-	139, **110**, 109, 93, 82
2	20,8	ácido p-hidroxibenzoico [1]	-	137	-	**93**
3	41,8	Agnusideo[2,3]	-	465	-	303, **285**, 241, 165, 137, 136, 101
4	46,6	Desconhecido[4]	-	495	-	451, 375, 357, 281, 239, 213, 179, **151**, 137, 125, 107, 93
5	77,5	Casticina*	375	-	359, **317**, 299, 271, 217, 151	-

* A substância correspondente ao pico 5 foi positivamente identificadas através da comparação com padrão externo. Os outros compostos foram aproximadamente identificados através da comparação dos valores dos quadrupolos Q1 e Q3, da análise por espectrometria de massas, com dados disponíveis na literatura. (-) não detectado.[1]Comparado com Huang et al. (2015). [2] Comparado com Mathon et al. (2013) [3] Comparado com Mari et al. (2015). [4] Similar ao composto também desconhecido encontrado por Mari et al. (2015). Os íons marcados em negrita correspondem ao fragmento mais abundante.

O ácido protocatecuico é considerado um orto-difenol e tem alta atividade antioxidante comparada a seu respectivo monofenol ácido p- Hidroxobenzoico, sendo um dos ácidos-fenólicos com maior eficiência antioxidante (CUVELIER, RICHARD & BERSET, 1992), a sua estrutura química pode ser observada na Figura 20. Ainda, o ácido protocatecuico extraído do *Hibiscus subdariffa L* apresentou efeitos protetores contra citotoxicidade e genotoxicidade de hepatócitos induzidos por t-BHP, que foram associados à sua atividade antioxidante (Tseng et al., 1995).

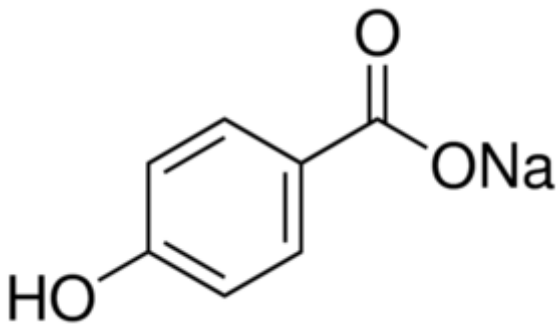
Figura 20. Estrutura química do ácido protocatecuico



Fonte: Pubchem, 2016.

O ácido p-Hidroxibenzoico, a sua estrutura química pode ser observada na Figura 21, incluído no grupo de parabenos, pode não ter uma atividade antioxidante muito alta, porém é utilizado em alimentos, medicamentos e especialmente em cosméticos em razão de sua alta atividade antimicrobiana, especialmente fungos e bactérias gram-positivas, sendo utilizado desde 1924 (AALTO; FIRMAN; RIGLER, 1953; SONI; CARABIN; BURDOCK, 2005). O uso de parabenos como conservantes tem sido questionado devido a possível risco de câncer de mamas, no entanto, ainda não foi comprovado (NASCIMENTO; RAFFIN; GUTERRES, 2004). O trabalho de Soni, Carabin e Burdock (2005) avaliou criticamente a toxicidade dos parabenos considerando os estudos disponíveis e concluíram que os parabenos são a história de sucesso de conservantes, avaliações de um possível risco reprodutivo e sugestão de envolvimento potencial de câncer de mama são equívocas.

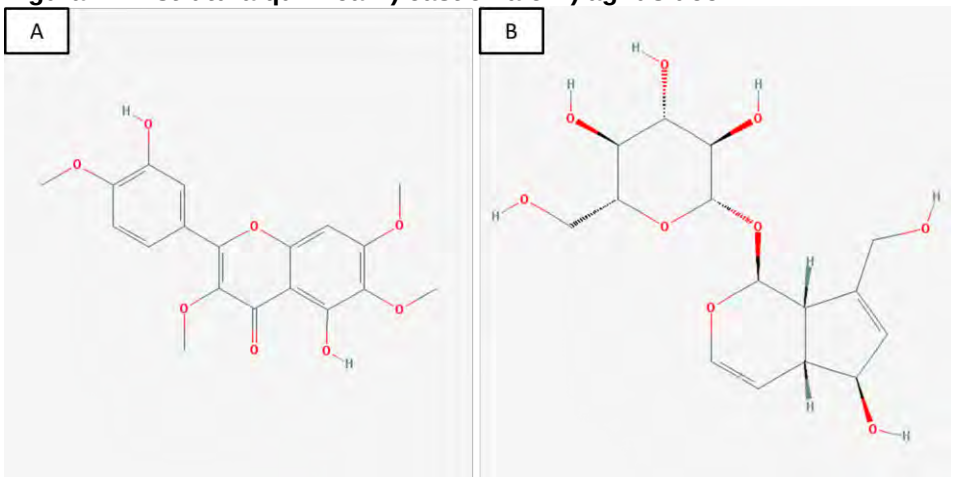
Figura 21. Estutura química do ácido p-Hidroxibenzoico.



Fonte: Pubchem, 2016.

O agnusideo e a casticina são marcadores químicos da espécie *Vitex*, as suas estruturas químicas podem ser visualizadas na Figura 22. O glicosídeo iridoide agnusideo tem alta atividade antioxidante, com IC_{50} de 25 µg/mL para o método DPPH (AROKIYARAJ et al., 2012). O estudo de Arokiyaraj et al. (2012) concluiu que o agnusideo mostrou ser significativo na eliminação de radicais livres e no efeito citotóxico, sugerindo que este pode possuir um bom valor terapêutico. A casticina é interessante por ser um composto com potencial anti-tumor e ter efeito citotóxico (SHAKIR; AWAD, 2013).

Figura 22. Estrutura química A) casticina e B) agnusideo.



Fonte: Pubchem, 2016.

Além disso, destacam-se o agnusideo e a casticina na espécie *Vitex*, pois os estudos atribuem a esses compostos, dentre outros, a função de combater ou atenuar os sintomas da tensão pré-menstrual (TPM), ou seja, são os compostos de maior interesse para a utilização do extrato dos frutos de *Vitex agnus castus* L. como ingrediente funcional anti-TPM.

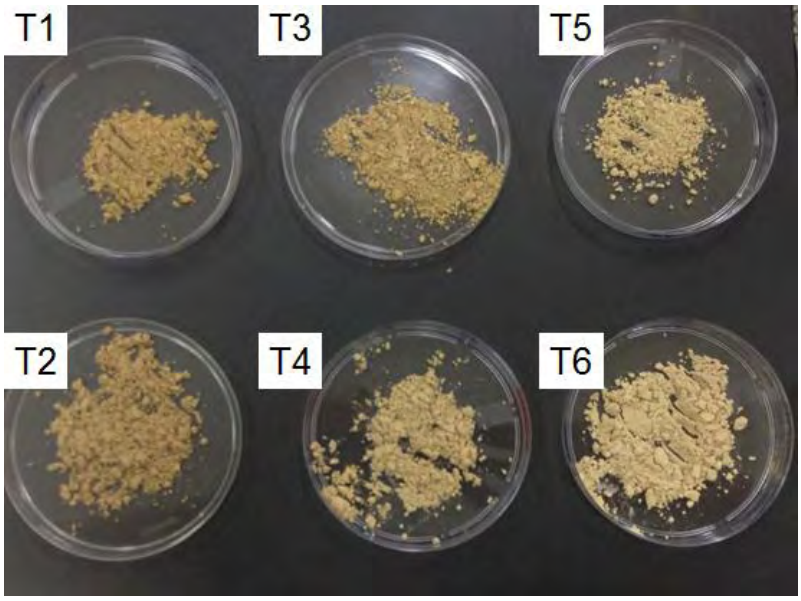
O estudo de Hu et al. (2007a) avaliou a atividade estrogênica do extrato etanólico das frutas de *Vitex rotundifolia* e de 4 constituintes principais (casticina, luteolina, rotundifuran e agnusideo), este estudo concluiu que *Vitex rotundifolia* e seus componentes apresentaram atividade estrogênica, ou seja, podem ter efeito na regulagem hormonal, diminuindo os sintomas da TPM, principalmente os componentes rotundifuran e agnusideo. Em outro estudo desse grupo de pesquisa (HU et al., 2007b) avaliaram a atividade anti-nociceptivo e anti-hiperprolactinemia de constituentes das frutas de *Vitex rotundifolia*, os resultados mostraram que a casticina tem propriedades analgésicas e anti-hiperprolactinemias, indicando que a casticina tem efeito, muito provavelmente, na redução dos sintomas da TPM. Já o estudo de Webster et al. (2010) trabalhou com os frutos de *Vitex agnus castus* L. e verificou que a casticina tem a capacidade de se ligar e assim ativar o receptor δ-opioide, consequentemente, inibir a liberação da prolactina, dessa forma, regular os sintomas da TPM.

6.4. Encapsulação/Secagem

6.4.1. Processos de secagem do extrato líquido e retenção dos compostos bioativos

O extrato concentrado dos frutos de vitex foi seco por *spray drying* com três concentrações de carreador goma arábica (5, 10 e 15 % m/m) e duas temperaturas de ar de entrada (130 e 160 ˚C), a Figura 23 mostra os 6 tratamentos.

Figura 23. Aparência dos pós obtidos por *spray drying* com goma arábica.



Onde, T1: extrato seco a 130 ^{o}C com 5% de GA; T2: extrato seco a 160 ^{o}C com 5% de GA; T3: extrato seco a 130 ^{o}C com 10% de GA; T4: extrato seco a 160 ^{o}C com 10% de GA; T5: extrato seco a 130 ^{o}C com 15% de GA; T6: extrato seco a 160 ^{o}C com 15% de GA

Pode-se observar na Figura 23 que os pós apresentaram coloração castanha, igual ao extrato, sendo que a medida que a porcentagem de goma arábica aumenta mais claro ficou o pó. Em geral, observa-se que os pós obtidos a 160 ˚C são mais claros do que os obtidos a 130˚C. Nota-se que os pós apresentam as características esperadas, com fluidez e presença de alguns agregados fáceis de separar.

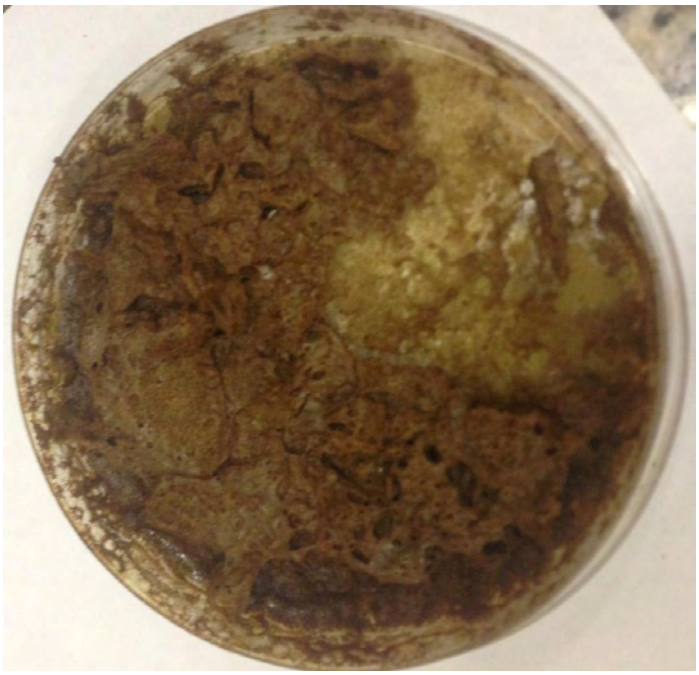
A Figura 24 mostra os pós obtidos do extrato concentrado de vitex por spray dryer sem carreador a 130 e 160 ˚C, neste caso em comparação com os pós obtidos com carreador observa-se maior formação de agregados, porém, também de fácil desagregação.

Figura 24. Pós obtidos do extrato concentrado de vitex por *spray dryer* sem carreador a 130 e 160 ˚C.

Onde S.130: extrato seco a 130 ^{o}C sem adição de GA; S.160: extrato seco a 160 ^{o}C sem adição de GA.

Por outro lado, a Figura 25 apresenta o extrato concentrado de vitex que acabou de ser liofilizado. Observa-se que este secou no formato de lâminas e ficou muito poroso e higrsocópico, em poucos minutos o extrato liofilizado começava a absorver umidade do ambiente e ficava mais escuro e melado, ou seja, o pó sofria "caking", o que pode ser percebido nas bordas da placa de petri na Figura 25.

Figura 25. Extrato concentrado de vitex logo após ser liofilizado por 48 horas.



Fonte: própria autoria

Rendimento dos processos de secagem e retenção dos compostos fenólicos e casticina após a secagem

O rendimento dos processos de secagem aplicados e a retenção dos compostos fenólicos e a casticina nos processos de secagem estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Rendimento de processo de secagem, retenção dos compostos fenólicos e da casticina do extrato dos frutos de vitex (Vitex agnus castus L.) secos por *spray drying* e por liofilização.

Tratamento	Rendimento de processo (%)	Retenção dos compostos fenólicos (%)	Retenção da casticina (%)
T1	68 ± 2^{B}	79 ± 2^{B}	$85 \pm 5^{A,B}$
T2	$67{,}4 \pm 0{,}5^{B}$	81 ± 6^{B}	$77 \pm 17^{A,B}$
T3	64 ± 10^{B}	78 ± 18^{B}	78 ± 1^{B}
T4	68 ± 17^{B}	67 ± 8^{B}	83 ± 1^{B}
T5	48 ± 3^{B}	81 ± 2^{B}	80 ± 4^{B}
T6	65 ± 18^{B}	80 ± 9^{B}	77 ± 8^{B}
S. 130	20 ± 4^{C}	95 ± 3^{A}	97 ± 2^{A}
S. 160	19 ± 3^{C}	84 ± 3^{B}	94 ± 2^{A}
Extrato liofilizado	93 ± 1^{A}	97 ± 2^{A}	95 ± 2^{A}

*Média ± desvio padrão (n = 2 replicadas). Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras ($p < 0.05$). Onde, T1: extrato seco a 130 ^{o}C com 5% de GA; T2: extrato seco a 160 ^{o}C com 5% de GA; T3: extrato seco a 130 ^{o}C com 10% de GA; T4: extrato seco a 160 ^{o}C com 10% de GA; T5: extrato seco a 130 ^{o}C com 15% de GA; T6: extrato seco a 160 ^{o}C com 15% de GA; S.130: extrato seco a 130 ^{o}C sem adição de GA; S.160: extrato seco a 160 ^{o}C sem adição de GA.

O extrato líquido desidratado por liofilização teve o maior rendimento de processo e retenção dos compostos bioativos. O rendimento do processo de secagem diferiu significativamente ($p < 0{,}05$) com os outros tratamentos. Em relação à retenção de fenólicos, esta foi alta (97%) e não apresentou diferença significativa com o tratamento S.130 (95%), já para a retenção da casticina também teve a maior retenção, não apresentando diferença sifnificativa ($p < 0{,}05$) com os tratamentos secos em *spray-dryer* sem carreador (S.130 e S.160) ou com 5% de GA (T1 e T2). O extrato líquido seco por liofilização apresenta, portanto, grandes vantagens em relação ao rendimento de processo e retenção dos compostos bioativos, provavelmente devido a se tratar de um processo que não emprega altas temperaturas, sendo a sua principal desvantagem a demora do processo (48 h).

Os processos de secagem pelo *spray-dryer* sem a utilização de carreador (S.130 e S.160) apresentaram rendimentos de processo muito baixos, provavelmente devido à queima das partículas na parede do equipamento pela falta de proteção do carreador, levando à grande perda do material. No entanto, em relação à retenção dos compostos fenólicos estes valores foram altos (80 – 95 %), observando-se diferença significativa ($p < 0{,}05$) na temperatura de ar de entrada, sendo que a temperatura maior (160 ˚C) teve uma retenção menor, efeito esperado, pois geralmente os compostos fenólicos são susceptíveis às altas temperaturas. Contudo,

parece que o flavonol casticina é resistente às altas temperaturas, pois não apresentou diferença significativa entre as duas temperaturas de ar de entrada tendo uma retenção alta (94 - 97 %) nem com o extrato liofilizado (95 %) que não emprega altas temperaturas.

Por outro lado, os processos de secagem por *spray-dryer* onde se utilizou carreador (T1-T6) não diferiram significativamente ($p < 0,05$) entre si, tanto para o rendimento de processo quanto para a retenção de fenólicos e casticina. Obtendo-se valores intermediários de rendimento de processo na faixa de 48 - 68 %, retenção dos compostos fenólicos na faixa de 67 - 81 % e da casticina na faixa de 77 - 85 %, sendo, com exceção dos tratamentos T1 e T2 para a retenção da casticina, inferiores ao extrato liofilizado. Em relação aos tratamentos sem carreador apresentaram um rendimento de processo maior, retenção de fenólicos menor que S.130 e igual que S.160. Já em relação à casticina, os tratamentos com 5% de GA apresentaram uma retenção maior, porém não diferem significativamente com os demais tratamentos. A menor retenção dos compostos bioativos pode ser em função da dificuldade de extraí-los na presença de goma arábica, por uma possível complexação entre os compostos.

Em geral, verifica-se que para o processo de secagem pelo *spray-dryer* a utilização de agente carreador proporciona um maior rendimento de processo, mais de 3 vezes, por outro lado, a retenção dos compostos bioativos é inferior estatisticamente, esta diferença não ultrapassa os 15 %. Visando a produção de pós do extrato dos frutos vitex para sua posterior aplicação e lembrando que os compostos bioativos além de conferirem gosto amargo e picante, são susceptíveis à oxidação, o emprego do agente carreador é de suma importância.

Os valores obtidos para o rendimento de processo dos pós com carreador encontram-se dentro da faixa esperada em concordância com os resultados obtidos por Bhusari, Muzaffar e Kumar (2014), estes autores secaram polpa de tamarindo com 40, 50 e 60 % de GA como carreador e 180 ˚C como temperatura de ar de entrada, a faixa de rendimento de processo obtida foi de 60-70%. Normalmente, à medida que se aumenta a concentração do agente carreador também aumenta o rendimento do processo, devido a uma redução na pegosidade dó pó e, portanto, uma redução no depósito do pó nas paredes da câmera de secagem. Tendo isso em mente, em comparação com os resultados obtidos por Bhusari, Muzaffar e Kumar (2014) o rendimento de processo obtido foi alta, pois encontra-se na mesma faixa, porém a porcentagem de carreador é muito menor, fato que depende também de todas as outras condições de processo. Bernstein e Noreña (2015) secaram o extrato rico em antocianinas da couve roxa por *spray-dryer* com goma arábica (10 e 15 % (m/v)) e temperatura de ar de entrada de 140 e 160 ^{o}C. Em relação à retenção das antocianinas, o tratamento realizado com 10% de goma arábica e 160 ^{o}C foi o que teve uma menor retenção (82,86 %), todos os outros

tratamentos não diferiram entre si (p>0,01) e obtiveram rendimentos na faixa de 90,85 – 97,10 %, sendo que o que apresentou maior rendimento foi o tratamento realizado com 15 % de goma arábica e temperatura de entrada de 140 °C. Estes valores foram maiores que os obtidos para os fenólicos e casticina, essa diferença se deve a que os compostos bioativos de cada planta são específicos, não conseguindo comparar diretamente, não havendo trabalhos publicados que sequem o extrato de vitex pelo *spary-dryer*, nem outras técnicas. No entanto, acredita-se que a escolha de agente carreador foi boa, pois o trabalho de Karaca et al. (2015) que avaliou os efeitos das condições de secagem pelo spray-dryer do extrato concentrado de cerejas ácidas (*Sour cherries*), dentre estes a temperatura de ar de entrada (130 - 150 °C) e goma arábica, maltodextrina DE6 e DE120 como agentes carreadores, concluíram que os pós obtidos com goma arábica como agente carreador apresentam um menor rendimento de processo, porém independentemente das condições de processo uma maior proteção aos compostos fenólicos, o que é de suma importância quando se trata de produzir um ingrediente com potencial funcional.

6.4.2. Efeito das variáveis do processo de atomizaçao na estabilidade dos compostos bioativos

Foram estudadas duas variáveis de processo: a temperatura de entrada do ar de secagem (130 e 160 ˚C) e a concentração do agente carreador em relação ao extrato líquido (0, 5, 10 e 15 % (m/m)). A fim de verificar o efeito destas sobre a estabilidade dos compostos ativos, foram quantificados os fenólicos totais e a casticina de todos os tratamentos logo após a sua produção, as Tabelas 13 e 14 apresentam os teores dos compostos fenólicos totais e a casticina dos pós, respectivamente.

Tabela 13. Efeito das variáveis de processo no teor de fenólicos totais (meq AG/ g amostra em base seca) dos pós obtidos por spray dryer.

Variáveis de processo	0 % de goma arábica	5 % de goma arábica	10 % de goma arábica	15 % de goma arábica
130 ˚C	96 ± 8^{aA}	$41,7 \pm 0,2^{aB}$	$32,4 \pm 0,6^{aB}$	22 ± 1^{aC}
160 ˚C	84 ± 1^{aA}	$45,4 \pm 0,^{4aB}$	23 ± 2^{bC}	$20,5 \pm 0,7^{aC}$

*Média ± desvio padrão (n = 6 replicadas). Diferentes letras maiúsculas na mesma linha e diferentes letras minúsculas na mesma coluna indica que diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

Tabela 14. Efeito das variáveis de processo no teor de casticina (mg/ g amostra em base seca) dos pós obtidos por spray dryer.

Variáveis de processo	0 % de goma arábica	5 % de goma arábica	10 % de goma arábica	15 % de goma arábica
130 ˚C	$1,60 \pm 0,04^{bA}$	$0,67 \pm 0,03^{aB}$	$0,42 \pm 0, 02^{aC}$	$0,30 \pm 0,02^{aD}$
160 ˚C	$3,0 \pm 0,1^{aA}$	$0,6 \pm 0,1^{aB}$	$0,45 \pm 0,02^{aBC}$	$0,26 \pm 0,01^{aD}$

*Média ± desvio padrão (n = 6 replicadas). Diferentes letras maiúsculas na mesma linha e diferentes letras minúsculas na mesma coluna indicam que diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

As variáveis de processo apresentaram efeito na estabilidade dos compostos bioativos. Os pós obtidos por processos onde se utilizou temperatura de ar de entrada a 130 ˚C apresentaram maiores teores de compostos fenólicos em todas as concentrações empregadas de carreador, não havendo diferenças significativas ($p<0,05$) quando a porcentagem adicionada de goma arábica foi de 0 e 15% de GA, porém, quando foi adicionado 5 e 10% de GA os teores de fenólicos totais mostraram ser maiores estatisticamente ($p<0,05$). Os compostos fenólicos são sensíveis a altas temperaturas podendo ser degradados por oxidação. Mesmo sendo instantânea a evaporação da água no processo de secagem pelo *spray dryer*, fazendo com que as partículas não atinjam altas temperaturas, quanto maior a temperatura de ar de entrada, maior será a temperatura da superfície da partícula, as quais podem sofrer perdas dos compostos bioativos, como observado nos resultados.

Observa-se que o flavonoide casticina, mesmo sendo um composto fenólico, tem pouca sensibilidade a altas temperaturas, pois apenas houve diferença significativa quando não foi adicionado carreador, sendo a temperatura de ar de entrada maior a que apresentou quase o dobro de casticina, essa grande diferença deve ter ocorrido devido a fatores desconhecidos, no entanto, deve ser levado em conta que o desvio padrão do tratamento com temperatura de ar de entrada 160 °C foi mais que o dobro que seu análogo a 130 °C, significando que pode ter havido algum problema na análise.

A variação na concentração do agente carreador teve grande impacto no teor dos compostos bioativos, sendo que quanto maior a quantidade de carreador adicionado, menor o teor de composto bioativo no pó, devido à diluição que ocorre na própria adição do agente carreador. Portanto, deve-se equilibrar o grau de proteção do carreador com a quantidade disponível do composto bioativo requerido para poder determinar qual concentração de carreador utilizar. Apenas os tratamentos obtidos a 130 ˚C com adição de 5 e 10 % de GA e a 160 ˚C com adição de 10 e 15 % de GA não apresentaram diferença significativa ($p<0,05$) no teor de compostos fenólicos.

Estes comportamentos são similares aos observados por Fazaeli et al. (2012) e Souza et al. (2014), quando avaliaram o efeito de vários parâmetros de processo do spray dryer em relação ao conteudo de antocianinas de amoras e compostos fenólicos do bagaço de vinho, respectivamente, entre os quais foram a temperatura de ar de entrada (110-150 ˚C e 130-170 ˚C) e concentração do carreador maltodextrina (8-16 % e 10-30%). Estes autores observaram que o efeito da concentração do carreador (diluição) foi mais pronunciado do que a temperatura de ar de entrada, sendo que quanto menor a concentração de carreador utilizada e/ou menor a temperatura de ar de entrada, maior foi o teor de antocianinas e fenólicos totais.

6.4.3. Estabilidade dos compostos bioativos durante a estocagem

Durante a estocagem dos pós a 25 ˚C e 38% de umidade relativa, foram quantificados os teores de fenólicos totais e casticina durante 120 dias de todas as amostras secas (atomizadas e liofilizadas) e do extrato líquido. As Tabelas 15 e 16 apresentam os valores obtidos para os compostos fenólicos totais e a casticina das amostras durante a estocagem, respectivamente. A Tabela 17 apresenta as porcentagens da perda total nas partículas dos compostos fenólicos após 60 dias e da casticina após 120 dias.

Tabela 15. Quantificação de fenólicos totais (mg EAG / g amostra em base seca) durante a estocagem (25 °C e 32,8% UR).

Tratamentos	Estocagem em dias						
	0	**7**	**15**	**30**	**60**	**90**	**120**
T1	$41,7 \pm 0,2^{dB}$	$39,8 \pm 0,6^{cdB}$	40 ± 2^{cB}	39 ± 3^{dB}	38 ± 1^{deB}	50 ± 1^{cA}	53 ± 1^{bA}
T2	$45,4 \pm 0,4^{dB}$	$44,8 \pm 0,8^{cB}$	42 ± 4^{cB}	45 ± 3^{dB}	44 ± 3^{dB}	$55,3 \pm 0,7^{cA}$	$53,1 \pm 0,2^{bA}$
T3	$32,4 \pm 0,6^{eBC}$	$31,7 \pm 0,1^{deBC}$	$31,6 \pm 0,1^{cdBC}$	28 ± 2^{eC}	29 ± 3^{edfC}	35 ± 1^{dBA}	40 ± 2^{bcA}
T4	23 ± 2^{fD}	30 ± 1^{efBC}	33 ± 3^{cdAB}	27 ± 2^{eCD}	28 ± 2^{defBCD}	36 ± 1^{dA}	$37,5 \pm 0,7^{bcA}$
T5	22 ± 1^{fB}	23 ± 1^{efAB}	23 ± 3^{dAB}	21 ± 2^{efB}	19 ± 2^{fB}	27 ± 2^{dA}	$26,7 \pm 0,7^{cA}$
T6	$20,5 \pm 0,7^{fBC}$	$21,5 \pm 0,7^{fB}$	$20,5 \pm 0,4^{dBC}$	$19,2 \pm 0,8^{fC}$	22 ± 1^{efB}	$27,9 \pm 0,9^{dA}$	$28,3 \pm 0,3^{cA}$
S. 130	96 ± 8^{bA}	102 ± 9^{aA}	100 ± 10^{aA}	90 ± 4^{abA}	102 ± 6^{aA}	90 ± 6^{bA}	100 ± 17^{aA}
S. 160	84 ± 1^{cB}	94 ± 4^{abAB}	84 ± 4^{bB}	83 ± 2^{bB}	82 ± 9^{bcB}	91 ± 9^{bAB}	104 ± 3^{aA}
Liof	109 ± 5^{aA}	102 ± 4^{aAB}	95 ± 7^{abAB}	94 ± 4^{aABC}	69 ± 13^{cC}	79 ± 4^{bBC}	87 ± 16^{aABC}
Ex. conc.	94 ± 2^{bBC}	86 ± 2^{bC}	88 ± 7^{abC}	68 ± 2^{cD}	89 ± 5^{abBC}	106 ± 3^{aA}	99 ± 3^{aAB}

*Média ± desvio padrão (n = 6 replicadas). Diferentes letras minúsculas na mesma coluna e diferentes letras maiúsculas na mesma linha indicam diferença significativa entre as amostras ($p < 0.05$). Onde, T1: extrato seco a 130 °C com 5% de GA; T2: extrato seco a 160 °C com 5% de GA; T3: extrato seco a 130 °C com 10% de GA; T4: extrato seco a 160 °C com 10% de GA; T5: extrato seco a 130 °C com 15% de GA; T6: extrato seco a 160 °C com 15% de GA; S.130: extrato seco a 130 °C sem adição de GA; S.160: extrato seco a 160 °C sem adição de GA; Liof: extrato concentrado liofilizado por 48 horas; Extrato conc.: extrato concentrado de vitex.

Tabela 16. Quantificação da casticina (mg casticina/ g amostra em base seca) durante a estocagem (25 °C e 32,8% UR).

Tratamentos	Estocagem em dias						
	0	**7**	**15**	**30**	**60**	**90**	**120**
T1	$0,67 \pm 0,03^{dA}$	$0,62 \pm 0,06^{cA}$	$0,61 \pm 0,03^{bA}$	$0,59 \pm 0,05^{dA}$	$0,58 \pm 0,04^{dA}$	$0,58 \pm 0,03^{dA}$	$0,57 \pm 0,02^{cA}$
T2	$0,6 \pm 0,1^{dA}$	$0,56 \pm 0,09^{cA}$	$0,56 \pm 0,09^{bA}$	$0,58 \pm 0,09^{dA}$	$0,6 \pm 0,1^{deA}$	$0,55 \pm 0,09^{deA}$	$0,57 \pm 0,09^{cA}$
T3	$0,42 \pm 0, 02^{deA}$	$0,38 \pm 0,02^{cA}$	$0,38 \pm 0,02^{bA}$	$0,40 \pm 0,02^{dA}$	$0,39 \pm 0,02^{defA}$	$0,39 \pm 0,01^{deA}$	$0,39 \pm 0,01^{cA}$
T4	$0,45 \pm 0,02^{deA}$	$0,43 \pm 0,02^{cA}$	$0,42 \pm 0,01^{bA}$	$0,42 \pm 0,02^{dA}$	$0,43 \pm 0,01^{defA}$	$0,42 \pm 0,02^{deA}$	$0,43 \pm 0,01^{cA}$
T5	$0,30 \pm 0,02^{eA}$	$0,28 \pm 0,01^{cA}$	$0,27 \pm 0,01^{bA}$	$0,26 \pm 0,01^{dA}$	$0,30 \pm 0,03^{fA}$	$0,28 \pm 0,03^{eA}$	$0,28 \pm 0,01^{cA}$
T6	$0,26 \pm 0,01^{eA}$	$0,26 \pm 0,01^{cA}$	$0,26 \pm 0,01^{bA}$	$0,25 \pm 0,01^{dA}$	$0,27 \pm 0,01^{efA}$	$0,25 \pm 0,01^{deA}$	$0,27 \pm 0,01^{cA}$
S. 130	$1,60 \pm 0,04^{cA}$	$1,2 \pm 0,1^{bB}$	$1,31 \pm 0,02^{bB}$	$1,29 \pm 0,01^{bcB}$	$1,5 \pm 0,1^{bA}$	$1,57 \pm 0,04^{bA}$	$1,53 \pm 0,04^{bA}$
S. 160	$3,0 \pm 0,1^{aAB}$	$3,5 \pm 0,5^{aAB}$	$3,8 \pm 0,9^{aA}$	$2,8 \pm 0,3^{aAB}$	$2,8 \pm 0,1^{aAB}$	$2,6 \pm 0,2^{aAB}$	$2,1 \pm 0,6^{aB}$
Liof	$2,1 \pm 0,2^{bA}$	$1,21 \pm 0,06^{bB}$	$1,1 \pm 0,2^{bB}$	$1,0 \pm 0,1^{cB}$	$1,17 \pm 0,08^{cB}$	$1,12 \pm 0,03^{cB}$	$1,19 \pm 0,05^{bB}$
Ex. conc.	$1,51 \pm 0,01^{cA}$	$1,47 \pm 0,04^{bA}$	$1,2 \pm 0,4^{bA}$	$1,5 \pm 0,1^{bA}$	$1,7 \pm 0,2^{bA}$	$1,7 \pm 0,2^{bA}$	$1,66 \pm 0,03^{abA}$

*Média ± desvio padrão (n = 6 replicadas). Diferentes letras minúsculas na mesma coluna e diferentes letras maiúsculas na mesma linha indicam diferença significativa entre as amostras ($p < 0.05$). Onde, T1: extrato seco a 130 °C com 5% de GA; T2: extrato seco a 160 °C com 5% de GA; T3: extrato seco a 130 °C com 10% de GA; T4: extrato seco a 160 °C com 10% de GA; T5: extrato seco a 130 °C com 15% de GA; T6: extrato seco a 160 °C com 15% de GA; S.130: extrato seco a 130 °C sem adição de GA; S.160: extrato seco a 160 °C sem adição de GA; Liof: extrato concentrado liofilizado por 48 horas; Ex. conc.: extrato concentrado de vitex.

Tabela 17. Porcentagem de perda nas partículas dos compostos fenólicos e da casticina durante a estocagem, 60 e 120 dias respectivamente.

Tratamentos	Fenólicos (%)	Casticina (%)
T1	11,71	14,93
T2	0,76	5,00
T3	1,72	7,14
T4	2,55	4,44
T5	6,19	5,62
T6	7,92	0,33
S130	5,87	3,49
S160	2,49	30,01
Liof	17,85	43,80
Ex. conc.	5,38	0,77

Onde, T1: extrato seco a 130 oC com 5% de GA; T2: extrato seco a 160 oC com 5% de GA; T3: extrato seco a 130 oC com 10% de GA; T4: extrato seco a 160 oC com 10% de GA; T5: extrato seco a 130 oC com 15% de GA; T6: extrato seco a 160 oC com 15% de GA; S.130: extrato seco a 130 oC sem adição de GA; S.160: extrato seco a 160 oC sem adição de GA; Liof: extrato concentrado liofilizado por 48 horas; Ex. conc.: extrato concentrado de vitex.

Observa-se na Tabela 15 que os pós sem carreador (S.130 e S.160) e o extrato líquido no início apresentaram teores de compostos fenólicos 5 vezes maiores que os tratamentos com 15 % de GA e 10%/160 ˚C, 3 vezes maior que o tratamento 10%/ 130 ˚C, e 2 vezes maior que os tratamentos com 5% de GA, sendo a faixa de valores entre 20,6 – 109 mg EAG / g amostra em base seca (T6 e Liof, respectivamente). Já no final da estocagem (120 dias) observa-se que os pós produzidos sem carreador e o extrato líquido apresentaram teores maiores de fenólicos, aproximadamente 4, 2,5 e 2 vezes maior que os tratamentos com 15, 10 e 5 % de GA, respectivamente, sendo a faixa de teor de fenólicos obtida entre 26,7 e 104 mg EAG / g amostra em base seca (T5 e S.130, respectivamente).

Comparando os teores dos compostos fenólicos das amostras, observa-se que inicialmente e ao longo do tempo as amostras do extrato liofilizado (109 ± 5 mg EAG / g amostra em base seca), atomizado sem carreador a 130 e 160 ˚C (96 ± 8 e 84 ± 1 mg EAG / g amostra em base seca, respectivamente) ou extrato líquido (94 ± 2 mg EAG / g amostra em base seca) foram as que apresentaram maior teor de compostos fenólicos, sendo o extrato liofilizado o que teve maior teor de fenólicos nos tempos 0 e 30 dias, no tempo 7 dias foram todos os extratos secos sem carreador os que apresentaram maior teor, no tempo 30 os extratos secos sem carreador e o extrato líquido, nos tempos 60 e 90 dias o extrato líquido e no final da estocagem (tempo 120 dias) não houve diferença significativa entre os extratos secos sem carreador e o extrato líquido, variando na faixa de 87 – 104 mg EAG / g amostra em base seca, sendo estes os que apresentaram maior teor de fenólicos.

Observando o comportamento dos pós produzidos com carreador, nota-se que o efeito da diluição pela concentração de carreador utilizada se manteve praticamente durante toda a estocagem, sendo os pós produzidos com 5% de adição de carreador (T1 e T2) os que apresentaram maior teor de compostos fenólicos (41,7 ± 0,2 e 45,4 ± 0,4 mg EAG / g amostra em base seca, respectivamente), sendo iguais estatisticamente aos tratamentos com 10 % de GA (T3 e T4) nos tempos 15, 60 e 120 dias. Por outro lado, não houve diferença significativa entre os tratamentos com 10 e 15 % de GA durante a estocagem, sendo o tratamento T3 (130 ˚C/ 10 % GA) o qual em alguns tempos apresentou maior teor de fenólicos.

Analisando os tratamentos individuais durante o tempo de estocagem, observa-se que houve um aumento no teor dos compostos fenólicos para todos os tratamentos no final da estocagem (tempos 90 e 120 dias), sendo na maioria dos casos maiores do que no tempo inicial, provavelmente isto ocorreu devido à inevitável troca de reagente Folin-Ciocalteu, mesmo sendo realizada uma nova curva de padrão externo. Observando os valores obtidos no período de 0 a 60 dias, observa-se grande estabilidade de todas as amostras, na maioria não variando significativamente ($p<0,05$) durante este período, sendo o extrato liofilizado que apresentou maior perda de compostos fenólicos (de 109 ± 5 a 69 ± 13 mg EAG / g amostra em base seca). A Tabela 17 apresenta as porcentagens das perdas totais dos compostos fenólicos e foi verificado que com exceção do tratamento T1 e o Extrato liofilizado as perdas foram baixas, inferiores a 8%. Não foi possível verificar uma relação entre a porcentagem de perda e a concentração do agente carreador ou a temperatura de ar de entrada de secagem, provavelmente devido a que as variações nas concentrações do carreador são pequenas. Foi constatado que a encapsulação não teve proteção muito eficiente, pois não há grandes variações entre a perda dos compostos com e sem carreador. Contudo, ressalta-se que a secagem pelo *spray dryer* em geral mostrou ser eficiente, pois o extrato liofilizado apresentou uma perda total de 17,85%.

Os compostos fenólicos são susceptíveis à degradação por oxidação perdendo a sua bioatividade, assim a proteção destes compostos é muito importante. Uma das propostas da encapsulação foi a proteção destes compostos, como foi possível observar os compostos fenólicos do extrato dos frutos de vitex foram estáveis em geral, mesmo que não foi diretamente pela encapsulação com goma arábica mas sim pelo método de secagem escolhido. Espera-se que maiores teores de carreador acarretariam em uma maior proteção, no entanto, dado que as percam em geral foram menores a 8 % e que a matriz alimentícia pode proteger também o composto ativo de possíveis degradações, verifica-se que os resultados encontram-se dentro do esperado.

Em relação ao teor de casticina observa-se o efeito da diluição devido à concentração de carreador novamente, sendo os extratos secos sem carreador e o extrato líquido os que apresentaram maior teor de casticina, variando na faixa de 1,0 – 3,8 mg casticina/ g amostra em base seca. O extrato atomizado a 160 ˚C sem carreador (S.160) apresentou maior teor de casticina em todos os tempos (3,0 ± 0,1 a 2,1 ± 0,6 8 mg casticina/ g amostra em base seca), não variando significativamente ($p<0,05$) no teor de casticina durante toda a estocagem. Com exceção do tempo inicial, no qual o extrato liofilizado apresentou maior teor, nos tempos 7, 15, e 120 dias os extratos atomizado a 130 ˚C, liofilizado e líquido não apresentaram diferença significativa ($p<0,05$), já nos tempos 30, 60 e 90 dias o extrato liofilizado apresentou menor teor de casticina, sendo este tratamento o menos estável em geral. Os pós produzidos com carreador apresentaram diferença significativa ($p<0,05$) no início, sendo os tratamentos T1-T4 os que apresentaram maior teor de casticina (0,42 - 0,67 mg casticina/ g amostra em base seca), na maioria dos outros tempos não houve diferença significativa ($p<0,05$) no teor de casticina entre os tratamentos.

Analisando a estabilidade da casticina durante o tempo de estocagem para cada tratamento individual, observa-se que todos os pós atomizados com goma arábica e o extrato líquido foram estáveis para a casticina durante toda a estocagem, não havendo diferença significativa ($p<0,05$). O extrato liofilizado sofreu uma perda de casticina do tempo inicial ao tempo 7 dias de quase 50 %, não havendo nos tempos posteriores perdas significativas ($p<0,05$). Provavelmente esta instabilidade ocorreu no extrato liofilizado pela alta porosidade e alto ganho de umidade deste tratamento (dados mostrados posteriormente na análise de isotermas de sorção). O tratamento S.160 sofreu uma leve queda durante todo o tempo de estocagem variando em alguns tempos estatisticamente, já o tratamento S.130 sofreu uma queda e a partir do tempo 60 dias de estocagem aumentou de novo o teor de casticina até valores iguais estatisticamente ($p<0,05$) que o inicial, sendo está flutuação proveniente, provavelmente, de erros na pesagem ou preparo de amostra. A Tabela 17 resume estes resultados apresentando a perda total da casticina durante os 120 dias de estocagem, é possível notar que com exceção dos tratemos T1, S160 e o extrato liofilizado, as perdas foram baixas, sendo estas inferiores a 8 %. No entanto, para os outros tratamentos (T1, S160 e extrato liofilizado), as perdas foram significativas, variando entre 14 – 30 %, ressalta-se que esses tratamentos não apresentam carreador ou no caso do T1 a porcentagem é a menor (5%), o que indica que para a proteção do flavonol casticina a encapsulação por *spray dryer* foi bem sucedida e necessária.

A estabilidades dos compostos bioativos é específica de cada composto e matriz, os compostos bioativos do extrato de vitex se mostraram estáveis durante a estocagem, já os compostos de bioativos do bagaço de uva de pós produzidos com concentrações de maltodextrina como carreador de 10-30 % armazenados nas mesmas condições (25 ^{o}C e 32,8% UR) durante 120 dias apresentaram porcentagem de perdas variando entre 16,50 e 29,96 %, sendo os pós produzidos com maior teor de carreador os mais estáveis (SOUZA et al., 2014). Por outro lado, os compostos bioativos da polpa de morango atomizada com diferentes agentes carreadores (maltodextrina 5DE, maltodextrina 10DE, goma arábica e capsul®) mostraram ser estáveis à temperatura ambiente por 90 dias (não apresentando diferença significativa ($p<0,05$)), sendo que a amostra produzida com goma arábica apresentou a maior concentração de composto bioativo, indicando que a goma arábica foi o agente carreador mais adequado para a produção de polpa de morango em pó (OLIVEIRA et al., 2013).

Em conclusão, pode-se notar que os compostos bioativos do extrato dos frutos de vitex foram estáveis na forma líquida e em pó. O processo de secagem por *spray dryer* obteve resultados muito melhores do que a liofilização, possivelmente porque este ultimo deixa o material mais poroso e portanto mais susceptível à degradação. A secagem em geral facilita o manuseio, o transporte, a aplicação e o armazenamento dos produtos. Os resultados mostraram que a encapsulação deste extrato deve ser feita pela maior estabilidade microbiológica e facilidade de manuseio dos pós do que pela proteção dos compostos bioativos à degradação por oxidação, se mantidos os pós nas condições de estocagem (25 ^{o}C e 32,8% UR). O tratamento T2 (160 ˚C/ 5 % de GA) apresentou os melhores resultados, pois apresentou bom rendimento de processo e boa retenção dos compostos fenólicos totais, maior retenção de casticina, maiores teores de compostos fenólicos totais e casticina e boa estabilidade durante todo o tempo de estocagem dos compostos bioativos.

6.4.4. Caracterização dos pós obtidos

A Tabela 18 apresenta os resultados da caracterização dos pós, ou seja, a densidade, a atividade de água e a umidade no inicio e após 120 dias dos pós armazenados em ambiente com umidade controlada (38 % UR), e a higroscopicidade.

Tabela 18. Caracterização dos pós obtidos pelos processos de secagem em spray-dryer e por liofilização do extrato dos frutos de vitex (*Vitex agnus castus* L.).

Tratamento	Densidade aparente (g/L)	Atividade de água (dia 0)	Atividade de água (dia 120)	Umidade (%) (dia zero)	Umidade (%) (dia 120)	Higroscopicidade (g água absorvida/100g amostra)
T1	376 ± 16^{B}	$0,30 \pm 0,01^{Ba}$	$0,45 \pm 0.01^{Bb}$	$4,1 \pm 0,1^{Bc}$	$7,1 \pm 0,3^{Bd}$	$1,4 \pm 0,1^{E}$
T2	254 ± 89^{C}	$0,30 \pm 0,02^{Ba}$	$0,44 \pm 0.02^{Bb}$	$3,4 \pm 0,1^{Bc}$	$7,1 \pm 0,2^{Bd}$	$1,64 \pm 0,09^{E}$
T3	433 ± 16^{B}	$0,30 \pm 0,01^{Ba}$	$0,49 \pm 0.01^{ABb}$	$4,9 \pm 0,2^{Bc}$	$7,1 \pm 0,1^{Bd}$	$3,4 \pm 0,2^{D}$
T4	193 ± 16^{C}	$0,29 \pm 0,03^{Ba}$	$0,50 \pm 0.01^{Ab}$	$4,5 \pm 0,8^{Bc}$	$7,9 \pm 0,3^{Ad}$	$5,0 \pm 0,4^{D}$
T5	323 ± 28^{B}	$0,28 \pm 0,02^{Ba}$	$0,52 \pm 0.01^{Ab}$	$4,7 \pm 0,7^{Bc}$	$8,4 \pm 0,4^{Ad}$	$4,1 \pm 0,3^{D}$
T6	219 ± 28^{C}	$0,29 \pm 0,07^{ABa}$	$0,54 \pm 0.01^{Ab}$	5 ± 1^{ABc}	$8,1 \pm 0.2^{Ad}$	6 ± 1^{C}
S. 130	--	$0,32 \pm 0,03^{AB}$	--	$5,6 \pm 0,2^{AB}$	--	$8,5 \pm 0,7^{A,C}$
S. 160	--	$0,39 \pm 0,04^{A}$	--	$5,9 \pm 0,2^{AB}$	--	$7,9 \pm 0,8^{B,C}$
Extrato Liofilizado	--	$0,44 \pm 0,01^{A}$	--	$6,3 \pm 0,5^{A}$	--	$9 \pm 1^{A,B}$
Goma arábica	492 ± 13^{B}	--	--	--	--	10 ± 1^{A}

*Média ± desvio padrão (n = 6 replicadas). Diferentes letras minúsculas na mesma coluna e diferentes letras maiúsculas na mesma linha indicam diferença significativa entre as amostras ($p < 0.05$). Símbolo "—" significa que não foi possível realizar a determinação dessa amostra. Onde, T1: extrato seco a 130 ^{o}C com 5% de GA; T2: extrato seco a 160 ^{o}C com 5% de GA; T3: extrato seco a 130 ^{o}C com 10% de GA; T4: extrato seco a 160 ^{o}C com 10% de GA; T5: extrato seco a 130 ^{o}C com 15% de GA; T6: extrato seco a 160 ^{o}C com 15% de GA; S.130: extrato seco a 130 ^{o}C sem adição de GA; S.160: extrato seco a 160 ^{o}C sem adição de GA.

Densidade

Os valores de densidade dos pós obtidos por *spray-dryer* com agente carreador variaram entre 193 e 433 g/L, e estão em concordância com os obtidos por Fernandes, Borges e Botrel (2013), os quais encapsularam óleo essencial de alecrim com concentração de GA 10-30% e temperatura de entrada de 135 e 195 ^{o}C.

Em relação à densidade aparente, pode se observar que a quantidade de goma arábica adicionada não teve um efeito direto, pois não foi possível observar uma relação de aumento ou diminuição na densidade aparente à medida que foi aumentada a porcentagem de goma arábica. Esse resultado diferiu do obtido por Bhusari, Muzaffar e Kumar (2014) e Fazaeli et al. (2012), cujos estudos mostraram que a medida que a porcentagem de carreador aumenta a densidade aparente diminui. Bhusari, Muzaffar e Kumar (2014) explicaram que este fato provavelmente acontece pelo aumento da viscosidade da solução com o aumento do agente carreador, consequentemente no aumento do tamanho de partícula e uma densidade aparente menor.

Por outro lado, a temperatura de ar de entrada apresentou efeito na densidade aparente, sendo que quando a temperatura de ar de secagem foi 160 ^{o}C (tratamentos pares) a densidade aparente foi menor que seu análogo a 130 ^{o}C. À medida que a temperatura de ar de entrada aumenta, a taxa de evaporação aumenta, produzindo pós mais porosos ou com estrutura mais fragmentada, ou seja, produzindo micropartículas maiores, o que leva a uma densidade aparente menor. Este resultado está em concordância com os resultados obtidos por Fazaeli et al. (2012) e Fernandes, Borges e Botrel (2013).

Atividade de água (Aw) e umidade

A atividade de água (Aw) no início (dia zero) apresenta valores para os pós secos com carreador T1-T6 na faixa de 0,28-0,30 não tendo diferença significativa entre si ($p<0,05$), entretanto os pós secos sem carreador S.130, S.160 e o extrato liofilizado apresentaram valores de Aw maiores estatisticamente ($p<0,05$) na faixa de 0,32 – 0,44. Cabe ressaltar que o valor da Aw do tratamento S.130 não diferiu significativamente com os pós secos com carreador e o tratamento T6 não diferiu significativamente com os pós obtidos sem carreador. Estes valores estão acima do que os encontrados por Fazaeli et al. (2012) e Karaca et al.(2015), 0,15 – 0,32 e 0,18-0,19 para a cereja preta (*Morus nigra*) e a cereja ácida, respectivamente. No entanto, os valores obtidos ainda são considerados baixos, evitando a possível multiplicação de microrganismos.

Para os valores de umidade no início (dia 0) observa-se que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos secos por *spray-dryer* estando na faixa de 3.4 – 5,9%, independentemente de utilizar agente carreador ou não, ainda, observa-se que o extrato seco por liofilização apresentou maior teor de umidade (6,3 ± 0,5%) não apresentando diferença significativa com os pós secos sem carreador e o T6. Estes valores estão acima do que os encontrados por Fazaeli et al. (2012) e Karaca et al.(2015), 1,5 – 2,5 e 1,1 - 2,1% para a cereja preta (*Morus nigra*) e a cereja ácida, respectivamente. Os valores obtidos encontram-se fora de especificação para pós secos na indústria de alimentos (3-4%) (KARACA et al., 2015). Os valores elevados da Aw e umidade podem estar relacionados com a higroscopicidade, explicada posteriormente.

Comparando os valores de Aw e umidade dos pós secos com carreador no início e após 120 dias, observa-se que houve direferença significativa ($p<0,05$) para todos os tratamentos, sendo que após 120 dias (durante a estabilidade) estes valores aumentaram para a faixa de 0,44 – 0,54 e 7,1 – 8,4%, respectivamente. O aumento destes valores era esperado, pois as amostras foram armazenadas por 120 dias em ambiente a 38 % UR, umidade maior do que a dos pós, portanto a absorção de água do ambiente ocorre espontaneamente. O extrato liofilizado apresentou maior Aw e umidade, tanto no inicio como no fim da estabilidade, por se tratar de um material mais poroso, tendo maior facilidade de absorção de umidade do ambiente. Para as duas variáveis, os tratamentos T1-T3 apresentaram valores inferiores significativamente, em outras palavras, extratos secos com maior concentração de GA (15%) apresentaram valores de Aw e umidade maiores. Em relação à temperatura de ar de entrada observa-se que para a Aw não houve diferença significativa. Para os valores de umidade dos extratos secos com 5 e 15% de GA não apresentaram diferença significativa independente da temperatura de ar de entrada, já o extrato seco com 10% de GA apresentou diferença significativa ($p<0,05$) em relação à temperatura de ar de entrada, sendo que o extrato seco com temperatura de ar de entrada maior apresentou maior valor de umidade, resultado inesperado, já que com uma temperatura de ar de entrada maior, a taxa de evaporação é maior, diminuindo assim a umidade dos pós, como aconteceu nos trabalho de Fazaeli et al. (2012), por exemplo. Este resultado pode ser atribuído à influência de outras variáveis, como temperatura e umidade relativa do ambiente, assim como pela capacidade intrínseca dos pós em absorver umidade do ambiente, discutida posteriormente no item higroscopicidade e isotermas de sorção.

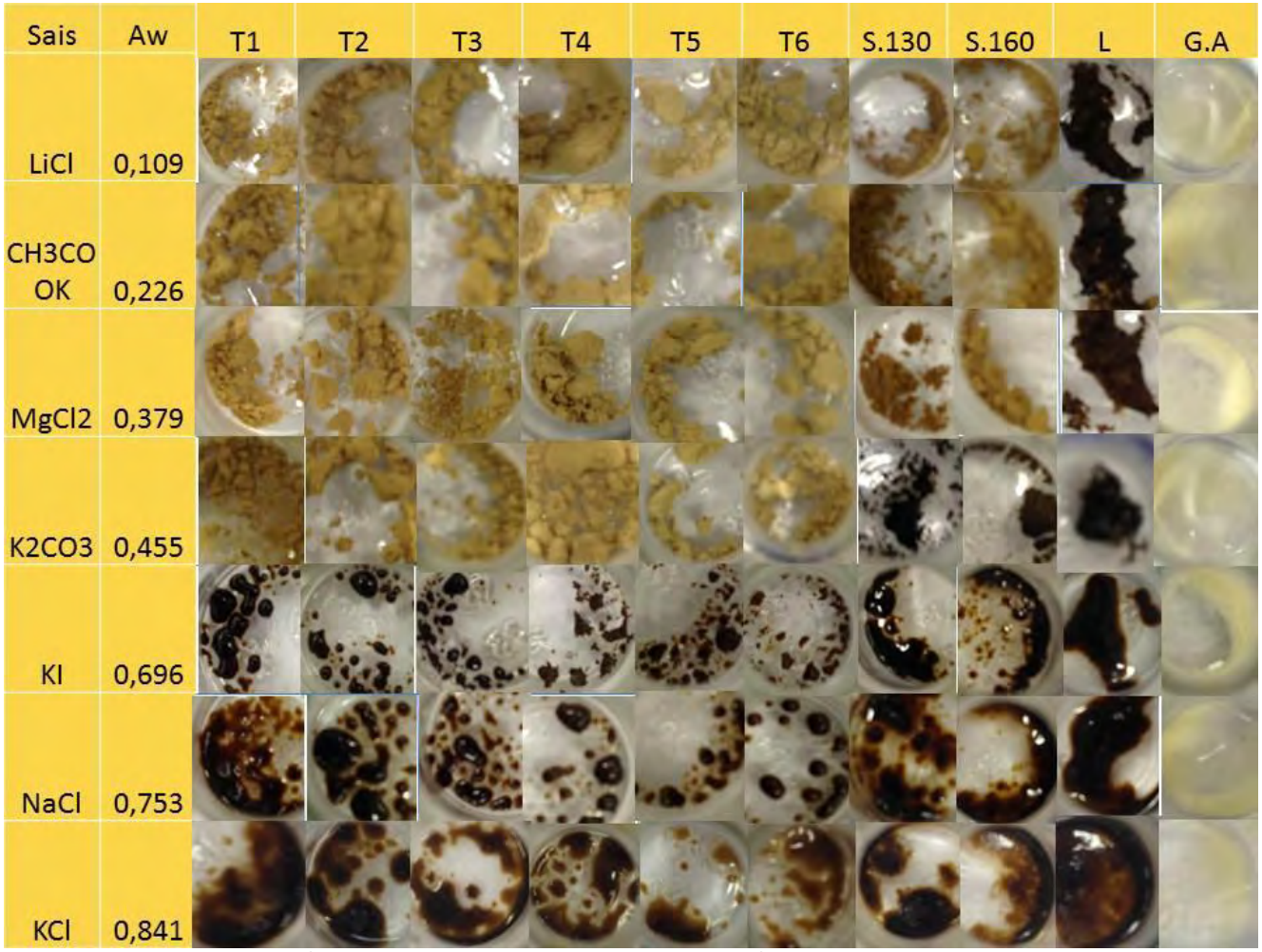
Higroscopicidade e Isotermas de sorção

A higroscopicidade é a capacidade de um material de absorver umidade do ambiente, assim, normalmente enquanto maior o valor da higroscopicidade maior a sua capacidade. Geralmente, pós com baixa higroscópicidade são considerados bons, pois a absorção de umidade pode levar a um aumento da Aw a valores altos o suficiente que permitam a multiplicação de microrganismos, além de poder modificar o estado físico dos pós, interferindo nas suas características de manuseio e fluidização (AGUILERA; DEL VALLE; KAREL, 1995). Caso o material for muito higroscópico pode ocorrer o fenômeno conhecido como *caking*, neste fenômeno o pó inicialmente solto é transformado primeiro em torrões, seguido por um aglomerado sólido e finalmente em um semi-líquido pegajoso, consequentemente a perda das características e funcionalidades do pó (AGUILERA; DEL VALLE; KAREL, 1995).

Os valores de higroscopicidade obtidos estão na faixa de 1,4 – 9 g/100g, sendo que à medida que a concentração de GA aumenta para os pós secos com carreador o valor de higroscopicidade aumenta, o que é inesperado, pois os agentes carreadores, por terem peso molecular alto, são menos higroscópicos e é esperado que funcionem como uma barreira para a absorção de umidade do ambiente. Pós secos por *spray-dryer* sem carreador apresentaram valores de higroscopicidade maiores do que os tratamentos secos com carreador, como esperado, pois estes não tem nenhum agente protetor. O extrato liofilizado apresentou maior valor, provavelmente pela alta porosidade do material, que aumenta a sua higroscopicidade. No entanto, todos estes valores são inferiores ao valor de higroscopicidade da GA pura (10 ± 1 g/100g), mesmo que não difiram significativamente ($p<0,05$) com os pós secos sem carreador. Os valores de higroscopicidade foram muito abaixo do esperado, por exemplo, as faixas de valores de higroscopicidade obtida por Bhusari, Muzaffar e Kumar (2014) e Tonon (2009) nos pós produzidos por *spray drying* com GA de suco de tamarindo e polpa de açaí são de 16,61-28,96 e 12,54-15,79 g/100g, respectivamente. Os valores obtidos de higroscopicidade são baixos, mas não indicam que os pós produzidos são pouco higroscópicos, pois visualmente notou-se a formação do *caking* em todos os tratamentos menos da GA, resultado que pode ser observado na Figura 26 que apresenta visualmente as amostras no equilíbrio em diferentes umidades relativas, na linha correspondente ao sal cloreto de sódio (NaCl). Observa-se nos tratamentos secos com GA, que à medida que a concentração de GA aumenta o semi-líquido formado está mais seco. O fato de ter maior teor de GA permite maiores quantidade de absorção de água, ou seja maior higroscopicidade, pois os componentes do extrato de vitex já foram saturados e a GA ainda não foi saturada. Assim

mesmo, os pós secos sem GA, tanto pelo spray-dryer quanto pela liofilização, encontram-se na forma semi-líquida, aparentando estar muito mais líquido do que os pós secos com GA, evidenciando que o carreador teve um efeito protetor sim, porém não o suficiente como para não acontecer o *caking* naquela umidade. O aparecimento deste fenômeno corresponde a um fator intrínseco do extrato de vitex, mostrando a dificuldade do manuseio destes pós e a importância da secagem deste extrato com agente carreador, sendo necessária uma concentração maior de GA. Assim sendo, provavelmente os valores altos da atividade de água e umidade após o período de 120 dias apresentados anteriormente ocorram pela alta higroscopicidade dos pós obtidos.

Figura 26. Visualização dos pós na umidade de equilíbrio submetidos a diferentes umidades relativas.



Onde T1: extrato seco a 130 ^{o}C com 5% de GA; T2: extrato seco a 160 ^{o}C com 5% de GA; T3: extrato seco a 130 ^{o}C com 10% de GA; T4: extrato seco a 160 ^{o}C com 10% de GA; T5: extrato seco a 130 ^{o}C com 15% de GA; T6: extrato seco a 160 ^{o}C com 15% de GA; S.130: extrato seco a 130 ^{o}C sem adição de GA; S.160: extrato seco a 160 ^{o}C sem adição de GA. L: extrato puro liofilizado; GA: goma arábica pura

Na Figura 26 podem ser observadas algumas mudanças físicas dos pós armazenados em diferentes umidades relativas. Para os pós produzidos com agente carreador (T1-T6) observa-se que até a umidade relativa de 45,5% (K_2CO_3) os pós permaneceram soltos. Na umidade de 69,6 % observa-se nos tratamentos T1-T3 a formação de um semi-líquido viscoso, escuro e pegajoso, já nos tratamentos T4-T6 a formação de aglomerados duros e escuros parecendo um sólido. Nas umidades relativas maiores observa-se para todos os tratamentos a formação do *caking*, sendo que à medida que a concentração de goma arábica é menor ou a umidade relativa do ambiente é maior, menor a viscosidade do semi-líquido produzido. O comportamentos dos pós produzidos por *spray dryer* sem carreador são similares porém os pós se liquefizeram em umidades relativas menores. Nas umidades relativas de 10,9 -37,9 % os pós permaneceram soltos, na umidade relativa de 45,5 % observou-se a formação de um sólido compacto escuro e em umidades maiores a formação do semi-líquido pegajoso. O pó obtido a partir da liofilização foi muito mais sensível, provavelmente pela maior porosidade das partículas. Até nas umidades menores (10,9-45,5 %) observou-se a formação do sólido compacto pegajoso em umidades maiores a amostra encontrava-se liquefeita. O agente carreador goma arábica teve outro comportamento, pois permaneceu com as suas características físicas de pó até ser armazenado na umidade relativa de 84,1 %, onde o pó se liquefez.

A partir destes resultados pode-se concluir que (i) a GA sim teve efeito protetor contra a higroscopicidade; (ii) o armazenamento dos pós obtidos por *spray drying* do extrato dos frutos de vitex sem carreador é impossibilitado pela alta higroscopicidade destes; (iii) nas concentrações estudadas de agente carreador (5-15 %) a estabilidade destes pós a temperatura ambiente e umidade relativa maior que 45,5 % é inviável, devendo ser estudadas futuramente concentrações maiores de GA e a utilização de outros agentes carreadores; (iv) dos pós produzidos neste estudo, os tratamentos com maior concentração de carreador (T5 e T6) foram os mais estáveis no armazenamento a temperatura ambiente em todas as umidades relativas estudadas, portanto um destes será escolhido para posterior aplicação em chocolate meio amargo.

No estudo da secagem no *spray dryer* de polpa de açai com diferentes agentes carreadores (maltodextrina 10 D e 20 D, goma arábica e fécula de mandioca) de Tonon (2009), observa-se que a partir da umidade relativa de 68,9 % ocorreu a formação destes sólidos escuros compactos e que até na umidade maior (84,3%) nenhuma das amostras se liquefez, indicando que a GA como carreador não é a responsável pelos valores altos de

higroscopidade dos pós produzidos e sim as características intrínsecas do extrato dos frutos de vitex.

A Tabela 19 apresenta os resultados experimentais da umidade de equilíbrio obtidos a 25ºC das amostras produzidas com diferentes concentrações de goma arábica secas pelo spray dryer, amostra liofilizada sem carreador e da goma arábica pura, armazenadas em 7 soluções salinas saturadas com diferentes atividades de água.

Tabela 19. Umidades de equilíbrio obtidas a 25 ºC dos pós do extrato dos frutos de vitex e do carreador (goma arábica) armazenados em sete soluções salinas saturadas com diferentes atividades de água.

Sais	aw	Umidade de Equilíbrio (Ueq) (g/g matéria seca)									
		T1	**T2**	**T3**	**T4**	**T5**	**T6**	**S.130**	**S.160**	**L**	**GA**
LiCl	**0.109**	-0,4 ± 1,0	-1,2 ± 0,6	-1,7 ± 0,5	1 ± 2	-1,8 ± 0,4	-2 ± 1	-2,2 ± 0,4	-4,0 ± 0,3	-8,6 ± 0,3	-6,3 ± 0,4
CH_3COOK	**0,226**	270 ± 15	171 ± 14	114 ± 20	203 ± 22	256 ± 27	290 ± 19	-1,1 ± 0,2	-0,7 ± 0,2	-5 ± 1	-4 ± 1
$MgCl_2$	**0,379**	3,0 ± 0,5	2,7 ± 0,2	1,7 ± 0,2	2,4 ± 0,4	0,5 ± 0,4	3,6 ± 0,5	3,1 ± 0,1	2 ± 2	-2,8 ± 0,5	-1,8 ± 0,1
K_2CO_3	**0,455**	4,6 ± 0,3	5,4 ± 0,4	4,4 ± 0,3	3,6 ± 0,2	4,4 ± 0,2	3 ± 1	4,7 ± 0,6	6 ± 1	1,6 ± 0,1	0,2 ± 0,1
KI	**0,696**	14,6 ± 0,5	15 ± 1	12 ± 2	15 ± 4	8,5 ± 0,5	9 ± 2	12,0 ± 0,5	11,8 ± 0,8	7,7 ± 0,7	3,5 ± 0,1
NaCl	**0,753**	2,7 ± 0,2	3,2 ± 0,2	6,6 ± 0,8	9,9 ± 0,7	7,9 ± 0,6	13 ± 2	20 ± 2	21 ± 2	16 ± 4	22 ± 1
KCl	**0,841**	27,8 ± 0,3	27 ± 2	25 ± 1	24,1 ± 0,8	20,3± 0,3	21 ± 2	27,5 ± 0,1	25,2 ± 0,6	22 ± 1	11,4 ± 0,2

*Média ± desvio padrão (n = 3 replicadas). Onde aw: atividade de água experimental; T1: extrato seco a 130 ^oC com 5% de GA; T2: extrato seco a 160 ^oC com 5% de GA; T3: extrato seco a 130 ^oC com 10% de GA; T4: extrato seco a 160 ^oC com 10% de GA; T5: extrato seco a 130 ^oC com 15% de GA; T6: extrato seco a 160 ^oC com 15% de GA; S.130: extrato seco a 130 ^oC sem adição de GA; S.160: extrato seco a 160 ^oC sem adição de GA. L: extrato puro liofilizado; GA: goma arábica pura

Observa-se na Tabela 19 que à medida que as atividades de água do ambiente aumentam as umidades de equilíbrio também, pois quando um material biológico é exposto a um ambiente, este reage (absorção/adsorção) ajustando a sua própria umidade com a umidade relativa do ambiente. Assim, observa-se que nas atividades de água mais baixas os valores para a umidade de equilíbrio foram negativos. Fisicamente isto significa que houve uma adsorção, ou seja, a amostra perdeu água para o meio ambiente.

Para adaptar melhor os modelos matemáticos das isotermas de sorção foram eliminadas as umidade de equilíbrio correspondentes aos sais CH3COOK e NaCl pois os valores obtidos apresentaram algumas incoerências, mesmo com desvios padrões baixos. Assim, os dados experimentais das isotermas de sorção para os pós com diferentes concentrações de goma arábica como carreador, diferentes temperatura de secagem e método de secagem, assim como do próprio carreador puro foram ajustados por cinco modelos da literatura. Os parâmetros estimados para cada modelo estão apresentados na Tabela 20.

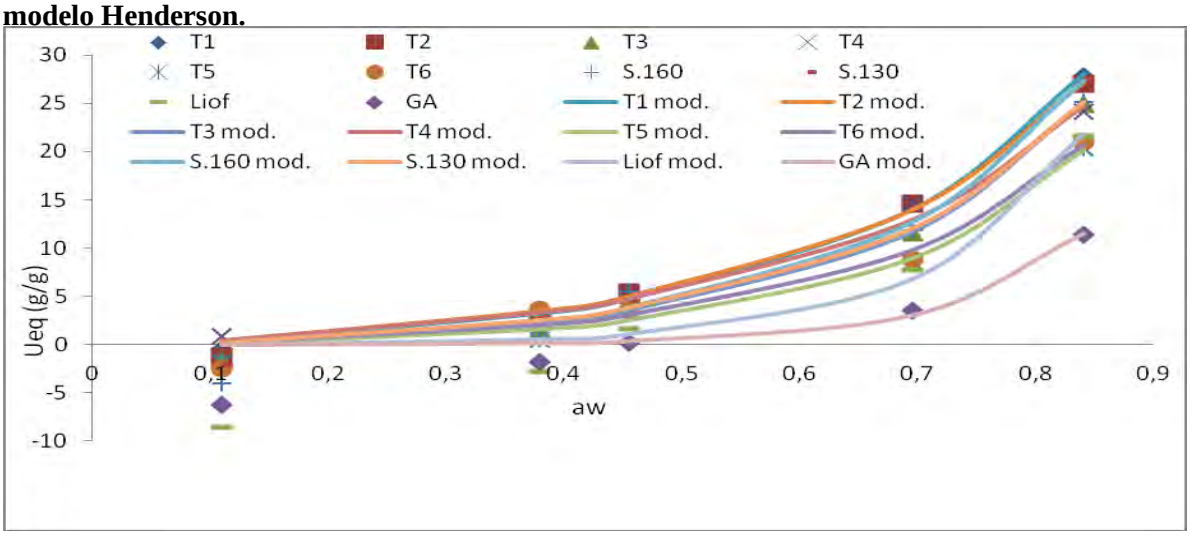
Tabela 20. Parâmetros estimados para cada modelo das isotermas de sorção dos extratos secos dos frutos de vitex e do carreador goma arábica.

Modelo	Parametro	T1	T2	T3	T4	T5	T6	S.130	S.160	L	G.A
	Xm	6,390	7,243	5,713	10,612	6,620	16,503	7,899	4,682	1,108	0,386
	CGAB	0,499	1,487	1,000	2,414	1,251	0,178	0,346	0,497	0,500	0,500
GAB	*KGAB*	0,739	0,946	0,967	0,939	0,907	0,213	0,498	0,772	0,949	0,990
	R2	0,998	0,994	0,994	0,979	0,983	0,970	0,988	0,965	0,902	0,852
	DR (%)	34,58	27,76	23,21	6,53	23,13	19,64	24,61	22,35	20,33	20,17
	Xm	29,499	142,269	142,208	15,055	5,092	3,944	5,293	4,825	9,401	14,472
	CBET	0,108	0,023	0,016	0,238	0,478	1,028	0,913	0,997	0,111	0,027
BET	*N*	6,902	5,258	6,721	7,292	19,746	114,847	114,847	114,847	114,847	114,847
	R2	0,999	0,995	0,990	0,995	0,974	0,972	0,988	0,960	0,900	0,854
	DR (%)	40,21	27,55	23,57	8,33	23,43	24,01	25,45	22,94	20,33	20,17
	A	84,401	88,489	58,483	92,810	43,448	51,111	62,177	59,714	22,381	13,633
Hasley	*B*	0,888	0,908	0,805	0,953	0,763	0,809	0,802	0,809	0,532	0,469
	R2	0,983	0,973	0,978	0,961	0,966	0,964	0,981	0,946	0,882	0,835
	DR (%)	94,88	47,68	32,48	21,87	27,91	27,33	30,54	25,49	20,42	20,16
	C	6,079	6,208	4,640	5,922	3,423	3,949	5,050	4,845	1,729	0,650
Oswin	*D*	0,922	0,895	1,016	0,861	1,072	1,003	1,019	0,997	1,525	1,725
	R2	0,992	0,986	0,988	0,972	0,974	0,971	0,988	0,961	0,897	0,850
	DR (%)	60,82	35,67	26,41	3,64	23,91	23,89	25,42	22,98	20,16	20,06
	kH	0,225	0,210	0,293	0,212	0,364	0,315	0,281	0,272	0,579	0,823
Henderson	*nH*	0,630	0,657	0,570	0,674	0,539	0,582	0,568	0,593	0,375	0,329
	R2	0,999	0,995	0,992	0,986	0,975	0,968	0,988	0,968	0,907	0,860
	DR (%)	36,15	26,67	22,27	10,10	21,29	21,44	21,91	21,18	20,03	20,01

Onde T1: extrato seco a 130 ^{o}C com 5% de GA; T2: extrato seco a 160 ^{o}C com 5% de GA; T3: extrato seco a 130 ^{o}C com 10% de GA; T4: extrato seco a 160 ^{o}C com 10% de GA; T5: extrato seco a 130 ^{o}C com 15% de GA; T6: extrato seco a 160 ^{o}C com 15% de GA; S.130: extrato seco a 130 ^{o}C sem adição de GA; S.160: extrato seco a 160 ^{o}C sem adição de GA. L: extrato puro liofilizado; GA: goma arábica pura; Xm é a umidade na monocamada molecular (g água/g sólidos secos), N é o número de camadas moleculares, CBET, CGAB, KGAB, A, B, C, D, kH, nH, KA, KB, nA e nB são constantes.

De acordo com a Tabela 20, em geral, os modelos apresentaram um ajuste intermediário, com valores de R^2 próximos de 1, com exceção do extrato liofilizado e da goma arábica e os valores do desvio relativo foram altos (acima de 10%). Dentre todos os modelos, o modelo de Henderson se ajustou melhor apresentando maiores valores de R^2 e menores valores de desvio relativo, assim, este modelo foi utilizado para representar as isotermas de sorção do extrato dos frutos de vitex em pó (Figura 27).

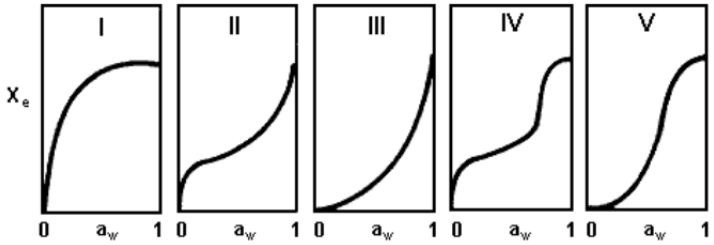
Figura 27. Isotermas de sorção dos pós do extrato de vitex com goma arábica, ajustadas pelo modelo Henderson.



Onde Ueq: Umidade de equilíbri; T1: extrato seco a 130 °C com 5% de GA; T2: extrato seco a 160 °C com 5% de GA; T3: extrato seco a 130 °C com 10% de GA; T4: extrato seco a 160 °C com 10% de GA; T5: extrato seco a 130 °C com 15% de GA; T6: extrato seco a 160 °C com 15% de GA; S.130: extrato seco a 130 °C sem adição de GA; S.160: extrato seco a 160 °C sem adição de GA. L: extrato puro liofilizado; GA: goma arábica pura.

A equação de Henderson representa um modelo puramente empírico e observa-se que mesmo sendo o modelo com melhor ajuste não consegue modelar bem os valores para umidade de equilíbrio em atividade de água baixas, provavelmente por se tratar de uma adsorção. Segundo classificação de Brunauer, Emmett e Teller (1938) apud Tonon (2009) (Figura 28) as umidades de equilíbrio obtidas seguem o tipo III.

Figura 28. Tipos de isoterma de sorção.



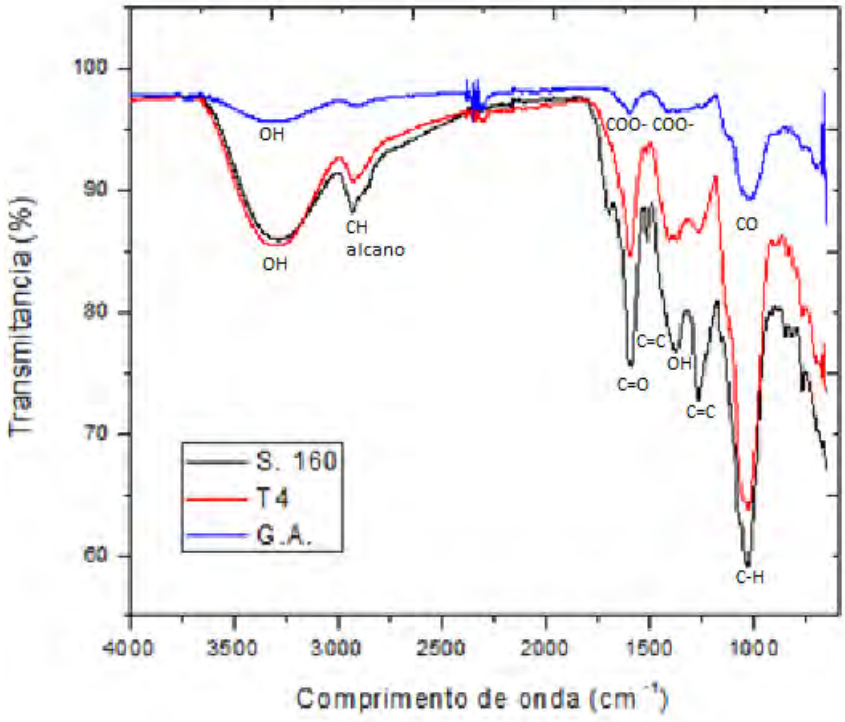
Fonte: Brunauer, Emmett e Teller (1938) apud Tonon (2009).

Saber o comportamento do material em diferentes umidades relativas, ou seja, o conhecimento da umidade de equilíbrio é muito importante na indústria, pois tem relação direta com a armazenagem o manuseio e a secagem (TONON, 2009). Devido à alta higroscopicidade dos pós produzidos é vital poder modelar o comportamento dos mesmos em diferentes umidades relativas para poder estabelecer as melhores condições de armazenamento, sendo interessante um futuro estudo das isotermas de sorção em temperaturas menores à ambiente.

Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A interação dos componentes ativos do extrato dos frutos de vitex presente nos pós com a goma arábica foi avaliada pela espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), a Figura 29 mostra as interações do tratamento 4, como modelo, pois todos os tratamentos tiveram comportamento similar, mudando apenas as intensidades dos picos. A linha azul corresponde ao carreador goma arábica puro, a linha preta corresponde às partículas do extrato vitex puro seco por *spray drying* com temperatura de ar de entrada de 160 ˚C (S.160) e a linha vermelha ao tratamento 4.

Figura 29. Interação dos componentes do extrato dos frutos de *Vitex agnus castus* L. com o agente carreador goma arábica pela espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).



Onde T4: extrato seco a 160 ^{o}C com 10% de GA; S.160: extrato seco a 160 ^{o}C sem adição de GA. GA: goma arábica pura.

Observando o espectro da goma arábica, linha azul, verifica-se que apresenta uma banda larga típica da absorção de deformação axial da ligação OH (3300-2500 cm^{-1}) em 3328 cm^{-1}. As bandas em 1599 cm^{-1} e 1416 cm^{-1} provavelmente ocorrem devido às vibrações do ânion carboxilato COO^{-}, deformação assimétrica e simétrica, respectivamente. As bandas em 1280 cm^{-1} e 1016 cm^{-1} ocorrem devido ao estiramento entre a ligação simples CO. O espectro obtido da goma arábica foi similar ao obtido por Espinosa-Andrews et al. (2010).

No espectro do tratamento S. 160, linha preta, que corresponde ao extrato puro de vitex, observa-se que a ligação OH (3300-2500 cm^{-1}) em 3275 cm^{-1} é bem forte, devido à presença dos compostos fenólicos e alcois. Já o pico em 2926 cm^{-1} ocorre devido ao estiramento da ligação do alcano (CH). Os picos em 1695 e 1031 cm^{-1} ocorrem devido às vibrações das ligações aromáticas C=O e C-H, respectivamente. Os picos em 1593, 1269 e 770 cm^{-1} correspondem às vibrações da ligação aromática C=C. O pico em 1514 cm^{-1} e 1379 cm^{-1} devido ao estiramento da ligação do O-H do ácido carboxílico e à ligação C-H, respectivamente. Os resultados obtidos foram muito similares aos apresentados por Sahib et al. (2016).

Observa-se no espectro correspondente ao tratamento 4, linha vermelha, que as ligações presentes no extrato de vitex predominam, destacando-se os picos correspondentes às ligações OH em 3296 cm^{-1}, estiramento da ligação do alcano (CH) em 2927 cm^{-1}e à ligação CH em 1373 cm^{-1}. Também nota-se que este espectro difere ao de vitex, com o aparecimento de ombros em alguns picos, assim, possivelmente pode ter ocorrido interação entre os componentes do extrato de vitex e a goma arábica devido a uma complexação.

6.4.5. Caracterização das micropartículas

As micropartículas foram caracterizadas em relação a seu tamanho e morfologia.

Tamanho e distribuição de tamanho das micropartículas

A Tabela 21 apresenta os valores dos diâmetros médios volumétricos das micropartículas obtidas pela secagem por *spray dryer*.

Tabela 21. Valores dos diâmetros médios volumétricos das micropartículas obtidas secagem por spray dryer.

Tratamento	Diâmetro médio volumétrico (µm)
T1	$8,9 \pm 0,4^{B}$
T2	$25,4 \pm 0,2^{A}$
T3	$9,7 \pm 0,4^{B}$
T4	$28,5 \pm 0,2^{A}$
T5	$28,2 \pm 0,3^{A}$
T6	$20,8 \pm 0,3^{A}$
S. 130	$9 \pm 0,3^{B}$
S. 160	$10,2 \pm 0,3^{B}$

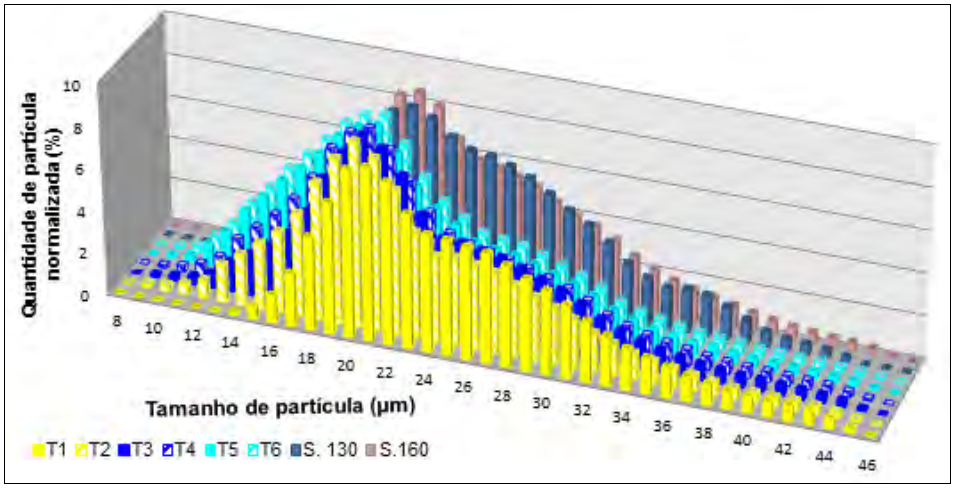
Onde T1: extrato seco a 130 ^{o}C com 5% de GA; T2: extrato seco a 160 ^{o}C com 5% de GA; T3: extrato seco a 130 ^{o}C com 10% de GA; T4: extrato seco a 160 ^{o}C com 10% de GA; T5: extrato seco a 130 ^{o}C com 15% de GA; T6: extrato seco a 160 ^{o}C com 15% de GA; S.130: extrato seco a 130 ^{o}C sem adição de GA; S.160: extrato seco a 160 ^{o}C sem adição de GA.

Com relação ao diâmetro médio volumétrico, observam-se dois grupos com faixas de valores diferentes, os tratamentos T1, T3, S.130 e S.160 apresentam valores na faixa de 8,9-10,2 µm e os outros tratamentos (T2, T4, T5 e T6) apresentam diâmetro médio volumétrico na faixa de 20 - 30 µm, valores esperados para microesferas produzidas no *spray dryer*, não apresentando uma tendência clara. Essa variação entre os tratamentos pode ser explicada pela quantidade de carreador adicionado, pois quanto maior o conteúdo de sólidos totais, maior a viscosidade e o tamanho da gota, ou seja, maior o tamanho da partícula formada.

De acordo com Gong et al. (2007) os pós obtidos pelo processo de *spray dryer* tem micropartículas pequenas, com tamanho inferior a 50 µm, estando os valores obtidos para todos os tratamentos dentro desta faixa. Ferrari et al (2012) obtiveram diâmetro médio volumétrico igual a 10,98 ± 0,47 µm do extrato de amora seco por spray dryer utilizando 7% de goma arábica como carreador; os valores obtidos por da Silva et al. (2013) do extrato de própolis encapsulado com goma arábica como carreador foram na faixa de 23,3-24 µm, mostrando, portanto, que os valores obtidos estão dentro do esperado.

A Figura 30 apresenta a distribuição volumétrica do tamanho das micropartículas produzidas no *spray dryer*.

Figura 30. Distribuição volumétrica de tamanho de partícula das micropartículas à base do extrato dos frutos de vitex (*Vitex agnus castus* L.).



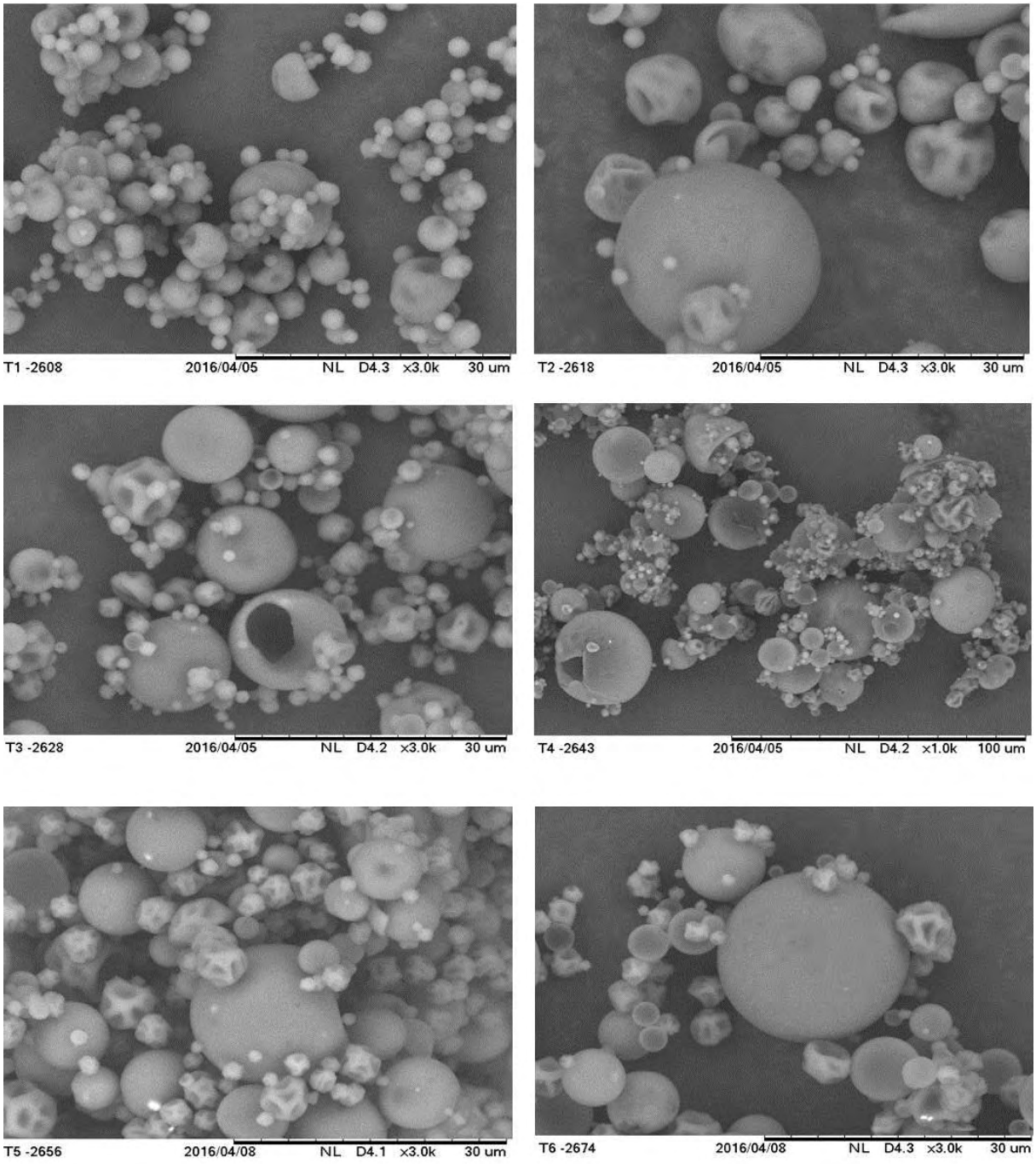
Onde, T1: extrato seco a 130 °C com 5% de GA; T2: extrato seco a 160 °C com 5% de GA; T3: extrato seco a 130 °C com 10% de GA; T4: extrato seco a 160 °C com 10% de GA; T5: extrato seco a 130 °C com 15% de GA; T6: extrato seco a 160 °C com 15% de GA; S.130: extrato seco a 130 °C sem adição de GA; S.160: extrato seco a 160 °C sem adição de GA.

Observa-se que a distribuição do tamanho de partícula para todos os tratamentos é monomodal, apresentando um máximo na faixa dos 20 - 23 µm, a distribuição não é muito larga variando, em geral, na faixa de valores de 5 - 44 µm. Observa-se comportamento similar entre os tratamentos, sendo que as micropartículas obtidas pela secagem sem carreador (S.130 e S. 160) apresentam maior número de partículas com diâmetro volumétrico maior. Estes resultados são importantes, uma vez que quanto menores as partículas, menor a possibilidade de interferirem negativamente na textura do alimento ao qual serão incorporadas. A variação da distribuição do tamanho de partícula obtido está de acordo com os obtidos por Tonon et al. (2009) e Ferrari et al. (2012) que variavam entre 0,1 - 41 µm e 0,1 – 41,4 µm, respectivamente, no entanto, estes autores reportaram uma distribuição bimodal.

Morfologia

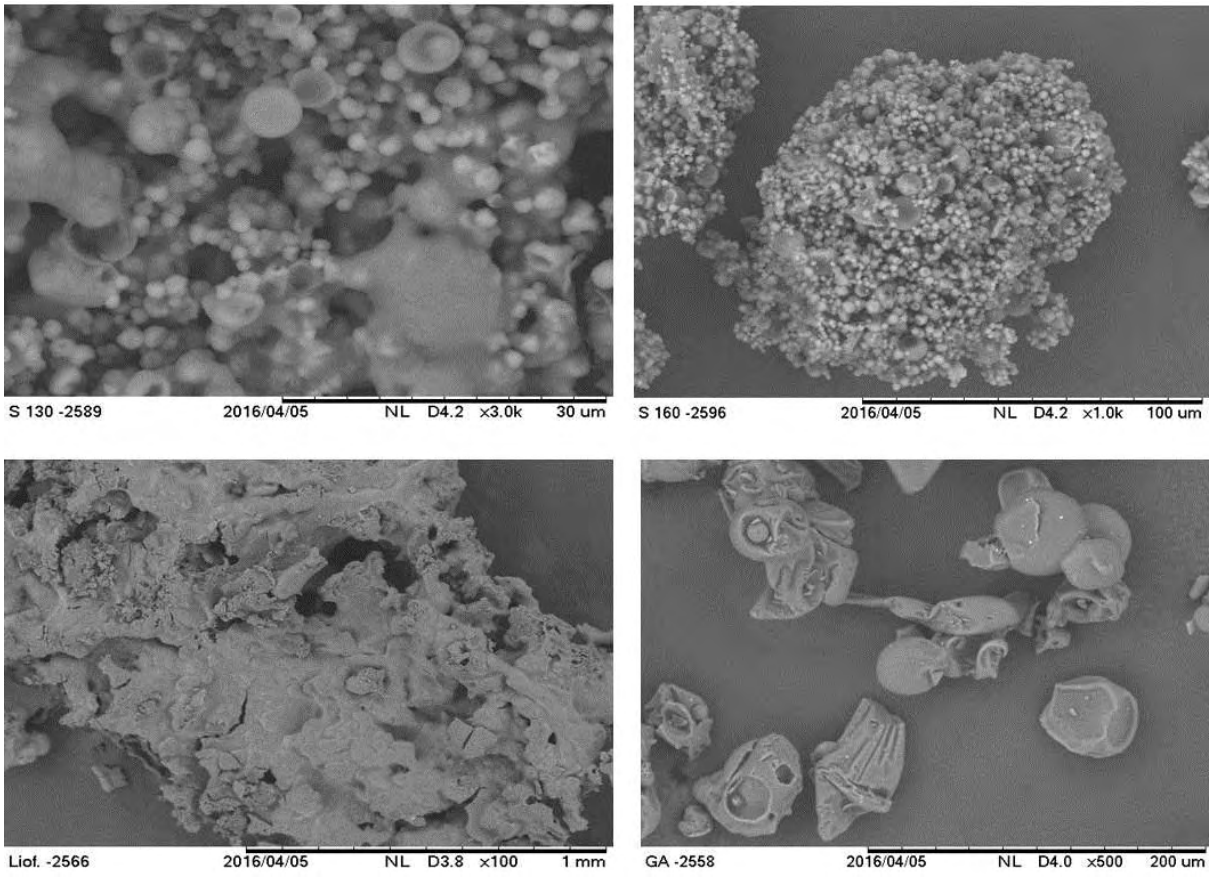
A Figura 31 mostra as micrografias dos pós obtidos com o carreador goma arábica (T1 – T6) com aumento 3000 vezes, com exceção do T4 que está com aumento de 1000 vezes. A Figura 32 apresenta as micrografias dos pós obtidos sem carreador (S.130 e S.160), do extrato liofilizado e da goma arábica, com aumento de 3000, 1000, 100 e 500 vezes, respectivamente.

Figura 31. Micrografias obtidas por microscopia de varredura das micropartículas do extrato dos frutos de vitex (*Vitex agnus castus* L.) com goma arábica como carreador.



Onde T1: extrato seco a 130 ^{o}C com 5% de GA; T2: extrato seco a 160 ^{o}C com 5% de GA; T3: extrato seco a 130 ^{o}C com 10% de GA; T4: extrato seco a 160 ^{o}C com 10% de GA; T5: extrato seco a 130 ^{o}C com 15% de GA; T6: extrato seco a 160 ^{o}C com 15% de GA.

Figura 32. Micrografias obtidas por microscopia de varredura das micropartículas obtidas do extrato dos frutos de vitex (*Vitex agnus castus* L.), do extrato liofilizado e da goma arábica.



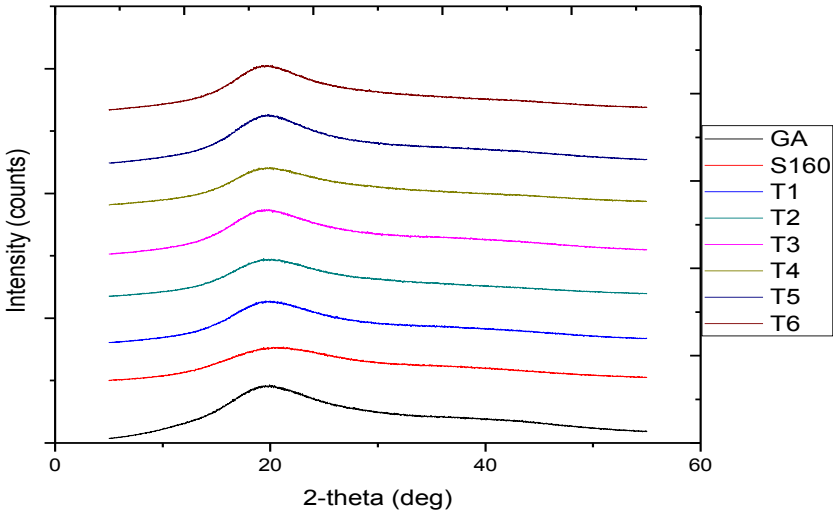
Onde S.130: extrato seco a 130 ^{o}C sem adição de GA; S.160: extrato seco a 160 ^{o}C sem adição de GA. Liof: extrato puro liofilizado; GA: goma arábica pura.

Na Figura 31 observa-se que todas as micropartículas obtidas pelo processo de secagem com *spray dryer* utilizando a goma arábica como carreador tem o formato esférico, havendo micropartículas com a parede lisa e com a superfície rugosa, de vários tamanhos (compatível com os resultados da distribuição de tamanho de partícula). A rugosidade ocorre devido ao uso de temperaturas mais baixas, pois devido a uma menor taxa de transferência a parede formada das partículas é mais flexível murchando na hora do resfriamento. Estas características estão dentro do esperado para partículas produzidas por este processo e estão de acordo com da Silva et al. (2013), Ferrari et al. (2012) e Tonon et al. (2009). As micropartículas obtidas no *spray dryer* sem carreador (Figura 32) também apresentam formato esférico e têm a superfície lisa, porém, pode-se observar que formaram aglomerados. Por outro lado o pó produzido pela liofilização apresentou aglomerados que parecem torrões, não sendo observadas partículas soltas. A aglomeração destas partículas deve ocorrer pela alta

higroscopicidade do extrato de vitex. Por último, observa-se a goma arábica pura, sem formato definido, superfície rugosa e de maior tamanho do que as partículas produzidas.

A análise de difração de raios-x (Figura 33) mostrou uma banda larga para todas as partículas (T1-T6, S.160 e GA), portanto as partículas em questão apresentaram estado amorfo, pois estruturas cristalinas refletem os raios x produzindo picos definidos. Cano-Chauca et al. (2005) avaliaram as partículas obtidas pelo processo de atomização do extrato de manga com goma arábica, dentre outros carreadores, e também relataram o estado amorfo.

Figura 33. Espectro das partículas e seus controles da análise de difração de raios x.



Onde, T1: extrato seco a 130 ^{o}C com 5% de GA; T2: extrato seco a 160 ^{o}C com 5% de GA; T3: extrato seco a 130 ^{o}C com 10% de GA; T4: extrato seco a 160 ^{o}C com 10% de GA; T5: extrato seco a 130 ^{o}C com 15% de GA; T6: extrato seco a 160 ^{o}C com 15% de GA; S.130: extrato seco a 130 ^{o}C sem adição de GA; S.160: extrato seco a 160 ^{o}C sem adição de GA. S.160: extrato seco a 160 ^{o}C sem adição de GA. GA: goma arábica pura.

6.5. Aplicação das micropartículas de vitex na forma livre e encapsulada em chocolate meio amargo

6.5.1. Caracterização do chocolate meio amargo controle, adicionado de vitex na forma livre e encapsulada

A Figura 34 apresenta os três chocolates produzidos: controle, adicionado de vitex encapsulado e vitex livre, em 3 cortes. Observa-se nitidamente a diferença de cor entre o chocolate com vitex encapsulado e os outros dois chocolates, sendo este mais claro. Pode se observar também que não apresentaram grandes falhas visuais na superfície. Contudo, quando

observado o corte transversal, percebe-se que a adição das micropartículas interferiu na aparência dos chocolates, pois se observa uma aparência mais porosa, enquanto o controle apresenta uma estrutura lisa. Ainda no corte transerval, nos chocolates adicionados de vitex na forma livre e encapsulada são observados uns pontinhos mais claros, o que sugere que houve aglomeração das micropartículas na hora da adição, porque de fato elas não poderiam ser perceptíveis a olho nú, pois apresentam diâmetro médio inferior a 50 µm. Estes agregados podem causar a sensação de arenosidade.

Figura 34. Chocolates meio amargos: controle, adicionado com vitex encapsulado e vitex livre.

Fonte: própria autoria.

A Tabela 22 apresenta os dados da atividade de água, pH e os parâmetros de cor do chocolate controle, adicionado com as micropartículas de vitex livre e encapsulado.

Tabela 22. Caracterização do chocolate meio amargo controle, adicionado de vitex na forma livre e encapsulada em relação à atividade de água, pH e cor.

Chocolate	Atividade de água	pH	L*	a*	b*
Controle	$0,31 \pm 0,01^{A}$	5,82	20 ± 1^{A}	$7,8 \pm 0,4^{B}$	$6,8 \pm 0,6^{B}$
Vitex encapsulado	$0,27 \pm 0,03^{A}$	5,50	$22,3 \pm 0,4^{A}$	$9,5 \pm 0,2^{A}$	$9,9 \pm 0,4^{A}$
Vitex livre	$0,29 \pm 0,02^{A}$	5,61	$19,9 \pm 0,6^{A}$	$7,9 \pm 0,4^{B}$	$7,0 \pm 0,1^{B}$

*Média ± desvio padrão (n = 3 replicadas). Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ($p<0,05$).

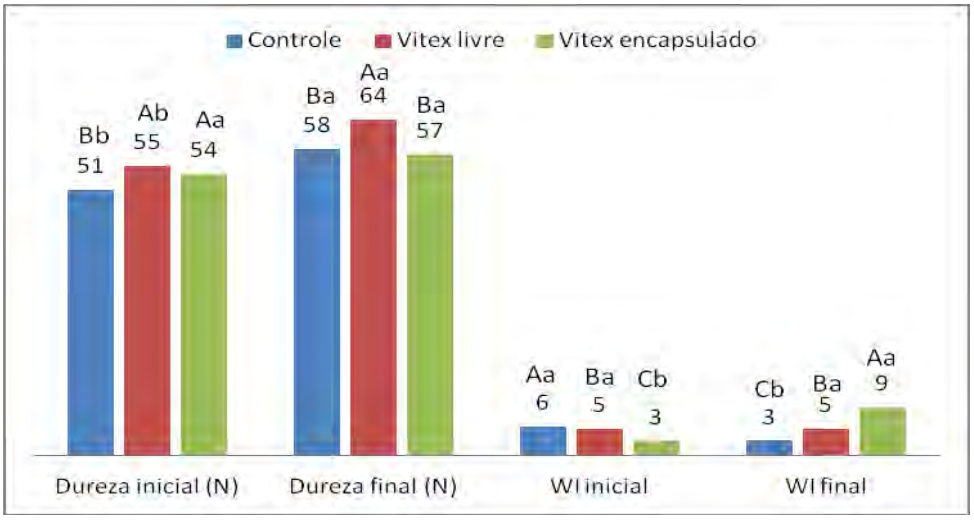
Observa-se na Tabela 22 que os chocolates meio amargo produzidos, controle (sem adição de vitex), vitex encapsulado (adição de 2,5 % (m/m) do tratamento T6- extrato de vitex adicionado com 15 % (m/m) de goma arábica atomizado a 160 °C) e vitex livre (adição de 2,5% de uma mistura mecânica de extrato de vitex atomizado a 160 °C puro e goma arábica, na mesma proporção de T6), não apresentaram diferença significativa ($p<0,05$) entre si nos parâmetros de atividade de água, pH e o parâmetro L* de cor.

Os valores da atividade de água foram baixos (0,27 – 0,31) como era esperado, pois o chocolate meio amargo é um produto sólido, sem adição de água na sua formulação. Já os valores de pH variaram entre 5,50 – 5,82, estando de acordo com o esperado. Dimick e Hoskin (1981) explicaram que durante a etapa da conchagem ocorre a redução do ácido acético, ácidos totais, taninos e água, consequentemente o pH aumenta de 4,9 a 5,7, sendo que os valores obtidos estão próximos ao pH 5,7. Os valores obtidos de pH foram similares aos obtidos por Silva et al (2017), estes autores trabalharam com a mesma formulação e ingredientes, porém avaliaram a aplicação de probioticos na forma livre e encapsulada, os valores de atividade de água obtidos foram maiores (0,36 – 0,50), provavelmente devido à incorporação de microrganismos e ao menor tempo de conchagem (16 horas).

Em relação aos parâmetros de cor, observa-se que não houve diferença significativa ($p<0,05$) na luminosidade (L*), ou seja, todas as amostras apresentaram a mesma claridade. Em relação à tonalidade (parâmetros a* e b*) observa-se que o chocolate com o extrato de vitex livre e o controle não apresentaram diferença sifnificativa, porém, o chocolate com o extrato de vitex encapsulado apresentou maiores valores destes parâmetros, ou seja, o

chocolate foi produzido foi mais amarelo (b*) e vermelho (a*), do que o controle e o chocolate com vitex na forma livre. A influencia destes parâmetros é quantificada com o valor do *whiteness index* (WI), dado que fornece quão branca é a amostra e pode ser relacionada com o problema de fabricação, temperagem e resfriamento de chocolate conhecido como *fat bloom*, este fenômeno ocorre devido à recristalização da gordura do chocolate de tal forma que estes cristais são capazes de refletir a luz e aparecem manchas brancas na superfície do chocolate. Este fenômeno normalmente acontece devido a uma mudança muito brusca de temperatura ou devido a uma temperagem mal feita. A Figura 35 apresenta os parâmetros dureza e *whiteness index* (WI) dos chocolates produzidos no inicio e após 60 dias de armazenamento a 22 °C.

Figura 35. Dureza e *whiteness index* do chocolate controle e adicionado de vitex na forma livre e encapsulada nos tempos 0 e 60 dias.



*Média ± desvio padrão (n = 5 replicadas). Diferentes letras maiúsculas para a mesma variável e tempo e diferentes letras minúsculas para a mesma variável e diferente tempo indicam diferença significativa entre si ($p < 0,05$).

Na Figura 35 observa-se que os WI de todos os chocolates produzidos, tanto no tempo inicial quanto final, foram bem baixos (3-6 inicial e 3-9 final), mostrando que a temperagem e o armazenamento foram realizados de forma correta, não ocorrendo o *fat bloom* no começo nem durante o armazenamento. No início a amostra controle apresentou maior valor de WI, seguido pelo chocolate com o vitex livre e por último o chocolate com o vitex encapsulado, esta ordem foi invertida durante o armazenamento, sendo que o chocolate controle diminuiu o valor de WI, o chocolate com vitex livre permaneceu igual e o chocolate com vitex

encapsulado triplicou ($p<0,05$). Essa inversão pode ter ocorrido porque as micropartículas com carreador (vitex encapsulado) apresentam um diâmetro maior do que o extrato de vitex sem carreador (vitex livre) o que pode ter gerado alguma instabilidade na cristalização da mantueiga de cacau ao longo do tempo, aumentando o WI. Por outro lado, a cristalização da manteiga de cacau do chocolate controle foi se estabilizando ao longo do tempo, diminuindo o WI. Estes resultados de WI, tanto no tempo 0 dias quanto no tempo 60 dias, foram muito menores aos obtidos por Silva et al. (2017) (20 no início e 30 após 120 dias).

Na Figura 35 também pode se observar a dureza das amostras no tempo 0 e tempo 60 dias, este parâmetro tem relação direta com a textura do chocolate e de alimentos em geral, podendo afetar a aceitação sensorial do produto (foi avaliado na seção 6.5.3.). Observa-se no tempo inicial, que os chocolates adicionados de vitex na forma livre e encapsulada foram significativamente mais duros ($p<0,05$) (55 e 54 N, respectivamente) do que o controle (51 N). Após o tempo de estocagem, apenas o chocolate com o extrato de vitex encapsulado não diferiu significativamente ($p<0,05$), os outros dois chocolates ficaram significativamente mais duros ($p<0,05$) com o tempo (58 e 64 N para o chocolate controle e vitex na forma livre, respectivamente). No final da estocagem o chocolate adicionado de vitex na forma livre foi significativamente mais duro do que os outros chocolates, sendo que não apresentaram diferença significativa entre o controle e o vitex encapsulado. Portanto, observa-se que inicialmente a adição do extrato de vitex provocou um aumento na dureza, contudo, com o tempo o chocolate adicionado de vitex na forma encapsulada manteve a sua dureza constante e o chocolate controle ficou mais duro. Mostrando que a incorporação do extrato de vitex na forma encapsulada fica mais estável, interage menos com a matriz alimentícia, sendo mais conveniente para manter a qualidade da textura do chocolate. Estes valores são inferiores aos obtidos por Silva et al. (2017) no tempo inicial e após 120 dias do chocolate controle e adicionados de probióticos (aproximadamente 75 – 90 N, respectivamente), mostrando que a produção do chocolate foi adequada.

6.5.2. Estabilidade da casticina e os compostos fenólicos ao longo do tempo nos chocolates

O teor dos compostos fenólicos e da casticina ao longo do tempo dos chocolates produzidos podem ser observados nas Tabelas 23 e 24, respectivamente. A Tabela 25 apresenta as porcentagens das perdas totais dos compostos bioativos durante o armazenamento de 60 dias.

Tabela 23. Teor de compostos fenólicos (mg EAG/ g chocolate) ao longo do tempo nos chocolates controle e adicionados de vitex na forma livre e encapsulada, armazenados por 60 dias.

Amostra	0 dias	7 dias	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias
Controle	$7,8 \pm 0,1^{Aa}$	$7,1 \pm 0,6^{Aa}$	$8,0 \pm 0,4^{Ab}$	$4,3 \pm 0,1^{Ba}$	$4,7 \pm 0,7^{BCa}$	3 ± 1^{Ca}
Vitex encapsulado	$8,1 \pm 0,5^{Ba}$	$6,2 \pm 0,3^{Ba}$	$9,4 \pm 0,8^{Aa}$	$4,1 \pm 0,2^{Ca}$	$4,1 \pm 0,6^{Ca}$	$2,0 \pm 0,5^{Da}$
Vitex livre	$8,2 \pm 0,3^{Ba}$	$6,4 \pm 0,6^{Ba}$	$10,5 \pm 0,4^{Aa}$	$4,3 \pm 0,3^{Ca}$	$4,5 \pm 0,4^{Ca}$	3 ± 1^{Da}

*Média ± desvio padrão (n = 6 replicadas). Letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ($p<0,05$).

Tabela 24. Teor de casticina (µg casticina/ g chocolate) ao longo do tempo dos chocolates adicionados de vitex na forma livre e encapsulada.

Chocolate	0 dias	7 dias	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias
Vitex encapsulado	$8,3 \pm 0,1^{Aa}$	$6,6 \pm 0,1^{Ba}$	$5,6 \pm 0,9^{Ca}$	$6,2 \pm 0,1^{BCa}$	$5,8 \pm 0,5^{Ca}$	$5,5 \pm 0,2^{Ca}$
Vitex livre	$6,3 \pm 0,7^{Ab}$	$4,6 \pm 0,3^{Bb}$	$4,2 \pm 0,2^{Bb}$	$4,7 \pm 0,7^{Bb}$	$5,5 \pm 0,2^{Ba}$	$5,0 \pm 0,4^{Ba}$

* Média ± desvio padrão (n = 3 replicadas). Letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ($p<0,05$).

Tabela 25. Porcentagem da perda total dos compostos bioativos durante o armazenamento de 60 dias.

Chocolate	Fenólicos (%)	Casticina (%)
Controle	67,10	--
Vitex encapsulado	75,93	33,94
Vitex livre	62,73	19,72

Observou-se, na Tabela 23, que durante a estocagem destes chocolates a 22 °C por 60 dias os compostos fenólicos foram se degradando, perdendo até mais da metade do teor neste tempo para todos os tratamentos. Contudo, uma observação relevante é o fato de que em todos os tempos analisados o teor de compostos fenólicos dos três chocolates (controle, vitex adicionado na forma encapsulada e livre) foi igual estatisticamente ($p<0,05$). Esse resultado indica que a adição de 2,5 % (m/m) de vitex, tanto na forma livre quanta na encapsulada, foi insignificante para o teor dos compostos fenólicos totais presentes, isso porque o teor destes compostos no chocolate meio amargo é alto.

Considerando que se trata de chocolate meio amargo com 53% de cacau na sua composição (massa de cacau - 43 % e manteiga de cacau - 10 %) os teores iniciais dos compostos fenólicos dos três chocolates, variando na faixa de 7,8 a 8,2 mg EAG/ g chocolate, estão de acordo com os obtidos por Belščak-Cvitanović et al. (2015), porém baixos quando comparados com outros estudos da literatura. Miller et al. (2006) avaliaram o teor de fenólicos totais e a atividade antioxidante de chocolates comerciais dos Estados Unidos, entre eles chocolates meio amargos de três marcas e obtiveram valores de teor dos compostos fenólicos variando entre 11,76 e 12,88 mg EAG/ g chocolate. Silva et al. (2017) com exatamente a mesma formulação e matéria-prima obtiveram teor de fenólicos totais do chocolate controle igual a 16,98 ± 0,32 mg EAG/ g chocolate, sendo mais que o dobro, está variação tão drástica deve ter acontecido porque a mesma matéria-prima foi utilizada um ano depois, devendo ter ocorrido oxidação destes compostos durante esse período e também porque a duração da conchagem realizada foi 8 horas maior. Ainda, Sim et al. (2016) avaliaram o teor de fenólicos totais de chocolate amargo (64 % de cacau) e chocolate análogo feito com gordura vegetal (17 % de cacau) adicionados com 0, 1 e 3 % (m/m) de pericarpo de mangostão (*Garcinia mangostana* L.) em pó, obtiveram resultados variando entre 23,88 - 27,10 e 7,71 – 11,60 mg EAG/ g chocolate, para o chocolate amargo e o chocolate feito com gordura vegetal, respectivamente, observando-se que o teor dos compostos fenólicos dos chocolates produzidos foram tão baixos quanto o chocolate feito com gordura vegetal (17 % de cacau).

Para todas as amostras aos 15 dias da estabilidade houve um aumento no teor dos compostos fenólicos, como não podem ter sido gerados espontaneamente, acredita-se que houve algum erro nesse dia de análise seja este com a balança ou com alguma diluição, devendo serem estes resultados omitidos para uma compreensão adequada da estabilidade destes compostos. Assim sendo, observou-se que aos 30 dias de estabilidade houve um decaimento significativo (quase 50 %) destes compostos para todos os chocolates. Os chocolates adicionados de vitex apresentaram uma segunda redução significativa ($p<0,05$) destes compostos aos 60 dias de estabilidade. Na Tabela 25 estão apresentadas as perdas dos compostos fenólicos dos chocolates, nela é possível observar que estas perdas foram gigantes, entre 62-76 %. Como o chocolate controle apresentou uma perda total de 67,10 %, conclui-se que os fenólicos perdidos foram maioritariamente os presentes no chocolate. Em relação a aplicação do extrato de vitex na forma livre e encapsulada, observa-se que houve maior perda

de compostos fenólicos no chocolate com o extrato encapsulado do que o livre, o que seria contraditório ao esperado, pois a encapsulação deveria proteger ao composto. O que pode ter acontecido é alguma falha na metodologia de extração, sendo que os compostos fenólicos encapsulados não foram extraídos totalmente, acarretando erros na quantificação. Outra opção é a possível interação entre a goma arábica e os compostos do chocolate, fazendo que o efeito protetor seja perdido.

Comparando com a estabilidade dos compostos fenólicos dos chocolates meio amargo (38 % de cacau) e amargo (70 % de cacau) com adição de 2 % do extrato liofilizado ou 2 % do extrato concentrado (21,13 % de sólidos totais) de *Urtica dioica* L. (rico em polifenois) (BELŠČAK-CVITANOVIĆ et al., 2015) a estabilidade dos compostos fenólicos dos chocolates produzidos foi muito baixa, pois nesse estudo avaliaram a estabilidade destes compostos por um ano (a cada 4 meses) e verificou-se que os teores destes compostos dos chocolates meio amargo e amargo (com as duas formas de adição do extrato) oscilaram, porém não reduziram substancialmente.

Portanto, concluiu-se que os teores dos compostos fenólicos dos chocolates meio amargo produzidos foram baixos e apresentaram estabilidade à estocagem a 22 °C durante 60 dias também baixa, sendo a adição de 2,5 % (m/m) de vitex irrelevante para o teor destes compostos. Essa baixa estabilidade pode estar associada, principalmente, à baixa qualidade da embalagem, que consistia apenas da envoltura da barra de chocolate em papel chumbo, não havendo barreira para o oxigênio, principal agente oxidante.

Na Tabela 24 observa-se a estabilidade da casticina nos chocolates produzidos. Ressalta-se que foram realizadas tentativas de quantificação da casticina no chocolate controle no início, aos 30 e 60 dias, e em nenhuma das vezes foi possível quantifica-la, pois a casticina é um flavonoide que não faz parte dos compostos do chocolate e ao longo do tempo não ocorreu nenhuma degradação de algum composto que interferisse na leitura no HPLC da casticina a 256 nm.

Observou-se que durante os primeiros 30 dias o chocolate com adição de vitex na forma encapsulada teve significativamente maior teor de casticina do que o chocolate com adição de vitex na forma livre ($p<0,05$), no entanto, estes teores foram similares para os tempos 45 e 60 dias. O maior teor de casticina no início no chocolate com adição de vitex na forma encapsulada (24,01 %) pode ser explicada devido à perda da casticina no extrato livre (sem agente carreador) durante a incorporação do extrato na forma de pó na produção do

chocolate, é posível que haja complexação de parte da casticina com algum composto do chocolate ou perda decorrente da secagem do extrato.

Na Tabela 25 observam-se as perdas totais da casticina nos chocolates adicionados de vitex na forma encapsulada e livre, 19,72 e 33,94 %, respectivamente. A perda no chocolate adicionado de vitex na forma encapsulada foi maior

Também se observou que o chocolate com adição de vitex na forma livre teve uma perda significativa ($p<0,05$) do teor de casticina nos primeiros 7 dias, após esse período o teor da casticina permaneceu estável. Por outro lado, o chocolate com adição de vitex na forma encapsulada teve duas perdas significativas ($p<0,05$), a primeira ocorreu nos primeiros 7 dias e a segunda nos próximos 7 dias (entre o tempo 7 e 15 dias), permanecendo constante após os primeiros 15 dias. Como as perdas de casticina ao longo dos 6 dias para os chocolates adicionados com vitex na forma encapsulada e livre foram 33,73 e 20,63 %, respectivamente, pode-se dizer que a casticina teve uma estabilidade moderada, melhor que a dos compostos fenólicos. No entanto, quando observados os resultados do estudo de Weathers e Towler (2013), percebe-se que a estabilidade observada da casticina nos chocolates foi boa. Estes autores realizaram uma infusão de *Artemisia annua* L. por 5 minutos em agua fervente, planta que contem casticina, e quantificaram a casticina logo após ser realizada a infusão e após 24 horas a temperatura ambiente no escuro, nesse período houve uma diminuição de 41,67 % no teor da casticina. Não foram encontrados outros estudos na literatura que avaliem a estabilidade da casticina durante o armazenamento para comparação.

6.5.3. Aceitação sensorial dos chocolates adicionados de vitex na forma livre e encapsulada e o controle

A avaliação da aceitação sensorial dos chocolates produzidos foi realizada por 122 mulheres, através do questionário de consumidor preenchido pelas provadoras. Sabe-se que dessas 122 mulheres, 88 % tinham entre 18 – 25 anos, 44% preferem chocolate ao leite e 42% chocolate meio amargo, 60% consome chocolate semanalmente e 63% gosta muito de chocolate meio amargo. Foi perguntado se realizavam alguma atividade para atenuar os sintomas da TPM e se consumiriam algum produto funcional para atenuar ou combater esses sintomas, 49% respondeu que não fazem nada específico, 33% responderam que fazem exercício físico e 16% tomam remédios, no entanto, 97% respondeu que consumiria um produto funcional que combatesse ou atenuasse os sintomas da TPM, mostrando a viabilidade de lançamento de um produto funcional com tais características.

A Tabela 26 apresenta as médias das notas da avaliação sensorial dos três chocolates produzidos: controle e adicionado de vitex na forma encapsulada e livre.

Tabela 26. Notas da avaliação sensorial dos chocolates produzidos: controle, adicionados de vitex na forma encapsulada e livre.

	Sabor	Aroma	Textura	Cor	Aceitação Geral	Intenção de compra
Controle	8 ± 1^{A}	8 ± 1^{A}	8 ± 1^{A}	8 ± 1^{A}	8 ± 1^{A}	5 ± 1^{A}
Vitex encapsulado	6 ± 2^{C}	7 ± 1^{A}	8 ± 1^{B}	8 ± 1^{A}	7 ± 2^{C}	3 ± 1^{C}
Vitex livre	7 ± 2^{B}	8 ± 1^{A}	7 ± 2^{C}	8 ± 1^{A}	7 ± 2^{B}	4 ± 1^{B}

*Média ± desvio padrão (n = 122 replicadas). Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ($p<0,05$).

Observa-se que todas as notas foram maior ou igual a 6 (gostei pouco), mostrando, portanto, que em geral os chocolates foram bem aceitos. O chocolate controle teve as maiores médias para todos os atributos (8 ± 1 – gostei muito) e certamente comprariam este chocolate. Em relação aos atributos aroma e cor, não houve diferença significativa ($p<0,05$) entre os chocolates, por outro lado, para os atributos sabor e aceitação sensorial e intenção de compra, apresentaram diferença significativa, sendo as notas das avaliações na seguinte ordem: controle > vitex livre > vitex encapsulado. Apenas para o atributo textura o chocolate com vitex na forma encapsulada teve melhor avaliação do que o chocolate com vitex na forma livre, sendo que provavelmente comprariam o chocolate com vitex na forma livre e talvez sim/talvez não comprariam o chocolate com vitex na forma encapsulada.

Portanto, no caso de chocolate meio amargo a adição de vitex na forma livre teve maior aceitação do que a adição de vitex na forma encapsulada. Este resultado deve ser atribuído ao fato que o sabor do extrato de vitex combinou com o sabor característico do chocolate meio amargo. Em conclusão, a incorporação do extrato de vitex como ingrediente funcional foi bem aceito sensorialmente, havendo sido produzido um produto funcional para aliviar ou atenuar os sintomas da TPM bem sucedido.

6.6. Avaliação do potencial da microencapsulação em mascarar ou atenuar a sensação de ardência e o amargor

O tratamento T6 (160 °C/ 15 % GA) foi escolhido para avaliação do potencial da encapsulação em mascarar ou atenuar a sensação de ardência e o amargor devido a: (I) apresentar maior quantidade de carreador adicionado, podendo mascarar o gosto desagradável do extrato de vitex mais facilmente; (II) apresentar, junto com o T5 (130 °C/ 15 % GA), melhor estabilidade ao armazenamento em diferentes umidades relativas; (III) apresentar bom rendimento de processo e boa retenção dos compostos fenólicos totais e casticina; (IV) porque o extrato atomizado sem carreador a 160 °C apresentou melhor estabilidade durante a estocagem do que o seu análogo a 130 °C.

Para o amargor e a sensação de picância, os resultados mostraram que não houve diferença significativa ($p<0,05$) entre o pó microencapsulado e o pó misturado mecanicamente, ou seja, a microencapsulação do extrato de vitex por *spray dryer* com 15 % de goma arábica não foi suficiente para mascarar ou atenuar a sensação de ardência e o amargor. Quando avaliados os chocolates meio amargos para a sensação de ardência as amostras com o extrato de vitex livre e encapsulado não apresentaram diferença significativa ($p<0,05$), porém, para o amargor o chocolate que continha o vitex na forma encapsulada mostrou ser mais amargo do que o chocolate com vitex na forma livre, em outras palavras, a encapsulação nas condições testadas não foi suficiente para mascarar o sabor do vitex. No entanto, como visto na seção 6.5.3. mesmo não mascarando o sabor, o chocolate foi bem aceito, devido a que o amargor proveniente do extrato dos frutos de vitex combinou com o amargor do chocolate meio amargo, pois era um sabor já esperado. Assim sendo, mesmo não havendo sido mascarado eficientemente o sabor do extrato de vitex, foi possível desenvolver um produto funcional para combater os sintomas da TPM bem aceito.

De fato, em outros trabalhos realizados por nosso grupo de pesquisa, a microencapsulação mostrou-se efetiva para mascarar o amargor de peptídeos de caseína (ROCHA et al., 2009) e para minimizar o gosto e aroma marcantes da própolis (NORI et al., 2011), o que possibilitou a aplicação destes materiais em barras de proteína (ROCHA et al., 2009) e salame (BERNARDI et al., 2013), respectivamente, com boas aceitações sensoriais. Todavia a microencapsulação, nas condições testadas, não foi suficiente para mascarar ou minimizar o sabor desagradável do extrato de vitex, porque o sabor do extrato de vitex pode

ser muito forte e peculiar, difícil de mascarar, e pela baixa concentração do agente carreador, devendo ser feitos futuros testes com concentrações maiores de carreador.

7. Conclusões

Foi possível determinar as condições ótimas para se obter um extrato rico em compostos fenólicos a partir dos frutos de vitex, com alto teor de casticina e alta atividade antioxidante. No extrato obtido confirmou-se a presença dos seguintes compostos: casticina, ácido protocatecuico, ácido p- hidroxibenzoico e agnusideo que apresentam características antioxidante, antimicrobiana e citotóxica. Destacando-se os compostos casticina e agnusideo por serem capazes de regular os sintomas da TPM.

Spray-drying é uma tecnologia interessante para a produção de extrato em pó de vitex, uma vez que este processo pode tornar o extrato mais fácil de embalar, armazenar, comercializar, manipular e usar, além de proteger seus compostos bioativos. Além disso, os pós apresentam baixa atividade de água, o que impede o crescimento de microrganismos e a ocorrência de reações bioquímicas que podem degradar o extrato.

Em geral os pós produzidos apresentaram bons resultados em relação ao rendimento de processo, retenção e estabilidade durante a estocagem dos compostos bioativos, no entanto, apresentaram baixa estabilidade no armazenamento em diferentes umidades relativas, sendo considerados pós muito higroscópicos. A microencapsulação nas condições testadas não foi suficiente para mascarar ou atenuar a sensação de ardência e o amargor. Portanto, recomendam-se futuros estudos da atomização do extrato dos frutos de vitex com maior teor de carreador, para avaliar melhor o efeito da concentração do carreador na estabilidade durante o armazenamento em diferentes umidades relativas e no potencial em mascarar ou atenuar a sensação de ardência e o amargor.

Os chocolates meio amargos produzidos apresentaram boas características físico-químicas e muito boa aceitação sensorial. Ressalta-se que mesmo que a encapsulação por *spray dryer* nas condições estudadas não mascarou o sabor do extrato de vitex, os chocolates foram bem aceitos, pois como se tratava de um chocolate meio amargo, o amargor proveniente do extrato dos frutos de vitex combinou com o amargor do chocolate.

Portanto, foi possível produzir um extrato dos frutos de vitex concentrado, encapsulá-lo e aplica-lo como ingrediente com potencial funcional para minimizar sintomas da TPM em

chocolate meio amargo. Assim, foi possível desenvolver um produto funcional para combater os sintomas da TPM bem aceito.

8. Referências Bibliográficas

AALTO, T.R.; FIRMAN, M.C.; RIGLER, N.E. p-hydroxybenzoic acid esters as preservatives. I. Uses, antibacterial and antifungal studies, properties and determination. **Journal of Pharmaceutical Science,** v. 42, n. 8, p. 449–457, 1953.

ABAD, M. J.; BEDOYA, L. M.; BERMEJO, P. An update on drug interactions with the herbal medicine Ginkgo biloba. **Current drug metabolism,** v. 11, n. 2, p. 171–181, 2010.

ADAMSON, G.E. et al.HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v.47, p. 4184-4188, 1999.

AFOAKWA, E.O. et al. Particle size distribution and compositional effects on textural properties and appearance of dark chocolates. **Journal of Food Engineering**, v. 87, n. 2, p. 181–190, 2008.

AGUILERA, J.M.; DEL VALLE, J.M.; KAREL, M. Caking phenomena in amorphous food powder. **Trends in Food Science and Technology**, v.6, n.5, p.149-155, 1995.

AGUILERA, J. M. **Solid-Liquid extraction**. In: Liadakis, G., Tzia, C. (Eds.), Extraction optimization in food engineering. CRC Press. 2003

AL-MUHTASEB, A.H.; McMINN, W.A.M.; MAGEE, T.R.A. Moisture sorption isotherm characteristics of food products: a review. **Trans IChemE,** v.80, Part C, p. 118-128, 2002.

ALAÑÓN, M. E. et al. Assessment of flavanol stereoisomers and caffeine and the obromine content in commercial chocolates. **Food Chemistry,** v. 208, p. 177-184, 2006.

ALLEN, T. **Powder Sampling and Particle Size Determination.** 1a edição, Elsevier, 2003.

ALVIM, I.D**. Produção e caracterização de micropartículas obtidas por spray drying e coacervação complexa e seu uso para alimentação de larvas de peixes.** Tese (Doutorado). Universidade estadual de Campinas, 2005.

AGÊNCIA NACIONAL DA VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Portaria nº. 264, de 22 de setembro de 2005. **Regulamento Técnico para Chocolate e Produtos de Cacau**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/5e63cd804745929d9afede3fbc4c6735/RDC_264_2005.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em 17 de ago. 2016.

AROKIYARAJ, S. Free Radical Scavenging And In Vitro Cytotoxicity Activity of Agnuside from *Vitex agnus castus* (*Verbenacae*). **Journal of Pharmacy Research,** v. 5, n. 6, p. 2548–2552, 2012.

ASLANTÜRK, O.S.; ÇELIK, T.A. Antioxidant activity and anticancer effect of Vitex agnus-castus L. (Verbenaceae) seed extracts on MCF–7 breast cancer cells. **International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics**, v. 66, n.3, p.257-267, 2013.

AZIZUDDIN; CHOUDHARY, M. I. Antibacterial, phytotoxic, insecticidal and cytotoxic potential of *Vitex agnus-castus*. **Journal of Medicine Plants Research,** v.5, n.23, p. 5642-5645, 2011.

AZIZUDDIN; MAKHMOOR, T.; CHOUDHARY, M. I. Radical scavenging potential of compounds isolated from - Vitex agnus-castus. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 34, n. 1, p. 119–126, 2010.

AZMIR, J. et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering,** v. 117, n. 4, p. 426–436, 2013.

BAE, E. K.; Lee, S. J. Microencapsulation of avocado oil by spray drying using whey protein and maltodextrin. **Journal of Microencapsulation:** Micro and Nano Carriers, v. 25, p. 549–560, 2008.

BARBOSA, M. I. M. J.; BORSARELLI, C. D.; MERCADANTE, A. Z. Light stability of spray-dried bixin encapsulated with different edible polysaccharide preparations**. Food Research International,** v. 38, p. 989–994, 2005.

BARROS, J. D. et al. Estudo toxicológico pré-clínico agudo e determinação da cl 50 do extrato bruto seco das folhas da Vitex Agnus Castus Linn. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 7, n. 3, p. 62–71, 2010.

BELŠČAK-CVITANOVIĆ, A. et al. Nettle (Urtica dioica L.) extracts as functional ingredients for production of chocolates with improved bioactive composition and sensory properties. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 12, p. 7723–7734, 2015.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70–76, 1996.

BERGER, D. et al. Efficacy of Vitex agnus castus L. extract Ze 440 in patients with pre-menstrual syndrome (PMS). **Archives of gynecology and obstetrics,** v. 264, n. 3, p. 150–153, 2000.

BERNARDI, S. et al. Italian-type salami with propolis as antioxidant. **italian Journal Food Science**, v. 25, p. 433–441, 2013.

BERNSTEIN, A.; NOREÑA, C. P. Z. Encapsulation of red cabbage (Brassica oleracea l. Var. capitata l. f. rubra) anthocyanins by spray drying using different encapsulating agents. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, n. 6, p. 944–952, 2015.

BHUSARI, S. N.; MUZAFFAR, K.; KUMAR, P. Effect of carrier agents on physical and microstructural properties of spray dried tamarind pulp powder. **Powder Technology**, v. 266, n. January 2016, p. 354–364, 2014.

BLOIS, M.S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. **Nature**, v. 181, p. 1199–1200, 1958.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v.28, n.1, p.25-31, 1995.

BRASIL, Portaria n° 398, de 30 de abril de 1999. Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 03 maio. 1999. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=11297&mode=PRINT_VERSION>. Acesso em: 19 maio 2015.

BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H.; TELLER, E. Adsorption of gases in multimolecular layers. **Journal of the American Chemists'Society**, v.60, p.309-319, 1938.

BUDEIRI, D. J.; PO, A. L. W.; DORNAN, J. C. Is Evening Primrose OiI of Value in the Treatment of Premenstrual Syndrome? **Elsevier**, v. 2456, p. 60–68, 1996.

CACACE, J. E.; MAZZA, G. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. **Journal of Food Engineering**, v. 59, p. 379–389, 2003.

CAI, Y.Z.; CORKE, H. Production and properties of spray-dried *Amaranthus* betacyanin pigments. **Journal of Food Science**, v.65, n.6, p.1248-1252, 2000.

CAN KARACA, A.; GUZEL, O.; AK, M. M. Effects of processing conditions and formulation on spray drying of sour cherry juice concentrate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 2, p. 449–455, 2016.

CANO-CHAUCA, M. et al. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.5, n.4, p.420-428, 2005.

CHEN, S. N. et al. Phytoconstituents from Vitex agnus-castus fruits. **Fitoterapia,** v. 82, n. 4, p. 528–533, 2011.

CHEN, Y. T.; KAO, W. T.; LIN, K. W. Effects of pH on the total phenolic compound, antioxidative ability and the stability of dioscorin of various yam cultivars. **Food Chemistry**, v. 107, n. 1, p. 250–257, 2008.

COSSUTA, D. et al. Supercritical fluid extraction of *Vitex agnus castus* fruit. **Journal of Supercritical Fluids,** v. 47, p. 188–194, 2008.

CUJIC, N. et al. Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. **Food chemistry,** v. 194, p.135-142, 2016.

CUVELIER, M.E.; RICHARD, H.; BERSET, C. Comparison of the Antioxidative Activity of Some Acid-phenols: Structure-Activity Relationship. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry,** v. 56, n. 2, p. 324–325, 1992.

DESAI, K.G.H.; PARK, H.J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, v.23, n.7, p.1361-1394, 2005.

DESOBRY, S. A.; NETTO, F. M.; LABUZA, T. P. Comparison of spray-drying, drum-drying and freeze-drying for β-carotene encapsulation and preservation. **Journal of Food Science**, v. 62, p. 1158–1162, 1997.

DIMICK, P.S.; HOSKIN, J. M. Chemico-physical Aspects of Chocolate Processing – A Review. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, v. 14, n. 4, p. 269–282, 1981.

DONG, Z. et al. Morphology and release profile of microcapsules encapsulating peppermint oil by complex coacervation**. Journal of Food Engineering,** v. 104, n.3, p. 455–460, 2011.

DVORACKOVA, E. et al. Effects of extraction methods on the phenolic compounds contents and antioxidant capacities of cinnamon extracts. **Food Science and Biotechnology**, v.24, n.4, p. 1201-1207, 2015.

EFRAIM, P.; ALVES, A.B.; JARDIM, D.C.P. Revisão: Polifenóis em cacau e derivados: teores, fatores de variação e efeitos na saúde. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n. 03, p. 181–201, 2011.

ERSUS, S.; YURDAGEL, U. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier. **Journal of Food Engineering,** v. 80, p. 805–812, 2007.

ESPINOSA-ANDREWS, H. et al. Determination of the gum Arabic-chitosan interactions by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and characterization of the microstructure and rheological features of their coacervates. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 3, p. 541–546, 2010.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY - EMA. Community herbal monograph on *Vitex agnus castus* L . fructus. 2010

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

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

FAZAELI, M. et al. Effect of spray drying conditions and feed composition on the physical properties of black mulberry juice powder. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 4, p. 667–675, 2012.

FERNANDES, R. V. B.; BORGES, S. V.; BOTREL, D. A. Influence of spray drying operating conditions on microencapsulated rosemary essential oil properties | Influência das condições operacionais da secagem por atomização nas propriedades de óleo de alecrim microencapsulado. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 33, n. 1, p. 171–178, 2013.

FERRARI, C.C. et al. Influence of carrier agents on the physicochemical properties of blackberry powder produced by spray drying. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n. 6, p. 1237–1245, 2012.

FERREIRA, V.L.P.; ALMEIDA, T.C.A.; PETTINELLI, M.L.C.V. **Análise Sensorial** – Testes Discriminativos e Afetivos. Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 1ªedição, 127 p., 2000.

FOUST, A.S. et al. **Princípios das operações unitárias**. Editora Guanabara Dois, 1982.

FRIEDMAN, M.; JÜRGENS, H.L. Effect of pH on the Stability of Plant Phenolic Compounds. **Journal of Agriculture & Food Chemestry,** v.48, n.6, p. 2101–2110, 2000.

FUGH-BERMAN, A.; KRONENBERG, F. Complementary and alternative medicine (CAM) in reproductive-age women: a review of randomized controlled trials**. Reproductive toxicology**, v. 17, n.2, p. 137–52, 2003.

FUKAHORI, M. et al. Quality Evaluation of Medicinal Products and Health Foods Containing Chaste Berry (Vitex agnus-castus) in Japanese. **European and American Markets**, v. 62, n. April, p. 379–385, 2014.

GHANNADI, A. et al. Antibacterial activity and composition of essential oils from Pelargonium graveolens L'Her and Vitex agnus-castus L. **Iranian Journal of Microbiology,** v. 4, n. 4, p. 171–176, 2012.

GONG, Z. et al. Spray drying and agglomeration of instant bayberry powder. **Drying Technology**, v.26, n.1, p.116-121, 2008.

GOULA, A.M. et al. Water sorption isotherms and glass transition temperature on spray dried tomato pulp. **Journal of Food Engineering,** v. 85, n.1, p. 73-83, 2008.

GOUIN, S. Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. Trends in **Food Science and Technology**, v. 15, n. 7-8, p. 330–347, 2004.

HANELT, P. **Mansfeld's Encyclopedia of Agricultural and Horticultural Crops** (Except Ornamentals), Springer, Berlin, 2001.

HERAS-RAMÍREZ, M. et al. Effect of blanching and drying temperature on polyphenolic compound stability and antioxidant capacity of apple pomace. **Food and Bioprocess Technology**, p. 1–10, 2011.

HOBERG, E.; MEIER, B.; STICHER, O. Quantitative High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Casticin in the Fruits of *Vitex agnus-castus*. **Pharmaceutical Biology**, v. 39, p. 57-61, 2001.

HOBERG, E.; MEIER, B.; STICHER, O. Quantitative high performance liquid chromatographic analysis of diterpenoids in agni-casti fructus. **Planta Medica**, v. 66, n. 4, p. 352–355, 2000.

HU, Y. et al. Evaluation of the estrogenic activity of the constituents in the fruits of *vitex rotundifoolia* L. for the potential treatment of premenstrual syndrome. **Journal of pharmacy and pharmacology,** v. 59, n.9, p. 1307-1312, 2007a.

HU, Y. et al. Anti-nociceptive and anti-hyperprolactinemia activities of Fructus Viticis and its effective fractions and chemical constituents. Phytomedicine, v. 14, n. 10, p. 668–674, 2007b.

HUANG, M. et al. Identification and quantification of phenolic compounds in *Vitex negundo* L. var. *cannabifolia* (Siebold et Zucc.) Hand.-Mazz. using liquid chromatography combined with quadrupole time-of-flight and triple quadrupole mass spectrometers. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,** v.108, p. 11–20, 2015.

JANG, S. H.; KIM, D.I.L; CHOI, M.-S. Effects and treatment methods of acupuncture and herbal medicine for premenstrual syndrome/premenstrual dysphoric disorder: systematic review. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 14, n. 1, p. 11, 2014.

KUSKOSKI, E. M. et al. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 726–732, 2005.

LABUZA, T.P.; SCHMIDL, M.K. Accelerated shelf-life testing of foods. **Food Technology**, v.39, n.9, p.57-62, 1985.

LAOKULDILOKA, N. et al. Optimisation of microencapsulation of turmeric extract for masking flavor. **Food Chemistry**, v. 194, p. 695–704, 2016.

LATIF, R. Health benefits of cocoa. **Current opinion in clinical nutrition & metabolic care**, v. 16, p. 669-674, 2013.

LATOUI, M. et al. Extraction of phenolic compounds from Vitex agnus-castus L. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 4, p. 748–754, 2012.

LAURITZEN, CH. Et al. Treatment of premenstrual tension syndrome with *Vitex agnus castus* Controlled, double-blind study versus pyridoxine. **Phytomedicine**, v. 4, p. 183-189, 1997.

LOHMAN, M.; HARTEL, R. Effect of milk fat fractions on fat bloom in dark chocolate. **Journal of the American Oil Chemists' Society,** v. 71, p. 267-276, 1994.

MADENE, A. et al. Review Flavour encapsulation and controlled release – a review. **International Journal of Food Science and Technology,** v. 41, p. 1–21, 2006.

MAIA, A.C.C.M.; SOARES, F.C.C.; JUNIOR, M.H.B. *Vitex agnus castus* L : Um Estudo Etnobotânico e Etnofarmacológico. **Revista Virtual de Iniciação Acadêmica da UFPA,** v. 1, n. 2, p. 1–15, 2001.

MALTAŞ, E. et al. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of *vitex agnus castus* L. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 19, n. 12 B, p. 3094–3099, 2010.

MARI, A. et al. Liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of chemical markers and principal component analysis of *Vitex agnus-castus* L. fruits (*Verbenaceae*) and derived food supplements. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 70, p. 224–230, 2012.

MATHON, C. et al. Multi-targeted screening of botanicals in food supplements by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 709–717, 2013.

MEIER, B. et al. Pharmacological activities of *Vitex agnus-castus* extracts in vitro. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 7, n. 5, p. 373–381, 2000.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B. T. **Sensory Evaluation Techniques**, 3rd edition, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, p. 387, 1999.

MICHENER, W. et al. The role of low progesterone and tension as triggers of perimenstrual chocolate and sweets craving: Some negative experimental evidence. **Physiology and Behavior**, v. 67, n. 3, p. 417–420, 1999.

MILLER, K. B. et al. Antioxidant activity and polyphenol and procyanidin contents of selected commercially available cocoa-containing and chocolate products in the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 11, p. 4062–4068, 2006.

MINTEL INTERNATIONAL GROUP. Seminário, Global new product trends and their impact on Latin America. São Paulo, mar. 2007

MINTEL PUBLICATIONS, www.gnpd.com. Conferência de Alimentos e Bebidas funcionais. IQPC. São Paulo, fev. 2007.

MORAES, A.; IKEDA, A. A.; MESQUITA, G. Considerações Sobre Tendências E Oportunidades Dos Alimentos Funcionais Refletions on Trends and Opportunities of Functional Foods. P&D - **Engenharia de Produção,** v. 08, n. 02, p. 1–17, 2010.

MORTOLA, J. F. Premenstrual syndrome. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 87, n. 3, p. 184, 1994.

NASCIMENTO, L.P.; RAFFIN, R. P.; GUTERRES, S.S. Aspectos atuais sobre a segurança no uso de produtos antiperspirantes contendo derivados de alumínio. **Infarma,** v.16, n. 7-8, p. 66-72, 2004.

NORI, M. P. et al. Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. **Food Science and Technology,** v. 44, n. 2, p. 429–435, 2011.

NOVAPRAM. **Alimentos naturais e funcionais conquistam consumidor e indústria.** 22 out. 2015. Disnponível em: < http://www.novaprom.com.br/alimentos-naturais-e-funcionais-conquistam-consumidor-e-industria-no-brasil/>. Acesso em: 25 fev. 2017.

OLIVEIRA, M. I. S. et al. Estabilidade da polpa de morango atomizada utilizando diferentes agentes carreadores. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 16, n. 4, p. 310–318, 2013.

ONEDA, F.; RÉ, M.I. The effect of formulation variables on the dissolution and physical properties of spray-dried microspheres containing organic salts. **Powder Technology**, v. 130, p. 377– 384, 2003.

PRILEPSKAYA, V. N. et al. *Vitex agnus castus*: Successful treatment of moderate to severe premenstrual syndrome. **Maturitas,** v. 55, n.1, p. 55–63, 2006.

QUEK, S. Y.; CHOK, N. K.; SWEDLUND, P. The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders**. Chemical Engineering and Processing**, v. 46, p. 386–392, 2007.

ROCHA, G. A. et al. Microcapsules of a Casein Hydrolysate: Production, Characterization, and Application in Protein Bars. **Food Science and Technology International**, v. 15, n. 4, p. 407–413, 2009.

ROCHA-SELMI, G. A. et al. Microencapsulation of aspartame by double emulsion followed by complex coacervation to provide protection and prolong sweetness. **Food Chemistry**, v.139, p. 72–78, 2013.

SAHIB, H.B.; ALZUBAIDY, A.A.; JASMIN, G. Anti- Angiogenic Activity of *Vitex agnus castus* Methanol Extract in vivo Study. **Iranian Journal of Pharmaceutical Science,** v. 12, n. 1, p. 59-68, 2016.

SALLES, L.G. **Os alimentos funcionais no brasil: uma análise dos produtos registrados com alegações de propriedade funcional e/ou de saúde entre 1999 e 2013.** Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Santa Catarina. 2013.

SARIKURKCU, C. et al. Studies on the antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of *Vitex agnus castus* L. fruits from Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 10, p. 2479–2483, 2009.

SCHELLENBERG, R. et al. Dose-dependent efficacy of the *Vitex agnus castus* extract Ze 440 in patients suffering from premenstrual syndrome. **Phytomedicine**, v. 19, n. 14, p. 1325–1331, 2012.

SCHELLENBERG, R. Treatment for the premenstrual syndrome with *agnus castus* fruit extract: prospective, randomised, placebo controlled study. **BMJ (Clinical research ed.),** v. 322, n. 7279, p. 134–137, 2001.

SCHOLEY, A.; OWEN, L. Effects of chocolate on cognitive function and mood: a systematic review. **Nutrition Reviews**, v. 71, p. 665-681, 2013.

SCHROETER, H.; HEISS, C.; BALZER, J. (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, p. 1024-1029, 2006.

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

SHAKIR, A. A.; AWAD, Z. J. Phytochemical Study of Flavonoid "Casticin" Present in the Fruits of *Vitex agnus-castus* L. Cultivated in Iraq. **Iraqui Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 22, n. 1, p. 104–109, 2013.

SILVA, M. P. et al. Semisweet chocolate as a vehicle for the probiotics *Lactobacillus acidophilus* LA3 and *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis BLC1: Evaluation of chocolate stability and probiotic survival under invitro simulated gastrointestinal conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 640–647, 2017.

Silva, M. C. et al. Use of the jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) depulping residue to produce a natural pigment powder with functional properties. **LWT – Food Science and Technology,** 55, 203–209, 2014.

SILVA, N. K. et al. Influence of shell material on vitamin C content, total phenolic compounds, sorption isotherms and particle size of spray-dried *camu-camu* juice. **Fruits**, v. 68, n. 3, p. 175–183, 2013.

SIM, S. Y. J. et al. Plant polyphenols to enhance the nutritional and sensory properties of chocolates. **Food Chemistry,** v. 200, p. 46–54, 2016.

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

SONI, M. G.; CARABIN, I. G.; BURDOCK, G. A. Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 7, p. 985–1015, 2005.

SOUZA, V.B. et al. Functional properties and stability of spray-dried pigments from Bordo

grape (*Vitis labrusca*) winemaking pomace**. Food Chemistry,** v.164, p. 380–386, 2014.

STOJKOVIC, D. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Vitex agnus-castus* L. fruits and leaves essential oils. **Food Chemistry,** v. 128, n. 4, p. 1017–1022, 2011.

TAN, L. H.; CHAN, L. W.; HENG, P. W. S. Alginate/starch composites as wall material to achieve microencapsulation with high oil loading. **Journal of Microencapsulation**: Micro and Nano Carriers, v. 26, p. 263–271, 2009.

TAN, S. P. et al. Effects of the spray-drying temperatures on the physiochemical properties of an encapsulated bitter melon aqueous extract powder. **Powder Technology**, v. 281, p. 65–75, 2015.

TANAKA, D. L. **Influência da desidratação por spray drying sobre o teor ácido ascórbico no suco de acerola (Malpighia ssp.)**. 2007. 73f. Tese (Mestrado em Alimentos e Nutrição). Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual de São Paulo, Araraquara, 2007.

TIR, R., DUTTA, P.C., BADJAH-HADJ-AHMED, A.Y. Effect of the extraction solvent polarity on the sesame seeds oil composition. **European Journal of Lipid Science and Technology,** v. 114, p. 1427–1438, 2012.

TONON, R. V. **Secagem por atomização do suco de açaí: Influência das variáveis de processo, qualidade e estabilidade do produto.** Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2009.

TONON, R. V. et al. Physicochemical and morphological characterisation of açai (*Euterpe oleraceae Mart*.) powder produced with different carrier agents. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, n. 10, p. 1950–1958, 2009.

TSENG, T.H. et al. *Hibiscus* protocatechuic acid protects against oxidative damage induced by tert-butylhydroperoxide in rat primary hepatocytes. **Chemico-Biological Interactions,** v. 101, n. 2, p. 137-148, 1996.

UTEUSH, Y. U. A.; BOBROVA, A. D.; ROMANENKO, L. R. Fruit and vegetable preservation compsn. - contg. specified domestic herbs as low cost substitutes for imported spices**. Patent SU614785-A,** 1978.

VAN DIE, M. D. et al. *Vitex agnus-castus* extracts for female reproductive disorders: a systematic review of clinical trials**. Planta Medica**, v. 79, p. 562–575, 2013.

VIEIRA, A.H.; FIGUEIRÊDO, R.M.F.; QUEIROZ, A.J.M. Isotermas de adsorção de umidade da pitanga em pó. **Revista de Biologia e Ciências da Terra,** v.7, n.1, p. 11-20, 2007.

WEATHERS, P.J.; TOWLER, M.J. The flavonoids casticin and artemetin are poorly extracted and are unstable in an *Artemisia annua* tea infusion. **Planta Med,** v.78, n.10, p. 1024–1026, 2013.

WEBSTER, D. E. et al. Activation of the δ-opiate receptor by *Vitex agnus-castus* methanol extracts: Implication for its use in PMS. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 2, p. 216–221, 2006.

WOHLFARTH, C. In: HAYNES, W.M. **Handbook of Chemistry and Physics**. CRC Press, Boca Raton, FL, 2014. p. 187–191

WUTTKE, W. et al. Chaste tree (*Vitex agnus-castus*)--pharmacology and clinical indications. **Phytomedicine** : international journal of phytotherapy and phytopharmacology, v. 10, n. 4, p. 348–357, 2003.

XIAO, Z.; LI, W.; ZHU, G. Effect of wall materials and core oil on the formation and properties of styralyl acetate microcapsules prepared by complex coacervation. **Colloid Polymer Science**, v. 293, p.1339–1348, 2015.

ZELLNER, D. A. et al. Chocolate craving and the menstrual cycle. **Appetite**, v. 42, n. 1, p. 119–121, 2004.

Apêndice A – Termo de consentimento livre e esclarecido da Análise Sensorial

Termo de consentimento livre e esclarecido
De acordo com a Resolução Nº 466, de 12 de dezembro de 2012

Consentimento formal de participação no projeto de pesquisa:
"Obtenção, caracterização, encapsulação e aplicação do extrato de vitex (Vitex agnus castus L.)"

Aluna de Pós Graduação responsável: Mariana A. Echalar Barrientos –Eng. de Alimentos – FZEA – USP. Contato: mariechalar@usp.br /Cel: 19 983068005

Nome: _____email: _____

Justificativa: O fruto de vitex (Vitex agnus castus L.) é utilizado como pimenta na gastronomia e seu extrato como medicamento fitoterápico para combater os sintomas da tensão pré-menstrual (TPM), síndrome que acomete a 80 % das mulheres na idade reprodutiva. Este fruto, além de ser aromático e picante, tem um gosto amargo proveniente do alto teor de compostos fenólicos como flavonoides. Assim, para a aplicação do extrato, com vistas à obtenção de um alimento funcional para o público feminino, propõe-se a encapsulação por spray drying para mascarar ou atenuar o seu sabor desagradável. Para aplicação das cápsulas será produzido chocolate meio amargo, pois o chocolate pode complementar e atuar em sinergia, potencializando a eficácia do extrato dos frutos de vitex, pois já foi comprovado que muitas mulheres sentem uma ansiedade descontrolada por comer chocolate, sendo até considerado um sintoma da TPM. Além disso, o chocolate é fonte de magnésio e é rico em compostos fenólicos.

Objetivos do projeto: O objetivo deste trabalho é a encapsulação do extrato concentrado dos frutos maduros e secos de vitex (Vitex agnus castus L.), para mascarar a sensação de ardência e o amargor do mesmo por spray drying, com vistas a sua aplicação no desenvolvimento de chocolate meio amargo com potencial para combater ou reduzir os sintomas da tensão pré-menstrual..

- **Desconfortos e riscos da pesquisa:** Tendo em vista que o extrato de vitex é considerado amargo e pode causar sensação de ardência, é possível que os provadores sintam desconforto ao provar as amostras, já que esses atributos não são desejados. Sugere-se que façam uso da água que será servida juntamente com as amostras a fim de aliviar o desconforto. A European Medicine Agency - EMA (2011) determinou que o extrato dos frutos maduros e secos de vitex (extraído a partir de um solvente 60% etanol m/m) é seguro para a maioria das mulheres em idade fértil, não devendo ser usado durante a gravidez ou lactação. Em geral, os efeitos colaterais são raros, pudendo ser: alergia, dor de cabeça, náusea, diarreia, entre outros.
- **Benefícios da pesquisa:** ao participar da pesquisa o provador estará contribuindo com o desenvolvimento da mesma, bem como ajudando no avanço do tema na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Outras informações:

- O provador poderá procurar a qualquer momento os responsáveis pela pesquisa caso ocorra algum problema decorrente da ingestão das amostras, para que seja dada a assistência adequada.
- O provador pode se recusar a continuar com a avaliação sensorial a qualquer momento, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.
- Serão mantidos o sigilo e a privacidade dos participantes durante todas as fases da pesquisa;
- Os provadores têm o direito a uma cópia do presente termo de consentimento livre e esclarecido.
- Os provadores não terão qualquer tipo de despesas em decorrência da participação nesta pesquisa.
- É garantida a indenização ao participante em caso de eventuais danos decorrentes da participação na pesquisa.
- Os testes para avaliação sensorial de vitex, nos quais os provadores experimentarão os pós constando de extrato de vitex livre e encapsulados, bem como de chocolate contendo as cápsulas desenvolvidas serão acompanhados pela aluna proponente (Mariana Echalar Barrientos).
- Quaisquer outros esclarecimentos poderão ser solicitados antes, durante e após a pesquisa.

Eu, _____, RG _____, CPF _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo **"Obtenção, caracterização, encapsulação e aplicação do extrato de vitex (Vitex agnus castus L.)".**

Tenho pleno conhecimento da justificativa, objetivos, benefícios esperados e dos procedimentos a serem executados, bem como da possibilidade de receber esclarecimentos sempre que considerar necessário. Será mantido sigilo quanto à identificação de minha pessoa e zelo a minha privacidade. Ao mesmo tempo assumo o compromisso de seguir as recomendações estabelecidas pelos pesquisadores.

Eu li e entendi todas as informações contidas neste documento.

Pirassununga, _____ de _____ de _____.

Assinatura: _____

Apêndice B – Questionário de consumo da Análise Sensorial

Nome:_____

Questionário de Consumo

Para complementar os resultados da pesquisa de mestrado que envolve o desenvolvimento de chocolate funcional, gostaríamos de conhecer você, sua opinião e preferência de consumo.

1) Faixa etária: ( ) 17-25 ( ) 26-35 ( ) 36-45 ( ) 46-50
( ) acima de 50

2) Você prefere qual tipo de chocolate?
( ) Amargo ( ) Meio amargo ( ) Ao leite ( ) Branco
( ) Nenhum

3) Com qual frequência você consome chocolate?
( ) Diariamente ( ) Semanalmente ( ) Ocasionalmente
( ) Raramente

4) Você gosta do chocolate meio amargo?
( ) Gosto muito ( ) Gosto pouco ( ) Nem gosto nem desgosto
( ) Desgosto pouco ( ) Desgosto muito

5) Você faz alguma atividade específica para combater os sintomas da tensão pré-menstrual (TPM)? Qual? (Ex: exercícios, dieta diferenciada, remédios, outros)

6) Você consumiria um produto funcional para combater ou atenuar os sintomas da TPM?

7) Qual produto você acredita que seria adequado para brindar a propriedade funcional de combater ou atenuar os sintomas da TPM?

Obrigada!