



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ISOLAMENTO DE CIANIDINA 3-O-RUTINOSÍDEO E DESENVOLVIMENTO DE
ALIMENTOS LÁCTEOS CONTENDO EXTRATOS VEGETAIS DE *Euterpe edulis* E
Paullinia cupana

LUANA MAGRI TUNIN

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos, da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

MARINGÁ

2020

LUANA MAGRI TUNIN

ISOLAMENTO DE CIANIDINA 3-O-RUTINOSÍDEO E DESENVOLVIMENTO DE
ALIMENTOS LÁCTEOS CONTENDO EXTRATOS VEGETAIS DE *Euterpe edulis* E
Paullinia cupana

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos, da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

MARINGÁ

2020

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

T926i

Tunin, Luana Magri

Isolamento de Cianidina-3-O- Rutinosídeo e desenvolvimento de alimentos lácteos contendo extratos vegetais de *Euterpe edulis* e *Paullinia cupana* / Luana Magri Tunin. -- Maringá, PR, 2020.

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

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2020.

1. Antocianinas . 2. *Paullinia cupana*. 3. Cianidina. 4. Bebida láctea. 5. *Euterpe edulis* . I. Mello, João Carlos Palazzo de, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. III. Título.

CDD 23.ed. 615.321

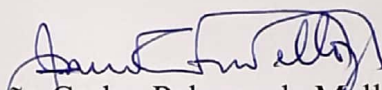
LUANA MAGRI TUNIN

**ISOLAMENTO DE CIANIDINA-3-O-RUTINOSÍDEO E
DESENVOLVIMENTO DE ALIMENTOS LÁCTEOS CONTENDO
EXTRATOS VEGETAIS DE *Euterpe edulis* E *Paullinia cupana***


116ª Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual
de Maringá como requisito para obtenção do título de
Doutor em Ciências Farmacêuticas.

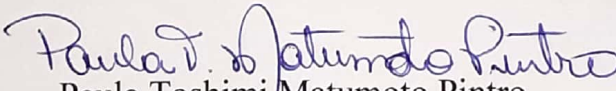
Aprovada em 17 de janeiro de 2020

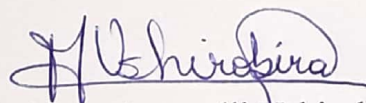
BANCA EXAMINADORA


João Carlos Palazzo de Mello
Universidade Estadual de Maringá


Admilton Gonçalves de Oliveira Junior
Universidade Estadual de Londrina


Marcos Luciano Bruschi
Universidade Estadual de Maringá


Paula Toshimi Matumoto Pinto
Universidade Estadual de Maringá


Tânia Mara Antonelli Ushirobira
Centro Universitário Ingá - Uningá

BIOGRAFIA



Luana Magri Tunin nasceu em Altônia, PR, no dia 17 de Junho de 1985. Em 2003 concluiu o Ensino Médio no Centro Educacional Cianorte (CEC), em Cianorte, PR. Em 2005 iniciou o curso de Farmácia com habilitação em Indústria na Universidade Estadual de Maringá, em Maringá, PR. Na graduação participou de Projeto de Extensão sobre Controle de Qualidade de produtos Fitoterápicos e Drogas Vegetais (2007) no laboratório de Farmacognosia da Instituição. Em 2008, no mesmo laboratório participou do Projeto de Pesquisa sobre Desenvolvimento de Soluções Extrativas e Técnicas de Controle de Qualidade para a Espécie vegetal *Eschweilera nana*. Realizou estágio curricular em Farmácia de Dispensação (2008), e na Indústria Citri Agroindustrial no controle de qualidade físico-químico de sucos de laranja concentrado e pasteurizado. Formou-se em Farmácia Industrial em 2010. Iniciou em 2011 o mestrado sob Orientação da Professora Dr^a. Maria da Conceição Torrado Truiti no Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas na Universidade Estadual de Maringá, obtendo o Título de Mestre em 2013. Em 2013, participou de processo seletivo para contratação de docente na Universidade Paranaense (UNIPAR – Unidade Paranavaí, PR) onde atua até o presente como Professora Horista nos cursos Superior de Farmácia e Tecnologia em Estética e Cosmética. Iniciou em 2015 o Doutorado em Ciências Farmacêuticas, sob Orientação do Professor Dr. João Carlos Palazzo de Mello, no Laboratório de Biologia Farmacêutica – Palafito.

RESUMO

Euterpe edulis Mart. (palmeira “juçara” ou “jussara”) é uma planta amplamente distribuída na Mata Atlântica, cujos frutos tem despertado interesse industrial como promissora fonte de antioxidantes e corantes naturais face a presença de antocianinas. As antocianinas, que pertencem ao grupo dos flavonoides, representam uma fonte atraente de pigmentos, que são responsáveis pelas cores cianídricas. Além disso, devido às suas propriedades antioxidantes e habilidades removedoras de radicais livres, as antocianinas foram correlacionadas com a prevenção de doenças em seres humanos. *Paullinia cupana* Kunth (guaraná) tem ampla utilização no mercado alimentício e farmacêutico no Brasil e em outros países. Suas sementes contêm altas concentrações de metilxantinas, como a cafeína, teofilina e teobromina, saponinas e polifenóis, especialmente taninos. Extratos de *Euterpe edulis*, ricos em antocianidinas, podem atribuir aos produtos alimentícios potencial antioxidante e cor e, quando adicionados a produtos obtidos por fermentação láctea pode conferir, além dos benefícios nutricionais, os funcionais; extratos de *Paullinia cupana* rico em compostos fenólicos e metilxantinas podem atribuir potencial antioxidante, estimulante além de melhorar as propriedades do gel dos produtos lácteos. Outro desafio será a proteção das substâncias bioativas dos extratos dentro de microestruturas, para garantir às mesmas suas propriedades funcionais. Neste sentido, este estudo teve como objetivos: extrair antocianinas da polpa dos frutos de *E. edulis*, desenvolver um produto lácteo contendo antocianinas, além do desenvolvimento de iogurte suplementado com extrato e micropartículas de *E. edulis* e *P. cupana* e, bem como avaliar as propriedades físico-químicas. A partir do extrato de *E. edulis* foi isolada e identificada cianidina-3-*O*-rutinosídeo, a qual foi confirmada por espectrometria de massas $[[M+H]^+ m/z 595]$, por comparação contra padrão por cromatografia líquida de alta eficiência e, por RMN. A partir da análise da curva de calibração, a equação da reta obtida foi $y = 70167x + 132018$, (r^2) de 0,994. O LD e LQ obtidos foram respectivamente 19,04 e 57,69 $\mu\text{g/mL}$. A precisão e a robustez foram expressas pelo coeficiente de variação (CV), e os dados obtidos apresentaram CV(%) menores do que 5%. Os resultados do ANOVA de um fator mostraram que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as análises de precisão e $p > 0,05$ para robustez. O método foi capaz de recuperar uma média de 104,85 $\mu\text{g/mL}$ do padrão nas concentrações analisadas. Neste estudo, a estabilidade do pigmento foi avaliada em termos de concentração ($p < 0,0001$), cor ($p < 0,0001$) e pH ($p\text{-valor} > 0,05$), durante os 21

dias de armazenamento. A cor do produto lácteo permaneceu estável por 9 dias, bem como a concentração de antocianinas, que reduz drasticamente ao final de 21 dias. O pH permaneceu estável no final do teste.

A suplementação das amostras de iogurte com os extratos vegetais na forma livre e encapsulada de *E. edulis* e *P. cupana* não afetaram as propriedades de textura como a adesividade, elasticidade e coesão, aumentando a firmeza das amostras quando comparadas aos controles. A viabilidade do *S. thermophilus* se manteve estável até o 14º dia, apresentando um decréscimo no 21º dia de estocagem. A adição dos extratos vegetais também contribuíram para manutenção da cor dos iogurtes, sendo que os iogurtes suplementados com juçara e guaraná se mantiveram respectivamente vermelhos e amarelos.

Palavras-chave: *Euterpe edulis*, antocianinas, *Paullinia cupana*, leite fermentado, estabilidade.

LISTA DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|--------|--|--------|
| 1 | Palmeira juçara | 11 |
| 2 | Estrutura química das antocianinas | 14 |
| 3 | Frutos Guaraná - <i>Paullinia cupana</i> | 15 |

LISTA DE TABELAS

| Tabela | | Página |
|--------|--|--------|
| 1 | Substituintes R ₁ e R ₂ das antocianidinas | 14 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------|---|
| ASPRAN | Associação dos Produtores Rurais e Artesanais de Antonina |
| CID | Dissociação induzida por colisão |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| EEM | Micropartículas contendo extrato de <i>Euterpe edulis</i> |
| HPLC | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| IAPAR | Instituto Agrônomo do Paraná |
| JCE | Extrato bruto de Juçara |
| LOD | Limite de detecção |
| LOQ | Limite de quantificação |
| MS/MS | Espectrometria de massas |
| NMR | Ressonância Magnética Nuclear |
| PDA | Detector de Arranjo de Diôdo |
| RSD | Desvio Padrão Relativo |
| SEBRAE | Serviço de apoio às Micro e Pequenas Empresas |
| SPE | Extração em fase sólida |
| TFA | Ácido Trifluoracético |
| UEPG | Universidade Estadual de Ponta Grossa |
| UHT | Temperatura Ultra Alta |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 8 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 10 |
| 2.1.1 <i>Gênero Euterpe</i> | 10 |
| 2.1.2 <i>Euterpe edulis Mart.</i> | 10 |
| 2.1.3 <i>Antocianinas</i> | 13 |
| 2.1.4 <i>Paullinia cupana</i> | 14 |
| 2.2 Leites fermentados | 16 |
| 3 OBJETIVO | 18 |
| 3.1 Objetivo geral..... | 18 |
| 3.2 Objetivos específicos..... | 18 |
| 4 ARTIGO 1 | 19 |
| 5 ARTIGO 2 | 39 |
| 6 DISCUSSÃO GERAL..... | 63 |
| 7 CONCLUSÃO GERAL | 67 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 68 |

1 INTRODUÇÃO

A tendência atual de consumo preferencial de alimentos naturais, juntamente com estudos epidemiológicos que relataram possíveis efeitos prejudiciais de aditivos sintéticos para a saúde, tem contribuído para a busca de novas fontes de ingredientes naturais. Neste contexto, os compostos fenólicos, especificamente antocianinas, têm atraído a atenção devido às suas propriedades antioxidantes e seu grande potencial como corante alimentar natural (VIEIRA et al., 2013).

O Brasil é um país com condições climáticas adequadas para um grande número de espécies de frutas nativas e exóticas com potencial interesse para a indústria (BORGES et al., 2011).

A fruta conhecida no Brasil como açaí é produzido por duas espécies heterotípicas, *Euterpe precatoria* Mart. e *Euterpe oleracea* Mart. “Jussara” ou “Juçara” como são conhecidos os frutos de *Euterpe edulis* Mart., pertencente à família Arecaceae e ao gênero *Euterpe*, é uma palmeira amplamente distribuída na Mata Atlântica, encontrada principalmente nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Bahia. Esta planta é procurada como a principal fonte de palmito, e pouco interesse comercial pelo seu fruto. No entanto, a fruta, tem emergido como uma promissora fonte de antioxidantes naturais, e é semelhante em aparência aos frutos de *E. precatoria* e *E. oleracea* (BORGES et al., 2013).

As antocianinas, que pertencem ao grupo dos flavonoides, representam uma fonte atraente de pigmentos, que são responsáveis pelas cores cianídricas, que vão do rosa salmão, vermelho, violeta ao azul escuro, que são observadas na maioria das flores, frutos e folhas de Angiospermas comumente encontradas na natureza (CAVALCANTI et al., 2011).

Além de suas propriedades corantes, as antocianinas possuem propriedades antioxidantes e habilidades removedoras de radicais livres que foram correlacionados com a prevenção de doenças em seres humanos. O seu consumo dietético está associado com efeitos neuroprotetores, particularmente diminuição do risco de doença de Parkinson (PATRICK et al., 2014), além da redução do risco de doença cardíaca coronária, a melhoria da acuidade visual e anticancerígena (KAMILOGLU et al., 2015).

Nas plantas as antocianinas têm diversas funções, como as de proteção e defesa para facilitar o crescimento, desenvolvimento e reprodução. Estruturalmente as antocianidinas mais difundidas em frutas e vegetais são baseados em seis antocianidinas, a saber: cianidina, delphinidina, malvidina, pelargonidina, peonidina e petunidina. (KAMILOGLU et al., 2015).

O guaraná (*Paullinia cupana* Kunth), pertencente à família Sapindaceae, é uma planta brasileira originária da região central da Amazônia. Suas sementes contêm altas concentrações de metilxantinas, como a cafeína, teofilina e teobromina, saponinas e polifenóis, especialmente taninos (YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007). Várias atividades biológicas do guaraná têm sido relatadas, entre elas, efeitos antioxidantes, estimulante do sistema nervoso central, antidiarreicos, efeitos benéficos sobre a cognição, efeitos antidepressivos e panicolíticos (CARLINI, 2003; BASILE et al., 2005; FUKUMASU et al., 2006; OTOBONE et al., 2007; RONCON et al., 2011).

Taninos são substâncias de natureza fenólica encontradas em várias espécies vegetais, com peso molecular podendo variar de 500 a 3000 Da. São divididos em dois grandes grupos, taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Uma de suas principais propriedades é a formação de complexos com proteínas e são responsáveis pela adstringência de muitas frutas e vegetais (SIMÕES et al., 2017). Essas moléculas apresentam várias atividades biológicas, em especial no trato gastrointestinal, onde estão relacionadas com a precipitação de proteínas no sítio de localização de úlcera péptica, formando uma película protetora, que promove o reparo do tecido. Portanto, estão relacionados com processos anti-inflamatórios, atividade antioxidante e ainda atividade anti-*Helicobacter pylori* (JESUS et al., 2012).

Considerando a diversidade de atividades descritas e importante aplicação das antocianinas a proposta aqui apresentada refere-se à obtenção do extrato de antocianinas obtida de *E. edulis* e sua aplicação em um produto lácteo, e o desenvolvimento de iogurte suplementado com extratos de *E. edulis* e *P. cupana* e avaliação de suas propriedades físico-químicas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais das espécies empregadas

2.1.1 Gênero *Euterpe*

Palmeiras são plantas monocotiledôneas pertencentes à família Arecaceae (Palmae). A família Arecaceae é representada por cerca de 2600 espécies, com cerca de 240 gêneros, sendo que no Brasil existem 119 espécies em 39 gêneros. O gênero *Euterpe* é composto por cerca de 28 espécies, distribuídas na América Central e América do Sul, principalmente em regiões com florestas (SCHULZ et al., 2016). Entretanto na busca no site www.theplantlist.org observou-se o seguinte para o gênero *Euterpe*: 9 espécies aceitas, 85 sinônimas e 6 espécies não resolvidas (THE PLANTLIST, 2010). Já no site www.tropicos.org observou-se o que segue para o gênero *Euterpe*: 118 espécies sem definição de sinônimas ou espécies aceitas e/ou não resolvidas.

No Brasil, cinco espécies foram encontradas: *Euterpe edulis* Mart., *E. oleracea* Mart., *E. precatória* Mart., *E. catinga* Wallace e *E. longibracteata* Barb. Rodr. Destas, apenas a primeira se distribui até o sul do Brasil pela costa Atlântica, as demais espécies distribuem-se na Floresta Amazônica (BICUDO, 2014).

As espécies distribuídas no Brasil formam cachos de frutos sésseis, esféricos, drupáceos, de cor violáceo-púrpura, e quase negra quando maduros. Cada fruto, que pesa em média 1,5 gramas, possui um caroço e uma fina camada de polpa constituída pelo epicarpo e a parte externa do mesocarpo. A parte interna do mesocarpo é fibrosa e está soldada ao endocarpo lenhoso (HENDERSON, 2000; ROGEZ, 2000).

2.1.2 *Euterpe edulis* Mart.

Euterpe edulis Mart., popularmente conhecido como palmeira juçara, é uma árvore nativa da Mata Atlântica com distribuição geográfica desde o Rio Grande do Norte, Paraíba, Alagoas, Pernambuco, Sergipe, Bahia, Distrito Federal, Goiás, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, além do nordeste da Argentina e sudoeste do Paraguai, em florestas tropicais, entre o nível do mar até 1000 metros de altitude (LIMA, 2012).

A palmeira *E.edulis* atinge até 20 metros de altura na idade adulta. Seu tronco é reto, cilíndrico, não estolonífero (não brota na base). Entre o término do tronco e a parte onde nascem as folhas, há uma seção verde, mais grossa que o tronco, formada pela base do conjunto de folhas, dentro desta seção encontra-se a parte comestível da palmeira (Figura 1A) (IPEF, 2008).



Figura 1. Palmeira Juçara (*Euterpe edulis*). (A) – aspecto da copa; (B) – frutos maduros.

Fonte: Luana M. Tunin (2016).

As folhas são alternas, pinadas, com até 3 metros de comprimento. As pinas são longas e estreitas; as bainhas são bem desenvolvidas formando um coroamento verde muito característico no ápice do caule. As flores são unissexuais, sendo as masculinas em maior número, de coloração amareladas, numerosas, com 3 a 6 milímetros de comprimento, distribuídas em grupo de três, uma feminina entre duas masculinas. A inflorescência é um espádice de 50 a 80 centímetros de comprimento, composto de várias espigas, inseridas abaixo das folhas. A inflorescência está envolta por uma grande bráctea que a protege até o seu desenvolvimento. Os frutos são carnosos, fibrosos, com endosperma muito abundante e não ruminado (IPEF, 2008). Os cachos são formados por milhares de frutos que são fibrosos e globosos com 1 a 1,4 centímetros de diâmetro, do tipo drupa. Durante o desenvolvimento do fruto a casca é verde, passando gradativamente de verde a roxa ou preta quando madura (Figura 1B). O mesocarpo carnoso se encontra entre a casca (epicarpo) e o endocarpo (coquinho). O endocarpo é lenhoso, envolvendo completamente a semente; quando imaturo é facilmente rompido,

adquirindo consistência dura quando o fruto apresenta cor roxa exteriormente (BICUDO, 2014).

Em virtude do intenso extrativismo a conservação e regeneração natural de *E. edulis* foi gravemente prejudicada pelo desmatamento e intensa extração ilegal de palmito. Assim, visando diminuir o processo predatório, organizações sem fins lucrativos e agências governamentais encorajou outras opções para a exploração sustentável desta espécie, principalmente o uso de sua fruta para ser usada no consumo humano (SCHULZ et al., 2016).

A espécie *E. edulis* é uma planta monóica, polinizada por insetos e dispersada por aves e mamíferos. Sua floração ocorre uma vez por ano e pode-se estender de agosto até janeiro, ocorrendo sobreposição entre florescimento e frutificação. O início da fase reprodutiva é determinado por uma série de fatores os quais estão relacionados principalmente ao meio ambiente em que as plantas se encontram. O desenvolvimento do fruto é lento, demorando cerca de oito meses para atingir a maturação. (MANTOVANI e MORELLATO, 2000; BICUDO, 2014)

Segundo Tsukamoto Filho (1999) a altitude tem grande influência sobre o período de amadurecimento dos frutos de juçara, na região litorânea, o período de amadurecimento ocorre de abril a novembro, enquanto nas palmeiras isoladas na mata, ocorre entre abril e junho. O ponto ideal de colheita dos frutos de juçara (*E. edulis*) é determinado de forma semelhante aos frutos de açaí (*E. oleracea*). O ponto final de maturação dos frutos é caracterizado pela coloração violácea a quase negra do epicarpo, consequência da síntese de compostos antociânicos (MANTOVANI; MORELLATO, 2000). A polpa dos frutos de Juçara apresenta em sua composição duas antocianinas principais identificadas como cianidina 3-glicosídeo e cianidina 3-rutinosídeo (BORGES et al., 2011).

A experiência econômica promissora dos frutos de açaí obtido de *E. oleracea* vem servindo como modelo para a obtenção de açaí de juçara, ou juçaí, a partir de *E. edulis* e já existem algumas experiências comerciais no Sul e no Sudeste do Brasil, como Santa Catarina, Paraná e São Paulo, e no sul da Bahia, onde o suco da polpa é ofertado em pequeno volume, devido à escassez do fruto, porém com grande aceitação, principalmente pelo sabor mais adocicado que o do açaí (SILVA, 2005). No ano de 2008, o Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), em parceria com a Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), a Associação dos Produtores Rurais e Artesanais de Antonina, Paraná (ASPRAN) e com apoio do Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e

Pequenas Empresas (SEBRAE), iniciou um projeto com agricultores familiares do município de Antonina para atividades de produção e processamento de frutos de juçara (*E. edulis*) no litoral do Paraná. O manejo dos frutos de juçara, para obtenção do açaí e de sementes, é considerado como uma estratégia importante para a conservação desta espécie e das florestas nativas, além do potencial sócio-econômico, da segurança alimentar e geração de renda das comunidades rurais nos locais de Mata Atlântica (BICUDO, 2014)

2.1.3 Antocianinas

Os flavonoides estão amplamente distribuídos no reino vegetal e constituem uma parte importante da dieta humana. Além de favorecer uma variada coloração em flores, sementes e folhas para atrair polinizadores e disseminadores de sementes, os flavonoides atuam também na sinalização entre plantas e microrganismos, na fertilidade de algumas espécies, na defesa como agentes antimicrobianos e na proteção à radiação UV. Na saúde humana, os flavonoides apresentam atividade antioxidante como sequestrador de espécies reativas de oxigênio (BRITO, 2007).

O pigmento antocianina é um tipo de flavonoide responsável por uma variedade de cores atrativas de frutas, flores e folhas que variam do vermelho ao azul. As antocianinas estão entre os grupos mais importantes de pigmentos naturais extraídos das plantas. O termo antocianina descreve a forma usualmente encontrada na natureza que contém carboidratos sendo classificada como um glicosídeo. O núcleo principal da molécula de antocianina é constituído por três anéis com ligações duplas conjugadas chamada aglicona (livre de açúcar) (LEIDENS, 2005). Existe uma enorme variedade de antocianinas distribuídas na natureza, sendo que as principais diferenças entre estas são o número de grupamentos hidroxílicos, a natureza e o número de açúcares ligados, a posição desta ligação e também a natureza e o número de ácidos alifáticos ou aromáticos ligados ao açúcar na molécula (figura 2) (CASTANEDA-OVANDO et al., 2009), dependendo do perfil dos substituintes nas posições R_1 e R_2 define-se uma antocianidina diferente como apresentado na Tabela 1 (LEIDENS, 2005) . São pigmentos hidrossolúveis possuindo colorações que variam do vermelho ao azul, e são altamente instáveis e suscetíveis a degradação, sendo que sua estabilidade é afetada por fatores como pH, temperatura, estrutura química, luz, oxigênio, solventes, presenças de enzimas e íons metálicos (CASTANEDA-OVANDO et al., 2009).

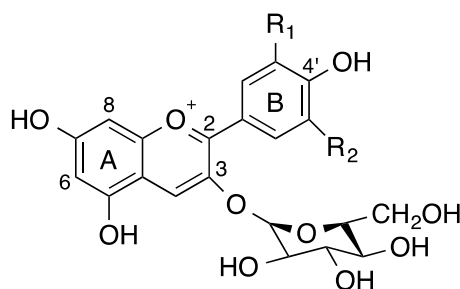


Figura 2. Estrutura química das antocianinas (RUTZ, 2013).

Tabela 1. Substituintes R₁ e R₂ das antocianinas

| Aglicona (Estrutura do Anel B) | | Substituição glicosídica (substituição nas posições 3 e 5) | Acilação (esterificação das hidroxilas do açúcar) |
|---|---------------|---|--|
| R ₁ = R ₂ = H | Pelargonidina | D-glicose | Ácidos cinâmicos |
| R ₁ = OH, R ₂ = H | Cianidina | D-galactose | p-cumárico |
| R ₁ = R ₂ = OH | Delfinidina | D-xilose | Ferúlico |
| R ₁ = OCH ₃ , R ₂ = H | Peonidina | L-ramnose | Caféico |
| R ₁ = OCH ₃ , R ₂ = OH | Petunidina | L-arabinose | Ácidos alifáticos |
| R ₁ = R ₂ = OCH ₃ | Malvidina | Rutinese | Ácético |
| | | Soforose | Malônico |
| | | Sambubiose | Succínico |
| | | Gentiobiose | |

A velocidade de degradação dos pigmentos varia grandemente entre as antocianinas em razão da sua diversidade de estrutura. Geralmente, o aumento da hidroxilação diminui a estabilidade, enquanto o aumento de metilação a aumenta. A cor dos alimentos contendo antocianinas ricas em agliconas do tipo pelargonidina, cianidina ou delfinidina é menos estável que a dos alimentos contendo antocianinas ricas em agliconas do tipo petunidina ou malvidina. O aumento da estabilidade deste último grupo ocorre devido ao fato de os grupos hidroxilados estarem bloqueados (LEIDENS, 2005). A estabilidade das antocianinas apresenta limitações para a indústria alimentícia devido a sua degradação na presença de metais, ácido ascórbico, açúcar, oxigênio, luz e temperatura, porém não impede sua utilização em alimentos, uma vez que se tem demonstrado a sua viabilidade na indústria (RUTZ, 2013).

2.1.4 *Paullinia cupana*

A espécie *Paullinia cupana* Kunth, conhecida popularmente como guaraná pertence à família Sapindaceae (The Plant List, 2013). A distribuição do gênero *Paullinia* ocorre na América tropical e subtropical, com uma única espécie *P. pinnata*

na África tropical, sendo 195 espécies reconhecidas atualmente pertencentes ao gênero *Paullinia* (The Plant List, 2013). A espécie *P. cupana* é um arbusto de planície tropical, nativa do território brasileiro com ampla distribuição nos estados do Amazonas, Acre, Pará, Rondônia, Bahia e Mato Grosso (ATROCH E FILHO, 2018).

Suas folhas medem em torno de 40 cm, seus frutos são cápsulas elipsoidais ou esféricas, medem cerca de 2,0 a 3,0 cm (Figura 3) e quando maduras são vermelhas (MARQUES, et al., 2019).



Figura 3. Frutas guaraná - *Paullinia cupana* (ATROCH; FILHO, 2018).

O Brasil se destaca como importante produtor de guaraná no mundo, satisfazendo a demanda doméstica e internacional, expandindo a área de cultivo da espécie no território nacional (ATROCH; FILHO, 2018). As sementes desta espécie são utilizadas pela indústria alimentícia na produção de refrigerantes mundialmente conhecidos, o que corresponde a aproximadamente 70%, o restante é comercializado em farmácias e estabelecimentos de venda de produtos naturais como pós, cápsulas, comprimidos ou misturados a outros ingredientes (MACHADO et al., 2018). Devido sua importante aplicação na indústria de alimentos e farmacêutica, a produção de sementes de guaraná no Brasil é de 3794 toneladas por ano, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (IBGE, 2012).

As sementes secas do guaraná é a parte comumente empregada comercialmente devido ao seu teor de cafeína (2,5 a 6,0%), responsável por sua atividade estimulante (SCIMPL et al., 2013). Além da cafeína, as sementes secas contêm outras metilxantinas, como teobromina e teofilina (abaixo de 0,3%), assim como taninos condensados (até

16%), predominantemente catequina e epicatequina, embora as procianidinas B1, B2, B3, B4 e A2 foram detectadas e identificadas (KLEIN et al., 2012).

Os compostos fenólicos presentes principalmente nas sementes do guaraná representam recursos antioxidantes para a dieta humana. A maioria dos efeitos do guaraná atribuídos à saúde humana está relacionada ao seu potencial antioxidante devido à presença de taninos (SANTANA; MACEDO, 2018).

Taninos são um grupo de compostos fenólicos que contêm hidroxilas e outros grupos como carboxilas, que conferem a eles capacidade de formar complexos fortes com várias macromoléculas. Devido às características estruturais e propriedades químicas dos taninos, eles podem ser divididos em taninos condensados e hidrolisáveis (ABDI et al., 2018). A molécula de tanino hidrolisável contém um carboidrato, geralmente D-glucose como núcleo central. Os grupos hidroxila desses carboidratos são esterificados com grupos fenólicos tais como ácido gálico ou ácido elágico. O tanino hidrolisável ocorre principalmente em sementes de frutas e nas partes aéreas das plantas. Os taninos condensados, também conhecidos como proantocianidinas, pertencem a uma classe de metabólitos secundários formados pela polimerização de flavan-3-ol monoméricos; isto é, catequinas, epicatequinas, procianidinas e seus derivados (SOLAIMAN; SENOO, 2018).

2.2 Leites fermentados

Atualmente a preocupação com a saúde e com a qualidade de vida tem feito com que a procura por alimentos que ofereçam benefícios a saúde humana, aumente. Neste contexto, aparecem os alimentos funcionais, que são aqueles que fornecem uma nutrição básica e que geram benefícios à saúde através de mecanismos não previstos na nutrição convencional, lembrando que esses alimentos têm o objetivo de promover saúde e não a cura de doenças (BECKER, 2009; SANTOS et al., 2011). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) alimentos funcionais são alimentos ou ingredientes que alegam propriedades funcionais ou de saúde, que além de atribuírem funções nutricionais básicas, produzem efeitos metabólicos e ou fisiológicos, devendo ser seguros para o consumo humano sem supervisão médica (ANVISA, 1999). A indústria de laticínios vem se destacando nesse aspecto com o maior número de

produtos funcionais, através da adição de probióticos e prebióticos em alimentos como o iogurte e os leites fermentados (WENDLING, 2013).

De acordo com a legislação brasileira os leites fermentados podem ser classificados em leite fermentado ou cultivado, iogurte, kefir, leite acidófilo ou acidofilado, kumys e coalhada, onde o principal fator que os diferencia é o tipo de microorganismo utilizado para a inoculação. Esses produtos devem também atender aos padrões de identidade e qualidade, que garantem ao consumidor um alimento padronizado, seguro e de qualidade (BRASIL, 2007). Considera-se que os leites fermentados apresentem propriedades terapêuticas por incluírem em sua composição bactérias como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* que apresentam características probióticas, e essas apresentam efeitos bioquímicos sobre os nutrientes do leite e efeitos fisiológicos sobre o consumidor (WENDLING, 2013).

A adição de antioxidantes e corantes derivados de fontes naturais, como de extratos vegetais em alimentos e outros materiais biológicos tem atraído um interesse considerável devido a segurança presumida e potenciais efeitos nutricionais e terapêuticos. A incorporação de corantes naturais aos sistemas alimentares enfrenta diferentes desafios, como a sua estabilidade relativamente baixa ao processamento, condições de armazenamento, e a presença de odores indesejáveis ou características de sabor (WALLACE E GIUST, 2008).

Neste contexto a associação de extratos vegetais em produtos lácteos para o desenvolvimento de novos produtos alimentares que visem o controle e/ou a profilaxia de doenças é de suma importância, além disso produtos lácteos ricos em fenólicos como as antocianinas, conferem aos produtos importantes propriedades tecnológicas, além de cor e propriedades antioxidantes.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Este trabalho teve por objetivo extrair e caracterizar antocianinas presentes no extrato de *Euterpe edulis* e o desenvolvimento de um produto lácteo. Além disso, produzir iogurte com a suplementação de extrato e micropartículas de *Euterpe edulis* e *Paullinia cupana* e avaliar suas propriedades físico-químicas.

3.2 Objetivos específicos

- Preparar extrato rico em antocianinas a partir do extrato bruto de *Euterpe edulis*.
- Isolar e caracterizar a antocianina majoritária presente no extrato rico em antocianinas de *Euterpe edulis*.
- Desenvolver um método analítico e validar por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para avaliação do extrato rico em antocianinas.
- Desenvolver um produto lácteo contendo extrato rico em antocianinas e avaliar a sua estabilidade físico-química.
- Desenvolver um iogurte contendo extrato e micropartículas de *Euterpe edulis* e *Paullinia cupana*.
- Avaliar a estabilidade físico-química dos iogurtes: cor, pH, acidez titulável, microestrutura, viabilidade dos microrganismos fermentadores e análise de textura.

Dessa forma este trabalho foi dividido em duas partes na forma de artigos científicos a saber:

Artigo 1: Development of an analytical method for anthocyanins from *Euterpe edulis* and its application in a natural food product

Artigo 2: Desenvolvimento de iogurte funcional contendo extratos de *Euterpe edulis* e *Paullinia cupana*

4 ARTIGO 1

Development of an analytical method for anthocyanins from *Euterpe edulis* and its application in a natural food product

Luana Magri Tunin; Mariana Nascimento de Paula; Graciete Matioli; Daniela Cristina de Medeiros; Claudio Roberto Novello; Emilene Dias Fiuza Ferreira; João Carlos Palazzo de Mello.

Development of an analytical method for anthocyanins from *Euterpe edulis* and its application in a natural food product

Luana Magri TUNIN¹; Mariana Nascimento DE PAULA¹; Graciette MATIOLI²; Daniela Cristina de MEDEIROS¹; Claudio Roberto NOVELLO²; Emilene Dias Fiuza FERREIRA¹;
João Carlos Palazzo de MELLO¹

¹Laboratory of Pharmaceutical Biology, Department of Pharmacy, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, BR-87020-900, Maringá, Brazil.

²Department of Pharmacy, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, BR-87020-900, Maringá, Brazil.

³Academic Department of Chemistry and Biology, Federal Technological University of Paraná, Linha Santa Barbara. BR-85601-970, Francisco Beltrão, Brazil.

Address correspondenceto: João Carlos Palazzo de Mello

Department of Pharmacy, State University of Maringá, BR-87020-900, Maringá, Brazil.

Tel.: +55-44-30114627; Fax: +55-44-30115050; E-mail: mello@uem.br

Development of an analytical method for anthocyanins from *Euterpe edulis* and its application in a natural food product

Abstract

The *Juçara* palm (*Euterpe edulis* Mart., Arecaceae) is a plant native to the Atlantic Forest; its fruit contains high concentrations of anthocyanins. The development of an analytical methodology by HPLC is one of the strategies to characterise the extract and for the evaluation of dairy products containing free and encapsulated extract. Cyanidin-3-*O*-rutinoside was isolated and identified as the major compound, showing a molecular ion $[M+H]^+ m/z$ 595, and the NMR data were in accordance with the literature. The validated method was performed according to the following parameters: linearity ($R^2=0.994$); LOD, 19.04 $\mu\text{g/mL}$; LOQ, 57.7 $\mu\text{g/mL}$; accuracy (RSD% < 5); recovery, 104.85 $\mu\text{g/mL}$; and robustness. Pigment stability was evaluated in terms of concentration, colour and pH during 21 days of storage. The colouring of the dairy product remained stable for nine days, as did the concentration of anthocyanins. The pH remained stable at the end of the test.

Keywords

Euterpe edulis; cyanidin-3-*O*-rutinoside, isolation, validation, dairy product.

1. Introduction

Recent epidemiological studies indicate that the consumption of natural foods, such as fruits and vegetables, reduces the risk of cardiovascular diseases and decreased blood pressure. Fruit consumption is universally recommended due to their provision of nutrients such as vitamins and minerals, especially electrolytes, and phytochemicals such as antioxidant compounds (Slavin & Lloyd, 2012). These are associated with protective effects for human health, in contrast to the deleterious effects caused by synthetic additives; such information contributes to the search for new sources and natural substances (Santana, Cano-Higuita, de Oliveira, & Telis, 2016). One of the characteristics of food and drink is colour, which, in addition to other functions, is considered important for the acceptability of the food product by the consumer. In industrial production, colouring foods and beverages with synthetic dyes to make them more attractive to the consumer is a practice often employed. However, the demand for food with these additives has been declining dramatically due to their associated health problems (Byamukama, Andima, Mbabazi, & Kiremire 2014).

Euterpe edulis Mart. (Arecaceae), popularly known as *Palmito Juçara*, is a palm native to the Atlantic Forest, distributed mainly in the states of the south and southeast regions of Brazil. Its fruits have a rounded shape, and dark purple colouring due to them of anthocyanin content and are similar to *Açaí* (*Euterpe oleracea* Mart.) with regard to their nutritional and sensory properties, as well as their form of consumption (Silva, Rodrigues, Mercadante, & de Rosso, 2014).

Anthocyanins, belonging to the group of flavonoids, are responsible for the determination of colour ranging from red to blue in a wide variety of plant species and also for the purple colour of the fruits of *Juçara* during maturation (Brito, Araújo, Alves, Carkeet, Clevidence, & Novotny, 2007; Schulz, Borges, Gonzaga, Costa, & Fett, 2016; Yamaguchi, Pereira, Lamarao, Lima, & da Veiga-Junior, 2015).

The pulp of the ripe *Juçara* fruits is prepared in water; the seeds are separated, and a thick dark purple pulp obtained. For its conservation, freezing is essential to maintain its quality if not consumed promptly; the pulp can be used to produce juices, liquor, ice cream, and other products rich in anthocyanins (Vieira, Cavalcanti, Meireles, & Hubinger, 2013). The anthocyanins present in the fruits of *Juçara* are excellent flavouring agents and antioxidants for food products; notable among these are dairy products with high nutritional quality and rich in lipids and minerals (Geraldi, Tulini, Souza, & Martinis, 2017). These characteristics have aroused interest in

the food industry to add these compounds to functional foods, allowing them to be more bioavailable than their natural sources(Gomes, Costa, Falcão, & Araújo,2014). In this sense, yogurts and their dairy derivatives are the main food vehicles of probiotic cultures categorised as functional foods marketed worldwide and increasingly.

In order to protect and maintain the stability of the anthocyanin compounds against light and oxygen, strategies such as microencapsulation are widely used Tonon, Brabet, &Hubinger (2008).

In this sense, the objective of the present study was to isolate and identify the major compound present in the extract of *Juçara*, as well as to develop an analytical method using HPLC to characterise them, to apply the analytical method in the evaluation of a dairy product containing *Juçara* extract, and to study the stability of the free and encapsulated anthocyanins in the dairy product.

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals and reagents

Methanol (J.T. Baker; HPLC grade), trifluoroacetic acid (TFA; J.T. Baker), and formic acid (J.T. Baker; analytical grade) were used for HPLC. Analytical grade standard of cyanidin-3-*O*-rutinoside ($\geq 98.5\%$ purity; PhytoLab, Germany) was used as external standard. Ethanol (analytical grade; Merck) and Milli-Q ultrapurified water (Millipore, USA) were also used throughout the study.

2.2 Plant material

The fruit pulp of *Euterpe edulis* Mart. was purchased in Antonina, State of Parana, Brazil (S 25°15'41"; W 48°44'23"; h=14m) in May 2016. A voucher specimen was deposited at the Herbarium of the State University of Maringá under number HUEM#30125 and identified by Prof. Dr. Maria Conceição de Souza.

2.3 Preparation of *Juçara* extracts (JCE)

The extraction of anthocyanins was carried out according to the methodology proposed by (Castañeda-Ovando, Pacheco-Hernández, Páez-Hernández, Rodríguez, & Galán-Vidal, 2009) with some modifications. The extraction was performed using a 1:2 ratio of the pulp of the *Juçara* palm fruit (500g) to a solution of ethanol/water (7:3v/v). The mixture was stirred for 40 min protected from light and filtered. The sample was defatted by extraction with three consecutive aliquots of 150mL of ethyl ether/petroleum ether (1:1v/v). The extract was concentrated to 30% of the initial volume in a rotary evaporator (Büchi R-135) under reduced pressure at 45 °C, lyophilised (Alpha 1–4, Christ), and stored at –20 °C to yield a crude extract (JCE, 6.0 g).

2.4 Apparatus and chromatographic conditions

The HPLC system consisted of a Thermo HPLC equipped with an integral degasser (Finnigan Surveyor LC Pump Plus), PDA spectrophotometric detector module (Finnigan Surveyor PDA Plus Detector), controller software (Chromquest), and autosampler (Finnigan Surveyor Autosampler Plus) equipped with a 10 μ L loop for injection. Chromatographic separation was conducted using a RP-18 analytical column (Phenomenex Gemini, 150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m), and a C-18 guard cartridge system (4.0 mm \times 3.0 mm, Phenomenex). A 1.00 mg portion of sample was dissolved in 2 mL of 20% methanol and eluted throughout the solid-phase extraction cartridge (SPE, C-18, Phenomenex) preconditioned with methanol and water then diluted in 10 mL of 20% aqueous methanol. The mobile phase consisted of phase A: water containing 0.25% TFA, and phase B: methanol with 0.25% TFA, previously degassed using an ultrasonic bath. A gradient program was used as follows: 0–5 min, 10% phase B; 5–13 min, 20% phase B; 13–20 min, 25% phase B, 20–30 min, 40% phase B; 30–34 min, 45% phase B, 34–38 min, 70% phase B; 38–40 min, 10% phase B, followed by 4 min post-time to re-equilibrate the system, at a flow rate of 0.4 mL/min. The eluent was monitored by a PDA, and the detection wavelength was set at 520 nm. The sample injection volume was 10 μ L.

2.5 Isolation and characterisation of the compound cyanidin-3-O-rutinoside

The isolation of anthocyanins was carried out according to Fossen, Slimestad, Ovstedal and Andersen (2000) with some modifications. A Sephadex LH-20 column (500 \times 60 mm) was used to separate the anthocyanins of the JCE (3.0 g). The pigment was eluted with increasing amounts of MeOH and TFA in H₂O (from 19.8% and 0.2%, respectively, to 69.8% and 0.7%, v/v) to yield 265 fractions of 10 mL each. The fractions were analysed by HPLC (section 2.4), and it was observed a pure compound from fractions 75 to 110.

The mass spectrometric analysis of pure compound was carried out using an aliquot of 1 mg/mL in 1:1 (v/v) HPLC-grade water solubilised/acetonitrile using a Q-TOF mass spectrometer (Bruker) with electrospray ionisation source, an acquisition rate of 5 Hz (MS and MS/MS), and the equipment tuned in the range of m/z 50–1300. The analyses were performed in positive ionisation mode, with capillary voltage of 4.50 kV, temperature of the source 180 °C, and desolvation gas flow 8 L/min. Daughter scan experiments were performed using collision-induced dissociation (CID) obtained using

collision energy of 30 eV. The obtained MS and MS/MS spectra were visualised through DataAnalysis 4.1 software, compared to the literature, and fragmentation proposals were presented for the fragments observed taking into account the error values in ppm.

The isolated compound (20 mg) was analysed by ^1H NMR using deuterated dimethylsulfoxide ($\text{DMSO-}d_6$) in an Avance III HD, 500 MHz Bruker instrument (superconducting magnet 11.74 T, model 500'54 Ascend ULH; 5 mm multinuclear probe PABBO BB/19F-1H). According Pedersen, Andersen, Aksnes, and Nerdal (1993) the pure compound was analysed at 1, 7, and 19 days by ^1H NMR using deuterated methanol acidified with 5% TFA- d_1 in an Avance III HD, 500 MHz Bruker instrument, for analysis of the H-6 and H-8 positions of ring A.

Pure compound: ^1H NMR ($\text{DMSO-}d_6$; 500 MHz; δ in ppm; J = Hz): 9.12 [1H, s, H-4], 7.01 [1H, sl, $J < 2.0$, H-6], 7.16 [1H, sl, $J < 2.0$, H-8], 7.70 [1H, d, $J = 2.1$, H-2'], 7.45 [1H, d, $J = 8.2$, H-5'], 7.55 [1H, dd, $J = 2.1, 8.2$, H-6']; **3-O-Glucosyl**: 5.73 [1H, d, $J = 8.24$, H-1''], 3.70–3.80, [3H, m, H-2'', H-3'', H-4''], 3.90 [1H, m, H-5''], 4.2 [1H, m, H-6b''], 4.45 [1H, m, H-6a'']; **6''-O- α -Rhamnosyl**: 5.40 [1H, d, $J = 1.2$, H-1'''], 4.01 [1H, d, $J = 9.16$, H-2'''], 3.94 [1H, dd, $J = 18.00\text{--}6.00$, H-3'''], 3.78 [1H, dd, $J = 9.46\text{--}8.24$, H-4'''], 4.50 [1H, dd, $J = 8.24\text{--}9.46$, H-5'''], 1.95 [1H, d, $J = 6.40$, H-6''']. ^{13}C NMR ($\text{DMSO-}d_6$; 125 MHz; δ in ppm): 159.47 [C-2], 146.01 [C-3], 132.32 [C-4], 159.20 [C-5], 103.28 [C-6], 159.74 [C-7], 101.93 [C-8], 159.07 [C-9], 114.20 [C-10], 101.89 [C-1'], 116.10 [C-2'], 152.38 [C-3'], 154.88 [C-4'], 116.70 [C-5'], 117.65 [C-6']; **3-O-Glucosyl**: 98.85 [C-1''], 74.10 [C-2''], 76.38 [C-3''], 69.75 [C-4''], 77.86 [C-5''], 67.81 [C-6a'']; **6''-O- α -Rhamnosyl**: 101.95 [C-1'''], 71.91 [C-2'''], 71.77 [C-3'''], 73.19 [C-4'''], 71.93 [C-5'''], 19.17 [C-6'''].

2.6 Analytical development method (method validation)

Validation of the method by HPLC (see conditions in 2.4) followed the AOAC (AOAC, 2012) in the parameters selectivity/specificity, linearity, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), precision, accuracy, and robustness.

For the calibration curve used in the quantification of anthocyanins, cyanidin-3-*O*-rutinoside, isolated in this study (96.4% purity) was used, similar to the purity grade of the primary standard (PhytoLab, 98.5%).

2.6.1 Selectivity/specificity

Selectivity is the degree to which the method can quantify the target analyte in the presence of other analytes, matrixes, or other potentially interfering materials. The selectivity of the proposed method was demonstrated by the resolution of the analyte peak investigated and the absence of sample interferences observed in the UV-vis detector (520 nm).

2.6.2 Linearity

The standard solution of cyanidin-3-*O*-rutinoside (1 mg/mL) was prepared in 20% methanol, and appropriate dilutions were made to obtain 10 concentrations (25–250 µg/mL) to acquire the calibration curve. The slope (S) and the other statistics of the calibration curves were calculated by linear regression.

2.6.3 Limit of Detection and Limit of Quantification

The LOD and LOQ were calculated based on the standard deviation (SD) and the slope (S) of the calibration curve based on Equations (1) and (2).

$$LOD = (3.3 \times SD) / S \quad \text{Equation (1)}$$

$$LOQ = (10 \times SD) / S \quad \text{Equation (2)}$$

2.6.4 Precision

The precision was evaluated at two levels: repeatability, intermediate precision, and reproducibility on different days and with different analysts, expressed by relative standard deviation (%RSD). To be considered precise, the method must present an RSD < 5%, and a confidence level of at least 95% in the variance analysis (ANOVA), with *p*-value < 0.05.

2.6.5 Accuracy

Accuracy was determined by the recovery of the method from the triplicate injection of solutions of three known concentrations of the cyanidin-3-*O*-rutinoside standard: 25.0, 125.0, and 250.0 µg/mL added to the sample matrix. The recovery data were determined by dividing the value obtained for the sample prepared with the added standard by the amount added and then multiplying by 100.

2.6.6 Robustness

Robustness was determined by applying two-way ANOVA for comparison between standard (pH 2.6 and flow 0.4 mL/min) and tested (pH 2.2 and 2.4, flow 0.3 and 0.5 mL/min) conditions.

2.7 Preparation of microparticles containing *Euterpe edulis* extract (EEM)

Dispersion of JCE/maltodextrin in the ratio 1:5 (w/w) as a suspension was dried using a mini spray dryer (LM-MSD 1.0). The inlet temperature was 150 °C, aspiration 80%, pressure established 3 Bar, and pump of 6%. The outlet temperature was 75 °C (Bicudo, Ribani, & Beta, 2014; Klein, Longhini, Bruschi, & Mello, 2015).

2.8 Application in functional food

2.8.1 Incorporation of extract and microparticles of anthocyanin into dairy product

Dairy product was prepared according to the methodology described by Wallace (2008) with some modifications. The dairy product was prepared by addition of a commercial dairy product culture (Batavo, Brazil), consisting of *Lactobacillus delbrueckii* sub sp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* to 2 L of UHT milk at 42°C, which was kept incubated (Mec Milk, Brazil) for 6 h at the same temperature. The product was then cooled to 4 °C and then refined sugar 10% (w/v) and 0.1% of the JCE or microcapsules containing the equivalent of *Juçara* extract were added.

2.8.2 Extraction of anthocyanin pigments from the dairy product.

Anthocyanins were recovered from the dairy product containing the JCE(0.1%) and EEM(1.0%) using the method described by Wallace and Giusti (2008) with some modifications. Dairy product samples (1.0 g) were blended with 3.0mL of 0.01% HCl-acidified methanol for 2 min using a Digital IR Vortex Mixer and centrifuged at $1070.16\times g$ for 15 min using an Excelsa 2 centrifuge. The supernatant was used for HPLC analysis (see 2.4) in triplicate.

2.8.3 Physico-chemical analysis of dairy product: pH, colouring, and quantification of cyanidin-3-O-rutinoside marker

The pH was measured with a pHmeter (PHS3BWBEL). Colour parameters were determined according to the methodology described by Matumoto-Pintro, Rabiey, Robitaille and Britten (2011) using a Minolta colorimeter (Minolta Chroma Meter CR 400). Dairy product samples (approximately 40mL) were transferred to plastic pots for reading by reflectance of the coordinates L* (luminosity), a* (intensity of +red and – green), and b* (intensity of +yellow and –blue). The values for each sample were obtained through an average of three readings. The colour was measured every four days for a period of 1 to 21 days storage at 4 °C. The quantification of cyanidin-3-O-rutinoside in the dairy product was performed by HPLC according method validation described in Section 2.6.

2.9 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Statistic®7.0 software. All experiments were performed in triplicate at least. Data were analysed by one-way ANOVA, in which the results were considered significant when the probability was less than 5% ($p < 0.05$), followed by the Tukey test for multiple comparisons.

3 Results and Discussion

3.1 Isolation and characterisation of cyanidin-3-O-rutinoside

The major anthocyanin compound present in the extract was isolated on a Sephadex LH-20 preparative column. Identification of the isolated compound was certified by its molecular ions in electrospray mass spectra (m/z 595). As shown Figure 1A, the molecular ion and its fragments were used to confirm the identity of the isolated anthocyanin. The retention time of the isolated anthocyanin was 25.4 min, showing

molecular ion m/z 595, and suggesting the presence of cyanidin-3-*O*-rutinoside, which was confirmed by the ion fragment m/z 449 (rhamnoside molecule) and ion m/z 287, which corresponds to aglycone cyanidin.

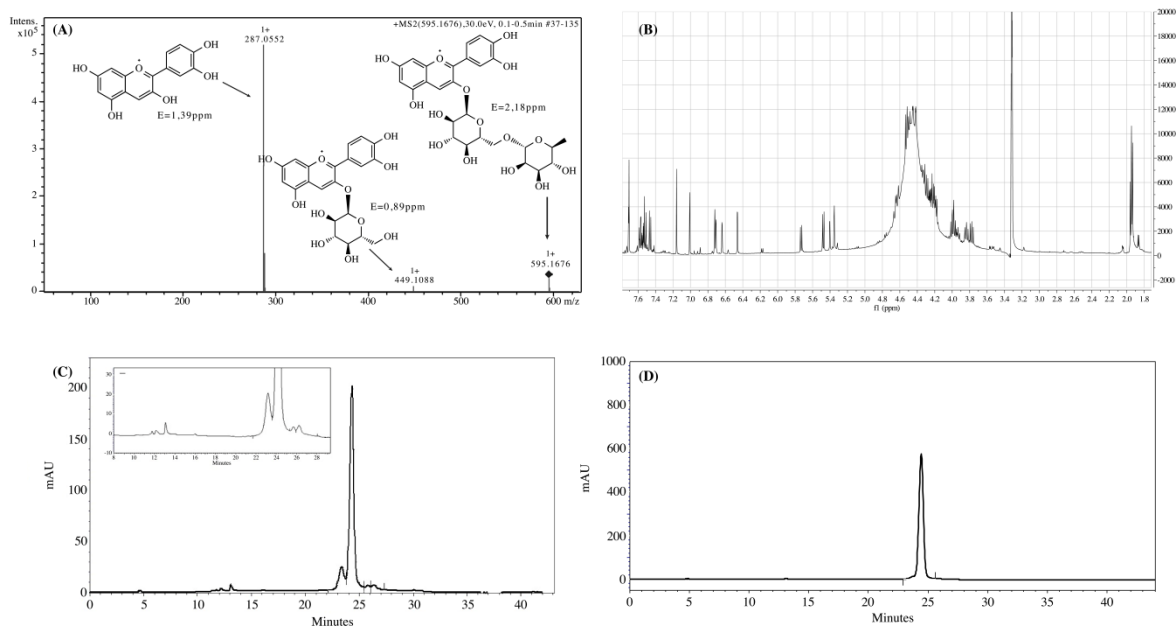


Figure 1. Data of cyanidin-3-*O*-rutinoside: (A) MS-MS spectra, (B) ^1H NMR, (C) HPLC of extract and, (D) HPLC of cyanidin-3-*O*-rutinoside standard.

The NMR spectral data in comparison with literature (Kucharska & Oszmianski, 2002) confirmed the compound as cyanidin-3-*O*-rutinoside (data in Section 2.5). It was observed in the literature that the coupling constant of H-6 at $\delta = 6.69\text{ppm}$, $^3J_{\text{H}_6/\text{H}_8} = 1.9\text{Hz}$ is clear, but that of H-8 at $\delta = 6.91\text{ppm}$ was not possible to determine. The NMR spectra at 1, 7, and 19 days (Figure 2) were performed just to confirm the position of H-6 and H-8 of the A-ring, according to Pedersen et al (1993). It was observed that there were no differences between them. So, the position for H-6 and H-8 can be confirmed, as mentioned above.

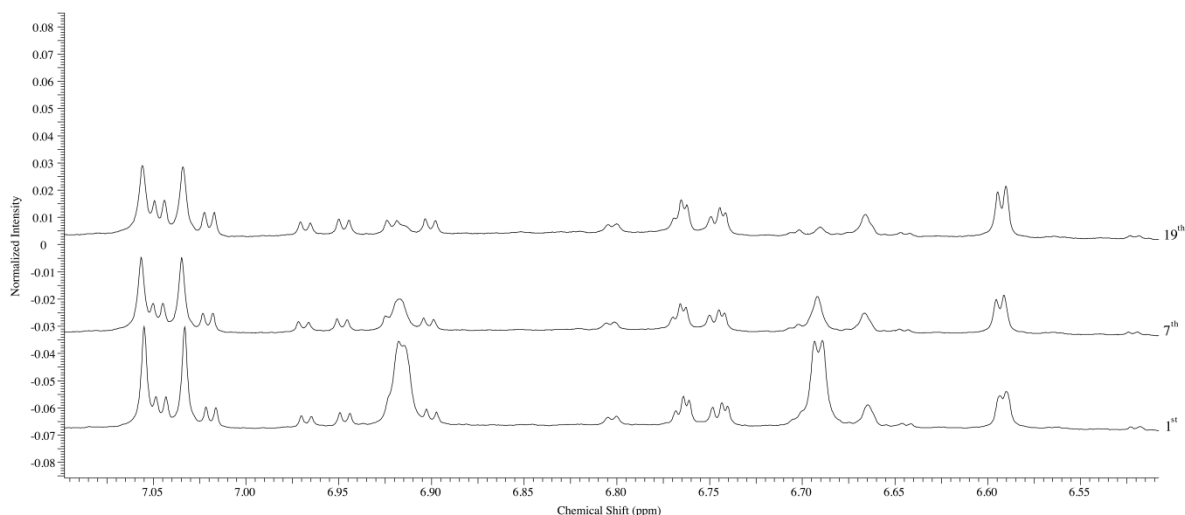


Figure 2. ^1H NMR of cyanidin-3-*O*-rutinoside at 1, 7, and 19 days (500MHz, CD_3OD acidified with 5% TFA-*d*₁).

The isolated compound, cyanidin-3-*O*-rutinoside, was compared by HPLC with a reference standard from PhytoLab, and presented 96.4% and 98.5% purity, respectively (Figure 1C, 1D).

The HPLC of the extract solution of *E. edulis* (JCE) in 20% methanol revealed a mixture of anthocyanins present (Figure 1C). Based on the UV-vis spectra recorded during HPLC analysis, the pigments of this group showed visible absorption around 520 nm, which has already been reported in other studies using *E. edulis* (Bicudo, Ribani, & Beta, 2014; Brito, 2007; Gouvêa, Araújo, Schulz, Pacheco, Godoy, & Cabral, 2012).

It has been reported the isolation of anthocyanin cyanidin 3-*O*-rutinoside in other species, such as, the fruits of *açai* (*Euterpe oleracea* Mart.) and *Prunus padus* L. (Bicudo et al, 2014; Gouvêa et al, 2012; Kucharska et al, 2002; Vieira, Marques, Machado, Silva, & Hubinger, 2017).

3.2 Method validation

3.2.1 Selectivity/specificity, linearity, LOD and LOQ

The selectivity/specificity of the proposed method was demonstrated by the resolution of the analyte peak investigated (Figure 1C), and the absence of sample interferences observed in the UV-vis detector (520 nm). The calibration curves with three standard solutions of cyanidin-3-*O*-rutinoside and the 10 concentrations used were obtained by appropriate dilutions of standard solutions in 20% methanolic solution.

Statistical analysis showed that the method is linear [$y = 70167x + 132018$, $n = 3$; $r = 0.9970$; $R^2 = 0.994$] with acceptable values for the regression analysis according results demonstrated. The LOD (19.04 $\mu\text{g/mL}$) is defined as the smallest amount of analyte in a sample that can be detected but not necessarily quantified as an exact value; the LOQ (57.7 $\mu\text{g/mL}$) of an individual analytical procedure is the smallest amount of analyte in a sample that can be quantitatively determined with suitable precision and accuracy. They were calculated by the ratio between the standard error (SE) and the slope of the line obtained from the calibration curve. The results can be observed above and are in according with AOAC (AOAC, 2012).

3.2.2 Precision

The precision of the method is shown in Table 1, at low, medium, and high levels. Intra-run precision was performed on the same day, with the same chromatographic conditions and analyst. Inter-run repeatability was determined in a similar way, as mentioned above, but on different days. For the determination of the intermediate precision, the chromatographic conditions were maintained, but the day and the analyst were different.

Table 1. Results of intra-day, inter-day and intermediate accuracy of the method for quantification of anthocyanins by HPLC-DAD and results of anthocyanin recovery in *Euterpe edulis* extract.

| Standard | Repeatability | | | Repeatability | | | Intermediate | | |
|-------------|---------------|--------|------|---------------|--------|------|--------------|--------|------|
| | (intra-day) | | | (inter-day) | | | precision | | |
| | Low | Medium | High | Low | Medium | High | Low | Medium | High |
| Cyn-3-O-rut | 2.73 | 4.89 | 3.66 | 3.12 | 2.68 | 4.38 | 4.77 | 2.86 | 2.79 |

Concentration level followed the analytical curve linear range.

The precision was expressed as %RSD, and the data obtained presented values lower than 5%. One-way ANOVA results showed that there was no significant difference ($p < 0.05$) between the intra-day inter-day, and with different analysts.

3.2.3 Accuracy

The results were expressed as %RSD of the peak areas as follows. The recovery obtained from the method showed low $104.1 \pm 2.2\%$, medium $112.8 \pm 3.1\%$, and high

97.8 ± 0.5% values, considered acceptable according to AOAC (80–120%) (AOAC, 2012).

3.2.4 Robustness

The results are described in Table 2. The robustness evaluation was performed changing the parameters pH and mobile phase flow. Significant differences in retention time for cyanidin-3-*O*-rutinoside were observed, demonstrating that changes in both the mobile phase flow and pH compromise the retention time of the compound. Therefore, the proposed method is robust just within the standard conditions.

Table 2. Evaluation of the robustness of the method for quantification of anthocyanins by HPLC-DAD.

| Flow rate (mL/min) | 1 st condition pH = 2.4 | 2 nd condition pH = 2.2 |
|-------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Cyn-3- <i>O</i> -rut RT (min) | | |
| 0.4 | 25.53 ± 0.28 (*) | 26.28 ± 0.26 (**) |
| 0.3 | 28.98 ± 1.22 (*) | 29.71 ± 0.12 (**) |
| 0.5 | 23.46 ± 0.15 (**) | 24.18 ± 0.00 (***) |

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

The methodologies described in the literature for the determination of anthocyanins in plant extracts and food products are insufficient, and in general very few are validated (Canuto, Oliveira, da Conceicao, Farah, & Tavares, 2016). The characterisation of these compounds using reliable analytical methods is of great value for quality control of the food products obtained, besides guaranteeing the reliability in the analyses carried out in order to minimise the risks for producer and consumer (Dias, Rozert, Chataigné, Oliveira, Rabelo, Hubert, Rogez, & Quetin-Leclercq, 2012).

3.3 Chemical physical analysis of dairy product: pH, colouring, and quantification of cyanidin-3-*O*-rutinoside marker

The results were measured at 4-day intervals. The results are presented in Table 3.

Table 3. Chemical physical analysis of yogurt by colouring, pH, and stability.

| Dairy product | Period of storage (days) | | | | | |
|--------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | 1 | 5 | 9 | 13 | 17 | 21 |
| pH control | | | | | | |
| 1 | 4.28 ± 0.08 ^(*) | 4.24 ± 0.00 ^(*) | 4.17 ± 0.01 ^(*) | 4.11 ± 0.01 ^(*) | 4.11 ± 0.00 ^(*) | 4.10 ± 0.00 ^(*) |
| 2 | 4.22 ± 0.03 ^(*) | 4.25 ± 0.00 ^(*) | 4.22 ± 0.00 ^(*) | 4.16 ± 0.00 ^(*) | 4.18 ± 0.00 ^(*) | 4.18 ± 0.00 ^(*) |
| Anthocyanin (µg/mL) | | | | | | |
| 1 | 38.32 ± 1.01 ^(***) | 26.34 ± 1.46 ^(***) | 20.14 ± 0.89 ^(***) | 19.07 ± 1.30 ^(***) | 18.05 ± 0.89 ^(***) | 14.86 ± 1.50 ^(***) |
| 2 | 39.73 ± 0.88 ^(***) | 30.37 ± 1.86 ^(***) | 15.97 ± 0.94 ^(***) | 14.03 ± 0.60 ^(***) | 13.36 ± 0.56 ^(***) | 7.85 ± 0.53 ^(***) |
| Colour measurement(a) | | | | | | |
| 1 | 15.23 ± 0.01 ^(***) | 14.34 ± 0.02 ^(***) | 13.31 ± 0.02 ^(***) | 12.92 ± 0.03 ^(***) | 12.56 ± 0.03 ^(***) | 12.57 ± 0.11 ^(***) |
| 2 | 15.53 ± 0.22 ^(***) | 14.99 ± 0.02 ^(***) | 13.68 ± 0.04 ^(***) | 13.08 ± 0.02 ^(***) | 12.81 ± 0.02 ^(***) | 12.75 ± 0.05 ^(***) |

* $p > 0.05$ ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; 1) dairy product + JEC; 2) dairy product + EEM.

The results obtained for pigment stability presented a statistical difference (p -value < 0.0001) during the 21 days of storage, indicating that the concentration of anthocyanins decreased in all evaluated days (Table 3). In a similar study, Byamukama et al (2014) observed that the stability of anthocyanin pigments increases when the concentration levels of anthocyanins added to yogurt also increase. The increased stability of the pigment at high concentration is attributed to the stabilisation of anthocyanin through the intermolecular association between anthocyanins and between anthocyanins and other flavonoids, amino acids, organic acids, nucleotides, polysaccharides or metals that could be present in the matrix (Castañeda-Ovando et al, 2009). The polymerisation of monomeric anthocyanins with other phenolic compounds causes gradual loss of anthocyanins. The lactic acid generated in the yogurt fermentation process produces hydrogen peroxide, which accelerates the degradation of anthocyanins, or the lactic acid culture probably produces β -glycosidases, which convert anthocyanins into their more unstable forms of aglycones (Ścibisz, Mitek, & Zaręba, 2012). It can be supposed that one or more of these factors may have caused

gradual degradation of the anthocyanins added to the yogurt, promoting a decrease in the pH of the medium (Table 3).

In this way it can be affirmed that the stability of the product does not exceed nine days, considering the control of pH, and by which time the concentration of anthocyanins reduces drastically by about 50%.

Conclusions

It was possible to isolate and identify the major compound, cyanidin-3-*O*-rutinoside. The methodology developed by HPLC for the quantification of anthocyanins showed linearity, precision and accuracy; the robustness conditions evaluated indicated that the analytical conditions cannot be altered; the method can be considered valid.

The product elaborated containing free and encapsulated *Juçara* extract was shown to be stable until day nine. The stability test demonstrated that the colouring of the dairy product remained stable for nine days, as did the concentration of anthocyanins; however, that had reduced drastically after 21 days. The pH remained stable at the end of the test.

Acknowledgements

The authors acknowledge the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Grant#402588/2013–4), PhytoLab GmbH & Co. KG for the donation of cyanidin-3-*O*-rutinoside standard, and Andressa Blainski Pinha (Manager, Pharmaceutical Technical Services Finzelberg GmbH & Co. KG) for collaboration.

References

- Bicudo, M. O., Ribani, R. H., & Beta, T. (2014). Anthocyanins, phenolic acids and antioxidant properties of Jucara fruits (*Euterpe edulis* M.) along the on-tree ripening process. *Plant Foods for Human Nutrition*, 69(2), 142-147.
- Brito, E. S., Araújo, M. C., Alves, R. E., Carkeet, C., Clevidence, B. A., & Novotny, J. A. (2007). Anthocyanins present in selected tropical fruits: acerola, jambolão, jussara, and guajiru. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(23), 9389-9394.
- Byamukama, R., Andima, M., Mbabazi, A., & Kiremire, B. T. (2014). Anthocyanins from mulberry (*Morus rubra*) fruits as potential natural colour additives in yoghurt. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 8(12), 182-190.
- Canuto, G. A., Oliveira, D. R., da Conceicao, L. S., Farah, J. P., & Tavares, M. F. (2016). Development and validation of a liquid chromatography method for anthocyanins in strawberry (*Fragaria* spp.) and complementary studies on stability, kinetics and antioxidant power. *Food Chemistry*, 192, 566-574.
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. L., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A. & Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: a review. *Food Chemistry*, 113, 859-871.
- Dias, A. L. S., Rozert, E., Chataigné, G., Oliveira, A. C., Rabelo, C. A. S., Hubert, P., Rogez, H., & Quetin-Leclercq, J. (2012). A rapid validated UHPLC–PDA method for anthocyanins quantification from *Euterpe oleracea* fruits. *Journal of Chromatography B*, 907, 108-116.
- Fossen, T., Slimestad, R., Ovstedal, D. O., & Andersen, O. M. (2000). Covalent anthocyanin-flavonol complexes from flowers of chive, *Allium schoenoprasum*. *Phytochemistry*, 54(3), 317-323.
- Geraldi, M. V. T., Tulini, F. L., Souza, V. M., & Martinis, E. C. P. (2017). Development of yoghurt with juçara pulp (*Euterpe edulis* M.) and the probiotic *Lactobacillus acidophilus* La5. *Probiotics & Antimicrobial Proteins*, 10(1), 71-76.
- Gomes, L. M. M. P., Costa, V. G., Falcão, D. Q., & Araújo, K. G. L. (2014). Inclusion complexes of red bell pepper pigments with β -cyclodextrin: preparation, characterisation and application as natural colorant in yogurt. *Food Chemistry*, 148, 428-436.
- Gouvêa, A. C. M. S., Araújo, M. C. P., Schulz, D. F., Pacheco, S., Godoy, R. L. O. & Cabral, L. M. C. (2012). Anthocyanins standards (cyanidin-3-O-glucoside and cyanidin-3-O-rutinoside) isolation from freeze-dried açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) by HPLC. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 32(1), 43-46.
- AOAC (2012). AOAC INTERNATIONAL guidelines for validation of botanical identification methods. *Journal of AOAC International*, 95(1), 268-272.
- Klein, T., Longhini, R., Bruschi, M. L. & Mello, J. C. P. (2015). Microparticles containing guaraná extract obtained by spray-drying technique: development and characterization. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25, 292-300.
- Kucharska, A., Oszmianski, J. (2002). Anthocyanins in fruits of *Prunus padus* (birdcherry). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(13), 1483-1486.
- Matumoto-Pintro, P. T., Rabiey, L., Robitaille, G. & Britten, M. (2011). Use of modified whey protein in yoghurt formulations. *International Dairy Journal*, 21, 21-26.

- Pedersen, A. T., Andersen, Ø. M., Aksnes, D. W., & Nerdal, W. (1993). NMR of anthocyanins: assignments and effects of exchanging aromatic protons. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 31(11), 972-976.
- Santana, A. A., Cano-Higueta, D. M., de Oliveira, R. A., & Telis, V. R. N. (2016). Influence of different combinations of wall materials on the microencapsulation of jussara pulp (*Euterpe edulis*) by spray drying. *Food Chemistry*, 212, 1-9.
- Schulz, M., Borges, G. S. C., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O., & Fett, R. (2016). Juçara fruit (*Euterpe edulis* Mart.): sustainable exploitation of a source of bioactive compounds. *Food Research International*, 89, 14-26.
- Ścibisz, L. Z., Mitek, M. & Zaręba, D. (2012). Effect of probiotic cultures on the stability of anthocyanins in blueberry yoghurts. *Food Science and Technology*, 49, 208-212.
- Silva, N. A., Rodrigues, E., Mercadante, A. Z., & de Rosso, V. V. (2014). Phenolic compounds and carotenoids from four fruits native from the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(22), 5072-5084.
- Slavin, J. L., & Lloyd, B. (2012). Health benefits of fruits and vegetables. *Advances in Nutrition*, 3(4), 506-516.
- Vieira, G. S., Cavalcanti, R. N., Meireles, M. A. A., & Hubinger, M. D. (2013). Chemical and economic evaluation of natural antioxidant extracts obtained by ultrasound-assisted and agitated bed extraction from jussara pulp (*Euterpe edulis*). *Journal of Food Engineering*, 119(2), 196-204.
- Tonon, R. V., Brabet, C., & Hubinger, M. D. (2008). Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying. *Journal of Food Engineering*, 88(3), 411-418.
- Vieira, G. S., Marques, A. S. F., Machado, M. T. C., Silva, V. M., & Hubinger, M. D. (2017). Determination of anthocyanins and non-anthocyanin polyphenols by ultra performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry (UPLC/ESI-MS) in jussara (*Euterpe edulis*) extracts. *Journal of Food Science and Technology*, 54(7), 2135-2144.
- Wallace, T. C., Giusti, M. M. (2008). Determination of color, pigment, and phenolic stability in yogurt systems colored with nonacylated anthocyanins from *Berberis boliviana* L. as compared to other natural/synthetic colorants. *Journal of Food Science*, 73(4), 241-248.
- Yamaguchi, K. K., Pereira, L. F., Lamarao, C. V., Lima, E. S., & da Veiga-Junior, V. F. (2015). Amazon acai: chemistry and biological activities: a review. *Food Chemistry*, 179, 137-151.

5 ARTIGO 2**Development of functional yogurt containing *Euterpe edulis* and *Paullinia cupana* extracts**

Luana Magri Tunin¹; Eliana Harue Endo¹; Emilene Dias Fiuza Ferreira¹; Mariana Nascimento de Paula¹; ³Admilton Gonçalves de Oliveira Junior; Daniela Cristina de Medeiros¹; Fernando Antônio Anjo²; Paula Matumotro-Pintro²; João Carlos Palazzo de Mello¹

Development of functional yogurt containing *Euterpe edulis* and *Paullinia cupana* extracts

Luana Magri Tunin¹; Eliana Harue Endo¹; Emilene Dias Fiuza Ferreira¹; Mariana Nascimento de Paula¹; ³Admilton Gonçalves de Oliveira Junior; Daniela Cristina de Medeiros¹; Fernando Antônio Anjo²; Paula Matumotro-Pintro²; João Carlos Palazzo de Mello¹

¹Laboratory of Pharmaceutical Biology, Department of Pharmacy, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, BR-87020-900, Maringá, Brazil.

²Department of Agronomy, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, BR-87020-900, Maringá, Brazil.

³Laboratory of Microbial Biotechnology, Department of Microbiology, Universidade Estadual de Londrina, Rod. Celso Garcia Cid, Pr 445, Km 380, BR-86057-970, Londrina, Brazil.

Address correspondence to: João Carlos Palazzo de Mello

Department of Pharmacy, State University of Maringá, BR-87020-900, Maringá, Brazil.

Tel.: +55-44-30114627; Fax: +55-44-30115050; E-mail: mello@uem.br

Abstract

Juçara palm tree (*Euterpe edulis* Mart., Arecaceae) is an Atlantic Forest native plant. *Juçara*'s fruit presents high anthocyanins concentrations, as cyanidin 3-O-glycoside and cyanidin 3-O-rutinoside. The anthocyanins are compounds belonging to the flavonoid group, they are responsible for the variation of fruits and flowers colour, granting them properties as colorants and oxidants. Although these compounds are instable and susceptible to degradation. *Paullinia cupana* Kunth. Known as *guaraná*, is an Amazon native plant. The seeds contain high concentrations of methylxanthines, saponins and polyphenols, particularly tannins. *Guaraná* presents various pharmacological activities

as stimulant, adstringent, analgesic, antimicrobial, antioxidant among others. A 2³ factorial was proposed to evaluation of two microparticles preparations techniques (lyophilisation and spray drying), two kinds of crude extract (*Juçara* and *Guaraná*) and different extracts concentrations (1:5 and 1:10). The moisture content, particle size, polydispersity and scanning electron microscopy (SEM) of microparticles were evaluated. The *Juçara* and *Guaraná* microparticles prepared by spray drying technique presented lower moisture content and a higher homogeneity was obtained in the particles formed with plant extract: polymer ratio 1:5. From 2³ factorial analysis, *Juçara* and *Guaraná* microparticles produced by the spray drying technique and with extract: polymer ratio (1:5) were chosen for incorporation into yogurt. From a commercial culture consisting of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* yogurt was produced by fermentation and supplemented with *Juçara* extract, *Guaraná* extract, *Juçara* microparticles and *Guaraná* microparticles for evaluation and comparison of acidity, pH, fermenter microorganisms' viability, syneresis and colour analysis during 21 days of storage. Supplementation of yogurt samples with free and encapsulated plant extracts did not affect texture properties such as springiness, adhesiveness and cohesiveness, increasing the firmness of the samples when compared to controls. The viability of *S. thermophilus* remained stable until the 14^o day, showing a decrease on the 21^o day of storage. The addition of plant extracts also contributed to maintaining the color of yogurt, and yogurt supplemented with *Juçara* and *Guaraná* remained red and yellow respectively.

Keywords: *Euterpe edulis*, *Paullinia cupana*, yogurt, functional, stability.

1. Introduction

Yogurts are products widely consumed due to their nutritional and sensory benefits. They are commonly produced after lactic milk fermentation by *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, although other lactic bacteria occur in the product (Geraldi et al., 2017). The consumption of sufficient amounts of these living microorganisms promote health benefits by positively influencing the intestinal mucosa (WHO, 2001).

In addition to the nutritional characteristics, the textural and microstructural characteristics of a yogurt are important parameters that influence the acceptability of the product in the consumer market. These parameters are governed by a three-dimensional network of milk proteins formed with the aggregation of casein micelles (Vianna et al., 2017). In traditional yogurts, protein gel is stabilised primarily by weak interactions and non-covalent bonds. The introduction of new covalent bonds promotes different properties in the protein gel characteristics, and the use of phenolic compounds for this purpose has been suggested already they are known because of them interact covalently with proteins (Vital et al., 2015).

In this respect, the addition of plant species rich in phenolic compounds in yogurt such as *Euterpe edulis* Mart., rich in anthocyanins, can attribute potential antioxidant and colour to the food product, while *Paullinia cupana* Kunth can be used as antimicrobial and stimulant, also conferring nutritional, functional textural and microstructural benefits in the protein gel mentioned above.

Euterpe edulis Mart. (Arecaceae), popularly known as *Juçara* palm tree is an Atlantic Forest native palm tree, mainly distributed in the South and Southern regions of Brazil. Its fruits have rounded shape and dark purple coloration due to its anthocyanin content, and are similar to *açaí* (*Euterpe oleracea* Mart.) regarding their nutritional and sensory properties, as well as its form of consumption (Silva, Rodrigues, Mercadante, & de Rosso, 2014).

Paullinia cupana Kunth (Sapindaceae) is a tropical flatice bush, adapted to warm and humid environment. *Guaraná* seeds are known for their stimulant property, which are composed by a large amount of theobromine, theophylline and caffeine, as well as high tannins concentrations and other compounds as saponins, polysaccharides and proteins (Marques et al., 2017).

Based on main properties of species *E. edulis* and *P. cupana*, this study aimed to evaluate the physicochemical properties of yogurt produced by lactic milk fermentation using *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* culture with the addition of extracts and microparticles containing *E. edulis*' and *P. cupana*'s extracts.

2. Material e Methods

2.1 Chemicals and reagents

Culture media MRS, M17 (Dfico) and peptone water. Skim milk powder (Molico - Nestlé, Brazil). A commercial yogurt culture (BV- Bela Vista, YOG-03, Brazil), consisting of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*, was used to prepare the yogurt.

2.2 Plant material

The fruit pulp of *Euterpe edulis* Mart. was purchased in Antonina, State of Parana, Brazil (S 25°15'41"; W 48°44'23"; h=14 m) in May 2016. A voucher specimen was deposited at the Herbarium of the State University of Maringá under number HUEM#30125 and identified by Prof. Dr. Maria Conceição de Souza. Access to the botanical material was registered by the Brazilian Biodiversity System – *SisGen* - *Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado* under number A280341.

Paullinia cupana H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (Guaraná) seeds were acquired from rural producer Sr. José Augusto de Souza, from the State of Mato Grosso, city of Alta Floresta, Rodovia MT 325, Estrada Central, km 8, LT 376 A.

2.3 Preparation of extracts

2.3.1 *Euterpe edulis* extracts

The extraction of anthocyanins was carried out according to the methodology proposed by Teixeira, Stringheta & Oliveira (2008), with some modifications. The extraction was performed using a 1:2 ratio of the pulp of the *E. edulis* palm fruit (500 g) to a solution of ethanol/water (7:3 v/v). The mixture was stirred for 40 min protected from light and filtered. The sample was defatted by extraction with three consecutive aliquots of 150 mL of ethyl ether/petroleum ether (1:1 v/v). The extract was concentrated to 30% of the initial volume in a rotary evaporator (Büchi R-135) under reduced pressure at 45 °C, lyophilised (Alpha 1–4, Christ), and stored at –20 °C to yield a crude extract (JCE, 6.0 g).

2.3.2 *Paullinia cupana* extracts

P. cupana ground seeds were used to prepare the extractive solution using as solvent acetone: water (7:3; v/v) (ES), by turboextraction (Ultra-Turrax UTC115KT, IKA Works, Wilmington, NC, USA). The extract of *P. cupana* was concentrated to 30% of the initial volume in a rotary evaporator at 45 °C, frozen in liquid nitrogen and lyophilized at 50 °C for 24 h and stored in a freezer at -20 °C.

2.4 Preparation of microparticles

For preparation of particles maltodextrin was dissolved in distilled water. In this mixture was added crude extract of *E. edulis* or *P. cupana* and stirred in a magnetic stirrer. This preparation was freeze and lyophilized (freeze-drying technique) or sprayed on hot air stream (spray-drying technique).

2.4.1 Characterization of microparticles

A factorial 2^3 (Table 1) were proposed for the evaluation of two microparticle preparation techniques (freeze-drying and spray drying), two types of crude extract (*E. edulis* and *P. cupana*) and different drug: polymer concentrations (1: 5 and 1: 10). The content of moisture, particle size, polydispersity and scanning electron microscopy (SEM) of the microparticles were evaluated.

Table 1. Factorial 2^3 for evaluation of the microparticles containing extracts of *E. edulis* and *P. cupana*.

| A | B | | | | C |
|--|--|---|--|---|---|
| | Preparation technique: freeze-drying (-) or spray-drying (+) | | | | |
| Drug: polymer concentration 1:5 (-) 1:10 (+) | 1 -/-/- 1:5 F:P Freeze-drying juçara | 2 -/+/- 1:5 F:P Spray-drying juçara | 3 +/+/- 1:10 F:P Spray-drying juçara | 4 +/-/- 1:10 F:P Freeze-drying juçara | Crude extract: juçara (-) guarana (+) |
| | 5 -/+/+ 1:5 F:P Freeze-drying guarana | 6 -/+/+ 1:5 F:P Spray-drying guarana | 7 +/+/+ 1:10 F:P Spray-drying guarana | 8 +/-/+ 1:10 F:P Freeze-drying guarana | |

2.4.1.1 Moisture content

The moisture content was obtained in infra-red scale (Ohaus MB35). It weighted about one gram of each sample. The microparticles were uniformly distributed over the aluminium collector contained inside the appliance and left for 45 min at a temperature of 105.0 °C. The result was expressed in percentage water loss, by the average of three determinations (Brasil, 2010).

2.4.1.2 Particle size and polydispersity

Particle size and polydispersity were analysed in nano particulate analyser equipment (Nanoplus zeta). The parameters were adjusted using mineral oil as solvent

and temperature of 25.0 °C. the samples were diluted in the ratio of 1: 10 (w/v) for the analysis.

2.4.1.3 Scanning electron microscopy (SEM)

Micrographs of *E. edulis* and *P. cupana* were obtained using a FEI Quanta 200 scanning electron microscope (SEM) (FEI Company, Netherlands). The samples were lyophilized, then, they were fixed on aluminum supports and coated with gold (Sputter Coater BAL-TEC SCD 050, Germany) under a pressure of 10^6 torr. The samples were analysed using a 9 kV accelerator voltage.

2.5 Yogurt production

A commercial yogurt culture composed by *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* was used to prepare the yogurt, as described by Vital (2015). For the preparation of the initial culture, the skimmed milk powder was reconstituted in sterile water (12%, w/v), which was inoculated with 0.1% of culture and incubated at 41.0 °C until pH 5.3. Then the milk was preheated at 41.0 °C, inoculated at 3% (v/v) with the initial culture. Were produced lots: Control (white), A (0.1% crude extract of *E. edulis*), B (0.1% crude extract of *P. cupana*), C (0.1% crude extract of *E. edulis* and *P. cupana*), D (white with maltodextrin microparticles), E (1.0% *E. edulis* microparticles), F (1.0% *P. cupana* microparticles) and G (1.0% *E. edulis* and *P. cupana* microparticles). The samples were incubated at 41.0 °C until pH 4.6 and the yogurt fermentation was interrupted by cooling at 4.0 °C.

2.5.1 Microbiological analysis

To quantify *S. thermophilus* and MRS for *L. bulgaricus*, was used the M17 agar culture medium. The plates were incubated under anaerobic conditions at 37.0 °C for 48 h and 37.0 °C for 72 h, respectively (IDF, 1997). The results were treated as logarithm of colony-forming units (CFU) per gram of yogurt, after counting the colonies.

2.5.2 Microstructure

Yogurt samples were evaluated by scanning electron microscopy using the FEI Quanta 200 (FEI Company, Netherlands) equipment with a vacuum atmosphere of 106 torr. The samples were freeze-dried, mounted on carbon tape in aluminium supports, sprayed with a gold film (BALTEC SDC 050, Sputter Coater, Germany) then the samples were observed under a scanning electron microscope. Electromyographs were generated on topographic mode (secondary electrons) at 15 kV.

2.5.3 Color evaluation

Colour parameters were determined according to the methodology described by Matumoto-Pintro, Rabiey, Robitaille and Britten (2011) using a Minolta colorimeter (Minolta Chroma Meter CR 400). Dairy product samples (approximately 40 mL) were transferred to plastic pots for reading by reflectance of the coordinates L* (luminosity), a* (intensity of +red and –green), and b* (intensity of +yellow and –blue). The values for each sample were obtained through an average of three readings. The colour was measured every four days for a period of 1 to 21 days storage at 4 °C.

2.5.4 Syneresis susceptibility evaluation

Yogurt samples were prepared in a Falcon tube (5.0 g) and centrifuged at 2200 rpm for 10 min, according the methodology describes by Vital (2015), with modifications. Susceptibility to sineresis was calculated as the percentage in weight of serum released after centrifugation.

2.5.5 pH and titratable acidity determination

The pH was measured with a pHmeter (PHS3BWBEL). To the determination of titratable acidity, as described by Vital (2015) with modifications, 5.0 g of yogurt were mixed with 5.0 mL of distilled water and titrated with sodium hydroxide solutions 0.1 M, until pH 8.3. Titratable acidity was expressed in g lactic acid/100 g yogurt and calculated by the following equation:

Titratable acidity (g/100 g) = $(V \times f \times 0.9)/m$, where:

V= volume (mL) of sodium hydroxide solution 0.1 M used in titration; m= sample's mass (g); 0.9= conversion factor for lactic acid; f= molarity of sodium hydroxide.

2.5.6 Texture analysis

Texture profile analyses (TPA) were performed using a Brook-field texture analyzer-CT III with a TA/1000 cylindrical probe; the speed of penetration was 1 mm/s, distance target was 5 mm and trigger was 15 g. For these tests, samples were taken out of the refrigerator (4 °C) just before test operation. Firmness, adhesiveness, cohesiveness, and springiness values were obtained (Vital, 2015).

2.6 Statistical analysis

The statistical analysis was performed using the software Statistic® 7.0. All experiments were performed at least in triplicate. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), in which the results were considered significant when the probability was less than 5% ($p < 0.05$), followed by the Tukey test for multiple comparisons.

3. Results and Discussion

3.1 Moisture content, particle size and polydispersity

The moisture content ranged from 2.14 to 7.37 %, and the formulations prepared with *Guaraná* (1:10) presented higher moisture content (Table 2). Particle size ranged from 124.4 to 773.9 nm, with larger particles being obtained with *Juçara* extract, freeze-drying technique and drug: polymer ratio 1: 10. The polydispersity of the formed particles ranged from 0.798 to 1.634 indicating greater homogeneity in particles formed with drug: polymer ratio of 1: 10 (Table 3).

Table 2. Moisture content of the microparticules containing extracts of *E. edulis* and *P. cupana*.

| Samples | Content of moisture (%) \pm SD | CV (%) |
|----------------------------|----------------------------------|--------|
| Guarana spray-drying 1:5 | 3.42 \pm 2.61 | 76.20 |
| Guarana spray-drying 1:10 | 7.37 \pm 2.11 | 28.63 |
| Guarana freeze-drying 1:5 | 4.02 \pm 2.92 | 72.75 |
| Guarana freeze-drying 1:10 | 3.83 \pm 0.83 | 21.81 |
| Juçara spray-drying 1:5 | 2.49 \pm 0.48 | 19.48 |
| Juçara spray-drying 1:10 | 2.14 \pm 0.06 | 2.99 |
| Juçara freeze-drying 1:5 | 2.80 \pm 0.94 | 33.57 |
| Juçara freeze-drying 1:10 | 4.68 \pm 1.61 | 34.46 |

Table 3. Particle size and polydispersity of microparticles containing extracts of *E. edulis* and *P. cupana*.

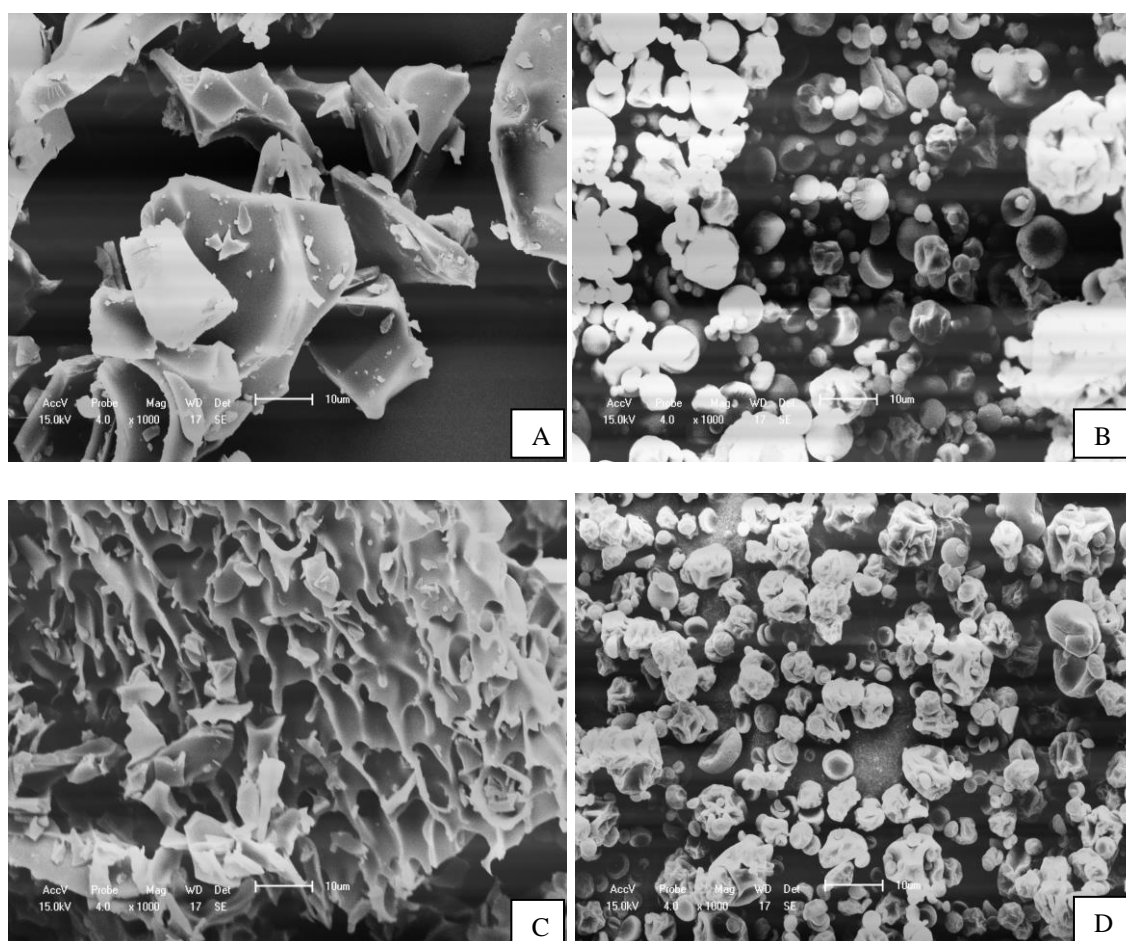
| Samples | Particle size (nm) | Polydispersity |
|----------------------------|--------------------|----------------|
| Guarana spray-drying 1:5 | 347.1 | 1.448 |
| Guarana spray-drying 1:10 | 152.8 | 1.066 |
| Guarana freeze-drying 1:5 | 296.9 | 1.613 |
| Guarana freeze-drying 1:10 | 124.4 | 0.933 |
| Juçara spray-drying 1:5 | 279.4 | 1.634 |
| Juçara spray-drying 1:10 | 162.5 | 0.798 |
| Juçara freeze-drying 1:5 | 207.3 | 1.138 |

| | | |
|--|-------|-------|
| Juçara freeze-drying 1:10 | 773.9 | 7.089 |
| Particle without extract spray-drying | 41.9 | 0.389 |
| Particle without extract freeze-drying | 37.4 | 0.385 |

3.2 Scanning electron microscopy (SEM)

The morphological evaluation of particles was performed through photomicrographs obtained by scanning electron microscopy (Figure 1).

Figure 1. Microparticles containing crude extract of: (A) *P. cupana* freeze-drying technique; (B) *P. cupana* spray-drying technique; (C) *E. edulis* freeze-drying technique; (D) *E. edulis* spray-drying technique.



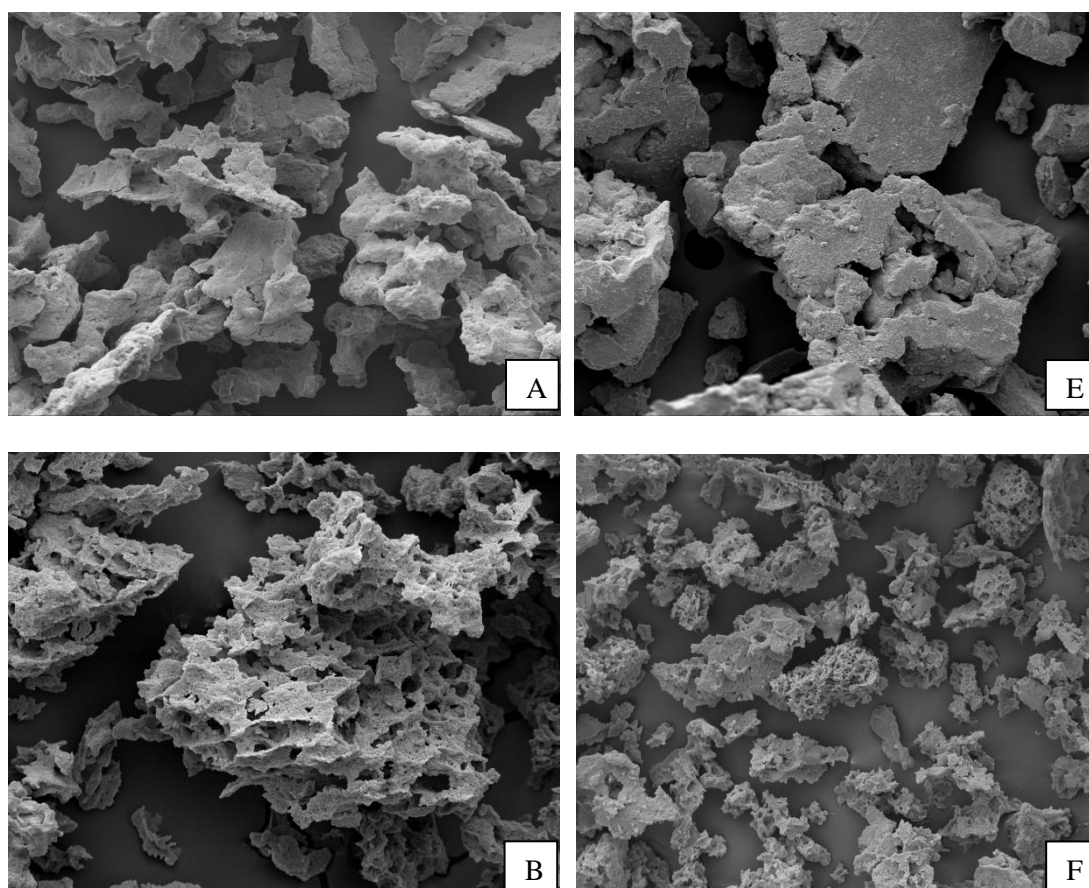
The particles morphological analysis demonstrates that the spray-drying technique leads to the

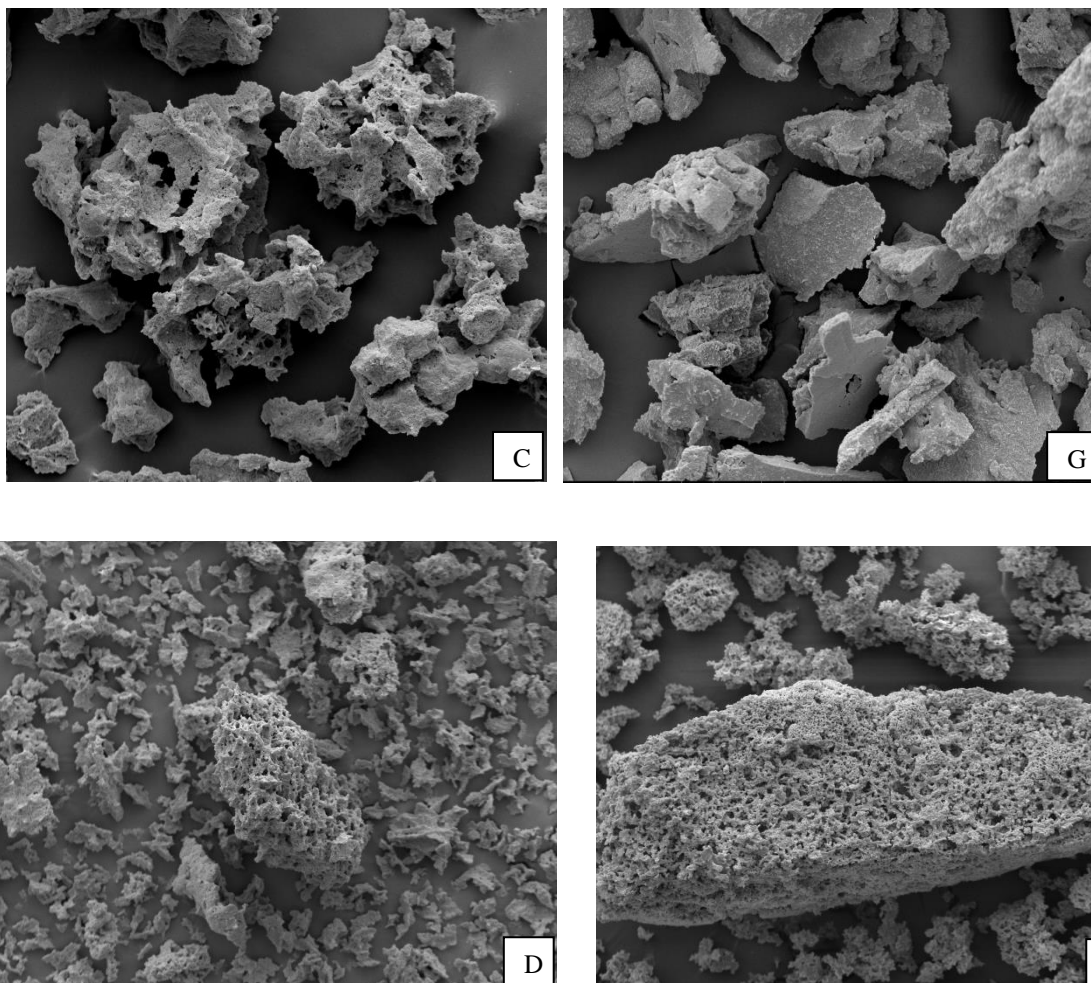
formation of rounded particles and “wilted”, while the freeze-drying technique forms amorphous particles (without defined format). In addition, it can be perceived that microcapsules with *Juçara* extract, prepared by spray-drying technique, are more “wilted” when compared with microcapsules containing *Guaraná* extract, probably due to the higher watery solubility of *Juçara*.

3.3 Microstructure

The microstructures of the yoghurt samples were observed by scanning electron microscopy as observed in Figure 2.

Figure 2. Scanning electron microscopy (SEM) images of yogurt supplemented with *E. edulis* and *P. cupana* crude extract and microparticles.





The microstructure of yoghurt samples is observed to consist of a three-dimensional network of empty zone-interspersed casein micelle aggregates. It can be observed that the addition of free and microencapsulated extracts altered the microstructure of the casein network, making them more branched when compared to controls A and E. This modification in the casein micelle structure is a result of the increased acidity caused by the formation of lactic acid during milk fermentation, the casein micelle branched formation enables new interactions with other components, especially with the polyphenols present in the extracts of *E. edulis* and *P. cupana* reducing the voids and stabilizing the yogurt gel. which ultimately contributes to reduced susceptibility to syneresis, which makes yogurt samples more stable during storage.

3.4 Viability of fermenter microorganisms

For *Streptococcus thermophilus*, the initial count (T=1) ranged from 7.48 to 21.25 x10⁸ CFU/g. as can be observed (**table 4**), there is no significant difference between control yogurt and yogurt plus extracts or microparticles containing extracts, until the 14th day. On the 21st day there is already a reduction in the counts in almost all samples.

This decrease of lactic bacteria on the 21st day was also observed in a study by Gouraji and collaborators (2019) that analysed the properties of yogurt enriched with phycocyanin.

Table 4. Effect of addition of *E. edulis* e *P. cupana* extracts and microparticles in the *S. thermophilus* viability for 21 days of storage at 4 °C.

| Type of yogurt | Time (days) | | | |
|----------------|---------------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|
| | 1 | 7 | 14 | 21 |
| A | 7.48±2.8 ^{abB} | 12.88±2.8 ^{aA} | 12.83±6.6 ^{aAB} | 2.50±0.8 ^{bBC} |
| B | 10.01±0.5 ^{bcB} | 22.18±2.5 ^{aA} | 15.26±8.6 ^{abA} | 3.35±4.4 ^{cABC} |
| C | 8.81±0.3 ^{abB} | 12.40±1.4 ^{aA} | 10.36±6.4 ^{aAB} | 13.90±9.8 ^{aA} |
| D | 10.02±1.3 ^{abB} | 17.43±4.3 ^{aA} | 8.13±3.6 ^{bAB} | 5.60±3.9 ^{bABC} |
| E | 14.33±0.5 ^{aAB} | 12.88±0.9 ^{aA} | 12.83±8.7 ^{aAB} | 3.06±3.0 ^{bBC} |
| F | 10.02±0.2 ^{bcB} | 19.43±3.2 ^{aA} | 13.26±8.0 ^{abAB} | 2.15±2.7 ^{cC} |
| G | 11.25±0.4 ^{bcAB} | 19.76±0.6 ^{aA} | 13.26±5.8 ^{abAB} | 3.93±7.9 ^{cABC} |
| H | 21.25±3.9 ^{aA} | 12.96±2.2 ^{aA} | 3.73±4.1 ^{bB} | 13.10±8.5 ^{aAB} |

* Different lower case letters on the same line show significant difference between times within the same treatment (p <0.05) by Tukey test. * Different capital letters in the same column show significant difference between treatments within the same time (p <0.05) by Tukey test.

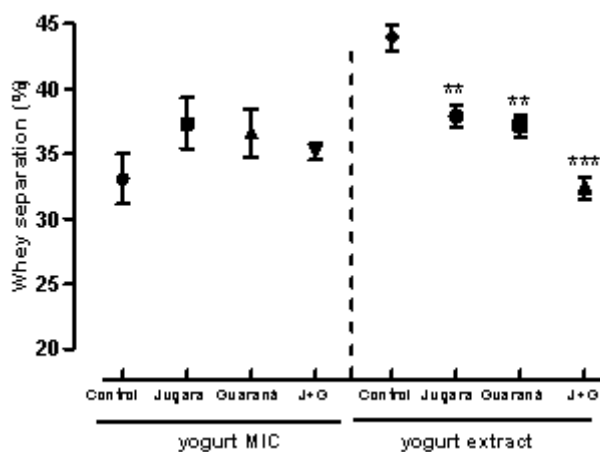
The presence of *E. edulis* extract and microparticles containing *E. edulis* extracts (samples 4 and 6) modify the count, especially in T= 7, when compared to T= 1.

For *Lactobacillus bulgaricus* the counts remained less than 5 log CFUU/g of yogurt, which could indicate an imbalance of microorganisms in yeast or that the fermentation process was interrupted before the number of *L. bulgaricus* was not yet equivalent (Gallina et al. 2011).

3.5 Syneresis

The protein gel formation during lactic fermentation and maintenance during the storage period is an important feature of yogurt acceptability. Syneresis is the shrinkage of the gel that leads to serum separation. The syneresis evaluation results are presented in figure 3, and according the data is possible to observed that there was no significant difference between the control and yogurt samples produced with the addition of *E. edulis* and *P. cupana*, different from what occurs with the samples produced using microparticles containing the extracts, which showed significant difference when compared to the control during the 21 days of storage.

Figure 3. Effect of *E. edulis* and *P. cupana* crude extract and microparticles addition on the syneresis of yogurt during storage.



It is known about the formation of stable complexes of polyphenols and casein, due to the interaction protein-polyphenol, and may be the reason of reduced syneresis in yogurt produced with addition of *E. edulis* and *P. cupana* extracts. Stable complexes with stronger internal bonds can lead to a reduction in protein rearrangement during storage, providing more stability to casein networks, keeping water in the network and reducing syneresis. The

formation of protein-polyphenol complexes is influenced by the protein's nature, the polyphenol's nature, the system's temperature and the presence of other components that can affect the interaction (Prigente et al., 2003).

3.6 pH and titratable acidity

During storage, yogurts containing *E. edulis* or *P. cupana* extracts or microparticles showed a significant difference in pH (Table 5). Minor changes in the yogurt's pH containing microparticles are observed when compared to yogurts containing extracts. There was a significant increase in the pH of yogurts content of *E. edulis* and *P. cupana* extracts until the 21st day, what can be observed in yogurt control (A) and in yogurt with *E. edulis* and *P. cupana* extract (D), except on the 14th day, when was a decrease in pH.

In yogurts content *E. edulis* microparticles (F), *P. cupana* (G) and control with microparticles (E) there was a significant increase in pH until the 14th day, a drop in pH on the 21st day was observed when compared with 14th, but remaining higher when compared with day 1. In yogurt containing *E. edulis* and *P. cupana* microparticles (H) it was observed a reduction in pH over the days.

Samples containing yogurt with *E. edulis* and *P. cupana* extract showed no significant difference in titratable acidity when compared with white, within the same time, showing only that there is no difference between the extracts added in the yogurts in different times (Table 5).

There is a change in titratable acidity at times 7 and 21 when compared between samples. Yogurt control white (A) showed a difference in yogurt containing *E. edulis* and *P. cupana* (D) on days 7 and 21. When compared with the controls there is an titratable acidity decrease in the yogurt sample (D) on the 21st day, there is an increase in titratable acidity in the yogurt (D) samples when compared to its control.

We can observe a small difference in titratable acidity in yogurt samples containing *P. cupana* extracts when comparing the samples over the days during their storage. There is a reduction in titratable acidity on days 7 and 14 when compared to the 21st.

We found a great variation in titratable acidity over the 21 storage days when analysed yogurt samples containing microparticles from their respective extracts.

Table 5. Effect of the addition of extract or microparticles containing *E. edulis* or *P. cupana* on pH and titratable acidity.

| Type of yogurt | Period of storage (days) | | | |
|---------------------------|-----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | 1 | 7 | 14 | 21 |
| pH | | | | |
| A | 4.47 ± 0.02 ^A | 4.47 ± 0.02 ^F | 4.42 ± 0.005 ^B | 4.49 ± 0.01 ^C |
| E | 4.56 ± 0.04 ^{d, e} | 4.79 ± 0.08 ^{C, D, e} | 4.83 ± 0.05 ^{E, d, G} | 4.68 ± 0.005 ^G |
| B | 4.38 ± 0.01 ^{a, A} | 4.45 ± 0.06 ^b | 4.53 ± 0.04 ^{a, B} | 4.61 ± 0.01 ^{a, b, C} |
| F | 4.50 ± 0.05 ^c | 4.62 ± 0.08 ^D | 4.66 ± 0.05 ^{c, E} | 4.62 ± 0.02 |
| C | 4.40 ± 0.03 ^{a, A} | 4.41 ± 0.01 ^{b, F} | 4.41 ± 0.01 ^f | 4.54 ± 0.03 ^{a, b, f} |
| G | 4.56 ± 0.02 ^e | 4.76 ± 0.02 ^e | 4.75 ± 0.09 ^e | 4.67 ± 0.02 |
| D | 4.37 ± 0.01 ^c | 4.50 ± 0.09 ^{c, e} | 4.34 ± 0.02 ^{e, g} | 4.48 ± 0.04 ^{c, g} |
| H | 4.57 ± 0.03 ^c | 4.51 ± 0.04 ^C | 4.45 ± 0.13 ^G | 4.35 ± 0.04 ^{c, G} |
| Titratable acidity | | | | |
| A | 0.086 ± 0.003 | 0.076 ± 0.003 | 0.084 ± 0.005 | 0.078 ± 0.003 |
| E | 0.075 ± 0.003 ^b | 0.082 ± 0.004 ^{Abc} | 0.073 ± 0.006 ^c | 0.070 ± 0.001 ^{Bc} |
| B | 0.086 ± 0.004 | 0.081 ± 0.005 | 0.078 ± 0.008 | 0.072 ± 0.001 |
| F | 0.076 ± 0.008 | 0.081 ± 0.001 ^{Bb} | 0.064 ± 0.005 ^b | 0.078 ± 0.002 ^{BCb} |
| C | 0.078 ± 0.003 | 0.084 ± 0.002 ^a | 0.082 ± 0.001 ^b | 0.075 ± 0.001 ^{ab} |
| G | 0.075 ± 0.001 | 0.077 ± 0.003 ^{Cb} | 0.070 ± 0.007 | 0.066 ± 0.002 ^{CDb} |
| D | 0.080 ± 0.001 | 0.079 ± 0.002 | 0.082 ± 0.003 | 0.082 ± 0.003 |
| H | 0.078 ± 0.002 ^a | 0.069 ± 0.002 ^{ABCa} | 0.067 ± 0.001 ^{ac} | 0.076 ± 0.001 ^{BDc} |

Means with different small letters in the same line are significantly different. For pH parameter ($p < 0.0001$) a, b, d, f^{***}, ($p < 0.05$) c^{*}, ($p < 0.001$) e, g^{**}; for titratable acidity parameter ($p < 0.001$) a^{**}, ($p < 0.05$) b^{*}, ($p < 0.0001$) c^{***}. Means with different uppercase letters in the same column are significantly different. For pH parameter ($p < 0.05$) A, B, D, E, F^{*}, ($p < 0.001$) C^{**}, ($p < 0.0001$) G^{***}, for titratable acidity parameter ($p < 0.001$) A^{**}, ($p < 0.05$) B, C, D^{*}.

3.7 Color evaluation

The luminosity values (L*), coordinate a* (red-to-green content) coordinate b* (blue-yellow content) obtained according to the CIELab color scale were presented in the table

6.

Table 6. Evaluation of L*, a* and b* colour coordinates of yogurts containing extracts and microparticles of *E. edulis* e *P. cupana*.

| Type of yogurt | Period of storage (days) | | | | | | | | | | | |
|----------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | 1 | | | 7 | | | 14 | | | 21 | | |
| | L* | a* | b* | L* | a* | b* | L* | a* | b* | L* | a* | b* |
| A | 87.2±0.4 ^(a) | 0.8±0.04 ^(b) | 1.9±0.2 ^(c) | 86.9±0.8 ^(a) | 0.5±0.3 ^(b) | 2.0±0.2 ^(c) | 87.4±0.1 ^(a) | 0.5±0.1 ^(b) | 2.4±0.2 ^(c) | 82.5±7.3 ^(a) | 0.5±0.4 ^(b) | 2.3±0.9 ^(c) |
| B | 68.9±0.6 ^(a) | 11.0±1.4 ^(b) | 5.7±3.2 ^(c) | 72.1±0.9 ^(a) | 10.7±0.4 ^(b) | 6.5±0.3 ^(c) | 68.9±0.6 ^(a) | 7.8±1.5 ^(b) | 7.9±3.1 ^(c) | 63.6±5.9 ^(a) | 10.0±5.9 ^(b) | 4.5±0.3 ^(c) |
| C | 84.6±0.9 ^(a) | 1.4±0.2 ^(b) | 7.1±0.2 ^(c) | 85.7±0.5 ^(a) | 1.2±0.1 ^(b) | 5.4±0.8 ^(c) | 85.8±0.2 ^(a) | 2.5±0.0 ^(b) | 12.5±0.0 ^(c) | 76.7±0.1 ^(a) | 1.7±0.1 ^(b) | 6.6±0.6 ^(c) |
| D | 66.8±0.8 ^(a) | 12.1±0.0 ^(b) | 9.4±0.0 ^(c) | 67.7±0.4 ^(a) | 8.2±2.2 ^(b) | 13.7±0.2 ^(c) | 66.4±1.3 ^(a) | 8.2±0.2 ^(b) | 13.7±0.2 ^(c) | 69.5±0.0 ^(a) | 10.9±0.0 ^(b) | 6.5±0.0 ^(c) |
| E | 85.8±1.8 ^(a) | 0.7±0.3 ^(b) | 1.7±0.0 ^(c) | 85.1±0.4 ^(a) | 1.5±0.4 ^(b) | 0.8±0.8 ^(c) | 86.8±0.4 ^(a) | 3.9±0.0 ^(b) | 6.0±0.3 ^(c) | 82.7±1.1 ^(a) | 0.2±0.0 ^(b) | 0.5±0.1 ^(c) |
| F | 67.6±1.5 ^(a) | 13.0±0.5 ^(b) | 0.8±0.2 ^(c) | 72.2±0.2 ^(a) | 10.3±0.0 ^(b) | 7.0±0.1 ^(c) | 69.9±0.9 ^(a) | 6.9±0.1 ^(b) | 7.6±0.2 ^(c) | 68.9±0.5 ^(a) | 9.0±0.3 ^(b) | 5.0±0.0 ^(c) |
| G | 82.6±0.1 ^(a) | 1.5±0.0 ^(b) | 6.5±0.3 ^(c) | 84.9±0.0 ^(a) | 1.5±0.0 ^(b) | 3.3±0.1 ^(c) | 85.8±0.1 ^(a) | 2.6±0.0 ^(b) | 10.4±0.0 ^(c) | 82.9±0.6 ^(a) | 1.4±0.0 ^(b) | 4.6±0.2 ^(c) |
| H | 67.8±0.1 ^(a) | 10.7±0.0 ^(b) | 10.0±0.2 ^(c) | 68.0±0.0 ^(a) | 6.8±0.2 ^(b) | 15.1±0.8 ^(c) | 66.9±0.0 ^(a) | 11.8±1.1 ^(b) | 10.6±0.7 ^(c) | 65.5±1.2 ^(a) | 12.2±0.2 ^(b) | 10.8±0.5 ^(c) |

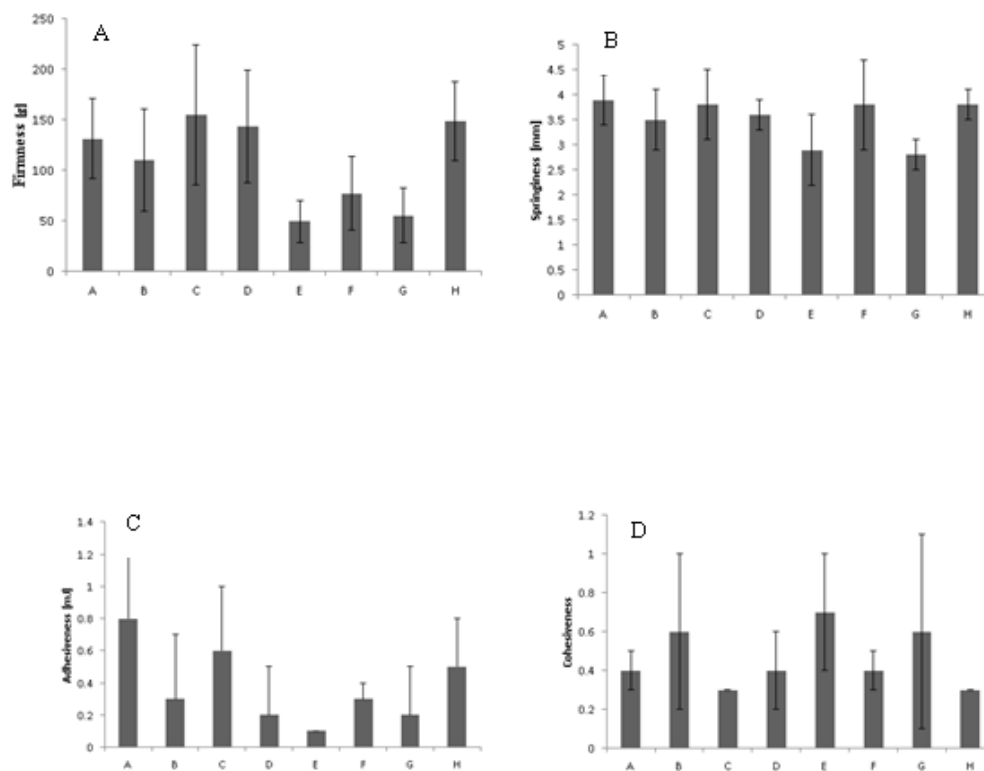
Averages with equal lowercase letters on the same line show no significant difference. For the coordinate L* (p -value > 0.05) a; coordinate a* (p -value > 0.05) b; coordinate b* (p -value > 0.05) c.

Data indicate that yogurts supplemented with free *E. edulis* extract (B) or microencapsulated (F) were redier as indicated by the coordinate a* values than White controls (A and E), as well as yogurts supplemented with free *P. cupana* extract (C) or microencapsulated (G) were more yellow as indicated by the coordinate b* values than white controls (A and E). the yogurt samples supplemented with the two plant extracts (D and H) also presented values of coordinates a* and b* higher than those of the white control (A and E). Thus, it is possible to observe that the colours of yogurt samples attributed by the addition of *E. edulis* and *P. cupana* extracts remained stable during the 21 days of storage at 4 °C.

3.8 Texture analysis

The evaluation of hardness, elasticity, adhesivity and cohesion parameters are important indexes to evaluate the yogurt texture quality (Fang, 2019). It can be observed (Figure 4) that the addition of free *P. cupana* extract (C) and *E. edulis* and *P. cupana* associated extracts (D) presented a lower softness than white control (A), and with significant difference ($p < 0.05$) when compared with control (A), only yogurt with free *E. edulis* extract (B) presented greater softness than its control (A). when we evaluated the hardness profile of microencapsulated extracts it is possible to observe that all samples F (77.0 g), G (55.1 g), H (148.5 g) presented a hardness value higher than their control E (49.15 g). The adhesivity of the samples may indicate a tendency of yogurt to be associated with the surface of the texturometer in the samples tested the values of adhesivity did not present a significant difference ($p > 0,05$) when compared with their free controls (A) or microencapsulated (E). The parameters elasticity and cohesion also showed no significant difference ($p > 0,05$) when compared with their controls (A) and (E) which indicates that the elasticity of the samples that is their ability to recover their condition after deformation were not maintained by the force of internal connections (cohesion).

Figure 4. Effect of the addition of extract or microparticles containing *E. edulis* or *P. cupana* on firmness, springiness, adhesiveness and cohesiveness.



4. Conclusion

Supplementation of yoghurt samples with free and encapsulated plant extracts of *E. edulis* and *P. cupana* did not affect the viability of the fermenting microorganism *Streptococcus thermophilus*, with a decrease only on the last day of storage. The addition of extracts in relation to texture, caused a reduction in softness and more firmness, but do not change the adhesiveness, elasticity and cohesion, as well as contribute to decreased susceptibility to syneresis. The addition of *E. edulis* to the yogurt samples contributed to the tendency of the a * coordinate to remain red, and the tendency of the b * coordinate to remain yellow in the samples supplemented with *P. cupana*, indicating that supplementation of yoghurt with The free and encapsulated extracts of *E. edulis* and *P. cupana* contributed to the color maintenance of the samples.

5. References

- Fang, T., Shena, X., Houb, J., Guo, M. (2019). Effects of polymerized whey protein prepared directly from cheese whey as fat replacer on physicochemical, texture, microstructure and sensory properties of low-fat set yogurt. *Food Science and Technology*, 115.
- Gallina, D. A. et al. (2011). Caracterização de leites fermentados com e sem adição de probióticos e prebióticos e avaliação da viabilidade de bactérias lácticas e probióticas durante a vida-de-prateleira. *Unopar Ciências Biológicas e da Saúde*, 13 (4), 239-244.
- Geraldi, M. V., Tulini, F. L., Souza, V. M., Martinis, E. C. P. (2017). Development of Yoghurt with Juçara Pulp (*Euterpe edulis* M.) and the Probiotic *Lactobacillus acidophilus* La5. *Probiotics and Antimicrobials Proteins*
- Marques, L. L. M., Ferreira, E. D. F., Paula, M. N., Klein, T., Mello, J. C. P (2017). *Paullinia cupana*: a multipurpose plant – a review. *Revista Brasileira de Farmacognosia*.
- Matumoto-Pintro, P. T., Rabiey, L., Robitaille, G. & Britten, M. (2011). Use of modified whey protein in yoghurt formulations. *International Dairy Journal*, 21, 21-26.
- Prigent, S. V. E., Gruppen, H., Visser, A. J. W. G., Van Koningsveld, G. A., De Jong, G. A. H., Voragen, A. G. J. (2003). Effects of non-covalent interactions with 5-*O*-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid) on the heat denaturation and solubility of globular proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(17), 5088-5095.
- Teixeira, L. N., Stringheta, P. C., Oliveira, F. A. (2008). Comparação de métodos para quantificação de antocianinas, *Revista Ceres* 55 (4), 297-304.
- The Plant List, 2013. in: <http://www.tropicos.org/Name/28600664> (Ed.), *Paullinia cupana* Kunth Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org/>
- Vianna, F. S., Canto, A. C. V. C. S., Costa-Lima, B. R. C., Salima, A. P. A. A., Costa, M. P., Balthazar, C. F., Oliveira, B. R., Rachid, R. P., Franco, R. M., Junior, C. A., Silva, A. C. O. (2017). Development of new probiotic yoghurt with a mixture of cow and sheep milk: effects on physicochemical, textural and sensory analysis. *Small Ruminant Research* 149, 154–162.
- Vital, A. C. P., Goto, P. A., Hanai, L. N. (2015). Microbiological, functional and rheological properties of low fat yogurt supplemented with *Pleurotus ostreatus* aqueous extract. *Food Science and Technology*, 64, 1028.

Who, (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria: report of a Joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. In: *Technical Report. Food and Agriculture Organization/World Health Organization*, Cordoba, Argentina, 1–4.

Yamaguti-Sasaki, E., Ito, L. A., Canteli, V. C., Ushirobira, T. M., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B.P., Nakamura, C.V., de Mello, J.C., (2007). Antioxidant capacity and in vitro prevention of dental plaque formation by extracts and condensed tannins of *Paullinia cupana*. *Molecules* 12, 1950-1963.

6 DISCUSSÃO GERAL

A tendência atual de consumo preferencial de alimentos naturais, juntamente com estudos epidemiológicos que relataram possíveis efeitos prejudiciais de aditivos sintéticos para a saúde, tem contribuído para a busca de novas fontes de ingredientes naturais. Neste contexto, os compostos fenólicos, têm atraído a atenção devido às suas propriedades antioxidantes e em especial os flavonoides como as antocianinas com grande potencial como corante alimentar natural (VIEIRA et al., 2013). O Brasil é um país com condições climáticas adequadas para um grande número de espécies de frutas nativas e exóticas com potencial interesse para a indústria (BORGES et al., 2011).

Extratos de plantas comumente auxiliam no tratamento e prevenção de doenças. Neste contexto espécies vegetais nativas do território brasileiro, como *Euterpe edulis* e *Paullinia cupana* podem contribuir para produção de medicamentos e alimentos.

Os frutos de *E. edulis* apresentam em seu conteúdo uma concentração de antocianinas superior a do açaizeiro (INÁCIO et al., 2013). Sua polpa é aplicada na confecção de sucos, bombons, sorvetes, cremes, entre outros produtos. As antocianinas são compostos pertencentes ao grupo dos flavonoides, responsáveis pela grande variedade de cores de frutas e flores que vão do vermelho-alaranjado, ao vermelho vivo, roxo e azul (BORDIGNON-LUIZ et al., 2007). A utilização das antocianinas como corantes naturais, além de sua propriedade antioxidante, é promissora, já que pesquisas têm sido intensificadas com a finalidade de diminuir a utilização de corantes sintéticos em alimentos (LOPES et al., 2007). O número de corantes naturais disponíveis no mercado é reduzido, pois a sua utilização requer o conhecimento de suas propriedades químicas e o desenvolvimento de novas tecnologias para conservação dos pigmentos, tais como o microencapsulamento (VALDUGA et al., 2008).

Dessa forma a primeira parte deste estudo visou o isolamento de cianidina-3-*O*-rutinosídeo e o desenvolvimento de uma metodologia analítica por CLAE para quantificação de antocianinas no extrato de *E. edulis* e no produto lácteo. Bicudo e colaboradores (2014) usaram um sistema cromatográfico semelhante para identificação de cianidina-3-*O*-glicosídeo (TR= 21,65 min.) e cianidina-3-*O*-rutinosídeo (TR= 23,03 min.) no extrato obtido a partir dos frutos de juçara (*E. edulis*). Podemos observar que a nossa proposta para a identificação da substância isolada foi baseada na sua massa

molecular, as quais foram confrontadas com dados existentes na literatura (BICUDO, 2014). O extrato de *E. edulis* contém uma substância majoritária, a qual foi isolada e identificada como cianidina-3-O-rutinosídeo (TR= 25,4 min.). O espectro de massas confirmou os dados obtidos pela cromatografia líquida de alta eficiência, pois o perfil MS/MS do pico majoritário apresentou íon molecular [M+H]⁺ m/z 595.

Dos métodos encontrados na literatura para quantificação de antocianinas em extratos vegetais ou produtos alimentares muito poucos são validados (CHANDRA et al., 2001; DIAS et al., 2012; WANG, 2014). A necessidade de desenvolver uma metodologia analítica para quantificar antocianinas também foi observada por Canuto e colaboradores (2016), que usaram os parâmetros estabelecidos pela Association of Analytical Communities (AOAC, 2012), servindo de referência para a validação realizada neste trabalho, em que avaliamos a seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez do método. A partir da análise da curva de calibração, a equação da reta obtida foi $y = 70167x + 132018$ e o coeficiente de correlação (r) de 0,994. O LD e LQ obtidos foram respectivamente 19,04 e 57,69 µg/mL. A precisão e a robustez foram expressas pelo coeficiente de variação (CV), e os dados obtidos apresentaram CV(%) menores do que 5%. Os resultados do ANOVA de um fator mostraram que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as análises de precisão intra-corrida, intermediária inter-corrida e entre analistas, e $p > 0,05$ para robustez. O método foi capaz de recuperar uma média de 104,85 µg/mL do padrão nas concentrações analisadas.

As antocianinas tem despertado grande interesse como alternativa aos corantes sintéticos devido ao seu amplo espectro de cores que variam do azul, vermelho ao violeta, além dos benefícios associados à saúde e de serem consideradas seguras já que são consumidos há séculos em frutas e vegetais (FAN et al., 2008). A aplicação das antocianinas como corantes alimentares enfrenta algumas limitações devido a sua baixa estabilidade frente a algumas condições de processamento, formulação e armazenamento. Apesar disso, algumas antocianinas aciladas podem apresentar alta estabilidade de cor em algumas matrizes alimentares (KIRCA et al., 2006). No entanto, Wallace e Giust, (2008) relataram que extratos das frutas de *Berberis boliviana* contendo antocianinas não aciladas apresentaram melhor estabilidade de cor quando incorporadas em iogurte. Essa informação serviu de parâmetro para que o extrato de amora (*Morus rubra*) poderiam servir como corante apropriado em um iogurte nutracêutico (BYAMUKAMA et al, 2014).

Como proposta para aplicar a metodologia analítica desenvolvida por CLAE, desenvolvemos um produto lácteo a partir de uma cultura comercial (Batavo, Brasil) composta por *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, com adição do extrato de *E. edulis* livre e encapsulado para avaliação da sua estabilidade durante 21 dias de armazenamento à 4°C. Em nosso estudo a cor e a concentração das antocianinas permaneceu estável até o 9º dia de análise, com redução até o 21º dia. Byamukama e colaboradores (2014), adicionaram ao iogurte extrato de amoreira (*Morus rubra*) em níveis crescentes de concentração (10, 20, 25, 30, 40 e 50 mg de equivalente Cianidina-3-glicosídeo) em 100 gramas de iogurte, e avaliaram sua estabilidade durante duas semanas de armazenamento. Neste estudo puderam observar que a estabilidade do pigmento foi afetada a partir do oitavo dia de armazenamento reduzindo ao final da segunda semana, principalmente os iogurtes com menores concentrações de pigmento (10, 20, 25 e 30 mg de equivalente Cianidina-3-glicosídeo) e que a concentração testada de 40 mg foi a que apresentou a maior estabilidade. O aumento da estabilidade do pigmento em alta concentração é atribuído à estabilização da antocianina através da associação intramolecular entre antocianinas e associação intermolecular com outros flavonoides, aminoácidos, ácidos orgânicos, nucleotídeos, polissacarídeos ou metais que podem estar presentes na matriz (Castañeda- Ovando et al., 2009).

Após avaliação dos resultados obtidos na primeira parte do nosso trabalho, optamos por desenvolver amostras de iogurte com dois extratos vegetais, *P. cupana* e *E. Edulis* para avaliarmos como esses extratos poderiam interferir na estabilidade do produto.

As sementes de *P. cupana* contêm altas concentrações de metilxantinas, como a cafeína, teofilina e teobromina e polifenóis como os taninos. Essas moléculas apresentam várias atividades biológicas, em especial no trato gastrointestinal, onde estão relacionadas com a precipitação de proteínas no sítio de localização de úlcera péptica, formando uma película protetora, que promove o reparo do tecido. Portanto, estão relacionados com processos anti-inflamatórios, atividade antioxidante e ainda atividade anti-*Helicobacter pylori* (JESUS et al., 2012).

Neste contexto, é de suma importância o desenvolvimento de novos produtos que priorizem à biodiversidade vegetal brasileira, pela utilização de extratos de *P. cupana* e *E. edulis*.

O iogurte é o produto lácteo fermentado mais popular e é altamente apreciado por seu valor nutricional e boa digestibilidade. Recentemente seu consumo foi associado a melhoria do sistema imunológico, melhora da função intestinal, proteção contra câncer de cólon e infecção por *Helicobacter pylori* (HELAL e TAGLIAZUCCHI, 2018). Os benefícios para a saúde do iogurte foram atribuídos à presença de peptídeos e probióticos bioativos (RUTELLA, TAGLIAZUCCHI e SOLIERI, 2016). No entanto, não é considerado uma fonte de compostos fenólicos e, portanto, plantas ou alimentos tradicionais, como, sucos de frutas e extratos vegetais foram usados para melhorar o conteúdo fenólico de iogurte (OLIVEIRA, et al., 2015).

A matriz de iogurte parece ser um excelente veículo para compostos fenólicos derivados de plantas. O baixo pH aumenta a estabilidade de compostos fenólicos durante o armazenamento, considerando que a presença de proteínas ou grandes peptídeos e gorduras deve manter a integridade dos compostos fenólicos durante a digestão, aumentando sua bioacessibilidade (CHOUCHOULI et al., 2013).

Em nosso estudo foi possível observar que a suplementação das amostras de iogurte com extrato livre e encapsulado das duas espécies vegetais (*E. edulis* e *P. cupana*), contribuíram para a estabilidade do gel do iogurte, reduzindo a suscetibilidade a sinérese e que não afetaram a textura durante os 21 dias de armazenamento, tais critérios são importantes parâmetros de qualidade avaliados pelos consumidores, e que demais informações sobre a contribuição para a saúde humana de iogurtes suplementados com *E. edulis* e *P. cupana* podem ser uma alternativa de pesquisa para o nosso grupo de pesquisa.

7 CONCLUSÃO GERAL

O presente estudo amplia as informações sobre desenvolvimento de metodologias específicas para a quantificação de antocianinas em extratos vegetais e produtos alimentares derivados. Além disso, a partir da necessidade de validação da metodologia analítica com uso de substância padrão com alto nível de pureza e conseqüentemente alto custo, foi proposto o isolamento da substância cianidina 3-*O*-rutinosídeo, sendo realizada com êxito, agregando mais conhecimento sobre as antocianinas para o nosso grupo de trabalho, assim como desenvolver um produto lácteo para podermos avaliar a estabilidade das antocianinas derivadas de *E. edulis*.

A proposta de darmos continuidade à pesquisa desenvolvendo em seguida um iogurte com o extrato de *P. cupana* já com reconhecidas propriedades pelo nosso grupo de estudo, e com *E. edulis* com reconhecida propriedade antioxidante e corante, agregaram conhecimentos ao observarmos com as análises que os extratos vegetais podem contribuir de maneira positiva com as principais propriedades do iogurte, como estabilidade do gel e textura devido à sua composição rica em composto fenólicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDI, M. M., AZLI, N. F. W. M., LIM, H. N., TAHIR, P. M., KARIMI, G., HOONG, Y. B. Polypyrrole/tannin biobased nanocomposite with enhanced electrochemical and physical properties. *Royal Society of Chemistry*, v. 8, p. 2978–2985, 2018.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 19, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos Para Registro de Alimento com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde em sua Rotulagem. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, 1999.
- AOAC. Association of Analytical Communities guidelines for validation of botanical identification methods. *Journal of AOAC International*, v. 95(1), p. 268-272, 2012.
- ATROCH, A. L., FILHO, F. J. L. *Paullinia cupana* Kunth var. *sorbilis* (Mart.) Ducke. *Exotic Fruits Reference Guides*, 2018.
- BASILE, A.; FERRAR, L.; DEL PEZZO, M.; MELE, G.; SORBO, S.; BASSI, P.; MONTESANO, D. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 102 p. 32–36, 2005.
- BICUDO, M. O. P. Composição fenólica, atividade antioxidante e microencapsulação de frutos de juçara (*Euterpe edulis*): Aspectos de interesse para a indústria de alimentos. Tese- Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.
- BORDIGNON-LUIZ, M. T.; GAUCHE, C.; GRIS, E. F.; FALCÃO, L. D. Colour stability of anthocyanins from Isabel grapes (*Vitis labrusca* L.) in model systems. *Food Science & Technology*, v. 40, p. 594–599, 2007.
- BORGES, G. S. C.; VIEIRA, F. G. K.; COPETTI, C.; GONZAGA, L. V.; ZAMBIAZI, R. C.; FILHO, J. M.; FETT, R. Chemical characterization, bioactive compounds, and antioxidant capacity of Jussara (*Euterpe edulis*) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil. *Food Research International*, v.44, p.2128-2133, 2011.
- BORGES, G. S. C.; GONZAGA, L. V.; JARDINI, J. M. F.; FILHO, J. M.; HELLER, M.; MICKÉ, G.; COSTA, A. C. C.; FETT, R. Protective effect of *Euterpe edulis* M. on Vero cell culture and antioxidant evaluation based on phenolic composition using HPLC–ESI-MS/MS. *Food Research International*, v.51, p.363-369, 2013.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. Adota o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados, anexo à presente Instrução Normativa. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. Brasília, 2007.

- BRITO, E. S.; ARAÚJO, M. C. P.; ALVES, R. E.; CARKEET, C.; CLEVIDENCE, B. A.; NOVOTNY, J. A. Anthocyanins present in selected tropical fruits: acerola, jambolão, jussara, and guajiru. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p.9389–9394, 2007.
- BYAMUKAMA, R., ANDIMA, M., MBABAZI, A., KIREMIRE, B. T. Anthocyanins from mulberry (*Morus rubra*) fruits as potential natural colour additives in yoghurt. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, v. 8, n.12, p. 182-190, 2014.
- CANUTO, G. A., OLIVEIRA, D. R., DA CONCEIÇÃO, L. S., FARAH, J. P., TAVARES, M. F. Development and validation of a liquid chromatography method for anthocyanins in strawberry (*Fragaria* spp.) and complementary studies on stability, kinetics and antioxidant power. *Food Chemistry*, v. 192, p. 566-574, 2016.
- CARLINI, E. A. Plants and the central nervous system. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 75, p. 501–512, 2003.
- CASTAÑEDA-OVANDO A., M. L. PACHECO-HERNÁNDEZ, M. E. PÁEZ-HERNÁNDEZ, J. A. RODRÍGUEZ, C. GALÁN-VIDAL, Chemical studies of anthocyanins: A review, *Food Chemistry*, v. 113, p. 859-871, 2009.
- CAVALCANTI, R. N., SANTOS, D. T., MEIRELES, M. A. A. Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems – an overview. *Food Research International*, v. 44, p. 499-509, 2011.
- CHANDRA, A., RANA, J., LI, Y. Separation, identification, quantification, and method validation of anthocyanins in botanical supplement raw materials by HPLC and HPLC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, p. 3515-3521, 2001.
- CHOUCHOULI, V., KALOGEROPOULOS, N., KONTELES, S. J., KARVELA, E., MAKRIS, D. P., KARATHANOS, V. T. Fortification of yogurts with grapes (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Science and Technology*, v. 53, p. 522–529, 2013.
- DIAS, A. L. S., ROZET, E., CHATAIGNÉ, G., OLIVEIRA, A. C., RABELO, C. A. S., RUBERT, P., et al. A rapid validated UHPLC–PDA method for anthocyanins quantification from *Euterpe oleracea* fruits. *Journal of Chromatography B*, v. 907, p. 108–116, 2012.
- FAN, G., HAN, Y., GU, Z., GU, F. Composition and colour stability of anthocyanins extracted from fermented purple sweet potato culture. *Food Science and Technology*, v. 4, n. 8, p. 1412-1416, 2008.
- FUKUMASU, H.; SILVA, T. C.; AVANZO, J. L.; LIMA, C. E.; MACKOWIAK, I. I.; ATROCH, A.; SPINOSA, H. S.; MORENO, F. S.; DAGLI, M. L. Z. Chemopreventive effects of *Paullinia cupana* Mart. Var. *sorbilis*, the guaraná, on mouse hepatocarcinogenesis. *Cancer Letters*, v. 233, p. 158-164, 2006.

- HENDERSON, A. The genus *Euterpe* in Brazil. In: REIS, M.S.; REIS, A. (Eds.) *Euterpe edulis* Martius – (Palmitero) biologia, conservação e manejo. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 2000.
- HELAL, A. e TAGLIAZUCCHI, D. Impact of in-vitro gastro-pancreatic digestion on polyphenols and cinnamaldehyde bioaccessibility and antioxidant activity in stirred cinnamon-fortified yogurt. *Food Science and Technology*, v. 89, p. 164–170, 2018.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Produção Agrícola Municipal*, v. 39, p. 101, 2012.
- INÁCIO, M. R. C., LIMA, K. M. G., LOPES, V. G. L., PESSOA, J. D. C., TEIXEIRA, G. H. A. Total anthocyanin content determination in intact açai (*Euterpe oleracea* Mart.) and palmitero-juçara (*Euterpe edulis* Mart.) fruit using near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate calibration. *Food Chemistry*, v. 136, p. 1160–1164, 2013.
- IPEF. Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, 2008.
- JESUS, N. Z. T.; FALCÃO, H. S.; GOMES, I. F.; LEITE, T. J. A.; LIMA, G. R. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; BATISTA, L. M. Tannins, Peptic Ulcers and Related Mechanisms. Review. *International Journal of Molecular Sciences*. v. 13, p. 3203-3228, 2012.
- KAMILOGLU, S.; PASLI, A. A.; OZCELIK, B.; CAMP, J. V.; CAPANOGLU, E. Colour retention, anthocyanin stability and antioxidant capacity in black carrot (*Daucus carota*) jams and marmalades: Effect of processing, storage conditions and *in vitro* gastro intestinal digestion. *Journal of functional foods*, v. 13, p. 1-10, 2015.
- KIRCA, A., OZKAN, M., CEMEROG, B. Stability of black carrot anthocyanins in various fruit juices and nectars. *Food Chemistry*, v. 97, n. 4, p. 598-605, 2006.
- KLEIN, T., LONGHINI, R., MELLO, J. C. P. Development of an analytical method using reversed-phase HPLC-PDA for a semipurified extract of *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (guaraná). *Talanta*, v. 88, p. 502–506, 2012.
- LEIDENS, K. Impregnação do corante natural antocianina em matriz polimérica de quitosana e quitosana / alginato e estudos de liberação. Relatório apresentado ao Curso de Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, para a obtenção da aprovação na disciplina QMC5510, Florianópolis, 2005.
- LIMA, C. P. Estudo Fitoquímico, Bromatológico e das Propriedades biológicas de frutos de *Euterpe edulis* Martius (Arecaceae) Tese- Programa de Pós graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

- LOPES, T. J.; XAVIER, M. F.; QUADRI, M.G. N.; QUADRI, M. B. Anthocyanins: a brief review of structural characteristics and stability. *Revista Brasileira de Agropecuária*, v. 13, n. 3, p. 291-297, 2007.
- MACHADO, K. N., FREITAS, A. A., CUNHA, L. H., FARACO, A. A. G., PÁDUA, R. M., BRAGA, F. C., SOARES, C. D. V., CASTILHO, R. O. A rapid simultaneous determination of methylxanthines and proanthocyanidins in Brazilian guaraná (*Paullinia cupana* Kunth.). *Food Chemistry*, v. 239, p. 180–188, 2018.
- MANTOVANI, A.; MORELLATO, L.P.C. Fenologia da Floração, frutificação, mudança foliar e aspectos da biologia floral do palmito. In: REIS, M.S.; REIS, A. (Eds.) *Euterpe edulis* Martius – (Palmito) biologia, conservação e manejo. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 2000.
- MARQUES, L. L. M.; FERREIRA, E. D. F.; PAULA, M. N. P.; KLEIN, T.; MELLO, J. C. P. *Paullinia cupana*: a multipurpose plant – a review. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 29, p. 77–110, 2019.
- OLIVEIRA, A., ALEXANDRE, E. M. C., COELHO, M., LOPES, C., ALMEIDA, D. P. F., PINTADO, M. Incorporation of strawberries preparation in yogurt: Impact on phytochemicals and milk proteins. *Food Chemistry*, v. 171, p. 370–378, 2015.
- OTOBONE, F. J.; SANCHES, A. C. C.; MAGAE, R. L.; MARTINS, J. V. C.; SELA, V. R.; MELLO, J. C. P.; AUDI, E. A. Effect of lyophilized extracts from guaraná seeds [*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke] on behavioral profiles in rats. *Phytoterapy Research*, v.21, p. 531-535, 2007.
- PATRICK, M. F.; EMILY, D. N. Effect of cultivar on phenolic levels, anthocyanin composition, and antioxidant properties in purple basil (*Ocimum basilicum* L.). *Food Chemistry*, v. 164, p. 518-526, 2014.
- ROGEZ, H. Açai: Preparo, Composição e Melhoramento da Conservação. Belém:EDUFPA, 2000.
- RONCON, C.M., DE ALMEIDA, C.B., KLEIN, T., MELLO, J.C.P., AUDI, E.A. Anxiolytic effects of a semipurified constituent of guaraná seeds on rats in the elevated T-maze test. *Planta Medica*, v. 77, p. 236-241, 2011.
- RUTELLA, G. S., TAGLIAZICCHI, D., SOLIERI, L. Survival and bioactivities of selected probiotic lactobacilli in yogurt fermentation and cold storage: New insight for developing a bi-functional dairy food. *Food Microbiology*, v. 60, p. 54–61, 2016.
- RUTZ, J. K. Caracterização e microencapsulação de suco de pitanga roxa (*Eugenia uniflora* L.) Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Pelotas, 2013.

- SANTANA, A. L., MACEDO, G. A. Health and technological aspects of methylxanthines and polyphenols from guarana: A review. *Journal of Functional Foods*, v. 47, p. 457–468, 2018.
- SCIMPL, F. C., DA SILVA, J. F., GONÇALVES, J. F. D. C., MAZZAFERA, P. Guaraná: Revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 150, n.1, p.14–31, 2013.
- SCHULZ, M.; BORGES, G. S. C.; GONZAGA, V. COSTA, A. C. O.; FETT, R. Juçara fruit (*Euterpe edulis* Mart.): Sustainable exploitation of a source of bioactive compounds. *Food Research International*, V. 89, P. 14–26, 2016.
- SILVA FILHO, J.L.V. Análise econômica da produção e transformação em ARPP, dos frutos de *Euterpe edulis* Mart. em açaí no município de Garuva estado de Santa Catarina. Dissertação (Mestrado em Agrossistemas), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.
- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. ed. Porto Alegre: Artmed Editora LMTA, p. , 2017.
- SOLAIMAN, Z. M., SENOO, K. Arbuscular mycorrhizal fungus causes increased condensed tannins concentrations in shoots but decreased in roots of *Lotus japonicus* L. *Rhizosphere*, v. 5, p. 32–37, 2018.
- THE PLANT LIST. A working list of all plant species, 2010. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org>>. Acesso em: 10/05/2019.
- THE PLANT LIST. A working list of all plant species, 2013. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org>>. Acesso em: 05/10/2019.
- TROPICOS. Disponível em: <<http://www.tropicos.org>>. Acesso em: 10/05/2019.
- TSUKAMOTO FILHO, A. A. Introdução do palmitreiro (*Euterpe edulis* Martius) em sistemas agroflorestais em Lavras. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.
- VALDUGA, E.; LIMA L.; PRADO, R.; PADILHA, F. F.; TREICHEL, H. Extração, secagem por atomização e microencapsulamento de antocianinas do bagaço da uva isabel (*Vitis labrusca* L.). *Ciência e Agrotecnologia*, v. 32, n. 5, p. 1568-1574, 2008.
- VIEIRA, G. S.; CAVALCANTI, R. N.; MEIRELES, M. A. A.; HUBINGER, M. D.; Chemical and economic evaluation of natural antioxidant extract sobtained by ultrasound-assisted and agitated bed extraction from jussara pulp (*Euterpe edulis*).*Journal of Food Engineering*, v.119, p. 196-204, 2013.
- WALLACE, T. C.; GIUSTI, M. M. Determination of Color, Pigment, and Phenolic Stability in Yogurt Systems Colored with Nonacylated Anthocyanins from *Berberis*

boliviana L. as Compared to Other Natural/Synthetic Colorants. Journal of Food Science, v.73, n.4, 2008.

WANG, H. Rapid quantitative analysis of individual anthocyanin content based on high-performance liquid chromatography with diode array detection with the pH differential method. Journal of Separation Science, v. 37, p. 2535-2544, 2014.

WENDLING, L. K.; WESCHENFELDER, S. Probióticos e alimentos lácteos fermentados – Uma revisão. Revista Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, v. 68, nº. 395, p. 49-57, 2013.

YAMAGUTI-SASAKI, E.; ITO, L. A.; CANTELI, V. C. D.; USHIROBIRA, T. M. A.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; MELLO, J. C. P. Antioxidant capacity and in vitro prevention of dental plaque formation by extracts and condensed tannins of *Paullinia cupana*. Molecules, v. 12, p. 1950-1963, 2007.