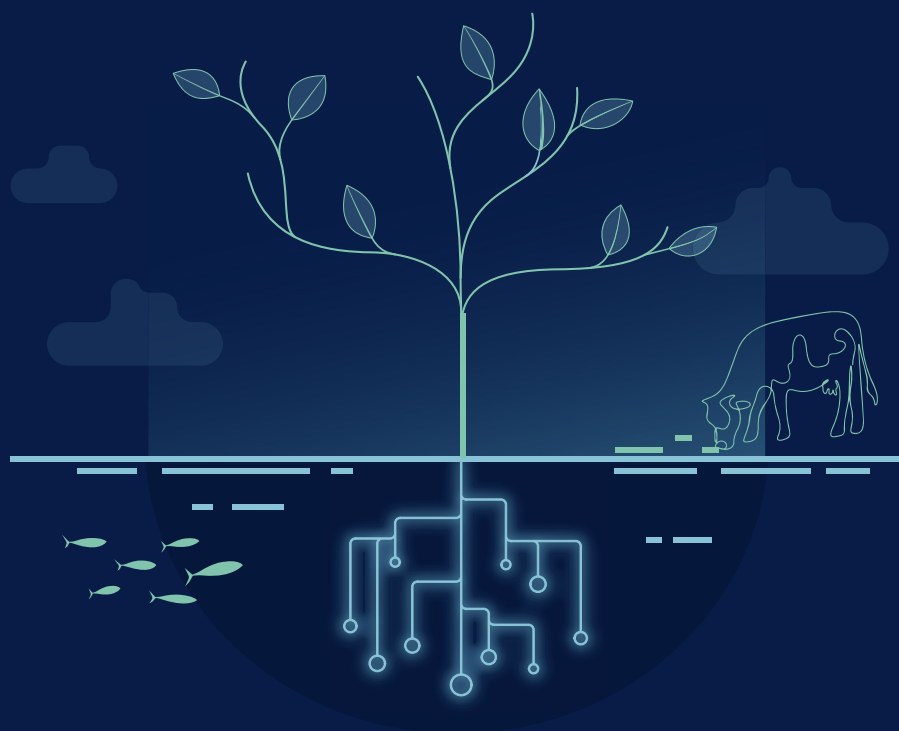


PRÁTICAS EM TECNOLOGIA AGROALIMENTAR



Camila Sampaio Mangolim | Amanda Marília da Silva Sant'Ana
Angela Maria Tribuzy de Magalhães Cordeiro | Bruno Raniere Lins de Albuquerque Meireles
Fábio Anderson Pereira da Silva | Íris Braz da Silva Araújo | Stelio Braga da Fonseca

Organizadores

PRÁTICAS EM TECNOLOGIA AGROALIMENTAR



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

Valdiney Veloso Gouveia

Reitor

Liana Filgueira Albuquerque

Vice-Reitora



Natanael Antônio dos Santos

Diretor Geral da Editora UFPB

Everton Silva do Nascimento

Coordenador do Setor de Administração

Gregório Ataíde Pereira Vasconcelos

Coordenador do Setor de Editoração

CONSELHO EDITORIAL

Cristiano das Neves Almeida (Ciências Exatas e da Natureza)

José Humberto Vilar da Silva (Ciências Agrárias)

Julio Afonso Sá de Pinho Neto (Ciências Sociais e Aplicadas)

Márcio André Veras Machado (Ciências Sociais e Aplicadas)

Maria de Fátima Alcântara Barros (Ciências da Saúde)

Maria Patrícia Lopes Goldfarb (Ciências Humanas)

Elaine Cristina Cintra (Linguística e das Letras)

Regina Celi Mendes Pereira da Silva (Linguística e das Letras)

Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes (Ciências Biológicas)

Raphael Abrahão (Engenharias)

Editora filiada à



Camila Sampaio Mangolim
Amanda Marília da Silva Sant'Ana
Angela Maria Tribuzy de Magalhães Cordeiro
Bruno Raniere Lins de Albuquerque Meireles
Fábio Anderson Pereira da Silva
Íris Braz da Silva Araújo
Sthelio Braga da Fonseca
Organizadores

PRÁTICAS EM TECNOLOGIA AGROALIMENTAR

Editora UFPB
João Pessoa
2024

1ª Edição – 2024

E-book aprovado para publicação através do Edital nº 01/2023 – Editora UFPB.

É proibida a reprodução total ou parcial desta obra, de qualquer forma ou por qualquer meio.
A violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610/1998) é crime estabelecido no artigo 184 do código penal.

O CONTEÚDO DESTA PUBLICAÇÃO, SEU TEOR, SUA REVISÃO E SUA NORMALIZAÇÃO
SÃO DE INTEIRA RESPONSABILIDADE DO(S) AUTOR(ES).

Projeto gráfico · **Editora UFPB**
Editoração eletrônica e design de capa · **Mônica Câmara**
Imagem de capa (ilustração digital) · **Freepik**

Catálogo na fonte: **Biblioteca Central da Universidade Federal da Paraíba**

- P912 Práticas em tecnologia agroalimentar [recurso eletrônico] /
Camila Sampaio Mangolim, Amanda Marília da Silva
Sant'Ana, Angela Maria Tribuzy de Magalhães Cordeiro,
Bruno Ranieri Lins de Albuquerque Meireles, Fábio Anderson
Pereira da Silva, Íris Braz da Silva Araújo, Sthelio Braga da
Fonseca (organizadores). – Dados eletrônicos – João Pessoa :
Editora UFPB, 2024.
- E-book.
Modo de acesso : <http://www.editora.ufpb.br/sistema/press/>
ISBN: 978-65-5942-268-5
1. Tecnologia de alimentos. 2. Tecnologia agroalimentar.
3. Ingredientes alimentícios – Microencapsulação. 4. Revestimentos
comestíveis – Alimentos. I. Mangolim, Camila Sampaio. II. Santa'Ana,
Amanda Marília da Silva. III. Cordeiro, Angela Maria Tribuzy de
Magalhães. IV. Meireles, Bruno Ranieri Lins de Albuquerque. V. Silva,
Fábio Anderson Pereira da. VI. Araújo, Íris Braz da Silva. VII. Fonseca,
Sthelio Braga da. VIII. Título.

UFPB/BC

CDU 664

OS DIREITOS DE PROPRIEDADE DESTA EDIÇÃO SÃO RESERVADOS À:



Cidade Universitária, Campus I – Prédio da Editora Universitária, s/n
João Pessoa – PB CEP 58.051-970
<http://www.editora.ufpb.br> E-mail: editora@ufpb.br Fone: (83) 3216.7147

Para Weysser Felipe Cândido de Souza
In memoriam

SUMÁRIO

10 APRESENTAÇÃO

12 **CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO À TECNOLOGIA AGROALIMENTAR**

Camila Sampaio Mangolim

José Evangelista Santos Ribeiro

Weysser Felipe Cândido de Souza

20 **CAPÍTULO 2: FILMES E REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS PARA ALIMENTOS**

Cristiani Viegas Brandão Grisi

Patrícia Lima Araújo

George Henrique Camêlo Guimarães

Angela Maria Tribuzy de Magalhães Cordeiro

Bruno Ranieri Lins de Albuquerque Meireles

43 **CAPÍTULO 3: MICROENCAPSULAÇÃO DE INGREDIENTES ALIMENTÍCIOS**

Camila Sampaio Mangolim

Max Suel Alves dos Santos

68 **CAPÍTULO 4: CURA ALTERNATIVA DE PRODUTOS CÁRNEOS**

Fábio Anderson Pereira da Silva

Valquíria Cardoso da Silva Ferreira

Elen Carla Alves da Silva

Isabelly da Silva Ramalho

José Narciso Francisco da Silva Filho

Maria de Fátima Clementino dos Santos

84 **CAPÍTULO 5: INDICADORES QUÍMICOS E SENSORIAIS DA QUALIDADE DO PESCADO**

Iris Braz da Silva Araújo

Fabiano Queiroga da Silva

Antônio Rosendo Costa

Neylton Marinho da Rocha

Inês Maria Barbosa Nunes Queiroga

Sthelio Braga da Fonseca

109 **CAPÍTULO 6: MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO PARA VEGETAIS**

Cristiani Viegas Brandão Grisi

Aline Macedo Dantas

Ana Regina Simplicio de Medeiros

Angela Maria Tribuzy de Magalhães Cordeiro

148 **CAPÍTULO 7: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS VEGETAIS**

Camila Sampaio Mangolim

Jossana Pereira de Sousa Guedes

176 **CAPÍTULO 8: APLICAÇÃO DA ELETROFORESE NA ANÁLISE DE PROTEÍNAS DO LEITE**

Laíza Soliely Costa Gonçalves

Amanda Marília da Silva Sant'Ana

Euzimária Amanso Silva

Marcelo Wesley da Silva Barbosa

José Evangelista Santos Ribeiro

214 **CAPÍTULO 9: MÉTODO INFOGEST NA DIGESTÃO SIMULADA IN VITRO DO LEITE**

Michele Santos de Oliveira

Amanda Marília da Silva Sant'Ana

Janaína Felizardo de Souza

Michela de Lima Bezerra

Valquíria Cardoso da Silva Ferreira

Camila Sampaio Mangolim

242 **SOBRE OS AUTORES E AS AUTORAS**

APRESENTAÇÃO

A presente obra se destina a todos(as) alunos(as), pesquisadores(as) e demais profissionais da área de alimentos interessados(as) em explorar temas relacionados à tecnologia agroalimentar. O livro reúne uma coletânea de temas inovadores da área de Ciência e Tecnologia de Alimentos que integram as linhas de pesquisa do Programa de Pós-graduação em Tecnologia Agroalimentar (PPGTA) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Os tópicos abordados neste livro foram selecionados com base nas áreas de pesquisa dos grupos que compõem o PPGTA. Os conteúdos estão organizados de forma a apresentar uma abordagem prática e direta dos assuntos explorados pelos pesquisadores, incluindo tanto temas atuais quanto práticas e metodologias clássicas de análises relacionadas aos tópicos descritos.

No primeiro capítulo, uma introdução geral contendo informações sobre os temas inovadores dessa obra será apresentada. Já no segundo capítulo, o desenvolvimento de filmes e revestimentos comestíveis será discutido, demonstrando a importância de sua aplicação em alimentos com o objetivo de controlar o crescimento microbiano e as reações indesejáveis.

O capítulo três discute a microencapsulação de ingredientes alimentícios, demonstrando as vantagens e desvantagens dessas técnicas e trazendo *insights* de seus principais usos e aplicações na indústria de alimentos.

Os capítulos quatro e cinco trazem informações inovadoras da indústria de produtos de origem animal como a elaboração de

produtos cárneos curados a partir de compostos naturais e quais os indicadores sensoriais e químicos para avaliar a qualidade dos produtos elaborados.

Nos capítulos seis e sete, serão apresentados os métodos clássicos e mais utilizados na determinação de propriedades antioxidantes e antimicrobianas de extratos e produtos vegetais.

Por fim, os capítulos oito e nove reúnem informações sobre as técnicas analíticas mais utilizadas na identificação, caracterização e estudo da estabilidade de compostos, como a eletroforese e digestão simulada *in vitro*.

De maneira geral, essa obra traz como propósito principal o de auxiliar pesquisadores de Iniciação Científica e de Pós-graduação que trabalham no desenvolvimento de novos produtos contendo ingredientes e compostos naturais. As metodologias de análise aqui abordadas de maneira simples e objetiva poderão auxiliar ainda no desenvolvimento e fácil execução de seus respectivos experimentos.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO À TECNOLOGIA AGROALIMENTAR

Camila Sampaio Mangolim

José Evangelista Santos Ribeiro

Weysser Felipe Cândido de Souza

A Tecnologia Agroalimentar consiste nos processos aplicados no campo e nas agroindústrias de alimentos e bebidas, ou de ingredientes, aditivos e embalagens destinadas a alimentos. Essas agroindústrias atuam na transformação das matérias-primas provenientes da agricultura, da pecuária, da aquicultura e silvicultura, tanto para produção de bens de consumo quanto para a produção de insumos e instrumentos que possibilitam o aumento da produtividade na agropecuária. Sendo assim, a pesquisa em Tecnologia Agroalimentar aborda uma visão sistêmica da problemática agroindustrial, a fim de aproveitar as matérias-primas das diferentes cadeias de produção agropecuária, compondo novos processos tecnológicos que contribuem de forma consistente para melhorar as cadeias agroalimentares.

É fato que a Tecnologia Agroalimentar tem atuação nas indústrias que objetivam o fornecimento de produtos a um mercado consumidor cada vez mais exigente, lidando com os métodos de transformação e conservação, armazenamento, embalagem e distribuição dos alimentos e bebidas, com foco em produtos seguros e de alta qualidade nutricional e sensorial.

Para atender a estas demandas, as agroindústrias estão cada vez mais modernas e sofisticadas, dando espaço para tecnologias emergentes de processamento e obtenção de ingredientes e embalagens para alimentos.

É importante ressaltar que, para que um produto final tenha qualidade, as matérias-primas empregadas na sua produção também necessitam apresentar boa qualidade, pois as tecnologias não têm a capacidade de “corrigir” matérias-primas ruins (não se faz um bom molho de tomate com tomates injuriados ou na senescência, por exemplo). Desta forma, a Tecnologia Agroalimentar atua também na obtenção das melhores matérias-primas para a agroindustrialização, sabendo que o planejamento da produção se faz necessário desde o plantio dos vegetais e seleção e nutrição dos animais até o momento que a matéria-prima é empregada na elaboração de um produto derivado.

Mais uma vez e por fim, em todas as fases da agroindustrialização, o objetivo é que tanto a matéria-prima quanto os produtos derivados satisfaçam as exigências relacionadas à sanidade, valor nutricional, características sensoriais e com estabilidade ou resistência ao processamento. Para atender a estas exigências, a observação das tendências do mercado consumidor é o primeiro passo.

ALGUMAS TENDÊNCIAS RELACIONADAS À TECNOLOGIA AGROALIMENTAR

No panorama da sociedade moderna, são observados diversos fatores que têm contribuído para o surgimento e consolidação de tendências tecnológicas no setor agroalimentar. Dentre estes fatores, é possível citar: **1)** a crise climática, com temperaturas alcançando valores recordes (máximos e mínimos), demonstrando a realidade dos efeitos do aquecimento global, os quais tendem a alterar e colocar em risco as condições de vida no planeta; **2)** o acesso à informação, o que gera sociedades mais esclarecidas e críticas em relação a aspectos ambientais, de saúde, sociais e econômicos; **3)** a globalização dos mercados, aumentando a competitividade; **4)** os avanços tecnológicos relativos à inteligência artificial, internet das coisas (*internet of things* – IoT), *Big data*, armazenamento de dados em nuvem (*cloud*) e plataformas de análise capazes de processar uma grande quantidade de dados variados (*big data analytics*); **5)** e o atual estilo de vida da sociedade, que está mais conectada, diversificada e inclusiva, buscando cada vez mais conveniência e qualidade de vida.

Este cenário tem sido uma força motriz de alto impacto nas tendências tecnológicas na indústria de alimentos e bebidas, motivadas por demandas focadas em sustentabilidade, estilo de vida saudável e conveniência, por parte dos consumidores, e na alta concorrência de mercado potencializada pelo fenômeno da globalização. Vale ressaltar que a indústria de alimentos sempre enfrenta novos desafios relacionados a mudanças no padrão de consumo da população. Isto porque o ponto focal de todo o

Sistema Agroindustrial (que vai desde os insumos agrícolas até o mercado consumidor) é o consumidor final, que consome os alimentos para satisfazer as suas necessidades alimentícias e tem suas escolhas dependentes de vários fatores, como renda, expectativas, faixa etária, entre outras.

Nos últimos anos, em especial após a pandemia da Covid-19, mudanças significativas ocorreram no comportamento do consumidor de forma geral. Isto porque os consumidores se tornaram mais atentos à sua saúde, buscando por alimentos que não tenham somente a função de nutrir, mas sim que apresentem outros benefícios, além de evitar o consumo de alimentos considerados vilões da nutrição, como os ricos em açúcares, sal, gorduras e com excesso de aditivos nocivos em sua composição.

Além desta tendência de alimentos saudáveis e de composição mais natural, percebe-se também a atenção com a sustentabilidade, que se relaciona com as preocupações com as mudanças climáticas e com o aquecimento global. Sendo assim, o aproveitamento sustentável de matérias-primas em processos e/ou fabricação de novos produtos, atendendo ao objetivo do Desenvolvimento Sustentável 12 da ONU (Organização das Nações Unidas), de consumo e produção responsáveis, tem sido valorizado pelo mercado consumidor, pois este aproveitamento contribui para reduzir a poluição ambiental, além de aumentar a lucratividade da produção e gerar produtos com benefícios à saúde. Como exemplo, o uso de resíduos de frutas e hortaliças como ingredientes de *snacks* ou como fontes para obtenção de compostos com propriedades biológicas de interesse (com capacidade antioxidante, antimicrobiana, etc.) tem sido alvo de muitas pesquisas científicas.

A tecnologia de embalagens para alimentos, na forma de materiais comestíveis ou biodegradáveis, também tem ocupado um espaço significativo nas tendências com foco no mercado consumidor preocupado com sustentabilidade e com o excesso de lixo plástico produzido no mundo. Opções de embalagens biodegradáveis, que podem ser compostadas, ou até embalagens comestíveis, têm sido produzidas com matérias-primas alimentares comuns (amidos, sementes e óleos) e também a partir de resíduos agroindustriais (como casca de frutas).

Ainda sobre tecnologia de embalagens, não se pode deixar de citar as tecnologias de embalagens ativas e inteligentes, que vêm de encontro com as necessidades de um consumidor mais conectado e atento ao produto, o que também pode ser atrelado às tendências *clean label* nesta mesma área. As embalagens ativas são aquelas que incorporam aditivos objetivando manter ou estender a qualidade e a vida de prateleira do produto, enquanto as embalagens inteligentes monitoram as condições do produto embalado, fornecendo informações a respeito da qualidade do mesmo ao consumidor. A embalagem inteligente, que se comunica de forma efetiva com o consumidor, unida ao conceito de embalagem *clean label*, que é aquela no qual a indústria comunica com maior clareza e de forma mais simples e habitual para o consumidor os materiais (ingredientes e aditivos) e processos empregados na fabricação, também atendem a várias demandas da sociedade conectada e preocupada com o que consome.

Atrelado ao conceito dos produtos *clean label* surgem as demandas por alimentos com menos aditivos, mais naturais e que usem processos mais brandos de produção, deixando de lado

ingredientes e processos vistos como artificiais e não familiares aos consumidores. Considerando que os aditivos sintéticos podem promover alguns efeitos colaterais e riscos aos consumidores (por exemplo: reações alérgicas, dores abdominais e potenciais efeitos carcinogênicos), uma das formas de diminuir o risco dessas reações adversas é por meio da substituição destes aditivos sintéticos pelos naturais.

Entre os principais aditivos naturais que vêm sendo utilizados como tendências na pesquisa e na indústria de alimentos, destacam-se os óleos essenciais e extratos vegetais, que consistem de substâncias ricas em compostos fenólicos com propriedades antimicrobianas e antioxidantes, que podem ser usadas para aumentar a vida de prateleira dos alimentos ao mesmo tempo que diminuem o consumo de aditivos sintéticos. No entanto, deve-se ainda considerar que estes compostos naturais apresentam uma menor estabilidade e podem impactar de forma negativa o aspecto sensorial dos alimentos. Assim, várias técnicas têm sido empregadas para superar estes inconvenientes, sendo uma delas a microencapsulação, que é uma técnica amplamente explorada em pesquisas científicas não só na área agroalimentar, mas também em indústrias de cosméticos, medicamentos, químicas, entre outras.

A microencapsulação consiste no aprisionamento de compostos de interesse em uma matriz polimérica para protegê-los de fatores externos. Além disso, é responsável por melhorar a estabilidade e solubilidade das substâncias, promovendo ainda a liberação controlada e permitindo que a sua bioatividade permaneça por mais tempo na matriz em que será aplicado.

Ainda relacionado ao fato de que a pesquisa e a indústria estão cada vez mais preocupadas com o uso de compostos naturais com propriedades bioativas como antimicrobianas e antioxidantes para manter a qualidade dos alimentos e aumentar a sua vida de prateleira, diversos métodos analíticos vêm sendo desenvolvidos ou modificados para avaliar o potencial desses compostos, levando a Ciência e a Tecnologia a caminharem juntas para produzir cada vez mais alimentos com qualidade e de forma sustentável.

Por fim, a sociedade moderna vivencia a quarta revolução industrial caracterizada pela produção inteligente (*smart factory*) a partir da automação e do compartilhamento de dados na tecnologia de fabricação. A agroindústria 4.0 utiliza a integração de tecnologias avançadas, tais como, IoT, Big data, inteligência artificial (artificial intelligence – AI), e segurança cibernética (cybersecurity) para melhorar a interação homem-máquina e tornar os meios de produção mais eficientes, sustentáveis e inteligentes.

Diante disso, esse livro surge como uma proposta para apresentar as principais tendências na área da Tecnologia Agroalimentar e como a Pesquisa Científica tem contribuído para o desenvolvimento e evolução na produção de alimentos.

REFERÊNCIAS

ASIOLI, D.; ASCHEMANN-WITZEL, J.; CAPUTO, V.; VECCHIO, R.; ANNUNZIAT, A.; NAES, T.; VARELA, P. Making sense of the “clean label” trends: A review of consumer food choice behavior and

discussion of industry implications. **Food Research International**, v. 99, p. 58-71, 2017.

BIJI, K. B.; RAVISHANKAR, C. N.; MOHAN, C. O.; GOPAL, T. K. S. Smart packaging systems for food applications: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 6125-6135, 2015.

PORPINO, G.; BOLFE, E. L. Tendências de consumo de alimentos: implicações e oportunidades para o setor agroalimentar brasileiro. **Informe Agropecuário. Certificação, rastreamento e agregação de valor**, v. 41, n. 311, p. 7-14, 2020.

SOUZA, W. F. C.; ALMEIDA, F. L. C.; MELO, A. M. SOARES, A. S. P.; FORTE, M. B. S.; CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Immobilization techniques on bioprocesses: Current applications regarding enzymes, microorganisms, and essential oils. **Food and Bioprocess Technology**, v. 15, p. 1449-1476, 2022.

ZAICOVSKI, Cristiane Brauer. **Técnico em Agroindústria. Introdução à Agroindústria – volume 2**. Instituto Federal Sul-rio-grandense. e-Tec Brasil: Pelotas, 2012.

CAPÍTULO 2

FILMES E REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS PARA ALIMENTOS

Cristiani Viegas Brandão Grisi

Patrícia Lima Araújo

George Henrique Camêlo Guimarães

Angela Maria Tribuzy de Magalhães Cordeiro

Bruno Raniere Lins de Albuquerque Meireles

A indústria brasileira, para atender a demanda de consumidores preocupados com a origem dos alimentos produzidos e com sistemas ecologicamente sustentáveis de produção, tem buscado materiais alternativos de base biológica para serem utilizados na elaboração de filmes e revestimentos. Eles desempenham um papel relevante na melhoria das características sensoriais dos produtos e na minimização dos problemas ambientais, mostrando-se cruciais para um ambiente mais seguro e saudável.

O filme comestível consiste em um material fino pré-formado, que pode ser colocado sobre o alimento ou entre componentes dele. Filmes comestíveis são estruturas independentes usadas como material de parede de embalagem, e que para serem considerados comestíveis precisam ser produzidos como um alimento, seguindo as boas práticas de fabricação. Os filmes são produzidos por diferentes processos como gelificação; ou coagulação térmica, que consiste no aquecimento das macromoléculas que envolvem desnaturação, formação de gel e

precipitação; ou coacervação simples ou complexa, que consiste na precipitação de um hidrocoloide que está disperso em solução aquosa; seguido, por processos de extrusão, ou moldagem por compressão, ou moldagem por injeção, ou moldagem por evaporação de solvente.

Os filmes comestíveis produzidos a partir de biopolímeros apresentam algumas limitações importantes quando substituem os polímeros convencionais. Uma delas é que a maioria deles se degrada em temperaturas próximas, geralmente inferiores, aos seus pontos de fusão, tornando os métodos tradicionais de processamento térmico no estado fundido (por exemplo, extrusão, moldagem por compressão, moldagem por injeção) desafiadores e geralmente inviáveis. Portanto, seu processamento normalmente requer adaptações de engenharia ou processos úmidos, baseados na evaporação de solvente, como o método de *casting*.

Os revestimentos são caracterizados como uma fina camada aplicada sobre a superfície de um produto, criando a atmosfera modificada, formada em função da permeabilidade do material e taxa respiratória quando aplicados em vegetais. O revestimento utilizado deve assegurar a qualidade dos produtos recobertos, atrasar a maturação e senescência, reduzir a desidratação e a taxa de crescimento microbiano, minimizando as perdas após a colheita. Outro fator, inerente a superfície dos vegetais que está diretamente relacionado a aplicação dos revestimentos, é a serosidade natural que minimiza a interação entre a superfície da infrutescência e o revestimento, influenciando no espalhamento ou molhabilidade, que é a capacidade que o líquido apresenta em escorrer sobre uma superfície.

O revestimento comestível, ou também chamado de recobrimento, é uma fina camada de material que seca diretamente no produto, moldando à forma do alimento revestido. A obtenção destes revestimentos pode ser através da imersão do produto na solução de revestimento, ou pela pulverização, ou aspersão, ou espalhamento da solução de revestimento na superfície do alimento, ou fusão e solidificação das gorduras sólidas e ceras.

Existem diversos métodos para síntese de filmes e revestimentos, onde o princípio de produção da matriz filmogênica é baseado, principalmente, na dispersão ou solubilização dos biopolímeros em um solvente e acréscimo ou não de aditivos plastificantes. Como forma de otimização do processo de produção da matriz filmogênica são empregadas algumas técnicas, como a agitação manual ou com aparelhos de alta rotação, o aumento da temperatura durante a solubilização, ajuste de pH, utilização de ultrassom para remoção de bolhas de ar e completa dissolução da suspensão, entre outras técnicas. Neste contexto, serão detalhados os principais métodos de obtenção de filmes e revestimentos utilizados em escala laboratorial, tais como *casting*, imersão e pulverização.

MÉTODOS PARA ELABORAÇÃO DOS FILMES E REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS

CASTING

O método de *casting* também é conhecido como fundição por solvente, e normalmente usado para elaboração de filme em escala laboratorial e piloto. A priori deve ser escolhido o polímero ou junção de polímeros para formulação básica do filme, esse polímero deve ser dissolvido em solvente apropriado, sendo a formação do filme dependente da solubilidade dele. Em sequência, a solução obtida deve ser dispersa em um molde e submetida à secagem, de modo que o solvente evapore e exista a formação do filme que ficará aderido ao molde.

As vantagens do método de *casting* são o baixo custo, a simplicidade de fabricação, sem a necessidade de utilizar equipamentos especializados, e fácil aplicabilidade. Por ser um método úmido, o acondicionamento das partículas é mais homogêneo, pois tem uma melhor interação partícula – partícula, reduzindo potenciais defeitos.

Em resumo, a técnica de *casting* está dividida em quatro etapas:

- I – Gelificação do polímero utilizando solvente apropriado;
- II – Dispersão da solução em molde adequado;
- III – Secagem para evaporação do solvente;
- IV – Remoção do filme formado no molde.

IMERSÃO

A técnica de imersão é aplicada à alimentos com superfícies irregulares, podendo ser obtidos revestimentos densos, que dependem do tipo de biopolímero para o revestimento, como também revestimentos pegajosos. A cobertura é empregada mergulhando o alimento na solução de revestimento e retirando após um tempo submerso, podendo variar de 5 a 30 segundos, e é seco naturalmente. Um desafio que pode ser pontuado é a dificuldade de conseguir propriedades de aderência adequadas.

O método por imersão para revestimentos está dividido em três etapas:

- I – Imersão e permanência;
- II – Deposição;
- III – Evaporação.

PULVERIZAÇÃO

A técnica de pulverização é comumente empregada para aplicação como revestimento em produtos alimentícios. A solução é pulverizada no alimento com o auxílio de bicos, gerando gotículas em toda superfície do produto. O manejo sobre o tamanho da gota pulverizada no alimento e qualidade do revestimento está ligado ao pistão de pulverização, ar, temperatura, bico e fluxo do fluido.

O método tradicional de pulverização pode produzir uma pulverização fina, em que o tamanho da gota é até 20 μm ,

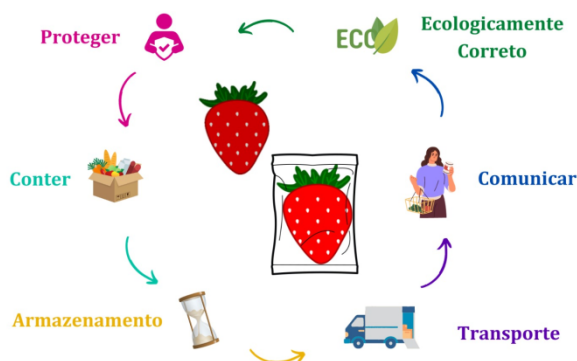
enquanto a eletropulverização forma revestimentos uniformes a partir de soluções de biopolímeros menores de 100 nm. Alguns fatores são críticos para a elaboração de revestimentos pela técnica de pulverização, a exemplos, do processo, tempo e temperatura de secagem.

Na indústria vem sendo aplicados três métodos de pulverização para a deposição dos revestimentos comestíveis em alimentos.

- I – Automatização por pulverização de ar;
- II – Atomização *airless* assistida por ar;
- III – Atomização por pressão.

EMBALAGEM

É sabido que as embalagens, em geral, têm por objetivo proteger, conter, armazenar e informar sobre o produto, permitindo também a sua distribuição e comercialização (Figura 1). As embalagens possuem características específicas a depender do produto ao qual serão aplicadas. Alguns alimentos contêm não apenas uma embalagem primária (em contato direto com o alimento), mas também uma embalagem secundária contendo esta primeira. As embalagens secundárias são necessárias para as embalagens comestíveis. Com isto, vale ressaltar que os métodos convencionais de embalagem são responsáveis por produzir uma quantidade considerável de resíduos ao meio ambiente.

Figura 1 – Funções das embalagens.

Fonte: Próprios autores (2023).

Desse modo, muito têm-se falado a respeito de embalagens oriundas de materiais biodegradáveis como opção para substituição dos materiais convencionais de origem petrolífera, trazendo destaque para os filmes e revestimentos comestíveis. Comumente, a produção de grande parte das embalagens biodegradáveis utiliza polímeros considerados ecologicamente adequados para aumentar a vida de prateleira e conservar a qualidade dos alimentos por colaborarem com a manutenção das características funcionais, sensoriais e físico-químicas.

As embalagens biodegradáveis são definidas como aquelas que se degradam por processo de transformação química promovida pela ação de micro-organismos por via aeróbica ou anaeróbica, sob condições adequadas de temperatura, umidade, luz, oxigênio e nutrientes, resultando somente em água, dióxido de carbono e biomassa. De acordo com a Norma da ABNT 15448, estas embalagens se decompõem em uma escala de tempo de semanas ou meses. Dentre estas embalagens destacam-se

as comestíveis que são produzidas com compostos considerados seguros, como especificados na lista de GRAS (*Generally Recognized as Safe*) da FDA (*Food and Drug Administration*), que é o órgão regulamentador em alimentos e medicamentos dos Estados Unidos, e além disto, devem ser processados dentro das boas práticas de fabricação, estabelecidos para alimentos.

Para garantir a segurança da utilização dessas embalagens, existem leis para regulamentação e controle na produção e qualidade dessas embalagens em que alguns requisitos básicos devem ser seguidos para que a embalagem esteja apta para ser utilizada:

- Deve seguir as boas práticas de fabricação;
- Não deve trazer nenhum risco à saúde das pessoas;
- Não deve provocar alterações na composição físico-química do alimento;
- Não deve modificar os aspectos sensoriais do alimento;
- Não conter informações enganosas sobre o produto.

Sendo assim, ao ponderar as especificidades de cada produto, os filmes e revestimentos comestíveis são potenciais alternativas para preservar, e possivelmente, melhorar a qualidade dos alimentos durante o seu processamento, armazenamento e transporte.

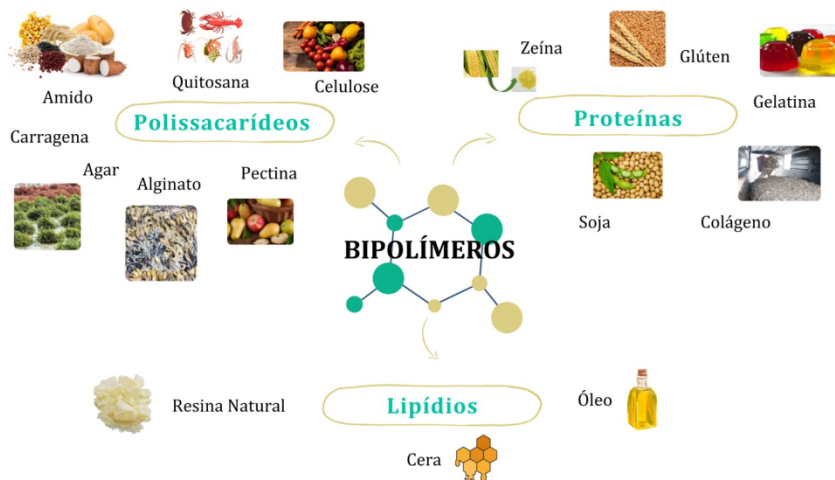
PRINCIPAIS MATRIZES POLÍMERICAS PARA FORMAÇÃO DE FILMES E REVESTIMENTOS

Os filmes e revestimentos podem ser preparados a partir de materiais biológicos, tais como polissacarídeos, proteínas e lipídios, como agentes formadores das matrizes poliméricas, chamados de biopolímeros (Figura 2). Os filmes e revestimentos podem ter perfil hidrofílico ou hidrofóbico, se comportando como obstáculo para a proliferação de micro-organismos, além de reduzirem a permeabilidade ao vapor d'água e aos gases. É possível destacar também que estes filmes e revestimentos podem proteger contra impactos mecânicos provenientes do manuseio inadequado ou transporte do produto.

Os filmes e revestimentos para serem considerados comestíveis devem ser provenientes de biopolímeros comestíveis, provenientes de polissacarídeos como: o amido e seus derivados, quitosana, goma, pectina, alginato, carragena; ou proteínas de origem animal como: gelatina, colágeno, caseína, ovoalbumina, proteínas miofibrilares; ou proteínas de origem vegetal como: soja, amendoim, glúten de trigo e zeína; ou lipídios como: ceras de abelha, óleo mineral ou vegetal; bem como de suas misturas poliméricas.

O amido é considerado o biopolímero universal e amplamente utilizado há décadas. O amido é formado por várias sequências de dois polissacarídeos (amilose e amilopectina) e baseada nas propriedades químicas, físicas e funcionais da amilose, que podem formar géis.

Figura 2 – Fontes de biopolímeros para desenvolvimento de filmes e revestimentos.



Fonte: Próprios autores (2023).

As moléculas de amilose em solução, por serem lineares, tendem a se orientar paralelamente, desta forma se aproximam o suficiente para que ligações de hidrogênio sejam formadas entre hidroxilas de polímeros adjacentes, reduzindo assim a afinidade do polímero por água e favorecendo a formação de pastas opacas e filmes resistentes. A formação do filme e revestimento de amido se dá pelos processos de gelatinização e retrogradação. O processo de retrogradação, também chamado de recristalização, ocorre à medida que o amido gelatinizado esfria e envelhece, formando uma estrutura insolúvel e parcialmente cristalina, sendo diferente da conformação inicial. Neste processo ocorre a agregação das cadeias de amilose, principalmente, formando duplas hélices cristalinas estabilizadas por pontes de hidrogênio, estas hélices formam estruturas cristalinas tridimensionais altamente

estáveis. Outro fator relevante é a diferença na temperatura de gelatinização a depender da origem do amido. Como exemplo, as soluções filmogênicas formadas por amido de inhame requerem maior temperatura para gelatinização, quando comparados com o amido de mandioca (70 – 75 °C).

Quitosana é um polissacarídeo obtido da desacetilação da quitina, sendo encontrada no exoesqueleto de crustáceos e insetos. A quitosana atraiu recentemente a atenção devido às suas propriedades como agente gelificante e às suas propriedades químicas (pode formar ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas) e biológicas (sua bioatividade). As principais características deste biopolímero são: produz filmes claros, consistentes e flexíveis; e boas propriedades de barreira ao oxigênio.

O alginato é proveniente das algas marrons, enquanto a carragena é proveniente das algas vermelhas. O alginato é outro biopolímero importante que apresenta a capacidade de formar hidrogéis e de encapsulamento. Os filmes de alginato podem ser formados por gelatinização, evaporação, ligação cruzada eletrolítica ou injeção de líquido miscível não solvente por alginato. Os filmes formados por alginato apresentam alta permeabilidade a gases e vapor de água, pois apresentam alta hidrofilicidade. A carragena apresenta alta tensão superficial, mostrando que os filmes e revestimentos formados por este polímero apresentam dificuldade em espalhamento, porém apresenta baixa permeabilidade ao oxigênio, menos opaco que filmes de amido e apresenta propriedade antifúngicas, sendo um bom filme contra a perda de vapores de água.

As proteínas devem se apresentar na forma aberta para permitir a interação molecular, necessária para a formação do filme ou revestimento. O grau de extensão desta interação depende da estrutura da proteína e da sequência dos resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos dela. Este biopolímero pode ser extraído de origem animal como colágeno, gelatina, caseína, proteínas do soro de queijo, proteínas miofibrilares; ou de origem vegetal como a zeína derivada do milho, a proteína isolada de soja, a proteína do glúten de trigo. Os filmes e revestimentos à base de proteínas são frágeis e suscetíveis a rachaduras.

A gelatina é uma proteína solúvel extraída de tecidos conjuntivos, ossos e pele de animais por dissociação térmica ou química das cadeias polipeptídicas do colágeno animal. Ela é uma matéria-prima produzida no Brasil em abundância e a baixo custo. As principais características dos filmes e revestimentos comestíveis de gelatina são: alta transparência, reduz a migração de oxigênio, umidade e óleo. Este biopolímero é muito utilizado como mistura de compostos, de modo a melhorar as propriedades mecânicas do material.

A zeína é uma proteína de caráter hidrofóbico, devido à elevada concentração de aminoácidos não-polares, como leucina, alanina e prolina. As principais características dos filmes e revestimento de zeína são: formam cobertura insípida, dura e transparente; apresentam estabilidade em alta umidade e calor; material com resistência natural ao ataque bacteriano e de alguns insetos.

Os lipídios são muito utilizados como revestimento há milênios. Quando aplicados para formação dos filmes, são utilizados como misturas poliméricas para melhorar as propriedades mecânicas e de barreiras, devido as suas características hidrofóbicas. Estes biopolímeros apresentam excelente barreira a umidade, moderada barreira ao oxigênio e dióxido de carbono, retarda a desidratação, rancidez oxidativa e escurecimento da superfície de vegetais.

Um outro componente importante na formação destes materiais são os agentes plastificantes como o glicerol e os açúcares (sorbitol, sacarose, monossacarídeos e açúcar invertido), que proporcionam maior maleabilidade para o material. Os plastificantes comestíveis interagem com as cadeias dos polissacarídeos e/ou proteínas, reduzindo as forças intermoleculares, aumentando a mobilidade molecular e a flexibilidade dos filmes. Estes componentes têm um caráter hidrofílico, que acaba aumentando a permeabilidade ao vapor de água do material. Os óleos quando incorporados em misturas poliméricas apresentam características plastificantes.

Além disto, outros compostos podem ser acrescentados com o intuito de trazer características específicas ao material, como os compostos ativos provenientes de óleos essenciais e extratos vegetais. Os extratos vegetais mostram-se eficientes em retardar a perda de massa e aumentam a capacidade conservante do material.

Como foi visto, existem inúmeras técnicas de elaboração dos filmes e revestimentos comestíveis e algumas destas técnicas são muito utilizadas em laboratório de pesquisa, as quais serão detalhadas a seguir.

PRÁTICA 1: MÉTODO DE CASTING

- **Objetivo**

Formar um filme fino através da evaporação de solvente por um processo de secagem da solução filmogênica previamente preparada.

- **Materiais, equipamentos e reagentes**

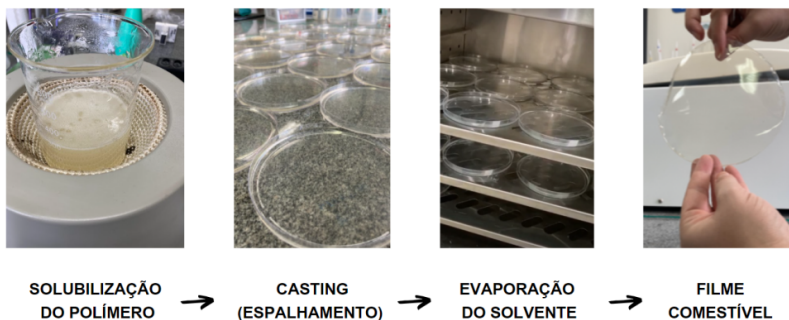
- Béquero;
- Espátula;
- Termômetro;
- Bastão de vidro;
- Placas de Petri (140x15 mm ou 150x15 mm);
- Balança analítica;
- Manta aquecedora;
- Estufa com circulação de ar;
- Água destilada;
- Alginato de sódio;
- Gelatina;
- Glicerol.

- **Procedimentos**

1. Elaborar a solução filmogênica através do processo de gelificação utilizando gelatina (2%, m/m), alginato (2%, m/m) e glicerol (1%, m/m) adicionado com a função de agente plastificante;
2. A gelatina (2%, m/m) deve ser dispersa em água destilada à 50 – 60 °C sob homogeneização;
3. Em seguida, adicionar alginato (2%, m/m) e glicerol (1%, m/m) levando ao aquecimento por 10 min a 90 °C até que a mistura esteja toda homogeneizada;
4. Esperar que a solução esfrie a temperatura ambiente até atingir por volta de 40 °C (caso ocorra a formação de muitas bolhas, a solução deve ser colocada em banho ultrassônico por 30 min);
5. Posteriormente, 45 g da formulação deve ser vertida em placas de petri estéreis;
6. Quando as placas estiverem devidamente preenchidas com a solução, bata a placa no sentido da bancada por 10x para retirada de bolhas remanescentes;
7. Em seguida, a placas devem ser submetidas a secagem em estufa de ar circulante a 50 °C por aproximadamente 15 h;
8. Ao retirar as placas da estufa aguardar entre 2 – 5 h em temperatura ambiente (25 °C) para que os filmes sejam removidos das placas facilmente.

As etapas para elaboração do filme comestível utilizando a técnica de *casting* estão descritas na figura 3.

Figura 3 – Procedimento de elaboração do filme utilizando a técnica de *casting*.



Fonte: Próprios autores (2023).

PRÁTICA 2: MÉTODO DE IMERSÃO

• Objetivo

Revestir vegetais através da imersão em solução filmogênica comestível.

• Materiais, equipamentos e reagentes

- Béquer;
- Espátula;
- Termômetro;
- Bastão de vidro;
- Balança analítica;

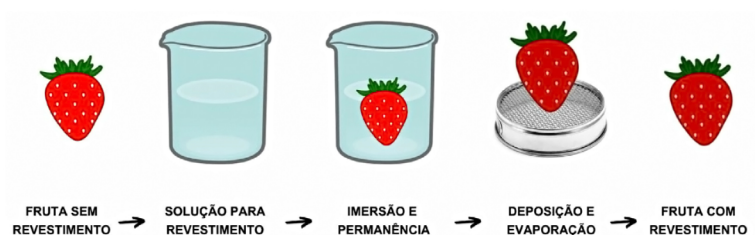
- Chapa aquecedora com agitação;
- Tela de “nylon”;
- Água destilada;
- Amido de mandioca;
- Fruta em que será aplicado o revestimento.

• Procedimentos

1. Elaborar a solução filmogênica utilizando amido de mandioca (5%, m/m) disperso em água destilada;
2. Em seguida, o amido (5%, m/m) devidamente homogeneizado deve ser aquecido até uma temperatura máxima de 70 °C, em agitação constante, até a sua gelificação;
3. A solução deve ser deixada em repouso até que esteja completamente resfriada em temperatura ambiente (25 °C);
4. Após o resfriamento, retirar a parte superior da solução, onde ocorreu a retrogradação do amido de mandioca;
5. Imergir as frutas na solução por aproximadamente 2 min e colocá-las para secar sobre tela de “nylon”, para que o líquido em excesso seja drenado. Nesta etapa, também acontece a secagem da solução sobre a fruta.

As etapas para elaboração do revestimento comestível utilizando a técnica de imersão estão descritas na figura 4.

Figura 4 – Procedimento de elaboração de revestimento comestível utilizando a técnica de imersão.



Fonte: Próprios autores (2023).

PRÁTICA 3: MÉTODO DE PULVERIZAÇÃO

- **Objetivo**

Revestir vegetais com o auxílio de um conjunto de bicos para pulverização.

- **Materiais, equipamentos e reagentes**

- Béquer;
- Espátula;
- Termômetro;
- Bastão de vidro;
- Balança analítica;
- Chapa aquecedora com agitação;
- Tela de “nylon”;
- Água destilada;

- Amido de mandioca;
- Fruta em que será aplicado o revestimento.

- **Procedimentos**

1. Elaborar a solução filmogênica utilizando amido de mandioca (5 %, m/m) disperso em água destilada;
2. Em seguida, o amido (5%, m/m) devidamente homogeneizado deve ser aquecido até uma temperatura máxima de 70 °C, em agitação constante, até a sua gelificação;
3. A solução deve ser deixada em repouso até que esteja completamente resfriada em temperatura ambiente (25 °C);
4. Após o resfriamento, retirar a parte superior da solução, onde ocorreu a retrogradação do amido de mandioca;
5. Em seguida, a fruta deve estar sob a tela de nylon em rotação contínua com velocidade controlada sob uma pistola pulverizadora manual, formando um revestimento de forma contínua;
6. O processo pode ser realizado mais de uma vez, até que a cobertura desejada seja alcançada formando um revestimento uniforme e com melhor aproveitamento da cobertura;
7. Sua aplicação depende da viscosidade da formulação a ser aplicada e das características do alimento.

As etapas para elaboração do revestimento comestível utilizando a técnica de pulverização estão descritas na figura 5.

Figura 5 – Procedimento de elaboração de revestimento comestível utilizando a técnica de pulverização.



Fonte: Próprios autores (2023).

Teste seu conhecimento!



1. Verifique na literatura as temperaturas de gelificação do amido e o tempo de secagem dos seguintes materiais: filmes de amido de batata inglesa, filmes de amido de batata doce e filmes de amido de inhame.
2. Liste 10 frutas que tem tamanho regular e que podem utilizar a técnica de revestimento por imersão.
3. Liste 5 alimentos que utilizam a técnica de revestimento por pulverização.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste capítulo, foram discutidos os principais métodos usados na elaboração de filmes e revestimentos comestíveis, em escala laboratorial. Além disto, foram detalhados os polímeros comestíveis e biodegradáveis, definindo o conceito e as características destes biopolímeros. Foram apresentadas práticas para obtenção de filmes e revestimentos comestíveis.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, M. S. *et al.* Fabrication of starch-based packaging materials. **Physical Sciences Reviews**, 2023.
- AVASSOLI-KAFRANI, E *et al.* Edible films and coatings for shelf life extension of mango: a review. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, v. 62, n. 9, p. 2432-2459, 2020.
- AZEREDO, H. M.C. *et al.* Edible films and coatings – Not just packaging materials. **Current Research in Food Science**, [S. L.], v. 5, p. 1590-1595, 2022.
- BRASIL. Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT 15448-1 Embalagens plásticas degradáveis e/ou de fontes renováveis, 2 ed, 2008.
- BUKHARI, N., Thohiroh M *et al.* Seaweed polysaccharide nanocomposite films: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 125486, 2023.
- CARRASCO, P. B *et al.* Revestimentos comestíveis proteicos. **Brazilian Journal of Food Research**, v. 10, n. 3, p. 148, 2019.
- DÍAZ-MONTES, E.; CASTRO-MUÑOZ, R. Edible films and coatings as food-quality preservers: An overview. **Foods**, v. 10, n. 2, p. 249, 2021.
- EMBRAPA. **Revestimentos comestíveis**. 2019.

HAMZAH, H. M. *et al.* Carrageenan as an alternative coating for papaya (*Carica papaya* L. cv. Eksotika). **Postharvest Biology and Technology**, v. 75, p. 142-146, 2013.

LIU, F. *et al.* Collagen films with improved wet state mechanical properties by mineralization. **Food Hydrocolloids**, v. 139, p. 108579, 2023.

LOBO, A. R.; SILVA, G. M. DE L. Amido resistente e suas propriedades físico-químicas. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 2, p. 219-226, 2003.

MAFTOONAZAD, N. *et al.* Effect of pectin-based edible emulsion coating on changes in quality of avocado exposed to *Lasiodiplodia theobromae* infection. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, n. 2, p. 341-349, 2007.

MATLOOB, A. *et al.* A Review on edible coatings and films: Advances, composition, production methods, and safety concerns. **ACS omega**, v. 8, n. 32, p. 28932-28944, 2023.

MORAN, F. Leis e regulamentos sobre embalagens de alimentos, com ênfase particular em carnes, aves e peixes. Em *Avanços em Embalagens de Carnes, Aves e Frutos do Mar*; Kerry, JP, Ed.; **Woodhead Publishing Limited**: Nova Delhi, Índia, 2012; p. 631-659.

PASHOVA, Sabka. Application of Plant Waxes in Edible Coatings. **Coatings**, v. 13, n. 5, p. 911, 2023.

RIBEIRO, C. *et al.* Optimization of edible coating composition to retard strawberry fruit senescence. **Postharvest Biology and Technology**, v. 44, n. 1, p. 63-70, 2007.

SONG, Y. *et al.* Effect of sodium alginate-based edible coating containing different antioxidants on quality and shelf life of refrigerated bream (*Megalobrama amblycephala*). **Food control**, v. 22, n. 3-4, p. 608-615, 2011.

SUHAG, R *et al.* Film formation and deposition methods of edible coating on food products: a review. **Food Research International**, v. 136, p. 109582, out. 2020.

SURYANTO, H. *et al.* Starch/Carrageenan Blend-Based Biocomposites as Packaging Materials. In: **Composites from the Aquatic Environment**. Singapore: Springer Nature Singapore, p. 139-161, 2023.

TAŞKIN ÇAKICI, G., BATIR, G. G.; YOKUŞ, A. Preparation and Characterization Novel Edible Nanocomposite Films Based on Sodium Alginate and Graphene Nanoplatelet, via Box–Behnken Design. **Arabian Journal for Science and Engineering**, p. 1-14, 2023.

YANG, J.; YU, J.; HUANG, Y. Recent developments in gel casting of ceramics. **Journal Of The European Ceramic Society**, v. 31, n. 14, p. 2569-2591, 2011.

YI, C. *et al.* Hydrophobic-modified cellulose nanofibrils (CNFs)/chitosan/zein coating for enhancing multi-barrier properties of heat-sealable food packaging materials. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 666, p. 131245, 2023.

CAPÍTULO 3

MICROENCAPSULAÇÃO DE INGREDIENTES ALIMENTÍCIOS

Camila Sampaio Mangolim

Max Suel Alves dos Santos

O uso de compostos naturais e, especialmente, bioativos em alimentos tem sido uma das principais tendências e desafios da indústria, uma vez que o consumidor tem demonstrado grande preocupação com a toxicidade de inúmeras substâncias empregadas como aditivos sintéticos em alimentos. Dessa forma, o desenvolvimento de métodos e/ou tecnologias que permitam o uso de ingredientes naturais está em expansão, já que os principais desafios no emprego desses ingredientes incluem baixa estabilidade química, dificuldade de aplicação e, muitas vezes, custo elevado.

Neste contexto, a técnica de microencapsulação de ingredientes tem sido amplamente empregada na indústria alimentícia, e o objetivo principal desta tecnologia é proteger os compostos, que podem ser variados (microrganismos probióticos ou compostos bioativos, como pigmentos, óleos essenciais, peptídeos, entre outros), a fim de permitir que os mesmos resistam a todas as etapas de processamento e armazenamento do produto e estejam disponíveis ao consumidor no alimento, possibilitando também que estas substâncias atinjam o ponto específico do organismo para desempenhar sua função de saúde.

É importante ressaltar que a microencapsulação tem sido utilizada também em outras indústrias, como de medicamentos (para liberação controlada de drogas e mascaramento de sabores indesejados), cosméticos (para liberação controlada de aromas, por exemplo), agrícola (para diminuir custos com agrotóxicos e atingir o alvo de interesse), e outras, mas a aplicação da técnica em ingredientes alimentícios tem particularidades especiais, pois a microcápsula não pode comprometer os aspectos sensoriais dos produtos, além do fato de que as matrizes alimentícias são de composição complexa e que, como os alimentos são ingeridos via oral, as microcápsulas devem resistir às condições gastrointestinais humanas.

Posto isto, existe uma grande variedade de métodos de microencapsulação empregados em ingredientes alimentícios, e o aparecimento de novos materiais de parede utilizados para este fim aumenta ainda mais os métodos disponíveis. As escolhas do método de encapsulação e do material encapsulante dependem de vários fatores, como o tamanho desejado para as microcápsulas, as propriedades físico-químicas do composto a ser encapsulado, o mecanismo de liberação desejado e os demais objetivos desejados para o princípio ativo de interesse (maior solubilidade, maior estabilidade, etc.).

CONCEITOS BÁSICOS

A microencapsulação é uma tecnologia de empacotamento, na qual ocorre a incorporação de substâncias de interesse, que podem ser sólidos, líquidos ou material gasoso

(chamadas de núcleo, material ativo ou encapsulado) em um sistema de revestimento, normalmente de material polimérico, denominado material de parede, carreador ou agente encapsulante. Essa incorporação resulta em pequenas partículas, denominadas microcápsulas, que têm a capacidade de liberar o seu conteúdo sob condições e velocidade específica. Dessa forma, as microcápsulas agem como embalagens extremamente pequenas de uma substância de interesse, com diâmetro variando entre 1 e 1000 μm .

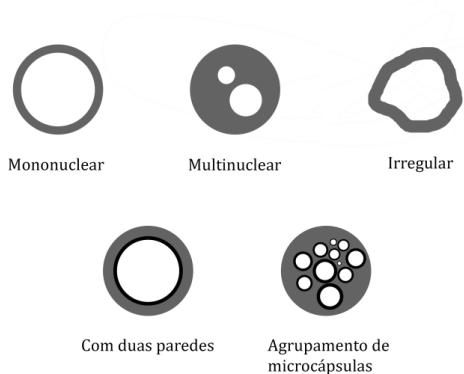
Uma microcápsula de um composto ativo, de forma geral, tem a capacidade de alterar e, conseqüentemente, melhorar a aparência e as propriedades desta substância. Dessa forma, a microencapsulação apresenta as seguintes aplicações:

- Redução da reatividade do material de núcleo com o ambiente, protegendo-o contra luz, umidade, calor, etc. e aumentando sua vida de prateleira;
- Diminuição da velocidade de transferência do material do núcleo para o meio, promovendo sua liberação controlada;
- Mascaramento de sabor e/ou odor desagradáveis;
- Aumento da solubilidade do material encapsulado, promovendo sua diluição homogênea na formulação alimentícia;
- Facilitação da manipulação, transporte e adição em formulações do material encapsulado por, por exemplo, transformá-lo de líquido em sólido;

- Redução da toxicidade do material ativo;
- Redução da volatilidade ou flamabilidade de líquidos;
- Aumento da vida de prateleira.

Os ingredientes comumente encapsulados para uso em formulações alimentícias incluem aromas, minerais, vitaminas, probióticos, peptídeos bioativos, óleos essenciais, corantes, enzimas, entre muitos outros. Para cada composto ativo de interesse, existem métodos de encapsulação e materiais de parede apropriados, que resultam em microcápsulas de diferentes faixas de tamanho e formatos/tipos de microcápsula (Figura 1).

Figura 1 – Tipos de microcápsulas obtidas pelos diferentes métodos de microencapsulação.

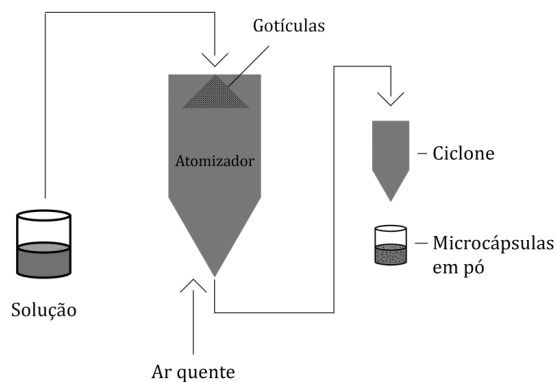


Fonte: Adaptado de Nunes *et al.*, 2015.

MÉTODOS DE MICROENCAPSULAÇÃO E MATERIAIS ENCAPSULANTES

Os métodos utilizados para microencapsulação são divididos em físicos, químicos e físico-químicos. Dentre os físicos, alguns muito utilizados são *spray-drying* (ou atomização), *spray chilling* (ou *spray cooling*), leito fluidizado, co-cristalização e liofilização. Já entre os químicos, podem ser citadas a polimerização e a inclusão molecular. Entre os métodos físico-químicos, a coacervação, a emulsificação e a pulverização são bastante usuais. Em grande escala, o método mais utilizado é o *spray-drying* (Figura 2), no qual a mistura entre o encapsulante e o encapsulado é atomizada em uma corrente de ar quente que promove a evaporação do solvente, resultando na rápida solidificação das gotículas e obtendo uma microcápsula na forma de pó estável, que é coletado com o uso de um ciclone.

Figura 2 – Esquema da microencapsulação utilizando *spray-dryer*.



Fonte: Adaptado de Nunes *et al.*, 2015.

A escolha da técnica de microencapsulação vai depender do tamanho requerido para as microcápsulas, do mecanismo de liberação almejado e das propriedades do composto ativo e do material de parede (tanto físico-químicas quanto biológicas). Consequentemente, tanto a técnica quanto o material de parede desempenharão um papel fundamental nas características de encapsulamento, como estabilidade e solubilidade das microcápsulas.

Em termos de materiais, são muitos os que têm sido utilizados como material de parede para microencapsulação de ingredientes alimentícios. Dentre eles, podem ser citadas gomas, como ágar, goma arábica, alginato e carragena; carboidratos, como amidos modificados e dextrinas (maltodextrina e ciclodextrinas, por exemplo); celuloses, como carboximetilcelulose, acetilcelulose, nitrocelulose; lipídios, como parafina, mono e diacilgliceróis, óleos e gorduras; proteínas, como as do glúten, gelatina, caseína e albumina; e materiais inorgânicos, como sulfato de cálcio e silicatos. A combinação de diferentes materiais de parede (como carboidratos e gomas) também tem sido relatada como eficiente na microencapsulação de diversos ativos alimentícios.

Os materiais ativos encapsulados apresentarão mecanismos de liberação de acordo com material de parede utilizado. Entretanto, variações de temperatura e pH, solubilidade do meio, ruptura mecânica, biodegradação, difusão, permeabilidade seletiva e gradiente de concentração são os principais mecanismos de liberação dos compostos ativos. A espessura do material de parede da microcápsula também tem efeito nesta liberação, e a

mesma pode ser modificada dentro de cada método de microencapsulação empregado.

Após a microencapsulação, algumas propriedades das microcápsulas devem ser avaliadas, como sua estrutura geral ou morfologia, estrutura fina e tamanho de partículas (por difração de raios-X, microscopias e analisador de tamanho de partículas), a composição e as propriedades estruturais da microcápsula, em termos de núcleo e parede (por análises térmicas, cromatográficas e espectroscópicas, como FTIR e espectroscopia Raman), o rendimento e a eficiência da microencapsulação, bem como o comportamento de liberação e outras propriedades que sejam interessantes para a microcápsula, como a solubilidade e a estabilidade. Outra análise bastante aplicada tem relação com a bioacessibilidade e a biodisponibilidade dos compostos ativos, por métodos de liberação e digestão *in vitro*.

PRÁTICA 1: OBTENÇÃO DE EXTRATO RICO EM ANTOCIANINAS PARA MICROENCAPSULAÇÃO

- **Objetivo**

Obter um extrato rico em antocianinas a partir de frutas para que o mesmo seja utilizado como núcleo em técnicas de microencapsulação.

- **Materiais, equipamentos e reagentes**

- 500 g da fruta de interesse (uva, açaí, juçara, mirtilo, framboesa, morango, jabolão, etc.);
- 500 ou 1000 mL da solução extratora (solução hidroetanólica a 50 ou 70%);
- Solução de HCl a 2 N;
- Liquidificador;
- pHmetro ou fitas medidoras de pH;
- Agitador magnético ou agitador mecânico (de hélice) para laboratório;
- Papel alumínio;
- Centrífuga;
- Papel filtro;
- Sistema de filtração a vácuo (bomba, kitassato e funil de Buchner);
- Evaporador rotativo;
- Liofilizador.

- **Procedimentos**

1. Preparar a fruta para extração (lavar, sanitizar com solução de hipoclorito de sódio, secar e remover, se necessário, cascas e sementes);

2. Triturar a fruta em liquidificador. Se necessário, utilizar parte do volume do solvente extrator (solução hidroetanólica a 50 ou 70%) para lavagem do equipamento;

3. Dicas:

- » A proporção de fruta para solução extratora utilizada deve ser 1:1 ou 1:2 (m/v). A escolha da proporção dependerá das características da fruta após triturada. Por exemplo, o jambolão com casca, quando triturado, forma um material muito viscoso e, neste caso, a proporção 1:2 é mais indicada. Evitar utilizar volumes excessivos de solvente;
 - » Metanol é um solvente muito eficiente para extração de antocianinas. Entretanto, deve ser evitado pela toxicidade, uma vez que o propósito é que o extrato seja microencapsulado para aplicação em alimentos.
4. Após trituração, misturar o restante da solução extratora, ajustar o pH da mistura para 2 com HCl 2 N e agitar em agitador magnético ou agitador mecânico por 40 min protegido da luz (cobrir o recipiente/béquero com papel alumínio;
 5. Após a extração, centrifugar ou filtrar a mistura (ou efetuar ambas as etapas), a fim de remover as partículas e obter apenas o extrato líquido.

- » Normalmente, quando se tritura frutas com cascas, a filtração é dificultada pelo excesso de partículas. Neste caso, sugere-se uma centrifugação inicial para posterior filtração apenas do sobrenadante.
6. Utilizar evaporador rotativo a 45 °C para eliminar o etanol utilizado na extração;
 7. Congelar e liofilizar o material, a fim de obter um extrato na forma de pó para a microencapsulação.

• Cálculos

São duas as análises que são interessantes serem feitas após a extração, sendo a primeira o rendimento do processo e a segunda a dosagem dos compostos de interesse, que neste caso são as antocianinas. A descrição da análise de teor de antocianinas será efetuada na Prática 2. Aqui, abordaremos o rendimento da extração, que é calculado pela equação 1.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{P_{es}}{P_m} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Na qual P_{es} corresponde ao peso do extrato seco obtido (g) e P_m corresponde ao peso da fruta utilizada na extração (g).

PRÁTICA 2: DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ANTOCIANINAS DO EXTRATO PELO MÉTODO DO PH DIFERENCIAL

- **Objetivo**

Determinar o teor de antocianinas totais em vegetais e derivados.

- **Materiais, equipamentos e reagentes**

- Balança analítica;
- Béqueres;
- Balão volumétrico de 1000 mL;
- Tubos falcon de 50 mL;
- Centrífuga;
- Espátulas;
- Estantes para tubos;
- Tubos de ensaio;
- Pipetadores automáticos para volumes de 10 µL a 5 mL;
- Papel filtro qualitativo;
- Funil;
- Capela de exaustão;
- Cubetas plásticas;
- Espectrofotômetro;

- Papel alumínio;
- Agitador tipo vórtex;
- Solução tampão pH 1 (cloreto de potássio a 0,025 mol/L);
- Solução tampão pH 4,5 (acetato de sódio 0,4 mol/L);
- Ácido clorídrico (HCl) P.A.

- **Procedimentos**

1. Preparo dos reagentes

- » Solução tampão pH 1 (cloreto de potássio a 0,025 mol/L): em um béquer, pesar 1,86 g de cloreto de potássio (KCl) e adicionar aproximadamente 900 mL de água destilada. Com o auxílio de um bastão de vidro, agitar a solução até a completa dissolução do KCl. Em seguida, medir o pH da solução e fazer o ajuste com ácido clorídrico (HCl) concentrado (P. A.), aproximadamente 6,3 mL, até o pH 1. Transferir a solução para um balão de 1000 mL e completar o volume com água destilada;
- » Solução tampão pH 4,5 (acetato de sódio 0,4 mol/L): em um béquer, pesar 54,43 g acetato de sódio ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$) e adicionar aproximadamente 950 mL de água destilada. Com o auxílio de um bastão de vidro, agitar a solução até a completa dissolução do acetato de sódio. Em seguida, medir o pH da solução e fazer o ajuste com ácido clorídrico (HCl) concentrado (P. A.), aproximadamente

20 mL, até o pH 4,5. Transferir a solução para um balão de 1000 mL e completar o volume com água destilada.

É importante ressaltar que o ajuste de pH das soluções tampão deve ser realizado em capela de exaustão devido ao desprendimento de gases nocivos. Adicionalmente, a adição de ácido clorídrico às soluções deve ser realizada aos poucos para evitar que o pH fique baixo demais, portanto, utilizar pequenos volumes de ácido e medir o potencial hidrogeniônico a cada adição de HCl às soluções.

2. Preparo da solução teste

Na diluição teste, a quantidade máxima de porção amostral a ser testada deve ser de uma parte da solução teste para quatro partes de solução tampão pH 1 (1:4). Desse modo, a capacidade tamponante dos reagentes não é excedida. Para determinação do fator de diluição apropriado, realizar o seguinte procedimento:

- » Preparar 10 mL de uma solução do extrato a ser testada, na concentração de 10 mg/mL ou 100 mg/mL;
- » Em um tubo de ensaio de 10 mL, adicionar 1 mL da solução do extrato previamente preparada e 4 mL da solução tampão pH 1;
- » Agitar em agitador tipo vórtex, aguardar 20 minutos (proteger da luz com papel alumínio) e ler a absorbância em espectrofotômetro a 520 nm. Se a absorbância estiver dentro da faixa linear do espectrofotômetro,

manter esses volumes para a análise. Caso contrário, diluir a solução de extrato com água ou preparar uma solução mais concentrada, caso seja necessário.

3. Procedimentos para leitura

- » A partir da determinação do volume de solução de extrato a ser analisada, preparar 6 tubos de ensaio, sendo três com a solução tampão pH 1 e três com a solução tampão pH 4,5;
- » Para tanto, adicionar nos tubos de ensaio 1 mL da solução do extrato (diluída ou não) e 4 mL da solução tampão. Proteger os tubos da luz com papel alumínio;
- » Agitar os tubos em agitador tipo vórtex e aguardar de 20 a 50 min para realizar a leitura em espectrofotômetro;
- » Determinar as absorbâncias da porção teste diluída em ambos os pHs nos comprimentos de onda de 520 e 700 nm;
- » Utilizar água destilada como branco.

Observação

A leitura realizada a 700 nm tem por objetivo corrigir a turbidez. Porém, se a porção teste estiver excessivamente turva, é necessário clarificá-la por centrifugação ou filtração antes da leitura.

4. Obtenção dos dados

Os dados obtidos em decorrência da pesagem de amostras e de fatores de diluição empregados para a obtenção de extratos podem ser organizados de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 – Dados obtidos na análise que serão utilizados nos cálculos.

Peso da amostra (g)	
Fator de diluição	

Para os dados das absorvâncias obtidas por meio das leituras em espectrofotômetro, os valores podem ser organizados conforme a Tabela 2.

Tabela 2 – Dados obtidos em espectrofotômetro.

pH 1		pH 4,5	
Abs 520nm	Abs 700nm	Abs 520nm	Abs 700nm

• Cálculos

O teor total de antocianinas nas amostras é dado em mg/L, em equivalentes de ciadina-3-glucosídeo. Para tanto, utiliza-se inicialmente a Equação 2 para a determinação da absorvância das amostras.

$$A = pH1 (A_{520} - A_{700}) - pH\ 4,5 (A_{520} - A_{700}) \quad (\text{Equação 2})$$

Onde A é a absorbância calculada e A_{520nm} e A_{700nm} são as absorbâncias lidas por espectrofotometria a 520 e 700 nm nos pHs 1 e 4,5.

A absorbância calculada na Equação 2 é utilizada para calcular o teor de antocianinas totais (AT), seguindo a Equação 3.

$$AT \left(\frac{mg}{L} \right) = \frac{A \times mm \times fd \times 10^3}{\epsilon \times 1} \quad \text{Equação 3}$$

Onde A é a absorbância calculada; mm é a massa molecular da ciadina-3-glucosídeo (449,2 g/mol); fd é o fator de diluição; 10^3 é para conversão de gramas para miligrama; ϵ é o coeficiente de extinção da ciadina-3-glucosídeo (26900 L/mol/cm); 1 é o comprimento do caminho óptico em centímetros.

Observações

1. Existem diversos pigmentos naturais encontrados na natureza além das antocianinas, portanto, é importante saber qual é o pigmento mais abundante na amostra a ser analisada, para assim, escolher o método que mais se adequa a ela;
2. As antocianinas degradadas são resistentes a mudança de cor independentemente do pH. Logo, não são incluídas nas medições porque são bem absorvidas em ambos os pHs (1 e 4,5);

PRÁTICA 3: MICROENCAPSULAÇÃO DO EXTRATO RICO EM ANTOCIANINAS COM MALTODEXTRINA POR LIOFILIZAÇÃO

- **Objetivo**

Proteger as antocianinas do extrato obtido a partir de frutas frente a fatores ambientais, como aquecimento, luz e oxigênio.

- **Materiais, equipamentos e reagentes**

- 10 g de extrato;
- 100 g de maltodextrina DE 20;
- Água destilada;
- Solução de HCl 2 N;
- Béquer;
- Agitador magnético;
- Papel alumínio;
- Liofilizador.

- **Procedimentos**

1. Dissolver a maltodextrina em 500 mL de água destilada;
2. Ajustar o pH da solução para 2 com solução de HCl concentrada;

3. Incorporar o extrato seco à solução e agitar em agitador magnético por 15 minutos ao abrigo da luz (cobrir com papel alumínio);
4. Congelar e liofilizar a mistura.

- **Cálculos**

A microcápsula obtida necessita de caracterização, sendo a primeira delas a análise da eficiência da microencapsulação, a ser descrita na Prática 5.

PRÁTICA 4: MICROENCAPSULAÇÃO DO EXTRATO RICO EM ANTOCIANINAS COM ALGINATO DE SÓDIO POR GELIFICAÇÃO IÔNICA

- **Objetivos**

Proteger as antocianinas do extrato obtido a partir de frutas frente a fatores ambientais utilizando uma metodologia prática e rápida.

- **Materiais, equipamentos e reagentes**

- Solução de alginato de sódio 1% ou 1,5% (m/v);
- Solução aquosa de extrato (10 mg/mL ou 100 mg/mL);
- Solução de CaCl_2 (0,25 mol/L);

- Água destilada;
- Béquer;
- Seringa para gotejamento;
- Agitador magnético;
- Peneira plástica comum;
- Liofilizador (opcional).

• Procedimentos

1. Misturar 9 mL de solução de alginato de sódio (1% ou 1,5%) com 1 mL da solução aquosa de extrato até completa homogeneização;
2. Colocar a mistura dentro de uma seringa de 10 mL e gotejar em béquer contendo 90 mL da solução de CaCl_2 0,25 mol/L;
 - » O gotejamento deve ser feito em velocidade e distância constante, a fim de padronizar o tamanho das microcápsulas;
 - » Seringas com agulhas mais finas formam gotas menores e, conseqüentemente, microcápsulas menores. Gotejamento mais lento forma gotas maiores e, conseqüentemente, microcápsulas maiores.
3. Manter a mistura sob agitação por 20 min para gelificação;

4. Coletar as microcápsulas com uma peneira, lavar com água destilada e armazenar. Se julgar conveniente, congelar e liofilizar as microcápsulas.

- **Cálculos**

A microcápsula obtida necessita de caracterização, sendo a primeira delas a análise da eficiência da microencapsulação, a ser descrita na Prática 5.

PRÁTICA 5: DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA MICROENCAPSULAÇÃO

- **Objetivos**

Avaliar a eficiência dos processos de microencapsulação utilizados, bem como do material de parede selecionado.

- **Materiais, equipamentos e reagentes**

- Balança analítica;
- Tubos de ensaio;
- Etanol PA;
- Ácido acético;
- Água destilada;
- Agitador tipo vórtex;

- Banho ultrassônico;
- Metanol PA;
- Filtros Millipore hidrofílicos (45 μm);
- Solução de EDTA 0,2 mol/L;
- Incubadora shaker;
- Demais materiais, reagentes e equipamentos citados na Prática 2 para dosagem de antocianinas.

• Procedimentos

A determinação da eficiência da microencapsulação envolve a análise do teor de antocianinas presentes no interior e no exterior da microcápsula formada. Para análise do teor de antocianinas microencapsuladas (no interior), a estrutura de revestimento das microcápsulas deve ser desfeita, o que fornece então a medida de teor de antocianinas totais, já que os as antocianinas encapsuladas e não encapsuladas se misturam nessa situação. Já para a análise do teor de antocianinas no exterior das microcápsulas, uma solução que as mantenha de forma íntegra deve ser utilizada.

1. Para desfazer as microcápsulas de maltodextrina:

- » Pesar 200 mg das microcápsulas em tubos de ensaio e adicionar 2 mL da mistura metanol:ácido acético:água na proporção 50:8:42;
- » Agitar a mistura em vórtex por 1 min e homogeneizar em ultrassom com aquecimento, durante 40 min;

- » Quantificar as antocianinas da solução de acordo com a Prática 2.

2. Para dosagem das antocianinas do exterior da microcápsula de maltodextrina:

- » Pesar 200 mg das microcápsulas em tubo de ensaio e adicionar 2 mL de solução de etanol e metanol (1:1);
- » Agitar a mistura em vórtex à temperatura ambiente durante 1 min e filtrada em filtro Millipore (45 µm);
- » Quantificar as antocianinas (Prática 2).

3. Para desfazer as microcápsulas de alginato:

- » Pesar 0,8 g das microcápsulas em erlenmeyer e dispersar em 24,5 mL de EDTA (0,2 mol/L);
- » Incubar em shaker a 100 rpm, 25 °C por 90 min para desfazer as microcápsulas;
- » Quantificar as antocianinas (Prática 2).

4. Para dosagem das antocianinas do exterior da microcápsula de alginato:

- » Retirar alíquotas da solução de CaCl_2 após o tempo de permanência das microcápsulas em solução e quantificar as antocianinas (Prática 2).

• Cálculos

Os compostos de superfície (CS) e a eficiência do processo de microencapsulamento (EM) são calculados de acordo com as Equações 4 e 5. **Lembrete:** os compostos de superfície são aqueles que ficam no exterior das microcápsulas, enquanto o total de compostos é medido ao desfazer as mesmas.

$$CS(\%) = \frac{\text{compostos de superfície}}{\text{total de compostos}} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

$$EM(\%) = 100 - CS \quad (\text{Equação 5})$$

Teste seu conhecimento!



1. Discuta sobre outras análises que podem ser empregadas para a caracterização das microcápsulas obtidas pelos diferentes métodos e agentes encapsulantes;
2. Compare as eficiências de encapsulação dos dois métodos empregados;
3. Quais variáveis podem ser ajustadas para melhorar a eficiência da encapsulação pelos métodos utilizados?
4. Quais as dificuldades encontradas na dosagem de antocianinas pelo método pH diferencial?

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste capítulo discutiu-se a aplicabilidade da microencapsulação de compostos bioativos na indústria de alimentos. Percebeu-se que os métodos e materiais de parede possíveis de serem utilizados são inúmeros, e que a escolha depende não só da disponibilidade de material e equipamentos, mas também das propriedades do núcleo e dos objetivos que se espera alcançar com a microencapsulação. São muitas as possibilidades e, para que a pesquisa seja completa, as microcápsulas obtidas devem ser caracterizadas e testadas quanto a aplicação a que elas se destinam (testes de estabilidade, aplicação em alimentos, bioacessibilidade, etc.).

REFERÊNCIAS

- ALBARELLI, J. Q.; MACUMOTO, A.; CARVALHO, L. C.; SANTOS, D. T.; MEIRELES, M. A.; BEPPU, M. M. Encapsulação de corantes funcionais em matriz de alginato puro ou recoberto por biopolímeros. **Anais do 10º Congresso Brasileiro de Polímeros**, Foz do Iguaçu-PR, 2009.
- CARVALHO, Ana Gabriela da Silva. **Estudo da inclusão de antocianinas de extrato da polpa de juçara (*Euterpe edulis* Martius) e partículas produzidas por *spray drying* e gelificação iônica**. 2017. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017.
- FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 103-112, 2008.
- LEE, J.; DURST, R. W.; WROLSTAD R. E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages,

natural colorants, and wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. **Journal of AOAC International**, v. 88, p. 1269-1278, 2005.

NUNES, G. L.; SILVA, T. M.; HOLKEM, A. T.; SCHLEY, V.; MENEZES, C. R. Microencapsulação de culturas probióticas: princípios do método de *spray drying*. **Ciência e Natura**, v. 37, p. 132-141, 2015.

PASSOS, A. P. S.; MADRONA, G. S.; MARCOLINO, V. A.; BAESSO, M. L.; MATIOLI, G. The use of thermal analysis and photoacoustic spectroscopy in the evaluation of maltodextrin microencapsulation of anthocyanins from juçara palm fruit (*Euterpe edulis* Mart.) and their application if food. **Food Technology and Biotechnology**, v. 53, p. 385-396, 2015.

ROBERT, P.; GORENA, T.; ROMERO, N.; SEPULVEDA, E.; CHAVEZ, J.; SAENZ, C. Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 1386-1394, 2010.

ROSSO, A. C.; KUZNIEWSKI, F. C.; GRIESANG, J. I.; BERTOLDO, V. C.; OLIVEIRA, M. S.; SEVERO, J. Microencapsulação de compostos bioativos em alimentos. **Boletim Técnico-Científico (IF Farroupilha)**, v. 5, n. 2, 2019.

CAPÍTULO 4

CURA ALTERNATIVA DE PRODUTOS CÁRNEOS

Fábio Anderson Pereira da Silva

Valquíria Cardoso da Silva Ferreira

Elen Carla Alves da Silva

Isabelly da Silva Ramalho

José Narciso Francisco da Silva Filho

Maria de Fátima Clementino dos Santos

Os produtos cárneos curados são comumente formulados com a adição de nitrito e/ou nitrato de sódio ou potássio como agentes de cura. Estes aditivos são baratos, fáceis de aplicar e proporcionam estabilidade oxidativa e microbiológica aos produtos, além de características sensoriais apreciadas pelos consumidores.

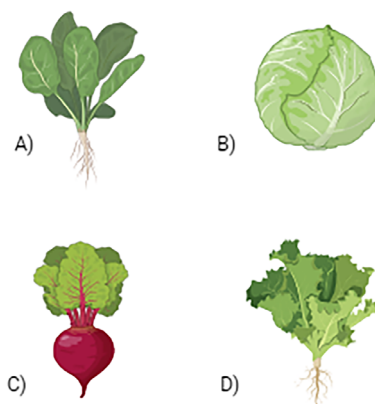
No entanto, a formação de compostos N-nitrosos considerados prejudiciais à saúde tem levado à busca por estratégias para substituir o nitrito de sódio comercial em produtos cárneos curados. O potencial cancerígeno do nitrito está relacionado à sua capacidade de reagir com aminas secundárias e formar compostos N-nitrosos como as nitrosaminas, que são consideradas cancerígenas, teratogênicas e mutagênicas.

O uso de vegetais ricos em nitrato tais como aipo, espinafre, couve-flor, beterraba e alface (Figura 1) tem sido

indicado como estratégia eficaz para cura alternativa de carnes. Embora o composto químico “nitrito ou nitrato” seja o mesmo em ambas as fontes, a utilização de vegetais ricos em nitrato em substituição ao nitrito de sódio comercial pode se tornar uma estratégia interessante para a elaboração de produtos cárneos “clean label” ou de rótulo-limpo. O nitrato pode ser extraído destes vegetais e aplicado diretamente nos produtos cárneos ou pode ser adicionado após pré-conversão do nitrato em nitrito utilizando microrganismos redutores de nitrato, comumente presentes em culturas *starter* comerciais.

Figura 1 – Fontes vegetais com teores elevados de nitrato.

A) Espinafre; B) Couve-flor; C) Beterraba; D) Alface.



Fonte: Criado em BioRender.com (2023).

PRÁTICA 1: OBTENÇÃO DE FONTE ALTERNATIVA DE NITRITO A PARTIR DA BETERRABA E CULTURAS INICIADORAS COMERCIAIS

Considerando-se a crescente preocupação dos órgãos de saúde e da população com relação ao consumo de produtos cárneos curados, e o aumento da demanda por produtos "clean label", os pesquisadores têm direcionado os esforços na busca por fontes alternativas de nitrito.

Uma das principais técnicas utilizadas para obtenção de fontes alternativas de nitrito é o uso de vegetais ricos em nitrato. Estes vegetais podem ser adicionados diretamente aos produtos cárneos ou podem ser biotransformados para conversão prévia do nitrato em nitrito.

- **Objetivo**

Obter fonte alternativa de nitrito a partir da biotransformação do extrato da beterraba vermelha utilizando culturas iniciadoras comerciais.

- **Materiais, equipamentos e reagentes**

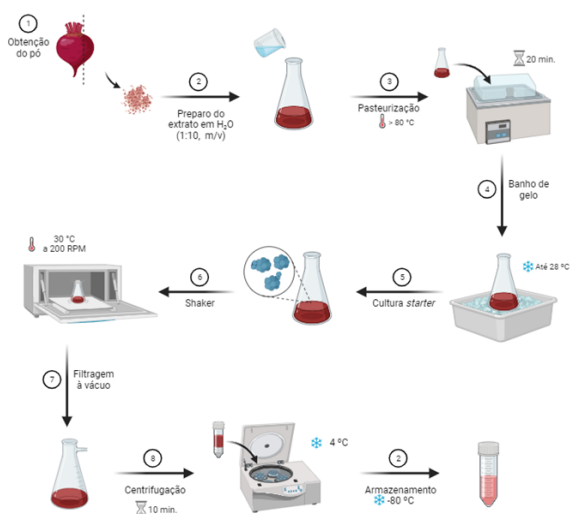
- 1 kg de beterraba vermelha
- 1 pacote de cultura iniciadora comercial contendo *Staphylococcus carnosus* e *Staphylococcus xylosus*
- Facas
- Bandejas
- Papel de filtro

- Erlenmeyer
- Kitassato com bomba de vácuo
- Banho-maria
- Estufa com circulação forçada de ar
- Incubadora *shaker*
- Centrífuga refrigerada
- *Freezer*.

• Procedimentos

As etapas para obtenção da fonte alternativa de nitrito estão descritas na Figura 2.

Figura 2 – Representação esquemática do processo de biotransformação.



Fonte: Criado em BioRender.com (2023).

- 1.** Selecionar beterrabas sem manchas ou defeitos aparentes.
- 2.** Lavar as beterrabas com água corrente e sanitizar por imersão, colocando-as em recipiente com água clorada por 10 minutos.
- 3.** Lavar as beterrabas com água potável corrente para remover o excesso de cloro.
- 4.** Cortar as beterrabas em rodela finas para facilitar a secagem.
- 5.** Secar as rodela de beterraba em estufa a vácuo (também pode ser feita a liofilização do suco de beterraba adicionado de maltodextrina).
- 6.** Moer a beterraba seca em moinho de facas até a obtenção de um pó fino.
- 7.** Em um Erlenmeyer, misturar e homogeneizar o pó obtido com água destilada numa proporção de 1:10 (m:v).
- 8.** Aquecer a mistura em banho maria a 80 °C por 20 minutos.
- 9.** Resfriar o extrato em banho de gelo até ± 28 °C.
- 10.** Adicionar 0,025% (m:v) da cultura iniciadora comercial previamente ativada em água destilada.
- 11.** Incubar os extratos a 30 °C durante 24 horas sob agitação em incubadora *shaker*.
- 12.** Transferir a mistura para tubos Falcon de 50 mL e centrifugar a 8960 xg por 10 minutos a 4 °C.
- 13.** Filtrar à vácuo em papel de filtro, armazenar em frasco âmbar e congelar até o momento da utilização.



CURIOSIDADE

Dependendo do sistema de produção dos vegetais (convencional ou orgânico) o teor de nitrato presente é diferente. Ao serem analisadas amostras de beterrabas nas duas condições supracitadas, pesquisadores encontraram valores médios de 2056,42 mg/kg em amostras de beterraba convencionais e 1328,50 mg/kg nos produtos orgânicos.

PRÁTICA 2: PRODUÇÃO DE APRESUNTADO ADICIONADO DE PÓ DE BETERRABA COMO FONTE ALTERNATIVA DE NITRATO E NITRITO

Conforme a legislação brasileira em vigor, o apresuntado é um produto cárneo elaborado com a paleta e/ou pernil suíno, com adição de ingredientes obrigatórios, como os agentes de cura, e submetido ao cozimento. O principal agente de cura utilizado na elaboração do apresuntado é o nitrito e nitrato e suas variações, isolados ou combinados.

Vários processos alternativos de cura da carne estão sendo estudados. A combinação de extratos vegetais ricos em nitrato com culturas iniciadoras contendo microrganismos conversores de nitrato em nitrito tem sido uma das principais estratégias indicadas pelos pesquisadores.

- **Objetivo**

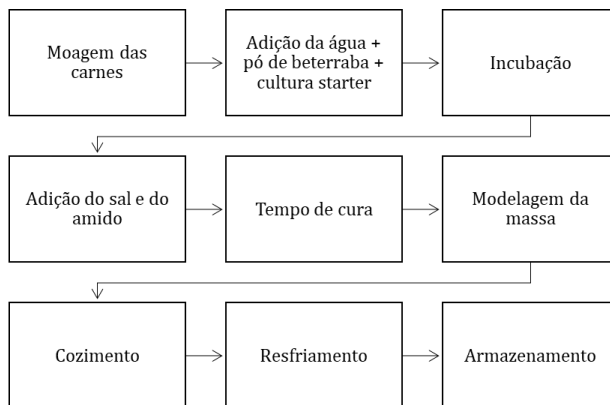
Elaborar apresuntado adicionado de fonte alternativa de nitrito e nitrato.

- **Materiais, equipamentos e ingredientes**

- Carne suína (pernil e paleta)
- Água
- Sal
- Amido de milho
- Pó de beterraba
- Cultura iniciadora contendo *Staphylococcus carnosus* e *Staphylococcus xylosus*
- Moedor de carne
- Forma de Apresuntado
- Termômetro
- Seladora à vácuo

- **Procedimentos**

As etapas de elaboração do apresuntado com nitrito natural obtido do pó de beterraba estão descritas na Figura 3.

Figura 3 – Fluxograma de processamento do apresuntado.

1. Selecionar carne de pernil e/ou paleta de suínos saudáveis e abatidos em estabelecimentos com selo de inspeção.
2. Remover a pele, excesso de gordura, hematomas, gânglios e quaisquer tecidos não cárneos.
3. Moer as carnes suínas utilizando disco de 20 mm.
4. Em um misturador, adicionar 1 kg de carne suína moída, 400 mL de água, pó da beterraba (quantidade suficiente para atingir 100 ppm de nitrito) e a cultura iniciadora (conforme recomendações do fabricante).
5. Homogeneizar bem a massa e transferir para uma estufa durante 2 h à 40 °C.
6. Adicionar o sal e o amido de milho e homogeneizar.
7. Deixar a massa em repouso sob refrigeração (4 °C) durante 12 h.

8. Transferir a massa para a forma de apresuntado.
9. Realizar o cozimento em banho-maria a 65 °C por 1 h (a temperatura da água não pode passar de 65 °C na primeira hora).
10. Da segunda hora em diante, continuar o aquecimento a 80 °C/hora/kg de apresuntado.
11. Resfriar em água fria durante 15 minutos e manter à 4 °C durante 12 h.
12. Desenformar o apresuntado, embalar à vácuo e armazenar sob refrigeração.

CURIOSIDADE



Para apresuntado, a legislação estabelece o limite máximo residual de 0,015 g de nitrito de sódio por 100 g do produto.

PRÁTICA 3: PRODUÇÃO DE SALAME ITALIANO ADICIONADO DE BETERRABA COMO FONTE ALTERNATIVA DE NITRITO

Os produtos cárneos curados recebem agentes de cura (nitratos e nitritos) que desempenham múltiplas funcionalidades. O processo de cura influencia em várias características do produto tais como: segurança, vida de prateleira e sabor.

O salame é um produto cárneo embutido e curado produzido com carne suína ou mistura com carne bovina, acrescido de toucinho e ingredientes. Pode ser nomeado de acordo com a sua origem, processo de obtenção e características físico-químicas. O processo tecnológico de fabricação do salame traz naturalmente a formação de mofo característicos na superfície do produto.

- **Objetivos**

Elaborar salame tipo italiano adicionado de fonte alternativa de nitrito e nitrato.

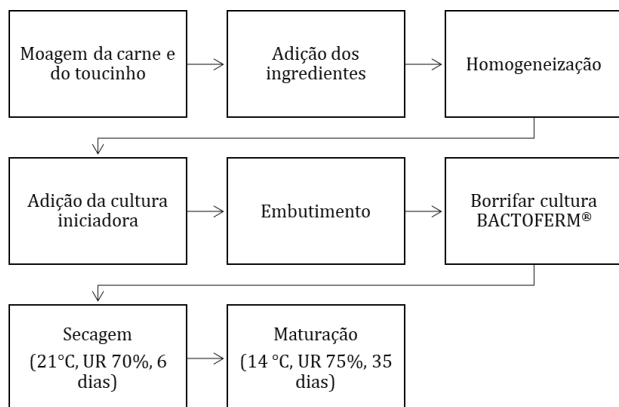
- **Materiais, equipamentos e ingredientes**

- Carne suína (pernil e paleta)
- Envoltório/tripa de colágeno para salame
- Toucinho
- Sal

- Açúcar
- Alho em pó
- Pimenta branca
- Eritorbato de sódio
- Pó de beterraba
- Cultura iniciadora contendo *Lactobacillus sakei*,
Staphylococcus xylosus e *Staphylococcus carnosus*
- Moedor de carne
- Embutideira
- Barbante
- Câmara climática com controle de umidade
e temperatura

- **Procedimentos**

As etapas para elaboração do salame italiano com nitrito e nitrato natural obtido do pó de beterraba estão descritas na Figura 4.

Figura 4 – Fluxograma de processamento do salame italiano.

1. Selecionar carne de pernil e/ou paleta de suínos saudáveis.
2. Remover a pele, excesso de gordura, hematomas, gânglios e quaisquer tecidos não cárneos.
3. Moer as carnes e o toucinho em moedor de carne utilizando disco de 20 mm, misturar rapidamente e reservar.
4. Incorporar os demais ingredientes: sal, pó de beterraba, eritorbato de sódio, açúcar, pimenta branca e alho em pó e homogeneizar bem.



Dica: Manter a mistura cárnea sempre em temperatura inferior a 10 °C.

5. Após completa homogeneização da massa cárnea, adicionar a cultura iniciadora previamente ativada segundo as recomendações do fabricante.
6. Embutir a massa cárnea em tripa de colágeno (ø30 mm).



Dica: Borrifar a cultura BACTOFORM® MOLD-600 para evitar o crescimento de bolores indesejáveis na superfície dos salames.

7. Seguir para a etapa de secagem e maturação em câmara climática com controle de umidade e temperatura.
 - » Etapa de secagem: seis dias a 21 °C, baixando 1 °C a cada dia. Ao final do sexto dia a temperatura deve atingir 16 °C. A umidade relativa deve ser mantida em 70%.
 - » Etapa de maturação: realizada a 14 °C e 75% de umidade relativa durante 35 dias ou até alcançar perda de peso de no mínimo 30%.

Tabela 1 – Formulação do salame italiano.

INGREDIENTES	QUANTIDADE (g)
Carne suína	3200
Toucinho	800
Cloreto de sódio	60
Açúcar	80
Alho em pó	40
Pimenta branca	10
Eritorbato de sódio	12
Pó de beterraba	10,5
Cultura starter	0,8

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste capítulo, foram descritas técnicas para obtenção de fonte alternativa de nitrito a partir da beterraba vermelha e produção de produtos cárneos curados utilizando estas fontes alternativas como agentes de cura.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Padronização dos Cortes de Carne Bovina, proposta pela Divisão de Padronização e Classificação de Produtos de Origem Animal (DIPAC), portaria nº 5, de 8 de novembro de 1988. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento** (MAPA). Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952.

EFSA. Parecer do painel científico sobre contaminantes na cadeia alimentar sobre um pedido da Comissão Europeia para realizar uma avaliação científica dos riscos relativos aos nitratos nos vegetais, v. 689, p. 1-79, 2008.

GRISPOLDI, L.; KARAMA, M.; EL-ASHRAM, S.; SARAIVA, C.; GARCÍA-DÍEZ, J.; CHALIAS, A.; GENNIS, M. de; VANNUCCINI, A.; POERIO, G.; TORLAI, P. A study on the application of natural extracts as alternatives to sodium nitrite in processed meat. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 46, n. 8, p. 83-101, 2022.

HONIKEL, K. The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. **Meat Science**, v. 78, n. 1-2, p. 68-76, 2008.

KREUTZ, D. H.; WEIZENMANN, M.; MACIEL, M. J.; SOUZA, C. F. V. Nitrate and nitrite determination in vegetables produced in conventional and organic farming in the Region of Taquari Valley-RS. **Journal of Health Sciences**, v. 14, n. 2, 2012.

LIDDER, S.; WEBB, A. J. Vascular effects of dietary nitrate (as found in green leafy vegetables and beetroot) via the nitrate-nitrite-nitric oxide pathway. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 75, n. 3, p. 677-696, 2013.

MAYNARD, D. N.; BARKER, A. V. Nitrate content of vegetables crops. **HortScience**, v. 7, n. 3, p. 224-226, 1972.

OZAKI, M. M.; MUNEKATA, P. E. S.; JACINTO-VALDERRAMA, R. A.; EFRAIM, P.; PATEIRO, M.; LORENZO, J. M.; POLLONIO, M. A. R. Beetroot and radish powders as natural nitrite source for fermented dry sausages. **Meat Science**, v. 171, 108275, 2021.

RANASINGHE, R. A. S. N.; MARAPANA, R. A. U. J. Nitrate and nitrite content of vegetables: A review. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 7, n. 4, p. 322-328, 2018.

SCHULLEHNER, J.; HANSEN, B.; THYGESEN, M.; PEDERSEN, C. B.; SIGSGAARD, T. Nitrate in drinking water and colorectal cancer risk: A nationwide population-based cohort study. **International Journal of Cancer**, v. 143, n. 1, p. 73-79, 2018.

TABANELLI, G.; BARBIERI, F.; SOGLIA, F.; MAGNANI, R.; GARDINI, G.; PETRACCI, M.; GARDINI, F.; MONTANARI, C. Safety and technological issues of dry fermented sausages produced without nitrate and nitrite. **Food Research International**. v. 160, p. 111685, 2022.

ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; JIA, J.; PENG, H.; QIAN, Q.; PAN, Z.; LIU, D. Nitrite and nitrate in meat processing: functions and alternatives. **Current Research In Food Science**, v. 6, p. 100470, 2023.

CAPÍTULO 5

INDICADORES QUÍMICOS E SENSORIAIS DA QUALIDADE DO PESCADO

Íris Braz da Silva Araújo

Fabiano Queiroga da Silva

Antônio Rosendo Costa

Neylton Marinho da Rocha

Inês Maria Barbosa Nunes Queiroga

Sthelio Braga da Fonseca

A demanda mundial por pescados vem aumentando de forma significativa nos últimos anos. Este produto destaca-se pelo teor de ácidos graxos poliinsaturados presentes em sua composição, em especial aqueles da família ômega 3, como os ácidos eicosapentanoico e docosa-hexaenoico. Além disso, o pescado possui uma grande quantidade de proteínas, em especial as miofibrilares, as quais conferem uma maior digestibilidade deste produto quando comparado com outros tipos de carne.

Após o abate do animal, diversos mecanismos físicos, químicos e microbiológicos iniciam suas atividades, ocasionando a perda de qualidade do pescado. Essas alterações ocorrem, principalmente, nos macronutrientes do pescado, como proteínas e lipídios. Quanto mais avançados os mecanismos de deterioração estiverem, menor será a qualidade do pescado. Diversos métodos são utilizados para avaliar a qualidade do pescado após o abate, dentre eles os métodos químicos e sensoriais. Dentre os

métodos químicos, pode-se destacar a determinação do valor de K, análise de Nitrogênio das Bases Voláteis Totais (N-BVT), Nitrogênio da Trimetilamina (N-TMA) e o valor da peroxidação lipídica. Em relação aos métodos sensoriais, podem-se destacar aqueles inerentes aos sentidos da visão, olfato, gosto, tato e audição. A seguir, será realizada uma abordagem mais detalhada de cada um dos indicadores anteriormente citados, iniciando pelos indicadores químicos.

VALOR DE K (ATP E SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO)

O valor de K é indicado para determinar a qualidade da maioria das espécies de pescado, e referencia-se a um índice de frescor. Ele é realizado através da determinação dos seguintes compostos presentes no pescado: ATP, ADP, AMP, IMP, Inosina e Hipoxantina. Após o abate do pescado, uma série de reações iniciam-se imediatamente culminando na quebra da molécula de ATP tissular. O ATP quebrado é convertido a ADP seguido da liberação de energia. Entretanto, esse ADP é reconvertido a ATP devido à ação da creatina fosfato (CP), presente no pescado. Porém, após o consumo da CP, o ATP passa a ser decomposto de forma irreversível, gerando ADP, AMP, IMP e, por fim, a Inosina e Hipoxantina. O valor de K é oriundo da relação existente entre essas moléculas, o qual é determinado pela seguinte equação:

$$\text{Valor de K} = \frac{\text{Inosina} + \text{Hipoxantina}}{\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP} + \text{IMP} + \text{Inosina} + \text{Hipoxantina}} \times 100$$

Desta forma, quanto maior for o valor de K, menor será a qualidade do produto. Valores de K até 20% indicam que o pescado encontra-se fresco e poderá ser consumido *in natura* (sashimi). Quando o valor estiver entre 20 e 60% o pescado deverá ser submetido à cocção antes do consumo. Já o K acima de 60% indica que o pescado encontra-se em avançado estado de decomposição ou putrefação. Inadequações nas condições de armazenamento e temperatura elevam o valor de K, acelerando o processo de deterioração desta matéria-prima.

N-TMA

O método do Nitrogênio da Trimetilamina (N-TMA) é um dos mais indicados para determinação da qualidade de peixes e crustáceos de origem marinha. Isso ocorre porque tais animais apresentam o Óxido de Trimetilamina (OTMA) em sua composição. Quando o pescado está fresco, ele apresenta uma quantidade pouco representativa de TMA em sua composição, entretanto, uma alta quantidade de OTMA. Após o abate, o OTMA é convertido em TMA, sendo a determinação deste produto, a base para avaliar a qualidade do pescado. Vale salientar que essa análise é específica para peixes e crustáceos marinhos, sendo mais indicada, pois a formação de TMA é superior a formação de amônia nesses animais.

N-BVT

A determinação da qualidade do pescado pela análise do Nitrogênio de Bases Voláteis Totais (N-BVT) ocorre devido a decomposição deste através da formação de aminas e seus derivados. A mensuração desses produtos será a base para a

determinação dos N-BVT. Após a morte do animal, inicia-se a decomposição do ATP, como mencionado anteriormente. Com a decomposição desta molécula, ocorre a liberação de amônia, substância mais representativa nesta etapa de decomposição. Após a decomposição total do ATP, inicia-se a decomposição de outros compostos nitrogenados ocasionando a formação de trimetilamina, dimetilamina, amônia, putrecina, cadaverina e outros compostos como produto final. Logo, a determinação destes produtos fornecerá um indicativo da qualidade do pescado, sendo essa inversa a quantidade dos compostos anteriormente citados. Apesar de ser largamente utilizado em pescado no geral, é importante destacar que esse método não é indicado para elasmobrânquios (tubarões e arraias), haja visto que tais animais apresentam uma grande quantidade de compostos precursores de amônia em sua composição, o que poderá acarretar em conclusões equivocadas sobre o estado de frescor do animal.

TBARS

A determinação da peroxidação lipídica através da determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) também fornece indicativo da qualidade do pescado. Isso ocorre pois, após o abate dos animais, as insaturações dos ácidos graxos insaturados começam a ser oxidadas. Dentre os produtos formados com a oxidação dos ácidos graxos, pode-se destacar alguns aldeídos, em especial o malonaldeído. Logo, a quantificação deste produto, através do ácido tiobarbitúrico (TBA) fornecerá um indicativo do grau de oxidação ou ranço do pescado. Quanto maior a formação de malonaldeído, menor será a qualidade do pescado, particularmente em relação a qualidade lipídica.

MÉTODOS SENSORIAIS

Os métodos sensoriais são os mais antigos e mais utilizados na determinação do frescor do pescado, sendo ainda muito utilizados na indústria alimentícia devido a rapidez dos resultados. A análise sensorial pode e deve ser utilizada em todas as etapas de processamento do pescado, a qual vai desde a recepção da matéria prima até o produto final. Por outro lado, a análise sensorial é muito subjetiva, dependendo muito da experiência do avaliador, estado de saúde, estado emocional, entre outros. Por esse motivo, é recomendado que a mesma seja realizada por pessoas treinadas para tal atividade e em local externo a fatores que possam mascarar os resultados.

O sentido da visão é um importante aliado em diversas etapas da cadeia produtiva do pescado. Ele permite classificar o pescado em diversos tamanhos ou espécie logo após a captura. Possibilita ainda detectar pescado que possa ter sofrido queimaduras de frio em sua pele, fator esse que pode reduzir o preço do produto. Com a visão é possível localizar resíduos de pele em unidades de filetagem que comercializam seu produto sem pele, detecção de ossos ou parasitas nos filés, entre outros. A visão possui ainda uma importância muito grande no que se refere ao frescor do produto. É possível identificar possíveis alterações de coloração nas brânquias, pele, olhos e músculo do pescado.

O tato também possui grande importância para se detectar a qualidade do pescado. Ao pressionar o pescado com o dedo é possível saber se este está com sua elasticidade normal ou se encontra-se flácido, o qual indica um menor frescor do produto. Também atua no momento de avaliar se a escama se encontra firmemente aderida ao pescado ou se ela se solta com

facilidade, indicativo de menor frescor. Além disso, existe o método oral de avaliação da textura do pescado, o qual é realizado através do contato do pescado com os dentes, lábios e língua. O pescado com menor firmeza poderá indicar um produto com menor grau de frescor.

Através do olfato é possível avaliar a qualidade do mesmo. Pescados frescos tem odor característicos e a medida que seu frescor é reduzido, surge o odor amoniacal, em especial nos elasmobrânquios. Em pescados gordurosos o aparecimento do odor de ranço é indicativo que o produto se encontra com menor grau de frescor.

O gosto do pescado ajuda a saber se o produto contém *off-flavor*, caracterizado pela presença de geosmina e metilisoborneol (MIB). Além disso, é possível saber se o pescado se encontra com seu sabor característico ou algum outro sabor diferente, como o sabor de ranço, indicando menor estado de frescor.

A audição também poderá ser utilizada na análise sensorial de pescado. Quando o pescado é mastigado ouve-se o ruído produzido o qual poderá determinar a aceitabilidade do pescado. Entretanto, esse sentido não é muito utilizado na análise sensorial de pescado.

Como visto, diversos fatores poderão indicar a qualidade do pescado, sejam eles sensoriais ou químicos. Entretanto, de uma forma geral, recomenda-se a utilização de mais de um método para determinar a qualidade do produto, haja visto que a combinação de resultados fornecerá um resultado mais preciso. Sendo assim, podemos concluir que a determinação da qualidade da matéria prima é fundamental para o sucesso de qualquer indústria de beneficiamento de pescado e que os métodos de avaliação deverão ser utilizados em todas as etapas de produção.

PRÁTICA 1: OXIDAÇÃO LIPÍDICA PELA DETERMINAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS) EM PESCADO

- **Objetivo**

Gerar informações importantes no que se refere à oxidação de lipídios em carnes e pescado.

- **Materiais, equipamentos e reagentes**

- Balança analítica;
- Homogeneizador;
- Becker de 500 mL;
- Funis de vidro;
- Papel de filtro;
- Balão volumétrico de 50 mL;
- Provetas;
- Pipetas (1 e 5 mL);
- Tubos Falcon de 50 mL;
- Tubos de cultura com tampa rosqueada;
- Agitador de tubos;
- Estrutura para aquecer amostras (estante);
- Banho Maria;
- Gelo;
- Suporte para tubos de ensaio;

- Cronômetro;
- Espectrofotômetro;
- Ácido tricloroacético (TCA) a 10%;
- Ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,02 M;
- Água destilada;
- Sulfanilamida 0,5%.

- **Preparo das soluções**

TBA: pesar 0,3494 g e diluir em 120 mL de água destilada (quente).

Observação

Após preparado, guardá-lo em balão volumétrico envolvido em papel alumínio sob refrigeração.

TCA: pesar 25,0 g e diluir em 250 mL de água destilada.

Observação

Esse volume é o suficiente para determinação de 20 amostras. Os volumes poderão ser ajustados a depender do volume de amostras a serem analisadas.

Solução de TCA a 10% (v/v)

10 mL TCA concentrado → 100 mL solução a 10%

Solução de Sulfanilamida a 0,5% em solução de HCL a 20%

Pesar 0,5 g de Sulfanilamida → 100 mL em solução de HCL a 20%

Observação

Estas soluções devem ser preparadas no dia da utilização.

• Procedimentos

- 1.** Pesar 5,0 g da amostra em balança analítica e colocar em um tubo de Falcon de 50 mL;
- 2.** Adicionar 1 mL de solução de sulfanilamida 0,5% (apenas para produtos defumados);
- 3.** Adicionar 10,0 mL da solução de TCA a 10% (v/v);
- 4.** Adicionar 5,0 mL de água destilada;
- 5.** Agitar por 5 min para promover a extração do Malonaldeído (MDA);

6. Centrifugar por 5 min a 3500 rpm;
7. Filtrar as amostras com papel filtro whatman nº 1 dentro de tubos de ensaio de 25,0 mL com tampa;
8. Adicionar 5,0 mL da solução de TBA 0,02 M;
9. Aquecer em banho-maria (100 °C por 35 minutos);
10. Resfriar rapidamente (colocar os tubos, bem tampados, em um recipiente com água gelada e gelo) para a leitura da absorbância a 532 nm;
11. Fazer, em duplicata, ensaio branco com 5,0 mL de TCA 10% (v/v) e 5,0 mL de TBA 0,02 M (nesta ordem), aquecer como a amostra.

- **Análise dos resultados**

Após a incubação em banho maria, a solução normalmente adquire uma coloração rosada. Quando mais oxidada estiver a amostra, mais rosada (ou vermelha) a solução estará. A quantificação do malonaldeído poderá ser realizada a partir da equação abaixo:

$$TBA = \text{valor da absorbância} \times 7,8$$

PRÁTICA 2: DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO DE BASES VOLÁTEIS TOTAIS (N- BVT)

- **Objetivo**

Avaliar o frescor do pescado com base na formação de compostos nitrogenados.

- **Materiais, equipamentos e reagentes**

- Homogeneizador;
- Aparelho de destilação micro-Kjeldahl e tubos para destilação;
- Balança analítica;
- Erlenmeyer de 250 mL;
- Funis de vidro;
- Papel de filtro;
- Ácido tricloroacético (TCA) a 5 %;
- Ácido clorídrico (HCl) a 0,01 N;
- Ácido bórico (H_3BO_3) como indicador misto (vermelho de metila + verde de bromocresol);
- Óxido de magnésio (MgO);
- Fenolftaleína.

- **Procedimentos**

1. Pesar 20 g da amostra num becker de 100 mL;

Observação

Para amostras de baixo rendimento na filtração, ex: liofilizadas, pesar 20 g em becker de 250 mL (Preferível becker's "altos" para uma melhor sucção na hora de filtrar).

2. Acrescentar 120 mL de TCA;
 - » Para amostras de baixo rendimento na filtração, acrescentar 120 mL;
3. Homogeneizar no turrax por 5 min;
4. Deixar decantar por 30 min;
5. Filtrar em funil de vidro com papel filtro whatman dentro dos tubos de ensaio;

Observação

Em amostras com partículas liofilizadas, deve-se succionar a parte do meio com pipeta, após a decantação, e adicionar o líquido no filtro.

6. Medir 20 mL do filtrado e transferir para o tubo digestor de proteína (fazer em duplicata);
7. Acrescentar 2 gotas de fenoltaleína;

8. Acrescentar 1 g de MgO, (aproximadamente 1 espátula rasa);
9. Agitar manualmente com cuidado até a coloração rosa;
10. Colocar em um Erlenmeyer de 250 mL, 20 mL da solução receptora (a mesma para a determinação de proteína bruta);
11. Destilar aproximadamente 70 mL no aparelho micro-Kjeldahl;
12. Titular com HCl (0,01 N) até a cor preto-azulado virar vermelho, anotando o volume de ácido gasto.

- **Cálculo**

$$N - BVT = \frac{(\text{mL de HCl} \times N \times 14 \times 134)}{(\text{Peso da amostra} \times \text{mL de HCl})}$$

Observação

mL de HCl é o volume gasto do mesmo na titulação; N é a normalidade do HCl (0,01 N); 134 corresponde a fração líquida que estaria em 20 g de peixe extraído com 120 mL de TCA. Considera-se que em média a carne de peixe tenha 70% de água, logo 20 g contribuiriam com 14 g de água que somada a 120 mL resulta em 134 de fração líquida total.

Caso se tenha os resultados de umidade, eles podem entrar no cálculo na substituição dos 14 gramas de água da amostra (considerando que o peixe tenha 70% de umidade).

- **Análise dos resultados**

De acordo com Ogawa e Maia (1999), o frescor do peixe poderá ser classificado segundo a Tabela 1.

Tabela 1 – Índice de frescor para pescados

N-BVT (mg/100 g)	Frescor
5-10	Excelente
15-25	Razoável
30-40	Início da putrefação
>50	Putrefação

Destaca-se que segundo a Portaria nº 185, de 13 de maio de 1997, do Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento, os valores de N-BVT são limitados a 30 mg de Nitrogênio por 100 gramas de carne. É importante frisar que esse parâmetro não é aplicado aos elasmobrânquios (tubarões e raias).

PRÁTICA 3: ABATE, AVALIAÇÃO POST-MORTEM E PRODUÇÃO DE FILÉS DE TILÁPIA DO NILO (*OREOCHROMIS NILOTICUS*)

- **Objetivo**

Realizar o abate de tilápias e verificar padrões físicos e sensoriais de qualidade durante sua fase *post-mortem*.

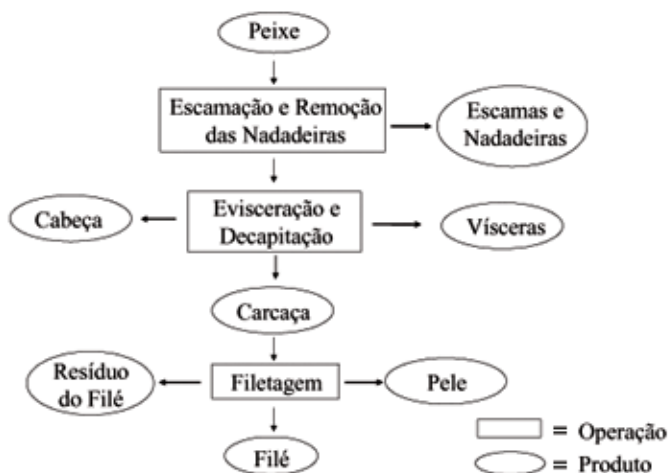
- **Materiais, equipamentos e reagentes**

- Tilápias;
- Gelo;
- Colheres;
- Tábuas de corte;
- Tesouras para alimentos;
- Cubas;
- Régua;
- Seringas;
- Medidor de pH;
- Medidor de glicose;
- Bandejas de isopor;
- Filme PVC;
- Sacos de polietileno.

- **Procedimentos**

Abate de tilápias

O procedimento para o abate de tilápias seguirá o fluxograma proposto por Santos *et al.* (2007), conforme Figura 1.

Figura 1 – Fluxograma de processamento manual da tilápia.

Fonte: Santos *et al.* (2007).

1. Os peixes serão transferidos para tanques de depuração no dia anterior e transportados para o laboratório em caixas plásticas com água.
2. Na etapa de recepção, os peixes devem ser transferidos para caixas plásticas com solução de água clorada a 5 ppm e gelo, para que a temperatura do meio atinja em torno de 1 °C. Essa condição (hipotermia) causa insensibilização nos animais, sendo alvo de estudos que analisam tanto questões de bem-estar, quanto sua ligação com a qualidade do produto final.
3. O pescado insensibilizado passará imediatamente pela sangria, que é um método de abate realizado pela

perfuração das brânquias após imersão do peixe em água gelada.

4. Após a etapa de sangria, os peixes deverão ser submetidos à abertura ventral da cavidade abdominal, desde o orifício urogenital até os ossos da mandíbula, seguido de retirada cuidadosa das vísceras, para evitar a contaminação dos músculos com o material fecal (Figura 2).

Figura 2 – Corte para retirada das vísceras no abate de tilápias



Fonte: Autoria própria (2023).

5. Os peixes deverão ser higienizados em água clorada e, a depender da finalidade, serem decapitados, cortados em postas ou submetidos à produção dos filés, e posteriormente embalados e acondicionados sob refrigeração (± 5 °C).

AVALIAÇÃO POST-MORTEM

• Determinação do Índice de *Rigor mortis*

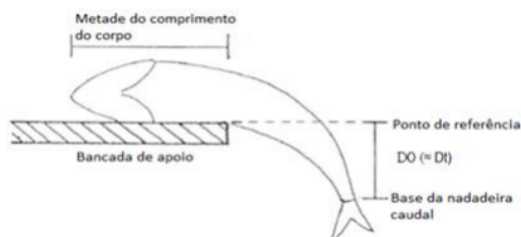
Para esta determinação, três peixes inteiros devem ser analisados quanto ao tempo de pré-*rigor mortis*, avaliados desde o abate até a entrada no *rigor mortis*, com o objetivo de determinar o tempo em que os animais permaneceram no período de pré-*rigor mortis*.

O índice de rigor (IR) é medido segundo Bito (1983), e é calculado de acordo com a equação:

$$IR = [(D_o - D)/D_o] \times 100$$

Onde: D_o = valor da distância que separa a base da nadadeira caudal ao ponto de referência, imediatamente após a morte e D = valor da distância que separa a base da nadadeira caudal ao ponto de referência nos intervalos de tempos selecionados (Figura 3).

Figura 3 – Ilustração dos pontos de medição para determinação do Índice de *Rigor mortis*.



Fonte: Gonçalves (2011).

Para avaliar o comportamento das carcaças após o abate, as avaliações do Índice de Rigor devem ser realizadas de 20 em 20 minutos, até o peixe atingir o índice rigor de 100%.

- **Determinação da glicose sanguínea**

Para os três peixes em análise, deve-se realizar a coleta de 0,5 mL de sangue por punção caudal, com o auxílio de seringa descartáveis. A concentração de glicose pode ser determinada com auxílio de medidor eletrônico de glicose sanguínea (Accu-Chek Guide Me/Roche), onde 10 μ L de sangue total são colocados em fitas de leitura do aparelho que, por meio de uma análise eletroquímica da amostra, apresenta a concentração de glicose em ug/dl.

A medição de glicose pode ser realizada ao início do período *post-mortem* e no momento que for observado que o pescado está em *rigor mortis*.

- **Análise do pH no período *post-mortem***

O pH deve ser medido nos peixes através de um medidor de pH diretamente no músculo dorsal, com eletrodo de contato (Galvão; Oetterer, 2014). As medições devem iniciar imediatamente após o abate (tempo 0) e após 30 minutos, 1 hora, 2 horas, até que se observe pH constante em duas medições consecutivas (Figura 3).

Figura 3 – Determinação do pH no período *post mortem*



Fonte: Autoria própria (2023).

- **Avaliação subjetiva do frescor dos peixes**

A avaliação do estado de frescor e da qualidade sensorial das amostras (método subjetivo) deve ser realizada por três avaliadores em três peixes, que ficarão acondicionados em gelo na temperatura de refrigeração (4 °C). As características sensoriais serão avaliadas pelo Método do Índice de Qualidade (MIQ), elaborado por Soares e Gonçalves (2012), que considera a tilápia fresca e deteriorada, gerando uma pontuação que serve como indicador da qualidade (Figura 4).

Figura 4 – Parâmetros de pontuação pelo método QIM para avaliação sensorial do frescor de tilápias ao longo do armazenamento refrigerado.

PARÂMETROS	CARACTERÍSTICAS	NOTA
Cor	Brilhante, bege a rosa claro	0 ()
	Ligeiramente opaca, bege mais escurecido	1 ()
Muco	Beje opaca, intercalada com manchas rosadas escurecidas	2 ()
	Transparente e fino	0 ()
	Ligeiramente viscoso	1 ()
	Muito viscoso	2 ()
Odor	Fresco	0 ()
	Não fresco, mas neutro	1 ()
	Amoniacal	2 ()
	Pútrido	3 ()
Musculatura	Firme	0 ()
	Ligeiramente mole	1 ()
Textura	Mole	2 ()
	Completamente autolisado, desfragmentando-se ao toque	3 ()
Sangue	Vermelho brilhante	0 ()
	Rubro a vinho	1 ()
	Amarronzado	2 ()
Disposição das fibras musculares	Sem abertura, poucas aberturas	0 ()
	Com abertura em menos de 25% do filé	1 ()
	Com abertura em mais de 75% do filé	2 ()
ÍNDICE DE QUALIDADE		0-14

Fonte: Soares e Gonçalves (2012).

A pontuação da avaliação sensorial varia entre 0 e 14, e servirá de parâmetro para discutir a qualidade dos peixes durante o armazenamento refrigerado, em cama de gelo.

RETIRADA DOS FILÉS DE TILÁPIAS

Antes de iniciar o procedimento de retirada manual dos filés de tilápias, os peixes deverão ser pesados. O processo consistirá na demarcação da área do filé com uma faca afiada. Em seguida, faz-se a retirada da pele e o corte do filé, no sentido do dorso para o ventre, com a faca posicionada rente aos ossos, conforme observado na Figura 5.

Figura 5 – Corte dos filés de tilápias.



Fonte: Autoria própria (2023).

Ao final, os filés obtidos devem ser pesados para calcular o rendimento em relação ao peso total da carcaça.

ANÁLISE DOS DADOS

Ao final da prática, observe:

1. Os valores obtidos para o Índice de Rigor mortis (IR), verificando em quanto tempo os peixes chegaram ao valor de IR igual a 100;
2. Observar as diferenças nas medições de glicose imediatamente após o abate e no *rigor mortis*;
3. Verificar o comportamento do pH durante o período *post mortem* do pescado, verificando o tempo em que eles atingiram pH constante;
4. Verificar os valores obtidos no MIQ durante o armazenamento dos peixes;
5. Observar o rendimento de filés dos peixes.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste capítulo, foram descritas as principais análises químicas e sensoriais para verificar a qualidade de pescados.

REFERÊNCIAS

- BERAQUET, N. J.; LINDO, M. M. K. Transformações bioquímicas *post mortem* em pescado. Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos, v. 22, p.169-192, 1985.
- BITO, M. Studies on rigor mortis of fish - I. Difference in the mode of rigor mortis among some varieties of fish. By modified cuttings methods. **Bulletin Tokai Regional Fisheries Research Laboratory**, v.109, p.89-96, 1983.
- BRASIL. Portaria nº 185, de 13 de maio de 1997. O Ministério da Agricultura e do Abastecimento aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Fresco (inteiro e eviscerado). Diário Oficial da União, Brasília, nº 93, 19 maio 1997. Seção 1, p.10.282-3.
- CARNEIRO, C. J.; BRUM, A. L.; THESING, N. J.; PROCHNOW, D. A. Cadeia produtiva da piscicultura: um olhar para a evolução da tilapicultura no Brasil. **Perspectiva**, Erechim. v. 46, n. 175, p. 25-34, 2022.
- CONTRERAS-GUZMÁN, E. S. Métodos químicos para análise do pescado. In: KAI, M.; RUIVO, U. E. Controle de qualidade do pescado. Santos: Leopoldianum, 1988. p. 196-209.
- EMBRAPA, 2009. Métodos para análises de pescado.
- FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Tilapia markets and producers diversifying as traditional large players lag**. Globefish – analysis and information on world fish trade. 4 out. Rome, 2018.
- GALVÃO, J. A.; OETTERER, M. **Qualidade e Processamento do Pescado**. Elsevier Editora: Rio de Janeiro, 237 p. 2014.
- GONÇALVES, A. A. **Tecnologia do pescado: Ciência, tecnologia, inovação e legislação**. Editora Atheneu, 2011.
- GONÇALVES, Alex Augusto. **Tecnologia do Pescado: Ciência, tecnologia, inovação e legislação**. São Paulo: Atheneu, 2011. 608 p.

MILANEZ, A. Y.; GUIMARÃES, D. D.; MAIA, G. B. S.; MUÑOZ, A. E. P.; PEDROZA FILHO, M. X. Potencial e barreiras para a exportação de carne de tilápias pelo Brasil. **BNDES**, v. 25, n. 49, p. 155-213, 2019.

OGAWA, M.; MAIA, E. L. **Manual de Pesca**: Ciência e tecnologia do pescado. São Paulo:Varela, 1999. 430 p.

ROSMINI, M. R.; PERLO, F.; PÉREZ-ALVAREZ, J. A.; PAGÁN-MORENO, M. J.; GAGO-GAGO, A.; LÓPEZ-SANTOVEÑA, F.; ARANDA-CATALÁ, V. TBA test by an extractive method applied to 'paté'. **Meat Science**, [S. L.], v. 42, n. 1, p. 103-110, jan. 1996.

SANTOS, V. B.; FREITAS, R. T. F.; LOGATO, P. V. R.; FREATO, T. A.; ORFÃO, L. H.; MILLIOTI, L. C. Rendimento do processamento de linhagens de tilápias (*Oreochromis niloticus*) em função do peso corporal. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 2, p. 554-562, 2007.

SOARES, K.; GONÇALVES, A. A. Aplicação do Método do Índice de Qualidade (MIQ) para o estudo da vida útil de filés de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) sem pele, armazenados em gelo. **Semina**, v. 33, p. 2289-2300, 2012.

TARLADGIS, Basil G.; WATTS, Betty M.; YOUNATHAN, Margaret T.; DUGAN, Leroy. A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. **Journal Of The American Oil Chemists' Society**, [S. L.], v. 37, n. 1, p. 44-48, jan. 1960. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02630824>.

CAPÍTULO 6

MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* PARA VEGETAIS

Cristiani Viegas Brandão Grisi

Aline Macedo Dantas

Ana Regina Simplício de Medeiros

Angela Maria Tribuzy de Magalhães Cordeiro

Os compostos antioxidantes estão largamente distribuídos na natureza e, desde o final do século 20, vêm sendo pesquisados nas diversas áreas do conhecimento, como a Agronomia, Ciência e Tecnologia de Alimentos, Zootecnia, Química, Bioquímica, Medicina e áreas afins. Estas substâncias podem ser definidas como moléculas que atuam em sistemas biológicos e alimentares, que previnem ou reduzem significativamente o processo oxidativo de outras moléculas.

Um desequilíbrio entre compostos antioxidantes e oxidantes leva ao desenvolvimento do estresse oxidativo, favorecendo Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), ou pode ocorrer quando a remoção destas acontece de forma lenta. As EROs abrangem uma série de espécies químicas com vida útil, propriedades, interações e reatividades distintas e se classificam em dois grupos, os radicais livres e os não radicais. Os radicais livres são aqueles que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados e fornecem reatividade à molécula, os principais são a alcóxila ($\text{LO}\cdot$), a hidroxila ($\text{OH}\cdot$), a peróxila ($\text{LOO}\cdot$) e o superóxido ($\text{O}_2\cdot$), já os não

radicais são formados através do compartilhamento de elétrons desemparelhados, os dois principais são o ácido hipocloroso (HClO), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o oxigênio (O₂).

As EROs ocorrem através do metabolismo celular dos organismos vivos. Quando estão presentes em baixas e moderadas concentrações, atuam em processos fisiológicos e se destacam pelo desempenho de algumas funções, tais como síntese de substâncias biológicas, produção de energia (ATP), regulação do crescimento celular e defesa do organismo. Porém, ao serem produzidas em abundância, conduzem aos danos oxidativos, sendo responsáveis por processos mutagênicos, como o câncer, e distúrbios neurológicos.

Os antioxidantes atuam contra essas EROs através de alguns sistemas, são eles:

- Sistema de prevenção: Impedindo a formação das EROs;
- Sistema de varredores: Impedindo a ação dessas EROs;
- Sistema de reparo: Reconstituindo e reparando as estruturas biológicas danificadas.

As principais fontes naturais de compostos antioxidantes são as de origem vegetal, que se destacam por possuírem substâncias ou fitoquímicos diversificados e amplamente distribuídos, dentre eles destacam-se as micromoléculas como as vitaminas (E e C), os minerais (cobre, zinco, magnésio e selênio) e os compostos fenólicos.

Além das micromoléculas citadas, algumas enzimas também podem agir no intuito de prevenir e controlar a formação

das EROs que estão envolvidas nas reações em cadeias, consequentemente, nos danos oxidativos dos vegetais. Dentre as enzimas responsáveis por essa proteção estão catalase, superóxido dismutase, monohidroascorbato, ascorbato peroxidase e dehidroascorbato redutase.

Frequentemente, o impacto de um antioxidante específico sobre um efeito biológico é utilizado para inferir o papel das EROs, como se todos os antioxidantes fossem equivalentes. No entanto, cada antioxidante possui uma composição química única e diferentes capacidades de reagir com diversas espécies reativas. Esses compostos podem atuar como inibidores, decompositores de radicais livres, quelantes de metais ou eliminadores de oxigênio.

Diante do exposto, foram desenvolvidos diferentes métodos para determinar a atividade antioxidante que avaliam a efetiva capacidade através de diferentes mecanismos de ação. A seguir são apresentados alguns dos métodos mais reportados na literatura para determinar a capacidade antioxidante de diferentes compostos. A utilização desses métodos permite avaliar como distintos antioxidantes contribuem para a proteção contra o dano oxidativo. Essa abordagem multifacetada possibilita a compreensão mais ampla do comportamento dos antioxidantes em diversos contextos e sistemas biológicos, como eles podem ser aplicados em diferentes situações e como podem ser usados para proteger a saúde e melhorar a qualidade de produtos em diversas áreas, como a tecnológica e nutricional.

MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS ANTIOXIDANTES

Atividade de captura do radical DPPH• (DPPH)

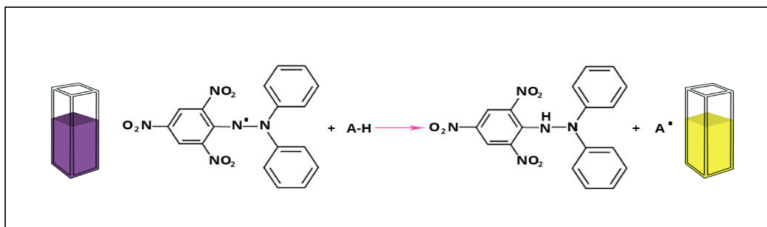
O DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) é o radical livre estável mais popular para o estudo de antioxidantes *in vitro*. Estes antioxidantes chamados “sequestradores” têm função de capturar os radicais livres ativos antes que ataquem moléculas biologicamente essenciais, doando átomo de hidrogênio ou elétrons, além de transferirem prótons para produzir um composto estável e um radical derivado de antioxidante. As taxas destas reações são determinadas primeiramente pela propriedade redox, tal como energia de ligação de dissociação e o potencial de ionização do antioxidante.

O DPPH• é um método utilizado para medir a capacidade antioxidante de um composto devido à alta estabilidade do radical. O seu mecanismo se ampara na capacidade do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•) simular uma espécie reativa de oxigênio. A doação de hidrogênio por um antioxidante, em meio alcoólico, promove a sua redução e formação do difenil picrilhidrazina (DPPH-H).

A atividade antioxidante pode ser avaliada de maneira eficiente pelo método do DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) desenvolvido por Brand-Williams; Cuvelier; Berset (1995), com algumas modificações de melhoria ocorridas nos últimos anos. Sua aplicação tem se destacado por ser considerado um método prático, rápido e estável, o qual consiste na redução do radical DPPH•, quando entra em contato com um composto capaz de

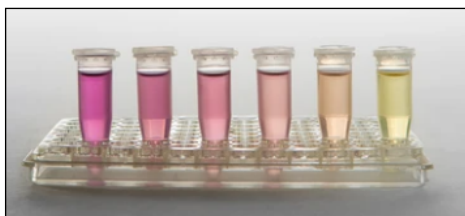
doar um elétron ou átomo de hidrogênio, alterando a cor da solução alcoólica de DPPH• de violeta para amarelo, de acordo com a reação apresentada na figura 1.

Figura 1 – Mecanismo de reação do DPPH•.



Fonte: Cordeiro, 2013.

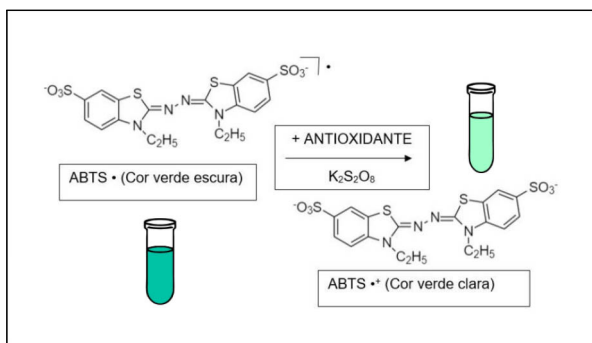
A adição do antioxidante resulta em um decréscimo na absorvância proporcional a concentração e atividade antioxidante do composto, apresentando uma absorção na faixa de 515-520 nm, que pode ser observado por espectrofotômetro UV-Vis, já que a coloração vai sendo alterada para um amarelo claro, como pode ser observado na figura 2. Os resultados podem ser expressos de diversas maneiras, utilizando a curva padrão de Trolox como referência, muito semelhante a estrutura da vitamina E, ou expressa como coeficiente de inibição (IC_{50}), que relaciona a quantidade de antioxidante necessária para reduzir 50% à concentração inicial do radical livre no meio, ou pelo % de inibição referente ao radical livre.

Figura 2 – Atividade antioxidante em DPPH.

Fonte: Grandini, 2011.

Captura do Radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$

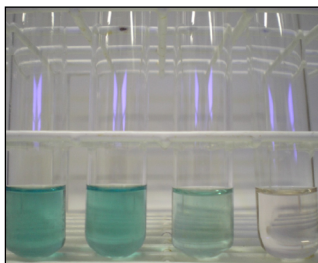
O método ABTS é baseado na capacidade dos antioxidantes de capturar o cátion $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (2,2' - azinobis (3 - etilbenzotiazolina - 6 - ácido sulfônico)). Este também é um dos métodos mais utilizados na triagem da capacidade antioxidante pela sua simplicidade e rapidez. Este radical pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática (Figura 3).

Figura 3 – Estabilização do radical ABTS a partir da reação com um antioxidante e persulfato de potássio para a formação de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ 

Fonte: Sacramento *et al.*, 2023.

A introdução de um antioxidante leva à redução do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$, que possui uma cor azul esverdeada, transformando-o em $\text{ABTS}^{\bullet}$. Essa reação resulta na perda da coloração (Figura 4) característica do composto. A inibição do $\text{ABTS}^{\bullet+}$ é calculada através de uma curva padrão de Trolox, como referência. Esse método pode ser aplicado para estudar antioxidantes solúveis em água e em gordura, tanto em compostos puros como em extratos de plantas. Uma das metodologias mais utilizadas foi descrita por Rufino *et al.* (2007) que utiliza espectrofotometria com comprimento de onda de 734 nm.

Figura 4 – Atividade antioxidante na captura do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$.



Fonte: Rufino *et al.*, 2007.

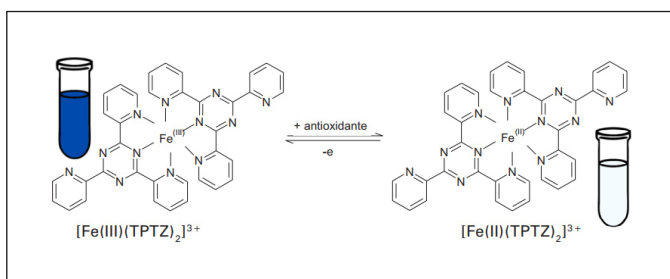
Método de Redução do Ferro (FRAP)

O FRAP é um método reprodutível, utilizado para determinar não apenas a capacidade antioxidante de extratos, mas também é utilizado na avaliação da eficácia de substâncias puras, gerando resultados comparáveis aos obtidos por meio de metodologias complexas.

Nesse método, a reação é acompanhada pela redução do complexo formado, entre o ferro e a 2,4,6-tri(2-piridil)-1,5,5-triazina (TPTZ), em que ocorre a redução do complexo de íons férricos $[\text{Fe}^{3+}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ em complexo de íons ferrosos $[\text{Fe}^{2+}(\text{TPTZ})_2]^{2+}$, ou seja, redução do complexo de íons férricos (Fe^{3+}) em complexo de íons ferrosos (Fe^{2+}), sendo assim, quanto maior a absorbância, maior será o seu efeito antioxidante dos compostos analisados.

Na presença de TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) e em condições ácidas, a redução é monitorada pela formação de uma solução de coloração azul intenso com o Fe^{2+} (Figura 5), apresentando uma absorbância máxima de 595 nm dependendo das espécies redutoras disponíveis, sendo analisados por meio de um espectrofotômetro, conforme metodologia descrita por Rufino *et al.* (2006).

Figura 5 – Redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe^{3+} .



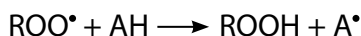
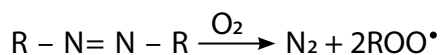
Fonte: Rufino *et al.*, 2006, com adaptações.

Capacidade de absorção do radical de oxigênio (ORAC)

A metodologia ORAC tem se mostrado eficiente e muito utilizada para determinar a capacidade antioxidante de diversos

compostos, desde substâncias sintéticas e naturais, a amostras hidrofílicas e lipofílicas. Neste método é avaliado o decréscimo da fluorescência que pode ser medido por espectrofluorimetria com comprimento de onda de excitação de 485 nm e de emissão de 515 nm, a partir do dano oxidativo. Ao adicionar o antioxidante, ocorre a reação com os radicais livres de oxigênio doando hidrogênio e inibindo a perda da intensidade da fluorescência (Figura 6), sendo assim, a atividade antioxidante proporcional a esta inibição.

Figura 6 – Mecanismo de reação de um ensaio ORAC.



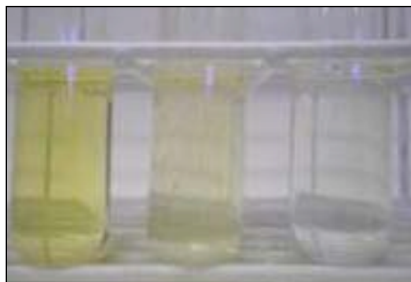
Fonte: Zapata e Zapata, 2022.

Ademais, quando os íons de hidrogênio são liberados pelos antioxidantes para os radicais livres, eles unem os elétrons desemparelhados desses radicais. Isso transforma o antioxidante em um radical livre que, então, se combina com outro radical peroxil, resultando na rápida eliminação de ambos os compostos. A metodologia descrita foi baseada na metodologia definida por Boroski *et al.*, (2015) e Sacramento *et al.*, (2023).

SISTEMA BETA-CAROTENO/ÁCIDO LINOLÉICO

A co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico permite avaliar a capacidade de uma determinada substância prevenir a oxidação do β -caroteno, protegendo-o dos radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico. É um método colorimétrico, realizado em meio emulsionado, pela técnica de co-oxidação de substratos. Baseia-se na leitura referente à descoloração da solução preparada com β -caroteno e ácido linoléico, em meio aquoso. A perda de cor acontece devido à formação de estruturas radicais resultantes da oxidação do ácido linoleico. Essas estruturas reagem com as ligações duplas do β -caroteno, levando à remoção de seu cromóforo e, conseqüentemente, resultando na descoloração do pigmento alaranjado que é típico da solução (Figura 7). A presença de antioxidantes no sistema atua como proteção para o ácido linoleico, estendendo assim o período em que esses radicais são formados. A reação pode ser monitorada espectrofotometricamente pela perda da coloração do β -caroteno em 470 nm, com leitura imediata e em intervalos de 15 min, por um tempo total de 2 h.

Figura 7 – Estruturas radicais resultantes da oxidação do ácido linoleico.



Fonte: Rufino, 2006.

ATIVIDADE DE ELIMINAÇÃO CONTRA RADICAL HIDROXILA ($\bullet\text{OH}$)

Algumas EROs como o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxila ($\text{OH}\bullet$), causam danos oxidativos no corpo humano, logo, para avaliar o potencial dos compostos antioxidantes de forma mais abrangente, o ideal é incluir testes capazes de reagir com ERO. Embora este mecanismo de ação seja altamente prejudicial à saúde humana, há um número limitado de artigos que fornecem informações sobre ensaios de capacidade de eliminação de ERO.

Os radicais hidroxila são altamente reativos entre as espécies e podem reagir com diversas moléculas, o que pode induzir diversas reações oxidativas. Isso pode ocorrer devido a reação de Fenton, quando o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) reage com o Fe (II).

É de conhecimento amplo que os compostos fenólicos são bons sequestradores do radical hidroxila, atuando na inibição da sua formação, o que pode ser principalmente pela inativação de íons metálicos e sua quelação, ou mesmo pela transformação do H_2O_2 em um composto mais estável dando como produtos, água e oxigênio. A Atividade de eliminação contra radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) de extrato vegetal pode ser determinado pela metodologia descrita por Zhong *et al.* (2010) por espectrofotometria utilizando um comprimento de onda de 510 nm.

ATIVIDADE QUELANTE

A capacidade quelante pode ser determinada pela competição por íons ferrosos, avaliando a intensidade da inibição

do complexo, que quanto mais elevada, maior será a atividade antioxidante. Uma boa capacidade quelante dos íons metálicos é avaliada quando eles não conseguem mais atuar como iniciadores de reações, pela formação de um complexo entre o antioxidante e o metal.

Íons ferrosos são metais de transição e bons facilitadores na produção de radicais livres. Além disso, diferentemente do ensaio FRAP, quando o mecanismo de reação ocorre por doação de elétrons para reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} , o mecanismo envolve a atividade quelante diretamente do Fe^{2+} . Neste caso, é interessante imobilizar íons ferrosos, uma vez que são altamente reativos pró-oxidantes que facilitam a produção de ERO, causando danos oxidativos.

O método utiliza a ferrozina, de modo a formar um complexo rosa quando quelato com Fe^{2+} (ferrozina- Fe^{2+}), ocorrendo a competição com a ferrozina por íons ferrosos com antioxidantes. Os dados sobre o potencial quelante do íon Fe^{2+} são valiosos, pois existem poucos na literatura para extratos de plantas. O potencial quelante de Fe^{2+} das amostras pode ser determinado por espectrofotometria e a absorbância monitorada a 562 nm pela metodologia descrita por Lefsih *et al.* (2016).

ATIVIDADE DE ELIMINAÇÃO CONTRA O RADICAL ÂNION SUPERÓXIDO ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

Ensaio que medem a capacidade de eliminação de oxidantes biológicos são importantes, como o ânion superóxido, que pode contribuir para oxidação em sistemas biológicos. Em

ensaios utilizando esse radical, que é gerado pela auto-oxidação do pirogallol, é observado a formação de um composto colorido que altera a sua cor de roxa para amarela quando o ânion superóxido é sequestrado por um antioxidante, indicando assim a intensidade da atividade antioxidante do composto.

Embora o ânion superóxido seja menos reativo que outros radicais, estes são precursores de outros radicais altamente reativos, podendo produzir radicais hidroxila e oxigênio singlete, ou seja, outros radicais livres e agentes oxidantes, que podem causar reações em cadeia, peroxidação lipídica e danos celulares. A capacidade de eliminação de ânions superóxido de extrato pela auto-oxidação do pirogallol para geração de ânions superóxido pode ser determinada em espectrofotômetro e absorbância medida a 325 nm de acordo com a metodologia descrita por Zhong *et al.* (2010).

PRÁTICA 1: PREPARO DO EXTRATO

- **Objetivo**

Elaborar o extrato a partir de um vegetal para determinação da atividade antioxidantes por diferentes métodos.

- **Materiais, equipamentos e reagentes**

- Material vegetal
- Balança analítica

- Estufa com circulação de ar
- Moinho ou processador de alimentos
- Mesa de agitação constante
- Bomba a vácuo
- Rotaevaporador
- Geladeira
- Proveta de 50 mL
- Erlenmeyer 250 mL
- Espátulas
- Álcool etílico P.A.
- Água destilada

- **Procedimento**

1. Secar o material vegetal a 40 °C por 24 h;
2. Diminuir o tamanho das partículas do material vegetal seco através de moagem em moinho de facas tipo Willey (SOLAB-SL31, Brasil), com rotação fixa em 1750 rpm e uma peneira de aço inox acoplado ao próprio equipamento de 10 mesh, garantindo a padronização das partículas;
3. Pesar 10 g de amostra seca, colocar em Erlenmeyer de 250 mL e adicionar 100 mL de solvente (1:10).

Os solventes mais utilizados são etanol e água, na proporção, 50 % (v/v);

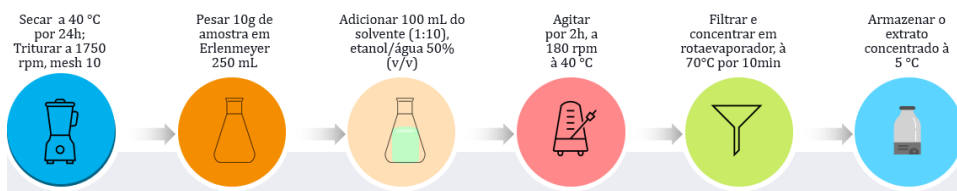
4. Agitar a solução por 2 h a 180 rpm à 40 °C;
5. Filtrar a solução com o auxílio de bomba a vácuo (SOLAB, SL-61);
6. Concentrar o extrato com o auxílio de rotaevaporador, em banho-maria à 70 °C por 10 min;
7. Armazenar os extratos à 5 °C em vidro âmbar e ao abrigo da luz.

NOTA

As propriedades do solvente e o pH influenciam nos compostos extraídos.

A metodologia para obtenção do extrato vegetal está descrita na Figura 8.

Figura 8 – Obtenção do extrato vegetal.



Fonte: Próprios autores (2023).

PRÁTICA 2: CAPTURA DO RADICAL LIVRE ABTS•+

- **Objetivo**

Avaliar a capacidade antioxidante de compostos hidrofílicos e lipofílicos através da captura do radical ABTS•+

- **Materiais, equipamentos e reagentes**

- Agitador de tubos de ensaio
- Balança analítica
- Balão volumétrico de 10 mL, 50 mL e 1.000 mL
- Cronômetro digital
- Cubetas de vidro (4 x 1 cm)
- Espectrofotômetro
- Pipeta automática (10 µL – 1.000 µL)
- Proveta de 50 mL
- Tubos de ensaio com tampa rosqueada (8 mL)
- Béquer 50 mL e 100 mL
- ABTS (2,2 AZINO BIS (3-ethylbenzo thiazoline 6 sulfonic acid) diammoninum salt (PM = 548,68)
- Água destilada
- Álcool etílico P.A.
- Persulfato de Potássio (PM = 270,3) Acros Organics, código 202015000 ou equivalente.

- Trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico) (PM = 250,29).

- **Soluções e preparo**

- Solução estoque de ABTS 7 mM: Em um balão volumétrico com água destilada, dissolver 192 g de ABTS e completar o volume para 50 mL, homogeneizar e transferir para um frasco de vidro âmbar devidamente identificado. Armazenar sob refrigeração (5 °C) por até 1 mês.
- Solução de persulfato de potássio 140 mM: Em um balão volumétrico com água destilada, dissolver 378,4 mg de persulfato de potássio e completar o volume para 10 mL, homogeneizar e transferir para um frasco de vidro âmbar devidamente identificado. Armazenar em temperatura ambiente (25 °C) por até 1 mês.
- Solução padrão de Trolox 2 mM: Em um balão volumétrico com álcool etílico, dissolver 25 mg Trolox e completar o volume para 50 mL, homogeneizar e transferir para um frasco de vidro âmbar devidamente identificado. Preparar e usar apenas no dia do experimento.
- Preparo do radical ABTS^{•+}: Em um balão, reagir 88 µL da solução de persulfato de potássio com 5 mL da solução estoque de ABTS. A mistura deve ser mantida em temperatura ambiente (25 °C) por 16 h, no abrigo da luz. A seguir, diluir 1 mL dessa mistura em etanol

até alcançar uma absorbância de 0,6 – 0,70 a 734 nm.
Preparar e usar apenas no dia do experimento.

• Procedimentos

1. Preparar os tubos de ensaio, em triplicata;
2. Conferir a leitura da solução de ABTS, que deve ter absorbância entre 0,6 – 0,7;
3. Pipetar uma alíquota de 30 μL de amostra, em seguida misturar com 3000 μL da solução do radical ABTS e homogeneizar em agitador de tubos.
4. Realizar a leitura em um espectrofotômetro à 734 nm após 6 min de espera no abrigo da luz;
5. Utilizar etanol como branco para calibrar o aparelho.

A Figura 9 apresenta o esquema do método de determinação da atividade antioxidante descrita por Rufino *et al.* (2007).

Figura 9 – Determinação a capacidade antioxidante por captura do radical ABTS•+.



Fonte: Próprios autores (2023), adaptado de Rufino *et al.* (2007).

- **Resultados expressos em Equivalente Trolox**

Curva-Padrão do Trolox

- » Em balões volumétricos de 10 mL, preparar soluções variando a concentração de 100 μM a 2.000 μM , a partir da solução padrão de Trolox (2 mM), conforme a Tabela 1.

Tabela 1 – Preparo das soluções para curva-padrão.

Solução padrão de Trolox (mL)	Álcool etílico (mL)	Concentração final (μM)
0,50	9,50	100
2,50	7,50	500
5,00	5,00	1.000
7,50	2,50	1.500
10,00	0,00	2.000

Fonte: Rufino *et al.*, 2007, com adaptações.

- **Cálculos**

- Inserir as concentrações de Trolox (μM) no eixo X e os valores referentes às respectivas absorbâncias no eixo Y, por fim, calcular a equação da reta. Diante do resultado obtido na equação da reta calcula-se a absorbância referente a 1.000 μM de Trolox de acordo com a Equação 1.

- Equação da reta – Absorbância correspondente a 1.000 μM de Trolox

$$y = -ax + b \quad (1)$$

Onde:

x = 1.000 μM do Trolox;

y = absorbância correspondente a 1.000 μM de Trolox.

- Equação para cálculo das diluições do extrato (mg/L) equivalente a 1.000 μM de Trolox

$$y = -ax + b \quad (2)$$

Onde:

y = Absorbância correspondente a 1.000 μM de Trolox (Equação 4);

x = Diluição da amostra (mg/L) equivalente a 1.000 μM de Trolox.

- Cálculo final expresso em (μM Trolox / g)

$$X(g) = x / 1.000 \quad (3)$$

$$Z = 1.000 / X(g).1 \quad (4)$$

- **Análise dos resultados**

A partir dos resultados obtidos no espectrofotômetro das diferentes diluições dos extratos das amostras, inserir a absorbância no eixo Y e a diluição (mg/L) no eixo X para determinar a equação da reta. Para obter o resultado da ATT (atividade antioxidante total) deve-se fazer uma substituição da absorbância equivalente a 1.000 μM do padrão Trolox (Eq. 1). A diluição (mg/L) da amostra corresponde ao valor obtido para o termo x, que equivale a 1.000 μM de Trolox (Eq. 2). Dividir por 1.000 o resultado obtido (x) na equação (2) para ter o valor em g. Para se obter o resultado que consta na equação 6, é necessário dividir 1.000 (μM) pelo valor de X(g), depois, multiplicar por 1 (g) e, com isso, encontrar o valor final (Z) que é expresso em μM Trolox / g de amostra.

PRÁTICA 3: CAPTURA DO RADICAL LIVRE DPPH•

- **Objetivo**

Avaliar a atividade antioxidante do extrato pelo mecanismo de captura do radical livre DPPH•.

- **Equipamentos e vidrarias**

- Agitador de tubos de ensaio
- Balança analítica
- Cronômetro digital
- Cubetas de quartzo (4 x 1 cm)

- Espectrofotômetro UV-Vis
- Pipeta automática (10 – 1000 µL)
- Balão volumétrico 10 mL e 250 mL
- Proveta 50 mL
- Tubos de ensaio com tampa rosqueada (8 mL)
- Béquer 50 mL e 100 mL

- **Reagentes**

- Álcool etílico P. A.
- Água destilada
- DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) (PM = 394,3)

- **Soluções e preparo**

- Solução de DPPH: Em um balão volumétrico de 250 mL, dissolver 5,90 mg de DPPH em álcool etílico, após a dissolução completar o volume do balão com o álcool etílico P. A., homogeneizar e transferir para um frasco de vidro âmbar, devidamente identificado. Importante: Preparar a quantidade suficiente para usar apenas no dia da análise.
- Solução padrão de Trolox 2 mM: Em um balão volumétrico com álcool etílico, dissolver 25 mg de Trolox e completar o volume para 50 mL, homogeneizar e transferir para um frasco de vidro âmbar devidamente identificado. Preparar e usar apenas no dia do experimento.

- **Procedimentos**

1. Preparar os tubos de ensaio, em triplicata;
2. Fazer a leitura da solução de DPPH, que deve ter absorvância entre 0,6 – 0,7;
3. Pipetar uma alíquota de 20 µL do extrato e transferir para os tubos de ensaio;
4. Adicionar 280 µL de etanol e 2700 µL da DPPH no tubo de ensaio;
5. Incubar em temperatura ambiente (25 °C) por 30 min.
6. Fazer a leitura da absorvância a 517 nm em espectrofotômetro, utilizando cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico. Utilizar o álcool etílico PA para zerar o equipamento;
7. Fazer uma curva padrão de Trolox nas mesmas condições das amostras nas concentrações de 100 a 2000 µmol/L. Ou fazer uma curva com diferentes concentrações da solução de DPPH.
8. Os resultados são expressos em mmol de Trolox por g de extrato ou % (percentual) de inibição ou EC₅₀, conforme detalhado abaixo.

A metodologia descrita está de acordo com o preconizado por Brand-Williams; Cuvelier; Berset (1995) e está apresentada na Figura 10.

Figura 10 – Determinação da capacidade antioxidante por captura do radical DPPH•.



Fonte: Próprios autores (2023), adaptado de Brand-Williams; Cuvelier; Berset (1995).

- **Para resultados expressos em EC₅₀**

- Curva padrão do DPPH

- » Preparar soluções de DPPH em diferentes concentrações (10 µM a 60 µM) em balões volumétricos de 10 mL, conforme a Tabela 2.

Tabela 2 – Preparo das soluções para curva do DPPH.

Solução de DPPH (mL)	Álcool Etílico (mL)	Concentração final de DPPH (µM)
0	10,00	0
1,7	8,30	10
3,3	6,70	20
5,0	5,00	30
6,7	3,30	40
8,3	1,70	50
10	0,00	60

Fonte: Rufino *et al.*, 2007, com adaptações.

- » Após obter os resultados, inserir as concentrações de DPPH no eixo X e os valores referentes à absorbância no eixo Y, por fim calcular a equação da reta.

• Cálculos

- Cálculo do EC₅₀

$$y = -ax + b \quad (5)$$

Onde: **y** = Absorbância inicial do controle / 2 (item “determinação da atividade antioxidante total”); **x** = EC₅₀ (mg/L).

- Equação – EC₅₀ expresso em g amostra / g DPPH

$$g\text{Amostra}/g\text{DPPH} = (EC_{50}(\text{mg/L})/1.000 \cdot 1)/g \text{ DPPH} \quad (6)$$

• Para resultados expressos em % de inibição

- A solução de DPPH em etanol foi utilizada como controle. Os resultados são expressos por meio da porcentagem de inibição (%I), calculado pela equação 7:

$$\%I = \frac{A_c - A_a}{A_c} \times 100 \quad (7)$$

Onde: **A_c** = Absorbância controle e **A_a** = Absorbância da amostra.

- **Para resultados expressos em Equivalente Trolox**
 - Curva padrão do Trolox
 - » Preparar soluções de Trolox em diferentes concentrações (100 μM a 2000 μM) em balões volumétricos de 10mL, conforme Tabela 1.

PRÁTICA 4: MÉTODO DE REDUÇÃO DO FERRO (FRAP)

- **Objetivo**

Determinar a capacidade antioxidante através da redução do ferro em fluidos biológicos e soluções aquosas de compostos puros.

- **Materiais, equipamentos e reagentes**

- Agitador de tubos de ensaio
- Balança analítica
- Balão volumétrico de 10 mL, 50 mL e 1.000 mL
- Banho-maria
- Cronômetro digital
- Cubetas de vidro (4 x 1 cm)
- Espectrofotômetro
- Pipeta automática (10 μL – 1.000 μL)

- Proveta de 50 mL
- Tubos de ensaio com tampa rosqueada (8 mL)
- Acetato de sódio trihidratado (PM = 136,08)
- Ácido clorídrico PA (PM = 36,5; d = 1,19)
- Ácido acético glacial PA
- Água destilada
- Álcool etílico P. A.
- Cloreto férrico hexahidratado (PM = 270,3)
- Sulfato ferroso heptahidratado (PM = 278,02)
- TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) (PM = 312,34)

• Soluções e preparo

- Solução de HCl 40 mM: Adicionar 3,34 mL de HCl concentrado em um balão volumétrico de 1000 mL, completar o volume do balão com água destilada, homogeneizar e transferir para um frasco de vidro devidamente identificado. Armazenar em temperatura ambiente (25 °C) por tempo indeterminado.
- Solução de TPTZ 10 mM: Em um balão volumétrico de 1000 mL, dissolver 3,12 g de TPTZ, aproximadamente, 5 mL de HCl 40 mM e, após dissolvido, completar o volume do balão com HCl 40 mM, homogeneizar e transferir para um frasco de vidro âmbar devidamente

identificado. Armazenar sob refrigeração (5 °C) por até 1 mês.

- Solução de Cloreto Férrico 20 mM: Em um balão volumétrico de 1000 mL, dissolver 5,4 g de cloreto férrico em água destilada e, após dissolvido, completar o volume do balão com água destilada, homogeneizar e transferir para um frasco de vidro âmbar devidamente identificado. Armazenar sob refrigeração (5 °C) por até 1 mês.
- Tampão Acetato 0,3 M, pH 3,6: Em um balão volumétrico de 1000 mL, dissolver 3,1 g de acetato de sódio em 16 mL de ácido acético glacial e, após dissolvido, completar o volume do balão com água destilada, homogeneizar e transferir para um frasco de vidro âmbar devidamente identificado. Armazenar em temperatura ambiente (25 °C) por tempo indeterminado.
- Solução do Reagente FRAP: Misturar 25 mL de tampão acetato 0,3 M, com 2,5 mL de uma solução de TPTZ 10 mM e 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mM. Utilizar imediatamente após o preparo.
- Solução Padrão de Sulfato Ferroso 2 mM: Em um balão volumétrico de 50 mL, dissolver 27,8 mg de sulfato ferroso em água destilada e, após dissolvido, completar o volume do balão com água destilada, homogeneizar e transferir para um frasco de vidro âmbar devidamente identificado. Preparar e usar apenas no dia do experimento.

- **Procedimentos**

1. Preparar os tubos de ensaio, em triplicata;
2. Pipetar uma alíquota de 90 μL de amostra, acrescentar 270 μL de água destilada e, em seguida, misturar com 2,7 mL do reagente FRAP;
3. Homogeneizar em agitador de tubos e manter em banho-maria a 37 °C por 30 min;
4. Realizar a leitura em um espectrofotômetro a 595 nm após este tempo;
5. Utilizar o reagente FRAP como branco para calibrar o aparelho.

A metodologia para determinação da atividade antioxidante por FRAP está de acordo com o descrito por Rufino et al. (2006) e está esquematizada na Figura 11.

Figura 11 – Determinação da capacidade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP).



Fonte: Próprios autores (2023), adaptado de Rufino et al. (2006).

- **Resultados expressos em Equivalente Sulfato Ferroso**

- Curva-Padrão do Sulfato Ferroso

- » Em balões volumétricos de 10 mL preparar soluções variando a concentração de 500 μM a 2.000 μM , a partir da solução padrão de sulfato ferroso (2.000 μM), conforme a Tabela 4.

Tabela 4 – Preparo das soluções para curva-padrão.

Solução padrão de sulfato ferroso (mL)	Água destilada (mL)	Concentração final (μM)
2,50	7,50	500
5,00	5,00	1.000
7,50	2,50	1.500
10,00	0,00	2.000

Fonte: Rufino *et al.*, 2007, com adaptações.

- **Cálculos**

- » Inserir em planilhas as concentrações de sulfato ferroso (μM) no eixo X e os valores referentes às respectivas absorbâncias no eixo Y, por fim calcular a equação da reta. Diante do resultado obtido na equação da reta calcula-se a absorbância referente a 1.000 μM de sulfato ferroso de acordo com a Equação (8).

- Equação da reta

$$y = ax + b \quad (8)$$

Onde: $x = 1.000 \mu\text{M}$ de sulfato ferroso; y = absorbância correspondente a $1.000 \mu\text{M}$ de sulfato ferroso.

- Equação para cálculo das diluições do extrato (mg/L) equivalente a $1.000 \mu\text{M}$ de sulfato ferroso

$$y = ax + b \quad (9)$$

Onde: y = Absorbância correspondente a $1.000 \mu\text{M}$ de sulfato ferroso; x = Diluição da amostra (mg/L) equivalente a $1.000 \mu\text{M}$ de sulfato ferroso

- Cálculo final expresso em (μM sulfato ferroso / g)

$$X(g) = x / 1.000 \quad (10)$$

$$Z = 1.000 / X(g).1 \quad (11)$$

• Análise dos resultados

A partir dos resultados obtidos no espectrofotômetro das diferentes diluições dos extratos das amostras, inserir a absorbância no eixo Y e a diluição (mg/L) no eixo X para determinar a equação da reta. Para obter o resultado da ATT deve-se fazer uma substituição da absorbância equivalente a $1.000 \mu\text{M}$ do sulfato ferroso (Eq. 8). A diluição (mg/L) da amostra corresponde ao valor

obtido para o termo x , que equivale a $1.000 \mu\text{M}$ de sulfato ferroso (Eq. 9). Dividir por 1.000 o resultado obtido (x) na equação (9) para ter o valor em g. Para se obter o resultado, que consta na equação 10, é necessário dividir $1.000 (\mu\text{M})$ pelo valor de $X(\text{g})$, depois, multiplicar por 1 (g) e, com isso, encontrar o valor final (Z) que é expresso em μM sulfato ferroso / g de amostra.

PRÁTICA 5: CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DO RADICAL DE OXIGÊNIO (ORAC)

• Objetivo

Avaliar a capacidade antioxidante de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica, sintéticos ou naturais.

• Materiais, equipamentos e reagentes

- Balança analítica
- Cubetas de quartzo
- Espectrofluorímetro ($\lambda_{\text{excitação}} = 485 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 515 \text{ nm}$)
- Tubos de ensaio
- Balões volumétricos
- AAPH (dihidrocloreto de 2,2' – azobis [2-metilpropionamida])
- Fluoresceína (3', 6'- dihidroxipiro[isobenzofurano -1 [3H], 9'[9H]-xanteno]-3-ona

- Solução tampão fosfato de potássio (75 mmol. L⁻¹ em pH = 7,075)
- Trolox

- **Soluções e preparo**

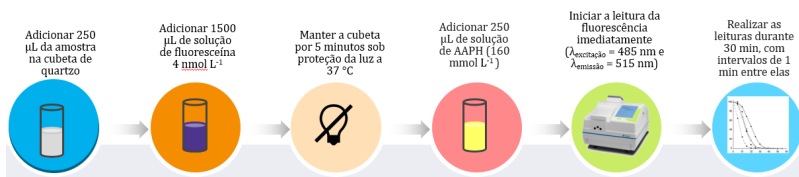
- Solução estoque de fluoresceína: Adicionar 19,8 mg de fluoresceína em um becker contendo 50 mL de solução tampão fosfato de potássio, homogeneizar e transferir para um frasco de vidro devidamente identificado. O armazenamento deve ser feito sob congelamento (-20 °C).
- Solução de trabalho de fluoresceína: Diluir 25 µL da solução estoque em 25 mL de solução tampão fosfato de potássio, em seguida pegar 100 µL desta diluição e misturar, novamente, em 25 mL de solução tampão, resultando em uma concentração final de 4 nmol. L⁻¹. Transferir para um frasco de vidro devidamente identificado.
- Solução padrão de Trolox-estoque: Em um balão volumétrico de 50 mL, dissolver 11 mg de Trolox em 50 mL de solução tampão fosfato, sendo a concentração final igual a 852 µmol. L⁻¹. Transferir para um frasco de vidro âmbar devidamente identificado. Armazenar ao abrigo da luz por até 4 (quatro) meses e pode ser submetida à temperatura de -80 °C.

• Procedimentos

1. Adicionar 250 μL da amostra na cubeta de quartzo;
2. Adicionar 1500 μL de solução de fluoresceína 4 nmol L^{-1} ;
3. Manter a cubeta por 5 minutos sob proteção da luz a 37 °C;
4. Adicionar 250 μL de solução de AAPH (160 mmol L^{-1});
5. Iniciar a leitura da fluorescência imediatamente ($\lambda_{\text{excitação}} = 485 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 515 \text{ nm}$);
6. Usar o tampão fosfato de potássio como branco e a solução de Trolox para a curva de calibração;
7. Realizar as leituras durante 30 min, com intervalos de 1 min entre elas.

A determinação da atividade antioxidante pelo método ORAC foi descrita por Boroski *et al.*, (2015) e Sacramento *et al.*, (2023) e está apresentada na Figura 12. O mesmo procedimento é realizado para as amostras do extrato, tampão fosfato de potássio para o branco e para solução de Trolox para curva de calibração.

Figura 12 – Determinação da Atividade Antioxidante Total (AAT) por ORAC.



Fonte: Próprios autores (2023), adaptado de Boroski *et al.*, 2015 e Sacramento *et al.*, 2023.

- **Resultados expressos em Equivalente Trolox**

Curva Padrão do Trolox (2.000 μM)

- » Preparar soluções variando a concentração do padrão Trolox de 0 μM a 100 μM , que deve ser diluído em solução tampão fosfato de potássio a partir da solução padrão de Trolox (2.000 μM), conforme Tabela 5.

Tabela 5 – Valores de volumes de solução estoque Trolox e solução tampão fosfato para obtenção das concentrações (0 até 100 $\mu\text{mol. L}^{-1}$).

Concentração final solução de trabalho Trolox ($\mu\text{mol. L}^{-1}$)	Volume da solução estoque Trolox (μL)	Volume da solução tampão fosfato (μL)
0	0,00	250,00
25	7,33	242,67
50	14,67	235,33
75	22,01	227,99
100	29,34	220,66

Fonte: Boroski *et al.*, 2015, com adaptações

- **Cálculos**

- Equação 12 – Soluções de trabalho do padrão Trolox

$$C_{\text{inicial}} \times V_{\text{inicial}} = C_{\text{final}} \times V_{\text{final}} \quad (12)$$

Onde: **C** = Concentração; **V** = Volume

- Equação 13 – Área sob a curva (ASC)

$$ASC = (1 + f_1/f_0 + f_2/f_0 + \dots + f_{n+1}/f_0) \quad (13)$$

Onde: **f₀** = intensidade de fluorescência inicial; **f_n** = intensidade de fluorescência no tempo n.

Observação

Esse cálculo deve ser realizado para todas as (triplicatas).

- Equação 14 – Área líquida

$$\text{Área Líquida} = ASC - ASC_{\text{branco}} \quad (14)$$

• Análise dos resultados

Inserir os resultados obtidos em um gráfico, a intensidade da fluorescência no eixo X e o tempo em minutos no eixo Y. Para se obter a área líquida subtrai da amostra, ou da solução padrão, o valor de ASC do branco. A capacidade antioxidante é determinada através da equação da reta de uma curva de calibração feita com solução Trolox descrita anteriormente, devendo ser expressa em Trolox equivalente (TE). Portanto, o valor Y na equação da reta representa a área líquida da amostra ou do padrão, ao passo que X representa o valor de ORAC, o qual pode ser expresso em $\mu\text{mol TE L}^{-1}$ para amostras líquidas e em $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ para amostras sólidas de extrato, ou em $\mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$ de amostra em base úmida ou seca.

Teste seu conhecimento!



1. Quais as diferenças entre os métodos estudados?
2. Quais vegetais apresentam maior atividade antioxidante pelo método de captura do radical livre DPPH do que por ABTS?
3. Qual a principal dificuldade de análise nestes métodos?

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste capítulo, foram discutidos os principais métodos para determinação de compostos antioxidantes em matrizes vegetais, detalhando os procedimentos de análise de acordo com os autores referência. Os meios de atuação e conceitos importantes dos diversos métodos empregados foram abordados no decorrer do texto.

REFERÊNCIAS

- BOROSKI, M; VISENTAINER, J. V; COTTICA, S. M; MORAIS, D. R. Antioxidantes: princípios e métodos analíticos, 1ª ed. Curitiba: Editora Appris, 2015.
- BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E., BERSET, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**, v. 28(1), p. 25-30, 1995.

CORDEIRO, A. M. T. DE M. Desenvolvimento de Bioaditivos Antioxidantes para Otimização da Estabilidade Oxidativa de Óleos Comestíveis. João Pessoa, PB: Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal da Paraíba, 2013.

GRANDINI, A. **Curva de taratura DPPH**, 2011.

LEFSIH, K., DELATTRE, C., PIERRE, G., MICHAUD, P., AMINABHAVI, T. M., DAHMOUNE, F., & MADANI, K. Extraction, characterization and gelling behavior enhancement of pectins from the cladodes of *Opuntia ficus indica*. **International Journal of Biological Macromolecules**, 82, 645-652, 2016.

RUFINO, M. D. S; ALVES, R. E., BRITO, E. S; MORAIS, S. M; SAMPAIO, C. G; JIMENEZ, P. J; SAURA- CALIXTO, F. D. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS**. Embrapa. 128, jul, 2007. (Comunicado Técnico).

RUFINO, M. S. M; ALVES, R. E; BRITO, E. S; MORAIS, S. M; SAMPAIO, C. G; JIMENEZ, J. P; CALIXTO, F. D. S. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH**. Embrapa. 127. 2007. (Comunicado Técnico).

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

RUFINO, M. S. M; ALVES, R. E; BRITO, E. S; MORAIS, S. M; SAMPAIO, C. G; JIMENEZ, J. P; CALIXTO, F. D. S. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas no Sistema β -caroteno/Ácido Linoléico**. Embrapa. 126. 2006. (Comunicado Técnico).

SACRAMENTO, V. M; VELOSO, P. H. F; ROYO, V. A, *et al.* **Métodos para determinação de capacidade antioxidante**. Ponta Grossa: Editora Atena, 2023.

ZAPATA, C; ZAPATA, P. Método ORAC y su aplicación en la determinación de la capacidad antioxidante de bebidas fermentadas. **Revista de La Facultad de Agronomía**. v. 121, n. Esp. 2, p.1-15, 2022.

ZHONG, X. K., JIN, X., LAI, F. Y., LIN, Q. S., & JIANG, J. G. (2010). Chemical analysis and antioxidant activities in vitro of polysaccharide extracted from *Opuntia ficus indica* Mill. cultivated in China. **Carbohydrate Polymers**, 82(3), 722-727.

CAPÍTULO 7

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS VEGETAIS

Camila Sampaio Mangolim

Jossana Pereira de Sousa Guedes

Desde os tempos remotos, são muitas as plantas conhecidas por apresentar potencial terapêutico quanto à atividade antimicrobiana. Não só no tratamento de doenças como também como aditivo alimentar, o uso de substâncias naturais, extraídas de plantas, com atividade antimicrobiana é altamente desejável e tem sido alvo de muitas pesquisas científicas. Isto porque a substituição de aditivos naturais pelos sintéticos na indústria de alimentos (devido à elevada toxicidade e à problemas de alergia), e a elevada resistência de microrganismos patogênicos a antibióticos na área da saúde têm sido preocupações frequentes de ambos os setores.

Das inúmeras espécies de plantas que são conhecidas, calcula-se que uma parcela muito pequena já foi completamente estudada e, se for considerada a quantidade de metabólitos secundários (fitoquímicos) diferentes encontrados em cada planta, percebe-se que a quantidade de compostos com propriedades interessantes a serem descobertas ainda é muito vasta.

As substâncias classificadas como metabólitos secundários de plantas, como taninos, flavonoides e óleos essenciais, formam um grupo bastante heterogêneo de moléculas, e po-

dem, entre outras funções, possuir importância contra o ataque de microrganismos ou herbívoros nos vegetais. Sendo assim, estas mesmas moléculas podem apresentar potencial para uso como agente antimicrobiano para alimentos ou no tratamento de infecções.

Dentre as vantagens do uso de antimicrobianos obtidos a partir de fontes vegetais, podem ser citadas o baixo custo de produção, o não prejuízo ao meio ambiente e o menor risco à saúde quando comparados à alguns aditivos sintéticos. Entretanto, os principais desafios das pesquisas estão no fato de que as plantas são compostas por substâncias variadas, de ampla diversidade estrutural e inúmeros usos, em concentrações desconhecidas e que podem ter efeito isolado ou ainda agir em sinergia/antagonismo com outras substâncias presentes, por exemplo, na matriz alimentar, o que evidencia a importância de se avaliar diferentes métodos de preparo de extratos vegetais e também diferentes técnicas de detecção da atividade antimicrobiana.

Dentre os métodos existentes para avaliar a atividade antimicrobiana de substâncias novas, o instituto norte-americano CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) indica análises de concentrações inibitórias mínimas (CIM) e de diâmetros dos halos de inibição, os quais são publicados em manuais pelo instituto.

CONCEITOS BÁSICOS

Extratos vegetais: Obtenção

Por definição, os extratos vegetais são preparações na forma líquida ou em pó, obtidos a partir de diferentes partes das matérias-primas vegetais (raiz, caule, folhas, frutos e/ou sementes) secas e trituradas. Entre outros objetivos, a obtenção do extrato visa a concentração de substâncias, com foco na separação dos compostos ativos efetivamente envolvidos nos efeitos esperados (terapêuticos ou funcionais), eliminando ou reduzindo a concentração de compostos indesejáveis.

O processo de obtenção dos extratos é constituído por duas etapas, sendo a primeira a separação dos metabólitos secundários do vegetal com o uso de um solvente e a segunda a eliminação do solvente, resultando em um extrato concentrado. A escolha do solvente é baseada na solubilidade dos compostos ativos presentes, ou seja, na composição química da planta. Na prática, vários solventes são comumente utilizados, especialmente água, etanol, metanol, clorofórmio, acetato de etila, éter e acetona, os quais também podem ser utilizados na forma de mistura.

Antes da extração, o vegetal pode ser seco e/ou triturado, a fim de reduzir a umidade e o volume, facilitando as etapas subsequentes. A extração de fato, que ocorre pela mistura do vegetal com os solventes, pode ser realizada por diferentes métodos, mas os principais são a maceração, a percolação e a turbólise (Figura 1). Os dois primeiros são técnicas nas quais o solvente fica em contato estático ou dinâmico com o vegetal,

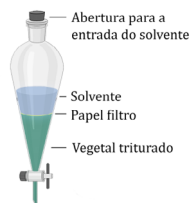
enquanto o último utiliza um equipamento, tipo liquidificador, que pulveriza o vegetal e lava os conteúdos celulares, ou seja, é um processo combinado de agitação com redução de tamanho de partícula. Além destes métodos, são utilizados métodos de extração por infusão, Soxhlet, ultrassom, decocção, fluido supercrítico, entre outros.

Figura 1 – Representação das técnicas de extração por maceração (A), percolação (B) e turbólise (C).

(A)



(B)



(C)



Fonte: Criado em BioRender.com (2023).

Independente do método de extração e do solvente, o processo segue com a matriz vegetal permanecendo em contato com o solvente por tempos diversos (que pode variar desde 30 minutos até vários dias de extração). Após, o que se obtém é o extrato vegetal líquido, que pode ser o objetivo final do processo. Caso não seja, o extrato pode ser filtrado e evaporado para a eliminação de partículas e do solvente, e pode ser seco em estufa, por atomização ou liofilização, obtendo-se então o extrato na forma seca. Para uso nos testes de atividade antimicrobiana, os extratos devem ser solubilizados.

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS VEGETAIS: PRINCIPAIS MÉTODOS

Existem vários métodos para avaliar a atividade antimicrobiana de extratos vegetais, dentre os quais podem ser citados os métodos de diluição, que pode ser na forma de macrodiluição ou microdiluição e de difusão em ágar. Independentemente do método, o objetivo é determinar a menor quantidade do extrato capaz de inibir o crescimento da bactéria ou fungo de interesse, sendo esse valor conhecido como Concentração Inibitória Mínima (CIM) ou Concentração Mínima Inibitória (CMI). Após a determinação da CIM, é possível realizar também a determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) (ou fungicida), que corresponde à concentração mínima do extrato capaz de eliminar completamente a bactéria/fungo de interesse.

Todos os métodos de determinação de atividade antimicrobiana, de diluição ou de difusão, necessitam de padronização

rigorosa para sua execução. Aspectos importantes a serem considerados incluem o meio de cultura e a quantidade/concentração do inóculo. Os meios de cultura mais citados para os testes são o Muller-Hinton ou Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) para bactérias e o Sabouraud dextrose ou batata dextrose para fungos. Nos testes de difusão, também a espessura (4 mm) e uniformidade do ágar são importantes para uma boa resolução. Em termos de concentração microbiana, a quantidade inoculada deve ser estabelecida e padronizada para cada método desenvolvido.

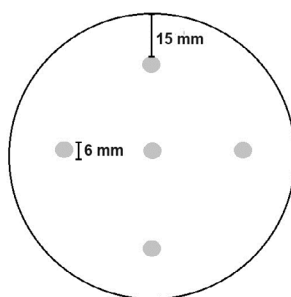
Métodos de difusão

Os testes de difusão em ágar são métodos físicos realizados em placas de Petri, nas quais a solução do extrato é administrada (por meio de discos de papel, cilindros de aço inox ou furos no gel) na camada de ágar solidificado com o microrganismo inoculado. Neste teste, a atividade antimicrobiana do extrato é relacionada com o tamanho da zona (halo) de inibição de crescimento do microrganismo ao redor do local dos discos, cilindros ou furos. Para incubação das placas, as condições utilizadas costumam ser de 35 a 37 °C para bactérias (por 24 a 48h) e 25 a 27 °C para fungos (por 48 a 72h). As cargas microbianas comumente utilizadas nos testes de difusão são 10^8 UFC (Unidade Formadora de colônia)/mL para bactérias, 10^6 UFC/mL para leveduras e 10^4 para esporos/mL.

Nos testes de difusão em disco (Figura 2), discos de papel filtro de 6 mm de diâmetro são adicionados ao meio de cultura solidificado já inoculado em distâncias pré-definidas (a distância até a lateral da placa deve ser maior que 15 mm e os halos de

inibição não devem se sobrepor). Posteriormente, 10 µL da solução do extrato são aplicados aos discos, em diferentes concentrações de extrato. Nos testes de difusão utilizando cilindros, cilindros de aço inoxidável são adicionados ao meio de cultura solidificado já inoculado, para posterior adição da solução do extrato. Nos testes de furos no gel (perfuração em ágar) o meio de cultura é removido utilizando cilindros de 6-8 mm de diâmetro para a formação dos furos, nos quais aplica-se a solução de extrato.

Figura 2 – Exemplo de distribuição de discos de 6 mm em placa de Petri (diâmetro = 10 cm) para teste de difusão.



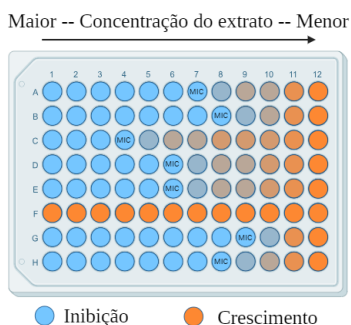
Fonte: Próprios autores (2023).

O resultado deste teste é comparativo, e usa-se como controle positivo um antimicrobiano conhecido e como controle negativo o solvente do extrato. Os halos de inibição são medidos a partir da circunferência do disco/cilindro/furo até a margem onde existe crescimento microbiano.

Métodos de diluição em caldo

Os métodos de diluição em caldo consistem na adição de diferentes concentrações da solução do extrato em um meio líquido, no qual o microrganismo de interesse é adicionado e o resultado é determinado utilizando leitor de microplaca ou leitura visual. Desta forma, este método leva em consideração a proporção de crescimento do microrganismo (turbidez) e a concentração do extrato. Como controle positivo, utiliza-se o caldo adicionado de um antimicrobiano conhecido (com a suspensão microbiana padronizada) e, como controle negativo, utiliza-se o solvente do extrato com a suspensão microbiana.

Os métodos de diluição em caldo podem ser divididos em métodos de macrodiluição e de microdiluição. A macrodiluição utiliza tubos de ensaio com volumes de meio de cultura de 1 a 10 mL. Já a microdiluição utiliza microplacas de 96 poços (Figura 3), e por isso são utilizados menores volumes (até 200 μ L), sendo este último mais vantajoso por requerer menor quantidade de reagentes e de espaço, gerando menor quantidade de resíduos. Outras vantagens da microdiluição incluem sensibilidade, baixo custo, possibilidade de uso de sistemas automatizados de leitura e reprodutibilidade. Devido a esses benefícios, a microdiluição é uma técnica bastante difundida para determinação da CIM de extratos vegetais e outros compostos e drogas.

Figura 3 – Placa de 96 poços utilizada no método de microdiluição em caldo.

Created in BioRender.com bio

Fonte: Criado em BioRender.com (2023).

PRÁTICA 1: OBTENÇÃO DE EXTRATOS A PARTIR DE CASCA DE ALHO

• Objetivo

Testar diferentes metodologias e solventes para obter extratos a partir de casca de alho com potencial atividade antimicrobiana.

• Materiais, equipamentos e reagentes

- 600 g de casca de alho;
- Solução de água clorada (200 ppm);
- 2 L de água destilada;
- 2 L de solução hidroalcoólica (50%);
- 2 L de solução hidroalcoólica (70%);

- Polisorbato 80 (tween 80) a 1%;
- Dimetilsulfóxido (DMSO);
- Etanol P.A.;
- Erlenmeyer e funil para filtração;
- Peneira de cozinha comum;
- Bandejas para secagem;
- Béquer de 2 L;
- Tubos de ensaio;
- Pano ou gaze para filtração;
- Filtros de papel;
- Balança;
- Liquidificador;
- Estufa com circulação de ar;
- Evaporador rotativo;
- Freezer;
- Liofilizador;
- Vórtex;
- Banho ultrassônico.

• Procedimentos

1. Pesar 600 g de casca de alho em balança.
2. Lavar em água corrente com auxílio da peneira e deixar em imersão por 30 min em solução de água clorada a 200 ppm.

3. Dispor as cascas úmidas espalhadas em bandejas e secar em estufa de circulação de ar com temperatura de 35 – 40 °C por 48h ou até completa secagem. Revirar as cascas a cada 12h.
4. Após secagem, triturar as cascas secas em liquidificador para facilitar a extração.
5. Separar porções de 100 g de casca para uso com os diferentes solventes e métodos de extração. Para todos os solventes, utilizar a proporção 1:10 (casca:solvente), ou seja, adicionar 1000 mL de solvente (água destilada ou solução hidroalcoólica 50 ou 70%) em 100 g de casca.
6. **EXTRAÇÃO POR TURBÓLISE:** Incorporar 100 g de casca com 1000 mL de solvente em liquidificador por 1 minuto.
7. **EXTRAÇÃO POR IMERSÃO:** Em um béquer, deixar 100 g da casca em contato com o solvente por 16h ao abrigo da luz.
8. Após o período de extração, filtrar os extratos em filtro de pano ou gaze e, posteriormente, em filtro de papel.
9. Para os extratos preparados com solução hidroalcoólica, concentrar em evaporador rotativo (60 °C) para remoção do etanol.
10. Após todas essas etapas, os extratos já podem ser utilizados nos ensaios de atividade antimicrobiana. Entretanto, se houver disponibilidade de equipamento, é interessante uma maior concentração dos materiais.

Para tanto, deve-se congelar os extratos, liofilizar e armazenar na forma de pó até o ensaio de atividade antimicrobiana.

11. Para o ensaio da atividade antimicrobiana, solubilizar o extrato seco em tubos de ensaio como segue:

- » Diluir o extrato em uma solução com 90% de água destilada + 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), na concentração desejada.
- » Caso haja necessidade ou dificuldade de solubilização, diluir o extrato com 50% de etanol, 1% de tween 80 e 49% de água destilada, na concentração desejada.
- » Se ainda necessário, utilizar vortex e banho ultrassônico para melhor solubilização dos extratos.

Cálculos

Após o preparo dos extratos, pode-se medir o rendimento da extração, como também pode-se efetuar a determinação dos compostos biativos de interesse (como teor de compostos fenólicos, por exemplo).

Aqui, abordaremos apenas o rendimento da extração, que pode ser calculado pela Equação 1.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{P_{es}}{P_c} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Na qual P_{es} corresponde ao peso do extrato seco obtido (g) e P_c corresponde ao peso das cascas secas (g).

PRÁTICA 2: PREPARO E PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO DE CULTURAS MICROBIANAS

- **Objetivo**

Preparar uma suspensão bacteriana (inóculo) com concentração celular conhecida para utilização nos testes antimicrobianos de micro e macrodiluição em caldo.

- **Materiais, equipamentos e reagentes**

- Alça bacteriológica descartável ou alça de platina;
- Placas de Petri descartáveis ou de vidro;
- Micropipeta automática digital monocal de volume variável;
- Ponteiras para micropipetas de 1 mL e 0,1 mL;
- Rack para ponteiras;
- Tubos de ensaio;
- Rack estante para tubos de ensaio;
- Cubeta para Espectrofotômetro 1,0-1,5 ou 2-4 mL;
- Microtubo Tipo Eppendorf 2 mL;
- Rack estante de plástico para microtubo eppendorf;

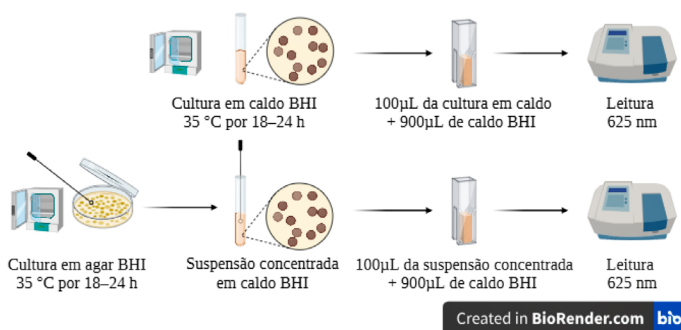
- Criotubo 2 mL;
- Agitador tipo vórtex;
- Estufa de cultura bacteriológica;
- Centrífuga refrigerada;
- Espectrofotômetro;
- Calculadora;
- Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI);
- Agar Infusão Cérebro Coração (BHI);
- Solução salina estéril (NaCl a 0,85% p/v);
- Álcool etílico hidratado 70° INPM.

• Procedimentos

1. Preparar uma cultura líquida de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 em 3,0 mL de Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) e incubar a 35 ± 1 °C por 18–24 h (*overnight*);
2. Outra possibilidade é de que a partir de uma cultura em meio sólido (agar; 35 ± 1 °C por 18–24 h) seja preparada uma suspensão concentrada em caldo BHI (3,0 mL) com o auxílio de uma alça bacteriológica descartável ou alça de platina (Figura 4);
3. Transferir 100 µL da cultura líquida ou desta suspensão concentrada obtida do agar para uma cubeta de 1,5 mL e adicionar 900 µL de caldo BHI;

4. Ler a densidade óptica (OD) desta suspensão em espectrofotômetro a 625 nm e anotar o resultado. Geralmente, a OD de 0,08-0,1 correspondente a uma concentração de aproximadamente $1-2 \times 10^8$ UFC/mL;

Figura 4 – Obtenção da suspensão concentrada de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 a partir de uma cultura em meio líquido ou sólido.



Fonte: Criado em BioRender.com (2023).

• Dessa forma

100 µL — OD lida

X µL — 0,1

Exemplo:

OD lida = 0,111

100 — 0,111

X µL — 0,1

$0,111 \times X = 100 \times 0,1$

$X = (100 \times 0,1) \div 0,111$

$X = 90,1 \mu\text{L}$

- **Portanto**

- » Se, a OD de 100 μL da suspensão concentrada correspondeu a 0,111, quantos μL devo utilizar desta suspensão concentrada para obter um inóculo de $1-2 \times 10^8$ UFC/mL que corresponde a uma OD de 0,08-0,1?

- **Então**

- » Para preparar uma suspensão de *L. monocytogenes* com concentração de $1-2 \times 10^8$ UFC/mL e volume final de 1 mL deve-se utilizar 90,1 μL da suspensão concentrada (100 μL da cultura + 900 μL de solução salina) e completar o volume para 1000 μL com caldo BHI (909,9 μL). Caso seja necessário preparar uma quantidade maior, multiplicar as quantidades de suspensão concentrada e caldo BHI por 2, 3 ou quantas vezes foram necessárias para alcançar o volume suficiente para o experimento;

- » Exemplo: para preparar 5 mL

$$5 \times 90,1 \mu\text{L} = 450,5 \mu\text{L}$$

$$5 \times 909,9 \mu\text{L} = 4549,5 \mu\text{L}$$

$$\text{Volume total} = 450,5 \mu\text{L} + 4549,5 \mu\text{L} = 5000 \mu\text{L} \text{ ou } 5 \text{ mL};$$

- » Caso a OD lida seja inferior a 0,08-0,1, será necessário um volume maior que 100 μL da suspensão concentrada para alcançar a contagem de $1-2 \times 10^8$ UFC/mL;

» Exemplo: OD lida = 0,058

$$100 \mu\text{L} \text{ --- } 0,058$$

$$X \mu\text{L} \text{ --- } 0,1$$

$$0,058 \times X = 100 \times 0,1$$

$$X = (100 \times 0,1) \div 0,058$$

$$X = 172,4 \mu\text{L}$$

• Então

- » Para preparar uma suspensão de *L. monocytogenes* com concentração de $1-2 \times 10^8$ UFC/mL e volume final de 1 mL deve-se utilizar 172,4 μL da suspensão concentrada (100 μL da cultura + 900 μL de solução salina) e completar o volume para 1000 μL com caldo BHI (827,6 μL).
- Para confirmar se a suspensão obtida (172,4 μL da suspensão concentrada + 827,6 μL de caldo BHI) possui ou não a concentração de $1-2 \times 10^8$ UFC/mL, deve-se diluir seriadamente até 10^{-6} e inocular 10 μL de cada diluição na superfície de agar BHI, utilizando a técnica da microgota e incubar em estufa bacteriológica a 35 ± 1 °C por 24 h. Após este período de incubação, fazer a contagem das colônias e a expressão do resultado em Unidades Formadoras de Colônia por mL (UFC/mL).
- Após a expressão do resultado, caso a OD de 0,1 corresponda a 10^6 UFC/mL ou 10^7 UFC/mL ou 10^9 UFC/mL

ou outra contagem, esta equivalência deve ser considerada todas as vezes que a suspensão for preparada;

- A partir desta suspensão de concentração conhecida pode-se preparar suspensões mais diluídas.

PRÁTICA 3: MICRODILUIÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

- **Objetivo**

Determinar a mais baixa concentração de um extrato vegetal capaz de inibir o crescimento microbiano visível e a mais baixa concentração de um extrato vegetal capaz de eliminar completamente o microrganismo.

- **Materiais, equipamentos e reagentes**

- Placas de Petri descartáveis ou de vidro;
- Micropipeta automática digital monocanal de volume variável;
- Micropipeta automática digital multicanal de volume variável;
- Ponteiras para micropipetas de 1 mL e 0,1 mL;
- Rack para ponteiras;
- Microtubo Tipo Eppendorf 2 mL;

- Rack estante de plástico para microtubo eppendorf;
- Agitador tipo vórtex;
- Estufa de cultura bacteriológica;
- Leitor de microplacas;
- Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI);
- Agar Infusão Cérebro Coração (BHI);
- Solução salina estéril (NaCl a 0,85% p/v);
- Álcool etílico hidratado 70° INPM.

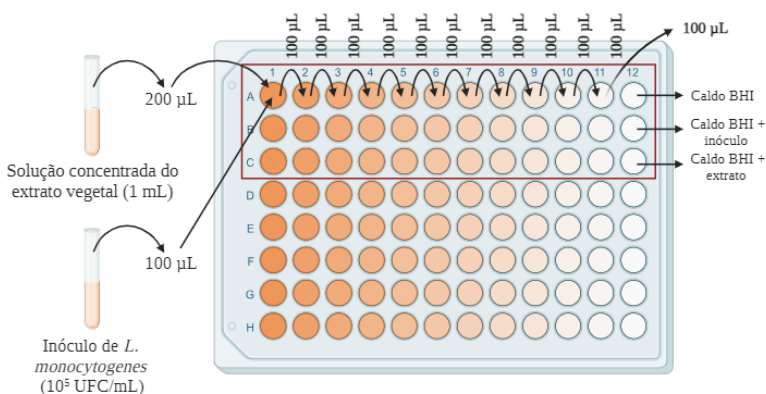
• Procedimentos

1. Preparar 1,0 mL da solução do extrato vegetal (em caldo BHI) com concentração quatro (04) vezes maior que a desejada;
2. A partir da solução preparada anteriormente distribuir 200 µL nos poços A, B e C da coluna 1 (total de 600 µL) de uma microplaca de 96 poços e nos poços A, B e C da coluna 2 a 11 colocar 100 µL de caldo BHI;
3. Com a pipeta no volume 100 µL, diluir a solução dos poços da coluna 1 até os poços da coluna 11 ou até a menor concentração que se deseja testar. Após esse procedimento a concentração inicial do extrato vegetal reduzirá pela metade em todos os poços;
4. Adicionar 100 µL do inóculo de *L. monocytogenes* (10⁵ UFC/mL; preparado de acordo com a PRÁTICA 2)

em todos os poços contendo o extrato vegetal. Após esse procedimento a concentração da substância antimicrobiana reduzirá pela metade em todos os poços;

- 5.** Preparar também na microplaca um poço controle positivo (caldo BHI + *L. monocytogenes*), um poço controle negativo (caldo BHI + extrato vegetal na concentração mais alta a ser testada) e um poço apenas com o caldo BHI (Figura 5);

Figura 5 – Microdiluição em caldo para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato vegetal contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644.



Created in **BioRender.com**

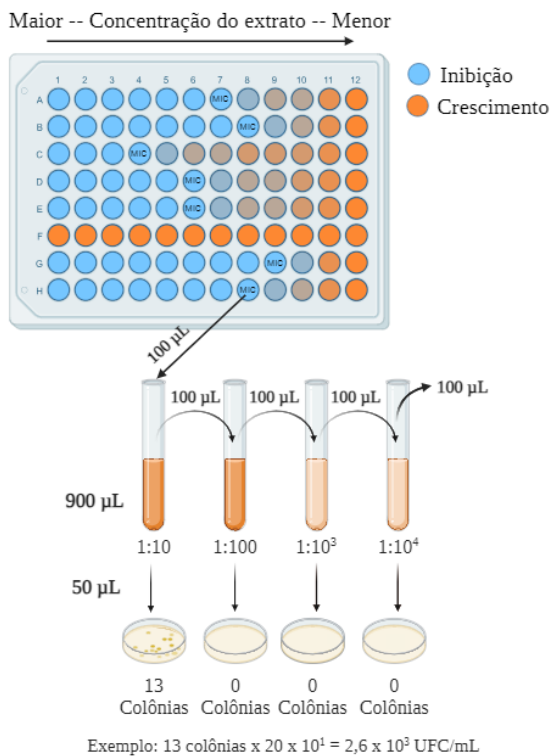
Fonte: Criado em BioRender.com (2023).

- 6.** Incubar a microplaca a 35 ± 1 °C por 24 h e, após este período de incubação, fazer a leitura do resultado em

leitor de microplaca ou visual. A mais baixa concentração da substância antimicrobiana capaz de inibir o crescimento bacteriano visível será considerada a Concentração Inibitória Mínima (CIM);

7. A partir dos poços da microplaca nos quais não houve crescimento bacteriano visível no teste da CIM diluir seriadamente (1:9, v/v) uma alíquota (100 μ L) em solução salina estéril (NaCl a 0,85% p/v) e inocular 50 μ L de cada diluição (10^{-1} a 10^{-4}) na superfície de placas contendo agar BHI;
8. Incubar a 35 ± 1 °C por 24 h e, após este período de incubação, fazer a contagem das colônias e a expressão do resultado em Unidades Formadoras de Colônia por mL (UFC/mL). A Concentração Bactericida Mínima (CBM) será considerada a menor concentração da substância antimicrobiana capaz de causar redução maior que 10^3 UFC/mL em comparação às contagens iniciais da cepa testada (Figura 6);

Figura 6 – Leitura do resultado da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato vegetal contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644.



Created in BioRender.com

Fonte: Criado em BioRender.com (2023).

No exemplo da Figura 6, a Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato vegetal contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 é o dobro da CIM.

PRÁTICA 4: DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA POR DIFUSÃO EM DISCO

- **Objetivo**

Avaliar a sensibilidade de microrganismos patogênicos e/ou deteriorantes a extrato vegetal.

- **Materiais, equipamentos e reagentes**

- Placas de Petri (10 cm de diâmetro) contendo 4 mm de ágar Mueller-Hinton;
- Discos de papel filtro de 6 mm de diâmetro estéreis;
- Inóculo de *L. monocytogenes* (10^5 UFC/mL; preparado de acordo com a PRÁTICA 2) ou outro microrganismo de interesse;
- Régua ou, preferencialmente, paquímetro;
- Extratos solubilizados;
- Solventes utilizados na solubilização dos extratos;
- Pipetas para volumes de 10 μ L estéreis;
- SWABs estéreis;
- Estufa bacteriológica a 35-37 °C.

- **Procedimentos**

- 1.** Inocular as placas com os microrganismos de interesse utilizando SWAB estéril para cobertura uniforme do meio de cultura com o inóculo. Preparar uma placa para cada microrganismo de interesse e para cada concentração de extrato. Preparar duas placas extras para cada microrganismo, sendo uma para o controle positivo e outra para o controle negativo.
 - » Exemplo: se o extrato vai ser testado contra 2 microrganismos em 3 concentrações diferentes, preparar 6 placas para os extratos (uma para cada concentração, frente a cada microrganismo), e 4 placas extras, duas para o controle positivo e duas para o controle negativo, sendo uma para cada microrganismo.
- 2.** Depositar, em cada placa, 5 discos de papel filtro equidistantes (Figura 2), com o auxílio da pinça estéril (espaçamento de, pelo menos, 30 mm entre cada disco e 15 mm entre o disco e a borda da placa).
 - » Importante: Veja que, nesta metodologia, estamos utilizando 5 discos por placa, ou seja, é uma análise em quintuplicata. Se for desejado, pode-se utilizar menos discos por placa ou placas menores, para fazer, por exemplo, em triplicata.
- 3.** Com o auxílio de uma pipeta estéril, adicionar em cada disco 10 μ L do extrato. Caso se julgue conveniente, o

extrato pode ser diluído e utilizado em várias diluições frente aos microrganismos de interesse.

4. **CONTROLE POSITIVO:** preparar uma solução de um antimicrobiano conhecido em concentração semelhante à do extrato e adicionar 10 µL nos discos.
5. **CONTROLE NEGATIVO:** adicionar 10 µL dos solventes dos extratos nos discos.
6. Incubar as placas a 35-37 °C em estufa bacteriológica por 24h.
7. Medir os halos de inibição com régua ou, preferencialmente, paquímetro.

• CÁLCULOS

A análise da atividade antimicrobiana por difusão em disco é considerada qualitativa. Entretanto, é possível calcular a porcentagem de inibição, comparando o extrato vegetal com o controle positivo utilizado, pela Equação 2.

$$Inibição(\%) = \frac{d_{extrato} - d_{controle\ negativo}}{d_{controle\ positivo} - d_{controle\ negativo}} \quad (\text{Equação 2})$$

Na qual **d** = diâmetro do halo de inibição.



Teste seu conhecimento!

8. A Prática 1 ilustrou o preparo de extrato vegetal a partir de cascas de alho. Poderiam ser utilizados os bulbos para este procedimento? Quais as vantagens do estudo das cascas?
9. Qual a importância de se testar diferentes solventes e métodos de extração a fim de obter extratos vegetais para estudo do potencial antimicrobiano?
10. Quais as dificuldades encontradas na padronização de culturas microbianas para os testes de atividade antimicrobiana?
11. Quais as dificuldades dos testes de CIM, CBM e difusão em disco? Como eles se complementam?

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste capítulo, discutimos testes que são comumente empregados em pesquisas científicas para determinação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. Na prática, os principais desafios costumam estar na escolha do método para preparo dos extratos e, a dica, neste caso, é que se saiba ou se pesquise previamente quais os compostos responsáveis por esta atividade que estão presentes na planta ou suas partes (se são lipossolúveis ou hidrossolúveis, por exemplo) a fim de garantir que o efeito esperado seja encontrado nos extratos avaliados.

Outra dica é tentar trabalhar com o extrato da forma mais concentrada possível, para evitar resultados falso-negativos. Finalmente, o trabalho com microrganismos requer várias etapas de preparo de culturas, esterilização de materiais e cuidados com contaminação. Com atenção a todos esses detalhes, as análises citadas nas práticas (CIM, CBM e difusão em disco) são valiosas ferramentas na avaliação do potencial de extratos para uso como antimicrobianos em embalagens, alimentos e demais aplicações industriais.

REFERÊNCIAS

BioRender. 2023. Disponível em: <<https://app.biorender.com>>. Acesso em: 23 de out. de 2023.

CLSI – CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 29th Edition**. CLSI standard M100., 2019.

GASPAR, E. B. *et al.* **Comparação de Métodos para a Avaliação “in Vitro” de Atividade Antimicrobiana de Extratos Vegetais**. Bagé: Embrapa Pecuária Sul, 2017.

HERIGSTAD, B.; HAMILTON, M.; HEERSINK, J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, p. 121-129, 2001.

MARQUES, L. C. Preparação de extratos vegetais. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, v. 3, n. 2, p. 74-76, 2005.

MASSAGUER, Pilar Rodriguez. **Microbiologia dos processos alimentares**. São Paulo: Varela, 2005. 258 p.

MCMAHON, M. A. S.; TUNNEY, M. M.; MOORE, J. E.; BLAIR, I. S.; GILPIN, D. F. Changes in antibiotic susceptibility in staphylococci habituated to sub-lethal concentrations of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*). **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, p. 263-268, 2008.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**, volume II, 2ª edição, 1997. São Paulo: Pearson. 524p

RODRIGUES, F. A.; PIMENTA; V. S. C.; BRAGA, K. M. S.; ARAÚJO, E. G. Obtenção de extratos de plantas do cerrado. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, v. 13, n. 23; p. 870-887, 2016.

SANTOS FILHO, Luíz Gonzaga Alves dos; CASTRO, Karina Neoob de Carvalho; PEREIRA, Alitene Moura Lemos; DINIZ, Fábio Mendonça. **Deteção da atividade antibacteriana in vitro de compostos naturais à base de plantas: metodologia científica**. Teresina: Embrapa, 2019, ISSN 0104-7647 (Comunicado Técnico).

SANTOS, Paula Correia Medeiros dos. **Propriedades antioxidante, antimicrobiana e toxicidade do extrato da casca do alho (*Allium sativum* L.)**. 2022. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2022.

SILVA, Neusely da *et al.* **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 6. ed. São Paulo: Blucher, 2017. 602 p.

SOUSA GUEDES, J. P.; MEDEIROS, J. A. C.; SILZA, R. S. S.; SOUSA, J. M. B.; CONCEIÇÃO, M. L.; SOUZA, E. L. The efficacy of *Mentha arvensis* L. and *M. piperita* L. essential oils in reducing pathogenic bacteria and maintaining quality characteristics in cashew, guava, mango, and pineapple juices. **International Journal of Food Microbiology**, v. 238, p. 183-192, 2016.

CAPÍTULO 8

APLICAÇÃO DA ELETROFORESE NA ANÁLISE DE PROTEÍNAS DO LEITE

Laíza Soliely Costa Gonçalves
Amanda Marília da Silva Sant'Ana
Euzimária Amanso Silva
Marcelo Wesley da Silva Barbosa
José Evangelista Santos Ribeiro

O termo eletroforese é usado para descrever o fenômeno migratório de partículas carregadas sob a influência de um campo elétrico. O movimento das partículas (substância com potencial para migrar) ocorrerá em um meio onde é estabelecido uma diferença de potencial. Neste capítulo, as partículas abordadas na análise do leite por eletroforese são as proteínas. As proteínas adquirem cargas por ionização e a técnica da eletroforese permite o seu fracionamento e caracterização.

Diferentes tipos de proteínas podem ser separadas por eletroforese. Sob condições de corrente constante, a força de deslocamento das partículas é o produto da carga efetiva, da molaridade do tampão e da resistência do meio de suporte. Como as proteínas possuem cargas positivas e negativas, a mobilidade eletroforética é diretamente proporcional à carga da partícula e é inversamente proporcional à viscosidade do meio.

A explicação física e química da eletroforese é muito simples. Uma fonte de corrente contínua é ligada a dois eletrodos dispostos em dois compartimentos (catódico e anódico) que contêm uma solução tampão. Quando a corrente elétrica passa pelo meio, o movimento das partículas ocorre em função da sua carga líquida negativa ou positiva. Por exemplo, a depender da carga da proteína, elas podem ser deslocadas para o pólo catódico (-) ou anódico (+).

As condições elétricas e do meio são determinantes nesse processo. Fatores como a diferença de potencial ou voltagem, resistência do meio à migração e intensidade da corrente elétrica precisam ser cuidadosamente observados. Quanto maior a corrente, mais rápido será o movimento de uma substância em relação a outra substância, que variam em constituição de terem mais cargas positivas ou negativas nos aminoácidos que constituem as moléculas de proteínas ou enzimas. Desta forma, enquanto os componentes com cargas mais altas se movem em direção a eletrodos com cargas opostas, os componentes com cargas equilibradas permanecem estacionários.

Esse processo se baseia na Lei de Coulomb (1736-1806), que descreve a força de interação entre cargas elétricas, onde a força entre duas partículas eletricamente carregadas é diretamente proporcional ao módulo de suas cargas e é inversamente proporcional ao quadrado da distância entre elas. Na eletroforese, ocorre a migração qualitativa, em que as partículas migram para o polo de sinal contrário e a quantitativa, onde a velocidade de migração eletroforética depende da quantidade ou densidade de cargas da partícula e a migração.

APLICAÇÃO DA ELETROFORESE

A eletroforese oferece uma abordagem eficaz e de alta resolução para a análise de alimentos, destacando sua capacidade de separar moléculas com precisão. É uma ferramenta analítica avançada e ao mesmo tempo de aparato simples, que é útil na detecção de contaminantes alimentares, na identificação de proteínas, peptídeos, ácidos nucleicos e outros componentes. Assim, permite não apenas caracterizar o alimento, como também garantir a sua autenticidade. Esse processo é utilizado em diversas áreas: biologia, química e engenharia.

A Eletroforese como Ferramenta Analítica Avançada

Se destaca na separação de moléculas com base em sua mobilidade elétrica. Método essencial na análise de alimentos, onde a composição precisa é crucial para garantir a segurança e qualidade.

Deteção de Contaminantes Alimentares

A eletroforese é utilizada também para detectar contaminantes, como bactérias patogênicas e resíduos de pesticidas, permitindo a identificação rápida e precisa.

Autenticidade Alimentar

A eletroforese é empregada na autenticidade de produtos alimentares, ajudando a determinar se um alimento está de acordo com suas especificações declaradas.

Identificação de Proteínas e outros Componentes

A eletroforese é usada para identificar e quantificar proteínas em alimentos, sendo útil na formulação e rotulagem precisa.

ELETROFORESE EM LEITE

O leite é o produto obtido através da ordenha completa e contínua, em condições limpas, de vacas saudáveis, bem alimentadas e descansadas. Inúmeros são os desafios encontrados em todos os elos da cadeia produtiva para atender às expectativas dos consumidores e garantir a qualidade nutricional, sensorial e microbiana, fatores esperados do setor industrial, produtos e supervisores.

O leite é considerado um alimento nobre e um dos alimentos mais complexos do ponto de vista nutricional, oferecendo muitas alternativas de industrialização e transformação na produção de diversos produtos.

As proteínas do leite podem ser divididas em duas classes principais: caseínas e proteínas do soro do leite. Ambos os tipos de proteínas são heterogêneos e cada tipo é composto por várias proteínas. As caseínas têm ponto isoelétrico (pI) em torno de 4,6 e podem ser facilmente precipitadas ajustando o pH do leite para 4,6, enquanto neste pH as proteínas do soro permanecem solúveis.

Em relação ao leite bovino, as proteínas podem ser classificadas em quatro grupos diferentes: caseínas (α s1 -caseína, α s2 -caseína, β -caseína, κ -caseína), proteínas séricas (α -lactalbumina, β -lactoglobulina, albumina sérica bovina, imunoglobulinas), peptonas proteosas e proteínas da membrana dos glóbulos de gordura do leite.

As caseínas têm pesos moleculares que variam de 19 a 25 kDa, aproximadamente. Em relação às proteínas presentes no soro do leite, a α -lactalbumina, que representa cerca de 15% a 25%

do leite, tem peso molecular de 14,2 kDa aproximadamente, enquanto a β -lactoglobulina, o maior peptídeo do soro, possui peso molecular médio de 18,4 a 36,8 kDa.

A eletroforese é aplicada com frequência no estudo de proteínas do leite e fatores genéticos, ambientais, métodos de conservação do leite podem influenciar as proporções das proteínas e peptídeos do leite. As variações nas proporções relativas das proteínas individuais do leite afetam as propriedades de fabricação dos derivados lácteos. Além disso, determinar o perfil eletroforético pode auxiliar na verificação de fraudes, baseada na mistura de diferentes concentrações do soro no leite ou produtos lácteos, já que as proteínas do soro diferem das caseínas.

As caseínas são semelhantes em tamanho e diferem muito pouco entre si em carga líquida. Quando o leite é aquecido, a κ -caseína sofre autopolimerização e forma complexos com as proteínas do soro.

As proteínas do leite podem ser separadas utilizando gel de poliacrilamida (PAGE): PAGE nativa, ureia-PAGE, Dodecil Sulfato de Sódio redutor (SDS)-PAGE, SDS-PAGE não redutor, ureia-SDS-PAGE, tricina-PAGE e eletroforese bidimensional (2DE). Será abordado nesse capítulo o método SDS-PAGE, que é um dos mais utilizados na literatura para separar proteínas do leite, porém outras formas de PAGE também têm suas próprias vantagens.

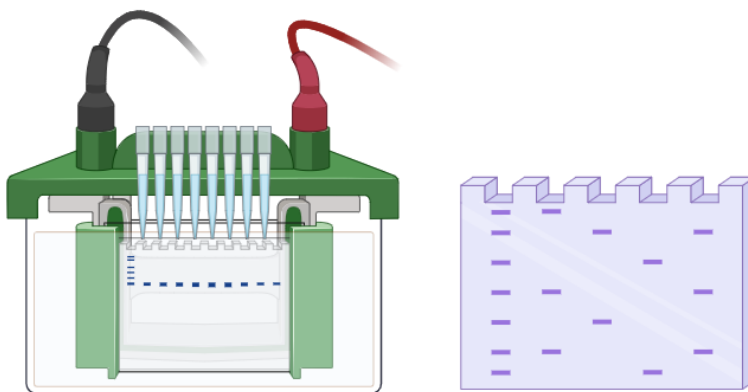
MÉTODO DE ELETROFORESE PARA ANÁLISE DE LEITE

Diversos componentes proteicos presentes em uma mistura, quando submetidos a um pH superior ou inferior ao seu ponto

isoeletrico (pI), se movem em diferentes velocidades nessa solução, devido às suas cargas elétricas específicas. Esse processo resulta na separação das proteínas em camadas claramente distinguíveis. Quando o pH é ajustado para alcalino em uma solução tampão, os grupos de ácidos presentes nas proteínas se dissolvem, gerando íons de carga negativa que podem ser separados por meio da técnica de eletroforese. A seguir, o método descrito será baseado em Laemmli (1970), com algumas adaptações.

A eletroforese utiliza um suporte (que pode ser sólido ou semi-sólido) e a corrida eletroforética pode ser feita na horizontal ou vertical. O método horizontal separa as partículas de acordo com a carga elétrica. O método descrito a seguir será de eletroforese em sistema vertical (Figura 1), que separa as partículas tanto pela carga elétrica quanto pela massa relativa, sendo mais eficiente no número de frações obtidas.

Figura 1 – Esquema geral de análise de eletroforese em cuba vertical.



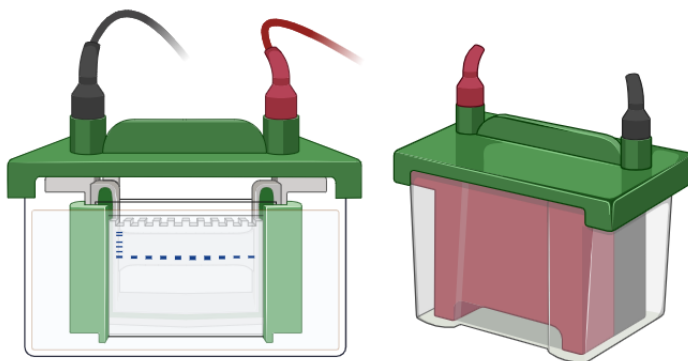
Fonte: Criado em BioRender.com (2023).

EQUIPAMENTO

O equipamento de eletroforese é formado por cuba vertical, fonte de alimentação elétrica, placas de vidro, pentes, base para *casting* (para represamento dos géis e estante de tubos), que juntos formam o módulo de corrida.

A cuba de eletroforese vertical foi desenvolvida para otimizar as técnicas de forma que evite perdas de amostra e garantindo um equipamento para fácil uso, reduzindo o espaço em bancadas, com análises rápidas com economia de reagentes, devido a sua versatilidade (Figura 2).

Figura 2 – Cuba vertical para eletroforese.

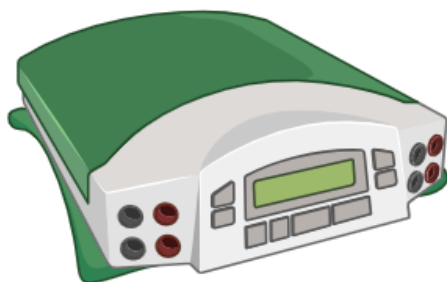


Fonte: Criado em BioRender.com (2023).

Na cuba de eletroforese é onde estará o gel com as amostras e por onde a corrente elétrica irá passar. Sua função é permitir que a corrente elétrica passe de forma uniforme durante o processo de separação das substâncias.

A cuba de eletroforese é acoplada a uma base de sustentação, chamada de base para cuba e fixação de *casting* (para represamento dos géis e estante de tubos). Além disso, a cuba deve ser conectada a uma fonte de alimentação de energia (Figura 3), que transfere a carga elétrica. Deve-se verificar com atenção se os eletrodos estão conectados adequadamente à fonte de alimentação, conferindo também a polaridade dos fios antes do início do processo.

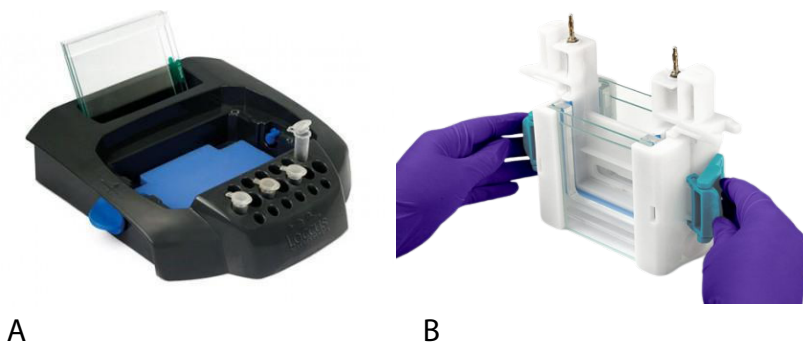
Figura 3 – Fonte de alimentação elétrica para eletroforese.



Fonte: Criado em BioRender.com (2023).

O módulo de corrida para sistema de eletroforese vertical é formado também por um conjunto de placas de vidro de 10x10 cm para géis de poliacrilamida, com capacidade de correr até 2 géis.

Figura 4 – Base para cuba vertical (A) e fixação de casting e módulo de corrida (represador para gel) (B).



Fonte: <<https://locus.com.br/>>

PRÁTICA 1: PREPARO DE SOLUÇÕES PARA ELETROFORESE

• Objetivo

Preparar as soluções que são utilizadas na técnica de eletroforese.

Nota: Em todo o preparo de soluções para eletroforese em gel de poliacrilamida em SDS-PAGE, é indispensável o uso de máscara e luva. **PROTEJA-SE!** As soluções devem ser preparadas com até 24 horas de antecedência da corrida eletroforética.

- **Materiais, equipamentos e reagentes**

- Cuba e fonte de eletroforese;
- Estabilizador;
- Suporte para molde do gel com pentes;
- Placas de vidro;
- Papel de filtro;
- Funil;
- Béquer;
- Balão volumétrico;
- Bastão de vidro;
- Balança analítica;
- Espátula metálica;
- Tubos Falcon;
- Tubos eppendorf;
- Tesoura;
- Centrífuga;
- Vórtex;
- Banho ultrassônico;
- Estante de inox;
- Pipetador;
- Ponteiras;
- Pisseta;

- Cronômetro;
- Ácido acético P.A.;
- β -Mercaptoetanol P.A.;
- Ácido Tricloroacético (TCA);
- Acrilamida P.A.;
- Álcool etílico P.A.;
- Álcool metílico (metanol) P.A.;
- Azul de Bromofenol P.A.;
- Bisacrilamida (N-N-Methylenebis) P.A.;
- Carbonato de sódio P.A.;
- Comassie Blue R250 P.A.;
- Formaldeído P.A.;
- Glicerol P.A.;
- Glicina P.A.;
- Hidrometilaminometano (Tris) P.A.;
- Lauril (dodecil) sulfato de sódio (SDS) P.A.;
- Nitrato de prata P.A.;
- Persulfato de amônio P.A. (APS);
- Temed (Tetrametiletilenodiamina)
(N,N,N',N'-Tetramethyl-1,2-Diaminomethane);
- Metanol P.A.;
- Etanol P.A.;
- Tiosulfato de sódio P.A.

• Procedimentos

Tampão de corrida (RUNNING BUFFER) – pH 8,3

A obtenção de uma boa solução de tampão de corrida (Tabela 1) é fundamental para a análise de eletroforese, visto que as cargas elétricas da amostra irão interagir com os íons positivos da solução tampão (NAOUM, 2012) para promover o deslocamento das proteínas por afinidade aos polos.

Tabela 1 – Reagentes e quantidades para preparo da solução tampão de corrida pH 8,3.

REAGENTE	100 mL
Glicina	14,4 g
SDS	1,0 g
Tris	3,0 g

Misturar os reagentes com um pouco de água ultrapura (aproximadamente 70 mL) em um recipiente tipo béquer, utilizando um bastão de vidro para auxiliar na homogeneização. Em seguida, transfira para um balão volumétrico e ajuste o volume para 100 mL. Dissolver a solução obtida (100 mL) em 900 mL de água ultrapura, quantidade suficiente para utilizar na cuba eletroforética vertical. Se ocorrer precipitação, aqueça a temperatura ambiente antes do uso. Guarde a solução em um recipiente de vidro com tampa, coberto com papel alumínio, a uma temperatura de 4 °C. A solução manterá sua validade de 30 a 60 dias. É importante identificar cada recipiente com o nome da solução, data e nome da pessoa que preparou.



Dica: Misturar a quantidade de SDS por último devido ao seu alto índice de produção de espuma; não ajustar o pH com ácidos ou bases; armazenar a 4 °C. Pode ser utilizado em até 2 corridas.

Observação

Utilizar gelado. Armazenar a 4 °C.

Solução de acrilamida 40% (39:1)

O efeito eletroendosmótico na formação dos géis depende do grau de pureza da acrilamida. A acrilamida é um dos reagentes responsáveis pela espessura dos géis, pois quanto mais espesso o gel, maior será a eletroendosmose (Naoum, 2012).

Tabela 2 – Reagentes e quantidades para preparo da solução de acrilamida 40%.

REAGENTE	QUANTIDADE (50 ml)
Acrilamida (39%)	19,5 g
Bisacrilamida (1%)	0,5 g

Misture os reagentes Acrilamida à 39% e Bisacrilamida à 1% com água ultrapura (± 40 ml) em um recipiente tipo béquer utilizando um bastão de vidro. Em seguida, realize uma filtração com auxílio de papel de filtro e funil, transfira para um balão volumétrico (50 ml) e ajuste o volume, se necessário com água ultrapura (± 10 ml) e homogeneíze. Guarde a solução em um **recipiente âmbar**, coberto com papel alumínio, a uma temperatura de 4 °C. A solução manterá sua validade **por até 30 dias**. É importante identificar cada recipiente com nome da solução, data e nome do manipulador.

Tampão Tris 1,5 M pH 8,8

O Tris 1,5 M pH 8,8 na eletroforese atua como um regulador de pH para criar um ambiente adequado para a migração das moléculas e, assim, permitir a separação das mesmas com base em suas cargas e tamanhos.

Tabela 3 – Reagentes e quantidades para preparo da solução tampão Tris 1,5 M com pH 8,8.

REAGENTE	QUANTIDADE (100 ml)
Tris	18,15 g
Água ultrapura	66,7 mL

Misture os reagentes com um pouco de água ultrapura em um recipiente tipo béquer utilizando um bastão de vidro. Em seguida, transfira para um balão volumétrico (100 mL), ajuste o

volume e homogeneíze, e calibre o **pH da solução para exatamente 8,8** com HCl puro, utilizando pHmetro. Em seguida, filtrar a solução com papel de filtro. Se necessário, adicionar água ultrapura para obter o volume final desejado (100 mL). **Armazenar em um recipiente âmbar a 4 °C por até 3 meses.** É importante identificar cada recipiente com nome da solução, data e nome do manipulador.

Tampão Tris 0,5 M pH 6,8

Tabela 4 – Reagentes e quantidades para preparo da solução tampão Tris 0,5 M com pH 6,8.

REAGENTE	QUANTIDADE (100 ml)
Tris	6 g
Água ultrapura	70 mL

Misture os reagentes com um pouco de água ultrapura em um recipiente tipo bquer utilizando um bastão de vidro. Em seguida, transfira para um balão volumétrico (100 mL), ajuste o volume e homogeneíze, e calibre o pH da solução para exatamente 6,8 com HCl puro, utilizando pHmetro. Em seguida, filtrar a solução com papel de filtro. Se necessário, adicionar água ultrapura para obter o volume final desejado (100 mL). Armazenar em um recipiente âmbar a 4 °C por até 3 meses. É importante identificar cada recipiente com nome da solução, data e nome do manipulador.

*Solução de SDS 1%***Tabela 5** – Reagentes e quantidades para preparo da solução SDS à 1%.

REAGENTE	QUANTIDADE (100 ml)
SDS P.A	1 g
Água ultrapura	90 mL

Misture os reagentes com um pouco de água ultrapura em um recipiente tipo béquer utilizando um bastão de vidro, homogeneizando com auxílio de banho ultrasônico para evitar o surgimento de espuma e bolhas em excesso. Em seguida, transfira lentamente para um balão volumétrico (100 mL) e ajuste o volume. Armazenar em um recipiente âmbar a temperatura ambiente por até 6 meses. É importante identificar cada recipiente com nome da solução, data e nome do manipulador.

*Solução de SDS 10%***Tabela 6** – Reagentes e quantidades para preparo da solução SDS à 10%.

REAGENTE	QUANTIDADE (100 ml)
SDS P.A	10 g
Água ultrapura	90 mL

Misture os reagentes com um pouco de água ultrapura em um recipiente tipo béquer utilizando um bastão de vidro,

homogeneizando com auxílio de banho ultrasônico para evitar o surgimento de espuma e bolhas em excesso. Em seguida, transfira lentamente para um balão volumétrico (100 mL) e ajuste o volume. **Armazenar em um recipiente âmbar a temperatura ambiente por até 6 meses.** É importante identificar cada recipiente com nome da solução, data e nome do manipulador.

Solução de Persulfato de Amônio (APS) 10%

O Persulfato de Amônio é um catalisador químico que atua na eletroforese.

Tabela 7 – Reagentes e quantidades para preparo da solução de Persulfato de Amônio (APS) à 10%.

REAGENTE	QUANTIDADE (100 ml)
APS P.A	10 g
Água ultrapura	80 mL

Diluir 10 g de APS em 80 mL de água ultrapura em um recipiente tipo béquer utilizando um bastão de vidro, homogeneizando. Em seguida, transfira lentamente para um balão volumétrico (100 mL) e ajuste o volume. Armazenar em um recipiente âmbar a temperatura de -20 °C por até 6 meses. É importante identificar cada recipiente com nome da solução, data e nome do manipulador.

Solução corante

Para preparar a solução corante, é necessário homogeneizar 40 mL de metanol com 20 mL de ácido acético e 0,5 g de Comassie Brilliant Blue (R-250) em béquer, transferindo para balão volumétrico de acordo com a quantidade escolhida e ajustar o valor (Tabela 8). Armazenar em um recipiente âmbar a temperatura de refrigeração por até 6 meses. É importante identificar cada recipiente com nome da solução, data e nome do manipulador.

Tabela 8 – Reagentes e quantidades para preparo da solução corante.

REAGENTE	QUANTIDADE (100 ml)
Metanol	40 ml
Ácido Acético	20 ml
Comassie Brilliant blue (R-250)	0,5 g

Solução descorante

Para finalizar, é necessário preparar a solução descorante que será utilizada na descoloração dos géis para permitir o aparecimento das bandas proteicas.

Tabela 9 – Reagentes e quantidades para preparo da solução descorante.

REAGENTE	QUANTIDADE (100 ml)
Metanol	20 ml
Ácido Acético	10 ml
H ₂ O PURA	70 ml

No preparo da solução descorante é necessário homogeneizar 20 mL de metanol com 10 mL de ácido acético e 70 mL de água ultrapura em béquer. Em seguida, transferir para balão volumétrico de acordo com a quantidade escolhida e completar o volume do balão. Armazenar em um recipiente âmbar a temperatura de refrigeração por até 6 meses. É importante identificar cada recipiente com nome da solução, data e nome da pessoa que preparou a solução.

PRÁTICA 2: PREPARO DE AMOSTRAS

O principal reagente utilizado na solução tampão de amostra é o SDS que é responsável pela desnaturação das proteínas presentes nas amostras em estruturas lineares e de densidade uniforme, devido a sua capacidade detergente anfipática.



Dica: Sugestão de preparo de 500 mL para cada gel.

O uso de beta-mercaptoetanol permite identificar se uma determinada proteína apresenta ou não mais de uma subunidade. O β -mercaptoetanol na presença de calor (quando a amostra é fervida) atua como agente destrutivo, pois atua na quebra das pontes de dissulfetos, o que auxilia na eliminação da estrutura tridimensional dos polipeptídios.

Inicialmente, descongelar as amostras e mantê-las em ambiente refrigerado. Logo, preparar um microtubo para cada amostra destinada à pipetagem no gel e identificá-lo com data, nome e/ou número da amostra.

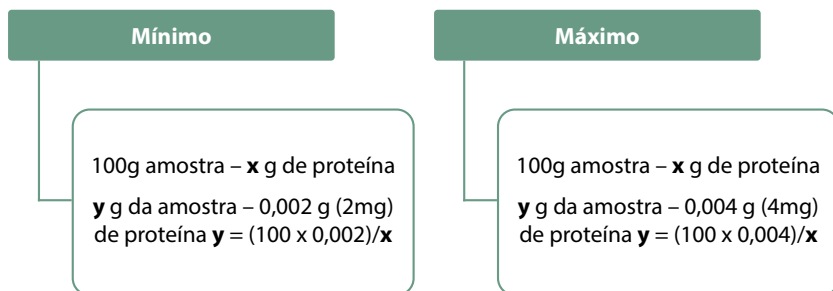
- **Procedimento de preparo da amostra**

Para preparar a amostra, é necessário determinar a quantidade total de proteína a ser aplicada no poço. Essa quantidade deve ser determinada experimentalmente.



Dica: Para géis corados com Coomassie Blue, deve-se pesar aproximadamente de 2 a 4 mg de proteína por mililitro de amostra. A quantidade de proteína no poço deve ser igual ou superior a 20 µg; portanto, pipetar entre 5 e 10 µL do tampão de amostra.

Para calcular o peso da amostra por mL do tampão, deve-se determinar a proteína total:



1. Pesar a amostra em eppendorf (já identificado e com plástico adesivo) e, em seguida, pipetar a quantidade necessária de tampão de amostra aliquotada (± 1 mL), conforme o cálculo realizado.
2. Colocar os eppendorfs em banho com água fervente por 5 minutos para promover a desnaturação das proteínas. Homogeneizar os tubos em vórtex (1 min) e centrifugar a baixa rotação sob refrigeração antes de aplicar o gel (3.000 rpm/4 °C/3 minutos).



Dica: Utilizar estantes de ferros que comportem eppendorf, assegurando o fechamento dos mesmos, pois pode ocorrer estouro da tampa.

- **Procedimento de preparo da solução tampão de amostra**

Preparo da solução do tampão de amostra (Stock Sample Buffer) conforme a tabela abaixo:

Tabela 11 – Reagentes e quantidades para preparo do tampão de amostra de leite.

TAMPÃO DE AMOSTRAS	QUANTIDADE (10 ml)
Tris 0,5 M (pH 6,8)	2500 µL
SDS 10% (p/v)	4000 µL
Glicerol	2000 µL
Azul de Bromofenol 0,5% (p/v)	0,004 mg
β-mercaptoetanol 5%	1000 µL

Misture todos os reagentes da Tabela 10, certificando-se que o corante azul de bromofenol esteja completamente dissolvido. Em seguida, com 500 µL de água, completar para atingir o volume final de 10 mL. Armazenar a solução em tubo Falcon, coberto com papel alumínio, sob refrigeração.



Dica: Utilizar tubo falcon de 15 mL para preparar a solução tampão e, em seguida, transferir para o recipiente final e adicionar o azul de bromofenol. Esta solução pode ser armazenada em temperatura ambiente. Após a adição de β -mercaptoetanol ao tampão de amostra, a amostra deve ser armazenada no freezer em tubos de eppendorf bem lacrados e identificados, para uso posterior.

PRÁTICA 3: SDS-PAGE – PREPARO DOS GÉIS DE POLIACRILAMIDA

- **Objetivo**

Preparar os suportes e placas de vidro para polimerizar o gel.

- **Procedimento:**

Inicialmente, deve ser realizada uma limpeza geral em todo o equipamento antes do uso, principalmente nas placas de vidro, para evitar resíduos de gel; utilize o lado macio da esponja, água e detergente neutro. Por fim álcool com pano/papel toalha macio para evitar arranhadura nas placas de vidro. Realizar o teste de vazamento das placas de vidro (já niveladas) com água, travando bem o suporte (Figura 5). Ter cuidado ao

colocar as placas de vidro, para evitar quebrá-las. Observar o nivelamento no encaixe.



Dica: Não se deve desmontar os suportes após o teste de vazamento. Apenas descartar a água ou álcool por inversão. Retirar o excesso com papel de filtro.

Figura 5 – Procedimento de trava das placas de vidro no suporte



Fonte: <<https://locus.com.br/>>

Preparar gel de separação de poliacrilamida (MALHA)

Para cada gel de 1 mm, preparar as soluções em um béquer. A solução de gel de separação pode ser de 10%, 12%, 15% ou outro percentual. É importante realizar testes em diferentes malhas para decidir qual a que separa melhor sua amostra.

Observação

Não esquecer de adicionar persulfato de amônio e Temed com cuidado! São nocivos e possuem mau cheiro.

Tabela 12 – Reagentes e quantidades para preparo do gel de separação de poliacrilamida

REAGENTE	10%	12%	15%
Acrilamida (40%)	2540 µL	3040 µL	3740 µL
Tris 1,5 M	1700 µL	1700 µL	1700 µL
SDS 1%	700 µL	700 µL	700 µL
Glicerol	560 µL	560 µL	560 µL
Água ultrapura	4320 µL	3880 µL	3180 µL



Dica: Colocar as soluções em béquer seguindo a ordem descrita e homogeneizar após cada adição. Para acrescentar o glicerol, deve-se realizar o corte da ponteira, para facilitar a pipetagem, devido a sua viscosidade.

1. Acrescentar 85 μL de persulfato de amônio a 10% e 11,25 μL de Temed no béquer e homogeneizar;



Dica: Marcar a placa de vidro com uma caneta até onde a solução do gel de separação foi pipetada. Remover as bolhas do gel com o auxílio de papel de filtro (cortar papel de filtro previamente). A água ou álcool etílico isola o gel de separação do ar, permitindo uma borda de gel lisa. SDS 0,1% também pode ser usado.

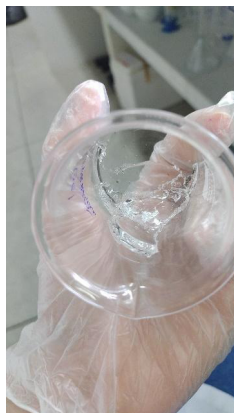
2. Transferir imediatamente a solução do gel de separação de poliacrilamida entre as duas placas de vidro, **até 0,5 cm abaixo da altura do pente** (cerca de 1,5 cm do final da placa menor), aguardar para ver se não há vazamentos e pipetar água ultrapura ou álcool etílico absoluto lentamente em linha, para evitar abaular.



Dica: Devido a polimerização rápida, a pipetagem da solução do gel deve ser realizada imediatamente nas placas até a medida marcada do nível na lateral do equipamento; a quantidade sugerida acima é suficiente para duas placas, quando utilizado suporte vertical para eletroforese.

3. Aguardar a polimerização – 30 minutos;

Figura 6 – Gel polimerizado



Fonte: próprio autor (2023).

4. Descartar, por inversão e com o auxílio de papel absorvente, a água ou álcool etílico das placas contendo o gel de separação polimerizado;

Dica: Não desmontar os suportes, apenas descartar a água ou álcool por inversão dos mesmos. Retirar o excesso com papel de filtro.



Preparo da solução do gel de entrada de poliacrilamida 4,5%

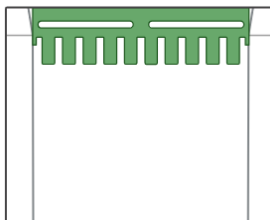
Tabela 13 – Reagentes e quantidades para preparo do gel de entrada de poliacrilamida 4,5%.

REAGENTE	QUANTIDADE*
Acrilamida (40%)	600 µL
Tris 0,5 M	1380 µL
SDS 1%	540 µL
Água ultrapura	2800 µL

*Quantidade para duas placas

1. Acrescentar **25 µL de persulfato de amônio a 10%** e **7,5 µL de Temed** no béquer;
2. Transferir a solução do gel de entrada de poliacrilamida em cima do gel de separação polimerizado, até o final da placa;
3. Inserir o pente plástico (Figura 7), que dará o formato dos poços do gel de entrada;

Figura 7 – Pentes inseridos no gel



Fonte: Criado em BioRender.com (2023).

4. Aguardar a polimerização: 60 minutos;
5. Encaixar a tampa da cuba, ajustar a voltagem para 120 V. Configure a corrente em 30 mA. Defina a potência em 15 W. Tempo de corrida em média 2h20;



Observação

Proteja seus olhos durante esse procedimento, pois há possibilidade de respingos no momento da inserção do pente.

PRÁTICA 4: SDS-PAGE

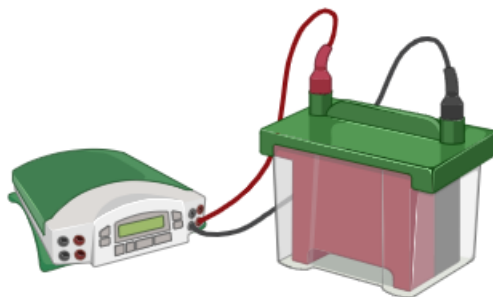
• Procedimento

1. Preparar a cuba de eletroforese (Figura 8): encaixar as placas de vidro com o gel no suporte com eletrodos e preencher as cisternas interna e externa com o tampão de corrida gelado, para manter durante toda a corrida;



Dica: Caso não utilize o gel imediatamente, guarde o mesmo com suporte completo na geladeira, envolto por papel umedecido com água destilada e plástico filme, dentro de um recipiente com tampa. O gel pode ser utilizado em até três dias.

Figura 8 – Equipamento montado para corrida de eletroforese



Fonte: Criado em BioRender.com (2023).

2. Após encaixar a guia, pipetar delicadamente as amostras nos poços, evitando a mistura e derramamento para os poços vizinhos (usar fitas de papel filtro);



Dica: Reserve sempre o primeiro poço para pipetar o marcador de peso molecular.



3. Pipetar de forma lenta e cuidadosa o marcador de massa molecular, até 10 microlitros de marcador, a depender da marca e forma de uso;



Dica: Encaixar a ponta da pipeta exatamente entre as duas placas de vidro, acima do poço a ser pipetado, inclinando-a suavemente.

4. Cobrir com o restante do tampão de corrida os poços, suportes e placas de vidro, até a marcação da cuba;
5. Encaixar a tampa da cuba, ajustar a voltagem (60-120) ou amperagem e iniciar a corrida;
6. A corrida deve ser feita até que o marcador de peso molecular alcance a distância desejada no gel. Isso pode levar de 1 a 2 horas, dependendo da concentração do gel e da voltagem aplicada.



Dica: Posicionar corretamente a tampa em correspondência a cada eletrodo, conforme os polos (positivo/negativo). O resultado da corrida depende do tipo de proteína observada (alto ou baixo peso molecular).

Observação

Controlar a amperagem da corrida (mA). Caso a amperagem esteja próxima a 0.00 mA, desligue o equipamento e troque o tampão entre as placas-gel por um tampão novo e de preferência gelado (realizar com cuidado, pois pode causar manchas no gel).

Após o término da corrida, proceder com a coloração Comassie.



Dica: Para remover o gel da placa usar água corrente. Separar as placas com o auxílio do pente/espátula plástica. E marcar o lado do marcador! (Pequeno corte no gel de entrada ou na parte inicial do gel de separação, mas evitando danificar possível local de presença de bandas proteicas).

PRÁTICA 5: MÉTODO DE COLORAÇÃO DE GÉIS SDS-PAGE COMASSIE BLUE

Após eletroforese, remover cuidadosamente com água e pisseta o gel das placas de vidro com a espátula plástica e colocar em um recipiente com dimensão que comporte a imersão do mesmo.

- **Procedimento**

1. Adicione até cobrir o gel a solução de fixação;
2. Homogeneize delicadamente de 2 a 16 horas no homogeneizador automático ou deixar em repouso por 16 horas em *overnight*.

Lave o gel com água destilada, tomando cuidado para não danificar sua estrutura. Adicione água com uma pisseta, mexendo o recipiente e aguardando aproximadamente 2 minutos antes da próxima lavagem, utilize uma pipeta para retirar a água da lavagem. Repita esse processo até que o gel esteja mais claro. Em seguida, adicione a solução descorante até cobrir o gel. Utilize papel filtro e carvão ativado para filtrar a solução descorante, visando sua reutilização. Continue lavando o gel até que as bandas se tornem visíveis e o gel esteja claro o suficiente para ser fotografado.

Coloração prata

Caso o peso molecular das proteínas seja pequeno e as bandas não tenham surgido, é necessário a coloração com nitrato de prata. É uma coloração muito sensível e o gel deve ser manipulado o mínimo possível.

- **Procedimento**

1. Após a eletroforese, remover o gel cuidadosamente e colocar em um recipiente com dimensão que comporte a imersão do mesmo;
2. Cobrir o gel com 50 mL metanol / 12 mL ácido acético / 50 µL formaldeído / 38 mL água e deixar por 1 hora à temperatura ambiente;
3. Lavar o gel com etanol 50%, 3 x por 20 minutos;
4. Adicionar 0,02% de solução de tiosulfato de sódio (0,01 g em 50 mL água) e aguardar 1 minuto;

Dica: Separar 1 mL para cada gel a ser corado.

5. Lavar com água 3 x por 20 segundos;
6. Adicionar 100 mL de solução de coloração fresca e manter por 20 minutos no escuro;
7. Lavar com água 2 x por 20 segundos;

8. Adicionar solução de revelação até surgirem as bandas;
9. Parar a revelação com ácido acético 1% (1 mL em 99 mL água).

Solução de coloração	
0,1 g	Nitrato de prata
38 mL	Formaldeído
50 mL	H ₂ O ultrapura

Observação

Utilizar luvas para manipular a prata.

Solução de revelação	
3 g	Carbonato de sódio
25 µL	Formaldeído 37%
1 mL	Tiossulfato de sódio 0,02%
49 mL	H ₂ O ultrapura

Análise e documentação

Documentação dos Resultados da Eletroforese: As proteínas presentes nas amostras migrarão ao longo do gel de acordo com seus tamanhos moleculares, resultando na formação de bandas proteicas distintas.

Uso de Scanner de Gel ou Sistema de Imagem: Utilize um scanner de gel ou um sistema de imagem apropriado para registrar visualmente as bandas proteicas obtidas após a execução da eletroforese.

Adesão ao Protocolo: Este protocolo detalhado foi desenvolvido para guiar a realização da eletroforese SDS-PAGE em amostras de leite de forma eficaz. É imperativo seguir todas as normas de segurança e realizar os procedimentos em um ambiente laboratorial adequado.

REFERÊNCIAS

BRACHT, Emy Luiza Ishii-Iwamoto A. **Métodos de laboratório em bioquímica:** Editora Manole, 2003. *E-book*.

SPEROTTO, R. A. Protocolos e métodos de análise em laboratórios de biotecnologia agroalimentar e de saúde humana. **Lajeado:** Editora Univates, 2014.

ROCHA, T. L. *et al.* **Eletroforese bidimensional e análise de proteomas.** Comunicado técnico 136, Brasília DF: Embrapa, ISBN 9192-0099, 2005.

COMPRINARDY, M. B.; STELLA, M. B.; OLIVEIRA, C. **Práticas de Laboratório de Bioquímica e Biofísica.** Grupo GEN, 2009. *E-book*.

AUSUBEL, F. M., BRENT, R., KINGSTON, R. E., MOORE, D.D, SEIDMAN, JG., SMITH, A., STRUHL, K. **Current Protocols in Molecular Biology**, John Wiley & Sons, 2003.

LAEMMLI, U. K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage**. *Nature*, 227, 680-685, 1970.

NAOUM, P. **Eletroforeses**: hemoglobinas, proteínas séricas, lipoproteínas. DNA. São Paulo: Editora Santos, 2012.

VERLENGIA, R. *et al.* Análises de RNA, Proteínas e Metabólitos: metodologia e procedimentos técnicos. In: **Análises de RNA, Proteínas e Metabólitos**: metodologia e procedimentos técnicos. 2013. p. 454-454.

NAOUM, P. C. **ELETROFORESES**. 2010. Disponível em: https://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/livros/aceso_gratuito/Livro_completo%20-%20Eletroforese.pdf. Acesso em: 07 out. 2023.

ECKERSALL, P. D. **Proteins, proteomics and the dysproteinemias**. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6th ed. Burlington: Academic Press. p. 117-155, 2008.

MCPHERSON, R. A. Specific Proteins. In: MCPHERSON, R. A.; PINCUS, M. R. **Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**. 22. ed. Philadelphia, Pa: Elsevier Saunders. p. 259- 272, 2011.

TORRES FILHO, H. M. **Eletroforese de proteínas**. *Richet Nouvelles*, Rio de Janeiro, v. 11, n. 3, p. 1-8, set. 2008.

VELOSO, A. C. A., *et al.* Separation and quantification of the major casein fractions by reverse-phase high-performance liquid chromatography and urea-polyacrylamide gel electrophoresis detection of milk adulterations. **Journal of Chromatography A.**, n. 967, p. 209–218, 2002.

FURTADO, M. A. M. **Desenvolvimento de um novo método analítico para a determinação de soro adicionado ao leite**

pasteurizado. 1989. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – UFLA, Lavras – MG, 1989.

SERPA, L. **Concentração de proteínas de soro de queijo por evaporação a vácuo e ultrafiltração.** 2005. 116 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – URI, Erechim – RS, 2005.

ALFONSO, GABRIELY MARINHO *et al.* **avaliação da densidade e acidez do leite adquirido no comércio informal no município de alegrete/RS.** Anais Congrega MIC-, p. 22-23, 2017.

VELOSO, A. C. A., *et al.* Detecção de adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 609-615, 2002.

ANDRADE, J. M. *et al.* Utilização de eletroforese para caracterização de leite UHT, soro de queijo e suas misturas. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 62, p. 423-9, 2007.

CAPÍTULO 9

MÉTODO INFOGEST NA DIGESTÃO SIMULADA *IN VITRO* DO LEITE

Michele Santos de Oliveira

Amanda Marília da Silva Sant'Ana

Janaína Felizardo de Souza

Michela de Lima Bezerra

Valquíria Cardoso da Silva Ferreira

Camila Sampaio Mangolim

A técnica laboratorial de digestão simulada *in vitro* (DSIV) pode ser aplicada para estudar a digestão e absorção de diversos alimentos, incluindo o leite e seus derivados. Esta abordagem é útil para entender como os componentes do leite, como proteínas, gorduras e carboidratos, são processados pelo sistema digestivo humano.

No processo de digestão, os alimentos sofrem transformações físicas e químicas, resultantes de processos mecânicos e químicos. Para compreender a resposta fisiológica do organismo durante a digestão dos alimentos, modelos *in vitro* têm sido desenvolvidos há muitas décadas, pois os modelos *in vivo* em humanos ou animais podem ser considerados invasivos, difíceis de realizar, custosos ou inadequados eticamente.

Com os métodos de digestão *in vitro* é possível simular os principais compartimentos do trato digestivo humano, incluindo as fases oral, gástrica e intestinal.

Os métodos de digestão *in vitro* estão divididos em estáticos e dinâmicos. O método estático tem a vantagem de ser menos custoso, mais simples, e utiliza uma proporção constante de alimentos para enzimas e eletrólitos e um pH constante para cada fase digestiva. Este é o método proposto pelo protocolo INFOGEST (Brodkorb *et al.*, 2019), que será utilizado como base neste capítulo.

O SISTEMA GASTROINTESTINAL HUMANO

O sistema digestivo (Figura 1), também conhecido como trato gastrointestinal, é um sistema complexo do corpo responsável pela digestão dos alimentos e absorção dos metabólitos resultantes desse processo. Ele se estende da boca até o ânus e consiste em uma série de órgãos interconectados, cada um com funções específicas:

- **Boca:** A digestão começa na boca, onde os alimentos são mastigados e misturados com a saliva. A saliva contém enzimas (como a amilase salivar) que iniciam a quebra dos carboidratos.
- **Faringe:** A faringe é uma área compartilhada entre o sistema digestivo e o sistema respiratório. Ela serve como passagem para o alimento após a mastigação.
- **Esôfago:** O esôfago é um tubo muscular que leva o alimento da faringe até o estômago por meio de contrações musculares coordenadas, chamadas de movimentos peristálticos.

- **Estômago:** O estômago é um órgão em forma de bolsa onde ocorre a digestão química e mecânica. Ele contém ácido clorídrico e enzimas digestivas que quebram os alimentos em partículas menores. O estômago também armazena alimentos temporariamente.
- **Duodeno, Jejuno e Íleo (Intestino Delgado):** O intestino delgado é responsável pela maior parte da absorção de nutrientes. O duodeno é a primeira parte, onde o suco pancreático e a bile são adicionados para ajudar na digestão. O jejuno e o íleo continuam a quebra dos alimentos e a absorção de nutrientes.
- **Intestino Grosso (Cólon):** O intestino grosso é onde a maior parte da absorção de água e eletrólitos ocorre. As bactérias intestinais também desempenham um papel importante na digestão de resíduos não absorvíveis.
- **Recto:** O reto é a última parte do intestino grosso e atua como um reservatório temporário de fezes.
- **Ânus:** O ânus é a abertura final do trato gastrointestinal, onde as fezes são eliminadas do corpo.

Figura 1 – Órgãos que compõem o Trato Gastrointestinal humano



Fonte: Criado em BioRender.com (2023).

O trato gastrointestinal é uma parte fundamental do nosso organismo com diversas particularidades que o tornam um sistema único no corpo humano, e que devem ser estudadas, como por exemplo:

- **Mucosa:** Cada parte do trato gastrointestinal tem uma camada de mucosa especializada que desempenha funções específicas na digestão e absorção.
- **Motilidade:** Os órgãos do trato gastrointestinal têm músculos que realizam contrações rítmicas para mover alimentos e líquidos ao longo do sistema. O processo é chamado de peristalse.

- **Sistema Nervoso Entérico:** O trato gastrointestinal possui seu sistema nervoso independente, conhecido como sistema nervoso entérico, que regula muitas funções autônomas, como a motilidade e a secreção de enzimas.
- **Microbiota Intestinal:** O intestino abriga uma comunidade de bactérias benéficas chamadas microbiota intestinal, que desempenham um papel importante na digestão, na produção de vitaminas e na saúde geral.
- **Produção de Enzimas Digestivas:** Diferentes partes do trato gastrointestinal produzem enzimas específicas para ajudar na digestão de proteínas, carboidratos e gorduras.

O LEITE

O leite é definido como a secreção de coloração esbranquiçada produzido pelas glândulas mamárias dos mamíferos, composto por água, lipídios, proteínas, carboidratos, vitaminas e sais minerais. Sua composição pode variar de acordo com cada espécie animal, fase de lactação, época do ano, raça, alimentação, entre outros.

Devido à sua composição, é um alimento muito importante na nutrição humana, especialmente na infância, pois fornece proteínas para o crescimento, cálcio para os ossos e vitaminas essenciais, além dos outros nutrientes.

O leite de vaca é o tipo mais consumido em todo o mundo, mas o leite de outros animais também é ingerido como fonte alimentar, mesmo que em menor quantidade. É a partir do leite que são elaborados derivados como queijos, iogurtes e manteigas, sendo também um ingrediente muito comum em outros produtos alimentícios, como produtos de panificação.

A digestão gástrica simulada do leite pode ser usada para avaliar sua digestibilidade e acompanhar a liberação das substâncias ao longo do processo. As substâncias presentes no leite podem ser degradadas por mudanças no pH e utilização de enzimas digestivas, além de técnicas que simulem os fluidos e motilidade do sistema digestivo. É possível, ainda, simular a absorção no epitélio intestinal.

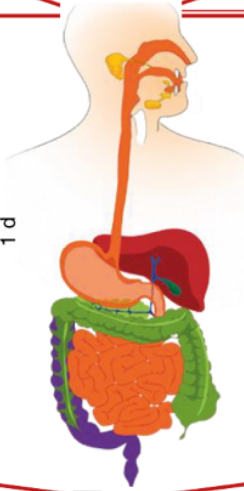
Esses métodos *in vitro* tentam reproduzir condições fisiológicas *in vivo*. O sistema digestivo, incluindo boca, estômago e intestinos têm motilidade e secretam substâncias (saliva, sucos gástricos, enzimas, bile, etc.). Todo o sistema permite a digestão e absorção de nutrientes e compostos ativos, que terão ação biológica no corpo. Cada vez mais, estes ensaios têm sido utilizados para correlacionar a alimentação com o impacto na saúde das pessoas, trazendo informações benéficas para a compreensão das atividades biológicas de compostos bioativos após a digestão.

Assim, neste capítulo será abordado um método de digestão *in vitro* (protocolo INFOGEST 2.0) que simula as transformações físicas e químicas dos principais compartimentos do trato digestivo humano, tendo o leite como alimento referência para aplicação da prática.

ENSAIO DA DIGESTÃO SIMULADA IN VITRO – PROTOCOLO INFOGEST 2.0

O protocolo INFOGEST 2.0 é dividido em três fases: preparo, procedimento de digestão e tratamento da amostra com posterior análise (Figura 2). A etapa de preparação é de extrema importância, pois erros podem resultar na incorreta digestão do alimento.

Figura 2 – Resumo de tempo e fluxo do método de digestão *in vitro* INFOGEST 2.0 para alimentos.

	5 d	Preparation	• Perform enzyme activity and bile assays • Prepare SSF, SGF and SIF stock solutions • Perform pH-test adjustment experiment	Step	1 2 4
		1 d	Oral phase	• Mix Food with SSF (1:1, (wt/wt)) • Include CaCl_2 (1.5 mM in SSF) • Add salivary amylase, if necessary (75 U/mL) • Incubate while mixing (2 min, 37 °C, pH 7)	
Gastric phase			• Mix oral bolus with SGF (1:1 (vol/vol)) • Include CaCl_2 (0.15 mM in SGF) • Add pepsin, gastric lipase (2,000, 60 U/mL) • Incubate while mixing (2 h, 37 °C, pH 3.0)		17, 18 19 20, 21 22–24
Intestinal phase			• Mix gastric chyme with SIF (1:1 (vol/vol)) • Include bile (10 mM bile salts) • Include CaCl_2 (0.6 mM in SIF) • Add pancreatin (trypsin activity 100 U/mL) • Incubate while mixing (2 h, 37 °C, pH 7.0)		25, 26 27 28 29 30–32
Sampling			• Sampling procedure and sample treatment (Table 1)		

Fonte: Brodkorb *et al.*, 2019

PRÁTICA 1 – PREPARO DE SOLUÇÕES ELETROLÍTICAS (SOLUÇÕES ESTOQUE)

- **Materiais, equipamentos e reagentes**

- Balança analítica;
- Béqueres;
- Espátulas;
- Balões volumétricos de 10, 25, 50, 100, 250, 500 mL;
- Bastão de vidro;
- Água destilada e **Água ultrapura (tipo 1)**;
- Centrífuga;
- Vórtex;
- Medidor de pH;
- Incubadora Shaker ou banho-maria com agitação;
- Banho ultrassônico;
- Tubos Eppendorf (2 mL);
- Tubos de centrífuga (15 e 50 mL);
- Micropipetas e ponteiros (P10-P1000);
- Frascos volumétricos para soluções;
- Cloreto de potássio (KCl);
- Fosfato monopotássico (KH_2PO_4);
- Bicarbonato de sódio (NaHCO_3);

- Cloreto de sódio (NaCl);
- Cloreto de magnésio ($\text{MgCl}_2 (\text{H}_2\text{O})_6$);
- Carbonato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$;
- Hidróxido de sódio (NaOH);
- Ácido clorídrico (HCl);
- Ácido tricloroacético (TCA);
- Hemoglobina de sangue bovino;
- Cloreto de cálcio $(\text{CaCl}_2 (\text{H}_2\text{O})_2$;
- α -amilase salivar humana;
- Pepsina suína;
- Extrato gástrico de coelho para lipase gástrica;
- Bile bovina ou suína, ou sais biliares;
- Pancreatina suína.

As concentrações elencadas a seguir são para a preparação de 400 mL de fluido de digestão simulado na concentração de 1,25×:

- 0,5 mL de $\text{CaCl}_2 (\text{H}_2\text{O})_2$ (0,3 M)
- 30 mL de KCl (0,5 M)
- 6 mL de KH_2PO_4 (0,5 M)
- 65 mL de NaHCO_3 (1 M)
- 25 mL de NaCl (2 M)

- 2 mL de $\text{MgCl}_2 (\text{H}_2\text{O})_6$ (0,15 M)
- 2 mL de $(\text{NH}_4)_2 \text{CO}_3$ (0,5 M)
- 1 M NaOH e 1 M HCl (mínimo de ~5 mL): para ajuste de pH de soluções estoque de fluidos de digestão simulados.

Esses concentrados são chamados de Fluido Salivar Simulado (FSS), Fluido Gástrico Simulado (FGS) e Fluido Intestinal Simulado (FIS). As soluções estoques podem ser preparadas e armazenadas em alíquotas a -20°C por 1 ano. Os fluidos de digestão simulados para as fases de digestão oral (FSS), gástrica (FGS) e intestinal (FIS) são misturados a uma concentração de 1,25x usando as soluções estoque de eletrólitos e água. A adição de enzimas, sais biliares, água, etc, resultará na correta concentração de eletrólitos na mistura final de digestão. O $\text{CaCl}_2 (\text{H}_2\text{O})_2$ não é adicionado às soluções de estoque de eletrólito, pois pode ocorrer precipitação. Em vez disso, é adicionado à mistura final de fluido de digestão simulado e no alimento.

- **Procedimento**

1. Em uma balança analítica e com o auxílio de um béquer pequeno e uma espátula, realize a pesagem dos reagentes a seguir. Na Tabela 1 são apresentadas as quantidades e concentrações dos reagentes da solução estoque.

Tabela 1 – Reagentes para solução estoque.

Reagentes	MM (g/mol)	m (g)	V (mL)	M (mol/L)
KCl	74,5513	1,86	50	0,5
KH ₂ PO ₄	136,086	0,68	10	0,5
NaHCO ₃	84,007	8,40	11	1
NaCl	58,44	2,92	25	2
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	203,30	0,30	10	0,15
(NH ₄) ₂ CO ₃	96,09	2,40	50	0,5
NaOH	40	10,00	250	1
HCl	36, 5	54,75	250	6
CaCl ₂	147,02	22,05	500	0,3

2. Após a pesagem de todos os reagentes, em seus respectivos recipientes, adicione uma pequena quantidade de água destilada e com o auxílio de um bastão de vidro realizar a mistura dos componentes até que se observe a diluição completa.

Observação

Neste momento, recomenda-se observar o volume exigido para cada um dos reagentes e realizar a mistura com cautela, pois, se adicionar um volume alto de água para diluir o reagente, isso pode prejudicar as etapas seguintes.

3. Após identificar que todos os reagentes foram totalmente diluídos, eles devem ser transferidos com cuidado para balões volumétricos, de acordo com o volume especificado na Tabela 1.
4. Complete o volume em cada balão com água destilada até atingir o menisco.

Figura 3 – Esquema de Preparo das soluções.

PREPARO DAS SOLUÇÕES



Fonte: Criado em BioRender.com (2023).

PRÁTICA 2 – PREPARO DE FLUIDOS PARA DIGESTÃO

Os fluidos de digestão simulados podem ser armazenados a -20 °C durante 1 ano em pequenas alíquotas de tamanho apropriado. Para o experimento usando 5 g de alimento, são necessários pelo menos 48 mL de FSS, 88 mL de FGS e 96 mL de FIS.

• Materiais

- Pipetador;
- Béquér de 500 mL;
- Phmetro;
- Bastão de vidro;
- Água destilada.

Fluido salivar simulado- FSS (pH 7,0)

Com o auxílio de um pipetador, transfira para um béquer as seguintes quantidades de solução estoque previamente preparadas (Tabela 2).

Tabela 2 – Quantidades de solução estoque FSS.

SOLUÇÃO ESTOQUE	QUANTIDADES (mL)
KCl	15,1
KH ₂ PO ₄	3,7
NaHCO ₃	13,6
NaCl	-
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	0,5
(NH ₄) ₂ CO ₃	0,06
HCl	0,09
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂ *	0,025

*CaCl₂ (H₂O)₂ deve ser adicionado imediatamente antes do uso.

1. Após transferir as soluções estoque para um béquer, adicione 300 mL de água destilada.
2. Após adicionar água destilada, com o auxílio de um pHmetro observe o pH do fluido. Caso não esteja no pH ideal, deve-se ajustá-lo com o auxílio de um conta gotas de plástico, adicionando gotas de $\text{CaCl}_2 (\text{H}_2\text{O})_2$ ou de NaOH (1 M) sob constante agitação até que se obtenha o pH 7,0 (ideal para este caso).
3. Após atingir o pH 7,0, complete o volume com água destilada até 400 mL.
4. Transfira o fluido para um recipiente com tampa e guarde na geladeira.
5. O fluido salivar simulado (FSS) pode ser armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 ano em pequenas alíquotas de tamanho apropriado.

Fluido gástrico simulado - FGS (pH 3)

Com o auxílio de um pipetador, transfira para um béquer grande as seguintes quantidades de solução estoque previamente preparadas (Tabela 3).

Tabela 3 – Quantidades de solução estoque FGS.

SOLUÇÃO ESTOQUE	QUANTIDADES (mL)
KCl	6,9
KH_2PO_4	0,9
NaHCO_3	12,5
NaCl	11,8
$\text{MgCl}_2 (\text{H}_2\text{O})_6$	0,4
$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	0,5
HCl	1,3
$\text{CaCl}_2 (\text{H}_2\text{O})_2^*$	0,005

* $\text{CaCl}_2 (\text{H}_2\text{O})_2$ deve ser adicionado imediatamente antes do uso.

1. Após transferir as soluções estoque para um béquer, adicione 300 mL de água destilada.
2. Após adicionar água destilada, com o auxílio de um pHmetro, observe o pH do fluido. Provavelmente o fluido estará com o pH acima do desejado, neste caso, com o auxílio de um conta gotas de plástico adicione gotas de HCl sob constante agitação até que se obtenha o pH 3,0 (ideal para este caso).
3. Após atingir o pH 3,0, complete o volume com água destilada até 400 mL.
4. Por fim, transfira o fluido para um recipiente com tampa e guarde na geladeira. O fluido gástrico simulado pode

ser armazenado a -20 °C durante 1 ano em pequenas alíquotas de tamanho apropriado.

Fluido intestinal simulado- SIF (pH 7,0)

Com o auxílio de um pipetador, transfira para um béquer as seguintes quantidades dos reagentes previamente preparados (Tabela 4).

Tabela 4 – Quantidades de solução estoque SIF.

SOLUÇÃO ESTOQUE	QUANTIDADES (ML)
KCl	6,8
KH ₂ PO ₄	0,8
NaHCO ₃	42,5
NaCl	9,6
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	1,1
(NH ₄) ₂ CO ₃	-
HCl	0,7
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂ *	0,04

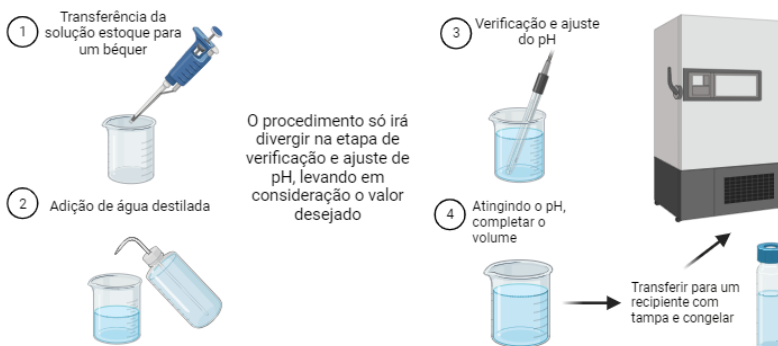
*CaCl₂ (H₂O)₂ deve ser adicionado imediatamente antes do uso.

1. Após transferir as soluções estoque para um béquer, adicione 300 mL de água destilada.
2. Após a adição de água destilada e com o auxílio de um pHmetro, observe o pH do fluido.

3. Se o pH não tiver ideal, com o auxílio de um conta gotas de plástico, adicione gotas de $\text{CaCl}_2 (\text{H}_2\text{O})_2$ ou de NaOH (1 M) sob constante agitação até que se obtenha o pH 7,0 (ideal para este caso).
4. Após atingir o pH 7, deve-se completar o volume com água destilada até 400 mL.
5. Por fim, transfira o fluido para um recipiente com tampa e guarde na geladeira. O fluido intestinal simulado pode ser armazenado a -20°C durante 1 ano em pequenas alíquotas de tamanho apropriado.

Figura 4 – Esquema de Preparo dos fluidos simulados.

Fluido salivar simulado - FSS (pH 7) Fluido gástrico simulado - FGS (pH 3) Fluido intestinal simulado - FIS (pH 7)



PRÁTICA 3 – DIGESTÃO ORAL SIMULADA

Este método de digestão (INFOGEST 2.0) inclui, mesmo para alimentos líquidos como o leite, a fase oral. Antes, em alimentos líquidos, a fase oral se torna opcional, haja vista que o

alimento permanece por pouco tempo na cavidade. No entanto, o novo protocolo recomenda que seja realizada esta fase.

1. Diluir o leite em FSS na proporção de 1:1 (peso/peso). A amilase salivar é necessária apenas para digerir alimentos que contenham amido. Por exemplo, 5 g de alimento para 5 g de FSS;
2. Medir o volume da mistura final (alimento + FSS). Anotar o volume.
3. Adicionar $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ para atingir uma concentração total de 1,5 mM em FSS;

Observação

Para leite, não necessita da adição de amilase salivar pois não é um alimento rico em amido.

4. Adicionar água tipo 1 para atingir uma concentração de 1× do FSS;
5. Incubar a mistura por 2 min a 37 °C.

PRÁTICA 4 – DIGESTÃO GÁSTRICA SIMULADA

Pré-aqueça a solução estoque de eletrólito FGS a 37 °C.

1. Colete 10 mL da fase anterior;
2. Em seguida transfira o material para um becker 100 mL;
3. Em seguida adicione 7,5 mL de solução estoque de FGS;

Observação

Essa adição da solução estoque de eletrólito FGS ao bolo oral deve ser calculada para atingir uma proporção final de 1:1 (v/v).

4. Adicione 5 μL de cloreto de cálcio CaCl_2 (0,3 M). Esta quantidade é calculada para atingir uma concentração final de 0,15 mM em FGS.
5. Verifique o pH e ajuste para 3,0 se necessário (com o auxílio da pipeta pasteur e pHmetro, adicione cuidadosamente gotas de HCl (6 M) até chegar no pH 3,0).

Observação

Neste momento, é importante que após a adição de cada gota da solução para ajuste de pH, a amostra seja levemente agitada com movimentos circulares. Em seguida, observe o resultado do pH obtido e, se necessário, repita o processo até chegar no pH desejado.

6. Adicione a solução de pepsina suína preparada em água para atingir uma atividade de 2.000 U/mL na mistura de digestão final.

NOTA

A adição da lipase gástrica (60 U/mL) é indicada apenas em alimentos que tenham mais de 50% de gordura em sua composição. Para leite, não é necessário adicioná-la.

Preparo da enzima

- Separe pequenos pedaços de papel alumínio para servir como suporte na pesagem da enzima.
- Pese 0,128 g de pepsina suína;

Preparo do substrato: adicione 0,5 g de hemoglobina a 20 mL de água destilada. Ajustar o pH para 2,0 com HCl a 300 mM.

Preparo da pepsina: misture 0,01 g de pepsina em 10 mL de tampão TRIS 10 mM contendo 150 mM de NaCl e pH 6,5. Obter diferentes concentrações de solução de pepsina (5-40 µg/mL) e armazenar as soluções de pepsina em gelo.

Ensaio da atividade enzimática: Pipetar 500 µL de hemoglobina; incubar os microtubos a 37 °C/5 min; adicionar 100 µL das soluções de pepsina para cada concentração e incubar por 10 minutos. Adicionar 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 5% (m/m); centrifugar as amostras a 6000 xg por 30 minutos; realizar a leitura das absorbâncias a 280 nm).

- Colete 1,6 mL do fluido gástrico simulado e adicione em um béquer, em seguida transfira a enzima previamente pesada, misture bem até observar que a enzima foi dissolvida e transfira a mistura para o recipiente com a amostra.
7. Leve a mistura para um tubo Falcon e encaixe o tubo em Erlenmeyer 250 mL;
 8. Adicione 0,700 mL de água tipo 1;
 9. Em seguida, deve-se aferir a temperatura da amostra com o auxílio de um termômetro.

Observação

Este valor é uma estimativa. O ideal é realizar o ensaio de reação da atividade enzimática. Este ensaio é realizado por espectrofotometria a 280 nm, utilizando hemoglobina de sangue bovino como substrato.

NOTA

Caso a temperatura das amostras esteja abaixo dos 37 °C, leve-as para banho maria e acompanhe o aumento da temperatura até alcançarem os 37 °C. Essa medida é necessária para garantir que a amostra siga para as próximas etapas com a temperatura correta, proporcionando a ativação correta da enzima.

10. Leve o Erlenmeyer com a amostra para incubação no Shaker por 2 horas a 37 °C à 90 rpm;

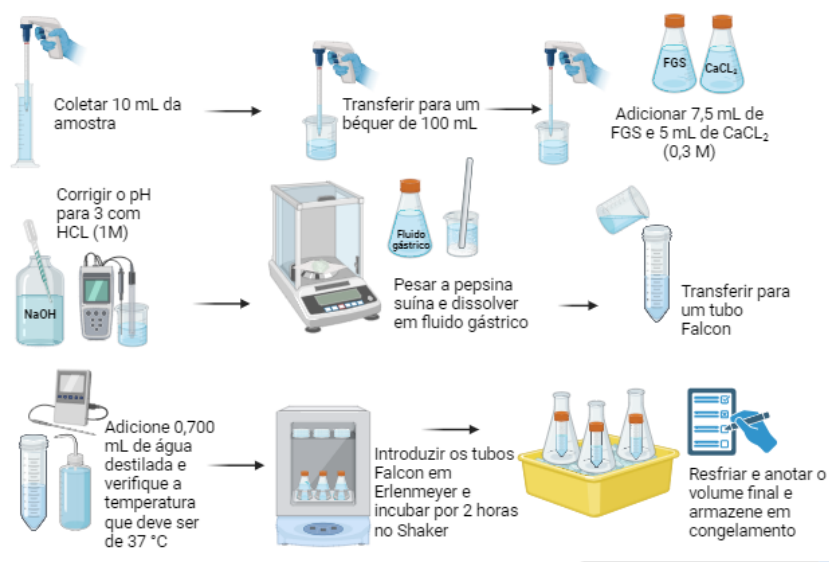
ATENÇÃO

Antes de inserir os frascos Erlenmeyer com as amostras no Shaker, é indicado realizar a verificação da temperatura dentro do aparelho. Nos casos em que a temperatura no interior do equipamento é inferior a 37 °C, deve-se aguardar até que a temperatura do interior chegue a temperatura ideal. Enquanto isso, as amostras podem permanecer em banho maria a 37 °C.

11. Passadas as 2 horas, retire o Erlenmeyer da incubadora Shaker e resfrie a amostra em banho de gelo com o objetivo de parar a atividade enzimática.

12. Anote o volume final obtido nesta fase, siga para a fase seguinte.

Figura 5 – Resumo das etapas da Fase gástrica.



Fonte: Criado em BioRender.com (2023).

PRÁTICA 5 – FASE INTESTINAL

1. Pré-aqueça a solução estoque de eletrólito FIS em banho-maria a 37 °C;
2. Colete 20 mL de químico gástrico;

3. Transfira para becker e adicione 11 mL de solução estoque eletrolítica de FIS (para atingir uma proporção final de 1:1 (v/v);
4. Adicione 4,0 microlitros de CaCl_2 (0,3);
5. Ajuste o pH, com o auxílio da pipeta Pasteur e pHmetro, adicionando cuidadosamente gotas de $\text{CaCl}_2 (\text{H}_2\text{O})_2$ ou de NaOH (1 M) até chegar no pH 7,0;
6. Adicione 1,31 mL de água tipo 1;
7. Inicie o preparo da enzima.

NOTA

Esta etapa pode ser iniciada com antecedência, porém a enzima só deve ser adicionada na mistura após o ajuste de pH.

Para o preparo da enzima:

- Separe pequenos pedaços de papel alumínio para servir como suporte na pesagem da enzima;
- Pese 0,04 g de pancreatina suína;
- Colete 5 mL do fluido intestinal simulado e adicione em um tubo Falcon. Em seguida, transfira para o banho ultrassônico por 5 minutos;
- Após esse tempo, centrifugue a 3000 xg por 5 minutos a 20 °C;

- Em seguida, colete o sobrenadante e transfira a mistura para o recipiente com a amostra para continuar o procedimento;
- 8. Em um pedaço pequeno de papel alumínio pese 0,5 g de sais biliares;
- 9. Adicione os sais biliares à mistura e com o auxílio de um bastão de vidro homogenize até que os sais sejam completamente dissolvidos;
- 10. Em seguida, transfira a mistura para tubo falcon e aco-ple em Erlenmeyer de 250 mL;
- 11. Verifique a temperatura da amostra com o auxílio de um termômetro.

NOTA

Caso a temperatura das amostras estejam abaixo dos 37 °C, leve-as para banho maria e acompanhe o aumento da temperatura até atingir 37 °C. Essa medida é necessária para garantir que a amostra esteja com a temperatura correta, proporcionando a ativação da enzima.

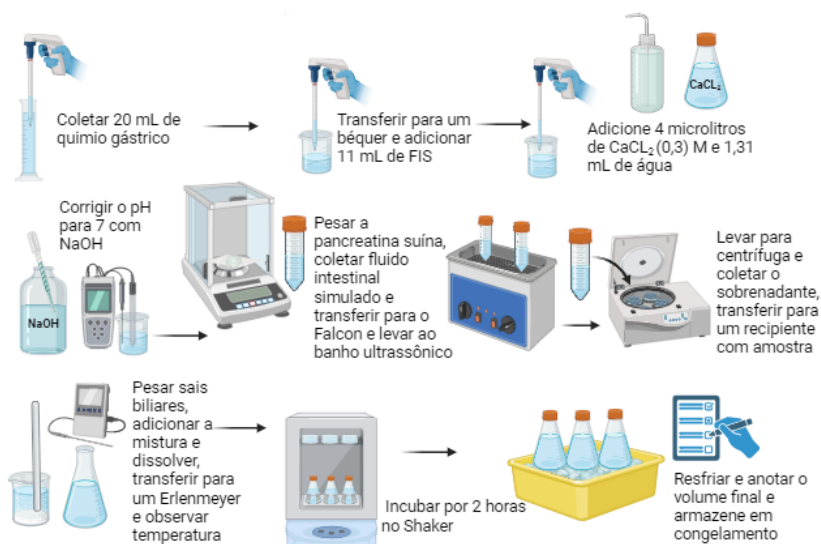
- 12. Leve para incubação no Shaker por 2 horas a 37 °C e 90 rpm;

ATENÇÃO

Deve-se aguardar até que a temperatura do interior do shaker chegue à 37 °C. Enquanto isso, as amostras podem permanecer em banho maria a 37 °C.

- 13.** Passadas as 2 horas, retire os frascos Erlenmeyer do shaker e resfrie a amostra em banho de gelo com o objetivo de parar a atividade enzimática.
- 14.** Anote o volume final obtido nesta fase e armazene sob congelamento para posteriores análises.

Figura 6 – Resumo das etapas da Fase gástrica.



Fonte: Criado em BioRender.com (2023).

Observação

O valor da pancreatina no item 7 é uma estimativa. O ideal é realizar o ensaio de reação da atividade enzimática. Este ensaio é realizado por espectrofotometria a 247 nm, utilizando TAME (Éster metílico de p-tolueno-sulfonil-L-ARGININA) como substrato.

ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados alcançados correspondem ao volume final que será obtido ao término da análise e aos dados gerados após a realização dos estudos posteriores. Ao concluir o procedimento, é recomendado que os materiais finais sejam armazenados em recipientes onde seja possível observar o volume total. Por fim, para conservar os fluidos e garantir a inativação das reações enzimáticas, as amostras devem ser congeladas.

REFERÊNCIAS

BRASIL ESCOLA. **Leite:** o que é, composição, alergia, importância: leite. Leite. Disponível em: <https://brasilecola.uol.com.br>. Acesso em: 14 out. 2023.

BRODKORB, André et al. "INFOGEST Static in Vitro Simulation of Gastrointestinal Food Digestion." **Nature Protocols**, v. 14, n. 4, p. 991–1014, 2019. <http://dx.doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>.

FERREIRA, M. P.; et al. A importância dos modelos gastrointestinais in vitro no estudo nutricional dos alimentos. **Ciências da Saúde: desafios e potencialidades em pesquisa**, v. 2, p. 15-29, 2023. <http://dx.doi.org/10.37885/230212212>.

GARCÍA-VILLALBA, R. et al. "Gastrointestinal Simulation Model TWIN-SHIME Shows Differences between Human Urolithin-Metabotypes in Gut Microbiota Composition, Pomegranate Polyphenol Metabolism, and Transport along the Intestinal Tract." **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 27, p. 5480-5493, 2017.

KONG, F.; DUC, H. T. "In Vitro Investigation of the Effect of Food Texture, Particle Size, and Viscosity on Gastric Disintegration and Emptying." **Food Bioengineering**, vol. 1, no. 1, p. 68-81, 2022.

LI, Y., et al. "Development of a Gastric Simulation Model (GSM) Incorporating Gastric Geometry and Peristalsis for Food Digestion Study." **Food Research International**, vol. 125, p. 108598, 2019.

Li, C.; et al. "Current in Vitro Digestion Systems for Understanding Food Digestion in Human Upper Gastrointestinal Tract." **Trends in Food Science & Technology**, vol. 96, p. 114-126, 2020.

MARZORATI, M.; et al. "The HMI (TM) Module: a New Tool to Study the Host-Microbiota Interaction in the Human Gastrointestinal Tract in Vitro." **BMC Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 133, 2014.

MINEKUS, M.; ALMINGER, M.; ALVITO, P.; BALLANCE, S.; BOHN, T.; BOURLIEU, C.; CARRIÈRE, F.; BOUTROU, R.; CORREDIG, M.; DUPONT, D. A standardised staticin vitrodigestion method suitable for food – an international consensus. **Food Funct.** v. 5, n. 6, p. 1113-1124, 2014. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c3fo60702j>.

VUIK, F.; et al. "Composition of the Mucosa-Associated Microbiota along the Entire Gastrointestinal Tract of Human Individuals." **United European Gastroenterology Journal**, v. 7, n. 7, p. 897-907, 2019.

WANG, Y. et al. "Influence of Gastrointestinal Tract on Metabolism of Bisphenol A as Determined by in Vitro Simulated System." **Journal of Hazardous Materials**, v. 355, p. 111-118, 2018.

YVON, M.; BEUCHER, S.; SCANFF, P.; THIROUIN, S., PELISSIER, J. In vitro simulation of gastric digestion of milk proteins: Comparison between in vitro and in vivo data. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 2, p. 239-244, 1992.

SOBRE OS AUTORES E AS AUTORAS

Aline Macedo Dantas

Pesquisadora e professora Colaboradora do Programa de Pós-graduação em Tecnologia Agroalimentar da Universidade Federal da Paraíba. Possui Doutorado em Ciência e Tecnologia de alimentos pela Universidade Federal da Paraíba (2022) e graduação em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal da Paraíba (2015). Tem experiência em Ciência e Tecnologia de Alimentos com ênfase em quantificação de compostos bioativos em frutas, avaliação das propriedades antioxidantes de compostos bioativos e da bioacessibilidade de compostos fenólicos em frutas.

Amanda Marília da Silva Sant'Ana

Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos – UFPB (2017), com período sanduíche na Università di Pisa, Itália (2014-2015). Mestra (2013) em Ciência e Tecnologia de Alimentos (UFPB) e Nutricionista pela Universidade Federal da Paraíba (2010). Realizou Estágio Pós-doutoral no Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição (2017 - 2018), UFPB. Tem experiência em pesquisas nas áreas de Nutrição e Ciência e Tecnologia de Alimentos, atuando principalmente nos temas: leites e derivados lácteos, controle de qualidade de alimentos, análises físico-químicas e sensoriais de alimentos, alimentos funcionais. Atualmente, é Professora Adjunta da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Departamento de Gestão e Tecnologia Agroindustrial (DGTA), Centro de Ciências Humanas, Sociais e Agrárias (CCHSA), onde é professora permanente do Programa de Pós-graduação em Tecnologia Agroalimentar (PPGTA/CCHSA/UFPB) e coordenadora do Laboratório de Cromatografia e Espectrometria (LaCE/CCHSA/UFPB).

Ana Regina Simplício de Medeiros

Aluna de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Agroalimentar (PPGTA/UFPB) e bolsista pela Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ). Possui graduação em Gastronomia pela Universidade Federal da Paraíba (2022), onde foi bolsista de Iniciação Científica, monitora e extensionista. Especialista em Panificação e Confeitaria. Tem experiência na área de Microbiologia, com foco em microbiologia dos alimentos e Tecnologia de Alimentos, com ênfase em elaboração de produtos e análises físico-químicas. Atua na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pesquisando e desenvolvendo fermentados, especialmente produtos para a panificação, com ênfase em fermentação natural e qualidade de alimentos.

Angela Maria Tribuzy de Magalhães Cordeiro

Professora Titular da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), vinculada ao Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), do Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional (CTDR), Campus I. Possui doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela UFPB (2013) e graduação em Agronomia UFAM (1998) e bacharel em Direito UNINORTE (2005). Atualmente é chefe do DTA/CTDR e faz parte do corpo docente do Programa de Pós-graduação Tecnologia Agroalimentar (PPGTA/UFPB). Atua como Pesquisadora do NPE-LACOM e do Laboratório de Tecnologia de Biocombustíveis do IDEP-UFPB. Tem experiência na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos, com ênfase em química de produtos naturais, explorando potencialidades de produtos de origem animal e vegetal da Caatinga, com destaques para análises Cromatográficas (GC/MS e HPLC).

Antônio Rosendo Costa

Graduado em Biologia pela Universidade Estadual Vale do Acaraú (2010), especialista na área de Ciências Ambientais, Técnico em Agroindústria pelo Colégio Agrícola Vidal de Negreiros (CAVN/UFPB) e graduado em

Bacharelado em Agroindústria no Centro de Ciências Humanas Sociais e Agrárias, pela Universidade Federal da Paraíba. Tem experiência na área de Química e Bioquímica aplicada a Alimentos, e também na área de Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, com ênfase em Aquicultura e no abate de animais de pequeno porte (peixe e rã). Atualmente é mestrando do Programa de Pós-graduação em Tecnologia Agroalimentar da UFPB.

Bruno Ranieri Lins de Albuquerque Meireles

Professor Classe C, Adjunto III, do Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar (CCTA) da Universidade Federal de Campina Grande, Campus Pombal. Engenheiro de alimentos pela Universidade Federal da Paraíba (2012). Mestre em Tecnologia Agroalimentar pela Universidade Federal da Paraíba (2014). Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal da Paraíba (2017). Tem experiência na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos, com ênfase em Tecnologia de Produtos de Origem Animal, atuando principalmente nos seguintes temas: produtos cárneos, análise físico-química, oxidação lipídica e análise cromatográfica de colesterol, ácidos graxos e compostos fenólicos. Desenvolve pesquisas com embalagens ativas e inteligentes para aplicação em produtos cárneos processados. Coordenador do Laboratório de Carnes, Ovos e Pescado do CCTA/UFCG. Coordenador de projetos PIBIC, PIBITI e PROBEX. Em 2022, ingressou como Professor Permanente do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Agroalimentar (PPGTA/UFPB).

Camila Sampaio Mangolim

Professora da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), vinculada ao Departamento de Gestão e Tecnologia Agroindustrial (DGTA) do Centro de Ciências Humanas, Sociais e Agrárias (CCHSA), campus III. Possui graduação em Engenharia de Alimentos pela UEM – Universidade Estadual de Maringá (2011), Mestrado (2013) e Doutorado (2017) em Ciência de

Alimentos pela mesma instituição. Atualmente, é vice-coordenadora do Programa de Pós-graduação Tecnologia Agroalimentar (PPGTA/UFPB), fazendo parte do corpo docente do mesmo. Tem experiência na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos, atuando na área de aditivos naturais para alimentos, especialmente na microencapsulação de pigmentos.

Cristiani Viegas Brandão Grisi

Pesquisadora e professora Colaboradora do Programa de Pós-graduação em Tecnologia Agroalimentar da Universidade Federal da Paraíba. Doutora em Engenharia Química pela Universidade Federal de Campina Grande (2019) e Graduada em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal da Paraíba (2005). Possui uma vasta experiência acadêmica, ministrou disciplinas nas áreas de tecnologia de alimentos, tecnologia de embalagem, processamento industrial de alimentos, princípio da conservação dos alimentos, operações unitárias, planejamento das instalações, empreendedorismo, sociedade e cidadania, e pesquisa aplicada. Mais de 10 anos de experiência corporativa, como coordenadora de projetos de melhoria contínua (Grupo Walmart Brasil) e como Engenheira Sênior em planejamento e desenvolvimento de projetos de novos produtos (Ford Motor Company do Brasil). Possui experiência nas áreas de desenvolvimento de novos produtos e tecnologia de embalagem, com ênfase em: embalagens biodegradáveis e comestíveis, embalagens inteligentes e ativas, novos ingredientes, compostos bioativos e análises de alimentos.

Elen Carla Alves da Silva

Nutricionista pela Universidade Federal de Campina Grande (UFCG-2021). Atualmente é Mestranda pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal da Paraíba (PPGCTA/UFPB). Atua como pesquisadora no grupo de pesquisa: Alimentos e Saúde: uma abordagem da Ciência da Nutrição (UFCG). Tem experiência em Ciências e Tecnologia de

Alimentos com ênfase em elaboração de produtos alternativos para patologias específicas, desenvolvimento de produtos cárneos *clean label*, oxidação lipídica e proteica de alimentos, compostos bioativos, antioxidantes naturais, aproveitamento integral de alimentos, qualidade microbiológica e composição físico-química e análise sensorial.

Euzimária Amanso Silva

Técnica em Nutrição e Dietética pelo Colégio Agrícola Vidal de Negreiros (CAVN), escola vinculada à Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Técnica em Alimentos pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte (IFRN). Graduanda em Bacharelado de Agroindústria pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Bolsista de Iniciação Científica com pesquisa na área de qualidade de leite e derivados.

Fabiano Queiroga da Silva

Graduado em Engenharia Ambiental pela Universidade Federal da Paraíba (2017). Tem experiência na área de Ciências Ambientais, com ênfase em Engenharia Ambiental, atuando principalmente nos seguintes temas: reutilização, universidade e sensibilização ambiental. Atualmente é mestrando do Programa de Pós-graduação em Tecnologia Agroalimentar da UFPB.

Fábio Anderson Pereira da Silva

Bolsista de Produtividade em Pesquisa nível 2, é Professor Adjunto (nível IV) no Departamento de Gestão e Tecnologia Agroindustrial (DGTA) do Centro de Ciências Humanas, Sociais e Agrárias (CCHSA) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Possui graduação em Engenharia de Alimentos pela UFPB (2010), mestrado em Tecnologia Agroalimentar pela UFPB (2012) e Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos também pela UFPB (2016) com estágio na Universidade

de Extremadura (Caceres, Espanha). Atualmente, é professor permanente no Programa de Pós Graduação em Tecnologia Agroalimentar (PPGTA/CCHSA/UFPB), onde é coordenador, e do Programa de Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA/CT/UFPB). Recebeu, no ano de 2017, Menção Honrosa no Prêmio Capes de Tese (Área: Ciência de Alimentos) de 2017. Atua em pesquisas com foco no estudo de processos oxidativos e promoção da qualidade de produtos cárneos e de pescado. Idealizador e apresentador do FoodCastBrasil, um podcast sobre Ciência e Tecnologia de Alimentos.

George Henrique Camêlo Guimarães

Atualmente é docente do Instituto Federal do Sertão Pernambucano, onde está como coordenador do curso de Agroindústria. Atua como orientador-docente colaborador nas especializações em Gestão dos Recursos Ambientais do Semiárido (IFPB), Ensino de Ciências da Natureza e Matemática (IFSertãoPE) e no Mestrado em Tecnologia Agroalimentar (PPGTA-UFPB). Engenheiro Agrônomo pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Mestre e Doutor, com estágio sanduíche pela Michigan State University, MSU, Estados Unidos. Possui experiência na área de Agroindústria, com ênfase em produção, colheita, pós-colheita, processamento e gestão agroindustrial.

Inês Maria Barbosa Nunes Queiroga

Médica Veterinária pela Universidade Federal de Campina Grande (2009). Mestre e Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos (2011-2017) pela UFPB. Atua na área de tecnologias de conservação e microbiologia de alimentos contemplando a temática de saúde pública que envolve o consumo de alimentos de origem animal, utilizando óleos essenciais como aditivos naturais em matrizes alimentícias e estudando sua capacidade antimicrobiana e antioxidante, com depósitos de patentes na área. Atualmente trabalha junto a Secretaria de Agricultura familiar da Paraíba com o desenvolvimento do Arranjo Produtivo Local

da Bovinocultura (leite e derivados) com ações voltadas à valorização, inovação e sustentabilidade da Agricultura Familiar.

Íris Braz da Silva Araújo

Engenheira de Alimentos pela Universidade Federal da Paraíba (2010), mestre em Tecnologia Agroalimentar pela Universidade Federal da Paraíba (2012) e doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal da Paraíba (2017). Está dentro do rol de cientistas mais influentes dos BRICS (Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul), dentre 20 pesquisadores da UFPB no ano de 2021. Professora da Universidade Federal da Paraíba, lotada no Departamento de Gestão e Tecnologia Agroindustrial, atua nos cursos técnicos em Agroindústria e em Nutrição e Dietética do CAVN. É membro permanente do Programa de Pós-graduação em Tecnologia Agroalimentar da UFPB (Campus III – Bananeiras). Tem experiência na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos, com ênfase em Tecnologia de Alimentos, atuando principalmente na Tecnologia de Carnes e Pescados, especialmente no aproveitamento de subprodutos para a obtenção de proteínas com propriedades bioativas.

Isabelly da Silva Ramalho

Bacharelanda em Agroindústria da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) – campus III (Bananeiras – PB), técnica em Agroindústria pelo CAVN/UFPB, bolsista Pibic-CNPQ e integrante do grupo de pesquisa Inovação e Promoção da Qualidade de Produtos Cárneos e Pescado UFPB, com pesquisas na área de obtenção de extratos pré-fermentados de beterraba e rúcula como fonte natural de nitrito para produtos cárneos.

Janáína Felizardo de Souza

Graduanda no curso de Bacharelado em Agroindústria (UFPB), bolsista de Iniciação Científica (CNPQ) e voluntária PROBEX nos projetos vinculados ao CCHSA – Capacitação de produtores na implantação da

caprinocultura leiteira no município de Gado Bravo; e Ações Educativas para qualificação de produtores e monitoramento da qualidade do leite. Tem experiência com grandes e pequenos ruminantes, atuando na área do leite na parte de obtenção, monitoramento (análises físico-químicas) e beneficiamento. É técnica em farmácia (O Parthenoon) e membro do grupo de estudos GECAL (Grupo de estudos em caprinocultura e leite caprino) e do GPLAC (Grupo de pesquisa em leite asinino e caprino).

José Evangelista Santos Ribeiro

Engenheiro de Alimentos pela Universidade Federal da Paraíba (2011). Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos (UFPB – 2014) e Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos (UFPB – 2018), com período sanduíche na Università di Pisa, Itália (2014-2015). Atualmente é Técnico de Laboratório na área de alimentos e laticínios, na Universidade Federal da Paraíba. Tem experiência em pesquisas nas áreas de Ciência, Engenharia e Tecnologia de Alimentos e de Biotecnologia, com ênfase em ciência e tecnologia de laticínios, análises reológicas de alimentos e bioprocessos para obtenção de moléculas bioativas a partir de microrganismos.

José Narciso Francisco da Silva Filho

Acadêmico do curso de Bacharelado em Agroindústria pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB), campus III – Bananeiras. Atuou como tutor, monitor, com atividades extensionistas e com pesquisas na área de Biotecnologia Agroalimentar. Na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos desenvolveu pesquisas com a utilização de insetos comestíveis como matéria-prima na elaboração de novos produtos. Atuou como Consultor (2019) e Diretor de Comercial e Marketing (2022) da EJ Agrocon Jr., do curso de Bel. em Agroindústria. Atualmente atua em pesquisas para obter e caracterizar extratos pré-fermentados de beterraba e rúcula como fonte natural de nitrito para produtos cárneos (clean label).

Jossana Pereira de Sousa Guedes

Professora do Ensino Básico, Técnico e Tecnológico (EBTT) no Colégio Agrícola Vidal de Negreiros (CAVN), escola vinculada à Universidade Federal da Paraíba (UFPB). É vinculada ao Departamento de Gestão e Tecnologia Agroindustrial (DGTA) do Centro de Ciências Humanas, Sociais e Agrárias (CCHSA) da UFPB, campus III. Doutora em Nutrição, com área de concentração em Ciência dos Alimentos, pela Universidade Federal de Pernambuco (2017) e Vencedora do Prêmio Capes de Tese 2018 na área de Nutrição. Possui Mestrado em Nutrição, com área de concentração em Ciência dos Alimentos, pela Universidade Federal de Pernambuco (2012) e Graduação em Nutrição pela Universidade Federal da Paraíba (2009). Atualmente, exerce a função de Coordenadora do Curso Técnico em Nutrição e Dietética do CAVN. Tem experiência na área de ciência de alimentos, microbiologia de alimentos e controle do desenvolvimento de microrganismos por meio do uso de antimicrobianos naturais.

Laíza Soliely Costa Gonçalves

Doutoranda em Engenharia de Processos, na área de bioprodutos, pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos PPGE/UFPG. Mestra em Tecnologia Agroalimentar – PPGTA/UFPB (2021). Bacharela em Agroindústria na Universidade Federal da Paraíba (2020). Técnica em Agroindústria pelo Colégio Agrícola Vidal de Negreiros – CAVN/CCHSA (2021). Pesquisadora do Grupo de Estudos em Laticínios (GEL) e no Grupo de Pesquisa em Ciência e Tecnologia de Leite Asinino (GPLA) da Universidade Federal da Paraíba. Tem experiência na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos e produção animal, atuando nos temas: controle de qualidade, processamento de frutas, elaboração de produtos e alimentos com alegações funcionais (prebióticos e probióticos), análise físico-química de alimentos, grãos de kefir e elaboração de derivados lácteos caprino, bovino e asininos.

Marcelo Wesley da Silva Barbosa

Bacharel em Nutrição pela Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). Foi integrante do Grupo de Pesquisa e Estudos em Nutrição Experimental (LANEX/CES/UFCG) e do Grupo de pesquisa e estudos em nutrição experimental (GEPEX). Participou do Programa de Iniciação à Docência e as Práticas do Profissional da Saúde (PRE/UFCG). Atualmente é mestrando em Tecnologia Agroalimentar na Universidade Federal da Paraíba (UFPB), atuando na área de ciência e qualidade de leite e derivados.

Maria de Fátima Clementino dos Santos

Técnica em Agroindústria pelo Colégio Agrícola Vidal de Negreiros CAVN da Universidade Federal da Paraíba UFPB (2016), com experiência na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos, e ênfase em Análise Sensorial de Alimentos e Ciência e Tecnologia de Alimentos. Bacharel em Agroindústria pela Universidade Federal da Paraíba UFPB (2021), com experiências no ensino de Química através dos alimentos. Atualmente é mestranda do Programa de Pós-graduação em Tecnologia Agroalimentar da UFPB, atuando em pesquisas para obter e caracterizar extratos vegetais como fonte natural de nitrito para produtos cárneos.

Max Suel Alves dos Santos

Técnico em Agroindústria formado pelo Colégio Agrícola Vidal de Negreiros (CAVN) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), campus III. Bacharel em Agroindústria pela UFPB. Atualmente é aluno de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Agroalimentar. Tem experiência em projetos de ensino, atuando como monitor acadêmico em disciplinas das áreas de Ciência animal, Tecnologia de alimentos e Gestão empresarial. Na pesquisa atua nas áreas de análise físico-química, análise microbiológica, extração de biocompostos e desenvolvimento de novos produtos.

Michela de Lima Bezerra

Mestranda no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Agroalimentar - PPGTA/UFPB. Bacharela em Agroindústria pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB) Campus III - Bananeiras - PB. Pós Junior - Agrocon Jr. Tem experiência na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos, atuando principalmente nos seguintes temas: Análises laboratoriais, Elaboração de novos produtos, Controle de Qualidade, Tratamento de resíduos agroindustriais e subprodutos. Membro Associado no Grupo de Pesquisa: Grupo de Estudos e Pesquisas da Produção Agroindustrial e Sustentabilidade – GEPROAS.

Michele Santos de Oliveira

Bacharela em agroindústria pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB), técnica em agropecuária pela Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) e estagiária da Cooperativa Potiguar de Apicultura e Desenvolvimento Rural e Sustentável- COOPAPI através do projeto de Agroresidência, subsidiado pelo Instituto Federal do Rio Grande do Norte (IFRN). Atualmente é mestrando do Programa de Pós-graduação em Tecnologia Agroalimentar da UFPB, atuando na área de ciência e qualidade de leite e derivados.

Neylton Marinho da Rocha

Graduando em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal de Campina Grande - Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar e Técnico em Agroindústria formado pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte - Escola Agrícola de Jundiá (2016), com experiência na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Patrícia Lima Araújo

Aluna de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Agroalimentar pela Universidade Federal da Paraíba (PPGTA/UFPB). Bacharel em Nutrição pelo Centro de Educação e Saúde (CES) da Uni-

versidade Federal de Campina Grande (UFCG). Foi estagiária do Hospital Universitário Alcides Carneiro (HUAC/EBSERH/UFCG) no Setor de Nutrição e Dietética, e no Setor de Nutrição Clínica. Atuou como monitora (PRE/UFCG) e foi aluna de iniciação científica na área de Tecnologia de Alimentos. Tem experiência na área de Bioquímica com ênfase em bioquímica geral e bioquímica metabólica; Tecnologia de Alimentos com ênfase em elaboração de produtos alimentícios, análises físico-química e sensorial; Tecnologia de Embalagem com ênfase no desenvolvimento de embalagens biodegradáveis e comestíveis, inteligente e ativa para aplicação em produtos cárneos.

Sthelio Braga da Fonseca

Engenheiro de Pesca pela Universidade Federal Rural de Pernambuco (2008), mestre em Tecnologia Agroalimentar pela Universidade Federal da Paraíba (2011) e doutor em Zootecnia pela Universidade Federal da Paraíba (2015) com período Sanduíche (2013) na Universidade do Porto (Portugal). Atualmente é professor Adjunto III da Universidade Federal de Campina Grande, lotado na Unidade Acadêmica de Tecnologia de Alimentos. Tem experiência na área de Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, com ênfase em produção e tecnologia do pescado. Atua como professor permanente do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Agroalimentar do CCHSA/UFPB.

Valquíria Cardoso da Silva Ferreira

Engenheira de Alimentos pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB) (2010), com mestrado em Tecnologia Agroalimentar (2012) e doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos (2016) pela mesma universidade, com participação no Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) na Universidade de Extremadura, Caceres, Espanha. Atua como Engenheira de Alimentos na Universidade Federal da Paraíba, campus III - Bananeiras. Tem experiência na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos, com ênfase em Ciência de Alimentos, atuando principalmente

nos seguintes temas: carnes, controle de qualidade, oxidação lipídica e proteica de carnes e produtos cárneos, antioxidantes em produtos cárneos, qualidade microbiológica e análises de alimentos.

Weysser Felipe Cândido de Souza (*in memorian*)

Técnico Agrícola com habilitação em Agroindústria pelo Colégio Agrícola Vidal de Negreiros. Bacharel em Agroindústria pela Universidade Federal da Paraíba. Mestre em Tecnologia Agroalimentar, tendo desenvolvido pesquisas na área de controle microbiano utilizando óleos essenciais verificando seu potencial como conservantes naturais em goiaba minimamente processada. Doutor em Ciência de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas, tendo desenvolvido pesquisas na área de bioprocessos envolvendo o cultivo de micro-organismos produtores de glicosiltransferases e sua posterior imobilização em gomas alternativas para a produção biotecnológica de isomaltulose. Atuou como bolsista pós-doutoral do Programa de Pós-graduação em Tecnologia Agroalimentar da UFPB.

