

**UNIVERSIDADE DE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIAS**

FERNANDO FREITAS DE LIMA

**MICROENCAPSULAÇÃO DO ÓLEO DE BACURI
POR COACERVAÇÃO COMPLEXA: OBTENÇÃO,
CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AMBIENTAL**

**DOURADOS/MS
FEVEREIRO/2014**

FERNANDO FREITAS DE LIMA

**MICROENCAPSULAÇÃO DO ÓLEO DE BACURI
POR COACERVAÇÃO COMPLEXA: OBTENÇÃO,
CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA**

**ORIENTADORA: Eliana Janet Sanjinez-Argandoña
CO-ORIENTADORA: Cândida Aparecida Kassuya Leite**

**Dissertação de mestrado submetida ao
programa de pós-graduação em Ciência e
Tecnologia Ambiental, como um dos
requisitos necessários para a obtenção do
título de mestre em Ciência e Tecnologia na
área de concentração Tecnologia Ambiental**

DOURADOS/MS

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

| | |
|-------|---|
| L732m | <p>Lima, Fernando Freitas. Microencapsulação do óleo de bacuri por coacervação complexa: Obtenção, caracterização e avaliação biológica. / Fernando Freitas de Lima. – Dourados, MS: UFGD, 2014. 64f.</p> <p>Orientadora: Profa. Dra. Eliana Janet Sanjinez-Argandoña Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. Microencapsulação. 2. <i>Attalea phalerata</i> Mart. 3. Coacervação Complexa. I. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDD – 665.12</p> |
|-------|---|

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.



Termo de Aprovação

Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: "Microencapsulação do óleo de bacuri por coacervação complexa: Obtenção, caracterização e avaliação biológica das microcápsulas", de autoria de **Fernando Freitas de Lima**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.

Profa. Dra. Eliana Janet Sanjinez Argandoña
(Orientadora - UFGD)
Presidente da Banca Examinadora

Profa. Dra. Farayde Matta Fakhouri
Membro Examinador (UFGD)

Profa. Dra. Thaise Mariá Tobal
Membro Examinador (UFGD)

Dourados/MS, 27 de fevereiro de 2014.

“Para aqueles que amam, o tempo é a eternidade”.

Henry Van Dyke

*Dedico este trabalho
a minha família e
amigos por
representarem tudo
em minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Obrigado DEUS!

Primeiramente, agradeço a minha orientadora, a Prof^ª Dr^ª Eliana Janet Sanjinez-Argandoña, pelo constante comprometimento pessoal. Obrigado por sua disponibilidade e respeito ao trabalho, obrigado por contribuir na minha formação e ainda por ser uma grande amiga.

À Prof^ª Dr^ª Cândida Aparecida Leite Kassuya, pela co-orientação e conhecimento passado a mim, aos professores presentes na banca: Prof^ª Dr^ª Farayde Matta Fakhouri, Prof^ª Dr^ª Thaise Mariá Thobal, vossas sugestões proporcionaram maior qualidade ao trabalho.

Agradeço a algumas pessoas muito especiais que acompanharam todas as etapas da minha formação como Mestre: Luan Ramos da Silva, Priscilla Narciso Justi, Caroline Honaiser Lescano e Débora da Silva Baldivia, obrigado pelos momentos incríveis que passamos junto, pela amizade e companheirismo que compartilhamos, seria impossível concluir essa etapa sem vocês.

Agradeço a todos os amigos e colegas do Laboratório de Tecnologia de Alimentos: Vinícius, Andressa, Tuany, Viviane, Tânia, Elaine, Ariana e Camila.

À minha família, pelo apoio, carinho e amor, especialmente ao meu pai, pela paciência e incentivo que ele me dá para continuar estudando.

À Capes pela bolsa concedida, ao CNPq e a Fundect.

À todos agradeço!!

MUITO OBRIGADO!

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------|---|
| ABTS | 2,2 AZINO BIS-3-ethylbenzo thiazoline 6 sulfonic acid diammoninum |
| CEUA | Comissão de Ética no Uso de Animais |
| Cg | Carragenina |
| DEX | Dexametasona |
| EAG | Equivalente Ácido Gálico |
| P.A | Padrão Analítico |
| PBS | Solução Salina Tamponada |
| RPM | Rotações por minuto |
| TROLOX | 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico |
| V.O. | Via Oral |

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Delineamento fatorial 2^3 para obtenção de microcápsulas por coacervação complexa de óleo de bacuri..... 21

Tabela 2. Efeito da quantidade de óleo (recheio), da temperatura e da velocidade de homogeneização no rendimento, na eficiência e no tamanho de microcápsulas do óleo da polpa de bacuri obtidas por coacervação complexa..... 26

Tabela 3. Carotenoides totais, compostos fenólicos e atividade antioxidante (AA), das microcápsulas do óleo da polpa de bacuri obtidas por coacervação complexa, em diferentes condições de processo.. 32

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Valores de compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante para o óleo bruto, microcápsulas úmidas e liofilizadas em condições de 10g, 60 ° C e 18 000 rpm agitação. 61

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figura 1. Microcápsulas coacervadas com óleo de bacuri nas condições de coacervação: (A) recheio 10 g, temperatura 60°C, velocidade de homogeneização 18000 rpm; (B) recheio 10 g, temperatura 60 °C, velocidade de homogeneização 12000 rpm; (C) recheio 10 g, temperatura 40 °C, velocidade de homogeneização 18000 rpm. 28

Figura 2. Eficiência na formação de microcápsulas do óleo de polpa de bacuri. A) recheio vs velocidade a 60 °C; B) recheio vs temperatura em 18000 rpm; C) temperatura vs velocidade com 10 g.....30

Figura 3. Micrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura das microcápsulas coacervadas em magnitudes de 2.5Kx: A e B ensaio 6 (10 g 40 °C 18000 rpm), C e D, ensaio 8 (10 g 60 °C 18000 rpm)35

CAPÍTULO 3

Figura 1. Efeito da administração oral do óleo bruto e microencapsulado no edema de pata induzido por carragenina em ratos. Os animais receberam o óleo de *A. phalerata* bruto, microcápsulas úmidas e liofilizadas (1000 mg / kg), a dexametasona (DEX - 1 mg / kg, sc) ou veículo e após 1 h, uma injeção intraplantar de carragenina (300 µg / rato) foi realizada. Apresenta-se a inibição de resposta nos tempos de 0,5 h (a), depois de 1 h (b), 2 h (c) e 6 h (d). As barras expressam a média ± SEM de 6-7 animais, em comparação

com o veículo (V) vs grupo tratado. ** P <0,01, *** P <0,001, ANOVA de uma via seguida por Student-Newman-Keuls.. 61

Figura 2. Efeito da administração oral do óleo bruto e microencapsulado na emigração de leucócitos e extravasamento de plasma induzido por carragenina no modelo de pleurisia em ratos. Os animais receberam o óleo de *A. phalerata* bruto, microcápsulas úmidas e liofilizadas (1000 mg / kg), dexametasona (1 mg / kg, sub-cutânea) ou veículo e após 1 h, injetou-se carragenina (300 µg / rato), intrapleural. O exsudato foi coletado 4 horas após a injeção de carragenina. O total de leucócitos que migraram, bem como, o extravasamento de plasma induzido por Cg foi analisado. As diferenças entre os grupos foram analisados por análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. Valores de p <0,05 foram considerados significativos. * P <0,05, ** P <0,01, *** P <0,001.....62

RESUMO

A microencapsulação é uma tecnologia para recobrir materiais sólidos, líquidos ou gasosos com a finalidade de permitir maior estabilidade e liberação controlada de ativos em condições específicas, bem como, mascarar aspectos sensoriais indesejados. Portanto, o objetivo do trabalho foi microencapsular óleo de bacuri utilizando o método de coacervação complexa, avaliar a influência das condições de recheio, temperatura e velocidade de homogeneização no rendimento e eficiência do processo. As microcápsulas foram caracterizadas quanto ao tamanho médio, morfologia (microscopia ótica e eletrônica de varredura). Nove formulações, em triplicata, foram produzidas utilizando gelatina e goma arábica como material de parede. As microcápsulas foram analisadas em relação ao conteúdo de compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante. Os resultados mostraram que a melhor concentração de recheio (óleo) em relação ao total de polímeros (gelatina e goma arábica) foi de 10 g para 5g de polímeros, nessas condições se obteve rendimento de microcápsulas formadas de 82,55%, eficiência do encapsulamento do óleo de 70,72%, e tamanho de partículas menores que 51 µm de formato esférico. O alto conteúdo de carotenoides foi observado no óleo e mantido nas microcápsulas, influenciando na atividade antioxidante. Microcápsulas úmidas e liofilizadas das duas melhores formulações diminuíram significativamente a formação de edema e do número total de leucócitos no lavado pleural, em ratos. A presença das microcápsulas na ação anti-inflamatória confirmou a liberação gradual do óleo. Em conclusão, o estudo mostrou que a coacervação complexa é uma técnica viável, as microcápsulas possuem atividade antioxidante e o óleo microencapsulado é um agente anti-inflamatório natural.

Palavras-chave: Microencapsulação, *Attalea phalerata* Mart., coacervação complexa.

ABSTRACT

Microencapsulation is a technology for coating solid, liquid or gaseous in order to allow more stability and controlled release of active materials in specific conditions, as well as sensory masking undesirable aspects. Therefore, the objective of this study was to microencapsulate bacuri oil using the complex coacervation method, and analyze the influence of the conditions of filling, temperature and speed of homogenization on yield and process efficiency. The microcapsules were characterized for mean size and morphology (optical and scanning electron microscopy). Nine formulations, in triplicate, were produced using gelatin and gum arabic as wall material. The microcapsules were analyzed in relation to the content of phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity. The results showed that the best concentration filling (oil) in relation to the total of polymers (gelatin and gum arabic) was 10 g for 5 g of polymer. In this condition of the process, the yield of formed microcapsules obtained was 82.55%, the oil encapsulation efficiency was 70.72%, and the particles size were smaller than 51 μ m in a spherical shape. The high content of carotenoids was observed in oil and kept in microcapsules, which influenced the antioxidant activity. Wet and lyophilized microcapsules from the two best formulations, significantly decreased the formation of edema, and the total number of leukocyte in pleural lavage in rats. The presence of the microcapsules in the anti-inflammatory action confirmed the gradual release of oil. In conclusion, the study showed that the complex coacervation is a viable technique, the microcapsules have antioxidant activity and microencapsulated oil is a natural anti-inflammatory agent.

Keywords: Microencapsulation, *Attalea phalerata* Mart., complex coacervation.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 12 |
| 2 ARTIGO 1..... | 15 |
| 2.2 MATERIAL E MÉTODOS..... | 19 |
| 2.1. Material | 19 |
| 2.2. Preparo da amostra | 20 |
| 2.3. Extração do óleo | 20 |
| 2.4. Preparação e Otimização das microcápsulas | 20 |
| 2.5. Rendimento do processo de microencapsulação | 21 |
| 2.6. Eficiência de microencapsulação | 22 |
| 2.7. Morfologia e tamanho | 22 |
| 2.8. Determinação de compostos bioativos | 22 |
| 2.8.1. Compostos Fenólicos | 22 |
| 2.8.2. Carotenoides totais | 23 |
| 2.9. Determinação da atividade antioxidante pelo Método ABTS ^{•+} | 24 |
| 2.10. Microscopia Eletrônica de Varredura | 25 |
| 2.11. Análise estatística | 25 |
| 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 25 |
| 3.1. Rendimento e Eficiência | 25 |
| 3.2. Tamanho | 27 |
| 3.3. Superfície de Resposta | 29 |
| 3.4. Compostos bioativos e atividade antioxidante | 31 |
| 3.5. Microscopia Eletrônica de Varredura | 34 |
| 2.4 CONCLUSÃO..... | 35 |
| 2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 36 |
| 3 ARTIGO 2..... | 44 |
| 3.1 INTRODUÇÃO | 47 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2 MATERIAL E MÉTODOS | 49 |
| 2.1. Material | 49 |
| 2.2. Liofilização | 50 |
| 2.3. Compostos fenólicos | 50 |
| 2.4. Carotenoides | 50 |
| 2.5. Atividade antioxidante pelo método ABTS•+ | 51 |
| 2.6. Animais | 52 |
| 2.7. Modelo edema de pata induzido pela carragenina | 52 |
| 2.8. Modelo de pleurisia induzido pela carragenina | 53 |
| 2.9. Modelo de diurese | 53 |
| 2.9. Análise estatística | 54 |
| 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 54 |
| 3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 58 |
| | |
| 4 CONCLUSÃO GERAL | 63 |

Capítulo I

Introdução Geral

O cerrado brasileiro ocupa aproximadamente 25% do território nacional e neste bioma encontram-se diversas espécies frutíferas que ainda não foram devidamente estudadas, a inserção desses frutos no estudo científico e no desenvolvimento de novos produtos propicia fontes com alto valor nutricional e conseqüentemente a valorização do cerrado.

A presença de metabólitos secundários biologicamente ativos como, por exemplo, carotenoides e compostos fenólicos, nesses vegetais, podem trazer benefícios à saúde ou efeitos fisiológicos desejáveis, como atividade vitamínica A, atividade antioxidante, fortalecimento do sistema imunológico e a prevenção de doenças degenerativas como câncer, doenças cardiovasculares, degeneração macular, inflamações crônicas, entre outras.

A *Attalea phalerata* Mart. conhecida como bacurizeiro é uma palmeira da família *Arecaceae*, comumente encontrada no Brasil mais precisamente nos Estados de Mato Grosso do Sul e Mato Grosso. O seu fruto é constituído de casca (exocarpo), polpa (mesocarpo) e amêndoa (endocarpo). O óleo extraído da polpa do fruto é usado pelas populações locais como tônico capilar e para aliviar dores nas articulações. Estudos fitoquímicos mostram que o fruto possui em sua composição quantidades consideráveis de carotenoides, que são pigmentos precursores da vitamina A, tendo como principais carotenoides o β -caroteno e α -caroteno. Entretanto, algumas limitações relacionadas à estabilidade desses compostos podem ser observadas, como por exemplo, a oxidação e exposição ao calor. Para minimizar a degradação destes compostos novas tecnologias têm sido empregadas, como a microencapsulação, que além de proteger compostos sensíveis contra as condições adversas do meio pode promover a liberação controlada e mascarar aspectos sensoriais indesejados que alguns compostos apresentam.

A microencapsulação é uma técnica bastante consolidada na indústria farmacêutica, nas últimas décadas tem se destacado também na indústria de alimentos e de cosméticos sendo aplicada para diversas finalidades. Dentre os métodos empregados na produção de microcápsulas, o processo de coacervação complexa é o mais empregado na conservação de compostos bioativos presentes em óleos, uma vez que permite recobrir o material ativo com o material de parede formando uma cápsula verdadeira. O processo consiste na interação interiônica entre dois polímeros de cargas opostas, onde um complexo entre esses polímeros é formado ao redor de gotículas ou partículas do material ativo suspenso ou emulsionado no meio da reação.

Diante disso, considerando o alto teor de carotenoides presentes no óleo de bacuri e os benefícios que estes aportam à saúde humana o objetivo do trabalho foi desenvolver e caracterizar microcápsulas de óleo de bacuri utilizando a técnica de coacervação complexa, e avaliar as propriedades bioativas *in vitro* e *in vivo* do óleo e das microcápsulas produzidas.

Os resultados do estudo são apresentados em dois capítulos. No capítulo 2 constam os parâmetros utilizados no processo de microencapsulação por coacervação complexa e as propriedades físicas, químicas e bioativas *in vitro* do das microcápsulas do óleo de bacuri. O capítulo 3 se refere à aplicação das microcápsulas de óleo de bacuri em ratos e sua ação anti-inflamatória.

Capítulo II

Artigo I

Artigo escrito nas normas do periódico Food Chemistry

Influência da microencapsulação nas propriedades físicas e bioativas do óleo de bacuri

Fernando Freitas de Lima^{a*}; Eliana Janet Sanjinez-Argandoña^b; Cândida Aparecida Leite Kassuya^c; Izabel Cristina Freitas Moraes^d

^a Faculdade de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal da Grande Dourados, PO Box 533, 79804-070 Dourados-MS, Brasil

^b Faculdade de Engenharia, Universidade Federal da Grande Dourados, PO Box 533, 79804-070 Dourados-MS, Brasil

^c Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, PO Box 533, 79804-070 Dourados, Brasil

^d Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Rua Duque de Caxias Norte, 225, 13635-900 Pirassununga-SP, Brasil

*Autor correspondente. Fax: +55-67-34262980

E-mail: flfernando_@hotmail.com

Resumo

Este estudo tem por objetivo produzir e caracterizar microcápsulas de óleo de bacuri pela técnica de coacervação complexa e avaliar a influência do processo nas propriedades físicas, no conteúdo de compostos bioativos e na atividade antioxidante do material microencapsulado. As microcápsulas foram preparadas com diferentes concentrações de óleo (5, 7,5 e 10 g), temperatura (40, 50 e 60 °C) e velocidade de homogeneização (12000, 15000 e 18000 rpm). Gelatina e goma arábica foram utilizadas como agentes encapsulantes. Os resultados mostraram que a melhor concentração de recheio (óleo) em relação ao total de polímeros (gelatina e goma arábica) foi de 10 g para 5g de polímeros, nessas condições se obteve rendimento de microcápsulas formadas de 82,55%, eficiência do encapsulamento do óleo de 70,72%, tamanho médio de partículas abaixo de 51 µm e formato esférico. O alto conteúdo de carotenoides foi observado no óleo e mantido nas microcápsulas, influenciando na atividade antioxidante.

Palavras-chave: Coacervação complexa; gelatina, goma arábica; *Attalea phalerata* Mart.; compostos bioativos

1. Introdução

A *Attalea phalerata* Mart. conhecida como bacurizeiro é uma palmeira comumente encontrada no Brasil, mais precisamente nos estados de Mato Grosso do Sul e Mato Grosso. Pertence à família *Arecaceae* e seus frutos são de forma arredondada, oval ou achatada, constituídos de polpa e sementes comestíveis (Barreto et al., 2009).

Sousa et al. (2011) destacam principalmente a atividade antioxidante dos compostos fenólicos e os carotenoides presentes em resíduos de polpas de frutos

tropicais, entre eles o bacuri. Esses constituintes e seus efeitos benéficos à saúde despertam o interesse de estudos na comunidade científica. Entre as atividades biológicas atribuídas a esses compostos estão o fortalecimento do sistema imunológico (Gomes, 2007) e a diminuição de doenças degenerativas como o diabetes, problemas cardiovasculares, processos inflamatórios, entre outros (Rodrigues-Amaya, 2010). Entretanto, algumas limitações relacionadas à estabilidade desses compostos podem ser observadas, como por exemplo, a oxidação lipídica e o escurecimento enzimático. Na tentativa de evitar a degradação destes compostos surgiram tecnologias como a microencapsulação (Kralovec et al., 2012).

A microencapsulação permite recobrir partículas ou pequenas gotas de material líquido formando microcápsulas, que protegem seu conteúdo da exposição direta à luz, água e calor pelos agentes encapsulantes (Cocato et al., 2007; Ferreira et al., 2009), além de favorecer à liberação controlada dos constituintes, sob condições específicas, bem como reduzir a volatilidade de líquidos (Menezes et al., 2013), mascarar o gosto de componentes amargos (Alvim & Grosso, 2005) e prolongar a vida útil do material de recheio (Nori et al., 2011), permitindo que os produtos microencapsulados tenham melhor aplicabilidade.

O processo de microencapsulação exige o revestimento do material (núcleo ou recheio) com um ou vários agentes encapsulantes (material de parede) que pode ser formado por diferentes polímeros. Entre os hidrocolóides utilizados como material de parede, as proteínas e polissacarídeos são estudados com frequência e entre os mais empregados na microencapsulação de óleos estão a gelatina e goma arábica (Peng et al., 2014; Piacentini et al., 2013). Os agentes encapsulantes influenciam no tamanho das microcápsulas, e o processo é finalizado com a secagem que pode ser obtida, entre

outras técnicas, por liofilização, atomização e convecção (Maisutthisakul & Gordon, 2012).

Dentre as técnicas de microencapsulação para óleos, a coacervação complexa é a mais empregada. A coacervação complexa consiste na interação entre dois polímeros de cargas opostas (material de parede), onde um complexo entre esses polímeros é formado ao redor de gotículas ou partículas do material ativo (recheio), levando à formação de micropartículas (Alvim & Grosso, 2005; Zuanon et al., 2013). O emprego de gelatina e goma arábica como materiais encapsulantes tem mostrado ser eficiente na estabilidade de compostos bioativos, desde que controlados a temperatura, incidência de luz e umidade (Qv et al., 2011; Quan et al., 2013). Devido à importância destes compostos na saúde e a necessidade de conhecimento das condições ideais de processo, o objetivo do presente trabalho foi produzir e caracterizar microcápsulas de óleo de bacuri pela técnica de coacervação complexa e avaliar a influência do processo no conteúdo de compostos bioativos e na atividade antioxidante do material microencapsulado.

2. Material e métodos

2.1. Material

Frutos de bacuri (*Attalea phalerata* Mart.) frescos, selecionados sadios e maduros, definidos pela coloração amarela do fruto, próprio para consumo foram coletados no município de Bonito – MS (Hotel Cabanas), latitude 21° 10' 19.1; longitude. 056° 26' 58.0 e altitude 6m. A exsicata da espécie encontra-se depositada no Herbário da UFGD n° DDMS5033. Goma arábica pura (Vetec) e gelatina tipo A (Fluka Analytical) foram utilizados como agentes encapsulantes.

2.2. Preparo da amostra

Após a seleção, os frutos sadios foram lavados em água corrente e higienizados com solução de dicloroisocianurato de sódio dihidratado 0,66% (teor de cloro ativo 3%). Em seguida os frutos foram descascados e despulpados, posteriormente a polpa foi desidratada em estufa a 40 °C com fluxo de ar de 0,5 m/s durante 72 horas. O material desidratado foi triturado, peneirado em malha com abertura de 0,200 mm para uniformização do pó, posteriormente, foi acondicionado em embalagens poliméricas e armazenado a temperatura ambiente.

2.3. Extração do óleo

O óleo do bacuri foi obtido por extração sólido-líquido com solvente hexano P.A. (Vetec), na proporção de uma parte de polpa em pó para 3 partes de solvente 1:3 (p/v) sob contínua agitação (150 rpm) durante 7 dias em temperatura ambiente. O produto foi filtrado e o solvente removido em evaporador rotativo IKA (modelo RV 0,5 basic), sob pressão reduzida a 50 °C. O óleo foi então acondicionado em frasco âmbar e armazenado a 9±2°C.

2.4. Preparação e Otimização das microcápsulas

As microcápsulas de óleo de bacuri foram preparadas pelo método de coacervação complexa em meio aquoso (Alvim & Grosso, 2005), com algumas modificações. Misturou-se o óleo sob agitação constante com 100 ml de solução de gelatina (2,5%) previamente hidratada e aquecida até formar uma emulsão, à qual foram incorporadas 100 ml de solução de goma arábica hidratada (2,5%) e água deionizada (400 ml). Logo, corrigiu-se o pH com ácido clorídrico (0,1 M) até alcançar o pH 4,0. O material foi resfriado gradualmente até 10 °C.

Foram produzidas microcápsulas a partir de nove formulações, definidas no delineamento fatorial 2^3 (Tabela 1), com três variáveis independentes: recheio (quantidade de óleo de bacuri), velocidade de homogeneização e temperatura. As variáveis dependentes (resposta) foram o rendimento, a eficiência da microencapsulação, o tamanho das microcápsulas, o conteúdo de compostos fenólicos e de carotenoides e a atividade antioxidante.

Tabela 1. Delineamento fatorial 2^3 para obtenção de microcápsulas por coacervação complexa de óleo de bacuri.

| Variáveis Independentes | Pontos Fatoriais | | Ponto Central |
|------------------------------------|------------------|-------|---------------|
| | -1 | +1 | 0 |
| Recheio (g) | 5 | 10 | 7.5 |
| Temperatura (°C) | 40 | 60 | 50 |
| Velocidade de homogeneização (rpm) | 12000 | 18000 | 15000 |

2.5. Rendimento do processo de microencapsulação

O rendimento (R) foi calculado a partir da separação das fases obtidas na microencapsulação (sobrenadante e sedimento). As microcápsulas foram centrifugadas a 15000 rpm (centrífuga Simplex II ITR) para rápida compactação e o sobrenadante foi retirado e peneirado em malha com abertura de 0,075 mm para separação total do sobrenadante e sedimento (microcápsulas). O sedimento foi então pesado e o rendimento calculado através da equação 1 (Barbosa & Mercadante, 2009).

$$(\%) = \frac{MS \text{ (base seca)}}{MT \text{ (base seca)}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Onde: MS é a quantidade de microcápsula sedimentada (g) e MT é a massa teórica constituída de goma arábica+gelatina+óleo (g).

2.6. Eficiência de microencapsulação

A eficiência de microencapsulação (EM) foi determinada considerando o teor de lipídios totais (Bueno & Grosso, 2008). A eficiência foi definida como a quantidade de óleo presente em um grama de microcápsula em relação à quantidade de óleo inicialmente inserido no processo de microencapsulação, conforme equação 2.

$$EM(\%) = \frac{OEM}{OIM} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde: OEM é a quantidade de óleo extraído das microcápsulas formadas (g) e OIM é a quantidade de óleo inserido (g).

2.7. Morfologia e tamanho

A morfologia da superfície externa das microcápsulas foi avaliada por microscopia óptica utilizando um microscópio acoplado a uma câmera fotográfica (Nikon Eclipse – 200). As amostras de cada formulação foram fixadas em lâminas, recobertas com lamínulas e obtidas as fotomicrografias. Partículas visivelmente aglomeradas foram descartadas. O tamanho das microcápsulas foi determinado pelos diâmetros transversais e longitudinais das partículas visualizadas nas fotomicrografias ampliadas. Foram analisadas 150 microcápsulas e no caso das partículas não esféricas o tamanho foi padronizado pela média dos diâmetros. As imagens e os dados foram analisados pelo *software* Image Pro Plus 4.0.

2.8. Determinação de compostos bioativos

2.8.1. Compostos Fenólicos

A quantificação de compostos fenólicos foi realizada com o reagente Folin-Ciocalteu, de acordo com George et al. (2005). O extrato foi preparado com 2 g de

amostra (microcápsulas ou óleo) e 50 ml de acetona (95%), a mistura foi centrifugada a 15000 rpm por 15 min e retirado o sobrenadante o qual foi considerado o extrato. Uma alíquota de 0,5 ml do extrato foi misturada com 0,45 ml de água destilada, 2,5 ml de solução aquosa do reativo Folin-Ciocalteu (10%) e 2,0 ml de carbonato de sódio (7,5%). A mistura foi incubada por 5 min em banho-maria a 50 °C e, após resfriamento (25 °C) a absorbância foi medida a 760 nm (espectrofotômetro Biospectro), usando-se água destilada como referência (branco). Os compostos fenólicos foram determinados por interpolação das absorbâncias das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (0,025; 0,035; 0,045; 0,055 e 0,065 mg/ml). A equação da curva de calibração do ácido gálico foi $C = 13,0100A + 0,0478$, onde C é a concentração do ácido gálico, A é a absorbância a 760 nm com coeficiente de correlação (R) de 0,999. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/g de extrato. Cada determinação foi realizada em triplicata.

2.8.2. *Carotenoides totais*

As amostras (microcápsulas ou óleo) foram pesadas (2,5 g) e maceradas em almofariz com auxílio de celite (0,5 g) para facilitar a extração dos carotenoides, em seguida adicionou-se acetona a 10 °C até extrair todo o pigmento, a mistura foi então, filtrada a vácuo. O extrato foi recolhido e transferido para um funil de separação contendo 40 ml de éter de petróleo. A mistura foi lavada lentamente com água destilada até a completa remoção da acetona. O extrato foi transferido para um balão volumétrico (50 ml) e o volume completado com éter de petróleo. Realizaram-se as leituras de absorbância a 450 nm (espectrofotômetro Biospectro). Éter de petróleo foi utilizado como branco (Rodriguez-Amaya, 2010). O conteúdo de carotenoides foi calculado pela Equação 3.

$$C(\mu g/g) = \frac{\lambda \times D \times 10^4}{\epsilon \times m(g)} \quad \text{Equação 3}$$

Onde, λ é a absorvância (nm), D é a diluição (ml), ϵ é o fator de β -caroteno em éter de petróleo (2592) e m a massa da amostra (g)

2.9. Determinação da atividade antioxidante pelo Método ABTS^{•+}

O extrato foi preparado a partir da mistura de 5g de microcápsulas e 50 ml de solução hidrometanólica (50%). Após repouso de 60 min, o material foi centrifugado (4000 rpm) por 15 min e o sobrenadante retirado. Ao sedimento foi adicionada 40 ml de acetona (70%) para realizar a segunda extração seguindo-se o procedimento da 1ª extração. Os sobrenadantes das duas extrações foram misturados, transferidos para um balão (100 ml) e o volume completado com água destilada, obtendo-se o extrato.

O radical ABTS^{•+} (2, 2 AZINO BIS-3-ethylbenzo thiazoline 6 sulfonic acid diammonium) foi formado pela reação de ABTS^{•+} (7 mM) com persulfato de potássio (140 mM), a mistura reagiu por 16 h à temperatura ambiente e na ausência de luz, obtendo-se a solução radicalar. Para as análises, a solução radicalar foi diluída em etanol até absorvância de 0,70 (\pm 0,05) a 734 nm (espectrofotômetro Biospectro). Alíquotas de 30 μ l de extrato foram adicionadas a 3 ml da solução diluída de ABTS^{•+} e as absorvâncias da mistura foram registradas após 6 min. A atividade antioxidante foi calculada utilizando-se da curva-padrão de 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico (Trolox). A curva-padrão foi preparada a partir de soluções etanólicas de Trolox nas concentrações de 100; 500; 1000; 1500 e 2000 μ M (Rufino et al., 2010). A equação da curva foi $C = -0,0002A + 0,3049$, com coeficiente de correlação (R) de 0,999, onde C é a concentração de Trolox, A é a absorvância a 734 nm. Os resultados foram

expressos em mM de Trolox/g de amostra. Cada determinação foi realizada em triplicata.

2.10. Microscopia Eletrônica de Varredura

As amostras foram recobertas em um Sputter Coater POLARON, Modelo: SC7620, Marca: VG Microtech (Uckfield, Inglaterra). A espessura da camada de Au, seguiu a equação: $\text{Espessura} = K \cdot i \cdot V \cdot t$, onde $K=0,17 \text{ A}^\circ/\text{mA.Volt.s}$; $i=3 \text{ mA}$; $V=1 \text{ Volt}$ e $t=180 \text{ s. (92 A}^\circ)$. As amostras recobertas foram analisadas em um Microscópio Eletrônico de Varredura com Detector de Energia Dispersiva de raios X, Modelo MEV: Leo 440i, Modelo EDS: 6070, Marca MEV/EDS: LEO Electron Microscopy/Oxford (Cambridge, Inglaterra). Utilizou-se tensão de aceleração igual a 10 kV e corrente do feixe igual a 100 pA para obtenção das micrografias.

2.11. Análise estatística

As formulações foram produzidas de acordo com o delineamento fatorial 2^3 constituídas de 9 experimentos, em triplicata. As médias obtidas foram avaliadas pela análise variância (ANOVA), a comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Os cálculos estatísticos foram efetuados pelo programa Statistica 8.0.

3. Resultados e discussão

3.1. Rendimento e Eficiência

A Tabela 2 mostra o efeito da quantidade de óleo inserido, da temperatura de processo e da velocidade de homogeneização da emulsão no rendimento, na eficiência e no tamanho das microcápsulas.

Tabela 2. Efeito da quantidade de recheio (óleo), da temperatura e da velocidade de homogeneização no rendimento, na eficiência e no tamanho de microcápsulas do óleo da polpa de bacuri obtidas por coacervação complexa.

| Variáveis independentes | | | | Variáveis dependentes* | | |
|-------------------------|-------------|------------------|------------------|----------------------------|--------------------------------|---------------------|
| Ensaio | Recheio (g) | Temperatura (°C) | Velocidade (rpm) | Rendimento (%) | Eficiência da encapsulação (%) | Tamanho (µm) |
| 1 | 5 | 40 | 12000 | 88,85 ^c ± 1,08 | 32,07 ^b ± 2,67 | 86,80 ^c |
| 2 | 10 | 40 | 12000 | 85,10 ^{de} ± 1,94 | 50,38 ^d ± 3,49 | 59,77 ^b |
| 3 | 5 | 60 | 12000 | 79,31 ^c ± 0,25 | 50,70 ^d ± 2,64 | 33,59 ^a |
| 4 | 10 | 60 | 12000 | 74,83 ^b ± 3,29 | 18,76 ^a ± 0,18 | 45,24 ^{ab} |
| 5 | 5 | 40 | 18000 | 67,58 ^a ± 1,26 | 20,66 ^a ± 1,01 | 38,37 ^a |
| 6 | 10 | 40 | 18000 | 82,60 ^{cd} ± 2,07 | 65,63 ^e ± 1,85 | 83,68 ^c |
| 7 | 5 | 60 | 18000 | 74,16 ^b ± 1,46 | 44,56 ^c ± 3,94 | 45,33 ^{ab} |
| 8 | 10 | 60 | 18000 | 82,55 ^{cd} ± 0,26 | 70,72 ^e ± 0,90 | 50,81 ^{ab} |
| 9 | 7,5 | 50 | 15000 | 72,86 ^b ± 3,90 | 34,85 ^b ± 1,89 | 34,42 ^a |

*Valores médios dos ensaios realizados em triplicata. Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Os ensaios 1, 2, 6 e 8 apresentaram rendimento acima de 80%, destes, apenas o ensaio 1 diferiu significativamente ($P \leq 0,05$). A temperatura influenciou na separação de fases, pois no geral, os melhores resultados foram obtidos a 40 °C. Segundo Prata et al. (2006), temperaturas mais baixas favorecem a separação de fases, bem como, temperaturas altas reduzem o rendimento devido ao aumento da solubilidade dos polímeros e, conseqüentemente, dos complexos formados (Remuñán-López &

Bodmeier, 1996). Entretanto, vale ressaltar que, valores elevados de rendimento não são correlacionados com alta eficiência, pois nem todas as microcápsulas apresentam recheio (óleo) em seu interior.

Em relação à eficiência da microencapsulação do óleo foram encontrados valores entre 18,76% e 70,72%. Os ensaios 6 e 8 não diferiram entre si ($P > 0,05$), porém foram significativamente diferentes dos demais ao nível de 5%, apresentando maior eficiência (65,63% e 70,72%, respectivamente). Esses mesmos ensaios (6 e 8) apresentaram também valores elevados de rendimento, como retratado na Tabela 1.

Célis & Grosso (2009) num estudo sobre o efeito da reticulação induzida pela transglutaminase e o glutaraldeído sobre as propriedades de micropartículas obtidas por coacervação complexa, concluíram que a fluidez do óleo parece ter contribuído na eficiência da encapsulação em função do aumento da temperatura. No presente estudo, o aumento da temperatura parece não ter influenciado significativamente essa característica, porém a quantidade de recheio (10g) e a velocidade de agitação (18 000 rpm) foram as variáveis que mais influenciaram.

3.2. Tamanho

Os diâmetros médios das cápsulas coacervadas de óleo de bacuri variaram de 33,59 a 86,80 μm (Tabela 2), caracterizando-as como microcápsulas por possuírem tamanho inferior a 500 μm (Favaro-Trindade et al, 2008). Os diâmetros das microcápsulas formadas (10,00 a 90,00 μm) foram semelhantes aos observados por Nori et al. (2011) na microencapsulação de extrato de própolis por coacervação complexa.

A morfologia das microcápsulas variou significativamente ($P \leq 0,05$) em função da temperatura e da velocidade de homogeneização. Microcápsulas mais homogêneas

foram obtidas nas condições de processo de 10 g de recheio, 60 °C e 18000 rpm de velocidade de homogeneização (Figura 1A).

A velocidade de homogeneização da emulsão foi o parâmetro importante na formação das microcápsulas, altas velocidades tendem a fornecer emulsões mais estáveis, o que resulta em microcápsulas com características morfológicas uniformes (Laine et al.,2011). No estudo, com a redução da velocidade de homogeneização a estrutura morfológica das microcápsulas não foi eficazmente formada (Figura 1B) e com a redução da temperatura de 60 para 40°C não foi possível observar a formação de cápsulas (Figura 1C).

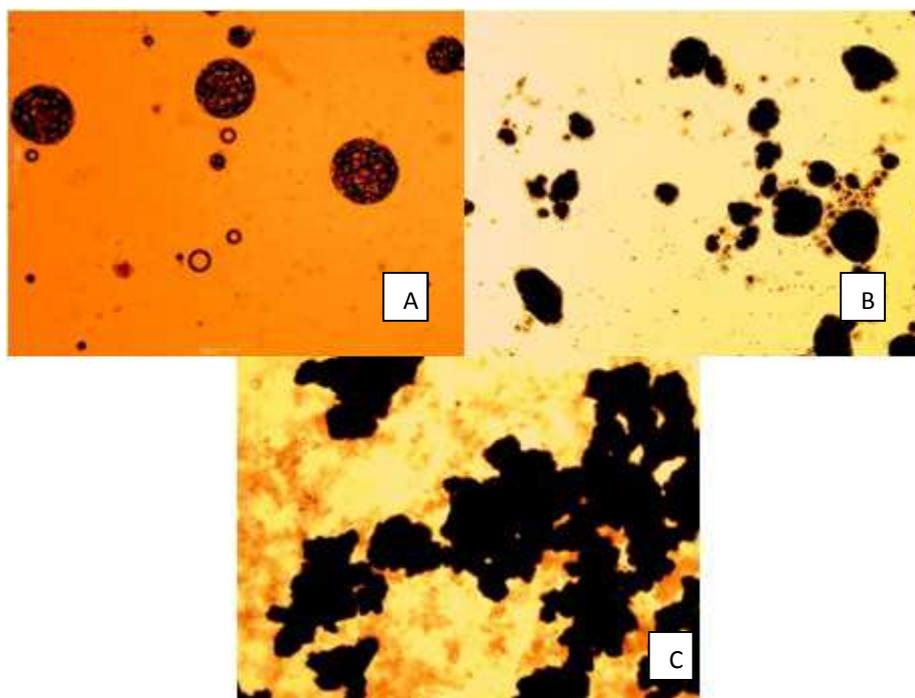


Figura 1. Microcápsulas coacervadas com óleo de bacuri nas condições de coacervação: (A) recheio 10 g, temperatura 60°C, velocidade de homogeneização 18000 rpm; (B) recheio 10 g, temperatura 60 °C, velocidade de homogeneização 12000 rpm; (C) recheio 10 g, temperatura 40 °C, velocidade de homogeneização 18000 rpm.

O pH e o uso de diferentes polímeros influenciaram no tamanho das partículas coacervadas. De acordo com Gorji et al. (2012) o pH influencia na formação de

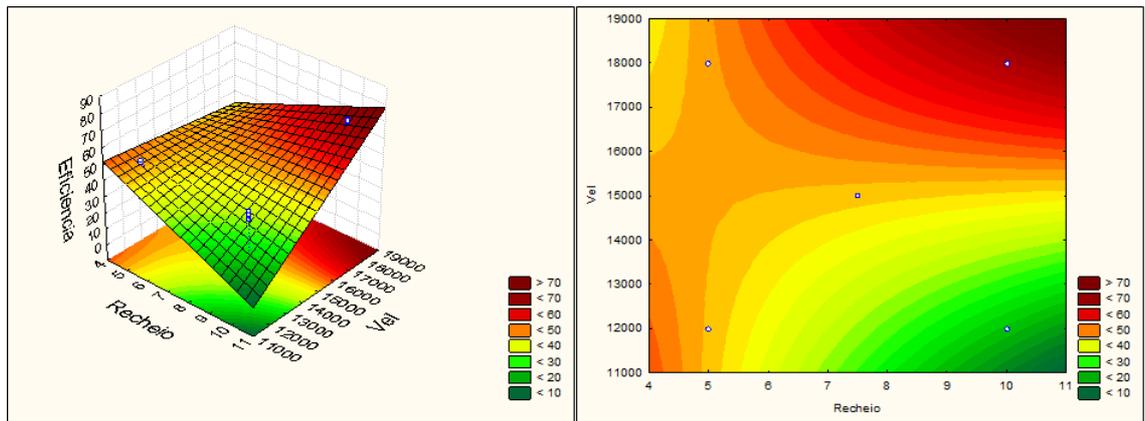
microcápsulas por coacervação complexa, os investigadores indicam que emulsões com pH menor que 4,15 favorecem à formação de microcápsulas de menor tamanho. A redução do pH causa intensa interação eletrostática entre as proteínas e polissacarídeos em meio aquoso e os polímeros apresentam-se com cargas opostas, ligando-se eletrostaticamente o que favorece à obtenção de microcápsulas de menor tamanho (Nakagawa & Nagao, 2012; Lv et al, 2013). Neste estudo, o pH da emulsão foi mantido constante (4,0), o que possibilitou a obtenção de microcápsulas na maioria dos ensaios realizados. Além de afetar no tamanho, o pH também pode influenciar no rendimento das microcápsulas (Wang et al., 2014).

3.3. Superfície de Resposta

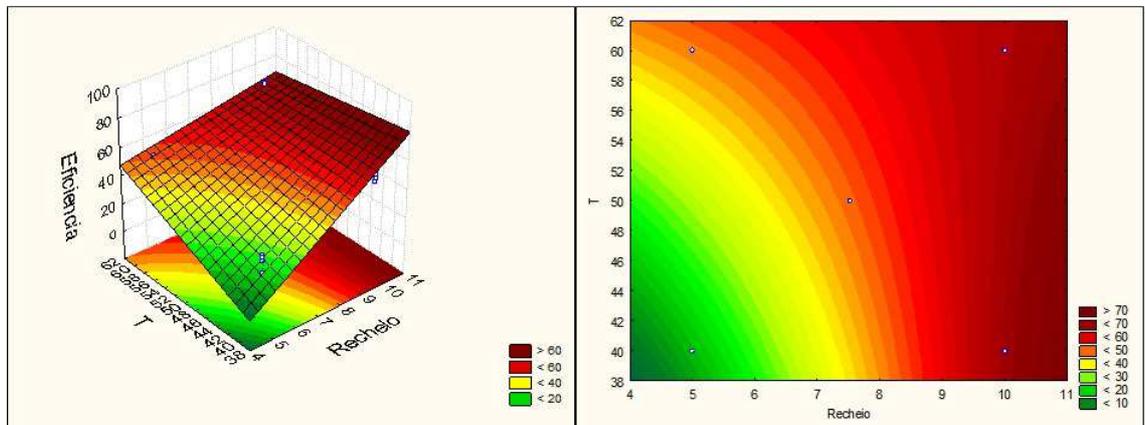
Os parâmetros de processo de microencapsulação são específicos, assim, o rendimento e a eficiência da microencapsulação podem variar, pois ambos são influenciados pela composição química e viscosidade do recheio (óleo) (Jun-Xia et al., 2011, Cheng et al., 2010; Wieland-Berghausen et al., 2002). Para avaliar os efeitos do recheio, da temperatura e da velocidade de homogeneização na eficiência (Figura 2), se consideraram as condições de processo do ensaio 8 (10 g 60 °C e 18000 rpm) por apresentar microcápsulas com morfologia mais bem definida que as do ensaio 6.

A Figura 2A mostra os efeitos da quantidade de recheio e da velocidade de homogeneização na eficiência da microencapsulação a 60 °C. O aumento da quantidade de recheio só teve efeito quando se aumentou a velocidade de homogeneização (Figura 2), esse fato pode ter ocorrido devido à grande quantidade de óleo, mostrando que a agitação favorece a superfície de contato entre o óleo e os polímeros encapsulantes.

A



B



C

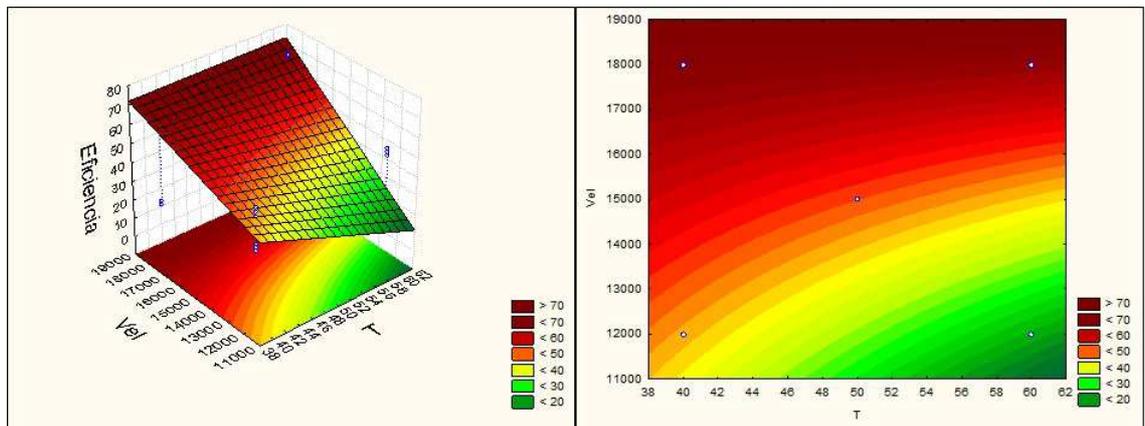


Figura 2. Eficiência na formação de microcápsulas do óleo de polpa de bacuri. A) recheio vs velocidade a 60 °C; B) recheio vs temperatura em 18000 rpm; C) temperatura vs velocidade com 10 g.

A influência do recheio e da temperatura, na formação de microcápsulas coacervadas a 18000 rpm, é observada na Figura 2B. A eficiência da encapsulação foi maior com o aumento do recheio, independente da temperatura.

A Figura 2C mostra a influência da temperatura e da velocidade de homogeneização na encapsulação de 10 g de óleo de bacuri. Observa-se maior eficiência com o aumento da temperatura e da velocidade de homogeneização, o que pode ser justificado pela alteração da viscosidade do óleo e maior fluidez. A redução da viscosidade, com o aumento da temperatura, também foi observado por Grangeiro et al. (2007), os autores atribuíram esse fato ao aumento das distâncias intermoleculares provocadas pelo aquecimento.

Aparentemente quanto menor a viscosidade do óleo maior o rendimento de microcapsulas formadas, possivelmente pelo maior deslocamento das partículas do fluido, o que permite distribuição mais homogênea das partículas de óleo e maior disponibilidade do reticulado. A influência da viscosidade do óleo na microencapsulação foi apresentada por Prata e colaboradores (2006), no estudo de microcápsulas produzidas por coacervação complexa de três óleos (vetiver, amêndoas e o óleo mineral) com viscosidades diferentes, os autores obtiveram maior eficiência de encapsulação (91,8%) para o óleo menos viscoso (óleo de vetiver).

3.4. Compostos bioativos e atividade antioxidante

O teor de carotenoides nas microcápsulas variou de 19,19 a 166,40 $\mu\text{g/g}$ de microcápsula em massa seca (Tabela 3). O conteúdo de carotenóides no óleo bruto de bacuri foi de 394,84 $\mu\text{g/g}$ de óleo (massa seca). A perda de carotenoides nas microcápsulas pode ser atribuída à exposição direta ao oxigênio durante a formação da emulsão, em função da velocidade de homogeneização, o que pode ter provocado a

oxidação deste biocompósito. Entretanto, os ensaios 2 (10 g 40 °C 12000 rpm) e 6 (10 g 40 °C 18000 rpm) apresentaram retenção de 42,14% e 35,66%, respectivamente.

Tabela 3. Carotenoides totais, compostos fenólicos e atividade antioxidante (AA), das microcápsulas do óleo da polpa de bacuri obtidas por coacervação complexa, em diferentes condições de processo.

| Ensaio | Carotenoides (μg /g microcápsula*) | Compostos fenólicos (mg GAE/g microcápsula*) | AA (μM trolox/g microcápsula*) |
|---------------------------|--|--|--|
| 1 (5 g 40 °C 12000 rpm) | 84,54 ^g | 6,16 ^c | 41,44 ^c |
| 2 (10 g 40 °C 12000 rpm) | 166,40 ⁱ | 6,82 ^d | 70,45 ^f |
| 3 (5 g 60 °C 12000 rpm) | 59,90 ^c | 8,33 ^e | 77,30 ^g |
| 4 (10 g 60 °C 12000 rpm) | 32,58 ^b | 3,17 ^a | 7,70 ^a |
| 5 (5 g 40 °C 18000 rpm) | 19,19 ^a | 3,80 ^b | 44,54 ^d |
| 6 (10 g 40 °C 18000 rpm) | 140,79 ^h | 11,14 ^g | 114,94 ^h |
| 7 (5 g 60 °C 18000 rpm) | 67,83 ^d | 9,30 ^f | 37,97 ^b |
| 8 (10 g 60 °C 18000 rpm) | 77,90 ^e | 15,16 ⁱ | 159,54 ⁱ |
| 9 (7,5 g 50 °C 18000 rpm) | 78,72 ^f | 12,44 ^h | 46,63 ^e |

*Valores médios dos ensaios realizados em triplicata. Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

A principal causa de perda ou destruição de carotenoides durante o processamento é a oxidação (Rodriguez-Amaya, 2010). A degradação de carotenoides por oxidação também foi observada por Castelo Branco & Torres (2011).

No que se refere aos compostos fenólicos, o óleo de bacuri apresentou (20,73 mg EAG/g de óleo bruto. Rufino et al. (2010) na polpa de bacuri *in natura*, quantificou 13,65 mg EAG/g de polpa, valor inferior ao encontrado neste estudo. O teor de compostos fenólicos encontrado no óleo de amêndoas de outras espécies mostra que o bacuri apresenta valores maiores, para a castanha de cutia (*Couepia edulis* Prance),

Costa-Singh et al. (2012) obtiveram 2,02 mg GAE/g do óleo. No óleo extraído da pecan (*Carya illinoensis* Wang.), Alasalvar & Shahidi (2009), reportaram 0,78 mg GAE/g de óleo. Contudo, a quantidade de carotenoides no óleo e nas microcápsulas foi maior em relação aos compostos fenólicos, o que pode ser justificado pela característica hidrofílica dos compostos fenólicos. Essa hidrofílicidade pode dificultar a sua determinação em óleos, diferentemente dos carotenoides, que fazem parte das frações lipofílicas (Castelo-Branco & Torres, 2011). Embora a maioria dos compostos fenólicos sejam hidrossolúveis e estejam ligados aos açúcares e às proteínas, os tocoferóis são os compostos fenólicos encontrados, principalmente, em sementes oleaginosas (Shahidi et al., 1992).

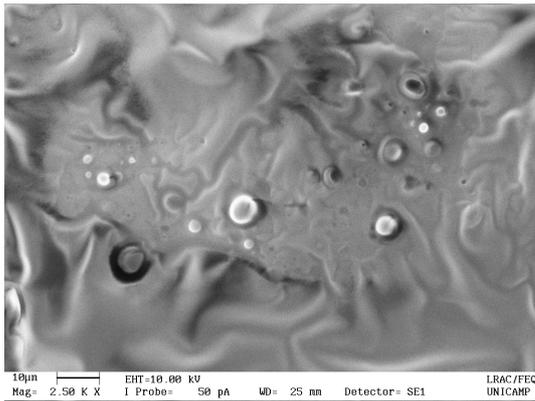
A maior retenção de compostos fenólicos nas microcápsulas foi observada nos ensaios 6 (10 g 40 °C 18000 rpm), 8 (10 g 60 °C 18000 rpm) e 9 (7,5 g 50 °C 15000 rpm), com 53,74%, 60,00% e 73,13%, respectivamente. A velocidade de homogeneização não exerceu influência na retenção, porém, a quantidade de óleo inserida no processo foi significativa ($P \leq 0,05$). Nas microcápsulas obtidas a 40 °C com 10g de recheio (ensaio 6) o teor de carotenoides foi maior (140,79 µg/g de microcápsula) e a 60 °C (ensaio 8) os compostos fenólicos (15,16 mg GAE/g de microcápsula). Esses resultados demonstram que a temperatura exerce maior influência na quantidade de carotenoides do que em compostos fenólicos e, conseqüentemente, na atividade antioxidante. O uso de altas temperaturas pode fornecer maior biodisponibilidade dos compostos fenólicos e de alguns carotenoides, pois ao utilizar altas temperaturas ocorre ruptura das células e liberação desses compostos. (Raupp et al., 2011; Re et al., 2002).

Os valores da atividade antioxidante pelo método ABTS^{•+} em diferentes condições (quantidade de recheio, temperatura e velocidade de homogeneização) variou

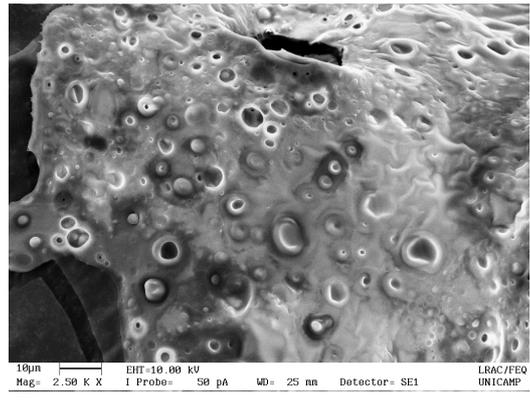
entre 7,7 e 159,54 μM trolox /g de massa seca de microcápsulas (Tabela 3). Nos ensaios 6 (10 g 40 °C 18000 rpm) e 8 (10 g 60 °C 18000 rpm) a atividade antioxidante foi maior às demais, o resultado da atividade antioxidante indica alto potencial antiradicalar das microcápsulas do óleo de bacuri, demonstrando a importância bioativa dessa espécie nativa do cerrado brasileiro.

3.5. Microscopia Eletrônica de Varredura

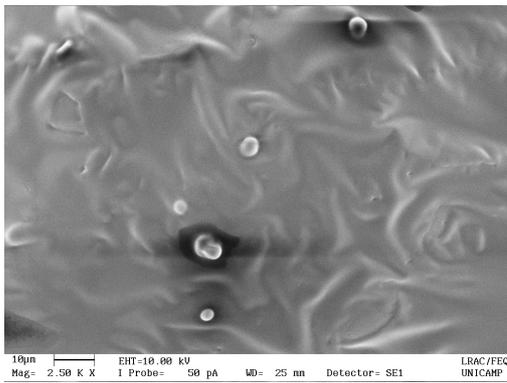
A Figura 3 mostra as micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura das microcápsulas do ensaio 6 (10 g 40 °C 18000 rpm) e 8 (10 g 60 °C 18000 rpm). Pelas imagens é possível observar a forma arredondada das microcápsulas como evidenciado na análise de microscopia ótica, bem como, a resistência das mesmas ao tratamento térmico empregado no preparo das amostras para realização das análises. As imagens demonstram que as partículas não se agregaram, mantendo sua formulação original, isso pode ter colaborado no maior teor de compostos fenólicos dessas formulações quando estes foram analisados, bem como no maior teor de carotenoides observado pelo ensaio 6 (Figura 3 a e b). Não foram observadas rachaduras, o que é um bom indicativo de que o recheio foi protegido, sendo assim, os resultados sugerem que as condições de processo do ensaio 6 e 8 poderiam ser utilizadas para a produção de microcápsulas, desde que as características do material de recheio sejam semelhantes às utilizadas neste estudo.



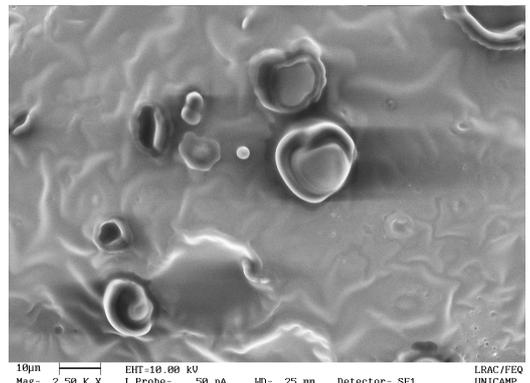
A



B



C



D

Figura 3. Micrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura das microcapsulas coacervadas em magnitudes de 2.5Kx: A e B ensaio 6 (10 g 40 °C 18000 rpm), C e D, ensaio 8 (10 g 60 °C 18000 rpm) .

Conclusão

A microencapsulação por coacervação complexa de óleo de bacuri com maior rendimento (82,55%) e eficiência (70,72%) foi obtida com 10g de recheio, nas condições de temperatura e velocidade de homogeneização de 60 °C e 18 000 rpm, respectivamente. Nessas condições, as microcápsulas apresentaram 50,81 µm de tamanho.

Quando compostos fenólicos e carotenoides foram avaliados, melhor desempenho foi observado nas microcápsulas obtidas nas condições de 10 g 40 °C

18000 rpm. Os carotenoides foram os compostos bioativos que predominaram nas microcápsulas, apresentando retenção de 42,46%, em relação ao óleo bruto, e alto potencial antiradicalar. A microscopia eletrônica de varredura mostrou a forma arredondada das partículas analisadas, bem como a estabilidade das mesmas, o que pode ter contribuído para os valores encontrados para essa formulação.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela auxílio da bolsa, aos órgãos Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro, ao Grupo de Estudos em Produtos e Processos Agroindustriais do Cerrado (GEPPAC) pela colaboração nas análises e ao Hotel Cabanas pela disponibilidade de coleta do fruto.

Referências

Alasalvar, C.; & Shahidi, F. (2009). Natural antioxidants in tree nuts. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111, 1056-1062.

Alvim, I. D.; & Grosso, C. R. F. (2005). Produção e caracterização de micropartículas obtidas por spray drying e coacervação complexa e seu uso para alimentação de larvas de peixes. 2005. 243f. Doutorado em Alimentos e Nutrição – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Barbosa, M. I. M. J.; & Mercadante, A. Z. Microcápsulas de bixina: obtenção, aplicação e estudos de fotodegradação em sistemas-modelo. 2009. 133f. Doutorado em Ciência de Alimentos – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Barreto, G. P. M.; Benassi, M. T.; & Mercadante, A. Z. (2009). Bioactive compounds from several tropical fruits and correlation by multivariate analysis to free radical scavenger activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20 (10), 1856-1861.

Bueno, C. M. M.; & Grosso, C. R. F. (2008). Extração e caracterização de gelatina de pele de tilápia e aplicação como agente encapsulante de óleo de salmão em micropartículas obtidas por coacervação complexa. 2008. 113f. Mestrado em Alimentos e Nutrição – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Castelo-Branco, V. N.; & Torres, A. G. (2011). Capacidade antioxidante total de óleos vegetais comestíveis: determinantes químicos e sua relação com a qualidade dos óleos. *Revista de Nutrição*, 24 (1), 173-187.

Célis, F. T.; & Grosso, C. R. F. (2009). Efeito da reticulação induzida pela transglutaminase e o glutaraldeído sobre as propriedades das micropartículas obtidas por coacervação complexa. 2009. 126f. Mestrado em Alimentos e Nutrição – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas – Campinas.

Cheng, S.; Yuen, M. C.; Lam, P.; Gambari, R.; Wong, R. S.; Cheng, G. Y.; Lai, P. B.; Tong, S.; Chan, K.; Lau, F.; Kok, S. H.; Lam, K.; & Chui, C. (2010). Synthesis, characterization and preliminary analysis of *in vivo* biological activity of chitosan/celecoxib microcapsules. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 10, 4147-4151.

Cocato, M. L.; Ré, M. I.; NETO, M. A. T.; Chiebao, H. P.; & Colli, C. (2007). Avaliação por métodos *in vitro* e *in vivo* da biodisponibilidade de sulfato ferroso microencapsulado. *Revista de Nutrição*, 20 (3), 239-247.

Costa-Singh, T.; Bitencourt, T. B.; & Jorge, N. (2012). Caracterização e compostos bioativos do óleo da castanha-de-cutia (*Couepiaedulis*). *Revista Instituto Adolfo Lutz*, 71 (1), 61-68.

Favaro-Trindade, C. S.; Pinho, S. C.; Rocha, G. A.(2008). Revisão: Microencapsulação de Ingredientes Alimentícios. *Revista Brasileira de Tecnologia de Alimentos*, 11, 103-112.

Ferreira, D. S.; Faria, A. F.; Grosso, C. R. F.; & Mercadante, A. D. (2009). Encapsulation of Blackberry Anthocyanins by Thermal Gelation of Curdlan. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 30 (10), 1908-1915.

George, S.; Brat, P.; Alter, P.; & Amiot, M. J. (2005). Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (5), 1370-1373.

Gomes, F. S. (2007). Carotenóides: uma possível proteção contra o desenvolvimento de câncer. *Revista de Nutrição*, 20 (5), 537-548.

Gorji, S. G.; Gorji, E. G.; & Mohammadifar, M. A. (2012). Characterisation of gum tragacanth (*Astragalus gossypinus*)/sodium caseinate complex coacervation as a function of pH in an aqueous medium. *Food Hydrocolloids*, 1-8.

Grangeiro, A. A.; Queiroz, A. J. M.; Figueirêdo, R. M. F.; Rangel, M. E.; & Mata, M. C. (2007). Viscosidades de polpas concentradas de figo-da-índia. *Revista Brasileira de Agrociências*, 13(2), 219-224.

Jun-Xia, X.; Hai-Yan, Y.; & Jian, Y. (2011). Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. *Food Chemistry*, 125 (4), 267-1272.

Kralovec, J. A.; Zhang, S.; Zhang, W.; & Barrow, C. J. (2012). A review of the progress in enzymatic concentration and microencapsulation of omega-3 rich oil from fish and microbial sources. *Food Chemistry*, 131, 639-644.

Laine, P.; Toppinen, E.; Kivela, R.; Taavitsainen, V.; Knuutila, O.; Sontag-Strohm, T.; Jouppila, K.; & Loponen, J. (2011). Emulsion preparation with modified oat bran: Optimization of the emulsification process for microencapsulation purposes. *Journal of Food Engineering*, 104, 538-547.

Lv, Y.; Zhang, X.; Zhang, H.; Abbas, S.; & Karangwa, E. (2013). The study of pH-dependent complexation between gelatin and gum arabic by morphology evolution and conformational transition. *Food Hydrocolloids*, 30, 323-332.

Maisutthisakul, P.; & Gordon, M. H. (2012). Influence of polysaccharides and storage during processing on the properties of mango seed kernel extract (microencapsulation). *Food Chemistry*, 134, 1453-1460.

Menezes, C. G.; Barin, J. S.; Chicoski, A. J.; Zepka, L. Q.; Jacob-Lopes, E.; Fries, L. L. M.; & Terra, N. N. (2013). Microencapsulation of probiotics: progress and prospects. *Rural Science*, 43 (7), 1309-1316.

Nakagawa, K.; & Nagao, H. (2012). Microencapsulation of oil droplets using freezing-induced gelatin-acacia complex coacervation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 411, 129-139.

Nori, M. P.; Trindade, C. S. F.; Alencar, S. M.; Thomazini, M.; Balieiro, J. C. C.; & Castillo, C. J. C. (2011). Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 429-435.

Peng, C.; Zhao, S. Q.; Zhang, J.; Huang, G. Y.; Chen, L. Y.; Zhao, F. Y. (2014). Chemical composition, antimicrobial property and microencapsulation of Mustard (*Sinapis alba*) seed essential oil by complex coacervation. *Food Chemistry*, 165, 560-568.

Piacentini, E.; Giorno, L.; Dragosavac, M. M.; Vladislavljevic, G. T.; Holdich, R. C. (2013). Microencapsulation of oil droplets using cold water fish gelatine/gum arabic complex coacervation by membrane emulsification. *Food Research Internacional*, 53, 362-372.

Prata, A. S.; Ré, M. I.; & Grosso, C. R. F. (2006). Estudo dos parâmetros físico-químicos envolvidos na formação de microcápsulas produzidas por coacervação complexa. 2006. 242f. Doutorado em Alimentos e Nutrição – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas – Campinas.

Quan, J.; Kim, S-M.; Pan, C-H.; & Chung, D. (2013). Characterization of fucoxanthin-loaded microspheres composed of cetylpalmitatebased solid lipid core and fish gelatin–gum arabiccoacervate shell. *Food Research International*, 50, 31-37.

Qv, X. Y.; Zeng, Z. P.; & Jiang, J. G. (2011). Preparation of lutein microencapsulation by complex coacervation method and its physicochemical properties and stability. *Food Hydrocolloids*, 25, 1596-1603.

Raupp, D. S.; Rodrigues, E.; Ruckebach, I. I.; Carbonar, A.; Campos, P. F.; Borsato, A. V.; & Fett, R. (2011). Effect of processing on antioxidant potential and total phenolics content in beet (*Beta vulgaris* L.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 31 (3), 688-693.

Re, R.; Bramley, P. M.; & Rice-Evans, C. (2002). Effects of food processing on flavonoids and lycopene status in a mediterranean tomato variety. *Free Radical Research*, 36 (7), 803-810.

Remuñán-López, C.; & Bodmeier, R. (1996). Effect of formulation and process variables on the formation of chitosan-gelatin coacervates. *Internacional Journal of Pharmaceutics*, 135 (1-2), 63-72.

Rodríguez-Amaya, D.B. (2010). Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids-A review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 726-740.

Rufino, M.S.M.; Alves, R.E.; Brito, E.S.; Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F.; & Mancini-Filho, J. (2010). Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 121, 996–1002.

Shahidi, F.; Wanasundara, P. K. (1992). Phenolic antioxidant. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32 (1), 67-103.

Sousa, M. S. B.; Vieira, L. M.; Silva, M. J. M.; & Lima, A. (2011). Caracterização nutricional e compostos antioxidantes em resíduos de polpas de frutas tropicais. *Revista Ciência e Agrotecnologia*, 35 (3), 554-559.

Zuanon, L. A. C.; Malacrida, C. R.; & Telis, V. R. N. (2013). Production of turmeric oleoresin microcapsules by complex coacervation with gelatin–gum arabic. *Journal of Food Process Engineering*, 36, 364-373.

Wang, B.; Adhikari, B.; & Barrow, C. J. (2014). Optimisation of the microencapsulation of tuna oil in gelatin-sodium hexametaphosphate using complex coacervation. *Food Chemistry*, 158, 358-365.

Wieland-Berghausen, S.; Schote U.; Frey, M.; & Schmidt, F. (2002). Comparison of microencapsulation techniques for the water-soluble drugs nitenpyram and clomipramine HCl. *Journal of Controlled Release*, 85, 35-43.

Capítulo III

Artigo II

**Artigo escrito nas normas da Revista International Journal of
Food Science and Nutrition**

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO ÓLEO DE BACURI
MICROENCAPSULADO POR COACERVAÇÃO COMPLEXA EM RATOS**

Fernando Freitas de Lima^a, Eliana Janet Sanjinez-Argandoña^c, Cândida Aparecida Leite
Kassuya^b

^aUniversidade Federal da Grande Dourados, Faculdade de Ciências Exatas e
Tecnologias, Dourados, MS, Brasil

^bUniversidade Federal da Grande Dourados, Faculdade de Ciências da Saúde,
Dourados, MS, Brasil

^c Universidade Federal da Grande Dourados, Faculdade de Engenharia, Dourados, MS,
Brasil

RESUMO

Attalea phalerata Mart. é uma palmeira da família das *Arecaceae*. O seu fruto, conhecido como bacuri, possui atividade antioxidante, com destaque aos carotenoides e compostos fenólicos que são degradados pela oxidação. A microencapsulação por coacervação complexa é uma técnica que minimiza este efeito, pois o óleo é revestido por agentes encapsulantes permitindo a retenção de compostos bioativos presentes. Os objetivos do presente trabalho foram determinar a atividade antioxidante, os teores de carotenoides e compostos fenólicos no óleo da polpa de bacuri, obter microcápsulas úmidas e liofilizadas do óleo, bem como avaliar o potencial anti-inflamatório e diurético. Durante a etapa de microencapsulação houve a retenção de 32,89% dos carotenoides e após a liofilização retenção de 25,67%. A administração oral de 1000 mg/kg do óleo, da microcápsula úmida e liofilizada diminuiu significativamente a formação de edema de pata após 0,5 e 1 h da injeção de carragenina. Entretanto, somente a administração oral de microcápsula úmida reduziu o edema nos tempos de 2 e 4 h após a carragenina. Além disso, no modelo de pleurisia, a administração oral de 1000 mg/kg do óleo, microcápsula úmida e liofilizada diminuiu significativamente a migração de leucócitos para a cavidade pleural. Na avaliação diurética, foi verificado que a administração oral de 1000 mg/kg do óleo, da microcápsula úmida ou liofilizada não apresentaram eficácia em aumentar a excreção de urina ou de eletrólitos. Assim, o presente estudo mostrou que o óleo é um agente anti-inflamatório natural, mas sem atividade diurética. As alterações tecnológicas nesse óleo, principalmente da formulação úmida, parecem prolongar a atividade anti-inflamatória provavelmente por aumentar a biodisponibilidade do(s) composto(s) ativos presente(s). Os resultados nos levam a concluir que a microencapsulação proporciona um aumento da estabilidade e preservação dos componentes ativos.

Palavras-chave: *Attalea phalerata* Mart., inflamação, microencapsulação, biodisponibilidade.

Introdução

O processo inflamatório representa a primeira linha de resposta de defesa do organismo a patógenos ou a estímulos nocivos contribuindo para a proteção e reparo do organismo. A migração de leucócitos, principalmente os neutrófilos, para o local de lesão contribui para a produção e liberação de citocinas e quimiocinas que acompanham o processo inflamatório e que regulam a interação célula-célula (Wright et al., 2014).

Tratamento de doenças inflamatórias se baseia em grande parte a interromper a síntese ou a ação de mediadores que impulsionam a resposta do hospedeiro à lesão. Anti-inflamatórios não-esteróides, esteróides e anti-histamínicos, por exemplo, foram desenvolvidos nesta base. Embora tais inibidores tem fornecido o principal tratamento para a asma e artropatias inflamatórias, a utilização é limitada por conta dos efeitos adversos desse fármacos (Gilroy et al., 2004)

Dentre as plantas promissoras como agente anti-inflamatório natural está *Attalea phalerata* Mart. (Arecaceae), conhecida popularmente como “bacuri”, é facilmente encontrada no Cerrado e na América do Sul, apresenta mesocarpo (polpa) e sementes comestíveis (amêndoa) (Corrêa et al., 2012). De acordo com Hiane (2003), a coloração amarelo-alarajando se refere a presença de carotenoides na polpa, principalmente de beta-caroteno, alfa-caroteno, luteína, zeaxantina e licopeno. Estudos científicos mostram

que os carotenoides apresentam ação antioxidante, protegendo o organismo de danos celulares provocados pelo estresse oxidativo (Silva; Naves, 2001; Rodriguez-Amaya, 2010), além de auxiliar na eficiência do sistema imune e na prevenção de doenças crônicas (Hiane, 2003; Choo et al, 2010; Rodriguez-Amaya, 2010).

A atividade farmacológica dos carotenoides em frutos vem sendo estudada, e já pode ser observada por Batista et al (2010) na diminuição do processo inflamatório local caracterizado pela formação de edema tecidual quando utilizado o óleo de pequi (*Caryocar cariaceum* Wittm) no processo de cicatrização de ferida cutânea em ratos. Por outro lado, Lescano & Sanjinez-Argandoña (2013) verificaram a atividade anti-edematogênica de microcápsulas de óleo de bocaiuva (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd.), por meio de modelos experimentais de pleurisia e edema de pata em ratos. Contudo, até o momento não foram encontrados relatos científicos sobre a ação farmacológica do óleo de bacuri.

Outro ponto importante são limitações em relação à estabilidade dos carotenoides bioativos que podem ser observadas, como a oxidação e degradação pelo calor desses compostos (Liu et al., 2012). Na tentativa de tornar compostos mais biodisponíveis e conseqüentemente minimizar sua degradação, desenvolveram-se tecnologias como a microencapsulação por coacervação complexa (Kralovec et al., 2012).

Diante do exposto, os objetivos do presente trabalho são quantificar carotenoides e compostos fenólicos do óleo e microcápsulas de *Attalea phalerata* Mart., avaliar sua ação antioxidante por ABTS^{•+} e analisar a atividade anti-inflamatória e diurética em modelos experimentais em ratos.

Material e Métodos

Material

Frutos de *Attalea phalerata* Mart. foram coletados no Hotel Cabanas do município de Bonito – MS, longitude, 21 ° 10 '19 0,1 MS, latitude 056 ° 26 '58 0,0, altitude 6 m e selecionados no estágio de maturação maduro, definido pela cor amarela.

O óleo do *Attalea phalerata* Mart. foi obtido por extração sólido-líquido com solvente hexano P.A. (Vetec), na proporção de uma parte de polpa desidratada em pó para 3 partes de solvente 1:3 (p/v) sob contínua agitação (150 rpm) durante 7 dias em temperatura ambiente. O produto foi filtrado e o solvente removido em evaporador rotativo IKA (modelo RV 0,5 basic), sob pressão reduzida a 50°C.

As microcápsulas de óleo de bacuri foram preparadas por coacervação complexa em meio aquoso de acordo com Lima et al. (2014). Foi preparada a emulsão misturando-se 10 g de óleo de bacuri com 100 mL de solução de gelatina (2,5%) previamente aquecida e hidratada a 60 °C com o auxílio de um homogeneizador ultraturrax a velocidade constante de 18000 rpm durante 1 min. Logo, foi incorporado 100 mL de goma arábica hidratada (2,5%) e água desionizada (400 mL). Em seguida foi corrigido o pH com ácido clorídrico (0,1 M) para obter a emulsão com pH 4.0. Finalmente, o material foi gradualmente resfriado em banho de gelo até alcançar a temperatura de 10 °C. Após o resfriamento o material foi armazenado à temperatura de – 18°C.

λ -carragenina, solução salina tamponada com fosfato (PBS), reagente de Bradford e dexametasona foram adquiridos da Sigma-AldrichCo. ® LLC (St. Louis, MO, EUA).

Liofilização

Microcápsulas previamente congeladas a -18 °C foram liofilizadas a temperatura – 50 °C em liofilizador (Modelo: Savant Micromodulyo e Marca: Thermo Sciencitific) acoplado à bomba de vácuo (Modelo: PLV 200 Bomba de vácuo e Marca: Thermo Sciencitific) até remoção completa da água e formação de microcápsulas em pó.

Compostos fenólicos

Inicialmente foi preparado um extrato a partir de 2g de óleo/microcápsulas de bacuri misturados com 50 ml de acetona (95%), e centrifugadas a 15000 rpm por 15 min. O sobrenadante do material centrifugado foi considerado o extrato. Para a quantificação dos compostos fenólicos, uma alíquota de 0,5 ml do extrato foi misturada com 0,45 ml de água destilada, 2,5 ml de solução aquosa do reagente Folin-Ciocalteau (10%) e 2,0 ml de carbonato de sódio (7,5%). A mistura foi incubada por 5 min em banho-maria a 50 °C e, após resfriamento (25 °C), a absorbância foi medida a 760 nm (espectrofotômetro Biospectro), usando-se água destilada como referência (branco). Os compostos fenólicos foram determinados por interpolação das absorbâncias das amostras contra uma curva de calibração construída com solução de ácido gálico em diferentes concentrações. Os resultados foram expressos em mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) g de extrato. Cada determinação foi realizada em triplicata.

Carotenoides

A extração de carotenoides constituiu na maceração de 2,5g de amostra em almofariz com auxílio de celite e acetona (10 °C), até completa extração do pigmento. Após a extração, a mistura foi filtrada a vácuo e transferida para um funil de separação contendo 40 ml de éter de petróleo. Procedeu-se à remoção da acetona com água

destilada. O extrato (éter de petróleo + pigmentos) foi transferido para um balão volumétrico (50 ml) completando-se o volume com éter de petróleo. Absorbância do extrato foi lida a 450 nm em espectrofotômetro (marca Biospectro), éter de petróleo foi utilizado como branco (Rodriguez-Amaya, 2010). O conteúdo de carotenoides foi calculado pela Equação:

$$C(\mu g/g) = \frac{\lambda \times D \times 10^4}{\varepsilon \times m(g)} \quad (1)$$

Onde, λ é a absorbância (nm), D é a diluição (ml) e ε é o fator de β -caroteno em éter de petróleo (2592) e m é a amostra seca (g).

Atividade antioxidante pelo método ABTS^{•+}

Os extratos foram preparados a partir das microcápsulas (5 g) com solvente (50 ml) na proporção de 1:10 (m/v). A extração foi realizada com metanol 50% (solvente) após repouso do material por 60 min, logo o material foi centrifugado(4000 rpm) por 15 min e o sobrenadante retirado. Ao sedimento foram adicionado 40 ml de acetona (70%) para realizar a segunda extração de acordo com o procedimento da 1ª extração. Os sobrenadantes das duas extrações foram misturados, transferidos para um balão (100 ml) e o volume completado com água destilada.

O radical ABTS^{•+} (2,2 AZINO BIS-3-ethylbenzo thiazoline-6-sulfonic acid diammonium) foi formado pela reação de ABTS^{•+} (7 mM) com persulfato de potássio (140 mM), a mistura reagiu por 16 h à temperatura ambiente e na ausência de luz, obtendo-se a solução radicalar. Para as análises, a solução radicalar foi diluída em etanol até absorbância de 0,70 (\pm 0,05). As absorbâncias foram medidas a 734 nm (espectrofotômetro Biospectro) após 6 min da adição do extrato. Uma curva de calibração foi preparada a partir de soluções etanólicas de Trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-

tetrametil chroman-2-ácido carboxílico) nas concentrações de 100; 500; 1000; 1500 e 2000 μ M (Rufino et al., 2010). Os resultados foram expressos em mM de Trolox/g de amostra. Cada determinação foi realizada em triplicata.

Animais

Para os testes anti-inflamatórios foram utilizados camundongos *Swiss* (20 a 25 g) machos (n = 5 por grupo) e para a avaliação diurética foram utilizados ratos *Wistar* machos (200 a 250 g). Os animais foram fornecidos pelo biotério da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (5 animais por gaiola) sob temperatura controlada (23 ± 1 ° C) e ciclo de luz (12 h claro/escuro), tratados com água e dieta comercial ad libitum. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFGD sob o protocolo de 021/2013.

Modelo edema de pata induzido pela carragenina

Os animais foram divididos em grupos experimentais (n = 5 animais/grupo), com o grupo 1 (controle) que foi tratado por via oral com veículo (1,0 ml/kg de soro fisiológico a 0,9% de solução salina). Diferentes grupos de ratos receberam por via oral o óleo bruto de *A. phalerata* (300, 700 e 1000 mg/kg) ou microcápsulas de óleo úmido e liofilizado obtidos de *A. phalerata* Mart. (1000 mg) dissolvida em solução salina a 0,9%. O grupo de controle positivo recebeu dexametasona a uma dose de 1 mg/kg por via subcutânea. Após 1 hora dos respectivos tratamentos, os animais receberam na pata posterior direita, 50 μ L de solução salina a 0,9% contendo 300 μ g de carragenina. O mesmo volume de solução salina foi administrado na pata esquerda. O edema foi mensurado em ambas as patas com o auxílio de um pletismômetro digital após 0,5, 1, 2 e 4 h da aplicação de carragenina (Winter, et al, 1962;.. Kassuya, et al, 2005; Formagio,

Kassuya et al., 2013). A diferença entre as patas foi expresso em μL sendo considerado como edema.

Modelo de pleurisia induzido pela carragenina

Os animais foram tratados via oral com o óleo bruto de *A. phalerata* (1.000 mg/kg) e a formulação úmida e liofilizada (1.000 mg/ kg) e o grupo controle positivo recebeu 1 mg/kg de dexametasona via subcutânea. Após uma hora a pleurisia foi induzida por injeção de 0,25 mL de uma suspensão de carragenina (200 μg) na cavidade intrapleural. A carragenina é diluída em solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH=7.4) (Vinegar, et al., 1973). Quatro horas após a indução de pleurisia, os animais foram eutanasiados com cetamina (100 mg/kg) e com xilazina (10 mg/kg) e o exsudado inflamatório foi coletado através de um lavado da cavidade pleural com Tampão PBS. Após a coleta do material foi realizado deslocamento cervical dos animais. Do lavado obtido, uma alíquota de 50 μL foi diluída em solução de Turk (01:20) e usada para determinar o número total de leucócitos em câmara de Neubauer.

Modelo de diurese

Na avaliação da atividade diurética ratos *Wistar* machos foram divididos 5 grupos (n=5), no grupo I, grupo II e III, foram administradas as doses de 300, 700 e 1000 mg/Kg de óleo de bacuri, respectivamente. O grupo IV recebeu solução salina 0,9% e o grupo V recebeu furosemida 25 mg/Kg. Realizou-se a avaliação da diurese de acordo com a metodologia de KAU *et al.*, (1984). Os ratos foram mantidos em gaiolas metabólicas por um período de adaptação de 6 horas, e seguidas 12 horas de jejum. No início dos experimentos os animais receberam uma sobrecarga de solução salina (NaCl 0,9%) à 5% do peso de cada animal. Quarenta e cinco minutos após a administração da

sobrecarga, os diferentes grupos foram tratados com os respectivos tratamentos, grupo controle positivo (grupo V) recebeu a furosemida, controle negativo (grupo IV) a solução salina e os grupos I, II e III receberam as doses de 300, 700 e 1000 mg/kg. Após realizada todas as administrações o volume da excreção urinária foi avaliado durante 8 horas, em diferentes tempos, sendo eles de 1h, 2h, 4h, 6h, e 8h à partir da administração dos tratamentos.

Análise estatística

Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). Análise de variância foi realizada pela ANOVA seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls, foi avaliada as possíveis diferenças entre os grupos. As diferenças foram consideradas significativamente em $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

Os valores obtidos (Tabela 1) mostraram que houve redução dos compostos bioativos e da atividade antioxidante com o processamento. O teor de carotenoides do óleo (236,88 μg de carotenoides/g de amostra no óleo) reduziu com os processos de microencapsulação e liofilização, mantendo retenção de 32,89% e 25,67%, respectivamente. Os carotenoides são sensíveis ao oxigênio, luz e calor por apresentarem ligações duplas conjugadas (Gonnet et al.,2010), durante a microencapsulação, o processo é conduzido a 60°C sob intensa agitação com consequente incorporação de oxigênio, o que justifica a degradação dos mesmos. Durante a liofilização, também houve redução de 21,95% nos carotenoides, porém o conteúdo de compostos fenólicos quantificados nas microcapsulas úmidas foi mantido nas liofilizadas.

Embora a liofilização seja uma técnica de secagem que melhor conserva constituintes nutricionais e substâncias bioativas (Ayen & Kumar, 2012), além de proporcionar maior tempo de estocagem, observou-se a degradação dos carotenoides durante a liofilização, que pode estar atribuída à exposição à luz durante o processo, pois a torre do equipamento é transparente e o tempo de liofilização foi de 48 horas, outro fator que possa ter contribuído para a degradação é a formação de grandes cristais de gelo devido à baixa taxa de congelamento na etapa anterior a liofilização. Esses cristais podem ter influenciado no tamanho dos poros criados durante a secagem subsequente, o que explica a diminuição dos carotenoides após a liofilização, sendo que com o aumento da porosidade das microcápsulas ocorre maior exposição do material encapsulado e conseqüentemente a diminuição do conteúdo de carotenoides e atividade antioxidante.

Os compostos fenólicos sofreram redução de 20,73 mg AG/g de amostra no óleo bruto para 15,16 mgAG/g de amostra nas microcápsulas úmidas e 15,99 mgAG/g de amostra nas microcápsulas liofilizadas, tendo menor redução quando comparados aos carotenoides, sendo isso devido ao fato que alguns compostos fenólicos podem se tornar mais biodisponíveis quando expostos a temperaturas elevadas (Raupp et al., 2011). A atividade antioxidante sofreu redução após a liofilização, possivelmente alguns compostos hidrofílicos que possam exercer atividade antioxidante além dos carotenoides e compostos fenólicos foram retirados durante a etapa de secagem.

O uso da carragenina vem sendo aplicado em diversos modelos experimentais de inflamação, auxiliando no desenvolvimento de drogas anti-inflamatórias, sendo o modelo de edema de pata induzido pela carragenina um modelo clássico, tendo a resposta inflamatória medida pela formação do edema (Silva et al., 2010). O modelo de edema induzido pela carragenina é um modelo de inflamação aguda acompanhada de

indução de ciclooxigenase (COX)-2, prostaglandina E2 sintase, aumento de citocinas pro-inflamatórias e outros mediadores inflamatórios (Samad et al., 2001; Guay et al., 2004, Song et al., 2009, Okine et al., 2012) em até 3 horas após a injeção na pata do animal. Os resultados do presente estudo demonstram que a injeção intraplantar aumenta o edema na pata dos animais nos tempos 0,5, 1, 2 e 4 horas após a injeção de carragenina corroborando com os resultados mostrados na literatura.

A administração oral da dose de 1000 mg/kg, mas não das doses de 300 ou de 700 mg/kg (resultados não mostrados), do óleo bruto de *A. phalerata* reduziu significativamente o edema nos tempos 0,5 e 1 hora após a injeção de carragenina (Figura 1). De forma semelhante à formulação liofilizada produzida por microencapsulação por coervarção complexa do óleo de *A. phalerata* na dose de 1000 mg/kg. Entretanto a formulação úmida produzida por microencapsulação por coervarção complexa do óleo prolongou o efeito anti-edematogenico que foi verificado além dos tempos 0,5 e 1 h também nos tempos 2 e 4 h após a carragenina (Figura 1).

As reduções no tempo de 0,5 h foram de $42 \pm 16\%$ quando do tratamento com o óleo bruto, e de $95 \pm 9\%$ e $83 \pm 4\%$ quando do tratamento com as microcápsulas úmidas e liofilizadas, respectivamente (Fig 1A). No tempo de 1 h as inibições das microcápsulas úmidas foram mais significativas, sendo de $93 \pm 7\%$ quando comparadas com as microcápsulas liofilizadas $57 \pm 23\%$ no tempo de 1h (Fig. 1B). De maneira similar, o grupo tratado com dexametasona, anti-inflamatório de referência reduziu significativamente o edema, como esperado, uma vez que é um efetivo anti-inflamatório esteroideal. Desta forma, demonstra-se que o óleo bruto de *A. phalerata* apresenta substâncias que permanecem no organismo de forma limitada e inibem o edema de carragenina. Outro ponto importante é que a formulação úmida produzida por

microencapsulação por coervação complexa desse óleo aumenta o tempo de permanência dos compostos bioativos.

Na pleurisia, a administração oral do óleo bruto de *A. phalerata* e também de microcápsulas úmidas e liofilizadas, todos na dose de 1000 mg / kg inibiu de maneira significativa o processo inflamatório, evidenciado pela redução da migração de leucócitos para a cavidade pleural, com inibição de $93,07 \pm 1\%$ para o óleo de *A. phalerata*, de $89 \pm 1\%$ para as microcápsulas úmidas e $45 \pm 34\%$ para microcápsulas liofilizadas, 4 horas após a administração do agente flogístico (Fig 2). O modelo experimental de pleurisia induzida por carragenina tem a capacidade de representar os principais eventos da inflamação aguda de maneira similar à que ocorre em humanos, assim este modelo pode ser considerado muito eficiente na investigação de efeitos anti-inflamatórios em substâncias potenciais (Jantz e Antony, 2008). Muitos anti-inflamatórios esteroidais como a dexametasona apresentam a propriedade de causar a inibição da migração de leucócitos. Dessa forma, demonstra-se que os compostos presentes no óleo bruto e também nas microcápsulas obtidas de *A. phalerata* apresentam uma ação contra a migração de leucócitos além de anti-edematogênica que foi evidenciado no edema de pata.

No modelo de avaliação da atividade diurética os óleos testados não apresentaram atividade em aumentar a excreção de urina ou de alterar a composição dos eletrólitos presentes. Dessa forma, o óleo de bacuri não apresenta potencial diurético.

Os resultados do presente estudo mostraram que o óleo bruto, microcápsulas úmidas e liofilizadas de bacuri foram capazes de reduzir os parâmetros de inflamação quando administrados oralmente em ratos. Após a realização deste trabalho, demonstrou-se que *A. phalerata* Mart. é de fato promissora para o desenvolvimento de

fitoterápicos e como fonte de diversas substâncias necessita-se de um estudo fitoquímico mais aprofundado.

Conflito de interesses

Não há conflitos.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), FUNDECT, CNPq pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Ayen, W. Y.; Kumar, N. A systematic study on lyophilization process of polymersomes for long-term storage using doxorubicin-loaded (PEG) 3-PLA nanopolymersomes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 46 (5), 405-414, 2012.
- Castro D. M.; Castellani D. C.; Martins, E. R.; Dias J. E. *Plantas medicinais*. Viçosa: Editora Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- Choo, J.; Ishak, H.; Simpson, B.; Mueller, U.; Juenger, T. Characterization of 14 Microsatellite Loci in a Tropical Palm, *Attalea phalerata* (Arecaceae). *American Journal of Botany*: e105–e106. 2010.
- Côrrea, C.E.; Fischer E.; Santos, F. A. M. Seed banks on *Attalea phalerata* (Arecaceae) stems in the Pantanal wetland, Brazil. *Annals of Botany* 109: 729–734, 2012.
- Kralovec, J. A.; Zhang, S.; Zhang, W.; & Barrow, C. J. A review of the progress in enzymatic concentration and microencapsulation of omega-3 rich oil from fish and microbial sources. *Food Chemistry*, 131, 639-644, 2012.
- George, S.; Brat, P.; Alter, P.; Amiot, M. J. Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (5), 1370-1373, 2005.
- Gilroy D. W.; Lawrence T.; Perretti M.; Rossi A. G. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nature Review Drug Discovery*, 3(5):401-16, 2004.
- Gonnet, M.; Lethuaut, L.; Boury, F. New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. *Journal of Controlled Release*, 146, 276-290, 2010.
- Guay, J.; Bateman, K.; Gordon, R.; Mancini, J.; Riendeau, D. Carrageenan-induced paw edema in rat elicits a predominant prostaglandin E2 (PGE2) response in the central nervous system associated with the induction of microsomal PGE2 synthase-1. *The Journal Biological Chemistry*, 279, 24866–24872, 2004.

- Hiane, P.A. et al. Carotenóides pró-vitamínicos A e composição em ácidos graxos do fruto e da farinha do bacuri (*Scheelea phalerata* Mart.). *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 23 (2), 206-209, 2003.
- Jantz, M. A.; Antony, V. B. Pathophysiology of the pleura. *Respiration*, 75 (2), 121-33, 2008.
- Lescano, C. H.; Sanjinez-Argandoña, E. J. Microencapsulação do óleo de bocaiuva *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Por coacervação complexa. 68 p. Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental – Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologias, Universidade Federal da Grande Dourados - Dourados.
- Lima, F. F.; Sanjinez-Argandoña, E. J.; Kassuya, C. A. L. Microencapsulação do óleo de bacuri por coacervação complexa: obtenção, caracterização e avaliação biológica. 2014. 64f. Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental – Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologias, Universidade Federal da Grande Dourados – Dourados.
- Liu, K.; Xu, Y.; Wang, X. Microencapsulation of sweet orange oil terpeneless using the orifice method. *Journal of Food Engineering*, 110, 390–394, 2012.
- Okine, B. N.; Norris, L. M.; Woodhams, S.; Burstn, J.; Patel, A.; Alexander, S. P.; Barrett, D. A.; Kendall, D. A.; Bennett, A. J.; Chapman, V. Lack of effect of chronic pre-treatment with the FAAH inhibitor URB597 on inflammatory pain behaviour: evidence for plastic changes in the endocannabinoid system. *British Journal of Pharmacology*, 67 (3), 627-40, 2012.
- Raupp, D. S.; Rodrigues, E.; Ruckebach, I. I.; Carbonar, A.; Campos, P. F.; Borsato, A. V.; Fett, R. Effect of processing on antioxidant potential and total phenolics content in beet (*Beta vulgaris* L.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 31 (3), 688-693, 2011.
- Rodriguez-Amaya, D. B. Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids-A review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 726-740, 2010.
- Roesler, R.; Malta, L. G.; Carrasco, L. C.; Holanda, R. B.; Sousa, C. A. S.; Pastore, G. M. Atividade antioxidante de frutos do cerrado. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27(1), 53-60, 2007
- Rufino, M.S.M.; Alves, R.E.; Brito, E.S.; Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F.; & Mancini-Filho, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 121, 996–1002, 2010.
- Samad, T. A.; Moore, K. A.; Sapirstein, A.; Billet, S.; Allchorne, A.; Poole, S. Interleukin-1[beta]-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature*, 410, 471–475, 2010.
- Silva, F. R. F.; Dore, C. M. P. G.; Marques, C. T.; Nascimento, M. S.; Benevides, N. M. B.; Rocha, H. A. O.; Chavante, S. F.; Leite, E. L. Anticoagulant activity, paw edema and pleurisy induced carrageenan: Action of major types of commercial carrageenans. *Carbohydrate Polymers*, 79, 26-33, 2010.
- Song, M. J.; Wang, Y. Q.; Wu, G. C. Additive anti-hyperalgesia of electroacupuncture and intrathecal antisense oligodeoxynucleotide to interleukin-1 receptor type I on carrageenan-induced inflammatory pain in rats. *Brain Research Bulletin*, 78, 335–341, 2009.
- Silva, C.R.M.; Naves, M.M.V. Suplementação de vitaminas na prevenção de câncer. *Revista de Nutrição*, 14 (2), 135-143, 2001.
- Vinegar R.; Truax J. F.; Selph J. L.; Voelker F. A. Path way of onset, development, and decay of carrageenan pleurisy in the rat. *Federation Proceedings* 41, 2588–2595, 1982.

Wright, H. L.; Moots, R. J.; Edwards, S. W. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Nature Review Rheumatology*, 10(10):593-601, 2014.

Legendas

Tabela. 1 – Valores de compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante para o óleo bruto, microcápsulas úmidas e liofilizadas em condições de 10g, 60 ° C e 18 000 rpm agitação.

Figura. 1 – Efeito da administração oral do óleo bruto e microencapsulado no edema de pata induzido por carragenina em ratos. Os animais receberam o óleo de *A. phalerata* bruto, microcápsulas úmidas e liofilizadas (1000 mg / kg), a dexametasona (DEX - 1 mg / kg, sc) ou veículo e após 1 h, uma injeção intraplantar de carragenina (300 µg / rato) foi realizada. Apresenta-se a inibição de resposta nos tempos de 0,5 h (a), depois de 1 h (b), 2 h (c) e 6 h (d). As barras expressam a média ± SEM de 6-7 animais, em comparação com o veículo (V) vs grupo tratado. ** P <0,01, * P <0,001, ANOVA de uma via seguida por Student-Newman-Keuls.**

Figura. 2 – Efeito da administração oral do óleo bruto e microencapsulado na emigração de leucócitos e extravasamento de plasma induzido por carragenina no modelo de pleurisia em ratos. Os animais receberam o óleo de *A. phalerata* bruto, microcápsulas úmidas e liofilizadas (1000 mg / kg), dexametasona (1 mg / kg, subcutânea) ou veículo e após 1 h, injetou-se carragenina (300 µg / rato), intrapleurial. O exsudato foi coletado 4 horas após a injeção de carragenina. O total de leucócitos que migraram, bem como, o extravasamento de plasma induzido por Cg foi analisado. As diferenças entre os grupos foram analisados por análise de variância (one-way ANOVA) seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. Valores de p <0,05 foram considerados significativos. * P <0,05, ** P <0,01, * P <0,001.**

Tabelas

Tabela 1

| | Óleo bruto | Microcápsula úmida | Microcápsula liofilizada |
|---|------------|--------------------|--------------------------|
| Carotenoides (μg de carotenoids/g de amostra em base seca) | 236,88* | 77,90* | 60,80 |
| Compostos Fenólicos (mg AG/g de amostra em base seca) | 20,73* | 15,16* | 15,99 |
| Atividade Antioxidante (μM de trolox/ g de amostra) | - | 159,54* | 67,36 |

*Lima, Sanjinez-Argandoña & Kassuya, 2014.

Figuras

Figura 1

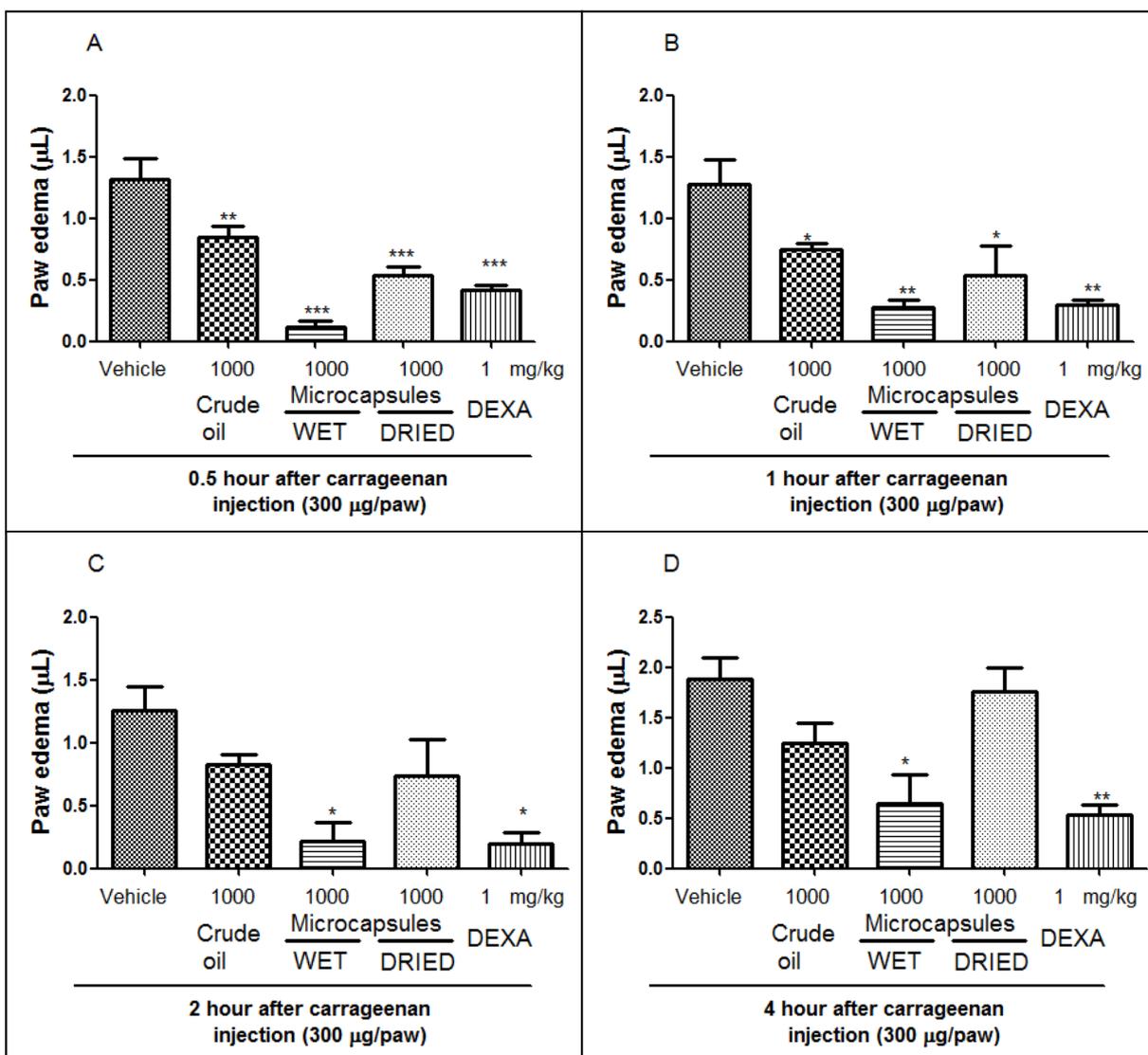
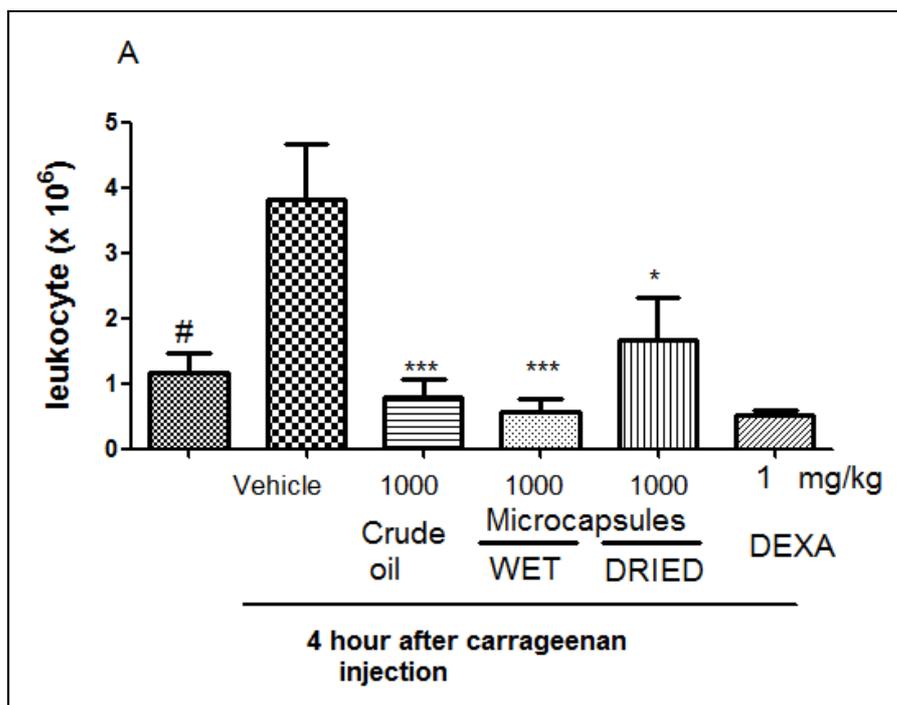


Figura 2



Capítulo IV

Conclusão Geral

Considerando os objetivos propostos e os resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que:

A microencapsulação por coacervação complexa de óleo de bacuri nas condições de processo de 10g de recheio (óleo) para 5 g de polímeros realizados a 60 °C e homogeneização de 18 000 rpm, apresentou rendimento de microcápsulas formadas de 82,55% , com eficiência de encapsulação alta (70,72%) e tamanho de partículas menores que 51 µm, considerando-se o processo eficiente.

A coacervação complexa favoreceu a retenção de 42,46% dos carotenóides, principais compostos biativos presentes no óleo de bacuri e manteve o alto potencial antiradicalar.

A ação anti-inflamatória do óleo microencapsulado úmido e liofilizado de bacuri foi verificada em ratos. A administração oral do óleo e das microcápsulas inibiu de maneira significativa o processo inflamatório em edema de pata e pleura. O óleo microencapsulado manteve a estabilidade do princípio ativo e apresentou ação anti-edematogênica.

Por fim, conclui-se que é possível microencapsular óleo de bacuri utilizando o método de coacervação complexa, uma vez que foi confirmado que os compostos bioativos são mantidos pelo recobrimento da gelatina e goma arábica, verificada pela ação anti-inflamatória, após ingestão oral em ratos.