



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOQUÍMICA



**PAULO LEONARDO MAROTTI SICILIANO**

**COMPARANDO MICROCÁPSULAS DE FRAÇÃO  
ANTIOXIDANTE DE *STEVIA*: AVALIAÇÃO DE  
PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS, ESTABILIDADE,  
BIOACESSIBILIDADE E AVALIAÇÃO ANTIDIABÉTICA**

**Maringá  
2023**

**PAULO LEONARDO MAROTTI SICILIANO**

**COMPARANDO MICROCÁPSULAS DE FRAÇÃO  
ANTIOXIDANTE DE *STEVIA*: AVALIAÇÃO DE  
PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS, ESTABILIDADE,  
BIOACESSIBILIDADE E AVALIAÇÃO ANTIDIABÉTICA**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em  
Bioquímica da Universidade  
Estadual de Maringá para a  
obtenção do grau de Mestre em  
Bioquímica.

**Orientadora: Dra. Paula Gimenez Milani Fernandes**

**Maringá  
2023**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

S566c

Siciliano, Paulo Leonardo Marotti

Comparando microcápsulas de fração antioxidante de *Stevia* : avaliação de parâmetros físico-químicos, estabilidade, bioacessibilidade e avaliação antidiabética / Paulo Leonardo Marotti Siciliano. -- Maringá, PR, 2023.

46 f.: il. color., figs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Paula Gimenez Milani Fernandes.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, 2023.

1. Extrato de *Stevia* - *Stevia rebaudiana* (Bert) Berton. 2. Maltodextrina. 3. Fração em acetato de etila. 4. *Whey protein*. 5. Goma arábica. I. Fernandes, Paula Gimenez Milani, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

CDD 23.ed. 572.565

Ademir Henrique dos Santos - CRB-9/1065

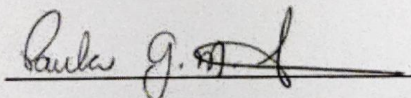
**PAULO LEONARDO MAROTTI SICILIANO**

**COMPARANDO MICROCÁPSULAS DE FRAÇÃO  
ANTIOXIDANTE DE *STEVIA*: AVALIAÇÃO DE  
PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS, ESTABILIDADE,  
BIOACESSIBILIDADE E AVALIAÇÃO ANTIDIABÉTICA**

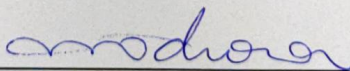
Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em  
Bioquímica da Universidade  
Estadual de Maringá para a  
obtenção do grau de Mestre em  
Bioquímica.

Aprovado em 08/12/2023

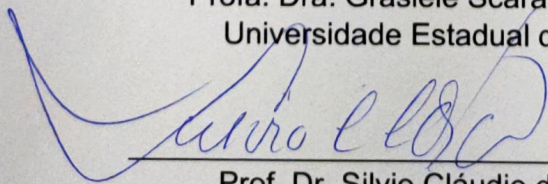
**BANCA EXAMINADORA**



Profa. Dra. Paula G. Milani Fernandes  
Universidade Estadual de Maringá



Profa. Dra. Grasielle Scaramal Madrona  
Universidade Estadual de Maringá



Prof. Dr. Silvio Cláudio da Costa  
Universidade Estadual de Maringá

## **BIOGRAFIA**

Paulo L. M. Siciliano, natural de Maringá-PR, graduado em gastronomia e nutrição pela Universidade Maringá (Unicesumar), no ano de 2022, iniciou o mestrado no Programa de Bioquímica na Universidade Estadual de Maringá (UEM).

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que contribuíram de maneira significativa para a realização deste trabalho. Este projeto não teria sido possível sem o apoio e a orientação valiosa de diversos indivíduos, aos quais dedico esta seção de agradecimentos.

Em primeiro lugar, expresso minha profunda gratidão a minha orientadora, Dra. Paula Gimenez Milani Fernandes, pela orientação paciente, conselhos sábios e apoio constante ao longo de todo o processo de pesquisa. Sua experiência e dedicação foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Ela acreditou em mim, mesmo quando muitas vezes, eu não acreditava.

Agradeço também à minha família pelo constante incentivo e compreensão durante os momentos desafiadores deste percurso acadêmico. Seu apoio incondicional foi meu pilar e fonte de motivação.

Às minhas amigas e colegas de pesquisas, agradeço por compartilharem ideias, experiências e por proporcionarem um ambiente enriquecedor de aprendizado. Sem o apoio de amigas como: Ma. Letícia, Natani, Betânia, Dra. Maria Rosa, Milena, Antônio Sergio, Maria Beatriz Bornia e Giovana Pozza, não teria conseguido. Cada interação e companheirismo contribuiu para o amadurecimento e enriquecimento pessoal e profissional;

Por fim, dedico este agradecimento a todos que, direta ou indiretamente, influenciaram positivamente minha jornada acadêmica. Essa dissertação é o resultado de um esforço coletivo, e estou profundamente grato por fazer parte dessa família de aprendizado.

Que este trabalho contribua, de alguma forma, para o avanço do conhecimento na área, assim como todos vocês contribuíram para o meu crescimento como estudante e pesquisador.

Muito obrigado.

Paulo L. M. Siciliano

## APRESENTAÇÃO

O presente trabalho foi realizado no Núcleo de Estudos em Produtos Naturais (NEPRON), no Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual de Maringá (UEM). A presente dissertação está apresentada no formato de artigo científico original, em consonância com as regras do Programa de Pós-graduação em Bioquímica da UEM

Artigo:

Paulo Leonardo Marotti Siciliano, Cynthia Letícia Serra. Cabeça, Natani Caroline Nogueira, Betanea Campangolli Pereira, Milena Kazue Enokida, Adan Rodrigues de Oliveira, Pauline Godoi Silva, Marcos Antonio Matiucci, Maria Rosa Trentin Zorzenon, Antonio Sergio Dacome, Felipe de Oliveira Souza, Eduardo Jorge Pilau, Silvio Claudio da Costa, Paula Gimenez Milani Fernandes. **Comparing microcapsules of Antioxidant fraction of Stevia: evaluation of physicochemical parameters, stability, bioaccessibility, and antidiabetic evaluation.** Food chemistry, submetido.

# SUMÁRIO

## Sumário

|                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Introdução .....                                                                                                     | 13 |
| 2. Materiais e métodos .....                                                                                            | 15 |
| 2.1. Amostras e reagentes .....                                                                                         | 15 |
| 2.2. Obtenção da Fração Antioxidante de Stevia UEM-13 (FAS) .....                                                       | 15 |
| 2.3. Identificação de compostos bioativos (UHPLC MS/MS) .....                                                           | 16 |
| 2.4. Microencapsulação .....                                                                                            | 17 |
| 2.4.1. <i>Eficiência de microencapsulação, solubilidade, umidade, higroscopicidade e cor e atividade de água.</i> ..... | 18 |
| 2.4.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....                                                                  | 19 |
| 2.5. Estabilidade e preservação dos compostos bioativos de interesse .....                                              | 19 |
| 2.6. Cor .....                                                                                                          | 20 |
| 2.7. Digestão simulada <i>in vitro</i> .....                                                                            | 20 |
| 2.8. Avaliação da atividade antidiabética <i>in vitro</i> .....                                                         | 21 |
| 2.8.1. <i>Inibição de <math>\alpha</math>-amilase</i> .....                                                             | 21 |
| 2.8.2. <i>Inibição de <math>\alpha</math>-glicosidase</i> .....                                                         | 21 |
| 2.9. Análise estatística .....                                                                                          | 22 |
| 3. Resultados .....                                                                                                     | 22 |
| 3.1. Microencapsulação de FAS .....                                                                                     | 22 |
| 3.1.1. <i>Eficiência de microencapsulação, solubilidade, umidade, higroscopicidade e atividade de água.</i> .....       | 1  |
| 3.2. Cor .....                                                                                                          | 4  |
| 3.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....                                                                    | 6  |
| 3.4. Estabilidade .....                                                                                                 | 8  |
| 3.5. Análise de estabilidade dos compostos fenólicos e atividade antioxidante e digestão simulada <i>in vitro</i> ..... | 12 |
| 3.6. Inibição das enzimas $\alpha$ -amilase e $\alpha$ -glicosidase .....                                               | 16 |
| 4. Conclusão .....                                                                                                      | 16 |
| 5. Referências .....                                                                                                    | 18 |

## RESUMO GERAL

A fração antioxidante de *Stevia rebaudiana*, com importante potencial antidiabético é pouco solúvel e tem baixa estabilidade, o que dificulta sua aplicabilidade. Este trabalho obteve a fração, caracterizou-a por UHPLC-MS/MS e microencapsulou esta fração com as matrizes maltodextrina e goma arábica, isoladas e combinadas, whey protein + maltodextrina e whey protein + goma arábica. Foram avaliados estabilidade e capacidade antioxidante ao longo de 30 dias, parâmetros físico-químicos, preservação de compostos bioativos por digestão e ainda atividade antidiabética *in vitro*. A microcápsula com goma arábica apresentou melhor eficiência de microencapsulação, enquanto sua versão com maltodextrina proporcionou aumento da solubilidade. A microencapsulação reduziu a umidade e atividade de água nas microcápsulas, exceto a goma arábica. A matriz da mistura de maltodextrina com whey protein mostrou maior luminosidade e um pó mais branco. As matrizes com maltodextrina e com sua mistura com goma arábica mantiveram os compostos fenólicos estáveis por 30 dias. A microencapsulação com o whey protein produziu um aumento da atividade antioxidante após 15 dias do processo, e durante a digestão *in vitro*. Todas as amostras apresentaram uma inibição de 96% da enzima  $\alpha$ -glicosidase e somente a microcápsula com maltodextrina inibiu  $\alpha$ -amilase (58%). Este estudo mostrou resultados importantes para que efetivamente a fração antioxidante de *Stevia* possa ser um produto adjuvante na prevenção e no tratamento do diabetes.

**Palavras-chaves:** extrato de *Stevia*; fração em acetato de etila; goma arábica; maltodextrina; whey protein.

## GENERAL ABSTRACT

The antioxidant fraction of *Stevia rebaudiana*, with paramount antidiabetic potential, is poorly soluble and has low stability, making its applicability difficult. In this research, we obtained the Stevia fraction and then characterized it by UHPLC-MS/MS. Besides, we microencapsulated it with the matrices maltodextrin and gum arabic, both isolated and combined with whey protein. Then, we evaluated their stability and antioxidant capacity over 30 days, physicochemical parameters, preservation of bioactive compounds through digestion, and antidiabetic activity *in vitro*. The microcapsule with gum arabic showed better microencapsulation efficiency, while its version with maltodextrin provided increased solubility. Microencapsulation reduced the humidity and water activity in the microcapsules, except for the ones with gum arabic. Maltodextrin + whey protein showed greater luminosity and a whiter powder. The matrices with maltodextrin and the ones with gum arabic kept the phenolic compounds stable for 30 days. Microencapsulation with whey protein increased antioxidant activity after 15 days of process and during digestion *in vitro*. All samples showed 96% inhibition of the  $\alpha$ -glucosidase enzyme, and only the microcapsule with maltodextrin inhibited  $\alpha$ -amylase (58%). This study showed relevant results so that the antioxidant fraction of Stevia may be an adjuvant product to prevent and treat diabetes.

**Keywords:** Stevia extract; ethyl acetate fraction; gum arabic; maltodextrin; whey protein.

# **Comparando microcápsulas de fração antioxidante de *Stevia*: avaliação de parâmetros físico-químicos, estabilidade, bioacessibilidade e avaliação antidiabética**

## **Autores**

Paulo Leonardo Marotti Siciliano<sup>1,2</sup>; e-mail: [pg404324@uem.br](mailto:pg404324@uem.br); ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0441-350X>  
Cynthia Letícia Serra. Cabeça<sup>1,2</sup>; E-mail: [pg55300@uem.br](mailto:pg55300@uem.br) and [leticiascabeca@gmail.com](mailto:leticiascabeca@gmail.com); ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9303-8643>  
Natani Caroline Nogueira<sup>1,2</sup>; e-mail: [pg404323@uem.br](mailto:pg404323@uem.br); ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-2248-7979>  
Betanea Campangolli Pereira<sup>2</sup>; e-mail: [ra117285@uem.br](mailto:ra117285@uem.br) and [betanea20111@gmail.com](mailto:betanea20111@gmail.com); ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-0229-5642>.  
Milena Kazue Enokida<sup>2</sup>; e-mail: [ra126833@uem.br](mailto:ra126833@uem.br); ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-0229-5642>  
Adan Rodrigues de Oliveira<sup>5</sup>; e-mail: [adanrodrigues1998@gmail.com](mailto:adanrodrigues1998@gmail.com); ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4948-1509>  
Pauline Godoi Silva<sup>4</sup>; email: [pauline.godoi@gmail.com](mailto:pauline.godoi@gmail.com); ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2473-479X>  
Marcos Antonio Matiucci<sup>3</sup>; e-mail: [m.matiucci@hotmail.com](mailto:m.matiucci@hotmail.com); ORCID: <https://orcid.org/my-orcid?orcid=0000-0003-2053-2679>  
Maria Rosa Trentin Zorzenon<sup>2</sup>; e-mail: [mrtzorzenon@uem.br](mailto:mrtzorzenon@uem.br) and [mariarosazorzenon@hotmail.com](mailto:mariarosazorzenon@hotmail.com); ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1080-8911>  
Antonio Sergio Dacome<sup>2</sup>; e-mail: [asdacome@uem.br](mailto:asdacome@uem.br); ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2363-3439>  
Felipe de Oliveira Souza<sup>3</sup>; e-mail: [oliveirasouza.felipe@gmail.com](mailto:oliveirasouza.felipe@gmail.com); ORCID: <https://orcid.org/my-orcid?orcid=0009-0006-8736-4895>  
Eduardo Jorge Pilau<sup>3</sup>; e-mail: [ejpilau@uem.br](mailto:ejpilau@uem.br); ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9175-3520>  
Silvio Claudio da Costa<sup>1,2</sup>; e-mail: [sccosta@uem.br](mailto:sccosta@uem.br); ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9002-3000>  
\*Paula Gimenez Milani Fernandes<sup>1,2</sup>; e-mail: [pgmfernandes2@uem.br](mailto:pgmfernandes2@uem.br); ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0851-6872>

## **Affiliations**

<sup>1</sup> Postgraduate Program in Biochemistry, Biochemistry Department, Biological Sciences Center, State University of Maringá (UEM), Maringá – Paraná, Brazil, Av. Colombo, 5790 – Jardim Universitário, Maringá, Paraná, Brasil – CEP: 87020-900;

<sup>2</sup> Biochemistry Department, State University of Maringá (UEM), Maringá – Paraná, Brazil, Av. Colombo, 5790 – Jardim Universitário, Maringá, Paraná, Brasil – CEP: 87020-900;

<sup>3</sup> Chemistry Department, State University of Maringá (UEM), Maringá – Paraná, Brazil, Av. Colombo, 5790 – Jardim Universitário, Maringá, Paraná, Brasil – CEP: 87020-900;

<sup>4</sup> Postgraduate Program in Food Science, Center for Agricultural Sciences, State University of Maringá (UEM), Maringá – Paraná, Brazil, Av. Colombo, 5790 – Jardim Universitário, Maringá, Paraná, Brasil – CEP: 87020-900.

<sup>5</sup> Postgraduate Program in Genetics and Molecular Biology, Federal University of Pará

(UFPA). Rua Augusto Corrêa, 01 - University Campus of Guamá, Belém, Pará, Brazil – CEP: 660750-110

**\*Corresponding author:** pgmfernandes2@uem.br; +55(44)3011-4397.

### **Lista de Abreviaturas**

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

BHT – Butil-Hidroxi-Tolueno

DPPH – Radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

FAS – Fração antioxidante de Stevia UEM-13

HPLC - High-performance liquid chromatography

MFASET - Fração antioxidante de Stevia do extrato etanólico microencapsulada

EAG – Equivalente de Ácido Gálico

EQ - Equivalente de Quercetina

REB - Rebaudiosídeo

Trolox - 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid

FMD: Fração microencapsulada com Maltodextrina

FGA: Fração microencapsulada com Goma Arábica

FMDGA: Fração microencapsulada com Maltodextrina e Goma Arábica

FMDW: Fração microencapsulada com Maltodextrinae Whey protein

FGAW: Fração microencapsulada com Goma Arábica e Whey protein

WP: Whey protein

## Resumo

A fração antioxidante de *Stevia rebaudiana*, com importante potencial antidiabético é pouco solúvel e tem baixa estabilidade, o que dificulta sua aplicabilidade. Este trabalho obteve a fração, caracterizou-a por UHPLC-MS/MS e microencapsulou esta fração com as matrizes maltodextrina e goma arábica, isoladas e combinadas, whey protein + maltodextrina e whey protein + goma arábica. Foram avaliados estabilidade e capacidade antioxidante ao longo de 30 dias, parâmetros físico-químicos, preservação de compostos bioativos por digestão e ainda atividade antidiabética *in vitro*. A microcápsula com goma arábica apresentou melhor eficiência de microencapsulação, enquanto sua versão com maltodextrina proporcionou aumento da solubilidade. A microencapsulação reduziu a umidade e atividade de água nas microcápsulas, exceto a goma arábica. A matriz da mistura de maltodextrina com whey protein mostrou maior luminosidade e um pó mais branco. As matrizes com maltodextrina e com sua mistura com goma arábica mantiveram os compostos fenólicos estáveis por 30 dias. A microencapsulação com o whey protein produziu um aumento da atividade antioxidante após 15 dias do processo, e durante a digestão *in vitro*. Todas as amostras apresentaram uma inibição de 96% da enzima  $\alpha$ -glicosidase e somente a microcápsula com maltodextrina inibiu  $\alpha$ -amilase (58%). Este estudo mostrou resultados importantes para que efetivamente a fração antioxidante de *Stevia* possa ser um produto adjuvante na prevenção e no tratamento do diabetes.

Palavras-chaves: extrato de *Stevia*; fração em acetato de etila; goma arábica; maltodextrina; whey protein.

## 1. Introdução

A *Stevia rebaudiana*, conhecida por seus glicosídeos de esteviol com propriedades de conferir sabor doce, tem sido objeto de estudo, não apenas por esses compostos, mas também pelos seus metabólitos bioativos. Durante o processo de extração e purificação para a produção de adoçantes, são produzidos extratos e frações como subprodutos, que podem conter compostos bioativos com notáveis propriedades funcionais. Além disso, as folhas de estêvia podem ser submetidas a diversos métodos de extração, os quais também resultam em extratos com potencial funcional (Milani et al., 2017a; Molina-Calle et al., 2016; Cabeça et al., 2023).

Uma fração antioxidante obtida a partir do fracionamento do extrato metanólico de folhas de estêvia, a FAS, apresentou importante capacidade antioxidante, e sua avaliação como uma possível adjuvante do tratamento do diabetes mellitus mostrou que animais suplementados com a FAS tiveram redução da hiperglicemia e uma melhora nos parâmetros metabólicos, com restauração de parte da função pancreática, recuperando a secreção de insulina, principalmente quando a concentração plasmática de glicose nos animais estudados era elevada (Milani et al., 2017b; Piovan et al., 2018; Milani et al., 2020). Melhores resultados foram observados quando adicionamos a FAS a um suplemento proteico (whey protein).

Um dos problemas em aplicar as frações amargas ou provenientes de subprodutos do processamento de obtenção e purificação de adoçantes de *Stevia rebaudiana*, como a FAS, em alimentos ou bebidas, são a reduzida solubilidade e estabilidade dos compostos bioativos. Cabeça et al., (2023) microencapsulou a FAS usando como matriz a maltodextrina. A eficiência de microencapsulação foi de 84% e proporcionou um aumento expressivo da solubilidade, e ainda mostrou potencial antidiabético testado *in vitro*. No entanto, melhores resultados podem ser alcançados variando os parâmetros do

processo.

A microencapsulação é um processo que basicamente consiste em incorporar substâncias em uma matriz para aumentar sua solubilidade, estabilidade e aplicação. Entre os métodos comumente utilizados para este fim está a secagem/microencapsulação por spray. A secagem por spray é o método físico mais amplamente aplicado nas indústrias farmacêutica e alimentícia, pois os compostos fenólicos são facilmente encapsulados e sua bioatividade pode ser preservada (Chen et al., 2019). Várias substâncias podem ser usadas como agente microencapsulante (matriz) e a sua escolha determina um encapsulamento eficiente. Em produtos alimentícios, as maltodextrinas, alginatos, ciclodextrinas, amido, gelatina, e gomas podem ser usados (Zorzenon et al., 2019).

As maltodextrinas (MD) são polímeros de açúcar amplamente utilizados pois não apresentam toxicidade, são bastante solúveis e produzem ótimos resultados como agente encapsulante, pois não apresentam influência sensorial no produto final. Alguns autores ainda demonstram que as MDs são ótimas para manter a estabilidade dos compostos encapsulados e conferem uma proteção importante para a microcápsula (Romanini et al., 2023). Goma arábica é um polímero acessível e de baixo custo, muito utilizado sozinho ou em misturas como agente encapsulante. Whey protein tem mostrado bons resultados como agente de microencapsulação, especialmente quando misturados, em diferentes proporções com maltodextrina ou gomas (Mahid et al., 2019).

Este estudo obteve a FAS, realizou sua caracterização, identificando os principais compostos fenólicos, flavonóides e glicosídeos de esteviol por UHPLC-MS/MS. Realizamos a microencapsulação desta fração antioxidante de *Stevia* (FAS) formulada com maltodextrina (MD), Goma arábica (GA) e misturas de MD, GA e whey protein (W). Avaliamos a eficiência de microencapsulação, estabilidade desses compostos e da

capacidade antioxidante ao longo de 30 dias. Comparamos os parâmetros físico-químicos de cor, solubilidade, higroscopicidade, atividade de água e umidade; realizamos microscopia eletrônica de varredura e ainda avaliamos a preservação dos compostos bioativos e da capacidade antioxidante pela digestão simulada *in vitro*. Teste de capacidade antidiabética *in vitro* também foi realizado.

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1. Amostras e reagentes**

As plantas de *Stevia rebaudiana* da variedade Stevia UEM-13 foram cultivados no Núcleo de Estudos em Produtos Naturais - NEPRON, localizado na Universidade Estadual de Maringá - UEM (23°24'21.2"S 51°56'21.8"W). A coleta das plantas foi realizada nas mesmas condições descritas por Formigoni et al., (2018).

Todos os solventes e amostras são de grau analítico ou HPLC-MS. Etanol absoluto, metanol, hexano, clorofórmio, acetato de etila (99.9%) são da Merck (Londrina, Paraná, Brasil). Água deionizada (18 MΩ·cm) do Milli-Q plus system foram adquiridos da empresa Induslab (Londrina, Paraná, Brasil). Todos os compostos de referência foram fornecidos por Sigma-Aldrich (Brasil). Whey protein, com 90% de proteínas do soro do leite, foi cedido pela empresa NUTRATEC – Tecnologia em Nutrientes Ltda, – Indústria Brasileira; 26, Alexandre Villa Street, Recreio Anhanguera, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil). A maltodextrina (DE 10) foi gentilmente cedida pela Ingredion Incorporated. A goma arábica é da marca Sinth.

### **2.2. Obtenção da Fração Antioxidante de Stevia UEM-13 (FAS)**

A metodologia utilizada foi a descrita por Milani et al. (2017a). Basicamente a metodologia consiste em fracionar o extrato metanólico obtido de folhas de Stevia UEM-13 em aparato *sohxlet*, usando uma sequência de solventes, de diferentes polaridades

(hexano, clorofórmio e acetato de etila). A fração obtida em acetato de etila foi caracterizada e posteriormente microencapsulada para ser avaliada. O processo foi repetido várias vezes e por não apresentar diferenças significativas em nenhuma etapa, nem em relação ao rendimento e nem quanto ao teor de compostos bioativos totais e edulcorantes, todas as frações foram reunidas para posterior microencapsulação.

### **2.3. Identificação de compostos bioativos (UHPLC MS/MS)**

A fração foi submetida a análises usando UHPLC MS/MS para identificação dos compostos fenólicos, flavonóides e glicosídeos de esteviol. As amostras foram inseridas por injetor automático em um sistema de separação cromatográfica UHPLC (Shimadzu, modelo Nexera X2), contendo um sistema binário de bombas (A e B). O UHPLC foi acoplado a um espectrômetro de massas (Bruker, modelo Impact II) de alta resolução com fonte de ionização por Electrospray e analisadores Quadrupolo (Q) e Tempo de voo (TOF). O espectrômetro de massas (QTOF) foi calibrado com solução de formiato de sódio 1 mM sendo a aquisição dos espectros de MS realizada em modo positivo e modo negativo com obtenção de espectros de MS/MS no modo scan para os íons mais intensos na faixa de 50 a 1300 m/z.

Para a separação das moléculas contidas nas amostras foi utilizada uma coluna cromatográfica do tipo C18. Foram injetados 3 µL de cada amostra, com a temperatura do forno cromatográfico ajustada para 40 °C. A fase móvel ligada a bomba A do UHPLC continha água ultrapura com 0,1% de ácido fórmico, a fase móvel ligada a bomba B continha metanol (MeOH) com 0,1% de ácido fórmico, estas em fluxo contínuo de 0,250 mL/minuto em eluição por gradiente. Na análise em modo negativo apenas a fase A continha ácido fórmico. No início da corrida cromatográfica até 2 minutos a fase móvel B ficou em 5%, de 2 a 5 minutos 30% de B, de 5 a 10 minutos 70% de B, de 10 a 20

minutos 90% de B, de 20 a 30 minutos 95% de B e de 30 a 35 minutos a reconstituição da coluna com 5% da fase B. O cromatograma iônico e os espectros MS e MS/MS obtidos foram visualizados com o software DataAnalysis 4.1, comparados com a literatura e analisados por bancos de dados de espectrometria de massa de acesso aberto, como Massbank e Human Metabolome Database.

#### 2.4. Microencapsulação

As microencapsulações das frações foram realizadas de acordo com Zorzenon et al., (2019), Mahdi et al., (2020) e Cabeça et al., (2023), com adaptações. Os materiais de parede escolhidos neste estudo tiveram ótimos resultados para microencapsulação de diferentes materiais. As formulações foram: 1) FMD (matriz maltodextrina 100%); 2) FGA (matriz goma arábica 100%); 3) FMDGA (matriz maltodextrina 50%+goma arábica 50%); 4) FMDW (matriz maltodextrina 50%+whey protein 50%) e 5) FGAW (matriz goma arábica 50%+ whey protein 50%), conforme **tabela 1 (arquivo suplementar)**. Whey protein não foi usado individualmente pois estudos mostram que quando combinado com outras matrizes os resultados parecem ser superiores (Plati & Paraskevopoulou, 2023).

**Tabela 1. Formulações da fração de Stevia UEM-13 microencapsuladas**

| Nº | Formulação | Maltodextrina (%) | Goma Arábica (%) | Whey Protein (%) |
|----|------------|-------------------|------------------|------------------|
| 1  | FMD        | 100               | 0                |                  |
| 2  | FGA        | 100               | 0                |                  |
| 3  | FMDGA      | 50                | 50               |                  |
| 4  | FMDW       | 50                | 0                | 50               |
| 5  | FGAW       | 0                 | 50               | 50               |

FMD: Fração Microencapsulada com Maltodextrina; FGA: Fração Microencapsulada com Goma Arábica; FMDGA: Fração Microencapsulada com Maltodextrina e Goma Arábica; FMDW: Fração Microencapsulada com Maltodextrina e Whey protein; FGAW: Fração microencapsulada com Goma

Arábica e Whey protein.

Para a preparação de cada solução, amostras contendo o pó da fração, foram primeiramente dissolvidas em etanol (10% p/v) e o pó de cada veículo (goma arábica, maltodextrina, whey protein ou a mistura de um deles), conforme a tabela 1, foi dissolvido em água (4g/100mL). Após completa dissolução, separadamente, as soluções foram homogeneizadas em agitador (Etica Equip. Cient.- 430) a 200 rpm, 15 min. Em seguida, secou-se a mistura em mini *Spray Dryer* (B-191, Buchi, 4 Bar, 500 mL/h), com temperatura de entrada e saída de 130 e 87 °C, respectivamente. As microcápsulas obtidas foram armazenadas em frascos âmbar e mantidas em dessecador até posterior análise.

*2.4.1. Eficiência de microencapsulação, solubilidade, umidade, higroscopicidade e cor e atividade de água.*

A eficiência de microencapsulação, expressa em porcentagem, foi calculada segundo a equação descrita por Mahdi et al., (2020).

$$\begin{aligned} & \text{Eficiência de encapsulação (\%)} \\ &= \left(1 - \frac{\text{teor de fenólicos na superfície da microcápsula}}{\text{teor total de fenólicos na microcápsula}}\right) \times 100 \end{aligned}$$

**Equação 1**

A solubilidade foi realizada na fração livre e nas microencapsulas de acordo com Chranioti e Tzia. (2016), equação (2).

$$\text{Solubilidade (\%)} = \frac{\text{Peso d pó (g) no sobrenadante}}{\text{Peso do pó (g) na solução}} \times 100$$

**Equação 2**

O teor de umidade das frações livre e das microencapsulas foi determinado por secagem em estufa a 105 °C até peso constante, conforme metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2005). A fração livre e as microencapsuladas também foram avaliadas quanto à sua higroscopicidade. As amostras foram distribuídas uniformemente sobre placas de

Petri e em seguida mantidas em dessecador a 25°C com umidade relativa de 75% gerada por solução saturada de NaCl. As amostras foram pesadas diariamente até que a massa foi constante. O aumento de peso foi determinado e a higroscopicidade foi analisada por miligramas de água absorvida por grama de amostra, e posteriormente convertida e expressa em porcentagem Chranioti et al., (2016).

A atividade de água (Aa) foi determinada nas amostras à temperatura ambiente (25 °C), utilizando o aparelho Aqualab 4TE (Meter Group, EUA).

#### **2.4.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

A fração livre e as frações microencapsuladas foram mantidas por aproximadamente 48 horas em recipientes hermeticamente fechados, contendo sílica, para garantir a absorção total da umidade. As amostras secas foram fixadas em um suporte metálico com fita dupla-carbono e recobertas com uma fina camada de ouro, seguida de metalização. A visualização morfológica foi realizada no Complexo do Centro de Apoio à Pesquisa da Universidade Estadual de Maringá (COMCAP), utilizando um microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6060 LV, operando a 10 kV de tensão de excitação, utilizando incrementos de 100 a 1.500 vezes para visualização.

#### **2.5. Estabilidade e preservação dos compostos bioativos de interesse**

O teor de compostos fenólicos, flavonoides e a capacidade antioxidante foram avaliados na fração livre (FAS) e em cada formulação de microencapsulação (FMD, FGA, FMDGA, FMDW e FGAW) com o objetivo de avaliar a estabilidade desses compostos bioativos e de sua atividade antioxidante ao longo de 30 dias. Para a realização da análise, as amostras foram armazenadas ao abrigo da luz e a temperatura de 4°C. O experimento foi realizado conforme metodologia descrita a seguir.

Compostos fenólicos totais foram quantificados segundo metodologia de Ahmad et al. (2018). A quantificação dos flavonoides foi determinada segundo Jia, Tang e Wu (1999). A capacidade antioxidante *in vitro* foi determinada pela capacidade de sequestro do radical DPPH de acordo com o método de Ahmad et al. (2018) e foram expressos mg/g, ou de sequestro ABTS+, que avalia a capacidade sequestrante desses radicais por metodologia descrita por Rufino et al. (2008), com adaptações.

## **2.6. Cor**

A análise foi realizada na Central Analítica Multiusuário de Medianeira – CEANMED – na Universidade Tec. Federal do Paraná, campus de Medianeira, Paraná, Brasil. A cor foi avaliada neste estudo com o objetivo de aplicar as microcápsulas em diferentes alimentos e bebidas. O método de análise segundo metodologia AACC 14-22 (AACC, 2000). As cores das amostras foram determinadas utilizando o colorímetro portátil Konica Minolt (CR/400/410 - Sensing, INC- Japão), o qual foi calibrado com placa de porcelana branca. Foi utilizado o iluminante D65.

Onde, L representa a luminosidade ( $L^* = 0$  é preto e  $L^* = 100$  claridades total). As coordenadas que indicam a direção das cores são:  $+a^*$  = vermelho e  $-a^*$  = verde;  $+b^*$  = amarelo e  $-b^*$  = azul. Além destas coordenadas de cores, também foi realizada a leitura dos parâmetros de cor como o valor de croma  $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ , que representa a pureza da cor, e a medida do ângulo  $h^* = \text{tg}^{-1}(b^*/a^*)$ , que representa a tonalidade da cor.

## **2.7. Digestão simulada *in vitro***

Para este teste foi avaliada a fração livre em comparação com as frações microencapsuladas com o intuito de testar a biodisponibilidade de compostos fenólicos e a evolução da atividade antioxidante durante a digestão *in vitro* simulando condições de

boca, estômago e intestino, seguindo o método de Ahmad et al. (2018).

## **2.8. Avaliação da atividade antidiabética *in vitro***

### **2.8.1. Inibição de $\alpha$ -amilase**

Apesar de não reproduzir fielmente um sistema biológico, as análises de inibição *in vitro* utilizando as enzimas como amilases e glicosidases indicam o potencial de uma substância, extrato ou fração de ser avaliada *in vivo* como uma possível adjuvante da síndrome do diabetes mellitus. Seguindo a metodologia de Apostolidis, Kwon e Shetty (2007) foi avaliada a inibição da enzima  $\alpha$ -amilase. Testamos concentrações de amido variando de (2-20 mg/mL), bem como diferentes concentrações das amostras (0,1; 0,5 e 2 mg/mL). Ainda uma curva de inibição foi traçada com a acarbose (0,1-2mg/mL), inibidor padrão dessas enzimas. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm e os resultados foram calculados usando uma curva padrão de maltose (0-10 mg/mL) e expressos por porcentagem de inibição.

### **2.8.2. Inibição de $\alpha$ -glicosidase**

A fração livre e as microencapsuladas foram preparadas na concentração de 0,5 mg/ml em metanol e testadas para a inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase *in vitro* de acordo com Natsir et al., (2018). pNPG foi utilizado como substrato e  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  usado para interromper a catálise. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição (equação 3).

$$\% \text{ Inibição} = \frac{\text{Absorbância (Controle)} - \text{Absorbância (Amostra)}}{\text{Absorbância (Controle)}} \times 100$$

**(Equação 3)**

## 2.9. Análise estatística

Todos os testes foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida de teste de Tukey com significância estabelecida em  $p < 0,05$ . Foram usados programas estatísticos como *GraphPadPrism* e R 4.3.2 (R Core Team, 2023).

## 3. Resultados

### 3.1. Microencapsulação de FAS

Milani et al., (2017a), Milani et al., (2017b) e Zorzenon et al., (2019) realizaram a análise de identificação de compostos bioativos na FAS por LC-MS/MS, e identificaram principalmente os seguintes compostos: ácido cafeico, quercetina-3-o-glicosídeo, cianidina-3-glicosídeo, kaempferol, quercetina, apigenina, ácido rosmarínico, ácido clorogênico e ácido dicafeoilquínico. Buscando maior precisão e identificação a FAS obtida neste estudo foi submetida a análise de UHPLC MS/MS e os compostos identificados estão mostrados na **tabela 2 (arquivo suplementar)**.

Tabela 2. Identificação de Compostos e Parâmetros Chave de Identificação por FAS UHPLC-MS/MS

| Metabólito                                          | Grupo | Adduct |                                                 | TR    | m/z    | Massa real | Erro (ppm) |
|-----------------------------------------------------|-------|--------|-------------------------------------------------|-------|--------|------------|------------|
| Quercetin-3- <i>O</i> -deoxyhexosyl-(1-2)-pentoside | F     | [M-H]- | C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>15</sub> | 15.91 | 580,14 | 579,13     | 1,20       |
| Kaempferol-3- <i>O</i> -pentoside                   | F     | [M-H]- | C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub> | 16.74 | 418,08 | 417,08     | 0,71       |
| Quercetin-3- <i>O</i> -deoxyhexoside                | F     | [M-H]- | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub> | 16.58 | 448,1  | 447,09     | 0,67       |
| Steviolbioside                                      | GE    | [M-H]- | C <sub>32</sub> H <sub>50</sub> O <sub>13</sub> | 21.55 | 642,32 | 641,31     | 0,46       |
| Rebaudioside G                                      | GE    | [M-H]- | C <sub>38</sub> H <sub>60</sub> O <sub>18</sub> | 19.98 | 804,37 | 803,36     | 0,12       |
| Rebaudioside C                                      | GE    | [M-H]- | C <sub>44</sub> H <sub>70</sub> O <sub>22</sub> | 20.43 | 950,43 | 949,42     | 0          |
| Rebaudioside A                                      | GE    | [M-H]- | C <sub>44</sub> H <sub>70</sub> O <sub>23</sub> | 19.91 | 966,43 | 965,42     | -1,34      |
| Feruloyl Caffeoylequinic acid                       | CF    | [M-H]- | C <sub>26</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub> | 16.30 | 530,14 | 529,13     | -1,51      |
| Chlorogenic acid                                    | CF    | [M-H]- | C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>  | 14.83 | 354,09 | 353,08     | 0          |
| Quercetin-3- <i>O</i> -deoxyhexosyl-(1-6)-hexoside  | F     | [M-H]- | C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub> | 16.08 | 610,15 | 609,14     | -0,49      |
| Quercetin-3- <i>O</i> -hexoside                     | F     | [M-H]- | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub> | 16.09 | 464,09 | 463,08     | -0,64      |

F= Flavonóide; GE=glicosídeo de esteviol e CF=compostos fenólicos. M-H=cromatograma negativo; TR=Tempo de Retenção.

A fração apresenta  $0,04 \pm 0,01\%$  de adoçantes em sua composição. Alguns compostos foram similares aos encontrados por Milani et al., (2017b) e Zorzenon et al., (2019). Mas alguns derivados ou distintos também foram identificados. Tal identificação permite caracterizar os principais bioativos presentes na fração. Alguns deles com atividades antioxidantes, antidiabética e até anticancerígena comprovada, como é o caso das quercetinas, kaempferóis e ácidos cafeicos (Ganespurkar et. al., 2017).

O propósito da técnica de microencapsulação é envolver o material ativo, independentemente de ser sólido, líquido ou gasoso, usando uma ampla gama de matrizes para a parede. A escolha adequada desses materiais desempenha um papel fundamental na eficácia da microencapsulação e na estabilidade das partículas. Compostos fenólicos e flavonoides são instáveis a agentes como a luz, oxigênio e temperatura e a microencapsulação tem sido eficiente na preservação desses compostos (Zorzenon et al., 2019).

#### *3.1.1. Eficiência de microencapsulação, solubilidade, umidade, higroscopicidade e atividade de água*

A **tabela 3** apresenta os valores de eficiência de microencapsulação, solubilidade, umidade, atividade de água e higroscopicidade. A eficiência de encapsulação é determinada pela quantidade de substância retida no interior das microesferas e está condicionada, entre outros fatores, à afinidade existente entre o material de revestimento e a substância microencapsulada. Os valores da eficiência variaram de 95% a 99,4%. A superior eficácia da goma arábica (FGA) pode estar relacionada à sua capacidade de emulsificação e à habilidade de criar películas ao redor dos núcleos (fração). Isso decorre da estrutura altamente ramificada da proteína arabinogalactana, que contém segmentos proteicos e polissacarídicos. Essa combinação proporciona um mecanismo de

estabilização, característico de apenas alguns sistemas polissacarídeo-proteína, conferindo-lhe uma vantagem sobre outros tipos de materiais de revestimento (Adamiec et al., 2012).

Cano-Higuita (2015) também observaram a diminuição na eficiência de encapsulamento com o aumento da relação MD:GA. Os autores associaram o motivo desse resultado à natureza da maltodextrina pura, que apresenta uma baixa atividade superficial, resultando em uma encapsulação inadequada. Portanto, é essencial combinar a maltodextrina com substâncias que possuam propriedades emulsificantes excelentes, como a goma arábica.

**Tabela 3. Eficiência de microencapsulação, solubilidade, umidade e higroscopicidade da fração de Stevia UEM-13 e das frações microencapsuladas**

|       | EM (%)                 | S (%)                  | U (%)                 | Aw                     | H (%)                 |
|-------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| FAZ   | -                      | 2,45±0,19 <sup>a</sup> | 6,7±0,02 <sup>a</sup> | 0,37±0,08 <sup>a</sup> | 99±0,001 <sup>a</sup> |
| FGA   | 99,4±0,01 <sup>a</sup> | 15,6±3,9 <sup>b</sup>  | 2,2±0,01 <sup>b</sup> | 0,25±0,10 <sup>a</sup> | 99±0,02 <sup>a</sup>  |
| FMD   | 96,0±0,05 <sup>b</sup> | 18,6±0,27 <sup>c</sup> | 2,4±0,06 <sup>b</sup> | 0,29±0,01 <sup>a</sup> | 99±0,01 <sup>a</sup>  |
| FMDGA | 97,1±0,01 <sup>b</sup> | 19,70±0,0 <sup>c</sup> | 3,5±0,01 <sup>c</sup> | 0,22±0,07 <sup>a</sup> | 99±0,02 <sup>a</sup>  |
| FGAW  | 96,2±0,01 <sup>b</sup> | 15,1±0,06 <sup>b</sup> | 2,3±0,21 <sup>b</sup> | 0,44±0,05 <sup>b</sup> | 99±0,01 <sup>a</sup>  |
| FMDW  | 95,2±0,03 <sup>b</sup> | 12,8±0,18 <sup>d</sup> | 1,6±0,01 <sup>d</sup> | 0,29±0,02 <sup>a</sup> | 99±0,001 <sup>a</sup> |

EM: Eficiência de Microencapsulação; S: Solubilidade; U: Umidade; Aw: Atividade água; H: Higroscopicidade. FAS: Fração Antioxidante Stevia UEM-13; FMD: Fração Microencapsulada com Maltodextrina; FGA: Fração Microencapsulada com Goma Arábica; FMDGA: Fração Microencapsulada com Maltodextrina e Goma Arábica; FMDW: Fração Microencapsulada com Maltodextrina e Whey protein; FGAW: Fração microencapsulada com Goma Arábica e Whey protein. Letras diferentes, na mesma coluna, representam diferença significativa com p<0,05.

Constatou-se que fração livre (FAS) apresenta baixa solubilidade (2,5%) em comparação com as microcápsulas. O processo de microencapsulação, independente da matriz usada, acarretou um aumento expressivo da solubilidade, podendo ser até 7 vezes superior (FMD). As matrizes de maltodextrina (MD) e MD com GA (goma arábica)

mostraram ser as mais eficientes em proporcionar solubilidade quando comparadas com as outras. Tal característica está relacionada à alta solubilidade desses materiais de parede, tornando escolhas viáveis em aplicações de bebidas. Em um estudo conduzido por Cano-Chauca et al. (2005), a solubilidade do pó de suco de manga seco por atomização, empregando maltodextrina e goma arábica como materiais de revestimento, alcançou um valor similar. Zorzenon et al. (2019) também observou aumento expressivo da solubilidade da fração de estévia microencapsuladas com maltodextrina.

Os teores de umidade e atividade de água apresentam papéis importantes com relação a deterioração de um produto. Conforme abordado por Masters (1972), a umidade não deve ser superior a 5% para prolongar a vida útil do produto. Neste estudo observou-se que a fração livre apresentou maior teor de umidade quando comparada com as versões microencapsuladas, com exceção da FGA. Mesmo assim os valores foram diminutos.

Embora o Brasil não disponha de um regulamento técnico que estabeleça limites de tolerância para teor de umidade, pode-se inferir que as frações microencapsuladas apresentam baixo teor de umidade (1,5 a 3,52%). Desta forma, esse valor encontra-se dentro do estabelecido por normativas para outros tipos de alimentos, como leite em pó integral, café em pó e farinha de trigo (3,5 a 15 %) (BRASIL, 2010). Isto ainda corrobora o aumento da qualidade quando realizamos processos de encapsulamento. Observa-se na **Tabela 3** que os menores valores de umidade foram atingidos nas matrizes MD+W, não havendo diferença significativa ( $p>0,05$ ) nas matrizes FMD, FGA e FGAW. Nota-se também que a mistura de MD+GA apresentou o maior teor de umidade em comparação às demais, e a matriz MD+W apresentou o menor valor. Valores esses que não corroboram com os observados por Tontul e Topuz, (2017), que descrevem que a microencapsulação usando matrizes a base de proteína beneficia a obtenção de produtos com maior teor de umidade, quando comparados àqueles a base de carboidratos.

Pensando na aplicabilidade em alimentos, o menor teor de umidade e atividade de água são mais requeridos, uma vez que são fatores que influenciam no desenvolvimento de microrganismos, estocagem e embalagem. Contudo, a umidade por si só não é um preditor confiável de respostas microbianas e reações químicas.

Cano-Higuita (2015), objetivou investigar o efeito de diferentes combinações de goma arábica, maltodextrina e amido de milho modificado como materiais de parede na microencapsulação de oleorresina de cúrcuma por secagem por atomização. Observou-se que as amostras com maiores proporções de amido modificado apresentaram menores teores de água, enquanto maiores proporções de goma arábica resultaram em maior umidade. As matrizes FMD, FGA, e FMDGA não apresentaram diferença significativa em suas atividades de água. Os valores estão dentro dos encontrados por Porrarud e Pranee, (2010) que acharam valores semelhantes (0,28 a 0,30) em microcápsulas de clorofila com parede de maltodextrina/goma arábica. Contudo, Cano-Higuita (2015), observou que os teores de água aumentaram com maiores proporções de maltodextrina e goma arábica, respectivamente. A amostra FGAW foi a microcápsula que apresentou maior atividade de água (0,44), nesta faixa não há crescimento microbiano, mas aplicada a alimentos, bolor e leveduras podem se desenvolver.

A higroscopicidade refere-se à habilidade de um material de absorver a umidade do ambiente, sendo uma característica relevante na estabilidade dos alimentos. Com relação a higroscopicidade não foi observado diferença significativa entre as amostras, sendo todas bastante higroscópicas.

### 3.2. Cor

Na **tabela 4** estão dispostos os dados relacionados à análise colorimétrica das amostras. A análise de cor é um dos indicadores de suma importância para a qualidade dos produtos, e se relaciona diretamente com a aceitabilidade do consumidor. As cores

das amostras podem variar conforme o método de secagem empregado, especialmente quando se utilizam altas temperaturas, reações enzimáticas e oxidação (Tellez et al., 2018). A FAS apresenta luminosidade significativamente inferior às demais amostras, o que demonstra que o processo de microencapsulação resulta em uma matriz de coloração mais clara. Esta tendência está relacionada à cor inerente do material da parede das cápsulas, que são esbranquiçadas visualmente.

**Tabela 4. Análise de cor da fração antioxidante da estévia livre e após microencapsulação**

|       | <b>L*</b>                 | <b>a*</b>                  | <b>b*</b>                 | <b>C*</b>                 | <b>h</b>                  |
|-------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| FAS   | 33,07 ± 0,45 <sup>a</sup> | -3,61 ± 0,04 <sup>a</sup>  | 20,26 ± 0,13 <sup>a</sup> | 21,13 ± 0,54 <sup>a</sup> | 99,91 ± 0,12 <sup>a</sup> |
|       |                           |                            |                           |                           | 107,41 ±                  |
| FGA   | 58,82 ± 0,72 <sup>b</sup> | -5,65 ± 0,04 <sup>db</sup> | 18,00 ± 0,15 <sup>b</sup> | 18,90 ± 0,23 <sup>b</sup> | 0,10 <sup>b</sup>         |
|       |                           |                            |                           |                           | 109,11 ±                  |
| FMD   | 53,48 ± 0,98 <sup>c</sup> | -5,44 ± 0,07 <sup>bc</sup> | 15,74 ± 0,28 <sup>c</sup> | 16,33 ± 0,14 <sup>c</sup> | 0,09 <sup>c</sup>         |
|       |                           |                            |                           |                           | 107,56 ±                  |
| FMDGA | 54,81 ± 0,38 <sup>c</sup> | -5,56 ± 0,03 <sup>cd</sup> | 17,55 ± 0,11 <sup>b</sup> | 18,58 ± 0,14 <sup>b</sup> | 0,08 <sup>b</sup>         |
|       |                           |                            |                           |                           | 109,81 ±                  |
| FGAW  | 62,97 ± 0,72 <sup>d</sup> | -5,56 ± 0,10 <sup>cd</sup> | 15,51 ± 0,31 <sup>c</sup> | 16,45 ± 0,03 <sup>c</sup> | 0,02 <sup>d</sup>         |
|       |                           |                            |                           |                           | 110,16 ±                  |
| FMDW  | 64,85 ± 0,43 <sup>e</sup> | -5,34 ± 0,04 <sup>b</sup>  | 14,67 ± 0,08 <sup>d</sup> | 15,49 ± 0,12 <sup>d</sup> | 0,08 <sup>e</sup>         |

Valores médios seguidos do seu erro padrão. Letras diferentes, na mesma coluna, apresentam diferença significativa entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). FAS: Fração Antioxidante Stevia UEM-13; FMD: Fração Microencapsulada com Maltodextrina; FGA: Fração Microencapsulada com Goma Arábica; FMDGA: Fração Microencapsulada com Maltodextrina e Goma Arábica; FMDW: Fração Microencapsulada com Maltodextrina e Whey protein; FGAW: Fração microencapsulada com Goma Arábica e Whey protein. Neste espaço de cores, L\* indica luminosidade, C\* representa saturação e h é o ângulo de matiz. O valor de saturação C\* representa a distância do eixo de luminosidade (L\*) e começa em zero no centro. O ângulo do tom começa no eixo +a\* e se move no sentido anti-horário. É expresso em graus (por exemplo, 0° é vermelho e 90° é amarelo).

Para o parâmetro L\* não houve diferença entre as amostras de FMD e FMDGA.

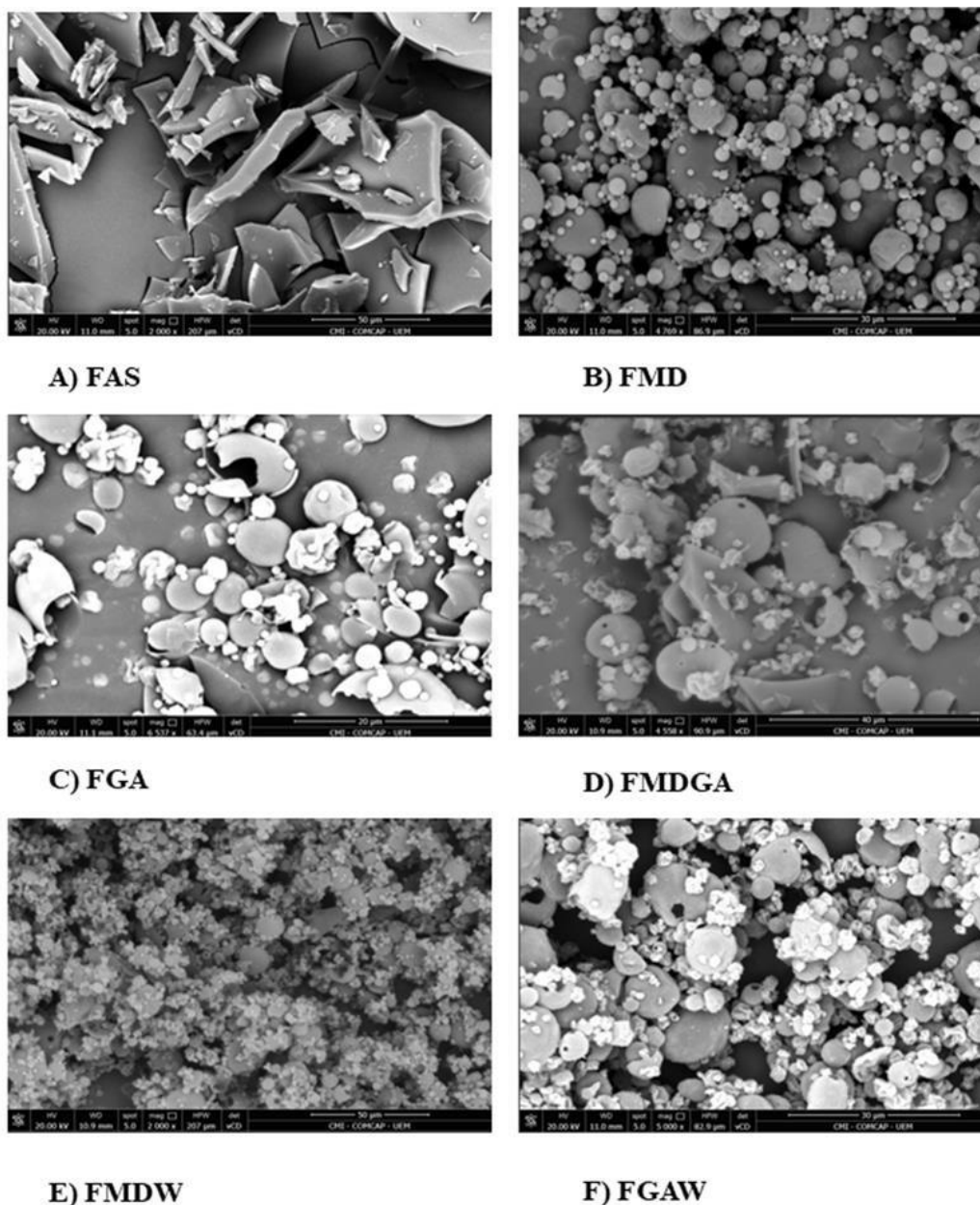
A microcápsula de FMDW possui significativamente maior grau de luminância em relação às demais amostras. Matrizes em pó ricas em proteínas refletem o branco, devido à cor branco-amarelada do leite (Milovanovic et al., 2020).

Para os parâmetros  $C^*$  e  $h$  as amostras FGA e FMDGA não diferem estatisticamente entre si. A amostra FAS se difere estatisticamente das demais nos parâmetros  $a^*$  e  $b^*$ , demonstrando que a coloração verde é predominante deste produto, com tons mais amarelados. As matrizes, microencapsuladas, além de maior luminosidade em relação a FAS, também reduzem a tonalidade verde inerente a fração. Desta forma, podemos relacionar que este aspecto é extremamente importante devido à percepção subjetiva da cor em relação ao consumidor, quando se propõe a aplicação em alimentos, não só pensando no melhoramento das características físico-químicas da fração, mas também a aceitabilidade do alimento pelo consumidor (León et al., 2006).

A cor verde pode gerar menor aceitabilidade, sendo assim, quanto menor alteração no padrão visual dos alimentos que estão sendo fortificados, menor será o impacto na modulação psicológica da cor na percepção do sabor pelo consumidor (Spence, 2015).

### *3.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)*

A análise da estrutura das partículas em pó foi conduzida por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando ampliações distintas (2000x a 6000x) a fim de ter uma visualização mais detalhada (**figura 1 em arquivo complementar**).



**Fig. 1.** Microscopia eletrônica de varredura da fração livre e microencapsuladas

A fração não microencapsulada (Figura 1A), apresentou formas irregulares e com fissuras. A fração microencapsulada com a matriz de maltodextrina (Figura 1B) teve esferas bem definidas, arredondadas, lisas, com poucas rachaduras e com leve aglomeração. Resultado semelhante foi encontrado com microcápsulas de fração de estévia por Zorzenon et al., (2022).

O microencapsulado contendo maltodextrina (Figura 1B) exibiu uma estrutura

mais compacta e uma matriz mais uniforme, em contraste com as microcápsulas que continham goma arábica (Figura 1D) e a combinação de MD+GA (Figura 1D), nas quais foram observadas algumas concavidades. As amostras com MD+W também mostraram ser compactas, menores e agrupadas, enquanto naquelas com GA+W (Figura 1F), foi possível identificar a presença de irregularidades, embora se perceba que os grânulos contendo as misturas com whey estão mais aglomerados.

As matrizes GA+W (Figura 1B) e GA (Figura 1D) apresentaram formato esférico maior, de variados tamanhos e com aspecto liso. As matrizes contendo maltodextrina (Figura 1B) apresentaram o formato esférico menor. Isso pode ser vantajoso, uma vez que as partículas menores têm a capacidade de adentrar os vazios entre as maiores, ocupando menos espaço durante o armazenamento e a estocagem.

Nota-se que as matrizes contendo goma arábica apresentaram mais rupturas. Chen e Ozkan (2007), associa tal comportamento à temperatura e à difusão da água ao longo do processo de secagem. Fazendo com que a microcápsula se quebre.

Apesar das diferenças relatadas, todas as amostras apresentaram de maneira predominante formato circular. A má formação das microcápsulas pode ser associada a deficiências nos equipamentos, incluindo tanto o *spray dryer* quanto o microscópio eletrônico de varredura, bem como, possíveis erros por parte do analista.

### **3.4. Estabilidade**

Os compostos fenólicos desempenham um papel significativo na atividade antioxidante devido principalmente às suas propriedades redox, que lhes conferem a capacidade de agir como agentes redutores, doadores de hidrogênio e/ou neutralizadores do oxigênio (Negri et al., 2011). A extração de compostos utilizando acetato de etila tem sido objeto de investigação em diversos estudos relacionados à estévia. Estas pesquisas

têm revelado a presença de fenólicos e flavonoides de relevância, conforme documentado por Khatun (2021). Em seu estudo, Khatun conseguiu isolar quatro flavonoides distintos das folhas de estévia, empregando o método de extração com acetato de etila.

A **tabela 5** apresenta a estabilidade dos compostos fenólicos e flavonoides ao longo de 30 dias. A fração livre (FAS) apresentou significativo teor de compostos fenólicos, entretanto, possui baixa solubilidade, reduzindo a sua possível aplicabilidade e biodisponibilidade. Este fato salienta a importância da microencapsulação, que permite que os compostos fiquem protegidos e que haja uma melhora na solubilidade.

**Table 5. Estabilidade de compostos fenólicos e flavonóides na fração livre e microcápsulas de Stevia UEM-13 durante um período de 30 dias**

| Compostos fenólicos (g/100g) |                             |                            |                            |
|------------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|                              | Day 1                       | Day15                      | Day 30                     |
| FAS                          | 56,54 ± 0,08 <sup>a</sup>   | 61,19 ± 7,01 <sup>a</sup>  | 47,96 ± 0,05 <sup>a*</sup> |
| FGA                          | 34,93 ± 0,03 <sup>b</sup>   | 16,81 ± 0,01 <sup>b*</sup> | 17,01 ± 2,01 <sup>b</sup>  |
| FMD                          | 14,15 ± 4,01 <sup>c</sup>   | 20,55 ± 5,01 <sup>c</sup>  | 17,17 ± 0,01 <sup>b</sup>  |
| FMDGA                        | 14,53 ± 0,01 <sup>c</sup>   | 16,02 ± 2,01 <sup>b</sup>  | 14,12 ± 0,02 <sup>c</sup>  |
| FGAW                         | 23,40 ± 0,30 <sup>d</sup>   | 20,11 ± 0,01 <sup>c*</sup> | 18,67 ± 0,01 <sup>b</sup>  |
| FMDW                         | 29,98 ± 0,01 <sup>be*</sup> | 21,43 ± 1,11 <sup>c</sup>  | 21,51 ± 0,01 <sup>d</sup>  |
| Flavonoides (g/100g)         |                             |                            |                            |
|                              | Day 1                       | Day 15                     | Day 30                     |
| FAS                          | 15,93 ± 1,04 <sup>a</sup>   | 17,63 ± 0,05 <sup>a</sup>  | 16,12 ± 0,01 <sup>a</sup>  |
| FMD                          | 4,38 ± 0,51 <sup>b</sup>    | 5,45 ± 0,01 <sup>b</sup>   | 2,40 ± 0,02 <sup>b</sup>   |
| FGA                          | 9,77 ± 0,01 <sup>c*</sup>   | 4,92 ± 0,02 <sup>b*</sup>  | 1,67 ± 0,03 <sup>b*</sup>  |
| FMDGA                        | 8,38 ± 0,01 <sup>c*</sup>   | 4,83 ± 0,02 <sup>b*</sup>  | 1,94 ± 0,02 <sup>b*</sup>  |
| FMDW                         | 6,27 ± 0,01 <sup>d</sup>    | 6,00 ± 0,02 <sup>b</sup>   | 2,30 ± 0,01 <sup>b*</sup>  |

|      |                          |                           |                           |
|------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| FGAW | 7,20 ± 0,01 <sup>d</sup> | 5,85 ± 0,082 <sup>b</sup> | 3,69 ± 0,03 <sup>c*</sup> |
|------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|

FAS: Fração Antioxidante Stevia UEM-13; FMD: Fração Microencapsulada com Maltodextrina; FGA: Fração Microencapsulada com Goma Arábica; FMDGA: Fração Microencapsulada com Maltodextrina e Goma Arábica; FMDW: Fração Microencapsulada com Maltodextrina Whey protein; FGAW: Fração microencapsulada com Goma Arábica e Whey protein. Valores médios seguidos do seu erro padrão. Letras diferentes, na mesma coluna, mostram diferença significativa entre as amostras pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ); \*diferem dos demais na mesma linha pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

No período de 15 dias após a obtenção da FAS e de suas microcápsulas foi possível observar, que de forma geral, a fração livre e as microcápsulas FMD, e FMDGA mantiveram seu teor fenólico. Já FGA, FGAW e FMDW tiveram redução do teor de compostos fenólicos totais. A microencapsulação utilizando a maltodextrina, como agente encapsulante, atuou na preservação dos compostos fenólicos contidos nas microcápsulas. Isso resultou na manutenção da atividade antioxidante e da estabilidade desses compostos. Zorzenon et al., (2019), Cabeça et al., (2023) também obtiveram preservação dos compostos ao microencapsular fração de estévia com maltodextrina DE 10 e DE19. Moraes et al. (2020), observaram comportamento similar de redução do conteúdo total de compostos fenólicos no extrato de seriguela microencapsulado com goma arábica (GA) e maltodextrina+whey protein.

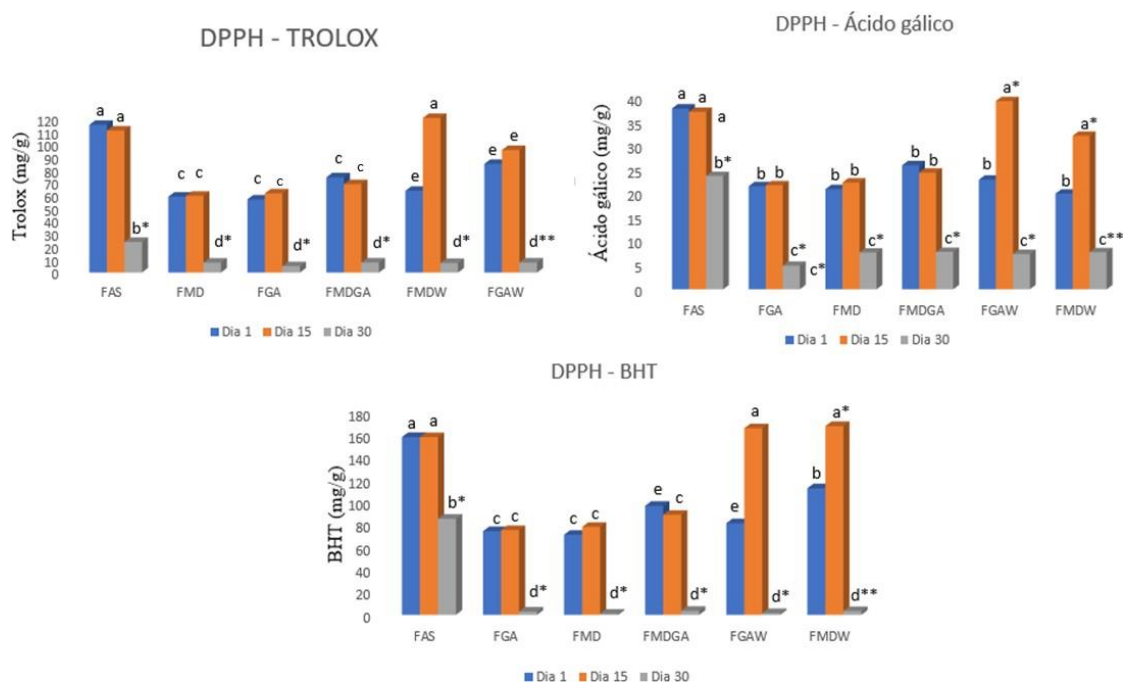
Após 30 dias, houve queda significativa do teor de compostos fenólicos na FAS (cerca de 27%). No mesmo período, observa-se que em todas as outras demais matrizes não houve queda significativa. Moraes et al. (2020), observaram o microencapsulado contendo a combinação maltodextrina com whey mantiveram sua estabilidade após o 25º dia de microencapsulação.

A microcápsula FMDGA manteve o conteúdo de polifenóis no decorrer dos 30 dias. Resultados similares foram observados por Tolun, Altinkas e Artik (2016), no perfil fenólico do microencapsulado de resíduo de uva. Observaram, que a combinação de maltodextrina e goma arábica proporcionou uma proteção mais eficaz para os compostos fenólicos. Conforme apontado pelos autores, essa ocorrência pode ser atribuída à

capacidade da goma arábica de estabelecer uma matriz conjuntamente com a maltodextrina, a qual demonstra eficácia na preservação dos compostos fenólicos contra o efeito do calor.

Uma observação importante ocorreu em relação ao conteúdo de flavonoides. Na fração não microencapsulada não foi observada redução significativa no conteúdo desses compostos, mas uma redução expressiva foi encontrada em todas as microcápsulas. É possível que classes diferentes de compostos bioativos respondam de forma diferente às condições de armazenamento.

A **figura 2** mostra a estabilidade em relação à capacidade antioxidante ao longo dos 30 dias. Os dados são referentes a análise usando o método DPPH, e foram expressos em relação aos padrões ácido gálico (composto fenólico), TROLOX (análogo hidrossolúvel do tocoferol) e BHT (um antioxidante sintético). É possível observar que durante quinze dias não houve queda da capacidade antioxidante em nenhuma análise, e ainda que FGAW e FMDW tiveram um aumento dessa capacidade em 15 dias. Zoerzenon et al., (2019) não avaliou a estabilidade de fração aquosa e sua versão microencapsulada, mas encontrou um aumento do conteúdo de fenólicos, até mesmo superior ao inicial, após algumas etapas da digestão.



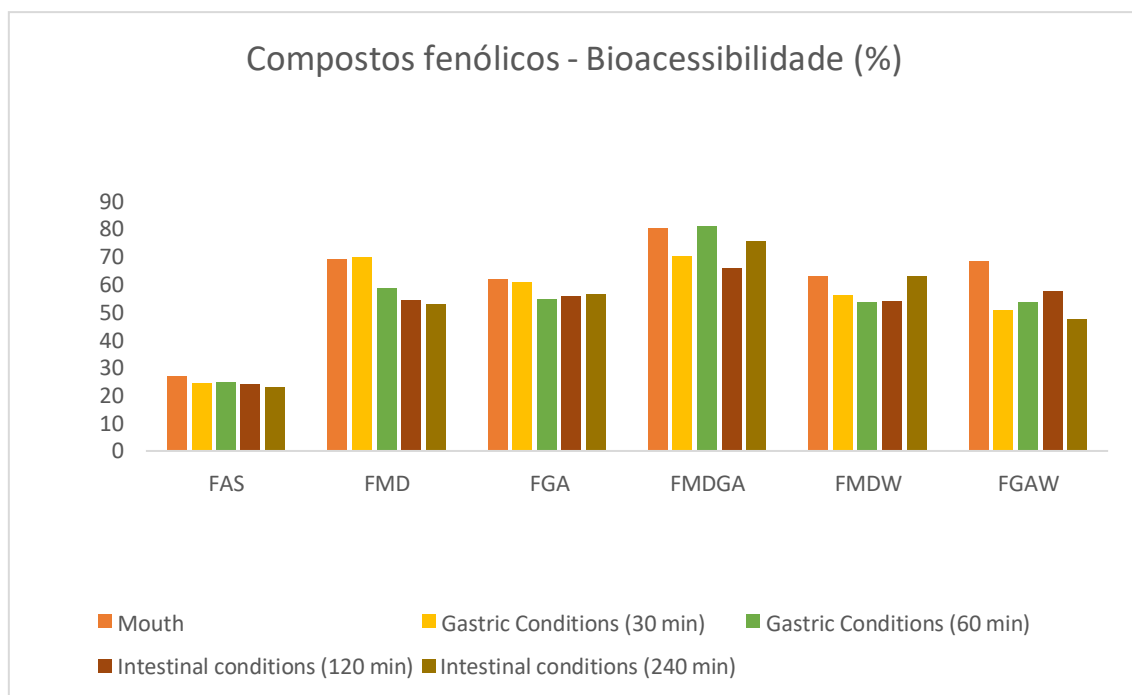
**Figura 2.** Capacidade antioxidante (método DPPH) no período de 30 dias da fração livre e das microencapsuladas de Stevia UEM-13 analisada em relação a três antioxidantes padrões. FAS: Fração Antioxidante de Stevia UEM-13; FMD: Fração microencapsulada com Maltodextrina; FGA: Fração microencapsulada com Goma Arábica; FMDGA: Fração microencapsulada com Maltodextrina e Goma Arábica; FMDW: Fração microencapsulada com Maltodextrina e Whey protein; FGAW: Fração microencapsulada com Goma Arábica e Whey protein. Os dados são apresentados como a média  $\pm$  e.p.m. Letras: mostram diferença entre todas as amostras. \* mostram diferença significativa dentro do grupo pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Os dados usando a técnica de ABTS, mostraram apenas preservação dos compostos por 15 dias, e os dados corroboram com os encontrados pelo método DPPH. Após 15 dias não foi evidenciado sequestro do radical ABTS<sup>+</sup> por nenhuma das amostras.

### 3.5. Análise de estabilidade dos compostos fenólicos e atividade antioxidante e digestão simulada *in vitro*

A **figura 3** apresenta os dados, após cada etapa do processo de digestão *in vitro*. Foram retiradas alíquotas para avaliação de dosagem da bioacessibilidade de compostos fenólicos e da atividade antioxidante dos radicais por DPPH. É possível observar que a bioacessibilidade da FAS (fração livre) é inferior a todas as versões das microcápsulas. Resultado similar foi encontrado por Zorzenon et al., (2022), com o extrato e sua

microcápsula de folhas de Stevia minimamente processadas. Os dados sugerem que a microencapsulação preserva os compostos fenólicos durante a digestão, já iniciada na boca.

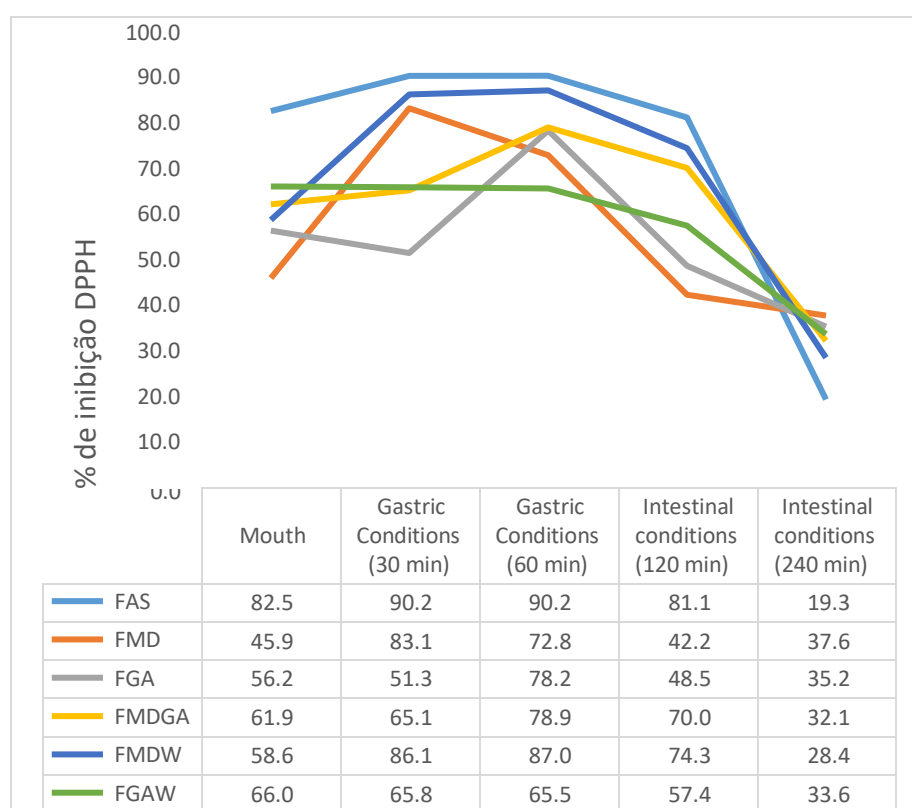


**Figura 3.** Bioaccessibilidade de compostos fenólicos totais ao longo da simulação da digestão *in vitro*. FAS: Fração Antioxidante de Stevia UEM-13; FMD: Fração microencapsulada com Maltodextrina; FGA: Fração microencapsulada com Goma Arábica; FMDGA: Fração microencapsulada com Maltodextrina e Goma Arábica; FMDW: Fração microencapsulada com Maltodextrinae Whey protein; FGAW: Fração microencapsulada com Goma Arábica e Whey protein. Os dados estão expressos em %. \* mostram diferença significativa dentro do grupo com  $p < 0,05$ .

As microcápsulas FMDGA e FMDW tiveram melhores taxas de preservação dos compostos até as condições intestinais. Estruturalmente, a goma arábica é um heteropolissacarídeo complexo com pequeno teor de proteínas, com cadeias principais e laterais ligadas por ligações  $\beta$ -glicosídicas. Fluidos digestivos geralmente contêm  $\alpha$ -amilases e  $\alpha$ -glicosidases. Neste caso então, a goma arábica é minimamente digerida e pode funcionar como uma fibra solúvel. As proteínas do soro são digeridas em taxas diferentes nas partes superior e inferior do trato gastrointestinal, atuando na preservação dos compostos. Bons resultados também foram encontrados para microencapsulações

com maltodextrina, especialmente quando adicionadas, a diferentes proporções de goma arábica. Resultados obtidos por Mansour et al. (2020) sugerem que a mistura de polissacarídeo e proteína como material de parede melhorou o encapsulamento de antocianinas e sua estabilidade durante a digestão simulada.

A **Figura 4** mostra a evolução da capacidade antioxidante de cada amostra em sequestrar radicais DPPH, em cada parâmetro da digestão simulada. Antes do processo de digestão simulada se iniciar na boca, a capacidade antioxidante da fração livre foi de 65%. Já para as microcápsulas FMD, FGA, FMDGA, FMDW e FGAW foram 64,63%, 63,56%, 64,45%, 67,76% e 58,75%, respectivamente. É possível observar que FAS mostrou uma queda importante da capacidade antioxidante na condição intestinal final. Já as microcápsulas, apesar de apresentarem quedas, foram inferiores.



**Figura 4.** Capacidade antioxidante em porcentagem de inibição do radical DPPH durante a análise de digestão *in vitro*. FAS: Fração Antioxidante de Stevia UEM-13; FMD: Fração microencapsulada com Maltodextrina; FGA: Fração microencapsulada com Goma Arábica; FMDGA: Fração microencapsulada com Maltodextrina e Goma Arábica; FMDW: Fração microencapsulada com Maltodextrina e Whey protein; FGAW: Fração microencapsulada com Goma Arábica e Whey protein.

Em alguns momentos é possível observar o aumento da capacidade antioxidante, seguida de uma queda e depois outro aumento. Isso foi observado também em relação ao conteúdo de compostos fenólicos totais. Muitos dos compostos presentes nesta fração de estévia estão glicosilados. Segundo Carbonell-Capella et al. (2015), os altos valores de bioacessibilidade podem ser alterados devido ao fato dessas ligações serem possíveis locais de ação de enzimas da digestão amilase, levando ao aumento desses compostos. As microcápsulas de FGA e FMD foram mais eficientes em manter a capacidade antioxidante ao longo do processo.

Um resultado interessante ocorreu com as microcápsulas contendo whey protein. Tanto na análise de preservação ao longo de 30 dias como na digestão *in vitro* há um aumento da capacidade antioxidante em relação ao valor inicial e depois nos deparamos com a queda dos valores. Pela **figura 2** é possível observar que, diferentemente das outras microcápsulas testadas, o pico de capacidade antioxidante ocorreu após 15 dias de microencapsulação. Na análise de digestão *in vitro* um aumento também foi observado dependendo das condições do processo, tais como pH (**Figura 4**). Estudos mostraram que os WPs podem ser ligados através de ligações covalentes (“conjugados”) ou ligações não covalentes (“complexos”) a polissacarídeos (Doost et al., 2019) e polifenóis (Li et al., 2020). Os polifenóis conjugados têm sido usados para melhorar tanto as propriedades tecnofuncionais quanto as atividades biológicas (de Moraes et al., 2020; Baba et al., 2021). As técnicas de conjugação podem ocorrer de forma química ou enzimática. Esta primeira baseia-se fundamentalmente na alteração de pH e temperatura, o que pode ter ocorrido durante a análise de digestão ou mesmo durante o armazenamento desses produtos (Buggy et al., 2018) e explicar o aumento da capacidade antioxidante em alguns momentos. Isso pode direcionar pesquisas importantes para aplicação desses compostos.

### 3.6. Inibição das enzimas $\alpha$ -amilase e $\alpha$ -glicosidase

Milani et al., (2017b); Milani et al., (2020) e Cabeça et al., (2023), iniciaram os estudos para avaliar a capacidade de frações antioxidantes de estévia de atuarem como possíveis adjuvantes para o tratamento do diabetes mellitus. Resultados *in vivo* e *in vitro* mostraram que há um potencial desta fração em reduzir a hiperglicemia, melhorar os distúrbios metabólicos advindos da hiperglicemia e ainda pode ajudar na restauração da função pancreática, modulando a secreção de insulina. A matriz usada na microencapsulação pode influenciar nesses resultados. Assim, este estudo realizou análises *in vitro* de inibição das enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase. Para a enzima  $\alpha$ -amilase, uma porcentagem de inibição de 36% foi alcançada, em uma concentração de 0,5 mg/mL com a fração não microencapsulada (FAS). Já para as microcápsulas apenas a FMD apresentou inibição (58%) nesta concentração.

Para a enzima  $\alpha$ -glicosidase a fração não microencapsulada apresentou inibição de 93,02% e as microcápsulas mostraram inibições acima de 96%. Esses dados corroboram com as literaturas citadas acima e com os estudos de Duru et al. (2018), que relataram que a inibição da  $\alpha$ -glicosidase retarda a absorção dos carboidratos ingeridos, resultando em redução da glicemia e menos picos de insulina pós-prandial, auxiliando assim no controle da glicemia. Esses dados incentivam a busca por mais estudos para efetivamente utilizarmos a fração antioxidante de estévia como adjuvante na prevenção ou tratamento do diabetes.

## 4. Conclusão

Este trabalho objetivou testar diferentes materiais de parede para a microencapsulação da fração antioxidante de estévia. Os resultados mostraram que dependendo do objetivo, físico-químico ou funcional, podemos ter resultados diferentes

para cada matriz. A matriz de goma arábica obteve a melhor eficiência de microencapsulação (FGA), e a microcápsula com maltodextrina (FMD) e com a mistura de maltodextrina e goma (FMDGA), a melhor solubilidade. A matriz da mistura de maltodextrina com whey protein (FMDW) apresentou o menor teor de umidade e maior luminosidade, o que produziu um pó mais branco. O processo de microencapsulação reduziu significativamente a atividade de água em todas as matrizes, exceto na de goma arábica. FGA, FMD e FGAW, mostraram microcápsulas mais regulares e uniformes pela análise de microscopia eletrônica de varredura. As matrizes FMD e FMDGA mantiveram os compostos fenólicos estáveis por 30 dias. A microencapsulação com o whey protein produziu um aumento da atividade antioxidante após 15 dias do processo, e dependendo do pH e temperatura pode apresentar o mesmo aumento durante a digestão *in vitro*. FMDGA e FMDW tiveram melhores taxas de preservação dos compostos durante a digestão, até as condições intestinais. Todas as matrizes provocaram uma inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase. FMD, ainda, inibiu a enzima  $\alpha$ -amilase, indicando um possível efeito antidiabético. Assim, dependendo da aplicabilidade desejada deve ser estudada e avaliada a melhor matriz, e este estudo pode contribuir para a literatura e auxiliando nesta escolha. Contudo, mais estudos ainda devem ser realizados para definir mais parâmetros para a aplicabilidade da fração em diferentes alimentos e bebidas.

|                                |                                                                              |
|--------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| <b>FGA</b>                     | Melhor eficiência de microencapsulação                                       |
| <b>FMD e FMDGA</b>             | Melhor solubilidade                                                          |
| <b>FMDW</b>                    | Menor teor de umidade e maior luminosidade, o que produziu um pó mais branco |
| <b>FMD, FMDGA, FMDW e FGAW</b> | Reduziu significativamente a atividade de água.                              |

|                                     |                                                                                               |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>FGA, FMD e FGAW</b>              | Mostraram microcápsulas mais regulares e uniformes pela análise de MEV.                       |
| <b>FMD e FMDGA</b>                  | Mantiveram os compostos fenólicos estáveis por 30 dias.                                       |
| <b>FMDGA e FMDW</b>                 | Melhores taxas de preservação dos compostos durante a digestão, até as condições intestinais. |
| <b>FMD, FGA, FMDGA, FMDW e FGAW</b> | Inibiram - $\alpha$ -glicosidase                                                              |
| <b>FGA</b>                          | Inibiu - $\alpha$ - amilase                                                                   |

## 5. Referências

1. AACC14-22.01- Método Internacional. Cor da Massa – Método do Colorímetro de Refletância. Primeira aprovação em 8 de outubro de 1976; Reaprovação em 3 de novembro de 1999. doi: 10.1094/AACCIntMethod-14-22.01
2. Adamiec J, Borompichaichartkul C, Srzednicki G, Panket W, Piriyaunsakul S, Zhao J. Microencapsulation of Kaffir Lime Oil and Its Functional Properties. Dry Technol. 2012;30(9):914–20.
3. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. RESOLUÇÃO DE DIRETORIA COLEGIADA – RDC Nº 45, DE 3 DE NOVEMBRO DE 2010 [Internet]. nº 212. 2010. p. 1–31. Available from: [https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/%281%29RDC\\_45\\_2010\\_COMP.pdf/ca8fab82-845e-4856-8883-c414612800d1](https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/%281%29RDC_45_2010_COMP.pdf/ca8fab82-845e-4856-8883-c414612800d1)
4. Baba WN, McClements DJ, Maqsood S (2021) Whey protein–polyphenol conjugates and complexes: Production, characterization, and applications. Food Chemistry, Volume 365, 130455, ISSN 0308-8146. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130455>.
5. Buggy AK, McManus JJ, Brodkorb A, Hogan SA & Fenelon, MA (2018) Pilotscale formation of whey protein aggregates determine the stability of heat-treated whey protein solutions—Effect of pH and protein concentration. Journal of Dairy Science, 101(12), 10819–10830.
6. Cabeça CLS, Nogueira NC, Zorzenon MRT, Dacome AS, Madrona GS, da Costa CEM, et al. Microencapsulated antioxidant stevia fraction fortifies whey protein and enhances its antidiabetic activity. J Food Sci Technol [Internet]. 2023;60(8):2275–85. Available from: <https://doi.org/10.1007/s13197-023-05755-7>

7. Cano-Chauca M, Stringheta PC, Ramos AM, Cal-Vidal J. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. *Innov Food Sci Emerg Technol*. 2005 Dec 1;6(4):420–8.
8. Cano-Higueta DM, Vélez HAV, Telis VRN. Microencapsulation of turmeric oleoresin in binary and ternary blends of gum Arabic, maltodextrin and modified starch | Microencapsulação de oleoresina de cúrcuma em misturas binárias e ternárias de goma arábica, maltodextrina e amido modificado. *Cienc e Agrotecnologia*. 2015;39(2):173–82.
9. Chen L, Gnanaraj C, Arulselvan P, El-Seedi H, Teng H. A review on advanced microencapsulation technology to enhance bioavailability of phenolic compounds: Based on its activity in the treatment of Type 2 Diabetes. *Trends Food Sci Technol*. 2019 Mar 1;85:149–62.
10. Chen XD, Özkan N. Stickiness, Functionality, and Microstructure of Food Powders. *Dry Technol* [Internet]. 2007 Jun [cited 2023 Nov 4];25(6):959–69. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07373930701397400>
11. Chranioti C, Chanioti S, Tzia C. Comparison of spray, freeze and oven drying as a means of reducing bitter aftertaste of steviol glycosides (derived from *Stevia rebaudiana* Bertoni plant) – Evaluation of the final products. *Food Chem*. 2016 Jan 1;190:1151–8.
12. de Moraes FPR, Pessato TB, Rodrigues E, Peixoto Mallmann L, Mariutti LRB & Netto FM (2020). Whey protein and phenolic compound complexation: Effects on antioxidant capacity before and after in vitro digestion. *Food Research International*, 133, 109104. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109104>.
13. Doost AS, Nasrabadi MN, Wu J, A'Yun Q & Van der Meeren P (2019). Maillard conjugation as an approach to improve whey proteins functionality: A review of conventional and novel preparation techniques. *Trends in Food Science & Technology*, 91, 1–11
14. Duru KC, Kovaleva EG, Danilova IG, van der Bijl P, Belousova A V. The potential beneficial role of isoflavones in type 2 diabetes mellitus. *Nutr Res*. 2018 Nov 1;59:1–15.
15. Formigoni, M., Milani, P. G., da Silva Avíncola, A., dos Santos, V. J., Benossi, L., Dacome, A. S., Pilau, E. J., & da Costa, S. C. (2018). Pretreatment with ethanol as an alternative to improve steviol glycosides extraction and purification from a new variety of stevia. *Food Chemistry*, 241, 452–459. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.022>
16. Ganeshpurkar, Aditya; Saluja, Ajay K. The pharmacological potential of rutin. *Saudi pharmaceutical journal*, v. 25, n. 2, p. 149-164, 2017.

17. Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos [Internet]. 1 edição. São Paulo/SP; 2008. p. 1020. Available from: [http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2016\\_3\\_19/analisedealimento\\_sial\\_2008.pdf](http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2016_3_19/analisedealimento_sial_2008.pdf).
18. Khatun MCS, Muhit MA, Hossain MJ, Al-Mansur MA, Rahman SMA. Isolation of phytochemical constituents from *Stevia rebaudiana* (Bert.) and evaluation of their anticancer, antimicrobial and antioxidant properties via in vitro and in silico approaches. *Heliyon* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2023 Nov 4];7(12). Available from: <http://www.cell.com/article/S2405844021025780/fulltext>
19. León K, Mery D, Pedreschi F, León J. Color measurement in L\*a\*b\* units from RGB digital images. *Food Res Int*. 2006 Dec 1;39(10):1084–91.
20. Li X, Dai T, Hu P, Zhang C, Chen J, Liu C & Li TI (2020). Characterization the non-covalent interactions between beta lactoglobulin and selected phenolic acids. *Food Hydrocolloids*, 105, 105761. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105761>.
21. Mahdi AA, Mohammed JK, Al-Ansi W, Ghaleb ADS, Al-Maqtari QA, Ma M, et al. Microencapsulation of fingered citron extract with gum arabic, modified starch, whey protein, and maltodextrin using spray drying. *Int J Biol Macromol*. 2020 Jun 1;152:1125–34.
22. Mansour M, Salah M, Xu X. Effect of microencapsulation using soy protein isolate and gum arabic as wall material on red raspberry anthocyanin stability, characterization, and simulated gastrointestinal conditions. *Ultrason Sonochem*. 2020 May 1;63:104927.
23. Masters K. *Spray Drying; an Introduction to Principles Operational Practice and Applications*. Leonard Hill 1972.
24. Milani PG, Formigoni M, Dacome AS, Benossi L, Da Costa CEM, Da Costa SC. New seminal variety of *Stevia rebaudiana*: Obtaining fractions with high antioxidant potential of leaves. *An Acad Bras Cienc* [Internet]. 2017a Aug 31 [cited 2023 Nov 4];89(3):1841–50. Available from: <https://www.scielo.br/j/aabc/a/ngPBcFFCQ9w6m8ZhZQR8zNK/?lang=en>
25. Milani PG, Piovan S, Lima YC, Zorzenon MRT, da Rosa CVD, Peixoto GML, et al. Whey protein enriched with *Stevia rebaudiana* fraction restores the pancreatic function of streptozotocin induced diabetic rats. *J Food Sci Technol* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2023 Nov 4];58(2):805–10. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13197-020047993>
26. Milovanovic B, Djekic I, Miocinovic J, Djordjevic V, Lorenzo JM, Barba FJ, et al. What Is the Color of Milk and Dairy Products and How Is It Measured? *Foods* [Internet]. 2020 Nov 8;9(11):1629. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/foods9111629>

27. Morais NNG. Microencapsulação de extrato do resíduo de seriguela (*Spondias purpurea* L.) usando maltodextrina, goma arábica e soro de leite: desenvolvimento e caracterização. 2020 Feb 10 [cited 2023 Nov 4]; Available from: <http://www.tede2.ufrpe.br:8080/tede2/handle/tede2/8480>
28. Natsir H, Wahab AW, Laga A, Arif AR. Inhibitory activities of *Moringa oleifera* leaf extract against  $\alpha$ -glucosidase enzyme in vitro. *J Phys Conf Ser* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2023 Nov 4];979(1):012019. Available from: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1742-6596/979/1/012019>
29. Negri G, Teixeira EW, Alves MLTMF, De Camargo Carmello Moreti AC, Otsuk IP, Borguini RG, et al. Hydroxycinnamic Acid Amide Derivatives, Phenolic Compounds and Antioxidant Activities of Extracts of Pollen Samples from Southeast Brazil. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2011 May 25 [cited 2023 Nov 4];59(10):5516–22. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf200602k>
30. Piovan S, Pavanello A, Peixoto GML, Matusso CCI, De Moraes AMP, Martins IP, et al. Stevia Nonsweetener Fraction Displays an Insulinotropic Effect Involving Neurotransmission in Pancreatic Islets. *Int J Endocrinol* [Internet]. 2018 [cited 2023 Nov 4];2018. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29853880/>
31. Plati F, Paraskevopoulou A. Hemp protein isolate – gum Arabic complex coacervates as a means for oregano essential oil encapsulation. Comparison with whey protein isolate – gum
32. Porrarud S, Pranee A. Microencapsulation of Zn-chlorophyll pigment from Pandan leaf by spray drying and its characteristic. *International Food Research Journal* [Internet]. 2010 Nov [cited 2023 Nov 5];17(4):1031–42. Available from: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=fsr&AN=55096955&lang=pt-br&site=ehost-live>
33. Romanini EB, Rodrigues LM, Stafussa AP, Cantuaria Chierrito TP, Teixeira AF, Corrêa RCG, et al. Bioactive Compounds from BRS Violet Grape Pomace: An Approach of Extraction and Microencapsulation, Stability Protection and Food Application. *Plants* [Internet]. 2023 Sep 5;12(18):3177. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/plants12183177>
34. R Core Team (2023). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <<https://www.R-project.org/>>.
35. Rufino, M. do S. M.; Alves, R. E.; Brito, E. S. de; Morais, S. M. de; Sampaio, C. de G.; Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calipto, F. D. Metodologiacientífica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS<sup>o+</sup>. *Embrapa Agroindústria Tropical*, 2007.
36. Spence C. On the psychological impact of food colour. *Flavour* 2015 41 [Internet]. 2015 Apr 22 [cited 2023 Nov 4];4(1):1–16. Available from:

<https://flavourjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13411-015-0031-3>

37. Tolun A, Altintas Z, Artik N. Microencapsulation of grape polyphenols using maltodextrin and gum arabic as two alternative coating materials: Development and characterization. *J Biotechnol.* 2016 Dec 10;239:23–33.
38. Tontul I, Topuz A. Spray-drying of fruit and vegetable juices: Effect of drying conditions on the product yield and physical properties. *Trends Food Sci Technol.* 2017 May 1;63:91–102.
39. Zorzenon M, Hodas F, Milani P, Formigoni M, Dacome A, Monteiro A, Costa C, Costa S. Microencapsulation by Spray-drying of Stevia Fraction with Antidiabetics Effects. *Chemical Engineering Transactions* [Internet]. 15Jun.2019 [cited 5Nov.2023];75:307-12. Available from: <https://www.cetjournal.it/index.php/cet/article/view/CET1975052>
40. Zorzenon MRT, Cabeça CLS, Nogueira NC, Aristides LGB, Cordeiro EB, Dacome AS, et al. Cold extraction of minimally processed Stevia UEM-13 leaves: Amylase inhibition and increased bioaccessibility of bioactive compounds by microencapsulation. *J Food Process Preserv* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2023 Nov 4];46(12):e17213. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jfpp.17213>