



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO



GABRIELLE MAHARA MARTINS AZEVÊDO CASTRO

**NANOENCAPSULAÇÃO DE ÓLEO DE BURITI (*Mauritia flexuosa*) EM ALGINATO  
E GELATINA: CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE E  
POTENCIAL ANTIMICROBIANO**

NATAL/RN

2018

GABRIELLE MAHARA MARTINS AZEVÊDO CASTRO

**NANOENCAPSULAÇÃO DE ÓLEO DE BURITI (*Mauritia flexuosa*) EM ALGINATO E GELATINA: CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE E PONTENCIAL ANTIMICROBIANO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito obtenção do título de Mestre para a defesa da dissertação.

Orientador(a): Prof. Dra. Cristiane Fernandes de Assis

Co-Orientador(a): Prof. Dra. Thaís Souza Passos

NATAL/RN

2018

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN  
Sistema de Bibliotecas - SISBI  
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial do Centro Ciências da Saúde - CCS

Castro, Gabrielle Mahara Martins Azevedo.

Nanoencapsulação de óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*) em alginato e gelatina: caracterização e avaliação da solubilidade e potencial antimicrobiano / Gabrielle Mahara Martins Azevedo. - 2019.

79f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde, Pós-Graduação em Nutrição. Natal, RN, 2019.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Fernandes de Assis.

Coorientadora: Prof. Dra. Thaís Souza Passos.

1. Compostos fenólicos - Dissertação. 2. Emulsificação O/A - Dissertação. 3. Óleos vegetais - Dissertação. I. Assis, Cristiane Fernandes de. II. Passos, Thaís Souza. III. Título.

RN/UF/BSCCS

CDU 613.2:665.3

GABRIELLE MAHARA MARTINS AZEVEDO CASTRO

NANOENCAPSULAÇÃO DE ÓLEO DE BURITI (*Mauritia flexuosa*) EM  
ALGINATO E GELATINA: CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA  
SOLUBILIDADE E PONTENCIAL ANTIMICROBIANO.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Nutrição da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial  
à obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Aprovada em 29 de novembro de 2018.

Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Karine Cavalcanti Maurício de Sena Evangelista  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Nutrição  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN

**BANCA EXAMINADORA**

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristiane Fernandes de Assis  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN  
Orientadora

Prof. Dr. Arnóbio Antônio da Silva Júnior  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN  
Membro Interno

Jailane de Souza Aquino  
Universidade Federal da Paraíba - UFPB  
Membro Externo

*É preciso chover o suficiente para que  
haja crescimento...*

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por ter me proporcionado a realização deste sonho e me dado forças para suportar os diversos momentos de dificuldades e cansaço, não me fazendo desistir.

Aos meus amados pais, **Maria de Fátima e José Robson**, por me apoiarem e incentivarem durante toda minha trajetória acadêmica.

Ao meu esposo e grande amigo **Bruno de Paiva e Silva Castro** que me deu suporte em todo o percurso de construção e desconstrução desse trabalho.

As minhas orientadoras professoras Dra. **Cristiane Fernandes e Thais Passos**, que me incentivaram no desenvolvimento deste grande trabalho e acreditaram em mim.

A todos os **Técnicos de Laboratórios, Vigilantes, Auxiliares de Serviços Gerais (ASGs) e Estudantes de Pós-graduação** que de alguma forma contribuíram imensamente na obtenção de cada resultado desta pesquisa.

Em especial, a toda a **Equipe de Nutrição do Hospital Universitário Ana Bezerra**, por todo o apoio e incentivo, especialmente nos momentos mais difíceis que passei durante o tempo dedicado à finalização desta pesquisa e contemplação desta nova conquista.

À nutricionista e grande amiga **Amanda Mendes**, que me incentivou desde o início a realizar o sonho de fazer o Mestrado, um exemplo de pessoa perseverante em prol de conquistar seus sonhos, enfrentar grandes batalhas e renascer para a vida.

Por fim, dedico a todos os(as) **amigos(as) e professores(as)** pelas palavras de incentivo, conforto, força e apoio nesta reta final, rumo à defesa.

## RESUMO

O óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*) apresenta grande potencial funcional por apresentar elevados teores de carotenoides, ácido oleico e compostos fenólicos. Entretanto, a lipossolubilidade e fácil oxidação dos compostos bioativos limitam a aplicação como ingrediente em alimentos. Com base nisso, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito isolado e conjugado de gelatina suína e alginato de sódio na encapsulação do óleo de buriti, e o efeito na solubilidade e potencial antimicrobiano. O óleo vegetal foi fornecido pela empresa Plantus S.A. e, foi submetido à caracterização química (perfil de ácidos graxos e compostos fenólicos) e avaliação da atividade antimicrobiana. A encapsulação foi realizada pela técnica de emulsificação óleo/água, utilizando Tween 20 como tensoativo. Os encapsulados obtidos foram caracterizados por MEV, FTIR, Difração a Laser, Potencial Zeta, DRX, e eficiência de incorporação (%). Além disso, foram avaliados quanto à solubilidade e potencial antimicrobiano comparado ao óleo bruto. O perfil de ácidos graxos mostrou predomínio de ácido linoleico w-6 (53,36%) e ácido palmítico (25,75%). O composto fenólico que apresentou maior concentração foi a quercetina [20,53 (0,37) µg/g]. O estudo de caracterização mostrou que os encapsulados a base de gelatina (OGS) apresentaram formato esférico, superfície lisa e pouca aglomeração, comparado ao obtido por meio da combinação de agentes encapsulantes (OAG). O FTIR indicou novas interações químicas presentes nos encapsulados devido à formação de novas bandas vibracionais, principalmente para OGS que apresentou maior atenuação das vibrações presentes no óleo bruto. As eficiências de encapsulação obtidas para OGS e OAG foram, respectivamente, de 86,80% e 71,91% ( $p < 0,05$ ). Quanto à solubilidade em água, OGS apresentou maior percentual [89,83 (2,59)%] comparado a OAG [42,84 (2,21)%] e ao óleo de buriti puro [3,91 (0,39)%]. Em relação à inibição do crescimento (%) de *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumonia*, OGS preservou a atividade antimicrobiana do óleo de buriti puro ( $p > 0,05$ ). Portanto, a encapsulação do óleo de buriti em gelatina foi uma estratégia promissora para aumentar o potencial de utilização do óleo como ingrediente em alimentos.

**Palavras-Chaves:** Ácidos graxos; Compostos fenólicos; Emulsificação O/A; Óleos vegetais.

## ABSTRACT

Buriti oil (*Mauritia flexuosa*) presents great functional potential because it presents high levels of carotenoids, oleic acid and phenolic compounds. However, the liposolubility and oxidation of the bioactive compounds limit application as an ingredient in food. Based on this, the objective of the present study was to evaluate the isolated and conjugated effect of porcine gelatin and sodium alginate on buriti oil encapsulation, and the effect on solubility and antimicrobial potential. The vegetable oil was supplied by Plantus S.A. and was submitted to chemical characterization (profile of fatty acids and phenolic compounds) and evaluation of antimicrobial potential. The encapsulation was performed by the oil/water emulsification technique, using Tween 20 as a surfactant. The encapsulates obtained were characterized by MEV, FTIR, Laser Diffraction, Zeta Potential, XRD, and incorporation efficiency (%). In addition, they were evaluated for solubility and antimicrobial potential compared to crude oil. The fatty acid profile showed predominance of linoleic acid (53.36%) and palmitic acid (25.75%). The phenolic compound that presented the highest concentration was quercetin (20.53 (0.37)  $\mu\text{g/g}$ ). The characterization study showed that the encapsulates based on gelatin (OGS) presented spherical shape, smooth surface and low agglomeration, compared to that obtained through the combination of encapsulating agents (OAG). The FTIR indicated new chemical interactions present in the encapsulates due to the formation of new vibrational bands, mainly for OGS that presented greater attenuation of the vibrations present in the crude oil. The encapsulation efficiencies obtained for OGS and OAG were, respectively, 86.80% and 71.91% ( $p < 0.05$ ). In relation to water solubility, OGS had a higher percentage [89.83 (2.59)%] than OAG [42.84 (2.21)%] and pure buriti oil [3.91 (0.39) %]. Regarding the inhibition of growth (%) of *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumonia*, OGS preserved the antimicrobial activity of pure buriti oil ( $p > 0.05$ ). Therefore, it can be concluded that the encapsulation of buriti oil in gelatin was a promising strategy to increase the potential of buriti oil use in foods.

Key words: Emulsification O/W; Fatty acids; Phenolic compounds; Vegetable oils.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fruto e óleo de buriti.....	17
Figura 2 - Estruturas químicas dos grupos de carotenoides.....	18
Figura 3 - Estrutura molecular do alginato de sódio. ....	23
Figura 4 - Estrutura molecular da gelatina.....	24
Figura 5 - Fluxograma de obtenção do óleo de buriti por fermentação.....	27
Figura 6 - Fluxograma do Protocolo de obtenção dos extratos hidrofílico (FH) e lipofílico (FL) do óleo de buriti.....	32
Figura 7 - Encapsulados em pó a base de óleo de buriti (Mauritia flexuosa) obtidos pela técnica de emulsificação O/A.....	49
Figura 8 - Micrografias obtidas por MEV das partículas em pó, dispersas em acetona, obtidas pela técnica de emulsificação O/A.....	50
Figura 9 - Espectros de FTIR dos encapsulados obtidos pela técnica de emulsificação O/A.....	52
Figura 10 - Distribuição de tamanho de partícula por Difração a Laser de partículas encapsulados em pó, obtidos pela técnica de emulsificação O/A, reticulados e redispersos em acetona para mensuração.....	54
Figura 11 - Difrátogramas de raios X dos encapsulados em pó obtidos pela técnica de emulsificação O/A.....	57

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Perfil de ácidos graxos do óleo de buriti ( <i>M. flexuosa</i> ) determinado por Cromatografia Gasosa dos ésteres metílicos de ácidos graxos.....	42
Tabela 2 - Caracterização físico-química do óleo de buriti ( <i>M. flexuosa</i> ) obtido via biotecnologia.....	43
Tabela 3 - Teor de minerais no óleo de buriti ( <i>M. flexuosa</i> ) obtido por biotecnologia.....	45
Tabela 4 - Perfil de compostos fenólicos presentes na fração hidrofílica do óleo de buriti ( <i>M. flexuosa</i> ), obtido por CLAE, utilizando os padrões comerciais de ácido gálico, catequina, ácido vanílico, ácido siríngico, ácido elágico, vanilina e quercetina.....	46
Tabela 5 - Atividade antioxidante nas frações hidrofílicas e lipofílicas do óleo de buriti ( <i>M. flexuosa</i> ) obtido por biotecnologia.....	48
Tabela 6 - Média e desvio-padrão do percentual de inibição do crescimento microbiano para os microrganismos <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Klebsiella pneumonia</i> , pelo óleo bruto de buriti ( <i>Mauritia flexuosa</i> ), encapsulados em gelatina suína (OGS), na concentração de 2,5 mg.mL <sup>-1</sup> .....	60

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	15
2.1 OBJETIVO GERAL .....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	16
3.1 BURITI ( <i>Mauritia flexuosa</i> ) .....	16
3.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO DE BURITI .....	17
3.2.1 CAROTENOIDES .....	17
3.2.2 ÁCIDOS GRAXOS .....	19
3.2.3 COMPOSTOS FENÓLICOS .....	19
3.3 ENCAPSULAÇÃO .....	20
3.3.1 TÉCNICAS DE ENCAPSULAÇÃO .....	21
3.3.2 AGENTES ENCAPSULANTES .....	22
3.3.2.1 ALGINATO .....	22
3.3.2.2 GELATINA .....	23
3.4 CARACTERIZAÇÃO DE PARTÍCULAS .....	24
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	26
4.1 MATERIAL .....	26
4.2 OBTENÇÃO DO ÓLEO .....	26
4.3 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO DE BURITI .....	27
4.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO ÓLEO DE BURITI .....	28
4.4.1 ÍNDICES DE ACIDEZ (IA) E DE SAPONIFICAÇÃO (IS) .....	28
4.4.2 ÍNDICE DE PERÓXIDO (IP) .....	29
4.4.3 ÍNDICE DE IODO PELO MÉTODO DE WIJS .....	29
4.4.4 ÍNDICE DE REFRAÇÃO (IR) .....	29

4.4.5 DETERMINAÇÃO DE UMIDADE VOLÁTIL .....	29
4.4.6 IMPUREZAS INSOLÚVEIS EM ÉTER .....	29
4.4.7 RESÍDUO MINERAL FIXO .....	29
4.4.8 DENSIDADE RELATIVA.....	30
4.4.9 VISCOSIDADE DINÂMICA.....	30
4.5 DETERMINAÇÃO DE MINERAIS NO ÓLEO DE BURITI.....	30
4.6 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE FENÓLICOS PRESENTES NO ÓLEO DE BURITI .....	31
4.6.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS HIDROFÍLICO E LIPOFÍLICO A PARTIR DO ÓLEO DE BURITI .....	31
4.6.2 ANÁLISE DO PERFIL DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR CLAE ...	32
4.7 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO DE BURITI..	33
4.7.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR 2,2-DIFENIL-1-PICRIL-HIDRAZIL (DPPH) 34	
4.7.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (TCA).....	34
4.7.3 TESTE DO PODER REDUTOR .....	34
4.7.4 TESTE DE SEQUESTRO DE ÍONS SUPERÓXIDO.....	35
4.8 ENCAPSULAÇÃO DO ÓLEO DE BURITI.....	35
4.8.1 OBTENÇÃO DO ÓLEO DE BURITI ENCAPSULADO.....	35
4.8.2 CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS OBTIDAS.....	37
4.9 ENSAIO DE DISPERSÃO EM ÁGUA .....	39
4.10 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROMIANA DO ÓLEO DE BURITI E DOS ENCAPSULADOS OBTIDOS.....	39
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
5.1 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS.....	41
5.2 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS.....	43
5.3 ANÁLISE DE MINERAIS.....	45

5.4 PERFIL DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	46
5.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	47
5.6 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	49
5.7 MICROSCOPIA DE VARREDURA (MEV).....	50
5.8 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSPORTADA DE FOURIER (FTIR).....	51
5.9 DIFRAÇÃO A LASER.....	54
5.10 POTENCIAL ZETA.....	55
5.11 DIFRAÇÃO DE RAIO X (DRX).....	57
5.12 EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO DO ÓLEO DE BURITI.....	58
5.13 ENSAIO DE DISPERSÃO EM ÁGUA.....	59
5.14 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	59
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>61</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>62</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os óleos vegetais são destinados na indústria à elaboração de diversos produtos, como margarinas, maioneses, cremes vegetais, a fim de contribuir na cremosidade e sabor desses produtos.<sup>1,2</sup>

Óleos da região Amazônica, por outro lado, têm sido investigados pelas propriedades físico-químicas de seus constituintes que os promovem a aplicações com fins comerciais não somente na área de alimentos, como também na cosmética e/ou farmacêutica.<sup>3,4</sup>

Dentre esses óleos pesquisados, o óleo de buriti é um deles, cujo fruto, o buriti, é oriundo do buritizeiro (*Mauritia flexuosa*), uma palmeira nativa da Região Amazônica, que pode ser inclusive, encontrada no Cerrado, Regiões Nordeste, Centro-Sul do Brasil, sazonalmente; e, em toda a América do Sul.<sup>4,5</sup>

Este fruto é conhecido por sua polpa de forte coloração amarelo-alaranjado, da qual é extraído o óleo com alta e predominante concentração de carotenoides, principalmente de  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno e zeaxantina.<sup>6</sup> Além disso, este óleo se destaca pelas características antioxidantes e pelo alto teor de ácido graxo oleico, o qual, o classifica como um óleo monoinsaturado.<sup>4,7,8</sup>

Esses compostos bioativos presentes no óleo de buriti, por sua vez, promovem a este produto uma importante capacidade antioxidante, associando seu consumo a potenciais propriedades antioxidantes, com conseqüente apelo mercadológico em alimentos.<sup>9,10</sup> Além disso, estudos mostram o potencial em relação ao uso deste óleo como vermífugo e antimicrobiano.<sup>11,12,13</sup>

A dificuldade de dispersão em água dos óleos, os sabores indesejáveis e a instabilidade de alguns compostos bioativos, frente à exposição de fatores ambientais, dificultam a aplicação dos óleos vegetais, como o de buriti, em alimentos. Para reverter esta problemática, a utilização da encapsulação para proteger os óleos contra a oxidação lipídica e controlar a liberação de substâncias bioativas, como os carotenoides e compostos fenólicos, é de interesse crescente.<sup>14,15,16</sup>

A utilização do alginato de sódio e gelatina suína como agentes encapsulantes nesta tecnologia, por sua vez, tem sido citada por autores, frente ao baixo custo e por serem biodegradáveis, biocompatíveis e atóxicos, características favoráveis à aplicação em alimentos.<sup>17,18</sup>

Além disso, estudos que obtiveram micro e nanoencapsulados a base de óleos vegetais, mostraram resultados promissores na aceitabilidade em relação aos aspectos sensoriais, na estabilidade oxidativa dos ácidos graxos essenciais, bem como na proteção de compostos fenólicos presentes nos óleos.<sup>19,20</sup>

Esta técnica aplicada à tecnologia dos alimentos é uma conquista tecnológica de grande valia ao permitir a utilização desses e outros produtos como ingredientes alternativos em matrizes alimentares.<sup>15,16,21</sup>

Com base nisso, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito isolado e conjugado da gelatina suína e alginato de sódio na encapsulação de óleo de buriti, visando produzir um insumo capaz de preservar as propriedades do óleo.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Produzir e caracterizar o óleo de buriti encapsulado em diferentes agentes encapsulantes, e avaliar a solubilidade e o potencial antimicrobiano.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Caracterizar os ácidos graxos do óleo de buriti.
- Quantificar o teor de compostos fenólicos presentes no óleo de buriti.
- Promover a encapsulação do óleo de buriti, utilizando gelatina suína, alginato, e a combinação destes como agentes encapsulantes.
- Caracterizar as partículas obtidas por métodos físicos e químicos.
- Determinar a eficiência de incorporação do óleo nas partículas obtidas.
- Avaliar a solubilidade do óleo de buriti na forma bruta e encapsulada.
- Determinar a atividade antimicrobiana no óleo de buriti na forma bruta e encapsulada.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 BURITI (*Mauritia flexuosa*)

O buriti da espécie *Mauritia flexuosa* é um fruto proveniente do buritizeiro, uma palmeira nativa do Brasil e pode ser localizada em todo o Sul da América. A palmeira pertence à família das Arecaceae, sendo encontrada em matas de terra firme, matas inundadas, ambientes degradados e planícies úmidas a beira de rios.<sup>4,5,22</sup>

Suas palmeiras estão presentes em maior proporção na região Amazônica, porém devido ao seu grande mecanismo de dispersão, podem ser encontrados sazonalmente inclusive em alguns Estados do Nordeste, podendo variar a composição das partes do fruto e rendimento médio da polpa e de seus subprodutos, como o óleo.<sup>22,23,24</sup>

Atualmente, o buritizeiro fornece materiais para uma variedade de aplicações que abrangem desde produtos cosméticos, medicinais, artesanais a alimentícios à população regional.<sup>23,25,26</sup> Dentre os produtos alimentícios derivados do buriti destacam-se sucos, licores, sorvetes, vinhos, doces e óleos, atrativos pela forte coloração alaranjada.<sup>23</sup>

O óleo de buriti, por sua vez, pode ser obtido exclusivamente a partir da polpa do fruto e/ou da polpa juntamente com as cascas, resultando em um produto de coloração vermelho-alaranjada (Figura 1).<sup>4,24</sup> Segundo Carvalho e colaboradores<sup>9</sup> ele pode ser obtido por diferentes métodos de extração considerados convencionais, capazes de influenciar nas características do produto. Por possuir uma aplicação ampla e variada, esse óleo vegetal tornou-se de grande interesse nas indústrias de cosméticos e de produtos alimentícios, devido a sua composição química.<sup>4,23</sup>



**Figura 1.** Fruto e óleo de buriti. Fonte: <http://www.dicasdouro.com/2016/06/beneficios-do-oleo-de-buriti.html> Disponível em: 18.03.18

### 3.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO DE BURITI

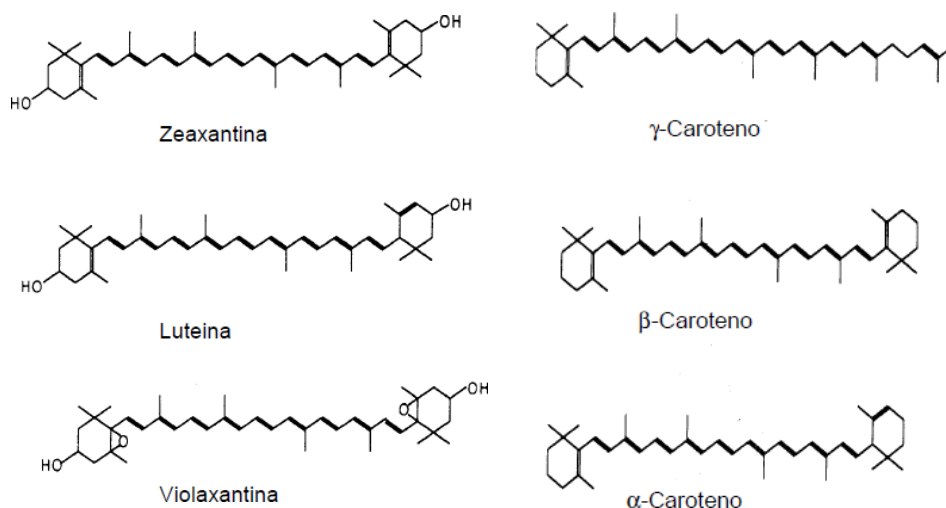
O valor nutricional de óleos vegetais como o de buriti pode variar conforme a sua composição química.<sup>8</sup> Autores afirmam que fatores como sazonalidade, estação do ano, clima, área geográfica, composição do solo, além das condições de produção, forma de colheita da matéria-prima, tipo de extração e armazenamento são capazes de influenciar no produto final.<sup>27</sup>

O grau de estabilidade do produto, características sensoriais e concentrações dos constituintes químicos dos óleos, como ácidos graxos, substâncias bioativas, são exemplos de resultados que podem ser influenciados nas condições em que as matérias-primas estão expostas.<sup>27,28,29</sup>

#### 3.2.1 CAROTENOIDES

Os carotenoides são compostos orgânicos do tipo tetraterpenoides, por possuírem oito unidades de isopreno totalizando 40 átomos na cadeia.<sup>6</sup> São pigmentos naturais com alto poder antioxidante e/ou atividade pró-vitamina A, também responsáveis pelas colorações amarela, laranja e vermelha de vários vegetais, fontes destes pigmentos.<sup>26</sup>

Esta propriedade marcante nos carotenoides é em consequência de uma distinta característica em suas estruturas, que consistem em um extenso sistema de duplas ligações conjugadas *trans* entre os átomos de carbono, proporcionando-lhes a capacidade cromófora - Figura 2.<sup>30</sup>



**Figura 2.** Estruturas químicas dos grupos de carotenoides. Fonte: Rodrigues-Amaya (1997).

O grande número de duplas ligações conjugadas torna estes pigmentos com alta reatividade, de fácil oxidação e isomerização, com consequente alteração na coloração do produto e, até mesmo, a destruição destes antioxidantes no alimento.<sup>31,32,33</sup>

O óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*), por sua vez é reconhecido como uma das fontes brasileiras mais ricas de carotenoides; dentre os carotenos estão o  $\beta$ -caroteno e  $\alpha$ -caroteno e, dentre as xantofilas está a zeaxantina como os principais componentes.<sup>26,34</sup>

O teor de  $\beta$ -caroteno pode chegar a 90% da composição total dos carotenoides presentes no óleo de buriti, sendo encontradas concentrações de 20  $\mu\text{g/g}$  a 110,46  $\mu\text{g/g}$ .<sup>26,32</sup>

Godoy e colaboradores<sup>34</sup> obtiveram concentrações de até 446  $\mu\text{g/g}$  de carotenoides totais, dos quais 364  $\mu\text{g/g}$  corresponderam ao  $\beta$ -caroteno, com maior concentração na casca que na polpa do fruto.<sup>35,36</sup> Por estar presente em uma matriz oleosa, a biodisponibilidade pode ser aumentada no organismo.<sup>37</sup> Entretanto, como o buriti é uma matéria-prima de origem vegetal, a composição pode variar especialmente em função da safra, local de produção, condições de crescimento da palmeira e maturação do fruto.<sup>4,38</sup>

### 3.2.2 ÁCIDOS GRAXOS

O buriti além de possuir uma polpa com coloração laranja tem característica oleosa, representado pelo teor de lipídios totais, segundo maior componente do fruto.<sup>39</sup>

O principal ácido graxo encontrado no óleo de buriti é o oleico com concentrações acima de 70%, um monoinsaturado pertencente à família do ômega-9, com benefícios à saúde humana quando consumido.<sup>3,23,40</sup>

Manhães<sup>39</sup>, ao comparar o óleo de buriti ao azeite de oliva e óleo de canola, observou que além do teor de ácido oleico acima dos demais, a concentração do ácido linolênico (w-3) foi superior comparada ao azeite de oliva. No estudo realizado por Albuquerque<sup>3</sup> com óleo de buriti, também foram observadas elevadas concentrações do ácido linolênico (2,2%) e de linoleico (2,4-3,9%).

Os ácidos graxos poli-insaturados das famílias ômega-3 e ômega-6 são essenciais ao organismo, apresentando diversos benefícios como atividade anti-inflamatória e anti-agregação e anti-plaquetária.<sup>41</sup>

### 3.2.3 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos são substâncias de ampla distribuição, complexidade e variada estrutura química. Nos vegetais, eles podem ser metabólitos secundários, associados à estratégia de defesa das plantas.<sup>42</sup>

Esses compostos atuam como potenciais antioxidantes, ao impedir a oxidação de constituintes ingredientes da matriz vegetal, em especial de lipídios nos óleos vegetais. Tal ação ocorre por meio da capacidade de doação de hidrogênio ou de elétrons destes compostos estabilizando os radicais livres ao inibir a cadeia de iniciação - ou interrompendo a cadeia de propagação das reações oxidativas promovidas por estas substâncias instáveis.<sup>43,44</sup>

Os compostos fenólicos apresentam, em sua estrutura, vários grupos benzênicos característicos, tendo como substituintes grupamentos hidroxilas.<sup>45</sup> Dentre as classes, estão os flavonoides, que compreendem um grupo de compostos fenólicos amplamente distribuídos nas frutas e nas hortaliças, apresentando-se sob muitas formas como flavonóis, flavonas, flavanonas,

catequinas, antocianinas, isoflavonas e chalconas.<sup>46</sup>

Na classe dos não-flavonóides estão os derivados dos ácidos hidroxicinâmico e hidroxibenzóico. A atividade antioxidante está relacionada com a posição dos grupos hidroxilas (OH<sup>-</sup>) e também com a proximidade do grupo carboxila (-COOH) em relação ao grupo fenil.<sup>47</sup>

Os principais compostos fenólicos não-flavonóides derivados dos ácidos hidroxicinâmicos são os ésteres dos ácidos caféico, cumárico e ferúlico. Quanto aos derivados dos ácidos hidroxibenzóicos, podem-se destacar os ácidos salicílico, gálico, elágico, protocatéico e vanílico.<sup>48</sup>

Para os óleos vegetais, como os óleos de palma e azeite de oliva, pesquisadores relataram que a concentração de compostos fenólicos pode ser influenciada por fatores ambientais, processo tecnológico de obtenção, época do cultivo, genética botânica e outros fatores, podendo afetar a capacidade antioxidante desses óleos.<sup>49</sup>

Dentre os óleos vegetais mais investigados tem-se o azeite de oliva extra-virgem conhecido por sua complexa constituição e perfil de compostos fenólicos de diferentes grupos, os quais qualificam este produto como alimentos com propriedades antioxidantes e capazes de prevenir as Doenças Crônicas Não-Transmissíveis.<sup>27</sup>

Pesquisas envolvendo concentração e perfil de compostos fenólicos totais em óleo de buriti apontam uma promissora capacidade antioxidante associada a esses compostos bioativos, pela presença em sua constituição dos grupamentos flavonóides e não-flavonoides.<sup>50</sup>

### 3.3 ENCAPSULAÇÃO

A técnica de encapsulação vem sendo empregada na indústria para resolver problemas relacionados à estabilidade de substâncias naturais, como os compostos bioativos, pigmentos e micronutrientes.<sup>14,15</sup> Consiste em um processo de empacotamento, no qual se utiliza um agente encapsulante, com a finalidade de atuar como um filme protetor e isolar a substância ativa (núcleo), evitando os efeitos de uma exposição inadequada. Tal revestimento é capaz de desfazer-se sob um estímulo específico, liberando a substância de interesse no local desejado.<sup>51,52,53</sup>

Segundo Shahidi e Han<sup>54</sup>, existem seis motivos principais para o uso da encapsulação na indústria alimentícia: (1) reduzir a reatividade do material do núcleo com o ambiente; (2) reduzir a velocidade de evaporação ou de transferência do material de núcleo para o meio; (3) facilitar a manipulação do material encapsulado; (4) promover a liberação controlada; (5) mascarar sabor e odor desagradáveis e; (6) promover a dispersão homogênea do material encapsulado em uma formulação alimentícia.

No processo de encapsulação, podem ser formadas cápsulas ou esferas. A primeira caracteriza-se pela formação de um núcleo concentrado na região central e circundado, de forma contínua, pelo material de parede. Por outro lado, nas esferas o ativo encontra-se disperso de forma homogênea na matriz polimérica. As partículas resultantes, por sua vez, podem ser classificadas conforme o tamanho obtido em micro (1 – 100  $\mu\text{m}$ ) ou em nanopartículas (1-100 nm).<sup>55</sup>

### 3.3.1 TÉCNICAS DE ENCAPSULAÇÃO

Inúmeras são as técnicas de encapsulação, cuja escolha dependerá de fatores, como: propriedades físicas e químicas do material a ser encapsulado e do agente encapsulante, aplicação do produto final encapsulado, tamanho de partícula almejado, mecanismo de liberação controlada, custo e escala de produção.<sup>14</sup>

Os métodos de encapsulação são categorizados em químicos (polimerização interfacial e inclusão molecular), físicos (spray cooling, spray drying e extrusão) e físico-químicos (emulsificação com coacervação de solvente).<sup>53,56,57</sup>

A emulsificação é relatada por pesquisadores como um método físico-químico, uma estratégia eficaz para promover a encapsulação de compostos bioativos lipofílicos, sendo cada vez mais utilizada na indústria farmacêutica e alimentícia.<sup>58,59,60</sup>

Este método caracteriza-se por promover o aumento da absorção de substâncias imiscíveis em água pela sua dispersão em soluções aquosas, por meio de dispositivos mecânicos, como homogeneizadores ultrassônicos, podendo resultar em nanoemulsões.<sup>61,62</sup>

As emulsões podem ser de dois tipos: a emulsão simples e múltipla. As emulsões simples caracterizam-se por sistemas formados por gotas de óleo dispersas em uma fase aquosa, óleo/água (O/A), ou quando sistemas em que a fase aquosa encontra-se dispersa na fase apolar, água/óleo (A/O).<sup>53,56,63</sup>

As emulsões múltiplas, por sua vez, possuem estruturas mais complexas que as simples e, são subdivididas em óleo/água/óleo (O/A/O), em cujo óleo é disperso primeiramente na água e, posteriormente a emulsão é dispersa em outra fase oleosa e, a emulsão água/óleo/água (A/O/A), na qual a água é dispersa em fase oleosa e, a emulsão resultante é dispersa em outra fase aquosa.<sup>58,64,65</sup>

### 3.3.2 AGENTES ENCAPSULANTES

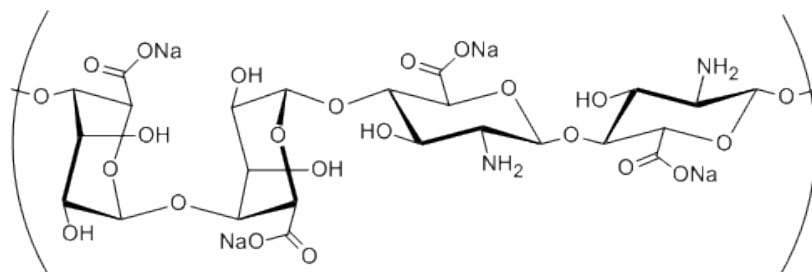
De acordo com Azeredo<sup>14</sup>, a natureza do material encapsulante é um dos principais fatores, capazes de influenciar na estabilidade do material encapsulado. A escolha deverá ser feita com base nas propriedades físicas e químicas do núcleo e da parede, compatibilidade do núcleo com a parede, mecanismo de liberação controlada e, fatores econômicos. Outros fatores, também cruciais na análise e definição do material de parede, são: eficiência de encapsulação, estabilidade durante a estocagem, grau de proteção do núcleo e características microscópicas da superfície.<sup>66,67</sup>

É de extrema importância que o agente encapsulante não seja capaz de reagir com o núcleo. Tais agentes podem ser utilizados como encapsulantes de ingredientes alimentícios, como: dextrina, amido, proteínas, alginato e lipídios.<sup>68,69</sup>

#### 3.3.2.1 ALGINATO

O alginato é um biopolímero aniônico composto de cadeias lineares de alta massa molar, com seções rígidas e regiões flexíveis, de ácido  $\alpha$ -L-glucurônico e  $\beta$ -D-mannurônico. Na presença de íons, tais como  $\text{Na}^{++}$  (Figura 3), formam hidrogéis, filmes, esferas, micro e nanopartículas, com capacidade para encapsulamento de inúmeras substâncias, principalmente com fins farmacêuticos.<sup>69,70,71</sup>

A maioria das microcápsulas produzidas tende a ter muita porosidade, permitindo fácil e rápida difusão em água e outros fluidos dentro e fora da cápsula, e conseqüentemente maior necessidade de técnicas mais apuradas.<sup>72,73,74</sup>



**Figura 3.** Estrutura molecular do alginato de sódio. Fonte: [https://www.researchgate.net/figure/Molecular-structure-of-both-monomers-and-sodium-alginate\\_fig7\\_284234116](https://www.researchgate.net/figure/Molecular-structure-of-both-monomers-and-sodium-alginate_fig7_284234116). Acesso: 17 jan 2019.

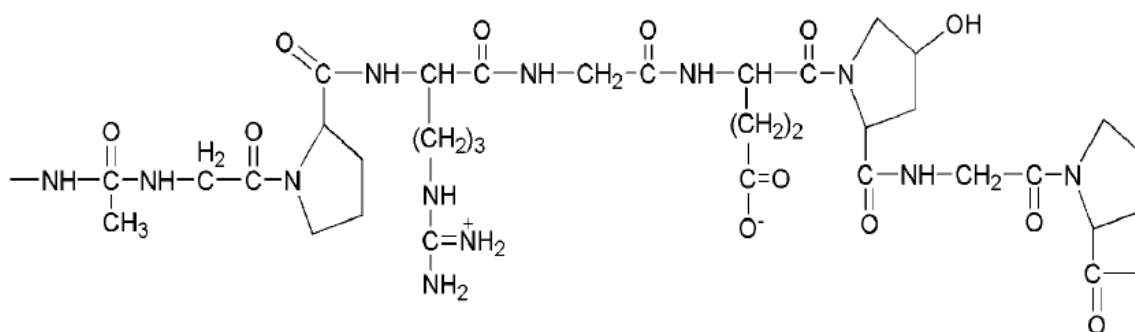
### 3.3.2.2 GELATINA

A gelatina é uma proteína desnaturada resultante da hidrólise do colágeno, com aplicações nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética. Devido à capacidade de transformação de sólido a gel, de forma reversível, pesquisadores investigam a combinação da gelatina com alimentos funcionais.<sup>75</sup>

De origem animal essa proteína pode ser obtida de diversas fontes como bovina, suína, frango e peixes. Autores afirmam que a maioria das gelatinas comerciais, são obtidas a partir de ossos e peles de mamíferos – bovina e suína; entretanto, vem sendo avaliada também a utilização de gelatinas derivadas de peles, ossos, escamas de peixes.<sup>76</sup>

Esta proteína possui um peso molecular entre 15000 a 400000 KDa, sendo constituída de uma mistura de aminoácidos, glicina, prolina e hidroxiprolina, que diferem em suas concentrações conforme a espécie e interagem via ligações peptídicas - Figura 4.<sup>77,78</sup> Fatores como espécie, raça, idade, tipo de alimentação do animal, e condições de armazenamento da matéria-prima são capazes de afetar as propriedades e processos de produção

da gelatina.<sup>79,80</sup>



**Figura 4.** Estrutura molecular da gelatina. Fonte: [https://www.researchgate.net/figure/Figure-S1-The-molecular-structure-of-gelatin-adopted-from-Reference-16-in-the-main\\_fig1\\_255765767](https://www.researchgate.net/figure/Figure-S1-The-molecular-structure-of-gelatin-adopted-from-Reference-16-in-the-main_fig1_255765767). Acesso: 17 jan 2019.

Ela apresenta um comportamento anfotérico, capaz de distinguir-se em dois tipos, conforme o ponto isoelétrico e o tipo de extração realizada quando em solução, o qual se caracteriza pela capacidade de se comportar como ácido e base. Em soluções ácidas, a gelatina é carregada positivamente e, em soluções básicas, é carregada negativamente.<sup>79</sup>

Existem dois tipos de gelatina, aquelas obtidas de peles e ossos de diferentes origens através de pré-tratamento ácido (Tipo A) e; as do Tipo B, as quais são obtidas de peles e ossos bovinos através de pré-tratamento alcalino.<sup>81</sup> Estes tipos de gelatinas provocam diferenças em suas propriedades físico-químicas e reológicas e, conseqüente especificidade em suas aplicações. A gelatina Tipo B possui um ponto isoelétrico (pI) de aproximadamente 5,0, enquanto que a do Tipo A varia o pI entre 7,0 e 9,0.<sup>75</sup> Pesquisas apontam a capacidade da gelatina em atuar como emulsificante em emulsões óleo em água, sendo promissora sua aplicação na área de alimentos.<sup>82,83,84</sup>

### 3.4 CARACTERIZAÇÃO DE PARTÍCULAS

A caracterização das partículas formadas após encapsulação pode ser realizada por técnicas, como: a Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Difração a Laser, Potencial Zeta e Difração de Raio X (DRX).

A técnica de FTIR consiste na detecção de bandas vibracionais referentes aos diferentes grupos funcionais presentes nos materiais brutos e no

encapsulado. O indicativo de que houve encapsulação é constatado por meio do desaparecimento e/ou formação de novas ligações químicas após o processo.<sup>85</sup>

Para avaliar o estado amorfo ou cristalino de materiais encapsulados, o DRX é a técnica escolhida. Com isso, a técnica permite a determinação de material com estrutura amorfa, quando são observados picos alargados e não definidos, ou cristalina, na qual pode-se detectar picos bem definidos.<sup>86</sup>

A MEV é capaz de avaliar a superfície do material (superfície lisa, rugosa, com fraturas, entre outras características), e o tamanho físico e homogeneidade das partículas formadas. Por meio desta técnica, o feixe de elétrons emitido pelo equipamento incide na superfície do encapsulado, sendo capaz de produzir imagens detalhadas do material encapsulado, especialmente se a substância ativa foi protegida ou não pelo agente encapsulante.<sup>83,84</sup>

Em adição às técnicas para caracterização de partículas tem-se a Difração a Laser, que consiste em mensurar o tamanho das partículas obtidas e/ou a distribuição dos diferentes tamanhos de partículas em uma amostra. Esta técnica é baseada no princípio de que uma amostra é atravessada por um raio laser monocromático na incidência de um feixe de luz paralelo sobre as partículas dispersas. Em seguida, os detectores gravam o padrão de espalhamento resultante e os feixes de laser que não incidiram em nenhuma partícula, baseada na teoria de Fraunhofer, na qual as partículas tem a capacidade de interagir com a luz de um modo diferente que a interação da luz com o meio, dependendo de sua dispersão.<sup>89,90</sup>

A magnitude de repulsão ou de atração eletrostática ou de cargas entre partículas pode ser avaliada por meio do Potencial Zeta. Ele caracteriza a superfície das partículas, podendo fornecer informações como estabilidade, interações proteicas, permeabilidade celular e tempo de circulação.<sup>91</sup> Essa medida é dependente do meio dispersante em que as partículas se encontram sendo determinadas as interações existentes entre seus grupos funcionais e o meio aquoso, por meio de técnicas de eletroforese.<sup>92</sup>

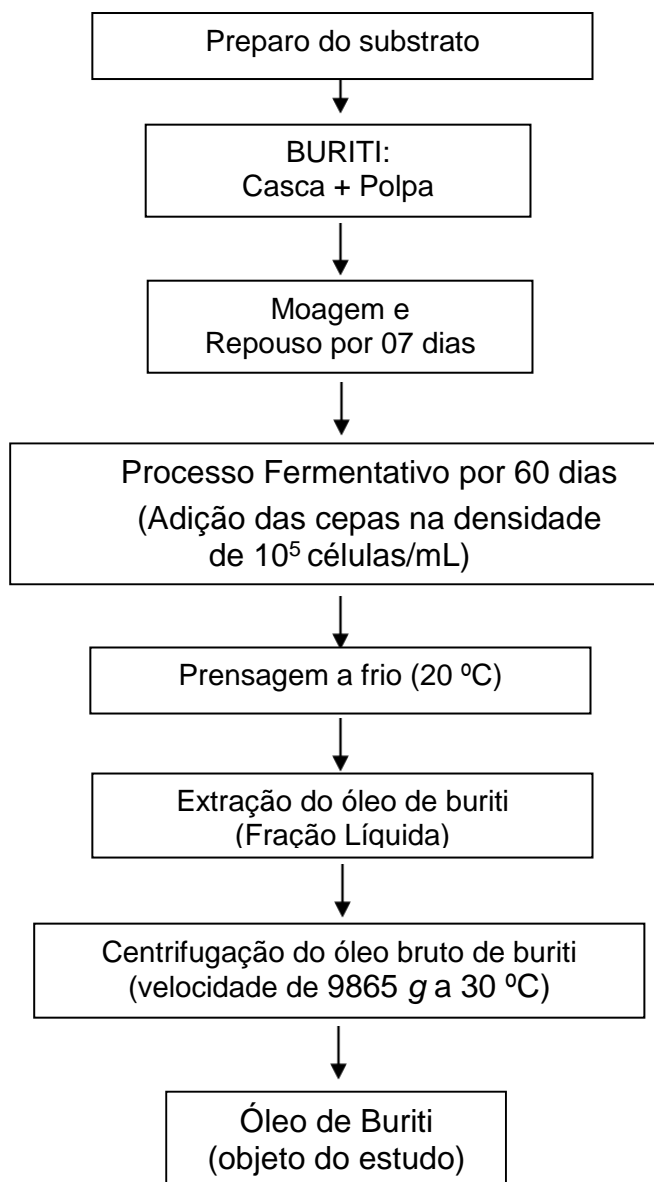
## 4 METODOLOGIA

### 4.1 MATERIAL

O óleo de buriti da espécie *Mauritia flexuosa* foi produzido e fornecido pela empresa de cosméticos Plantus S.A. (Nísia Floresta, no Rio Grande do Norte, Brasil) com o certificado IBD (Inspeções e Certificações Agropecuárias e Alimentícias). As amostras foram transportadas sob proteção de luz e refrigeradas, sendo levadas para o Laboratório de Bromatologia do Departamento de Farmácia, na Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), onde foram armazenadas a 4°C.

### 4.2. OBTENÇÃO DO ÓLEO

As cascas e polpas do fruto foram processadas através de moagem e em seguida deixadas em repouso por um período de 7 dias. Para a produção do óleo por via biotecnológica foram adicionadas as cepas *Pichia pastoris* e *Lactobacillus subtilis* (cedidas gentilmente pela Eucodes Bioscience, Viena, Austria) sob temperatura de 35 °C por 60 dias de fermentação. Após a fermentação, foi realizada a prensagem a frio do material produzido para separar a fração líquida (que contém o óleo) do material residual sólido. O óleo obtido após a prensagem foi centrifugado (Fran, Model CO30) por 9865 g a uma temperatura de 30 °C, sendo esse utilizado para os estudos, conforme fluxograma na Figura 5.



**Figura 5.** Fluxograma de obtenção do óleo de buriti por fermentação.

#### 4.3 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO DE BURITI

Para análise do perfil de ácidos graxos no óleo de buriti, foram utilizados 50 mg do óleo, os ácidos graxos foram metilados utilizando solução metanólica de hidróxido de sódio (0,5 N) e de cloreto de amônia e ácido sulfúrico em metanol ( $\text{NH}_4\text{Cl}-\text{H}_2\text{SO}_4-\text{MeOH}$ ) pelo método descrito por Hartman e Lago<sup>93</sup>, para obtenção dos ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES).

Em seguida, os FAMES foram determinados por cromatografia gasosa

(Thermo Scientific – CG/FID – FOCUS) com detector de ionização de chama (FID) no Laboratório Multiusuário de Nutrição Animal da Escola Agrícola de Jundiaí. Foi utilizada uma coluna capilar supelco SP2560 (100 m x 0,25 mm x 0,2  $\mu$ m) e, como gás de arraste o nitrogênio a um fluxo de 2,5 mL/minuto. As temperaturas do injetor e detector foram 230 °C e 270 °C, respectivamente. A programação da temperatura da coluna foi a seguinte: 40 °C por 3 minutos, em seguida foi aquecida a 180 °C por 5 minutos com uma taxa de 10 °C/minuto, sendo novamente aquecida a 220 °C por 3 minutos com taxa de 10 °C/minuto e por fim, a temperatura chegou a 240 °C mantida por 25 minutos com taxa de 20 °C/minuto.

O volume de amostra injetada foi de 1,0  $\mu$ L com razão Split de 10:1. Os picos foram integrados, comparados com um padrão de ácidos graxos Supelco™37 componente FAME MIX e expressos em percentagem (%).

#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO ÓLEO DE BURITI

O óleo de buriti foi submetido à caracterização físico-química pelas seguintes propriedades: Índice de acidez (IA), Índice de peróxido (IP), Índice de saponificação (IS), Índice de iodo (II), Índice de refração (IR), Umidade volátil, Impurezas insolúveis em éter e, Cinzas.

Além disso, foram realizadas as determinações de Densidade relativa e Viscosidade dinâmica, nos Laboratórios de Tecnologia de Cosméticos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (USP) e, de Pesquisa em Petróleo da UFRN, respectivamente.

##### 4.4.1 ÍNDICES DE ACIDEZ (IA) E DE SAPONIFICAÇÃO (IS)

Os índices de acidez e saponificação foram determinados, respectivamente por titulometria com hidróxido de sódio 0,1 M e ácido clorídrico 0,5 M pelos métodos propostos pela Anvisa.<sup>94</sup> As análises foram realizadas em triplicatas e expressas em média e desvio-padrão.

#### 4.4.2 ÍNDICE DE PERÓXIDO (IP)

Determinado por titulometria com tiosulfato de sódio 0,001 N proposto pela Anvisa<sup>94</sup>, expresso em mg KOHg<sup>-1</sup>. Os resultados foram realizados em triplicatas e expressos em média e desvio-padrão.

#### 4.4.3 ÍNDICE DE IODO PELO MÉTODO DE WIJS

Método baseado na AOCS<sup>95</sup> que, por titulação com tiosulfato de sódio 0,1 M, é expresso em cg I2g<sup>-1</sup> com média e desvio-padrão.

#### 4.4.4 ÍNDICE DE REFRAÇÃO (IR)

Foi mensurado por meio de um refratômetro (ABBE, Quimis®), a 20 °C, sendo os valores expressos em média e desvio-padrão, conforme a Anvisa.<sup>94</sup>

#### 4.4.5 DETERMINAÇÃO DE UMIDADE VOLÁTIL

Foi determinada por prévio aquecimento direto das amostras, em triplicata, a 105 °C em estufa, conforme AOCS<sup>96</sup>, e pesagem até constância do peso. Os valores foram em percentagem (%).

#### 4.4.6 IMPUREZAS INSOLÚVEIS EM ÉTER

Foi realizada por meio do método gravimétrico, estabelecido por AOCS<sup>97</sup>, utilizando estufa a 105 °C até obtenção de peso constante. As análises foram realizadas em triplicata com os resultados expressos em percentagem (%).

#### 4.4.7 RESÍDUO MINERAL FIXO

Método em que consiste na incineração da amostra a 550 °C para destruição da matéria orgânica e pesagem dos constituintes residuais até peso constante<sup>94</sup>.

#### 4.4.8 DENSIDADE RELATIVA

Foi mensurada em triplicata a temperatura de 20 °C utilizando o equipamento densímetro (Anton Paar® DAM 4500, São Paulo, Brasil). Os resultados foram expressos em  $\text{kgm}^{-3}$  por média e desvio-padrão.

#### 4.4.9 VISCOSIDADE DINÂMICA

Foi determinada a 25 °C por meio de um reômetro rotacional (Thermo-Scientific, HAAKE MARS, Waltham, EUA), utilizando sensor Z41. As curvas determinantes da viscosidade foram obtidas pelo método CR (taxa de cisalhamento controlada) no intervalo de 7 a 1000  $\text{s}^{-1}$ , durante um minuto. As análises foram realizadas em triplicata e expressas em média e desvio-padrão ( $\text{mPA}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

#### 4.5 DETERMINAÇÃO DE MINERAIS NO ÓLEO DE BURITI

Para determinação dos minerais no óleo de buriti foi utilizada a técnica de espectrometria de emissão óptica com plasma (ICP/OES), por meio do espectrômetro ICP-OES-iCAP 6000 Series, o qual detecta a radiação eletromagnética emitida por íons excitados ou átomos neutros na região UV-visível.

Foram determinados os macroelementos (fósforo, potássio, cálcio e magnésio) e microelementos (ferro, zinco, cobre, manganês e sódio) do óleo de buriti com base no estabelecido pela AOCS.<sup>98</sup>

Previamente foi realizada uma digestão nitro-perclórica, ao diluir as cinzas das amostras, em duplicatas, em 100 mL de ácido nítrico a 10%; a fim de eliminar o material orgânico. Os resultados foram expressos em microgramas por 100 g do produto ( $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ).

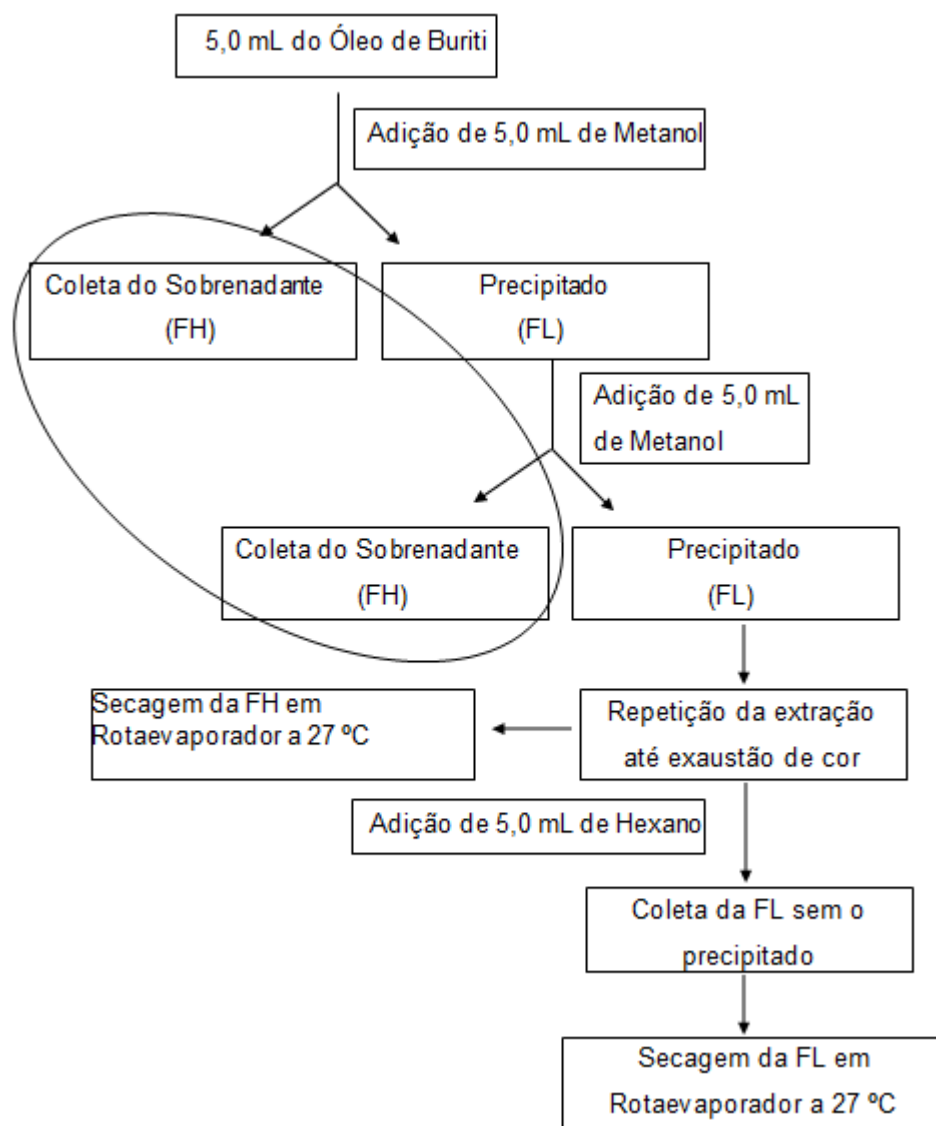
## 4.6 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE FENÓLICOS PRESENTES NO ÓLEO DE BURITI

### 4.6.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS HIDROFÍLICO E LIPOFÍLICO A PARTIR DO ÓLEO DE BURITI

Para obtenção dos extratos hidrofílicos e lipofílicos do óleo de buriti foram testadas três metodologias, sendo elas: Espín e Soler-Rivas<sup>99</sup>, Bajoub e colaboradores<sup>100</sup> e Chaniot & Tzia<sup>101</sup>, a fim de avaliar qual extrato apresentou maior concentração de fenólicos totais. A extração descrita por Espín e Soler-Rivas<sup>99</sup> foi escolhida para o estudo, com modificações, para realização da caracterização do potencial antioxidante do óleo de buriti.

Os extratos secos do óleo de buriti foram definidos como fração hidrofílica (FH) e fração lipofílica (FL), conforme o fluxograma na Figura 6. Mensurou-se 5,0 mL de óleo, considerando uma proporção de óleo de buriti: metanol (1:1, v/v), para posterior agitação em vortex (Mod. AP59) por 1 minuto e, centrifugação por 15 minutos a 7560 g em centrífuga refrigerada a 10 °C (FANEM, Excelsa 4, Mod. 280R).

Ao precipitado foi adicionado 5,0 mL de hexano e efetuado o mesmo procedimento de obtenção da FH, a fim de se obter o extrato da FL. Os extratos das FH e FL foram secos em rotaevaporador a vácuo (Butchi, R-100) em banho-maria a 27 °C e, em fluxo de nitrogênio para a avaliação da capacidade antioxidante e compostos fenólicos do óleo de buriti obtido por via biotecnológica. Este processo de obtenção dos extratos hidrofílicos e lipofílicos foi realizado nos laboratórios de Bromatologia e Farmacognosia do Departamento de Farmácia da UFRN.



**Figura 6.** Fluxograma do Protocolo de obtenção dos extratos hidrofílico (FH) e lipofílico (FL) do óleo de buriti.

#### 4.6.2 ANÁLISE DO PERFIL DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR CLAE

A avaliação do perfil de compostos fenólicos no óleo de buriti foi realizada no Laboratório de Engenharia Bioquímica do Departamento de Engenharia Química da UFRN. A amostra utilizada foi proveniente do extrato seco da FH solubilizado em acetonitrila na concentração de 0,1 mg/mL, previamente filtrada em membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  e submetida à análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) no cromatógrafo Acella (Thermo Scientific) acoplado ao detector por arranjo de diodo (PDA).

A separação foi realizada, conforme Kim, Seo, Kim e Ha<sup>102</sup> com

modificações, usando-se uma coluna de fase reversa Shim-Pack CLC-ODS (M) C18 constituída de sílica modificada na superfície por grupos de octadesil, com poros de 5,0 µm de diâmetro e tamanho da coluna de 25 cm x 4,6 mm de diâmetro interno, mantida a 40 °C. A composição da fase móvel consistiu em água (Fase A) e acetonitrila (Fase B), ambos contendo 1% de ácido acético, com fluxo de 1,0 mL/minuto. A eluição foi realizada usando um gradiente linear de 0 a 30% de B em 10 minutos, 30 a 70% de B em 5 minutos, 70 a 100% em 10 minutos, e por fim 100% de B mantido por 5 minutos.

Curvas de calibração foram realizadas com os padrões da marca Sigma® de ácido gálico (280 nm), catequina (280 nm), ácido vanílico (280 nm), ácido siríngico (280 nm), ácido elágico (256 nm), vanilina (280 nm) e quercetina (255 nm). Os resultados foram expressos em média e desvio-padrão por µg.g<sup>-1</sup> de óleo de buriti.

#### 4.7 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO DE BURITI

Para avaliação da capacidade antioxidante do óleo de buriti foi necessária, primeiramente a realização de alguns ensaios químicos, como definição da metodologia de obtenção e teste de solubilidade dos extratos obtidos a partir do óleo para realização dos testes antioxidantes.

O teste de solubilidade foi realizado com dois solventes para diluição das amostras: água, metanol e hexano, sendo para os extratos secos da FH os solventes metanol:água e, da FL, metanol:hexano, em 03 diferentes proporções testes (40:60; 50:50 e 20:80).

Para os testes de solubilização dos extratos foi utilizado um ultrassom (UltraCleaner, Mod. 1650) por 20 minutos para homogeneização mais efetiva das soluções, na concentração de 1mg/mL.

As proporções escolhidas para diluição das frações do óleo de buriti foram aquelas, que se apresentaram homogêneas, sendo selecionadas para a FH e FL respectivamente, as proporções entre os solventes metanol:água de 40:60 (v/v) e metanol:hexano 50:50 (v/v).

#### 4.7.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR 2,2-DIFENIL-1-PICRIL-HIDRAZIL (DPPH)

A atividade antioxidante foi determinada de acordo com o método de Nóbrega et al.<sup>44</sup> com modificações para o uso de microplacas de 96 poços. A absorbância foi medida em 517 nm usando um espectrofotômetro (BioChrom ASYS, UVM 340, Cambridge, UK). A curva de calibração foi construída com concentrações de 10 a 200  $\mu\text{M}$  de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico). Os resultados foram expressos em micromoles de equivalentes de Trolox por grama de amostra ( $\mu\text{MTE/g}$ ).

#### 4.7.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (TCA)

Para TCA utilizou-se o método proposto por Pietro et al.<sup>103</sup> Foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de molibdato de amônio-ácido sulfúrico 40 mM, de fosfato de sódio 280 mM e 100  $\mu\text{L}$  das soluções dos extratos FH e FL em uma concentração de 2 mg/mL e, posteriormente 700  $\mu\text{L}$  de água destilada nos tubos de ensaio. Em seguida, os tubos foram agitados e incubados em banho-maria (QUIMIS, Mod. Q334M-28) a 90 °C por 90 minutos para posterior leitura das absorbâncias por espectrofotometria (Biospectro, Mod. SP-220) a 695 nm, em triplicata.

Curvas de calibração foram construídas nas concentrações de 0,03 a 1,0 mg/mL de ácido ascórbico (AA), uma curva em metanol:água (40:60 v/v) e em metanol:hexano (50:50 v/v). Os resultados expressos em mg AA  $\text{g}^{-1}$ .

#### 4.7.3 TESTE DO PODER REDUTOR

Foi realizado conforme a metodologia descrita por Wang.<sup>104</sup> Foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  da solução ferricianeto de potássio a 1% e 200  $\mu\text{L}$  das soluções dos extratos FH e FL a 2 mg/mL, respectivamente em metanol:água (40:60 v/v) e, hexano:metanol (50:50 v/v) em tubos de ensaio. Os tubos foram agitados e incubados em banho-maria (QUIMIS, Mod. Q334M-28) a 50 °C por 20 minutos. Em seguida, adicionou-se 180  $\mu\text{L}$  de cloreto de ferro a 0,1% e 1,5 mL de tampão fosfato 200 mM (pH 6,6).

As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro (Biospectro,

Mod. SP-220), em triplicata, a 700 nm. Os resultados foram expressos em mg ácido ascórbico (AA) g<sup>-1</sup> de óleo, conforme a curva de calibração construídas para TCA.

#### 4.7.4 TESTE DE SEQUESTRO DE ÍONS SUPERÓXIDO

A capacidade de sequestro do radical superóxido das frações hidrofílicas e lipofílicas foi determinada de acordo com Bilan e colaboradores.<sup>105</sup> Em resumo, 50 mM tampão fosfato (pH 7,8), 13 mM metionina, 10mM EDTA, 75 mM NBT (Nitrotetrazolium Blue Chlorid), 2 mM de riboflavina foram adicionados aos extratos hidrofílicos e lipofílicos. Os tubos foram homogeneizados e incubados a temperatura ambiente sob exposição da luz por 15 minutos. Tubos com a mistura reacional semelhante foram guardados no escuro e usados como controle. O tampão fosfato (pH 7,8) foi usado como branco. As absorbâncias foram medidas em espectrofotometro (Bispectro, Mod. SP-220) a 560 nm. Os resultados foram expressos como % de inibição de íons superóxido de acordo com a equação:  $\% \text{ inibição} = (A \text{ controle} - A \text{ amostra}) / (A \text{ controle} - A \text{ branco}) \times 100$ .

### 4.8 ENCAPSULAÇÃO DO ÓLEO DE BURITI

#### 4.8.1 OBTENÇÃO DO ÓLEO DE BURITI ENCAPSULADO

As partículas foram obtidas pela técnica de emulsificação O/A seguida de coacervação, McClements, et al.<sup>106</sup>, com modificações.

Foram utilizados como agentes encapsulantes a gelatina suína (Sigma®), o alginato de sódio de baixo peso molecular (Sigma®) e a combinação desses dois e, o Tween 20 (Sigma®) foi usado como tensoativo, para obtenção das formulações de encapsulados a base de: 1. alginato de sódio e óleo de buriti (OAL), 2. gelatina suína e óleo de buriti (OGS) e, 3. da combinação alginato de sódio e gelatina suína e, óleo de buriti (OAG).

Para a fase oleosa, foram utilizados 10 mL de óleo de buriti. Já as duas fases aquosas foram formuladas como descrito abaixo:

- Fase aquosa 1 (FA 1) (90 mL) – constituída 1,5% de Tween 20

solubilizado em água destilada.

- Fase aquosa 2 (FA 2) (100 mL) – constituída de 4% (p/v) do agente encapsulante e 1,5% de Tween 20 solubilizados em água destilada. Sendo a fase aquosa 2 da combinação contendo, 3% GS (p/v) e 1% ALG (p/v).

O preparo da solução de alginato de sódio para a formulação OAL consistiu na solubilização do mesmo em água destilada sob agitação magnética 24 h a 50 °C e, ao final desse tempo a solução foi filtrada em papel de filtro qualitativo.

O preparo da solução contendo gelatina suína para a formulação OGS foi realizado sob agitação magnética por 1 h a 40 °C. Por fim, o preparo da solução contendo alginato de sódio e gelatina suína para a formulação OAG, foi realizado pela solubilização do alginato de sódio a 50 °C por 24 h sob agitação magnética. Posteriormente, foi adicionada a gelatina suína a esta solução, sendo solubilizada sob agitação magnética por 1 h a 40 °C. Ao final desse tempo, o pH da solução foi ajustado para 5,5, utilizando HCl PA.

A emulsão foi obtida a partir da homogeneização da FA 1 com a fase oleosa, utilizando-se de um ultradispersor a uma velocidade de 17.000 rpm/10 minutos (Ultra-Turrax, IKA®T18 basic).

Posteriormente, foi realizada a homogeneização da FA 2 com a emulsão obtida, utilizando as mesmas condições descritas acima. Após o processo de homogeneização, as emulsões foram desidratadas por liofilização (LioTop L101) a -57 °C e pressão de 43 µHg para posterior caracterização das partículas, determinação da eficiência de encapsulação, avaliação da solubilidade e do potencial antimicrobiano. O processo de encapsulação foi realizado no Laboratório de TecBioFar do Departamento de Farmácia da UFRN e, no Laboratório de Tecnologia de Alimentos do Departamento de Nutrição da UFRN.

## 4.8.2 CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS OBTIDAS

### 4.8.2.1 MICROSCOPIA DE VARREDURA (MEV)

A MEV no Laboratório de Caracterização Estrutural de Materiais do Departamento de Engenharia de Materiais da UFRN para determinar a morfologia dos materiais encapsulados obtidos e seus tamanhos físicos.

Os encapsulados foram suspensos em acetona e gotejadas em placas de silício fixadas com fita de carbono em stubs. A análise foi realizada em diferentes ampliações, utilizando alto vácuo, tensão de 2 – 3 kV e sem metalização, em microscópio tipo MEV-FEG ZEISS (AURIGA).

### 4.8.2.2. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSPORTADA DE FOURRIER (FTIR)

As análises de FTIR foram realizadas na Central Analítica no Instituto de Química da UFRN.

Os materiais brutos, óleo de buriti, gelatina suína, alginato de sódio e Tween 20 e, os encapsulados obtidos foram homogeneizados a brometo de potássio (KBr), macerados e, prensados para a formação de pastilhas. Posteriormente, foram registrados em transmitância e com região do infravermelho médio, de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Foi utilizado o espectrômetro da Shimadzu, modelo FTIR-8400S, série IRAFFINITY-1, software IRSOLUTION, versão 1.60, com número de varredura de 32 e resolução 4  $\text{cm}^{-1}$ .

### 4.8.2.3 DIFRAÇÃO A LASER

Para a determinação do tamanho de partícula, 10 mg dos encapsulados foram dispersos em acetona sob agitação magnética à temperatura ambiente por 2 minutos. Posteriormente, as dispersões foram adicionadas de 2 mL de formaldeído PA e agitadas por 30 minutos, para promover a reticulação das partículas e facilitar a análise de tamanho de partícula, por promover a desaglomeração, com base no estudo realizado por Medeiros, et al.<sup>107</sup>, com modificações.

Após esse tempo, as dispersões foram filtradas e a massa de partículas retida, no papel de filtro qualitativo, foi coletada para a realização da

Difração a laser. Os materiais foram redispersos em 4 mL de acetona. Todas as variáveis desse processo foram padronizadas por meio de ensaios de bancada. Em seguida, as dispersões foram dispostas em cubetas de vidro e lidas a 5 corridas/1 minuto, para a mensuração do diâmetro médio e o índice de polidispersão, no NanoBrook ZetaPlus Zeta Potential Analyzer, software Brookhaven Instruments – ZetaPALS Particle Sizing Software. Os experimentos e as medições foram realizados em triplicata. Essa caracterização aconteceu no Núcleo de Pesquisa em Petróleo e Gás – NUPEG do Departamento de Engenharia Química (DEQ) no Centro de Tecnologia (CT) da UFRN.

#### 4.8.2.4 POTENCIAL ZETA

Para mensuração do Potencial Zeta, os encapsulados foram dispostos em cubetas específicas munidas de eletrodos laterais. Foram utilizados 10 mg de cada encapsulado liofilizado, os quais foram dispersos em 4 mL de acetona. Em seguida foram dispostos em cubetas específicas para a mensuração do Potencial Zeta, sendo realizadas 10 corridas em 01 minuto.

As análises foram realizadas no NanoBrook ZetaPlus Zeta Potential Analyzer, software Brookhaven Instruments – PALS Zeta Potential Analyzer, no Núcleo de Petróleo e Gás (NUPEG) do Departamento de Engenharia Química da UFRN.

#### 4.8.2.5 DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX)

Os agentes encapsulantes brutos e os encapsulados obtidos foram analisados em um difratômetro de raios X de alta resolução (SHIMADZU, modelo XRD 7000), com gerador Seifert ID3000, para avaliar se a fase dominante nos materiais é cristalina ou amorfa. Para esta análise, os materiais foram colocados em uma porta amostras cilíndricas e analisados em ângulo de difração  $2\theta$  entre 0 e 100°.

As análises de DRX foram realizadas no Laboratório de Caracterização Estrutural de Materiais do Departamento de Engenharia de Materiais da UFRN.

#### 4.8.2.6 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO (%)

O percentual de óleo de buriti incorporado às partículas foi obtido a partir da fórmula:  $EI (\%) = (\text{rendimento do óleo de buriti em partículas (g)} / \text{total de óleo de buriti utilizado no processo (g)}) \times 100$ .<sup>108</sup>

Para a determinação do óleo de buriti presente no interior das partículas (g) foi realizada a determinação da quantidade de lipídeos por meio do método de Soxhlet.<sup>109</sup> As análises foram realizadas em triplicata e os valores expressos em média e desvio-padrão.

#### 4.9 ENSAIO DE DISPERSÃO EM ÁGUA

Para o ensaio de dispersão em água baseou-se em Eastman e Moore<sup>110</sup>, com modificações. Foram pesados 200 mg e 20 mg, respectivamente dos grupos encapsulados e do óleo bruto de buriti, em triplicatas, os quais foram dispersos em 4 mL de água destilada em tubos de ensaios. Em seguida, os tubos foram levados para agitador orbital (QUIMIB® - Q816M20) por 48 horas a 27 °C ( $\pm 2$  °C) a 120 rpm.

Após 48 horas o material foi centrifugado em centrífuga (CENTRIBIO) a Força G 3000 rpm por 5 minutos. A fração lipídica foi separada da fração solubilizada e transferida para cápsulas de porcelana previamente taradas.

As cápsulas foram acondicionadas em estufa a 105 °C por 5 h e, pesadas para determinação do percentual (%) de material não solubilizado, o qual foi subtraído do total de material submetido ao ensaio, para obtenção do percentual de óleo de buriti e encapsulados (OGS, OAG) que solubilizou.

#### 4.10 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROMIANA DO ÓLEO DE BURITI E DOS ENCAPSULADOS OBTIDOS

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada no óleo bruto de buriti e encapsulado na concentração inicial de 5,0 mg/mL solubilizados, em metanol e hexano (50:50, v/v) e água, respectivamente, para identificar qual a concentração de melhor atividade antimicrobiana, conforme a metodologia descrita pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) com modificações.<sup>111,112</sup>

Analisou-se a ação antimicrobiana das frações das três cepas bacterianas: *Klebsiella pneumonia* (ATCC10031) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853). Em uma placa de 96 poços, 50 µL da suspensão bacteriana com densidade de 105 UFC/mL em caldo Müller Hinton (MH, Himedia, Índia), foi adicionada a solução do óleo de buriti bruto e encapsulado (2,5 mg/mL) e os antibióticos vancomicina (0,4 mg/mL) e gentamicina (0,3 mg/mL) e incubada a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ , sob agitação a 200 rpm em agitador orbital (QUIMIB® - Q816M20), sendo avaliada a densidade óptica a 595 nm em um leitor de microplacas (Epoch Biotek, Winooski, EUA) nos tempos de 0 e 24 horas. Os poços com meio e solução salina foram utilizados como controle de esterilidade do meio (controle negativo de crescimento).

#### 4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando o software Graph Pad Prism versão 5.0. Para avaliar a eficiência de incorporação do óleo nas partículas e a inibição do crescimento microbiano foi utilizado Teste t Student, para comparar os resultados obtidos ( $p < 0,05$ ). Para comparar as concentrações de óleo de buriti e de encapsulados (OGS e OAG) solubilizados em água foi utilizada ANOVA e pós-teste de Turkey.

Foi utilizado o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) para determinar diferença significativa entre os grupos avaliados e, os resultados foram expressos em média e desvio-padrão.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS

Considerada como uma técnica indispensável à pesquisa, desenvolvimento, ou simples Controle de Qualidade, a Cromatografia Gasosa permite o conhecimento completo e a quantificação e identificação de cada tipo de ácidos graxos presente, por exemplo, em produtos alimentícios.<sup>113</sup>

A Tabela 1 mostra o perfil dos ácidos graxos encontrado no óleo de buriti obtido por via biotecnológica. Observou-se um predomínio do ácido graxo linoléico (53,36%), sendo superior ao que mostra estudos da literatura envolvendo óleo de buriti cru e/ou refinado convencionais, que citam um teor mínimo variando entre 1,0 a 2,5%.<sup>8,114-116</sup> O dado obtido é superior ao encontrado para o óleo de castanha do Brazil investigado nos estudos de Pereira et al.<sup>117</sup> e Serra et al.<sup>114</sup> Isso mostra que o óleo de buriti obtido por via biotecnológica tem potencial benéfico para ser utilizado como ingrediente em alimentos industrializados, já que apresentou elevado conteúdo de ácidos graxos polinsaturados (53,60%).

**Tabela 1.**

Perfil de ácidos graxos do óleo de buriti (*M. flexuosa*) determinado por Cromatografia Gasosa dos ésteres metílicos de ácidos graxos.

<b>Ácidos Graxos</b>	<b>%</b>
C10:0 (Cáprico)	0,86
C12:0 (Láurico)	0,07
C14:0 (Mirístico)	0,87
C16:0 (Palmítico)	25,75
C16:1 (Palmitoleico)	0,44
C17:0 (Margárico)	0,07
C18:0 (Esteárico)	0,12
C18:1 (Vacênico)	2,08
C18:1n9c (Oleico)	17,27
C18:1n9t (Elaídico)	0,14
C18:2n6c (Linoleico)	53,36
C18:2n6t (Linolelaídico)	0,24
C18:3 (Linolênico)	ND*
C20:0 (Araquídico)	0,10
C20:1 (Gadoleico)	0,18
C22:0 (Behênico)	0,08
Ácidos Graxos Saturados	28,36
Ácidos Graxos Monoinsaturados	20,11
Ácidos Graxos Poli-insaturados	53,60

\*Não detectado.

O percentual de 17,27% referente ao ácido oleico (C18:1n9c) e a ausência do ácido linolênico ( $\omega$ -3) foram observados no óleo de buriti avaliado. Essa distribuição foi diferente do encontrado em outros estudos, os quais obtiveram uma média de 2% do ácido linolênico e prevalência superior a 70% de ácido oleico, percentual este que classifica o óleo de buriti como um monoinsaturado, sendo comparado inclusive ao azeite de oliva.<sup>114,115</sup> Isso pode estar associado às diferenças na origem da matéria-prima como também na parte do fruto utilizada para a obtenção do óleo (casca e polpa).<sup>118,119</sup> Além disso, estudos mostram que esse achado também pode ser atribuído à produção de

lipídios microbianos, cuja produção é proveniente de microrganismo estimulados/adaptados para crescimento na presença de substratos específicos.<sup>120</sup>

Os ácidos graxos *trans* elaídico (C18:1n9t) e linolelaídico (C18:2n6t), comumente encontrados em alimentos industrializados e, em gorduras que sofreram hidrogenação<sup>121</sup>, foram encontrados no presente estudo, porém com teores considerados insignificantes quando comparados a parâmetros da legislação.<sup>122-124</sup>

## 5.2 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos para a caracterização físico-química do óleo de buriti obtido por via biotecnológica.

### **Tabela 2.**

Caracterização físico-química do óleo de buriti (*M. flexuosa*) obtido via biotecnologia.

<b>Determinações</b>	<b>Média (DP)</b>
Índice de Acidez (mg KOHg <sup>-1</sup> )	3,80 (0,09)
Índice de Peróxido (Meqkg <sup>-1</sup> )	8,34 (0,40)
Índice de Saponificação (mg KOHg <sup>-1</sup> )	230 (2,51)
Índice de Iodo (cg I <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> )	77,26 (1,12)
Índice de Refração	1,47 (0,00)
Densidade Relativa 20°C (kgm <sup>-3</sup> )	920 (0,00)
Viscosidade 25°C (mPA.s <sup>-1</sup> )	45,32 (0,00)
Umidade (%)	0,23 (0,06)
Impurezas Insolúveis em Éter (%)	0,66 (0,06)
Cinzas (%)	0,17 (0,00)

O produto avaliado encontra-se em conformidade com os limites máximos estabelecido pelo *Codex Alimentarius Commission*<sup>125</sup> para os valores de acidez e de peróxidos (Tabela 2), respectivamente, de 4,0 mg KOH.g<sup>-1</sup> e 15 meq.Kg<sup>-1</sup> para óleos vegetais prensados a frio e não refinados.

Na literatura podem ser encontrados estudos que investigaram o óleo

de buriti quanto a esses parâmetros e, obtiveram resultados acima dos encontrados no presente estudo. Aquino et al.<sup>8</sup> realizaram a extração manual usando calor (60 °C) e obtiveram valores iguais a 4,27(0,43) mg.KOHg<sup>-1</sup> e 14,82(0,72) meq.kg<sup>-1</sup>, respectivamente, para índice de acidez e peróxido.

Os óleos artesanais geralmente obtidos por extração mecânica são mais susceptíveis à degradação, principalmente devido ao processamento térmico e exposição à luz.<sup>126</sup> O óleo de buriti investigado por Cunha et al.<sup>127</sup> obtido por extração supercrítica com dióxido de carbono, utilizando a polpa do fruto, apresentou resultados para índice de acidez de 12,03 mg KOHg<sup>-1</sup>. Isso mostra que, a forma de extração, estocagem ou manipulação podem afetar diretamente esses índices, resultando em maior degradação do óleo.

Os índices de iodo e de refração determinados no presente estudo foram semelhantes aos encontrados tanto no óleo de buriti refinado analisado por Lima, et al.<sup>115</sup>, como também no óleo extraído por diferentes métodos realizados por Silva, et al.<sup>126</sup>, Garcia-Queiroz, et al.<sup>128</sup> e, Cunha et al.<sup>127</sup>. Isso indica que o processo de extração por via biotecnológica não alterou os parâmetros físico-químicos do óleo.

O índice de saponificação obtido para o óleo de buriti (230,0 [2,51] mg KOH.g<sup>-1</sup>) apresentou-se elevado de acordo com Serra et al.<sup>114</sup>, ou seja, maior que 160 mg KOH.g<sup>-1</sup>, o que sugere que o óleo de buriti avaliado apresenta ácidos graxos de cadeia média em sua composição, como o ácido láurico detectado por GC.

Os resultados obtidos para densidade relativa (920 kg/m<sup>-3</sup>) e viscosidade a 25 °C (45,32 mPA.s<sup>-1</sup>) foram semelhantes aos valores médios encontrados na literatura de 916 kg/m<sup>-3</sup> (Cunha et al.<sup>127</sup>, Aquino et al.<sup>8</sup>, Silva et al.<sup>126</sup>, Ceriani et al.<sup>129</sup>) e 46 mPA.s<sup>-1</sup> (Cunha et al.<sup>127</sup>, Aquino et al.<sup>8</sup>) em óleos de buriti brutos ou refinados extraídos de forma convencional ou não convencional em diferentes temperaturas.

### 5.3 ANÁLISE DE MINERAIS

Os resultados obtidos para a determinação de minerais do óleo de buriti obtido por via biotecnológica são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.**

Teor de minerais no óleo de buriti (*M. flexuosa*) obtido por biotecnologia.

<b>Minerais</b>	<b>mg.g<sup>-1</sup> óleo</b>
Cobalto	< LD*
Cobre	0,68
Cromo	< LD
Ferro	1,1
Fósforo	4,37
Magnésio	2,56
Manganês	0,09
Níquel	< LD
Potássio	1,7
Sódio	5,96
Cálcio	9,00
Zinco	0,93

\*LD: Limite de Detecção.

O mineral presente em maior concentração foi o cálcio (9,00 mg.g<sup>-1</sup>), seguido do sódio (5,96 mg.g<sup>-1</sup>) e fósforo (4,37 mg.g<sup>-1</sup>). Silva, et al.<sup>127</sup> avaliou o óleo de buriti refinado obtido da polpa do fruto, encontrando apenas o fósforo (1,00 mg.Kg<sup>-1</sup>).

A elevada concentração de minerais obtida no óleo de buriti investigado pode ser justificada pela ausência de processamento (refino) após a obtenção. Os óleos refinados sofrem uma redução significativa no teor de minerais a fim de prolongar a vida de prateleira, pois os íons metálicos são desencadeadores de processos oxidativos, interferindo na qualidade e nos aspectos sensoriais dos óleos comestíveis.<sup>130</sup>

#### 5.4 PERFIL DE COMPOSTOS FENÓLICOS

A Tabela 4 mostra o perfil de compostos fenólicos presentes no óleo de buriti detectados por HPLC. Observa-se que altas concentrações de compostos fenólicos encontradas no óleo de buriti podem ser representadas pela predominância do flavonoide glicosídeo, quercetina, reconhecido por seu potente poder antioxidante. Suas propriedades englobam efeitos cardio e gastroprotetor, anti-hipertensivo, antidiabetogênico e imunomodulador, protegendo o organismo contra câncer, processos inflamatórios, virais, infecciosos e alérgicos.<sup>131</sup>

##### **Tabela 4.**

Perfil de compostos fenólicos presentes na fração hidrofílica do óleo de buriti (*M. flexuosa*), obtido por CLAE, utilizando os padrões comerciais de ácido gálico, catequina, ácido vanílico, ácido siríngico, ácido elágico, vanilina e quercetina.

<b>Compostos Fenólicos</b>	<b>Teor de Fenólicos (<math>\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}</math>)</b>
Ácido gálico	ND*
Catequina	0,33 (0,02)
Ácido Vanílico	3,49 (0,04)
Ácido Siringíco	0,31 (0,02)
Ácido Elágico	1,11 (0,04)
Vanilina	0,70 (0,31)
Quecetina	20,53 (0,37)
Eugenol	17,60 (0,16)

\*Não detectado.

A quercetina também foi detectada por Koolen et al<sup>11</sup>, por espectrofotometria, no extrato da polpa do buriti proveniente da Amazônia. No óleo, autores afirmam que a quercetina pode proporcionar maior estabilidade ao prevenir danos oxidativos induzidos por radicais-livres, íons peróxidos e metais de transição com seus íons metálicos, retardando a peroxidação lipídica.<sup>129</sup>

O segundo fenólico predominante no óleo de buriti avaliado foi o eugenol [17,60 (0,16)  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ], inferior à média encontrada por exemplo no cravo-da-índia, referenciado como uma das principais fontes de eugenol. Este fenólico apresenta propriedades antioxidantes, antimicrobianas, antivirais e citotóxicas.<sup>133</sup>

A vanilina também foi detectada no óleo de buriti na concentração de 0,70 (0,31)  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Este composto caracteriza-se como um importante flavorizante, tendo como fonte de extração a planta *Vanilla planifolia*, muito procurado pela indústria alimentícia.<sup>134</sup>

Foram detectados ainda no estudo os taninos, ácido elágico e catequina, antioxidantes com efeitos antimicrobianos e citotóxicos no organismo, contribuindo para a prevenção da oxidação induzida por radicais-livres, resultando em redução do estresse oxidativo.<sup>135,136</sup>

## 5.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Um antioxidante pode agir em um sistema por meio de diferentes mecanismos e, sua efetividade pode variar em função da presença de diferentes espécies de radicais.<sup>137</sup> O uso de múltiplos métodos de avaliação da atividade antioxidante tem sido recomendado, uma vez que, variam em termos de substratos, mecanismos e condições de reação.<sup>138</sup>

A Tabela 5 mostra os resultados obtidos pelas diferentes metodologias utilizadas para avaliar a atividade antioxidante das frações hidrofílica (HF) e lipofílica (LF), obtidas a partir do óleo de buriti. Observou-se que HF apresentou uma maior atividade antioxidante em todos os testes realizados, quando comparada a LF ( $p < 0,05$ ). Isso reflete a presença de altas concentrações de compostos fenólicos detectados por HPLC. Esses compostos apresentam a capacidade de doar hidrogênio ou elétrons com intuito de estabilizar os radicais livres, inibindo a cadeia de iniciação ou interrompendo a cadeia de propagação das reações oxidativas promovidas por estas substâncias.<sup>139,140</sup> Em função disso, os fenólicos têm papel de destaque na redução do estresse oxidativo no organismo humano desencadeado por diversas patologias.<sup>141-143</sup>

**Tabela 5.**

Atividade antioxidante nas frações hidrofílicas e lipofílicas do óleo de buriti (*M. flexuosa*) obtido por biotecnologia.

Testes Antioxidantes	Mean (DP)	
	Fração Hidrofílica	Fração Lipofílica
TCA (mg AA g <sup>-1</sup> )	8,96 (0,10) <sup>A</sup>	2,88 (0,23) <sup>B</sup>
Poder Redutor (mg AA g <sup>-1</sup> )	32,00 (0,00) <sup>A</sup>	12,23 (1,30) <sup>B</sup>
DPPH (μM TE.g <sup>-1</sup> )	37,17 (0,10) <sup>A</sup>	0,32 (0,02) <sup>B</sup>
Íon Superóxido (% inibição)	87,66 (0,283) <sup>A</sup>	82,14 (0,122) <sup>B</sup>

Nota: Letras maiúsculas iguais, na mesma coluna, não diferem significativamente ( $p > 0,05$ ). Letras maiúsculas diferentes na mesma linha, diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ).

Em relação ao teste de sequestro do radical DPPH, o resultado obtido para HF (37,17 μM TE.g<sup>-1</sup>) foi 100 vezes maior quando comparada a LF (0,32 μM TE.g<sup>-1</sup>). Estudos encontrados na literatura mostram dados obtidos em estudos com óleos vegetais inferiores aos valores encontrados no presente estudo. Ribeiro et al.<sup>144</sup> obtiveram encontraram valores iguais a 1,94 e 1,08 μM TE.g<sup>-1</sup>, respectivamente para as frações hidrofílica e lipofílica obtidas a partir do óleo da faveleira (*Cnidocolus quercifolius*). Li et al.<sup>145</sup> avaliaram o óleo de nozes solubilizado em isopropanol e obtiveram resultado igual a 0,47 μM TE.g<sup>-1</sup>.

Tanto HF (32,00 mg AA.g<sup>-1</sup>) como a LF (12,23 mg AA.g<sup>-1</sup>) do óleo de buriti apresentaram valores de poder redutor maiores que os encontrados no estudo de Ribeiro et al.<sup>144</sup>, que utilizou o extrato metanólico oriundo do óleo obtido da faveleira, e obteve 0,11 mg AA.g<sup>-1</sup> e 1,59 mg AA.g<sup>-1</sup> para a fração lipofílica e hidrofílica, respectivamente. Por outro lado, observa-se comportamento semelhante ao obtido no presente estudo, ou seja, a fração hidrofílica teve maior potencial antioxidante comparada a lipofílica. O poder redutor está relacionado com a habilidade do composto em transferir elétrons, os quais contribuem para neutralizar os radicais livres.<sup>146</sup> Alguns estudos mostram que a capacidade do poder redutor de um composto pode servir como indicador do significativo potencial antioxidante.<sup>147,148</sup>

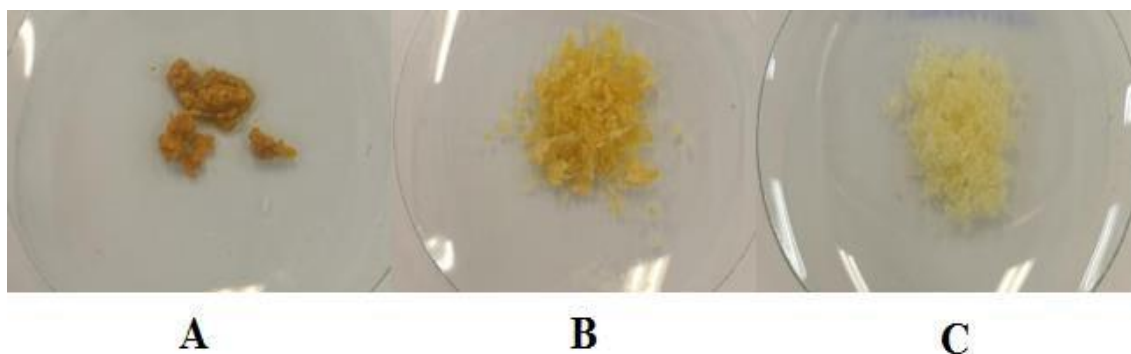
A atividade antioxidante de óleos vegetais está diretamente associada às condições de cultivo da matéria-prima e extração do óleo vegetal (Espinosa-Pardo et al.<sup>149</sup>, Viganó et al.<sup>150</sup>), sendo a via biotecnológica uma alternativa para

a obtenção do óleo de buriti. Os resultados mostram que o óleo de buriti obtido por via biotecnológica pode ser empregado como fonte de compostos antioxidantes, minerais e ácidos graxos polinsaturados na dieta, apresentando grande potencial para ser utilizado como ingrediente em alimentos industrializados.

## 5.6 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

A técnica de encapsulação em produtos, como os óleos vegetais, vem sendo empregada na indústria para minimizar problemas relacionados à instabilidade de substâncias naturais, como os compostos bioativos, pigmentos e micronutrientes, bem como de insolubilidade em água e baixa palatabilidade.<sup>14,16,151</sup>

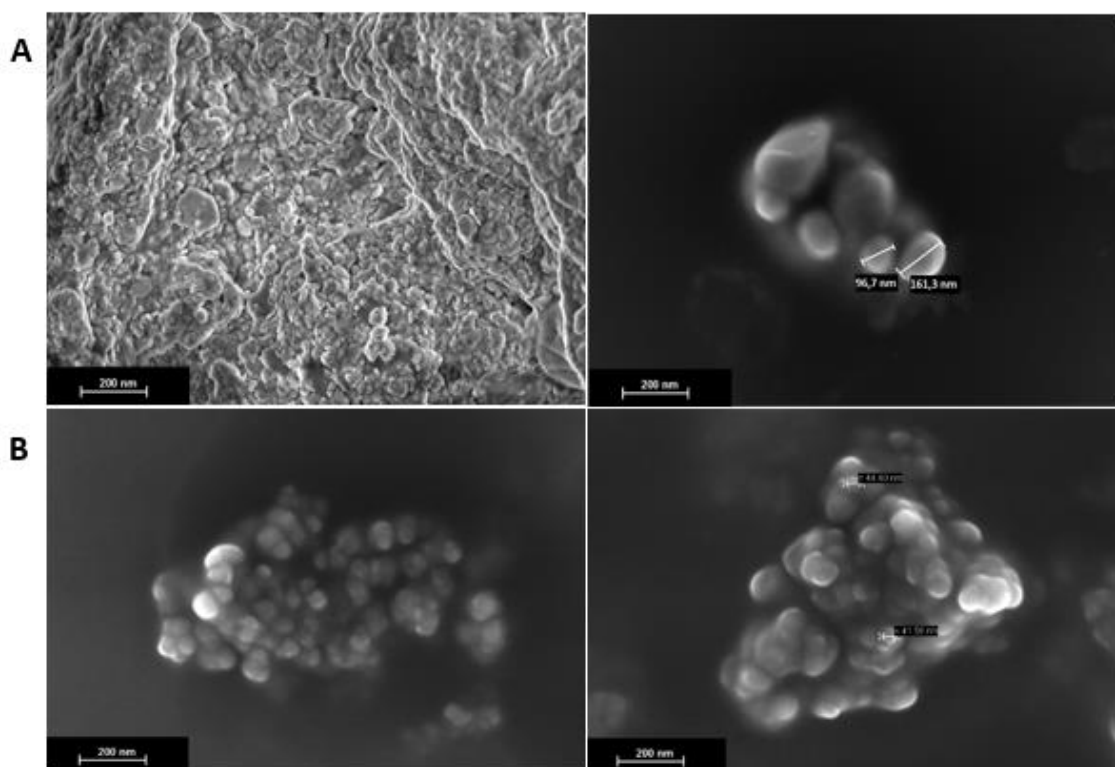
Diante destes propósitos, o encapsulado a base de alginato (OAL) foi excluído do estudo, devido às características visuais observadas, tais como o aspecto oleoso (Figura 7), o qual inviabilizou a realização de análises como MEV e DRX, apontando a ineficácia da encapsulação do óleo de buriti. Com este agente, Soliman, et al.<sup>152</sup>, observaram que concentrações de alginato acima de 2 % promoveram redução na eficiência de incorporação de óleos vegetais essenciais. De acordo com os pesquisadores, isso ocorreu devido ao aumento do espaço ocupado pelo alginato, causando diminuição do espaço livre dentro da matriz polimérica e, em função disso a quantidade de óleo aprisionada também diminui.



**Figura 7.** Encapsulados em pó a base de óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*) obtidos pela técnica de emulsificação O/A. A: óleo de buriti encapsulado em alginato de sódio (OAL); B: óleo de buriti encapsulado em gelatina suína (OGS); C: óleo de buriti encapsulado em alginato de sódio e gelatina suína (OAG).

## 5.7 MICROSCOPIA DE VARREDURA (MEV)

A Figura 8 mostra as micrografias obtidas a partir dos encapsulados OGS e OAG. Por meio do MEV, pode-se analisar e caracterizar aspectos morfológicos de superfície das partículas formadas, bem como seu tamanho físico e homogeneidade.<sup>153,154</sup>



**Figura 8.** Micrografias obtidas por MEV das partículas em pó, dispersas em acetona, obtidas pela técnica de emulsificação O/A. (A) OAG: encapsulado a base da combinação de alginato de sódio, gelatina suína, Tween 20 e óleo de buriti e; (B) OGS: encapsulado a base de gelatina suína, Tween 20 e óleo de buriti.

Para OAG pode-se observar a presença de partículas com formato esférico e oval, superfícies lisas, sem rachaduras ou depressões, com grande aglomeração e heterogêneas quanto à distribuição de tamanho físico, mostrando muitas partículas em escala micrométrica e poucas em escala nanométrica.

Partículas em formato esférico, caracterizadas como micropartículas (> 100 nm) e dispostas de forma heterogênea, também foi observado em um estudo ao realizar a encapsulação de óleo essencial por emulsão com os

agentes encapsulantes alginato de sódio e goma de caju.<sup>155</sup>

Lemos et al.<sup>156</sup>, ao encapsular óleo de buriti por coacervação obtiveram micropartículas com tamanho heterogêneo ao utilizar alginato de sódio e gelatina como agentes encapsulantes.

Por outro lado, OGS apresentou partículas esféricas, com superfícies lisas e, tamanho na escala nanométrica ( $< 100 \text{ nm}$ )<sup>18</sup> com distribuição homogêneas e, menor tendência à aglomeração quando comparada a OAG.

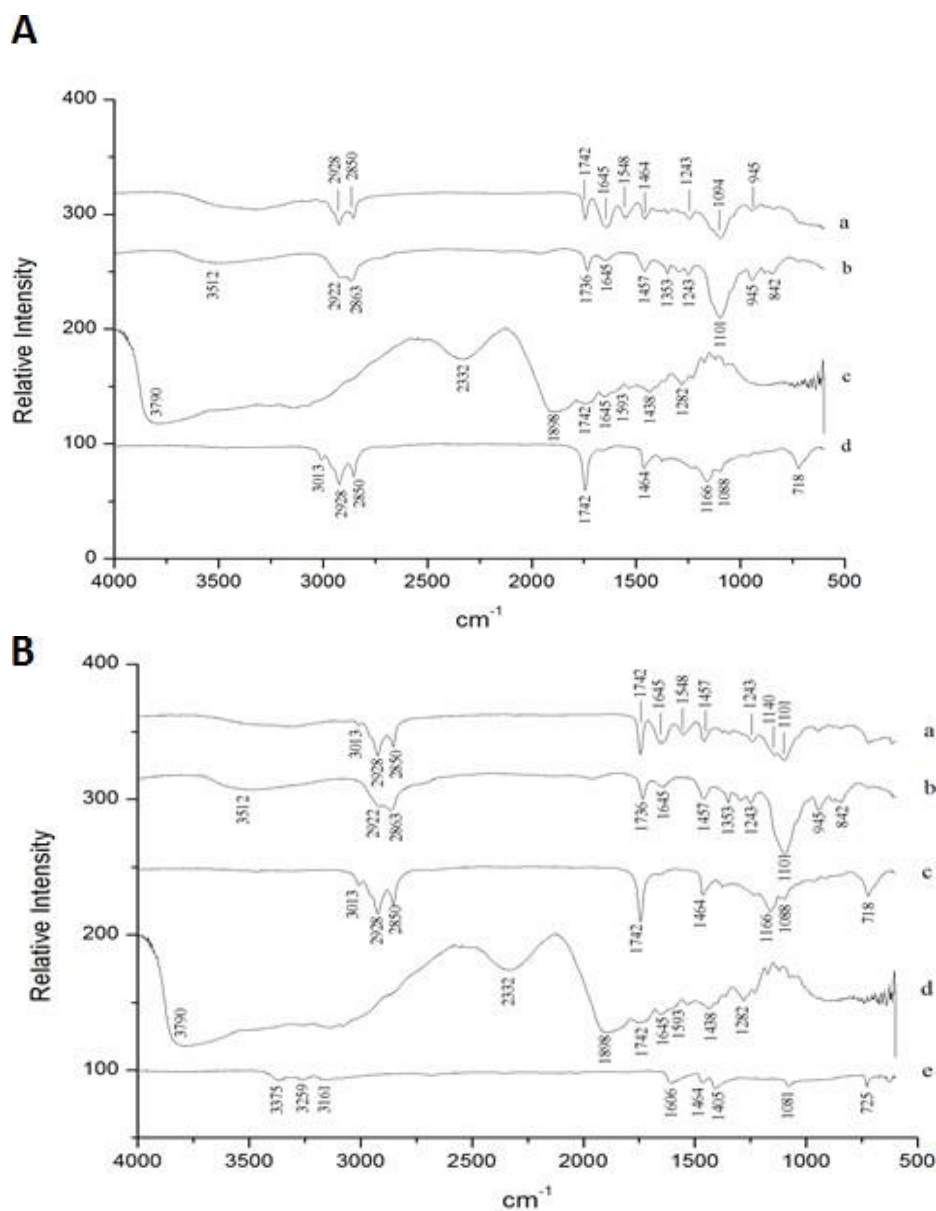
A partir desses resultados o óleo de buriti encapsulado pela técnica de emulsificação O/A foi bem protegido, tanto por gelatina suína (OGS), como também pela combinação desta com alginato de sódio (OAG). Entretanto, a gelatina suína foi o agente encapsulante que proporcionou menor tamanho e distribuição homogênea mais satisfatória, o que pode ajudar a promover o aumento do potencial de aplicação do óleo encapsulado em matriz alimentícia.

## 5.8 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSPORTADA DE FOURRIER (FTIR)

A Figura 9 mostra os espectros de FTIR obtidos para o óleo de buriti puro, agentes encapsulantes isolados e os encapsulados em pó (OGS e OAG). Observou-se no espectro do óleo bruto de buriti a detecção de grupos de hidrocarbonetos, pelas bandas vibracionais na faixa de  $2928 - 2850 \text{ cm}^{-1}$  (ligação C – H), além de bandas na região de  $3013 \text{ cm}^{-1}$  e de  $1464 \text{ cm}^{-1}$ , caracterizando, respectivamente, os grupos –OH e –CH<sub>3</sub>, que mostram a forte constituição deste óleo descrita na literatura como ingrediente fonte de carotenoides.<sup>26</sup> A vibração detectada na região  $1742 \text{ cm}^{-1}$  indica a forte presença de ligações duplas (C = C; C = O) no óleo de buriti, que caracterizam a presença de ácidos graxos insaturados.

O espectro do tensoativo Tween 20 apresentou vibrações intensas na região de  $3512 \text{ cm}^{-1}$ , que caracteriza a presença de ligação –OH; em  $2922 \text{ cm}^{-1}$  e  $2863 \text{ cm}^{-1}$  referente a estiramento das vibrações de metileno assimétrico e simétrico; em  $1736 \text{ cm}^{-1}$ , mostrando vibração

do grupo carbonila; e, em  $1101\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento da vibração  $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$ , de acordo com Silverstein & Webster.<sup>157</sup>



**Figura 9.** Espectros de FTIR dos encapsulados obtidos pela técnica de emulsificação O/A. (A) OGS: encapsulado em gelatina suína: a. OGS: encapsulado em gelatina suína; b. Tween 20; c. gelatina suína; d. óleo de buriti puro; (B) OAG: encapsulado a base da combinação de gelatina suína e alginato de sódio: a. OAG: encapsulado em combinação de gelatina suína e alginato de sódio; b. Tween 20; c. óleo de buriti; d. gelatina suína; e. alginato de sódio.

No espectro da gelatina suína foram observadas bandas que caracterizam vibração em  $1645\text{ cm}^{-1}$ , que reflete a presença da ligação  $\text{C}=\text{O}$  (amida I), que de acordo com Silverstein & Webster<sup>157</sup>, fica próxima à região de  $1650\text{ cm}^{-1}$ . Outra banda é observada em  $1593\text{ cm}^{-1}$ ,

apontando a presença de amida secundária acíclica, em função da flexão da ligação N-H, de acordo com Guerrero et al.<sup>158</sup>

O alginato de sódio apresentou vibrações na região de 1597 – 1413  $\text{cm}^{-1}$  que indica a presença do grupo carbonila (C = O), valores próximos também detectados por Lawrie et al.<sup>159</sup> e Lemos et al.<sup>156</sup> Observou-se também no espectro do alginato de sódio uma vibração na faixa 3360 - 3156  $\text{cm}^{-1}$  e, 1080  $\text{cm}^{-1}$  que caracterizam, respectivamente a existência em sua estrutura de grupos hidroxilas (O-H) e anéis piranosídicos (C - O), também detectados por Mandal et al.<sup>160</sup> e Lee et al.<sup>161</sup>

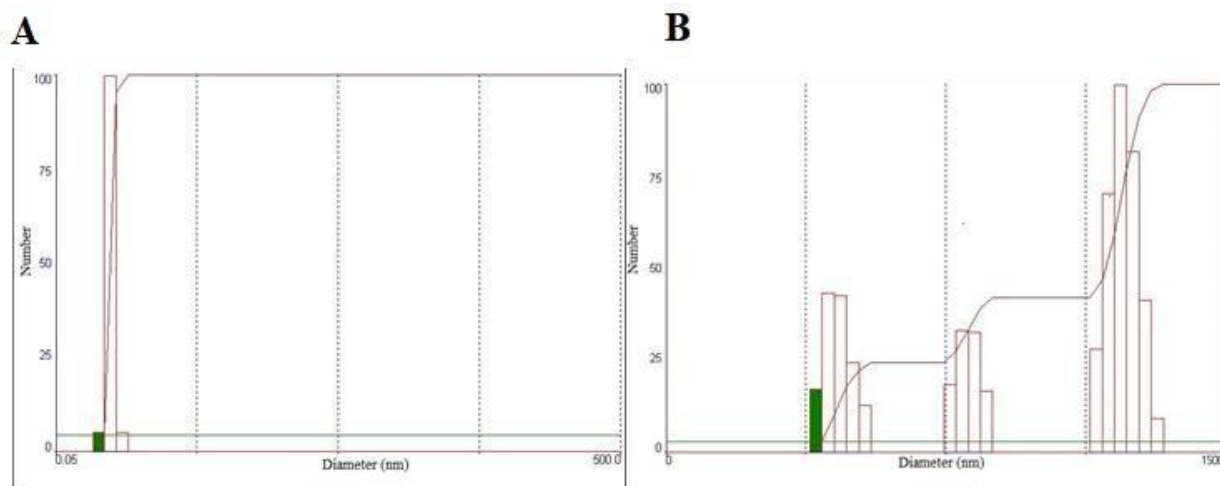
Ao observar o espectro obtido do OGS (Figura 9B) pode-se observar que houve interação entre o agente encapsulante gelatina, o óleo de buriti e tensoativo Tween 20, pela atenuação das bandas de absorção detectadas no Tween 20 (1097  $\text{cm}^{-1}$ ) e, no óleo de buriti (3013, 2928, 2850 e 1742  $\text{cm}^{-1}$ ), indicando não somente a presença como também proteção do óleo nas partículas obtidas. Também foi observado um estiramento da vibração em 1645  $\text{cm}^{-1}$  presente tanto na gelatina pura quanto no Tween 20. Além disso, houve a formação de novas bandas, não observadas nos espectros do óleo de buriti puro e gelatina suína bruta (1548 – 1094  $\text{cm}^{-1}$ ), o que pode ser um indicativo de interações hidrofóbicas entre aminoácidos apolares presentes na molécula da gelatina suína com a cadeia carbônica do óleo vegetal.

Por outro lado, ao observar o espectro do OGA (Figura 9B) houve uma atenuação menos expressiva nas bandas de absorção referentes ao óleo de buriti (2928, 2850, 1742  $\text{cm}^{-1}$ ). Entretanto, foi identificada atenuação de bandas de vibração do Tween 20 (1645 e 1101  $\text{cm}^{-1}$ ), estiramento da vibração de 1645  $\text{cm}^{-1}$ , também observada na gelatina suína e no Tween 20, além da formação de novas bandas (1548  $\text{cm}^{-1}$  e 1140  $\text{cm}^{-1}$ ), podendo sugerir a presença de interações químicas entre os materiais utilizados no estudo. Interações químicas mais expressivas entre os mesmos agentes encapsulantes utilizados no estudo foram observados por Lemos et al.<sup>156</sup>, por meio da encapsulação do óleo de buriti por coacervação.

## 5.9 DIFRAÇÃO A LASER

O tamanho de partícula é um parâmetro importante para definir a aplicação dos encapsulados. Sagiri et al.<sup>162</sup> reforçam que o tamanho de partícula e sua distribuição são de suma importância quando a intenção é a incorporação de ingrediente em alimentos, uma vez que, partículas grandes podem afetar os atributos de textura do produto final, e a biodisponibilidade do ativo. Tendo em vista que, apresentam uma maior variedade de tamanho.<sup>51,160,161</sup>

Os resultados de tamanho de partícula e índice de polidispersão obtidos para os encapsulados produzidos no presente estudo foram: 51,0 (6,07) nm e 0,40 (0,05) para grupo OGS e; para o grupo OAG, 400,0 (7,0) nm e 0,55 (0,12) para partículas menores e 1443,87 (87,83) nm e 0,60 (0,09) das partículas maiores. Com isso, é possível inferir que OGS apresentou distribuição unimodal de tamanho e, OAG apresentou distribuição trimodal de tamanho, como pode ser observado na Figura 10.



**Figura 10.** Distribuição de tamanho de partícula por Difração a Laser de partículas encapsulados em pó, obtidos pela técnica de emulsificação OA, os quais foram reticulados e redispersos em acetona para mensuração. (A) OGS: encapsulado em gelatina suína e, (B) OAG: encapsulado em combinação de alginato de sódio e gelatina suína.

Com base nisso, é possível observar que os resultados obtidos reforçam o que foi mostrado por meio do MEV, ou seja, que a

encapsulação do óleo de buriti com gelatina suína promoveu a obtenção de nanopartículas com dispersão de tamanho homogêneo, tendo em vista que apresentaram tamanho inferiores a 100 nm e menor índice de polidispersão. O oposto foi observado para OAG, cujo processo originou micropartículas, com dispersão de tamanho heterogêneo, devido ao maior índice de polidispersão obtido e distribuição trimodal.

Lemos et al.<sup>156</sup> avaliaram a encapsulação do óleo de buriti utilizando técnica de coacervação com a combinação dos agentes encapsulantes alginato e gelatina, sem utilização de tensoativo, obtendo micropartículas na faixa de 132 a 490 µm, distribuição de tamanho heterogêneo, perfil das partículas obtidas no presente estudo pela técnica de emulsificação O/A.

Estudos associaram a influência da concentração e tipo de tensoativo na obtenção de bons resultados de dispersão, tamanho de partículas e, conseqüentemente, de estabilidade físico-química das partículas obtidas após processo de encapsulação de óleos vegetais.<sup>163-165</sup>

No presente estudo, ao obter partículas com diâmetros menores para OGS, pode-se notar a existência de uma melhor interação entre o óleo de buriti, gelatina e o tensoativo Tween 20, comparado à combinação dos encapsulantes do grupo OAG.

Anarjan & Tan<sup>165</sup> observaram que o tipo e a concentração do tensoativo a ser utilizado no processo de encapsulação é capaz de influenciar tanto na eficiência de incorporação do núcleo, bem como no tamanho e dispersão das partículas obtidas no processo.

## 5.10 POTENCIAL ZETA

Esta variável reflete as cargas presentes na superfície das partículas, sendo influenciada por mudanças na interface com o meio dispersante, devido à dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula, ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio de dispersão.<sup>166</sup>

O resultado do Potencial Zeta obtido para OGS e OAG foi de

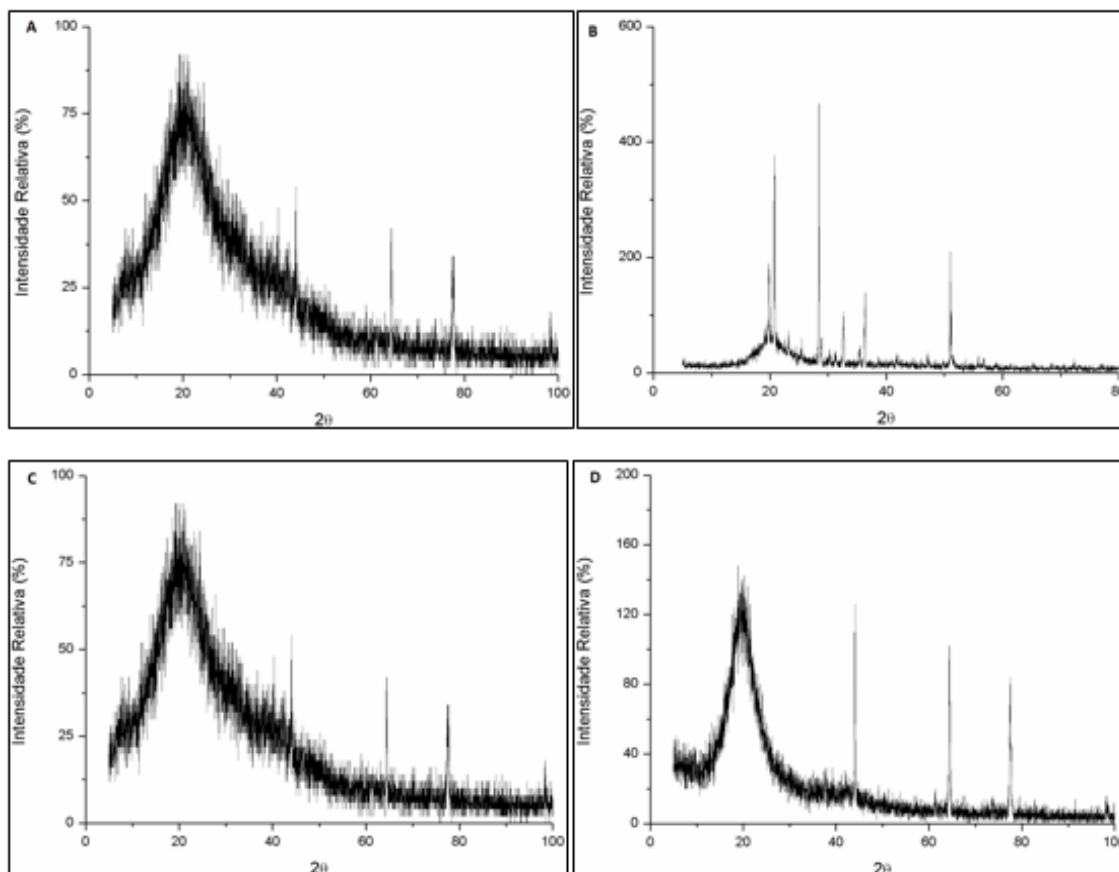
6,85 (0,81) mV e 10,34 (1,79) mV, respectivamente. Os dados obtidos indicam a presença de cargas positivas na superfície das partículas, mostrando a influência do pH no ponto isoelétrico da gelatina suína, tendo em vista que a mesma em pH abaixo de 7,0 tem carga positiva.<sup>167</sup> Além disso, tendo em vista que o alginato é aniônico, nota-se que as partículas obtidas utilizando a combinação de agentes encapsulantes possuem o predomínio de gelatina na superfície.<sup>161,168</sup>

Os valores desta mensuração também são capazes de indicar a estabilidade das partículas obtidas, podendo assim, influenciar na definição da aplicabilidade dos encapsulados obtidos. Conforme Bhattacharjee<sup>169</sup>, altamente estáveis quando os valores do Potencial Zeta são em média  $\pm 30$  mV, moderadamente instáveis de  $\pm 20$ -30 mV e altamente instáveis quando são em média  $\pm 0$ -10 mV. Com isso, pode-se classificar as nanopartículas obtidas como altamente instáveis nas condições definidas no estudo.

Partículas obtidas por Wang et al<sup>170</sup>, ao promover a encapsulação do óleo de atum pela técnica de coacervação, utilizando gelatina e hexametáfosfato de sódio, também obtiveram valor médio de Potencial Zeta semelhante em pH abaixo de 7,0 e, a predominância da gelatina suína na superfície das partículas em pH na faixa de 4,0 - 7,0, associando este resultado ao fato das proteínas apresentarem grupamentos aminos ( $-NH_3^+$ ) carregados positivamente no ponto isoelétrico.

## 5.11 DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX)

A Figura 11 mostra os difratogramas dos agentes encapsulantes na forma bruta e, encapsulados em gelatina e em combinação desta com alginato de sódio.



**Figura 11.** Difratogramas de raios X dos encapsulados em pó obtidos pela técnica de emulsificação O/A. (A) gelatina suína, (B) alginato de sódio, (C) OGS: encapsulado a base de gelatina suína, Tween 20 e óleo de buriti e, (D) OAG: encapsulado a base da combinação de alginato de sódio e, gelatina suína, Tween 20 e o óleo.

Pode-se observar que os difratogramas obtidos para os agentes encapsulantes alginato de sódio e gelatina suína apresentaram estrutura semi-cristalina, com ruídos que caracterizam comportamento amorfo e picos bem definidos, que caracterizam regiões cristalinas, sendo mais predominante no alginato. Oliveira, et al.<sup>17</sup> observou o mesmo comportamento para o alginato de sódio em estudo envolvendo encapsulação de óleo essencial de alecrim-pimenta. A cristalinidade do alginato está relacionada a sua composição molecular contendo

minerais como sódio e cálcio.<sup>171</sup> Já a detecção de picos bem definidos no difratograma da gelatina pode estar relacionada à estrutura da tríplice hélice do colágeno.<sup>18</sup>

Os difatogramas obtidos para os encapsulados sugerem interação entre o óleo de buriti, os agentes encapsulantes e Tween 20, tendo em vista que, observaram-se deslocamentos dos picos e atenuação na intensidade dos sinais de cristalinidade detectados nos encapsulados, especialmente no difratograma do encapsulado em gelatina.

## 5.12 EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO DO ÓLEO DE BURITI

A eficiência de incorporação obtida para OGS e OAG foi respectivamente, de 86,80 (1,31)% e 71,91 (1,12)%, com diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Os resultados caracterizaram uma boa eficiência de incorporação dos agentes encapsulantes avaliados, porém observou-se maior retenção do óleo de buriti em gelatina comparada a obtida por meio da combinação desta com alginato. Em trabalho de revisão sobre encapsulação, Sagiri et al<sup>162</sup> indicam estudos com ótima eficiência de incorporação quando percentuais >80% são obtidos. Esse resultado reflete a boa interação entre gelatina, óleo de buriti e Tween 20 mostrada na caracterização por FTIR, que apontou interações químicas entre os materiais e maior proteção do núcleo.

Em estudo avaliando a eficiência de incorporação do óleo de buriti encapsulado em combinação de gelatina e alginato de sódio, por meio da técnica de coacervação, foi obtido percentual semelhante comparado ao presente estudo (85%).<sup>156</sup>

Diferenças em resultados de eficiência de incorporação estão relacionadas com a proporção de núcleo e encapsulante, nas condições sob as quais o encapsulamento foi realizado e da técnica ou método de obtenção empregado.<sup>172</sup> Com isso, uma eficiente incorporação de óleo vai depender diretamente da quantidade utilizada no processo, por influenciar na eficiência de aprisionamento pelos agentes encapsulantes e na ação dos tensoativo.<sup>173</sup>

### 5.13 ENSAIO DE DISPERSÃO EM ÁGUA

Os óleos vegetais são conhecidos pela baixa solubilidade em água, sendo investigadas formas de resolver esta limitação por meio do uso de solventes orgânicos, ou por técnicas como a encapsulação.<sup>174,175</sup> Esta técnica caracteriza-se por aumentar o potencial de aplicação destes produtos no mercado, ao aumentar a solubilidade de substâncias lipofílicas em água.<sup>162,176</sup>

As partículas em nanoescala têm atraído muita atenção para o desenvolvimento de novos complexos de biopolímeros para o aprimoramento não somente da estabilidade dos óleos, mas também da solubilidade.<sup>177</sup> Tendo em vista que, o tamanho das partículas obtidas pode influenciar diretamente na solubilidade, devido a maior disposição da superfície de contato para interações entre os constituintes do sistema, as nanopartículas proporcionam maior solubilidade ao produto final.<sup>162,178,179</sup>

Os resultados do ensaio de solubilidade obtidos para os encapsulados e para o óleo de buriti bruto mostram que OGS apresentou maior solubilidade em água [89,83% (2,59)] ( $p < 0,05$ ), comparado ao OAG [42,84% (2,21)], tendo o óleo de buriti bruto o menor percentual de solubilidade [3,91% (0,39)].

Keawchaon e Yoksan<sup>180</sup> associaram bons resultados de solubilidade de óleos encapsulados em quitosana à formação de nanopartículas após o processo de encapsulação. Esta associação pode ser observada com o óleo de buriti encapsulado em gelatina (OGS), que apresentou melhor solubilidade em água comparado ao grupo OAG, devido ao menor tamanho de partícula obtido para esse grupo, além da maior interação química entre os materiais apontada pela FTIR.

### 5.14 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A Tabela 6 descreve o percentual de inibição do crescimento microbiano obtido para o óleo bruto de buriti e encapsulado na concentração de 2,5 mg.mL<sup>-1</sup>, na qual apresentou a melhor atividade antimicrobiana.

**Tabela 6.**

Média e desvio-padrão do percentual de inibição do crescimento microbiano para os microrganismos *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumonia*, pelo óleo de buriti bruto (*Mauritia flexuosa*), encapsulados em gelatina suína (OGS), na concentração de 2,5 mg.mL<sup>-1</sup>.

Microrganismo	Inibição do crescimento (%) (DP)	
	Óleo de buriti Bruto	OGS
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	68,42 (1,19) <sup>a</sup>	49,1 (14,8) <sup>a</sup>
<i>Klebsiella pneumonia</i>	39,24 (3,48) <sup>a</sup>	29,5 (6,42) <sup>a</sup>

\*Médias de três repetições (desvio padrão).

\*Letras minúsculas iguais, na mesma linha, não diferem significativamente segundo o Teste t Student ( $p > 0,05$ ).

A formulação OGS foi avaliada por ter obtido melhores resultados no estudo de caracterização, eficiência de incorporação e solubilidade. Pode-se observar que, o óleo bruto apresentou inibição do crescimento bacteriano das cepas analisadas, com destaque para a inibição de *Pseudomonas aeruginosa* (>50%). Já o encapsulado a base de gelatina suína (OGS) conseguiu preservar a atividade antimicrobiana do óleo de buriti ( $p > 0,05$ ).

Poucos estudos foram encontrados reportando a atividade antimicrobiana do óleo de buriti. Gomez-Estaca et al.<sup>181</sup> ao utilizar gelatina e/ou gelatina em combinação com quitosana como agentes encapsulantes na incorporação de óleo essencial do cravo, observaram que não afetou significativamente ( $p > 0,05$ ) a inibição de crescimento dos microrganismos: *Pseudomonas fluorescens*, *Lactobacillus acidophilus*, *Listeria innocua* e *E. coli*.

Koolen et al.<sup>11</sup>, apesar de não citar o percentual de inibição bacteriana no estudo, encontrou no extrato de buriti o melhor desempenho na atividade antimicrobiana em cepas como *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Entretanto, estes pesquisadores utilizaram uma concentração de 50 mg/mL do extrato, maior que a utilizada no presente estudo (2,5 mg.mL<sup>-1</sup>).

Ao analisar a atividade antimicrobiana do óleo de buriti, em uma concentração de partida de 800 mg/mL, foi observada uma atividade de inibição

contra algumas bactérias, dentre elas: *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*.<sup>13</sup> Batista et al.<sup>13</sup> identificaram maior desempenho de inibição no crescimento da cepa *Klebsiella pneumoniae*, exercido pelo óleo de buriti.

Os produtos de origem vegetal apresentam atividade antimicrobiana mais intensa sobre o crescimento de bactérias gram-positivas que gram-negativas. Oliveira et al.<sup>182</sup>, associam a predominância deste comportamento antimicrobiano à maior interação entre os constituintes fitoquímicos presentes no óleo com a parede celular bacteriana.

Por outro lado, a membrana externa presente nas bactérias gram-negativas podem atuar como uma barreira contra os compostos bioativos presentes nos extratos e óleos de vegetais.<sup>174</sup> Entretanto, o presente estudo obteve resultado de inibição acima de 50% para *Pseudomonas aureaginosa*, que é um microrganismo gram-negativo, mesmo na menor concentração utilizada.

## 6. CONCLUSÃO

O processo biotecnológico possivelmente potencializou a extração de ácidos graxos, minerais e antioxidantes, como os compostos fenólicos, durante a obtenção do óleo de buriti promovendo seu caráter funcional. O perfil de ácidos graxos identificado no óleo aponta perceptíveis lacunas sobre o processo fermentativo com a utilização das cepas *Pichia pastori* e *Lactobacillus sp.*

Em adição, o encapsulamento do óleo de buriti, por meio da técnica de emulsificação O/A, mostrou-se um processo promissor ao utilizar gelatina suína como agente encapsulante e Tween 20 como tensoativo. Esta formulação permitiu a produção de nanopartículas com distribuição de tamanho homogênea, sendo crucial para aumentar a solubilidade do óleo em água. Isto associado a preservação do potencial antimicrobiano do óleo, aumentam o potencial de aplicação do óleo de buriti como ingrediente em alimentos industrializados.

## REFERÊNCIAS

1. Saberi, AH, Kee, BB, Oi-Ming, L, Miskandar, MS. Physico-chemical properties of various palm-based diacylglycerol oils in comparison with their corresponding palm-based oils. *Food Chemistry*. 2011; 127 (3): 1031.
2. Majidi, MIH, Bader, AT. Physicochemical Characteristics of Some Imported Edible Vegetable Oils in Iraq. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2015; 6 (5): 488-494.
3. Albuquerque, MLS, et al. Characterization of Buriti (*Mauritia flexuosa* L.) Oil by Absorption and Emission Spectroscopies. *J. Braz. Chem. Soc.* 2005; 16 (6): 1113-1117.
4. Sampaio, MB. Boas práticas de manejo para o extrativismo sustentável do buriti; Brasília: Instituto Sociedade, População e Natureza, 2011: pp 80.
5. Freire, JAP, Barros, KBNT, Lima, LKF, Martins, JM, Araújo, Y de C, Oliveira, GL de S, et al. Phytochemistry Profile, Nutritional Properties and Pharmacological Activities of *Mauritia flexuosa*. *Journal of Food Science*. 2016; 81 (11): R2611-R2622.
6. Rodriguez-Amaya, DB. A guide to carotenoid analysis in foods. Campinas, SP: ILSI Human Nutrition Institute, 2001: pp 71.
7. Taipina, MS, Lamardo, LC, Campos, NC, Tavares, M, Gonzalez, E, Jorge, LIF, et al. Review of literature: carotenoids, chemical composition and dietary reference intake of buriti fruits. *International Journal of Nutrology*, 2013, 6(3), 102-106.
8. Aquino, JS, Pessoa, DCN de P, Araújo, K de LGV, Epaminondas, OS, Schuler, ARP, Souza, AG de, et al. Refining of buriti oil (*Mauritia flexuosa*) originated from the Brazilian Cerrado: physicochemical, thermal-oxidative and nutritional implications. *J Braz Chem Soc*. 2012; 23 (2): 212-219.
9. Carvalho, CO, Scudeller, VV, Sargentini Júnior, E, Fernandes, OCC, Bolson, MA. Características físicas, químicas e rendimento do óleo de buriti (*Maurita flexuosa* L.f. – Arecaceae). In: Santos-Silva, EM, Scudller, VV, Cavalcanti, MJ. *BioTupé: Meio Físico, Diversidade Biológica e Sociocultural do Baixo Rio Negro. Amazônia Central*, 2011: 3: 123-134.
10. Uenojo, M, Maróstica Junior, MR, Pastore, GM. Carotenoides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de

aroma. *Quim Nova*. 2003: 30 (3): 616-622.

11. Koolen, HHF, Silva, FMA da, Gozzo, FC, Souza, AQL de; Souza, ADI de. Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) by UPLC-ESI-MS/MS. *Food Research International*. 2013: 51: 467-473.

12. Koolen, HHF, Soares, ERS, Silva, FMA, Almeida, RA, Souza, AQL. An antimicrobial alkaloid and other metabolites produced by *Penicillium* sp. An endophytic fungus isolated from *Mauritia flexuosa* L. f. *Quim. Nova*. 2012: 35 (4): 771-774.

13. Batista, JS, Olinda, RG, Medeiros, VB, Rofrigues, CMF, Oliveira, AF, Paiva, ES, et al. Atividade antibacteriana e cicatrizante do óleo de buriti *Mauritia flexuosa* L. *Ciência Rural*. 2012: 42 (1): 136 – 141.

14. Azeredo, HMC. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. *Alim. Nutr*, 2005: 16 (1): 89-97.

15. Quian, C, Decker, EA, Xiao, H, McClements, D J. Inhibition of  $\beta$ -carotene degradation in oil-in-water nanoemulsions: influence of oil-soluble and water-soluble antioxidants. *Food Chemistry*. 2012: 135: 1036-1043.

16. Schrooyen, P, Van Der Meer, R, De Kruif, C. Microencapsulation: its application in nutrition. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2001: 60: 475 – 479.

17. Oliveira, EF, Paula, HCB, Paula, RCM. Alginate/cashew gum nanoparticles for essential oil encapsulation. *Colloids and Surfaces B. Biointerfaces*. 2014: 113: 146–151.

18. Peña, C, Caba, K, Eceiza, A, Ruseckaite, R, Mondragon, I. Enhancing water repellence and mechanical properties of gelatin films by tannin addition. *Bioresource Technology*. 2010: 101: 6836–6842.

19. Barras, A, Mezzetti, A, Richard, A, Lazzaroni, S, Roux, S, Melnyk, P, et al. Formulation and characterization of polyphenol-loaded lipid nanocapsules. *Int. J. Pharm.* 2009: 379 (2): 270–277.

20. Naik, A, Meda, V, Lele, SS. Freeze drying for microencapsulation of  $\alpha$ -linolenic acid rich oil: A functional ingredient from *Lepidium sativum* seeds. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2014: 116 (7): 837–846.

21. Nazzaro, F, Orlando, P, Fratianni, F, Coppola, R. Microencapsulation in food science and biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2012: 23 (2): 182–186.

22. Castro, DS, Sousa, EP, Nunes, JP, Silva, LMM, Moreira, IS.

Caracterização física e físico-química de polpa de buriti (*Mauritia flexuosa*). Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável. 2014: 9 (2): 117-120; Mossoró.

23. MMA. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidade. Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: Plantas para o futuro – Região Centro-Oeste. Brasília (DF), 2016.

24. Barbosa, RI, Lima, AD, Mourão Júnior, M. Biometria de frutos do buriti (*Mauritia flexuosa* L.F. – Arecaceae): produção de polpa e óleo em uma área de savana em Roraima. Amazônia: Ci. & Desenvolvimento. 2010: 5 (10): 71-85.

25. Vieira, DA, Facó, LR, Cecy, A. Buriti: um fruto do cerrado considerado uma planta de uso múltiplo. Cenarium Farmacêutico. 2011 Maio/Nov; 4 (4):11-22.

26. Rodriguez-Amaya, DB, Kimura, M, Amaya-Farfan, J. Fontes Brasileiras de Carotenoides: tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos. Organizadores: CORADIN, L, POMBO, VB. - Brasília: MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. 2008: 100.

27. Bajoub, A, Carrasco-Pancorbo, A, Ajal, EA, Ouazzani, N, Fernández-Gutiérrez. Potential of LC–MS phenolic profiling combined with multivariate analysis as an approach for the determination of the geographical origin of north Moroccan virgin olive oils. Food Chemistry. 2015: 166: 292-300.

28. Castelo-Branco, VN, Torres, AG. Capacidade antioxidante total de óleos vegetais comestíveis: determinantes químicos e sua relação com a qualidade dos óleos. Revista de Nutrição. 2011: 24 (1): 173-187.

29. Cândido, TLN, Silva, MR, Agostini-Costa, TS. Bioactive compounds and antioxidant capacity of buriti (*Mauritia flexuosa* L.f.) from the Cerrado and Amazon biomes. Food Chemistry. 2015: 177: 313-319.

30. Rodriguez-Amaya, DB. Carotenoids and foods preparation: the retention of provitamin A carotenoids in prepared, processed and stored foods. Campinas, SP, 1997.

31. Khoo, H, Prasad, KN, Kong, K, Jiang, Y, Ismail, A. Carotenoids and their isomers: color pigments in fruits and vegetables. Molecules. 2011: 16: 1710-1738.

32. Yuyama, LKO, Yonekura, L, Aguiar, JPL, Sousa, RFS. Biodisponibilidade dos carotenoides do buriti (*Mauritia flexuosa* L.) em ratos. Acta Amazonica. 1998: 28 (4): 409-415.

33. Dias, MG, et al. Critical assessment of three high performance liquid chromatography analytical methods for food carotenoid quantification. *Journal of Chromatography A*. 2010: 1217: 3494-3502.
34. Godoy, HT. Rodriguez-Amaya, DB. Buriti (*Mauritia vinífera* Mart), uma fonte riquíssima de pró-vitamina A. *Arq de Biologia e Tecnologia*. 1995: 38: 109-120.
35. Ribeiro, BD, Coelho, MAZ, Barreto, DW. Production of concentrated natural beta-carotene from buriti (*Mauritia flexuosa*) oil by enzymatic hydrolysis. *Food and Bioproducts Processing*. 2012: 90: 141- 147.
36. Das, A, Yoon, S-H, Lee, S-H, Kim, J-Y, Oh, D-K, Kim, S-W. An update on microbial carotenoid production: application of recent metabolic engineering tools. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007: 77: 505-512.
37. Kopec, RE, Cooperstone, JL, Cichon, MJ, Schwartz, SJ. Analysis methods of carotenoids. In: *Analysis of Antioxidant-Rich Phytochemicals*. 1ªed: John Wiley & Sons, Ltd, 2012: pp 105-148.
38. Milanez, JT, Neves, LC, Silva, PMC da, Bastos, VJ, Shahab, M, Colombo, RC, et al. Pre-harvest studies of buriti (*Mauritia flexuosa* L.F.), a Brazilian nativefruit, for the characterization of ideal harvest point and ripeningstages. *Scientia Horticulturae*. 2016: 202: 77-82.
39. Manhães, LRT. Caracterização da polpa de buriti (*Mauritia flexuosa*, M.): um potente alimento funcional [Dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade Rural do Rio de Janeiro; 2007.
40. Rodrigues, AMC, Darnet, S, Da Silva, LHM. Fatty Acid Profiles and Tocopherol Contents of Buriti (*Mauritia flexuosa*), Patawa (*Oenocarpus bataua*), Tucuma (*Astrocaryum vulgare*), Mari (*Poraqueiba paraensis*) and Inaja (*Maximiliana maripa*) Fruits. *J Braz Chem Soc*. 2010: 21(10): 2000-2004.
41. Connor, WE. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2000: 71: 171-175.
42. Silva, MLD, Costa, RS, Santana, AS, Koblitz, MGB. Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais. *Semina: Ciências Agrárias*. 2010: 31(3): 669-682.
43. Podsedek, A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT-Food Sci. Technol*. 2007: 40: 1-11.
44. Nóbrega, E. M.; Oliveira, E. L.; Genovese, M. I.; Correria, R. T. P. The

impact of hot air drying on the physicalchemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of acerola (*Malphigia emarginata*) residue. J. Food Process. Preserv. 2014: 1 (2): 1-11.

45. Hernández, AM, Prieto Gonzáles, EA. Plantas que contienen polifenoles. Revista Cubana de Investigaciones Biomedica. 1999: 18 (1): 12-14.

46. Graham, HD. Stabilization of the Prussian blue color in the determination of polyphenols. J. Agric. Food Chem. 1992: 40 (5): 801-805.

47. Hrazdina, G, Borzel, AJ, Robinson, WB. Studies on the stability of the anthocyanidin-3,5-diglucosides. Am. J. Enol. Vitic. 1970: 21 (4): 201- 204.

48. Belitz, HD, Grosch, W. Food chemistry. New York: Springer Verlag, 2004: 774p.

49. Manna, C, D'Angelo, S, Migliardi, V, Loffredi, E, Mazzoni, O, Morrica, P, et al. Protective effect of the phenolic fraction from virgin olive oils against oxidative stress in human cells. J. Agric. Food Chem. 2002: 50: 6521-6526.

50. Brennan, JG, Butters, JR, Cowell, ND, Lilley, AEV. Food engineering operations. Linton Road, England: Elsevier Applied Science, 1990.

51. Depypere, F, Dewettinck, K, Ronsse, F, Pieters, J. Food powder microencapsulation: principles, problems and opportunities. Appl. Biotechnol. Food Sci. Pol. 2003: 1(2): 75-94.

52. Pszczola, D. Encapsulated ingredients: providing the right fit. Food Technol. 1998: 52 (12): 70-77.

53. Risch, S.J. Encapsulation: overview of uses and techniques. In: Risch, S.J.; Reineccius, G.A. Encapsulation and controlled release of food ingredients. Washington, DC: ACS, 1995: 2-7. (ACS Symposium. Series, 590)

54. Shahidi, F, Han, X. Encapsulation of food ingredients. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 1993: 33 (6): 501-547.

55. Chen, L, Remondetto, GE, Subirade, M. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. Trends in Food Science & Tecnology. 2006: 272-283.

56. Jaiswal M, Dudhe R, Sharma PK. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. 3 Biotech. 2015: 5 (2): 123-127. doi:10.1007/s13205-014-0214-0.

57. Santos, TM. Influência de nano cristais de celulose sobre as propriedades

de filmes de gelatina de resíduos de tilápia. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2012.

58. Pereira, LJB, Garcia-Rojas, EE. Emulsões múltiplas: formação e aplicação em microencapsulamento de componentes bioativos. 2015: 45 (1): 155-162.

59. Suave, J, Dall'agnol, EC, Pezzin, APT, Silva, DAK, Meier, MM, Soldi, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. Health and Environment Journal. 2006: 7 (2): 12-20.

60. McClements, DJ. Emulsion design to improve the delivery of functional lipophilic components, Ann. Rev. Food Sci. Technol. 2010: 1: 241-269.

61. Spornath, L, Magdassi, S. A new method for preparation of poly- lauryl acrylate nanoparticles from nanoemulsions obtained by the phase in, version temperature proceesy. Polymers for advanced technologies. 2007: 18: 705-711.

62. Anton, N, Bernoit, JP, Saulnier, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates. Journal of Controlled release. 2008: 128: 185-199.

63. Schramm, LL. Emulsions, foams and suspensions: fundamentals and applications. Weinheim: Wiley-VCM Verlag GmbH & Co. KGa A. 2005: 1ª Ed.: 448.

64. Solans, C, et al. Nanoemulsions. Current opinion in colloid e interface science, Kidlington, 2005: 10: 102-110.

65. Solans, C, Izquierdo, P, Nolla, J, Azemar, N. Nano-emulsions. Current Opinion in Colloid & Interface Science. 2005: 10 (3-4): 102-110.

66. Pérez-Alonso, C, et al. Estimation of the activation energy of carbohydrate polymers blends as selection criteria for their use as wall material for spray-dried microcapsules. Carbohydr. Pol. 2003: 53 (2): 197- 203.

67. Gibbs, BF, Kermasha, S, Alli, I, Mulligan, CN. Encapsulation in the food industry: a review. Int. J. Food Sci. Nutr. 1999: 50: 213-224.

68. Fávoro-Trindade, CS, Pinho, SC, Rocha, G.A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. Brazilian Journal of Food Technology. 2008: 11: 103-112.

69. Hamidi, M, Azadi, A, Rafiei, P. Hydrogel nanoparticules in drug delivery. Adv. Drug Deliv. Rev. 2008: 60 (15): 1638-49.

70. Sarmiento, B, Ribeiro, A, Veiga, F, Sampaio, P, Neufeld, R, Ferreira, D. Alginate/chitosan nanoparticules are effective for oral insulin delivery. Pharm.

Res. 2007: 24 (12): 2198-206.

71. Menezes, C, Barin, JS, Chicoski, AJ, Zepka, LQ, Jacob-Lopes, E, Fries, LLM, et al. Microencapsulação de probióticos: avanços e perspectivas. *Ciência Rural* [Online], 2013: 1-8.

72. Martins, E, Poncelet, D, Rodrigues, RC, Renard, D. Oil encapsulation techniques using alginate as encapsulating agent: applications and drawbacks. *Journal of Microencapsulation*. 2017: 34 (8): 754- 771. <http://dx.doi.org/10.1080/02652048.2017.1403495>. PMID:29161939.

73. Sohail, A, Turner, MS, Coombes, A, Bostrom, T, Bhandari B. Survivability of probiotics encapsulated in alginate gel microbeads using a novel impinging aerosols method. *International Journal of Food Microbiology*. 2011: 145: 162-168. Disponível em: Acesso em: 2 mar. 2013. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.007.

74. Anal, AK, Sing, K. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*. 2007: 18: 240-251. Disponível em: Acesso em: 02 mar. 2013. doi:10.1016/j.tifs.2007.01.004.

75. Bigi, A, Borghi, M, Cojazzi, G, Fichera, A, Panzavolta, S, Roveri, N. Structural and Mechanical Properties of Crosslinked Drawn Gelatin Films. *J. Therm. Anal. Calorim*. 2000: 61: 451-459.

76. Gilsenan, PM, Ross-Murphy, SB. Shear creep of gelatin gels from mammalian and piscine collagens. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2001: 49: 53-61.

77. Karim, AA, Bhat, R. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids*. 2009: 23: 563-576.

78. Veis A. *The macromolecular chemistry of gelatin*. 1964: New York, London: Academic Press.

79. Gelatin Manufacturers Institute of America. *Gelatin handbook*. 2012: 3 – 22.

80. Badii, F, Howell, NK. Fish gelatin: Structure, gelling properties and interaction with egg albumen proteins. *Food Hydrocolloids*. 2006: 20: 630-640.

81. Segtnan, VH, Kvaal, K, Rukke, EO, Schüller, RB, Isaksson, T. Rapid assessment of physico-chemical properties of gelatina using near infrared spectroscopy. *Food Hydrocolloids*. 2003: 17: 585-592.

82. Rahman MS, Al-Saidi, GS, Guizani N. Thermal characterisation of gelatin extracted from yellowfin tuna skin and commercial mammalian gelatin. *Food Chem.* 2008; 108: 472–481.
83. Surh J, Decker EA, McClements DJ. Properties and stability of oil- in-water emulsions stabilized by fish gelatin. *Food Hydrocoll.* 2006; 20: 596-606.
84. Burey, P, Bhandari, BR, Howes, T, Gidley, MJ. Hydrocolloid gel particles: formation, characterization, and application. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2008; 48 (5): 361-77.
85. Bortolato, SA, Thomas, KE, McDonough, K, Gurney, RW, Martino, DM. Evaluation of photo-induced crosslinking of thymine polymers using FT-IR spectroscopy and chemometric analysis. *Polymer.* 2012
86. Gustafson J, Shipilin, M, Zhang, C, Stierle, A, Hejral, U, Ruett, U, et al. High-Energy Surface X-ray Diffraction for Fast Surface Structure Determination. *Science.* 2014; 343: 758-761.
87. Aichele CP, Venkataramani D, Smay JE, McCann MH, Richter S, Khanzadeh-Moradillo M, et al. A comparison of automated scanning electron microscopy (ASEM) and acoustic attenuation spectroscopy (AAS) instruments for particle sizing. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2015; 479: 46-51.
88. Buhr E, Senftleben N, Klein T, Bergmann D, Gnieser D, Frase CG, et al. Characterization of nanoparticles by scanning electron microscopy in transmission mode. *Meas. Sci. Technol.* 2009; 20: 1-10.
89. Stojanovic, Z, Markovic, S. Determination of particle size distributions by laser diffraction. *Technics – New Materials.* 2012; 67: 11- 20.
90. Allen, T. Field scanning methods of particle size measurements. In: T. Allen, Powder sampling and particle size determination. Amsterdam: Elsevier, Chap 10. 2003: 524-608.
91. Mosqueira, VCF, Legrand, P, Pinto-Alphandary, H, Puisieux, F, Barratt G. Poly (D,L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: Influence of the composition on physicochemical and structural properties. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2000; 89 (5): 614-626.
92. Smith, MC, Crist, RM, Clogston, JD, Mcneil, SE. Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. *Anal Bioanal Chem.* 2017; 409: 5779-5787.
93. Hartman, L, Lago, RCA. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from

lipids. Laboratory Practice. 1973: 22: 475–476.

94. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos. Edição IV. Instituto Adolfo Lutz. Brasília: Ministério da saúde, 2005.

95. American Oil Chemists Society (AOCS). Official methods and recommended practices of the American oil chemist's society. 4.ed. Champaign, USA: AOCS. 1995.

96. Instituto Adolfo Lutz. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3.ed: São Paulo: IMESP; 1985; p.22.

97. American Oil Chemists Society (AOCS). Official methods and recommended practices of the American oil chemists society. 4.ed. Champaign, USA: AOCS. 1996.

98. American Oil Chemistry Society (AOCS). Official methods of analysis. 18.ed. Maryland: AOAC, 2005.

99. Espín, JC, Soler-Rivas, C, Wichers, HJ. Characterization of the Total Free Radical Scavenger Capacity of Vegetable Oils and Oil Fractions Using 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical. J. Agric. Food Chem. 2000: 48 (3): 648-656.

100. Bajoub, A, Hurtado-Fernández, E, Ajal Amine, E, Ouazzani, N, Fernandez-Gutierrez, A, Carrasco-Pancorbo, A. A comprehensive 3-years study of the phenolic profile of Moroccan monovarietal virgin olive oils from Meknès region. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2015: 63 (17): 4376-4385.

101. Chanioti, S, Tzia, C. Optimization of ultrasound-assisted extraction of oil from olive pomace using response surface technology: Oil recovery, unsaponifiable matter, total phenol content and antioxidant activity. Food Science and Technology. 2017: 79: 178-189.

102. Kim, JH, Seo, CS, Kim, SS, Ha, H. Simultaneous Determination of Gallic Acid, Ellagic Acid, and Eugenol in *Syzygium aromaticum* and Verification of Chemical Antagonistic Effect by the Combination with *Curcuma aromatica* Using Regression Analysis. Journal of Analytical Methods in Chemistry. 2013: 1-7.

103. Pietro, P, Pineda, M, Aguilar, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. Analytical Biochemistry.

1999: 269: 337-341.

104. Wang, J, Zhang, Q, Zhang, Z, Li, Z. Antioxidant activity of sulphated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. International Journal of Biological Macromolecules. 2007: 42 (2): 127-132.

105. Bilan, MI, Vinogradova, EV, Shashkov, AS, Usov, AI. Structure of a highly pyruvylated galactan sulphate from the Pacific green alga *Codium yezoense* (Bryopsidales, Chlorophyta). Carbohydr Res. 2007: 342: 586-596.

106. McClements DJ, Decker EA, Park Y, Weiss J. Structural Design Principles for Delivery of Bioactive Components in Nutraceuticals and Functional Foods. Crit Rev Food Sci. Nutr. 2009: 49: 577-606.

107. Medeiros, AKOC, Gomes, CC, Amaral, MLQA, Medeiros, LDG, Medeiros, I, Porto, DG, et al. Nanoencapsulation improved water solubility and color stability of carotenoids extracted from Cantaloupe melon (*Cucumis melo* L.). Food Chemistry. 2018: 270: 562-572.

108. Hu, K, Huang, X, Gao, Y, Huang, X, Xiao, H, McClements, DJ. Core Shell Biopolymer Nanoparticle Delivery Systems: Synthesis and Characterization of Curcumin Fortified Zein-Pectin Nanoparticles. Food Chemistry. 2015: 182: 275-28.

109. AOCS. American Oil Chemists Society. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society. 1997: 5.ed. 1: Champaign, IL: AOCS.

110. Eastman, JE, Moore, CO. Cold water soluble granular starch for gelled food composition. U. S. patente 4465702: 1984.

111. Cockerill, FR, Wikler, M, Alder, J, Al, E. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard- M07-A9. 9 ed. Pensilvania, EUA: Clinical and Laboratory Standards Institute: 2012.

112. Guo, X, Ma, C, Du, Q, Wei, R, Wang, L, Zhou, M, et al. Two peptides, TsAP-1 and TsAP-2, from the venom of the Brazilian yellow scorpion, *Tityus serrulatus*: Evaluation of their antimicrobial and anticancer activities, Biochimie. 2013: 95 (9): 1784–1794. doi:10.1016/j.biochi.2013.06.003.

113. Pereira, AS, Neto, FRA. Estado da arte da cromatografia gasosa de alta resolução e alta temperatura. Química Nova. 2000: 23 (3): 370-379.

114. Serra, JL, Rodrigues, AM da C, Freitas, RA de, Meirelles, AJ de A, Darnete, SH, Silva, LHM da. Alternative sources of oils and fats from Amazonian

plants: Fatty acids, methyl tocols, total carotenoids and chemical composition. Food Research International. 2019: 116: 12–19.

115. Lima, RP, Luz, PTS da; Braga, M, Batista, PRS, Costa, CEF da; Zamian, JR, et al. Murumuru (*Astrocaryum murumuru* Mart.) butter and oils of buriti (*Mauritia flexuosa* Mart.) and pracaxi (*Pentaclethra macroloba* (Willd.) Kuntze) can be used for biodiesel production: Physico-chemical properties and thermal and kinetic studies. Industrial Crops and Products. 2017: 97: 536-544.

116. Darnet, SH, Silva, LHM, Rodrigues, AMC, Lins, RT. Nutritional composition, fatty acid and tocopherol contents of buriti (*Mauritia flexuosa*) and patawa (*Oenocarpus bataua*) fruit pulp from the Amazon region. Ciência e Tecnologia dos Alimentos. 2011: 31(2): 488-491.

117. Pereira, E, Ferreira, MC, Sampaio, KA, Grimaldi, R, Meirelles, AJ de A, Máximo GJ. Physical properties of Amazonian fats and oils and their blends. Food Chemistry. 2019: 278: 208-215.

118. Masaada, K, Taarit, MB, Hosni, K, Hammami, M, Marzouk, B. Regional and maturational effects on essential oils yields and composition of coriander. Scientia Horticulturae. 2009: 122: 116-124.

119. Wannes, WA, Mhamdi, B, Marzouk, B. Variations in essential oil and fatty acid composition during *Myrtus communis* var. *italica* fruit maturation. Food Chemistry. 2009. 112: 621-626.

120. Aizemberg, R. Produção de glicerol quinase em *Pichia pastoris*. Dissertação Ms. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara: SP, 2001.

121. Santana, DMN, Marques, MN, Rosa, CAR. Determinação por cromatografia gasosa da composição em ácidos graxos e teor de ácido *trans* oléico em algumas marcas de batata frita. Bol. Soc. Bras. Ciênc. Tecnol. Aliment. 1999: 33 (1): 64-69.

122. Codex Alimentarius Commission. Codex Standards for olive oils, and olive pomace oils, CODEX STAN 33, 1981: FAO/WHO, 2003.

123. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n. 359, de 23 de dezembro de 2003b. Aprova regulamento técnico de porções de alimentos embalados para fins de rotulagem nutricional. Diário Oficial da República Federativa do Brasil; Brasília, n. 251, 26 de dezembro de 2003, Seção 1, pp 28.

124. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n. 360, de 23 de dezembro de 2003a. Aprova regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, n. 251, 26 de dezembro de 2003, Seção 1, pp 33.
125. Codex Alimentarius. Standard for Named Vegetable Oils. Codex Stan 210, 1999. Retrieved from [http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/it/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCODEX%2BSTAN%2B210-1999%252FCXS\\_210e.pdf](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/it/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCODEX%2BSTAN%2B210-1999%252FCXS_210e.pdf).
126. Silva, SM, Sampaio, KA, Taham, T, Rocco, AS, Ceriani, R, Meirelles, AJA. Characterization of oil extracted from buriti fruit (*Mauritia flexuosa*) grown in the Brazilian Amazon Region. Journal Am Oil Chem Soc. 2009; 86: 611-616.
127. Cunha, MAE, Neves, RF, Souza, JNS, França, LF, Araújo, ME, Brunner, G, et al. Supercritical adsorption of buriti oil (*Mauritia flexuosa* Mart.) in  $\gamma$ -alumina: A methodology for the enriching of anti-oxidants. The Journal of Supercritical Fluids. 2012; 66: 181-191.
128. Garcia-Quiroz, A, Moreira, SGC, Morais, AV de, Silva, AS, Rocha, GN da, Alcantara, P. Physical and chemical analysis of dielectric properties and differential scanning calorimetry techniques on buriti oil. Instrumentation Science & Technology. 2003; 31 (1): 93-101.
129. Ceriani, R, Paiva, FR, Golçalves, CB, Batista, EAC, Meirelles, AJA. Densities and viscosities of vegetable oils of nutritional value. J Chem Eng. 2008; 53 (8): 1846-1853.
130. Kreps, F, Vrbiková, L, Schmidt, S. Influence of industrial physical refining on tocopherol, chlorophyll and beta-carotene content in sunflower and rapeseed oil. Eur J Lip Sci. 2014; 116: 1572-1582.
131. David, AV, Arulmoli, R, Parasuraman, S. Overviews of biological importance of quercetin: a bioactive flavonoid. Pharmacognosy Review. 2016; 10 (20): 84-89.
132. Alrawaiq, NS, Abdullah, A. A review of flavonoid quercetin: metabolism, bioactivity and antioxidant properties. International Journal of Pharm Tech research. 2014; 6 (3): 933-941.

133. Cortés-Rojas, DF, Souza, CRF, Oliveira, WP. CLove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2014: 4 (2): 90-96.
134. Daugsh, A, Pastore, G. Obtenção de vanilina: oportunidade biotecnológica. *Quimica Nova*. 2005: 28 (4): 642-645.
135. Sepúlveda, L, Ascacio, A, Rodríguez-Herrera, R, Aguilera-Carbó, A, Aguilar, CN. Ellagic acid: Biological properties and biotechnological development for production processes. *African Journal of Biotechnology*. 2011: 10 (22): 4518-4523.
136. Grzesik, M, Naparto, K, Bartosz, G, Sadowska-Bartos, I. Antioxidant properties of catechins: comparison with other antioxidants. *Food Chemistry*. 2018: 241: 480-492.
137. Alam, Md N, Bristi, NJ, Rafiquzzaman, Md. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2013: 21 (2): 143-152.
138. Shahidi, F, Zhong, Y. Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*. 2015: 18: 757-781.
139. Brand-Williams, W, Cuvelier, ME, Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft Technologie*. 1995: 28: 25-30.
140. Podsedek, A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT-Food Sci. Technol*. 2007: 40: 1-11.
141. Biglari, F, AlKarkhi, AFM, Easa, AM. Antioxidant activity and phenolic content of various date palm (*Phoenix dactylifera*) fruits from Iran. *Food Chemistry*. 2008: 107: 1636–1641.
142. Neo, YP, Ariffin, A, Tan, CP, Tan, YA. Determination of oil palm fruit phenolic compounds and their antioxidant activities using spectrophotometric methods. *International Journal of Food Science and Technology*. 2008: 43: 1832–1837.
143. Sánchez-Moreno, C. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science Technology International*. 2002: 8 (3): 121-137.
144. Ribeiro, PPC, Silva, DML, Assis, CF, Correia, RTP, Damasceno, KSFSC. Bioactive properties of *faveleira* (*Cnidocolus quercifolius*) seeds, oil and press

- cake obtained during oilseed processing. Plos One. 2017: 12 (12): 1-12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183935>
145. Li, Y, Fine, F, Fabiano-Tixier, A-S, Abert-Vian, M, Carre, P, Pages, X, et al. Evaluation of alternative solvents for improvement of oil extraction from rapeseeds. Comptes Rendus Chimie. 2014: 17 (3): 242-251.
146. Zhu, N, Wang, M, Wei, GF, Lin, JK, Yang, CS, Ho, CT. Identification of reaction products of (-)-epigallocatechin, (-)-epigallocatechin gallate and pyrogallol with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. Food Chemistry. 2001: 73: 345-349.
147. Sofidiya, MO, Odukoya, OA, Familoni OB, Inya-Agha, SI. Free radical scavenging activity of some nigerian medicinal plant extracts. Pakistan Journal of Biological Sciences. 2006: 9 (8): 1438-1441.
148. Adesegun, SA, Elechi, NA, Coker, HAB. Antioxidant activities of methanolic extract of *Sapium elliticum*. Pak. J. Biol. Sci. 2008: 11: 453-457.
149. Espinosa-Pardo, FA, Martinez, J, Martinez-Correa, HA. Extraction of bioactive compounds from peach palm pulp (*Bactris gasipaes*) using supercritical CO<sub>2</sub>. J. of Supercritical Fluids. 2014: 93: 2-6.
150. Santos, P, Aguiar, AC, Viganó, J, Boeing, JS, Visentainer, JV, Martínez, J. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of cumbaru oil (*Dipteryx alata* Vogel) assisted by ultrasound: Global yield, kinetics and fatty acid composition. The Journal of Supercritical Fluids. 2016: 107: 75-83.
151. Nedovica, V, Kalusevica, A, Manojlovicb, V, Levica, S, Bugarskib, B. An overview of encapsulation technologies for food applications. Procedia Food Science. 2011: 1: 1806 – 1815.
152. Soliman, EA, El-Moghazy, EY, Mohy El-Din, MS, Massoud, MA. Microencapsulation of Essential Oils within Alginate: Formulation and in Vitro Evaluation of Antifungal Activity. Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences. 2013: 3: 48-55.
153. Hosseini, SM. Incorporation of essential oil in alginate microparticles by multiple emulsion/ionic gelation process. International Journal of Biological Macromolecules. 2013: 62 (1): 582-588.
154. Buhr, E, Senftleben, N, Klein, T, Bergmann, D, Gnieser, D, Frase, CG, et al. Characterization of nanoparticles by scanning electron microscopy in transmission mode. Meas. Sci. Technol. 2009: 20: 1-10.

155. Aichele, CP, Venkataramani, D, Smay, JE, McCann, MH, Richter, S, Khanzadeh-Moradillo, M, et al. A comparison of automated scanning electron microscopy (ASEM) and acoustic attenuation spectroscopy (AAS) instruments for particle sizing. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2015; 479: 46-51.
156. Lemos, PY, Marfil, PHM, Nicoletti, VR. Particle size characteristics of buriti oil microcapsules produced by gelatin-sodium alginate complex coacervation: Effect of stirring speed. *International Journal of Food Properties.* 2017; 20 (S2): 1438 – 1447.
157. Silverstein, RM, Webster, FX, Kiemle, DJ. Infrared Spectrometry. In: RM Silverstein, FX Webster, DJ Kiemle (Eds.), *Spectrometric Identification of Organic Compounds.* New York: Wiley; 2005, 7 ed., p 550.
158. Guerrero, P, Stefani, PM, Ruseckaite, RA, De la Caba, K. Functional properties of films based on soy protein isolate and gelatin processed by compression. *Journal of Food Engineering.* 2011; 105 (1): 65–72.
159. Lawrie, G, Keen, I, Drew, B, Chandler-Temple, A, Rintoul, L, Fredericks, P, et al. Interactions between Alginate and Chitosan Biopolymers Characterized Using FTIR and XPS. *Biomacromolecules.* 2007; 8: 2533-2541.
160. Mandal, S, Kumar, SS, Krishnamoorthy, B, Basu, SK. Development and evaluation of calcium alginate beads prepared by sequential and simultaneous methods. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2010; 46 (4): 785-793.
161. Lee, EM, Singh, D, Singh, D, Choi, SM, Zo, SM, Park, SJ, et al. Novel Alginate-Gelatin Hybrid Nanoparticle for Drug Delivery and Tissue Engineering Applications. *Journal of Nanomaterials.* 2014: p 7.
162. Sagiri, SS, Anis, A, Pal, K. Review on Encapsulation of Vegetable Oils: Strategies, Preparation Methods, and Applications. *Polymer-plastics technology and engineering.* 2016; 55 (3): 291–311.
163. Liakos, I. All-natural composite wound dressing films of essential oils encapsulated in sodium alginate with antimicrobial properties. *International Journal of Pharmaceutics.* 2014; 463 (2): 137-145.
164. Ziani, K, Fang, Y, McClements, D.J. Encapsulation of functional lipophilic components in surfactant-based colloidal delivery systems: Vitamin E, vitamin D, and lemon oil. *Food Chemistry.* 2012; 134: 1106–1112.
165. Anarjan, N, Tan, CP. Effects of Selected Polysorbate and Sucrose Ester Emulsifiers on the Physicochemical Properties of Astaxanthin Nanodispersions.

Molecules. 2013: 18: 768-777.

166. Schaffazick, SR, Freitas, SSGLL, Pohlmann, AR. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim. Nova*. 2003: 26 (5): 726-737.

167. Dickinson, E, Lopez, G. Comparison of the Emulsifying Properties of Fish Gelatin and Commercial Milk Proteins. *Food Engineering and Physical Properties*. 2001: 66 (1): 118-123.

168. Surh, J, Decker, EA, McClements, DJ. Properties and stability of oil-in-water emulsions stabilized by fish gelatin. *Food Hydrocolloids*. 2006: 20: 596-606.

169. Bhattacharjee, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*. 2016: 235: 337-351.

170. Wang, B, Adhikari, B, Barrow, CJ. Optimisation of the microencapsulation of tuna oil in gelatin–sodium hexametaphosphate using complex coacervation. *Food Chemistry*. 2014: 158: 358–365.

171. Reis, CP, Neufeld, RJ, Vilela, S, Ribeiro, AJ, Veiga, F. Review and current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process for the design of alginate particles. *Journal of Microencapsulation*. 2006: 23 (3): 245-257.

172. Tavares, GM, Croguennec, T, Carvalho, AF, Bouhallab, S. Milk proteins as encapsulation devices and delivery vehicles: Applications and trends. *Trends in Food Science & Technology*. 2014: 37 (1): 5-20.

173. Chan, E. Preparation of Ca-alginate beads containing high oil content: Influence of process variables on encapsulation efficiency and bead properties. *Carbohydrate Polymers*. 2011: 84: 1267–1275.

174. Galvão, EL, Silva, DCF, Silva, JO, Moreira, AVB, Sousa, EMBDS. Avaliação do potencial antioxidante e extração subcrítica do óleo de linhaça. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2008: 28 (3): 551-557.

175. Bajerski, L, Michels, LR, Colomé, LM, Bender, EA, Freddo, RJ, Bruxel, F, et al. The use of Brazilian vegetable oils in nanoemulsions: an update on preparation and biological applications. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016: 52 (3): 347-363.

176. Bigon, JP, Montoro, FE, Lona, LMF. Vegetable Oils Acting as Encapsulated Bioactives and Costabilizers in Miniemulsion Polymerization

Reactions. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2018: 120: p 7.

177. Jayasundera, M, Adhikari, B, Howes, T, Aldred, P. Surface protein coverage and its implications on spray-drying of model sugar-rich foods: solubility, powder production and characterization. *Food Chemistry*. 2011: 128: 1003-1016.

178. Assis, LM, Zavareze, ER, Prentiche-Hernández, C, Souza-Soares, LA. Características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. *Brazilian Journal of Food Technology*. 2012: 15 (2): 99-109.

179. Özbek, ZA, Ergönül, PG. A Review on Encapsulation of Oils. *CBU J. of Sci.* 2017: 13 (2): 293-309.

180. Keawchaon, L, Yoksan, R. Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. *Colloids and Surfaces*. 2011: 84 (1): 163-171.

181. Gómez-Estaca J, López, de LA, López-Caballero, ME, Gómez-Guillén, MC, Montero, P. Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiol.* 2010: 27 (7): 889-96.

182. Oliveira, GF, Furtado, NAJC, Filho, AA da S, Martins, CHG, Bastos, JK, Cunha, WR, et al. Antimicrobial activity of *Syzygium cumini* (Myrtaceae) leaves extract. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2007: 38: 381-384.