

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
INSTITUTO DE QUIMICA E BIOTECNOLOGIA

ELENITA MARINHO ALBUQUERQUE BARROS

**Obtenção e caracterização de microencapsulados enriquecidos com polifenóis
extraídos da polpa do maracujá (*Passiflora edulis*)**

MACEIO

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
INSTITUTO DE QUIMICA E BIOTECNOLOGIA



ELENITA MARINHO ALBUQUERQUE BARROS

**Obtenção e caracterização de microencapsulados enriquecidos com polifenóis
extraídos da polpa do maracujá (*Passiflora edulis*)**

MACEIO
2019

ELENITA MARINHO ALBUQUERQUE BARROS

**Obtenção e caracterização de microencapsulados enriquecidos com polifenóis
extraídos da polpa do maracujá (*Passiflora edulis*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, ponto focal Alagoas, Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia, na Área de Concentração: Biotecnologia Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Josealdo Tonholo
Coorientador: Prof. Dr. Ticiano G. Nascimento

MACEIO – AL

2019

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale - CRB4 – 661

- B277o Barros, Elenita Marinho Albuquerque.
Obtenção e caracterização de microencapsulados enriquecidos com polifenóis extraídos da polpa do maracujá (*Passiflora edulis*) / Elenita Marinho Albuquerque Barros. – 2019.
103 f.: il. color.
- Orientador: Josealdo Tonholo.
Coorientador: Ticiano Gomes do Nascimento.
Tese (doutorado na Rede Nordeste de Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. RENORBIO. Maceió, 2019.
- Bibliografia: f. 89-102.
Anexo: f. 103.
1. Nutracêuticos. 2. Microencapsulação. 3. Polifenóis. 4. Maracujá. 5. *Passiflora edulis*. 6. Prospecção tecnológica. I. Título.

CDU: 615.014.6

Folha de Aprovação

ELENITA MARINHO ALBUQUERQUE BARROS

Obtenção e caracterização de microencapsulados enriquecidos com polifenóis extraídos da polpa do maracujá (*Passiflora edulis*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Alagoas, Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia Industrial.

Aprovada em: 01/10/2019.

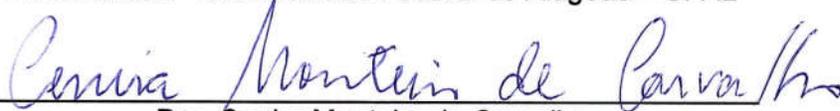
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Josealdo Tonholho
Orientador – Universidade Federal de Alagoas - UFAL



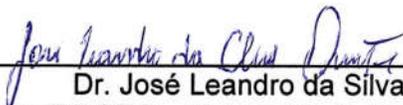
Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento
Coorientador - Universidade Federal de Alagoas – UFAL



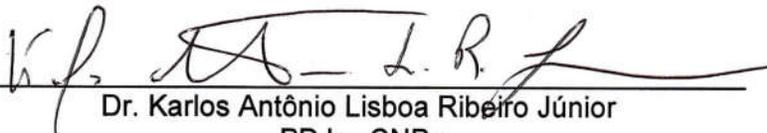
Dra. Cenira Monteiro de Carvalho
PNPD - Capes/PPGQB – Universidade Federal de Alagoas - UFAL



Prof. Dr. Henrique Fonseca Goulart
Universidade Federal de Alagoas - UFAL



Dr. José Leandro da Silva Duarte
PNPD - Capes/PPGEQ – Universidade Federal de Alagoas - UFAL



Dr. Karlos Antônio Lisboa Ribeiro Júnior
PDJr - CNPq

Dedico esse trabalho a todos que de alguma forma foram importantes
para a realização desta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por permitir que eu tivesse disposição e saúde para conduzir este trabalho. Sem sua permissão esse sonho não seria concretizado.

Família,

Obrigada pelo incentivo e por terem depositado em mim a confiança na realização desse doutorado, bem como, pela paciência e compreensão por minhas ausências em diversos momentos.

Orientador,

Meus sinceros agradecimentos ao Professor Dr. Josealdo Tonholo, obrigada pelo incentivo, confiança e pela disposição em me orientar nesse doutorado. Seu apoio foi fundamental para a realização desse doutorado.

Coorientador,

Ao Professor Dr. Ticiano Gomes pela atenção, paciência e sua disposição constante. Obrigada pela confiança depositada em mim. Mesmo diante de várias dificuldades o Senhor sempre acreditou em mim. Sou eternamente grata por toda ajuda e contribuição prestada na realização desse trabalho.

Ao meu amigo Professor Dr. Genildo Cavalcante

Agradeço pela paciência e gentileza como sempre me tratou, muito obrigada pelo apoio e ajuda na correção da escrita desse trabalho. Sem o seu apoio, certamente não teria condições de enfrentar mais essa fase em minha vida profissional.

As queridas Professoras,

Professoras Dr^a. Terezinha Ataíde e Dr^a. Suzana Lima, obrigada pelo apoio constante ao longo desses anos na Universidade. Vocês foram essenciais no meu crescimento profissional, sempre me apoiando desde o mestrado e agora no doutorado.

Em especial,

Agradeço a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho, Professoressa. Dr. Irinaldo Diniz Basilio, Valdemir da Costa Silva, Clarissiane Serafim Cardoso, Marta Maria Conceição, Ramiro Batinga dos Santos, Woodland de Souza Oliveira e Juliana Almerino Silva, agradeço a todos pelas contribuições e ajuda.

E por fim, agradeço a minha amiga Margarete Cabral da Engenharia Química, pelo companheirismo e parceria ao longo desse doutorado.

RESUMO

Os produtos nutracêuticos são suplementos alimentares que contêm a forma concentrada de um ou mais compostos bioativos extraídos dos alimentos, sendo apresentado separadamente da matriz alimentar e utilizado com a finalidade terapêutica, em doses que excedem aquelas que poderiam ser obtidas dos alimentos *in natura*. A concentração dos compostos bioativos extraídos de plantas medicinais, frutas tropicais ou de alimentos funcionais, em microencapsulados representa uma via para utilização desses produtos para fins terapêuticos. Desta forma, objetivou-se neste trabalho a produção de microencapsulados nutracêuticos produzidos a partir de polifenóis extraídos da polpa do maracujá (*Passiflora edulis*). Para produção dos microencapsulados, foi utilizado polpa de maracujá, seguida pela técnica de emulsificação com aditivos nutracêuticos e imediata secagem pela técnica Spray-Dryer, para obtenção das micropartículas. Inicialmente foram testadas três técnicas de emulsificação com aditivos nutracêuticos (preparações 1, 2 e 3), e a preparação que apresentou melhor estabilidade na secagem (preparação 1), foi usada para a otimização com a elaboração das formulações 1, 2 e 3. Os microencapsulados obtidos das formulações, bem como a polpa de maracujá, foram submetidos a caracterização físico-química, por meio da análise térmica, difração de Raio X, análise de infravermelho, tamanho de partícula, quantificação e identificação de fenóis e flavonoides, perfil cromatográfico, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e teste *in vitro*, além da avaliação do potencial antioxidante por meio das análises DPPH, FRAP e ABTS. Para o teste *in vitro*, foi avaliado a ação da polpa do maracujá sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. Os resultados de análise térmica demonstraram que a formulação 2, apresentou melhor estabilidade ao calor, com menor perda de massa. Em relação a difração de RX todas as formulações apresentaram comportamento semelhante. Na análise de infravermelho, a formulação 2 apresentou melhor proteção pelos agentes encapsulantes e na MEV, observou-se de maneira clara o efeito encapsulante nas formulações. No perfil cromatográfico da polpa, observou a presença de ácido clorogênico e apigenina, ambos extraídos com HCl (ácido clorídrico) e EtOAC (acetato de etila). Quanto a capacidade antioxidante da polpa de maracujá, o melhor efeito antioxidante foi demonstrado pelo método DPPH. Quanto aos testes *in vitro*, as avaliações contra o crescimento de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*, indicaram que os microencapsulados com polpa de maracujá apresentam efeito inibitório no crescimento desses microrganismos patogênicos, apresentando potencial terapêutico no combate a infecções. Pode-se constatar que os microencapsulados preparados com gelatina, amido, aerosil, etanol e água (formulação 1 e 2), foram os que apresentaram melhor estabilidade ao processo de secagem, apresentando boa estabilidade térmica e perfil de difração de RX e infravermelho semelhante ao da polpa de maracujá.

Palavras-chave: Nutracêutico. Flavonoides. Prospecção tecnológica. Microencapsulados de maracujá.

ABSTRACT

Nutraceuticals are food supplements that contain the concentrated form of one or more bioactive compounds extracted from food, being presented separately from the food matrix and used for therapeutic purposes at doses exceeding those that could be obtained from *in natura* foods. The concentration of bioactive compounds extracted from medicinal plants, tropical fruits or functional foods in microencapsules represents a route for use of such products for therapeutic purposes. Thus, the objective of this work was the production of nutraceutical microencapsulates produced from polyphenols extracted from passion fruit pulp (*Passiflora edulis*). For the production of the microencapsulates, passion fruit pulp was used, followed by the emulsification technique with nutraceutical additives and immediate drying by the Spray-Dryer technique, to obtain the microparticles. Initially, three emulsification techniques with nutraceutical additives (preparations 1, 2 and 3) were tested, and the preparation that presented better drying stability (preparation 1), was used to carry out with the preparation of formulations 1, 2 and 3. The microencapsules obtained from the formulations, as well as the passion fruit pulp, were submitted to physico-chemical characterization, through thermal analysis, X-ray diffraction, infrared analysis, particle size, quantification and identification of phenols and flavonoids, chromatographic profile, scanning electron microscopy (SEM) and in vitro test, in addition to the evaluation of the antioxidant potential through the DPPH, FRAP and ABTS analyzes. For the in vitro test, the action of passion fruit pulp on the growth of *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* was evaluated. Thermal analysis results showed that formulation 2, showed better heat stability, with lower pasta. In relation to RX diffraction all the formulations presented similar behavior. In the infrared analysis, formulation 2 presented better protection by the encapsulating agents and in SEM, the encapsulating effect in the formulations is clearly evident. In the chromatographic profile of the pulp, it observed the presence of chlorogenic acid and apigenin, both extracted with HCl and EtOAc (ethyl acetate). As for the antioxidant capacity of passion fruit pulp, the best antioxidant effect was demonstrated by the DPPH method. As for the in vitro tests, evaluations against the growth of *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* and *C. albicans*, indicated that the microencapsulated with passion fruit pulp present an inhibitory effect on the growth of these pathogenic microorganisms, presenting therapeutic potential in combat infections. It can be seen that the microencapsules prepared with gelatin, starch, aerosil, ethanol and water (formulation 1 and 2) presented the best stability to the drying process, presenting good thermal stability and RX and infrared diffraction profile similar to of passion fruit pulp.

Keywords: Nutraceutical. Flavonoids. Technological prospecting. Microencapsules of passion fruit.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema do Processo de Secagem em <i>Spray Dryer</i> : obtenção de micropartículas	31
Figura 2 - Propriedades físicas medidas e técnicas relacionadas em análise térmica	33
Figura 3 - Representa um diagrama de um equipamento de termogravimetria genérico	34
Figura 4 - Espectro Eletromagnético e a Excitação Molecular	36
Figura 5 - Redução do radical ABTS por um antioxidante.....	41
Figura 6 - Reação química que descreve a produção de Fe ²⁺ (forma ferrosa) a partir da redução de Fe ³⁺ (forma férrica) presente no complexo com TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina)	42
Figura 7 - Fluxograma de elaboração das formulações	46
Figura 8 - Fluxograma do desenvolvimento da pesquisa	52
Figura 9 - Preparação contendo polpa de maracujá, gelatina, amido, aerosil, água e etanol, após o processo de secagem (PREPARAÇÃO 1).....	54
Figura 10 - Preparação contendo polpa de maracujá, caseína, aerosil, água e etanol, antes do processo de secagem (PREPARAÇÃO 2).....	55
Figura 11 - Preparação contendo polpa de maracujá, gelatina, farinha de inhame, aerosil, água e etanol, após o processo de secagem (PREPARAÇÃO 3)	55
Figura 12 - Curvas termogravimétricas de TG e DTG da polpa de maracujá (PM) ..	57
Figura 13 - Curvas termogravimétricas de TG e DTG da formulação 01 (PF01).....	58
Figura 14 - Curvas termogravimétricas de TG e DTG da formulação 02 (PF02).....	59
Figura 15 - Curvas termogravimétricas de TG e DTG da formulação 03 (PF03).....	60
Figura 16 - Curvas termogravimétricas de TG e DTG do aerosil.....	61
Figura 17 - Curvas termogravimétricas de TG e DTG do amido	61
Figura 18 - Curvas termogravimétricas de TG e DTG da gelatina.....	61
Figura 19 - Comportamento da polpa de Maracujá (a) e das formulações 1, 2 e 3 (b, c e d) mediante a análise de difratometria de raios X - DRX.....	63

Figura 20 - Comportamento da polpa de Maracujá das formulações na análise de DRX.....	63
Figura 21 - Espectro de absorção na região do infravermelho (FTIR) da polpa do maracujá (a) e das formulações 1, 2 e 3 (b, c e d).....	65
Figura 22 - Espectro de absorção na região do infravermelho (FTIR) da formulação 01, 02 e 03 com polpa do maracujá	66
Figura 23 - Espectro de absorção na região do infravermelho (FTIR) do Aerosil.....	67
Figura 24 - Espectro de absorção na região do infravermelho (FTIR) do Amido.....	67
Figura 25 - Espectro de absorção na região do infravermelho (FTIR) do Gelatina ..	67
Figura 26 - Espectro de absorção na região do infravermelho (FTIR) da polpa do maracujá (PM), Aerosil, Amido e Gelatina	68
Figura 27 - Microscopia eletrônica de varredura da formulação 01	69
Figura 28 - Microscopia eletrônica de varredura da formulação 02	69
Figura 29 - Microscopia eletrônica de varredura da formulação 03	69
Figura 30 - Perfil cromatográfico da polpa de maracujá usando diferentes métodos de extração no comprimento de onda de 280nm para detecção de flavonoides.....	72
Figura 31 - Perfil cromatográfico da polpa de maracujá usando diferentes métodos de extração no comprimento de onda de 320nm para detecção de compostos fenólicos e ácidos fenólicos.....	73
Figura 32 - Ácido clorogênico no perfil cromatográfico da polpa de maracujá	74
Figura 33 - Apigenina no perfil cromatográfico da polpa de maracujá.....	74
Figura 34 - Ácido gálico no perfil cromatográfico da polpa de maracujá	75
Figura 35 - Rutina no perfil cromatográfico da polpa de maracujá	76
Figura 36 - Perfil cromatográfico dos microencapsulados da formulação 1 (Ácido gálico e Apigenina).....	76
Figura 37 - Perfil cromatográfico dos microencapsulados da formulação 1 (Rutina e Quercitina).....	77
Figura 38 - Perfil cromatográfico dos microencapsulados da formulação 2 (Ácido gálico e Apigenina).....	77
Figura 39 - Perfil cromatográfico dos microencapsulados da formulação 2 (Rutina e Quercitina).....	78
Figura 40 - Perfil cromatográfico dos microencapsulados da formulação 3 (Ácido gálico, ácido clorogênico e Apigenina)	78

Figura 41 - Perfil cromatográfico dos microencapsulados da formulação 3 (Rutina e Quercitina).....	79
Figura 42 - Concentração de fenóis na polpa de maracujá	80
Figura 43 - Concentração de fenóis de totais das microcápsulas da polpa de maracujá seca por <i>Spray Dryer</i>	81
Figura 44 - Concentração de flavonoides na polpa de maracujá.....	81
Figura 45 - Concentração de flavonoides nas amostras de microencapsulados (Formulações 1 – PF1, 2 – PF2 e 3 – PF3).....	82
Figura 46 - Sequestro de radicais DPPH utilizando polpa de maracujá	83
Figura 47 - Placas utilizadas no ensaio da MIC.....	86
Figura 48 - Formulações utilizadas no ensaio da MIC.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição nutricional em 100 g de fruta fresca	24
Tabela 2 - Seleção da preparação prospectiva das misturas com polpa do maracujá para secagem por <i>Spray Dryer</i>	45
Tabela 3 - Formulações elaboradas a partir da preparação1 para secagem por <i>Spray Dryer</i>	45
Tabela 4 - Rendimento das formulações	56
Tabela 5 - Perdas de massa versos temperaturas da polpa de maracujá	57
Tabela 6 - Perdas de massa versos temperaturas da formulação 1 (01 – PF).....	58
Tabela 7 - Perdas de massa versos temperaturas da formulação 2 (02 – PF).....	59
Tabela 8 - Perdas de massa versos temperaturas da formulação 3 (03 – PF).....	60
Tabela 9 - Microscopia eletrônica de varredura da formulação 01	70
Tabela 10 – Resultado do potencial antioxidante das amostras de polpa de maracujá avaliadas	84
Tabela 11 - Concentração Inibitória Mínima das formulações 1 e 2, e da polpa de maracujá em inibir o crescimento de microrganismos.....	85

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	Geral	17
2.2	Específicos	17
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
3.1	Composições Nutracêuticas	18
3.2	Maracujá	22
3.3	Compostos fenólicos	26
3.4	Microencapsulados	26
3.5	Secagem em <i>Spray Dryer</i>	30
3.6	Análise Térmica	32
3.7	Difração de Raio X	35
3.8	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR	35
3.9	Tamanho de Partículas	37
3.10	Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV	37
3.11	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE	38
3.12	Avaliação do Potencial Antioxidante	39
3.12.1	DPPH.....	39
3.12.2	ABTS	40
3.12.3	FRAP	41
3.13	Ensaio Microbiológicos	42
4	METODOLOGIA	44
4.1	Local de execução	44
4.2	Amostras	44
4.3	Obtenção das composições farmacêuticas, desenvolvimento e identificação dos microencapsulados da polpa do maracujá (<i>Passiflora edulis</i>)	44
4.3.1	Preparação do sistema emulsificante contendo polpa de maracujá	44
4.3.2	Secagem do sistema emulsificante contendo polpa de maracujá usando <i>Spray Dryer</i>	46
4.4	Caracterização físico-química dos microencapsulados	47
4.4.1	Análise Termogravimétricas	47
4.4.2	Difração de Raio-X	47
4.4.3	Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier	47
4.4.4	Microscopia eletrônica de varredura – MEV	48
4.4.5	Determinação do tamanho de partículas	48
4.4.6	Identificação dos flavonoides via HPLC.....	48
4.4.7	Determinação de fenóis e flavonoides	49
4.5	Avaliação da atividade antioxidante por DPPH, ABTS e FRAP	50
4.5.1	Sequestro de radicais livres DPPH.....	50

4.5.2	Método ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico).....	50
4.5.3	Determinação do poder de redução do íon ferro - FRAP (<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>).....	51
4.6	Teste <i>in vitro</i>	51
4.6.1	Concentração Inibitória Mínima	52
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1	Obtenção das composições farmacêuticas, desenvolvimento e identificação dos microencapsulados da polpa do maracujá (<i>Passiflora edulis</i>)	54
5.1.1	Preparação do sistema emulsificante contendo polpa de maracujá	54
5.2	Caracterização físico-química	56
5.2.1	Análises termogravimétricas	56
5.2.2	Análises de difratometria de Raio-X (DRX).....	62
5.2.3	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier	64
5.2.4	Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV	68
5.2.5	Determinação do tamanho de partícula	70
5.2.6	Identificação e determinação de e fenóis e flavonoides na polpa de maracujá por HPLC	71
5.2.7	Determinação de fenóis e flavonoides na polpa de maracujá e nas formulações	79
5.3	Avaliação do potencial antioxidante	83
5.3.1	DPPH.....	83
5.3.2	ABTS e FRAP	84
5.4	Teste <i>in vitro</i>	85
6	CONCLUSÃO	88
	REFERÊNCIAS	89
	ANEXO	102
	ANEXO A – Registro de patente	102

1 INTRODUÇÃO

De acordo com Zeisel (1999), os produtos nutracêuticos são suplementos alimentares que contêm a forma concentrada de um composto bioativo de alimento, apresentado separadamente da matriz alimentar, e utilizado com a finalidade de melhorar a saúde, em doses que excedem aquelas que poderiam ser obtidas de alimentos. Corozzolino (2012) afirma que o termo nutracêutico, já vem sendo utilizado por alguns cientistas no sentido de mostrar o alimento com ação de medicamento, desde o período de Hipócrates (460-370 A.C) que já afirmava para deixar o alimento ser o seu remédio e o remédio seu alimento. Entre os alimentos com potencial nutracêutico no Brasil, destaca-se o maracujá, devido as suas características físico-químicas e por ser um alimento amplamente consumido pela população.

O maracujá é um fruto popular na região norte e nordeste do Brasil, podendo ser uma alternativa de produtos nutracêuticos, devido a sua abundância e sua aceitação no país. Vários estudos indicam a presença de substâncias com potencial funcional no maracujá, como compostos polifenólicos, ácidos graxos poli-insaturados, fibras e outras classes de substâncias, indicando o potencial do maracujá como um alimento funcional (CÓRDOVA et al., 2005; KOBORI; JORGE, 2005; ZERAIK; YARIWAKE, 2010).

Conhecido popularmente como maracujá, o fruto pertence a várias espécies do gênero *Passiflora* (o maior da família Passifloraceae), sendo o nome maracujá, originado da palavra *marajú-ya*, que para os indígenas significa “fruto de sorver” ou “polpa que se toma de sorvo” (ITAL, 1994). Cerca de 90% das 400 espécies deste gênero são originárias das regiões tropicais e subtropicais do globo, sendo o maior foco de distribuição geográfica o centro-norte do Brasil, onde se encontram pelo menos 79 espécies. As espécies de maior interesse comercial no país são *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg., *P. alata* Curtis e *P. edulis* (RUGGIERO, 1987). O termo *flavicarpa*, representa variedades da espécie *P. edulis*. O fruto do maracujá pode ser dividido basicamente em três partes o epicarpo (parte externa), mesocarpo, massa esbranquiçada abaixo do exocarpo e a polpa, denominada endocarpo.

Várias pesquisas têm sido conduzidas mostrando o potencial do maracujá (fruto, casca e semente) para várias finalidades, e a atividade biológica mais

estudada com relação aos frutos do maracujá é sua ação antioxidante (HEIM et al., 2002; ZUCOLOTTO, 2005; KUSKOSKI et al., 2006).

A casca do maracujá é também rica em niacina (vitamina B3), ferro, cálcio e fósforo (GONDIM et al., 2005), e já foram testadas e usadas com sucesso na alimentação animal (TOGASHI et al., 2007). Paiva (1998) demonstrou que o emprego dos resíduos industriais do maracujá (cascas e sementes) na alimentação de bovinos levam os animais a produzirem mais leite, inibindo inclusive problemas digestivos. Foram também verificados os benefícios da farinha de casca de maracujá como redutor da glicêmico no tratamento do Diabete *mellitus* tipo II, sendo o provável mecanismo desta ação a presença de um alto teor de pectina, totalmente degradável no organismo, que ajuda a diminuir a taxa de glicose e colesterol no sangue, sugerindo o uso do extrato seco da casca do maracujá como adjuvante das terapias convencionais.

Diante deste contexto, faz-se necessário a condução de estudos para o preenchimento da lacuna tecnológica em termo da aplicação da polpa do maracujá como elemento ativo de composições nutraceuticas/farmacêuticas para o tratamento e prevenção de doenças, com ações antioxidantes e anti-inflamatórias.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Obter e caracterizar microencapsulados nutracêutico enriquecidos com polifenóis extraídos da polpa do maracujá (*Passiflora edulis*).

2.2 Específicos

- Determinar os marcadores fenólicos por HPLC;
- Determinar a atividade antioxidante (DPPH, ABTS, FRAP) *in vitro* dos polifenóis extraídos da polpa do maracujá;
- Determinar atividade antimicrobiana *in vitro*;
- Obter e quantificar composições nutracêuticas da polpa do maracujá (*Passiflora edulis*);
- Desenvolver microencapsulados a partir de composições obtidas da polpa do maracujá (*Passiflora edulis*);
- Preparar os microencapsulados usando a técnica Spray-Dryer e caracterizá-los através da análise térmica, infravermelho, MEV, DRX, tamanho de partícula, análise de fluorescência.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Composições Nutracêuticas

O termo nutracêutico, vem sendo utilizado por alguns pesquisadores no sentido de mostrar o alimento com ação de medicamento. De acordo com a literatura, nutracêuticos são definidos como composto bioativos (CB), extraídos de alimentos e apresentados na forma farmacêutica, como em cápsulas, comprimidos e/ou tabletes (COZZOLINO, 2012).

Historicamente, a utilização de alimentos com finalidade de redução do risco de doenças teve início no Japão, na década de 1980, por incentivo de cientistas do Ministério da Saúde e Bem Estar daquele país, que, em 1990, criaram a categoria de alimentos denominada FOSHU (*Foods for Specified Health Use*), que tinha como princípio a promoção de alimentos que conferissem mais saúde à população. A definição proposta para essa nova categoria de alimentos foi de “alimentos projetados e processados para suprir funções relacionadas aos mecanismos de defesa do organismo, controle do ritmo corporal e prevenção e recuperação de doenças” (COZZOLINO, 2012).

Em seguida, este conceito de alimentos (que se convencionou chamar de alimentos funcionais) passou a ser discutido em outros países e, em 1995, o ILSI (*International Life Science Institute*) apresentou a primeira definição para estes alimentos que foi aceita mundialmente, sendo definido como alimentos funcionais, aqueles alimentos que melhoram ou afetam a função corporal, além do seu valor nutricional normal, ou seja, alimentos que, além de sua função primordial de nutrir, teriam também características específicas que contribuiriam para redução do risco de doenças (COZZOLINO, 2012). Os alimentos funcionais fazem parte de uma nova concepção de alimentos, lançada pelo Japão na década de 80, através de um programa de governo que tinha como objetivo desenvolver alimentos saudáveis para uma população que envelhecia e apresentava uma grande expectativa de vida (ANJO, 2004).

No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), com o objetivo de definir e regulamentar esta classe de alimentos, constituiu no ano de 1999, uma Comissão de Assessoramento Técnico Científico em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos (CTCAF), com a finalidade de estabelecer normas e

critérios para a comercialização destes alimentos. A definição de alimentos funcionais e novos alimentos proposta por este grupo foi: “Alimentos semelhantes em aparência ao alimento convencional, consumido como parte da dieta usual, capaz de produzir efeitos metabólicos ou fisiológicos demonstráveis, úteis na manutenção de uma boa saúde física e mental, podendo auxiliar na redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis, além de suas funções nutricionais básicas” (COZZOLINO, 2012).

De acordo com Machado et al. (2019), no Brasil, os nutracêuticos, comercializados na forma de cápsulas, por exemplo, devem seguir a Resolução - RDC nº 16 de 1999 ou a RDC nº 2 de 2002 (BRASIL, 1999; BRASIL, 2002). A RDC nº 16 é aplicada para alimentos processados e encapsulados, como é o caso de tomate na forma de cápsulas, e a RDC nº 2 é utilizada para um ingrediente isolado, como licopeno e bioativo do extrato de tomate. Em julho de 2018, a ANVISA publicou uma notícia para regulamentar os suplementos por meio de consultas públicas e, em breve, serão publicadas as novas legislações acerca do assunto (BRASIL, 2018).

Os vários fatores que têm contribuído para o desenvolvimento dos alimentos funcionais são inúmeros, sendo um deles o aumento da consciência dos consumidores, que desejam melhorar a qualidade de suas vidas, e estão optando por hábitos saudáveis. Esses alimentos devem apresentar propriedades benéficas e nutricionais básicas, e se apresentarem na forma de alimentos comuns na alimentação dos consumidores (MORAES; COLLA, 2006).

A diferença entre alimentos funcionais e nutracêuticos, justifica-se devido ao pouco conhecimento destes conceitos pela população, bem como da relação entre dieta e saúde. Dispondo de maiores informações, tanto sobre o efeito benéfico de determinados alimentos, como os maléficos causados pela exposição a inúmeras substâncias inerentes à vida moderna, as pessoas poderão conferir maior importância aos alimentos, contendo substâncias benéficas à saúde. A informação contribui para uma maior aceitação dos alimentos funcionais, diferenciando-os dos nutracêuticos, os quais envolvem todos os tipos de alimentos que possuem algum efeito médico e de saúde (MORAES; COLLA, 2006).

O termo nutracêutico é um alimento ou parte de um alimento que proporciona benefícios médicos e de saúde, incluindo a prevenção e/ou tratamento da doença

(MORAES; COLLA, 2006). Sua ação varia do suprimento de minerais e vitaminas essenciais até a proteção contra várias doenças infecciosas (HUNGENHOLTZ; SMID, 2002). Tais produtos podem abranger desde os nutrientes isolados, suplementos dietéticos na forma de cápsulas e dietas até os produtos benéficamente projetados, produtos herbais e alimentos processados tais como cereais, sopas e bebidas (KWAK; JUKES, 2001a; ROBERFROID, 2002; HUNGENHOLTZ; SMID, 2002; ANDLAUER; FÜRST, 2002). Vários nutracêuticos podem ser produzidos através de métodos fermentativos com o uso de microrganismos considerados como GRAS - *Generally Recognized as Safe* (MORAES; COLLA, 2006).

Os nutracêuticos podem ser categorizados de acordo com o interesse envolvido, ou seja, através da fonte alimentar, mecanismo de ação ou até mesmo de sua natureza química, nas quais se destacam os: microbianos (probióticos), isoprenóides (carotenóides), minerais (cobre, cálcio), compostos fenólicos (isoflavonas), ácidos graxos poli-insaturados (ômega 3), carboidratos e derivados (fibras) (SULERIA et al., 2015). O alvo dos nutracêuticos é significativamente diferente dos alimentos funcionais, por várias razões: a) a prevenção e o tratamento de doenças (apelo médico) são relevantes aos nutracêuticos, enquanto que a redução do risco da doença, e não a prevenção e tratamento da doença estão envolvidos com os alimentos funcionais (MORAES; COLLA, 2006); b) os nutracêuticos incluem suplementos dietéticos e outros tipos de alimentos, os alimentos funcionais devem estar na forma de um alimento comum (KWAK; JUKES, 2001b).

Os alimentos funcionais se caracterizam por oferecer vários benefícios à saúde, além do valor nutritivo inerente à sua composição química, podendo desempenhar um papel potencialmente benéfico na redução do risco de doenças crônicas degenerativas (NEUMANN, et al., 2000; TAIPINA, et al., 2002). Os alimentos e ingredientes funcionais podem ser classificados de dois modos: quanto à fonte, de origem vegetal ou animal, ou quanto aos benefícios que oferecem, atuando em seis áreas do organismo: no sistema gastrointestinal; no sistema cardiovascular; no metabolismo de substratos; no crescimento, no desenvolvimento e diferenciação celular; no comportamento das funções fisiológicas e como antioxidantes (SOUZA, et al., 2003). Uma grande variedade de produtos tem sido caracterizada como

alimentos funcionais, incluindo componentes que podem afetar inúmeras funções corpóreas, relevantes tanto para o estado de bem-estar e saúde como para a redução do risco de doenças (MORAES; COLLA, 2006).

Esta classe de compostos pertence à nutrição e não à farmacologia, merecendo uma categoria própria, que não inclua suplementos alimentares, mas o seu papel em relação às doenças, na maioria dos casos, concentrado mais na redução dos riscos do que na prevenção. Os alimentos funcionais apresentam as seguintes características: a) devem ser alimentos convencionais e serem consumidos na dieta normal/usual; b) devem ser compostos por componentes naturais, algumas vezes, em elevada concentração ou presentes em alimentos que normalmente não os supririam; c) devem ter efeitos positivos além do valor básico nutritivo, que pode aumentar o bem-estar e a saúde e/ou reduzir o risco de ocorrência de doenças, promovendo benefícios à saúde além de aumentar a qualidade de vida, incluindo os desempenhos físico, psicológico e comportamental; d) a alegação da propriedade funcional deve ter embasamento científico; e) pode ser um alimento natural ou um alimento no qual um componente tenha sido removido; g) pode ser um alimento onde a natureza de um ou mais componentes tenha sido modificada; h) pode ser um alimento no qual a bioatividade de um ou mais componentes tenha sido modificada (ROBERFROID, 2002; MORAES; COLLA, 2006).

Os alimentos medicamentos são definidos pela FDC (*Food, Drugs and Cosmetics*) como sendo alimentos formulados para serem consumidos sob a supervisão de um médico (MORAES; COLLA, 2006), sendo usados para fins dietéticos específicos em caso de doença ou condição para qual existam requisitos nutricionais distintos. Estes requisitos devem ser baseados em princípios científicos conhecidos e que sejam estabelecidos por avaliação médica (NOONAN; NOONAN, 2004). De acordo com o Codex Alimentarius, alimentos para fins médicos especiais são definidos como uma categoria de alimentos para usos dietéticos específicos, que são especialmente processados ou formulados e apresentados para o controle dietético de pacientes, podendo ser usados somente sob supervisão médica (MORAES; COLLA, 2006).

Nos EUA, o termo alimento-medicamento é legalmente definido como sendo o alimento formulado para ser administrado inteiramente sob a supervisão de um

médico, que é utilizado para o controle de uma doença ou condição para os quais possui requerimentos nutricionais distintos, baseado em princípios científicos reconhecidos (MORAES; COLLA, 2006). De acordo a FDA (*Food and Drug Administration*), a diferença entre alimentos-medicamentos e alimentos para fins dietéticos específicos, é que os primeiros incluem uma categoria mais estreita de alimentos, usados por pessoas com doenças ou condições particulares, as quais possuem requerimentos nutricionais distintos (MORAES; COLLA, 2006). Os alimentos para fins dietéticos específicos, pertencem a uma categoria mais ampla de alimentos, usados por pessoas com necessidades ou desejos por dietas especiais. Desta forma, como os alimentos-medicamentos necessitam de supervisão médica, e não podem ser incluídos na categoria de alimentos funcionais (KWAK; JUKES, 2001b).

3.2 Maracujá

Entre as espécie do maracujá cultivada no mundo, no Brasil se destaca o maracujá-azedo ou amarelo (*P. edulis* fo. *flavicarpa*), espécie mais cultivada e comercializada no país, devido à qualidade de seus frutos (ZERAİK et al., 2010). O Brasil, ainda se destaca como o maior produtor mundial de maracujá. De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2007), a produção brasileira de maracujá em 2007 foi de 664.286 toneladas, com 47.032 ha de área plantada ou destinada à colheita, concentrada nos estados do Pará, Bahia, Sergipe e São Paulo. No Brasil, o consumo de sucos de frutas, frescos ou industrializados, já é um hábito consolidado e em 2003 o consumo do suco de maracujá representou quase 25% dentre o total de 579 mil litros de sucos de frutas integrais industrializados (PINHEIRO et al., 2006).

De acordo com o IBGE (IBGE, 2019), nos anos de 2016, 2017 e 2018, o País produziu 618.298, 548.088 e 602.651 toneladas de maracujá, respectivamente. O Nordeste se manteve como maior produtor do fruto nos últimos três anos, representando 69,6% da produção nacional no ano de 2016, seguido pela região Sudeste (16,06%) e Norte (10,39%). Conforme o último censo agropecuário realizado pelo IBGE, o Estado de Alagoas ocupa a 10ª posição na produção do fruto, contribuindo com 15.578 toneladas, 2,58% da produção nacional (IBGE, 2019).

O maracujá-roxo (*P. edulis* fo. *edulis*) pode ser consumido em suco ou como fruta fresca, os frutos desse tipo de maracujá são globosos, com 4 a 5 cm de

diâmetro, com casca verde antes da maturação, tornando-se púrpura após iniciado o processo (ZERAİK et al., 2010), sendo muito apreciado na Austrália e na África do Sul, desenvolvendo-se em regiões de clima mais ameno e de elevadas altitudes. O maracujá amarelo apresenta uma série de características consideradas superiores ao maracujá roxo, tais como: maior tamanho do fruto, peso, teor de caroteno, acidez total, resistência a pragas e maior produtividade por hectare (CARVALHO-OKANO et al., 2001; ZIBADI; WATSON, 2004).

O maracujá-doce (*P. alata* Curtis), originário do Brasil é uma fruta ainda pouco conhecida pela maioria da população, tendo sua produção e comercialização restritas, sendo consumida exclusivamente como fruta fresca, devido à sua baixa acidez (ZERAİK et al., 2010). Os frutos do maracujá-doce são ovais ou periformes, e a casca da *P. alata* é intensamente alaranjada, lembrando um mamão papaia. A polpa é adocicada, odor forte e agradável, mas enjoativa quando utilizada na forma de suco (MELETTI, 1996).

De acordo com Borrmann et al. (2013), o maracujá é rico em vitamina C, vitaminas B1 e B2 e a pró-vitamina A, β - caroteno, bem como minerais como K, P, Ca, Fe e fibras. Em 100g de maracujá, pode ser encontrado 75,8% de água, 63 kcal, 9,5g de carboidratos, 0,4g de lipídios, 2,4g de proteínas, 1,5g de fibra alimentar, 3,9g ácidos orgânicos e 0,9g de minerais (SOUCI et al., 2008). No suco pode ser encontrado 40mg de minerais, em 100mL do produto (SUNTORNUSUK et al., 2001).

Diversos estudos têm demonstrado a capacidade do maracujá em atuar como um alimento funcional e/ou nutracêutico, devido a presença de substâncias polifenólicas, ácidos graxos poli-insaturados e fibras em sua composição (KOBORI; JORGE, 2005; CÓRDOVA et al., 2005; ZERAİK et al., 2010; ZERAİK; YARIWAKE, 2010). A composição nutricional em 100g de fruta fresca, de duas espécies de maracujá (*P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. edulis*) é detalhado na tabela 1.

Tabela 1 - Composição nutricional em 100 g de fruta fresca

Componentes	<i>P.edulis f. flavicarpa</i> ¹	<i>P. edulis</i> ²
Umidade (%)	72,20	75,10
Proteínas (g)	3,00	2,20
Gordura (g)	0,12	0,70
Glucose (%) ³	38,10	37,10
Frutose (%) ³	29,40	33,50
Sucrose (%) ³	32,40	29,40
Fibras (%)	12,80	0,04
Ácido cítrico (meq) ³	13,10	55,00
Ácido málico (meq) ³	10,55	3,86
Ácido láctico (meq) ³	0,58	7,49
Ácido malônico (meq) ³	0,13	4,95
Ácido succínico (meq) ³	Traços	2,42
Cinzas (%)	0,50	0,80
Sódio (mg)	8,00	28,00
Potássio (mg)	208,00	348,00
Cálcio (mg)	6,80	13,00
Ferro (mg)	0,60	1,60
Fósforo (mg)	63,80	64,00
Magnésio (mg)	28,00 ⁴	17,00 ⁵
Zinco (mg)	0,60 ⁴	0,10 ⁵
Cobre (mg)	0,19 ⁴	0,10 ⁵
Vitamina A (U.I)	200,00	700,00
Tiamina (mg)	Traços	Traços
Riboflavina (mg)	0,10	0,10
Niacina (mg)	1,50-2,20	1,50
Ácido ascórbico (mg)	22,00	30,00

Fonte: ¹ROMERO-RODRIGUEZ et al. (1994); ²MORTON (1987); ³CHAN et al. (1972); ⁴KIDOY et al. (1997); ⁵ZIBADI; WATSON (2004); ZERAIK et al. (2010).

De acordo com Ramos (2004), o extrato seco da casca de maracujá amarelo exerce uma ação positiva sobre o controle glicêmico no tratamento da diabetes mellitus tipo II, sendo o provável mecanismo desta ação a presença de um alto teor de pectina, totalmente degradável no organismo, que ajuda a diminuir a taxa de glicose e colesterol no sangue, sugerindo o uso do extrato seco da casca do maracujá como adjuvante das terapias convencionais. Agra et al. (2007), em extenso levantamento sobre as plantas medicinais mais utilizadas no nordeste brasileiro, evidenciaram que o mesocarpo seco e pulverizado de *P. edulis* (variedade não especificada) já é utilizado popularmente contra o diabetes.

Em um estudo clínico piloto, verificou-se que o tratamento com a farinha da casca do maracujá (*P. edulis* fo. *flavicarpa*) resultou na diminuição dos níveis de colesterol em mulheres entre 30 e 60 anos que apresentavam hipercolesterolemia (colesterol \geq 200 mg/dL) (RAMOS et al., 2007). Ichimura et al. (2006) demonstraram o efeito anti-hipertensivo do extrato metanólico da casca de *P. edulis* (variedade não especificada) em ratos naturalmente hipertensos. Este efeito foi atribuído

principalmente ao ácido γ -aminobutírico (GABA) e parcialmente à ação vasodilatadora dos polifenóis, principalmente da luteolina (ZERAİK et al., 2010).

O efeito anti-hipertensivo do extrato da casca de maracujá roxo (mistura de bioflavonoides, ácidos fenólicos e antocianinas) foi investigado em um modelo experimental com 24 ratas naturalmente hipertensas e com mulheres naturalmente hipertensas (ZIBADI et al., 2007). O efeito dos extratos nas mulheres e ratas naturalmente hipertensas foi avaliado por meio da medida da pressão sanguínea. Observou-se diminuição significativa na pressão sanguínea em ambos os experimentos, sendo que os pacientes não apresentaram nenhum efeito colateral, sugerindo que o extrato possa ser uma alternativa segura no tratamento de hipertensão.

Watson et al. (2008) estudaram pacientes com asma durante quatro semanas, administrando extratos de cascas de maracujá roxo ou pílulas placebo, para posterior comparação. Os efeitos dos extratos foram avaliados por meio dos sintomas clínicos da asma e testes espirométricos. Os autores constataram que o extrato da casca do maracujá roxo, administrado por via oral em seres humanos, melhorou os sintomas clínicos da asma, como, diminuição do chiado no peito e tosse e causou uma melhora em relação à falta de ar, os pacientes não apresentaram efeitos colaterais.

A produção e comercialização do suco de maracujá tem enfrentado muitas dificuldades em relação ao transporte e vida de prateleira (BORRMANN et al., 2013). Já a fruta, também enfrenta problemas de comercialização, por se deteriorar facilmente. De acordo com o IAC (2011), as concentrações de 14° Brix para natural suco e 50° Brix para suco concentrado são considerados seguros para comercialização. Uma tecnologia promissora para conservação e o aumento do prazo de validade é a microencapsulação, sendo definida como a embalagem de produtos sólidos e líquidos em cápsulas seladas de tamanhos entre nanômetros e milímetros.

A embalagem dos microencapsulados, isola e protege o material de condições ambientais, como luz, temperatura, oxigênio, umidade e da interação com outras substâncias. Se desejado, o material pode ser liberado das cápsulas de forma controlada e sob condições específicas (DZIEZAK, 1988; RISCH, 1995; RÉ, 1998). Por outro lado, o ambiente também pode ser protegido de material encapsulado

tóxico o que poderia ser um risco para a saúde. A microencapsulação também protege o material da evaporação (JACKSON; LEE, 1991).

3.3 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos englobam uma classe de compostos que inclui uma diversidade de estruturas, simples ou complexas, que possuem no mínimo um anel aromático no qual, ocorre pelo menos a substituição de um hidrogênio por um grupamento hidroxila. Esses compostos são amplamente estudados devido à sua influência na qualidade dos alimentos, englobando uma gama enorme de substâncias, entre elas, os ácidos fenólicos (MARTINS; NICOLETTI, 2016). Os polifenóis também fazem parte do metabolismo animal, especificamente, nos microrganismos, e estão distribuídos amplamente no reino vegetal (SOARES, 2002; MELLO, et al., 2007). Dentre os compostos bioativos nos vegetais, os polifenóis estão no maior grupo, dividindo-se em classes de acordo com a estrutura química de cada substância possuindo, em geral, características ácidas. Esses compostos são instáveis, ou seja, os fenóis são facilmente oxidados, principalmente, em meio básico (MELLO, et al., 2007; FALLER; FIALHO, 2009).

Podem ser classificados segundo o tipo do esqueleto principal, em: fenóis simples, benzoquinonas, ácidos fenólicos, acetofenonas, ácidos fenilacéticos, fenilpropanóides (ácido cinâmico e compostos análogos, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas e cromonas), naftoquinonas, xantonas, estilbenos, antraquinonas, flavonoides, isoflavonoides, lignanas, diflavonoides, melaninas vegetais, ligninas, taninos hidrolisáveis e condensados (MARTINS; NICOLETTI, 2016).

De acordo com a ocorrência destes compostos no reino vegetal, outra classificação para os polifenóis pode ser adotada. Os polifenóis amplamente distribuídos (derivados de ácidos benzoicos e de ácidos cinâmicos, cumarinas, flavonoides e derivados de polimerização - taninos, ligninas), e os compostos fenólicos de distribuição restrita (MARTINS; NICOLETTI, 2016).

Segundo Martins e Nicoletti (2016), os polifenóis ainda podem apresentar outra classificação, os flavonoides (catequinas, epicatequinas, flavonóis (casca: miricetina, quercitina), antocianoides - casca) e os não flavonoides (ácido benzoico, ácido hidrociânico, estilbeno (resveratrol), ácido cafeico ou caftárico, ácido cutárico, ácido fertárico e ácido sinápico). A atividade antioxidante em sucos é atribuída aos

polifenóis, principalmente aos flavonoides (HEIM et al., 2002). Esses compostos são responsáveis por dar pigmentação aos vegetais, como forma de proteção ao ataque de predadores, atuando também na formação do sabor e aroma característicos de algumas plantas

3.4 Microencapsulados

Os diferentes compostos antioxidantes, como a vitamina C, vitamina E, carotenóides e polifenóis, presente nas frutas, tem atraído ultimamente grande interesse devido ao seu potencial efeito na prevenção dos processos degenerativos de câncer, doenças cardiovasculares e doenças cerebrovasculares em humanos (ORREGO et al., 2013).

Os compostos fenólicos presentes nas frutas, incluem milhares de compostos com diferentes estruturas e compreendem ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos e lignanas. Além do potencial anti-inflamatório, antibacteriano e antiviral, muitos deles são antioxidantes mais fortes do que as vitaminas com potencial antioxidantes (FANG; BHANDARI, 2010).

O composto dominante no polifenol subgrupo de ácidos hidroxí e metoxibenzóicos é o ácido gálico (3,4,5-ácido tri-hidroxibenzóico), normalmente encontrado nos tecidos vegetais em forma de éster e é amplamente distribuído em frutas e plantas (DEWICK; HASLAM, 1969). Segundo Sun et al. (2002), morangos, casca de carvalho, chá verde, cascas de maçã, uvas, abacaxi, banana, limão, vinho tinto e branco, avelã são alguns dos produtos naturais que são ricos em ácido gálico. A eficácia dos polifenóis depende da sua estabilidade nos alimentos processamento e armazenamento, que é paradoxalmente pobre devido ao seu poder antioxidante, além de sua biodisponibilidade fenólica ser afetada negativamente pelas condições do trato gastrointestinal (ORREGO et al., 2015). Essas são algumas das razões pelas quais as concentrações de polifenóis que parecem eficazes *in vitro* são muitas vezes uma ordem de magnitude superior aos níveis medidos *in vivo* (FANG; BHANDARI, 2010; MUNIN; LEVYS, 2011), portanto, o uso de polifenóis encapsulados em vez de compostos livres pode superar essas dificuldades.

Nos sistemas alimentares, a microencapsulação pode ser utilizada para ácidos, lipídios, enzimas, microorganismos, vitaminas, minerais, agentes de crescimento e corantes (BAKAN, 1973; POTHAKAMURYE; BARBOSA-CÁNOVAS,

1995). O encapsulamento, é um processo de aprisionamento do composto ativo em partículas, podendo ser alcançado através de várias técnicas, tais como spray de secagem, spray de resfriamento/refrigeração, extrusão, revestimento de leito fluidizado, coacervação, aprisionamento de lipossomas, complexação de inclusão, centrifugação separação por suspensão, secagem por congelação ou por vácuo, cocristalização, nanoencapsulação, inclusão molecular e emulsão.

Entre as técnicas de encapsulação, a secagem por pulverização é a mais utilizada na indústria alimentos, sendo mais econômica, flexível e permite uma operação contínua (FANG; BHANDARI, 2010). A técnica de microencapsulação por spray de secagem é amplamente utilizada nas indústria de alimentos, uma vez que é um método bastante barato (GOUIN, 2004).

A liofilização é um processo de secagem para a preservação a longo prazo de alimentos e outros materiais biológicos baseados nos fenômenos da sublimação. Um processo de liofilização bem-sucedido preserva a maior parte das propriedades iniciais da matéria prima, tais como forma, dimensões, aparência, sabor, cor, textura e atividade biológica (CEBALLOS et al., 2012). Exemplos diferentes de encapsulamento de polifenol de fruta, incluindo liofilização e secagem por pulverização, pode ser encontrado em várias pesquisas (FANG; BHANDARI, 2010; MUNIN; LEVYS, 2011; MURUGESAN; ORSAT, 2012).

Existem muitos métodos de encapsulamento, cuja a diferença consiste na combinação do material encapsulante e do núcleo, que pode ser de natureza física, química ou físico-química (SHAHIDI; HAN, 1993; GOUIN, 2004). Os materiais utilizados para o design da capa protetora de encapsulados deve ser de comestíveis, biodegradável e capaz de formar uma parede ou barreira entre a fase interna e seu entorno (NEDOVIC et al., 2011).

O agente de encapsulamento não deve reagir com o núcleo. Os materiais mais comuns usados para microencapsulação por spray-drying são gomas, como goma arábica (GA), carboidratos de baixo peso molecular como maltodextrinas e sacarose, celulose, gelatina, lípidos e proteínas, como as proteínas de soja (GHARSALLAOUI et al., 2007; FÄLDT; BERGENSTÄHL, 1995; HOGAN et al., 2001; KIM; MORR, 1996; KEOGH et al., 2001; LIN et al., 1995).

As matrizes de carboidratos aumentam a temperatura de transição vítrea do produto seco, capturando assim o composto ativo em uma fase vítrea que o protege

contra a temperatura, viscosidade, colapso e alterações enzimáticas ou químicas, como oxidação (MUNIN; LEVYS, 2011). O amido derivado de n-octenilsuccinato, amido modificado, é um material comum para microencapsulação na indústria de alimentos. Sua modificação consiste na adição de um componente lipofílico, octenilsuccinato, que aumenta a estabilidade da emulsão (ARBURTO et al., 1998). O amido derivado de n-octenilsuccinato é utilizado pela indústria alimentar e farmacêutica com aprovação de o FDA como aditivo alimentar desde o conteúdo de octenilsuccinato não excede 3% (BASTOS et al., 2009).

A maltodextrina (MD) é um amido hidrolisado que é amplamente usado no encapsulamento de compostos bioativos para protegê-los de mudanças oxidativas e efeitos de temperatura (RAMIREZ et al., 2015). Geralmente é uma opção de baixo custo, mas tem baixa capacidade de emulsificação. A goma arábica é um complexo heteroglicano com uma estrutura altamente ramificada consistindo de uma cadeia principal formada por unidades de D-galactopiranosose unidas por ligações β -D-glicosídicas (1 \rightarrow 3) (WHISTLER; DANIEL, 1990).

A goma arábica apresenta muitas características desejáveis, como um bom material de parede para secar nas técnicas de encapsulamento, e um aumento na temperatura de transição do vidro. Também confere alta solubilidade, baixa viscosidade e boas propriedades emulsionantes para alimentar dispersões (RAMIREZ et al., 2015). No entanto, usar como material de parede para encapsulamento é restrito, por causa de seu custo e sua oferta variada e limitada (RAMIREZ et al., 2015). Materiais de parede podem ser combinados em busca de um portador mais eficiente e estável. A maltodextrina/pectina (MD/PE) foi estudada para o encapsulamento de extratos de polifenóis por secagem por pulverização. A matriz MD/PE foi capaz de mascarar o odor desagradável dos extratos e o produto foi rapidamente solúvel na água (SANSONE et al., 2011)

A maioria dos estudos sobre o encapsulamento de polifenóis levam em consideração no processo de encapsulamento a utilização de determinados extratos naturais (concentrados ou não) diferentes técnicas e/ou materiais de parede (RAMIREZ et al., 2015). Esta especificidade dificulta estimar se a seleção de um determinado procedimento pode ser adequada para outra matéria-prima.

3.5 Secagem em *Spray Dryer*

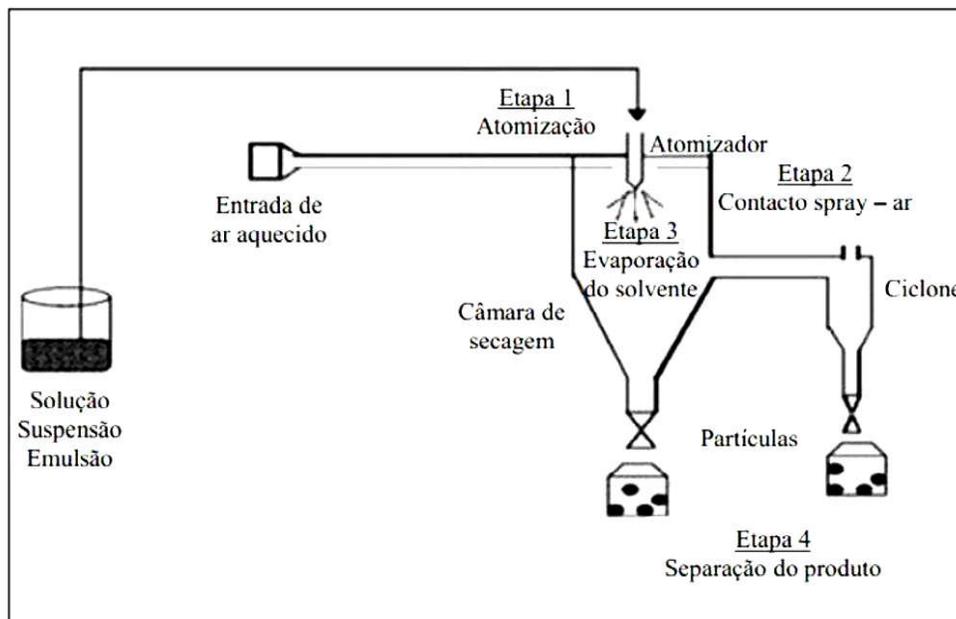
A técnica de secagem por *Spray Dryer*, também denominada secagem por atomização ou pulverização, é um processo que consiste na transformação de materiais em estado líquidos ou semissólidos (soluções, suspensões, géis ou pastas) em produto seco, utilizando para isso um único processo de secagem (ESTEVES, 2006). Durante o processo no *Spray Dryer* a vaporização da parte líquida da amostra é possível acontecer a partir do contato com uma corrente ar, levando a desintegração da corrente líquida (atomização), que é projetada por um bico aspersor dentro de uma câmara normalmente cônica, desta aspersão surgem pequenas gotículas que entram em contato com uma corrente de ar quente, suficiente para tal vaporização, obtendo no final do processo um material sólido (pó) (ALMEIDA, 2017).

O processo de secagem por atomização é dividido em quatro etapas (ESTEVES, 2006):

- a) Espalhamento do líquido em gotículas, aumentando área de superfície de contato. Este depende do tipo de bico atomizador (rotativo ou por bocal);
- b) Vaporização do líquido por contato com ar quente em um curto intervalo de tempo, gerando calor suficiente para evaporação;
- c) Evaporação do líquido, que depende diretamente dos fatores: tempo e temperatura do ar;
- d) Coleta do produto seco.

Na figura 1, é possível observar um esquema do processo de secagem em *Spray Dryer*, para obtenção de micropartículas.

Figura 1 - Esquema do Processo de Secagem em *Spray Dryer*: obtenção de micropartículas



Fonte: Adaptado de Swati (2014).

A secagem de produtos em spray-dryer se aplica em várias áreas e processos. Na indústria de alimentos produtos como leite, soro, ovos, caldos e sucos, são processados buscando uma maior vida de prateleira (GOULA; ADAMOPOULOS, 2005). Já na indústria farmacêutica a secagem por spray-dryer vem sendo empregada na microencapsulação de produtos farmacologicamente ativos, sejam eles sintéticos ou de origem natural. Essa encapsulação ajuda a mascarar sabor e aroma desagradáveis além de proteger produtos voláteis ou fotossensíveis, levando uma maior estabilidade para estes produtos (BRUSCHI et al., 2003).

Yoshii (2001) relata em seu trabalho que com a encapsulação por *Spray Dryer* é possível obter formulações com liberação controlada e liberação em locais específicos. A técnica de microencapsulação consiste no aprisionamento de um componente biologicamente ativo ou de caráter funcional numa matriz sólida. Este processo possui algumas vantagens, tais como a proteção do material ativo e o baixo custo de aplicação (ONEDA, 2003). A utilização da microencapsulação em *spray dryer* no intuito de melhorar características de diversos produtos, é relatada no

estudo de Ascheri et al. (2003). Neste trabalho os pesquisadores utilizaram a técnica no intuito de melhorar a solubilidade de óleos extraídos da casca de frutas cítricas.

No que se refere a pesquisa na área da indústria farmacêutica muitos estudos têm aplicado a técnica de *Spray Dryer* para incorporar fármacos insolúveis em matrizes de caráter anfipático (SHAPIRA, 2012). A microencapsulação também vem sendo aplicada para direcionar o fármaco para um determinado tecido orgânico, como no estudo proposto por Raffin e colaboradores (2006), o qual teve como objetivo reduzir o efeito do pH ácido sobre a degradação do pantoprazol, fármaco utilizado no tratamento de úlcera gástrica. Como o pantoprazol necessita ser ativado dentro das células parietais gástricas, por meio de ligação irreversível com a bomba de H⁺/K⁺ ATPase, ele precisa ser absorvido de forma intacta pelo trato gastrointestinal (TGI) e uma alternativa foi o revestimento por matriz, utilizando microencapsulação pela técnica de *Spray Dryer*.

3.6 Análise Térmica

Os microencapsulados podem sofrer mudanças ao ser exposto a uma fonte de calor. O calor retirado ou fornecido a esses materiais, podem promover mudanças úteis e industrialmente importantes, assim como podem provocar a deterioração e queima, não sendo desejável. Por isso é importante entender e estudar as mudanças térmicas de determinados compostos, assim como os limites de temperatura aos quais podem ser submetidos sem que se comprometa as suas propriedades (DENARI; CAVALHEIROS, 2012).

O conhecimento das propriedades térmicas pode levar à melhora de processos de moldagem, transporte, conservação e até melhorar as aplicações de determinados compostos e materiais. No caso de decomposição é útil saber quais são os produtos voláteis e os resíduos gerados, em relação à sua ação biológica ou ambiental. Quando uma amostra é aquecida, podem ocorrer mudanças químicas ou físicas em sua estrutura, dependendo se o calor térmico é menor ou maior que as energias de suas ligações, respectivamente (DENARI; CAVALHEIROS, 2012).

A termogravimetria é uma técnica na qual é possível avaliar a variação de massa de uma dada amostra em relação a temperatura ou tempo de aquecimento, para isso é utilizado programa controlado de temperatura. A análise térmica se constitui de um conjunto de técnicas, cada uma com a habilidade de acompanhar

uma propriedade física específica. Dentre as técnicas difundidas e utilizadas observa-se: a Termogravimetria (TG), Termogravimetria Derivada (DTG), Análise Térmica Diferencial (DTA), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Detecção de gás desprendido (EGA) e Análise termomecânica (TMA). Estas técnicas permitem obter informações com respeito à: variação de massa, estabilidade térmica; água livre e; água ligada; pureza, ponto de fusão, ponto de ebulição, calores de transição, calores específicos, diagramas de fase, cinética da reação, estudos de catalisadores e transições vítreas (DENARI; CAVALHEIROS, 2012).

Na figura 2, observa-se as propriedades físicas medidas e técnicas relacionadas em Análise Térmica.

Figura 2 - Propriedades físicas medidas e técnicas relacionadas em análise térmica

Técnica	Abreviatura	Propriedade	Usos
Análise Termogravimétrica	TGA	Massa	Decomposição Desidratação Oxidação
Termogravimetria Derivada	DTG		
Análise Térmica Diferencial	DTA	Temperatura	Mudança de fase Reações
Calorimetria Exploratória Diferencial	DSC	Entalpia	Capacidade de calor Mudança de fase Reações Calorimetria
Análise Termomecânica	TMA	Deformação	Mudanças mecânicas Expansão
Análise Dinâmico Mecânica	DMA	Propriedades Mecânicas	Mudança de fase Cura de polímero
Análise de gás envolvido	EGA	Gases	Decomposição Catálise e reação de superfície
Termoptometria	-	Ótica	Mudança de fase Reações de superfície Mudanças de coloração

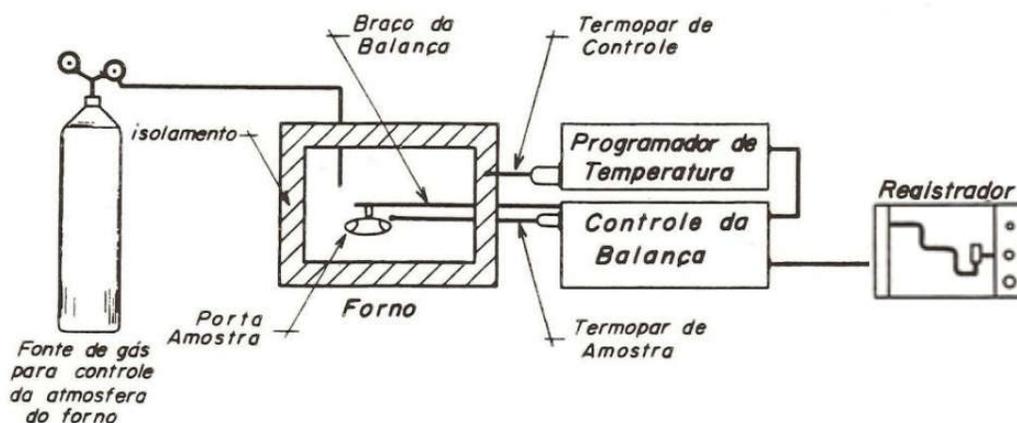
Fonte: Adaptado de DENARI e CAVALHEIROS (2012).

A Análise Termogravimétrica (TGA) pode ser dita como: A técnica termoanalítica que acompanha a variação da massa da amostra, em função da programação de temperatura. É a técnica termoanalítica que acompanha a perda e/ou ganho de massa da amostra em função do tempo ou temperatura. Já a

Termogravimetria Derivada (DTG), nada mais é do que um arranjo matemático, no qual a derivada da variação de massa em relação ao tempo (dm/dt) e é registrada em função da temperatura ou tempo. Em outras palavras, a DTG é a derivada primeira da TGA (DENARI; CAVALHEIROS, 2012).

Pode-se dizer que o equipamento da análise termogravimétrica é composto basicamente pela termobalança. O equipamento pode mudar de configuração de um fabricante para outro, mas os fundamentos de todos são os mesmos. A termobalança é um instrumento que permite a pesagem contínua de uma amostra em função da temperatura, ou seja, à medida que ela é aquecida ou resfriada. Os principais componentes de uma termobalança são: balança registradora, forno, suporte de amostra e sensor de temperatura, programador de temperatura do forno, sistema registrador e controle da atmosfera do forno, conforme observado na figura 3.

Figura 3 - Representa um diagrama de um equipamento de termogravimetria genérico



Fonte: DENARI e CAVALHEIROS (2012)

O dispositivo encontrado no equipamento permite aquecer e medir simultaneamente a massa do analito. Podendo ainda, em algumas situações, acoplar o aparelho a um sistema que possibilite detectar e analisar produtos voláteis (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Geralmente a razão de aquecimento pode atingir de $1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até $100^{\circ}\text{C min}^{-1}$ dependendo do fabricante. A temperatura final vai depender do forno, podendo chegar a, até, 2000°C . A sensibilidade é da ordem de $0,1\mu\text{g}$, geralmente com capacidade de até 1g (DENARI; CAVALHEIROS, 2012).

3.7 Difração de Raio X

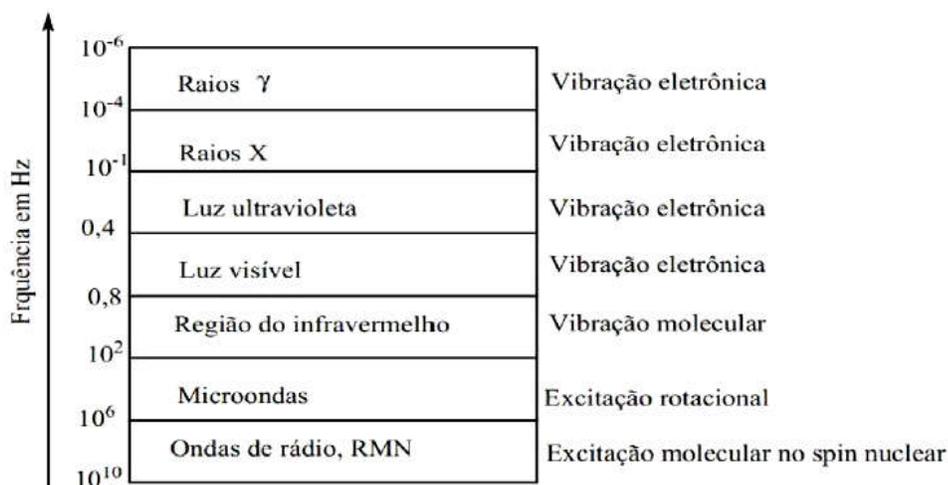
A ocorrência do fenômeno de difração depende de aspectos geométricos do cristal, isto é, da rede cristalina, e da disposição relativa do cristal com respeito à radiação incidente. Esses fatores geométricos são as distâncias interatômicas, o grupo espacial que caracteriza a simetria do cristal e o comprimento de onda da radiação incidente (SANTOS, 2006).

A difração é um fenômeno que ocorre com as ondas quando elas passam por um orifício ou contornam um objeto cuja dimensão é da mesma ordem de grandeza que o seu comprimento de onda. Por volta de 1912, Max Von Laue concebeu a possibilidade de realizar difração de raios X, utilizando uma estrutura cristalina como rede de difração tridimensional. As primeiras experiências foram realizadas por dois alunos de Laue, Walter Friedrich e Paul Knipping. Um ano depois, William Henry Bragg (1913) apresentou uma explicação simples para os feixes de raios-X difratados por um cristal. Ele supôs que as ondas incidentes são refletidas especularmente (o ângulo de incidência é igual ao ângulo de reflexão) por planos paralelos de átomos no interior do cristal, sendo que cada plano reflete somente uma pequena fração da radiação. Os feixes difratados são formados quando as reflexões provenientes dos planos paralelos de átomos produzem interferência construtiva (SANTOS, 2006).

Dentre as vantagens da técnica de difração de raios X para a caracterização de fases, destacam-se a simplicidade e rapidez do método, a confiabilidade dos resultados obtidos (pois o perfil de difração obtido é característico para cada fase cristalina), a possibilidade de análise de materiais compostos por uma mistura de fases e uma análise quantitativa destas fases (ALBERS et al., 2002).

3.8 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR

A radiação infravermelha dentro do espectro eletromagnético encontra-se situada entre as regiões do visível e das micro-ondas (Figura 4), sendo a porção denominada infravermelho médio (4000 cm^{-1} – 400 cm^{-1}) a de maior importância para a análise de grupos funcionais de estruturas orgânicas (BRUICE, 2006).

Figura 4 - Espectro Eletromagnético e a Excitação Molecular

Fonte: Adaptado de Bruice (2006)

Quando a radiação infravermelha (IV), em frequência menor que 100 cm^{-1} for absorvida por moléculas orgânicas, esta radiação é convertida em energia de rotação molecular. Como consequência, o processo de absorção é quantizado e o espectro de rotação das moléculas são gerados em forma de linhas (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1994).

Para Bruice (2006), o princípio da técnica diz que, quando a amostra a ser analisada é colocada em contato com a radiação do IV, essa radiação atravessa a amostra e a radiação transmitida é então comparada com aquela transmitida na ausência de amostras. O espectrômetro registra estes resultados em forma de bandas de absorção. Ainda de acordo com Bruice (2006) quando se deseja um espectrômetro de maior sensibilidade usa-se um com transformada de Fourier (FTIR), este emprega um interferômetro de Michelson, que tem por finalidade dividir o feixe de radiação da fonte de IV de maneira que ele reflita simultaneamente a partir de um espelho em movimento e de um espelho fixo. Quando refletidos, os feixes voltam a se combinarem e ultrapassam as amostras chegando ao detector, sendo gerados na forma de gráfico de tempo contra a intensidade do sinal conhecido como interferograma.

3.9 Tamanho de Partículas

Ter o conhecimento das dimensões dos produtos sólidos particulados é de fundamental importância quando o objetivo é a produção de pó para aplicação terapêutica. O tamanho das partículas é um dos parâmetros que deve ser levado em consideração no momento da obtenção e caracterização destes produtos, pois afetam diretamente na escolha da forma farmacêutica na qual o fármaco vai se apresentar (AULTON, 2005).

Ainda de acordo com Aulton (2005), em escala magistral, o tamanho das partículas é um parâmetro que pode, por exemplo, influenciar no enchimento de cápsulas. Variações de tamanho interfere no volume que determinado pó ocupa dentro de uma cápsula, comprometendo lotes e conseqüentemente a terapêutica desejada. O tamanho das partículas também influencia em um outro parâmetro importante que deve ser levado em consideração na obtenção de formas farmacêuticas sólidas.

3.10 Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) é muito usada rotineiramente por ser um instrumento de alta versatilidade para análise microestrutural de materiais sólidos. Dentre os diversos campos de aplicação podemos destacar: engenharia e ciências de materiais, engenharia metalúrgica, ciências biológicas, ciências farmacêuticas, dentre outras (ALMEIDA, 2017). Como princípio a técnica atua através da interação de um fino feixe de elétrons focalizado sobre a área ou microvolume a ser analisado, gerando assim uma série de sinais que são utilizados para caracterizar as propriedades das amostras, tais como composição, superfície topográfica e cristalografia. Isso é possível ser feito devido ao aumento máximo conseguido pelo MEV, que fica entre o microscópio óptico (MO) e o microscópio eletrônico de transmissão (MET) (KAHN, 2001).

Como vantagem, o MEV apresenta alta resolução, na ordem de 2 a 5 nm (20 –50 A°). Diferente do MO que possui resolução de 0,5 µm. Já a vantagem em relação ao MET é a facilidade de preparar as amostras (MALISKA, 2000).

3.11 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma técnica de separação que nos últimos trinta anos, passou a ser um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos (SANTOS, 2010). As razões para esse crescimento estão relacionadas à sua adaptabilidade para determinações quantitativas com boa sensibilidade e a possibilidade de separar espécies não voláteis e termicamente instáveis (TONHL et al., 2002).

A CLAE consiste em um método físico-químico de separação, que ocorre através de diferentes interações entre as substâncias presentes em uma mistura e na interface entre dois ambientes químicos imiscíveis: a fase estacionária e a fase móvel (SANTOS, 2010). Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes componentes (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997). A técnica da CLAE, pode ser efetuada mantendo-se a composição da fase móvel constante durante toda a análise cromatográfica, que é denominada modo isocrático. Quando necessária a utilização de solventes de diferentes polaridade e porcentagens destes em misturas, denomina-se como modo por gradiente, tendo como vantagem análises mais rápidas, melhores separações e maior simetria nos picos, em contraste à eluição isocrática, que pode tomar muito tempo com forma de picos nem sempre adequados (MEYER, 1993).

Essa técnica apresenta diversas vantagens para a quantificação de marcadores químicos tais como: eficiência na separação, alta reprodutibilidade, linearidade, automação e habilidade em analisar vários compostos em um único método (HE, 2000; DRASAR; MORAVCOCA, 2004). Porém para a caracterização e quantificação de marcadores químicos em amostras complexas requer a utilização desta técnica cromatográfica com a detectores apropriados que aumentem consideravelmente a seletividade e a sensibilidade na análise das substâncias de interesse (SANTOS, 2010). Um detector é um transdutor que converte uma mudança de concentração na fase móvel eluente num sinal, que poderá ser registrado por um processador de dados ou por um registrador conveniente (SANTOS, 2010). A interpretação desse registro produz dados qualitativos e

quantitativos sobre a amostra e seus constituintes (HOSTETTMAN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003).

O número de técnicas de detecção empregadas em CLAE é enorme, mas os detectores geralmente utilizados são: de absorção no UV e no visível, de fluorescência, de índice de refração e eletroquímicos (SANTOS, 2010). A utilização de perfis cromatográficos ou “fingerprints” são utilizados para análises de extratos vegetais, pois possibilita obter representatividade dos múltiplos compostos químicos presentes na amostra em uma única análise e, desta forma, permite estabelecer um parâmetro comparativo para o reconhecimento de semelhanças e diferenças entre extratos submetidos às mesmas condições de análise (ALAERTS et al., 2007).

Porém, deve-se considerar que um cromatograma fornece apenas uma peça de informação qualitativa acerca de cada espécie em uma amostra, a saber, seu tempo de retenção ou sua posição sobre a fase após certo período de eluição e não indica o número total dos compostos existentes na amostra (HENDRINKS et al., 2005). A análise deve ser repetida com outras fases móveis e em outras colunas, a fim de se conseguir o maior número de picos e mesmo assim deve-se tomar cuidado com o detector empregado (FARIAS, 2004). Para análise de perfis cromatográficos, um dos aspectos importantes é a escolha do método de extração e preparo de amostras, uma vez que influenciam sobremaneira na variedade de substâncias que serão analisadas, além de promover a degradação de várias delas (MEYER, 1993).

Assim, faz-se importante o desenvolver de um método adequado, que apresente boa reprodutibilidade e que possa extrair compostos ativos característicos do vegetal (ALAERTS et al., 2007). Para utilização da CLAE, é necessário conhecimento das amostras avaliadas e estudo prévio de todos os mecanismos e fatores que estão relacionados à técnica, pois apesar de os equipamentos cromatográficos serem aparelhos automatizados, o manejo e a padronização para cada amostra é diferente e necessita de experiência (SANTOS, 2010).

3.12 Avaliação do Potencial Antioxidante

3.12.1 DPPH

Compostos que possuem atividade antioxidante e que são de fontes naturais, vêm ao longo do tempo ganhando um espaço importante e de destaque dentro das ciências farmacêuticas e de alimentos. A capacidade de prevenir reações oxidativas

fazem desses produtos desejo de consumo, seja na prevenção da formação de radicais livres no organismo humano ou dentro da indústria, buscando reduzir degradação oxidativa em alimentos, conferindo uma maior vida de prateleira para estes (HALLIWELL, 1995; SHAHIDI, 2007).

Quando elaborada uma nova formulação contendo compostos fenólicos é importante fazer a quantificação destes e avaliar sua capacidade de sequestrar radicais livres. O presente trabalho aborda a determinação da atividade antioxidante pelo método de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), que tem como fundamento a capacidade que o agente antioxidante possui em sequestrar o radical livre DPPH. Durante a reação o DPPH sofre redução para difenil-picril-hidrazina, essa redução é possível devido a ação de uma espécie antioxidante (ALMEIDA, 2017).

Quando feita a leitura na região do UV é notado o desaparecimento da absorção, sendo assim, durante a análise monitora-se o decréscimo da absorbância de várias soluções com concentrações diferentes e conhecidas. Com esta diminuição que ocorre é possível calcular o consumo do radical livre DPPH, que é representada em porcentagem, a mesma corresponde a quantidade de DPPH que é consumida pelo antioxidante (SOUSA et al., 2007).

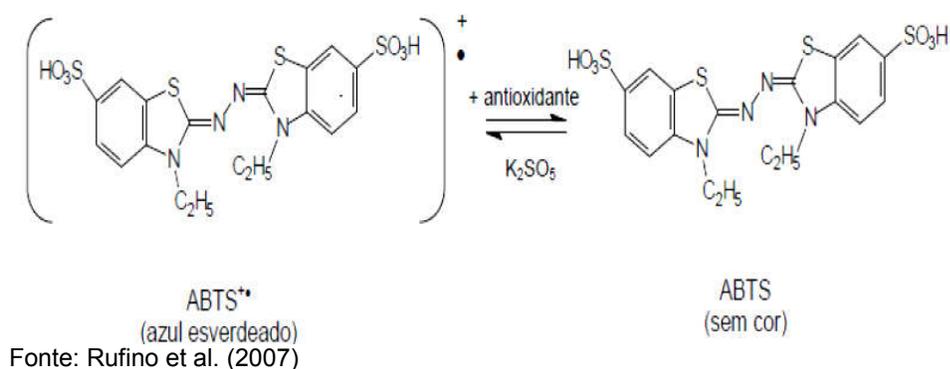
3.12.2 ABTS

Paralelamente com método DPPH, a determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS (2,2- azino – bis – 3- etil – benzotiazolina – 6- ácido sulfônico) é bastante utilizado. Ambos apresentam boa estabilidade em certas condições de análise, mas também mostram diferenças importantes frente aos antioxidantes e quanto á manipulação (SOUZA, 2013). O DPPH é um radical livre que é adquirido dessa forma, sem a necessidade de preparo; já o radical ABTS deve ser gerado por reações enzimáticas ou químicas. Outra diferença é que o ABTS pode ser solubilizado em meios orgânicos e aquosos nos quais a atividade antioxidante pode ser determinada, dependendo da natureza dos compostos antioxidantes, enquanto que o DPPH somente pode ser solubilizado em meios orgânicos, especificamente alcoólicos (ARNAO, 2000).

O método se baseia na geração do $ABTS^{\cdot+}$, de cor azul esverdeado, por meio da reação do ABTS com perssulfato de potássio que possui absorção máxima em 645, 734 e 815 nm (SOUZA, 2013). Com a adição de um antioxidante ocorre a

redução do $\text{ABTS}^{\cdot+}$ a ABTS promovendo a perda da coloração do meio reacional (Figura 5). Com a extensão da perda de cor, a porcentagem de inibição do $\text{ABTS}^{\cdot+}$ é determinada em função do Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), um padrão submetido às mesmas condições de análise do antioxidante. O método é aplicável ao estudo de antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis, compostos puros e extratos vegetais (RE et al., 1999).

Figura 5 - Redução do radical ABTS por um antioxidante



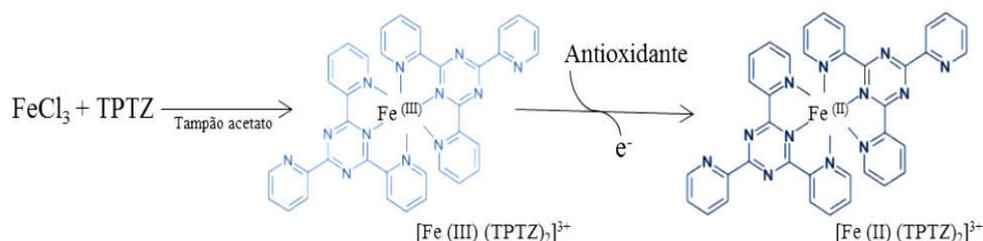
O método $\text{ABTS}^{\cdot+}$ é simples e pode ser avaliado em diferentes faixas de pH, o que torna essa metodologia importante para o conhecimento do efeito do pH em mecanismos oxidantes. Porém, esse método tem a limitação de não ser um representante das biomoléculas e nem mesmo sem encontrado em nenhum sistema biológico. Destaca-se, ainda, que termodinamicamente, qualquer componente que apresente um potencial redutor menor que este radical pode reagir com o mesmo (MAGALHÃES et al., 2008).

3.12.3 FRAP

Os radicais altamente reativos como as espécies reativas de oxigênio (EROs), potencialmente prejudiciais, são produzidas como consequência do metabolismo celular (BENZIE; STRAIN, 1996). Normalmente, estes radicais livres podem ser removidos ou inativados por diversos antioxidantes (ANTOLOVICH et al., 2002), mediante mecanismos baseados na transferência de elétrons ou hidrogênios (Ou et al., 2002).

O ensaio antioxidante de determinação do poder de redução do íon ferro, FRAP (do inglês Ferric Reducing Antioxidant Power), está baseado na produção do íon Fe^{2+} (forma ferrosa) a partir da redução do íon Fe^{3+} (forma férrica) presente no complexo 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) (Figura 6) (URREA-VICTORIA et al., 2016).

Figura 6 - Reação química que descreve a produção de Fe^{2+} (forma ferrosa) a partir da redução de Fe^{3+} (forma férrica) presente no complexo com TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina)



Fonte: URREA-VICTORIA et al. (2016)

Quando a redução ocorre, há uma alteração na tonalidade da mistura de reação, passando de roxo claro a um roxo intenso, cuja absorbância pode ser medida no comprimento de onda de 595 nm (BENZIE; STRAIN, 1999; ANTOLOVICH et al., 2002). Quanto maior a absorbância ou intensidade da coloração, e maior será o potencial antioxidante.

O método do FRAP foi originalmente desenvolvido como uma alternativa para determinar a redução do ferro em fluidos biológicos e soluções aquosas de compostos isolados (BENZIE; STRAIN, 1996). Posteriormente, este método foi adaptado por diversos autores (PULIDO et al., 2000; PRIOR et al., 2005; RUFINO et al., 2006). No entanto, a maioria dos protocolos descritos na literatura utiliza volumes elevados de reagentes e extratos, o que torna por vezes o método inviável para amostras ou extratos que são de mais difícil obtenção ou de baixo rendimento (URREA-VICTORIA et al., 2016).

3.13 Ensaios Microbiológicos

Os testes microbiológicos são de fundamental importância para validação de estudos que têm como finalidade o desenvolvimento de novas formulações com

aplicação terapêutica. Principalmente quando o estudo em questão traz ativos que já possuem atividade microbiológica comprovada, como é o caso da própolis vermelha.

Dentre os testes mais utilizados nesses estudos podemos destacar os que utilizam o princípio da sensibilidade frente a cepas semeadas em meio de cultura para formação de halos de inibição, formados por discos impregnados com o ativo (NCCLS, 2001).

4 METODOLOGIA

4.1 Local de execução

O trabalho foi desenvolvido na FANUT (Faculdade de Nutrição), ESENFAR (Escola de Enfermagem e Farmácia), LSCAT (Laboratório de síntese de catalizadores) e Laboratório de Instrumentação e Desenvolvimento em Química Analítica (LINQA) da Universidade Federal de Alagoas e no Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba.

4.2 Amostras

As polpas de maracujá (*Passiflora edulis*) da marca shups® não pasteurizada e sem conservantes, foram obtidos de um hipermercado da cidade de Maceió, sendo imediatamente congeladas após a coleta, em freezer a -20°C até momento da preparação de microencapsulados nutracêuticos de maracujá. A escolha de polpa de maracujá da marca shups®, deu-se para eliminar o efeito da sazonalidade e sempre obtidas em triplicata.

4.3 Obtenção das composições farmacêuticas, desenvolvimento e identificação dos microencapsulados da polpa do maracujá (*Passiflora edulis*)

4.3.1 Preparação do sistema emulsificante contendo polpa de maracujá

Para preparação do sistema emulsificante contendo polpa de maracujá foram utilizados os excipientes farmacêuticos usuais com diferentes funcionalidades sendo eles: composto ativo (polpa de maracujá), diluentes, promotor de fluidez/aderência (aerosil), dispersante/emulsificantes (água, etanol, amido e gelatina). Foram elaboradas três preparações, a fim de se obter a melhor preparação prospectiva das misturas com polpa do maracujá para secagem por *Spray Dryer*. A primeira foi composta com polpa de maracujá, gelatina, amido, aerosil, água e etanol. A segunda com polpa de maracujá, gelatina, farinha de inhame, aerosil, água e etanol e por fim a terceira com polpa de maracujá, caseína, aerosil, água e etanol (Tabela 2).

Tabela 2 - Seleção da preparação prospectiva das misturas com polpa do maracujá para secagem por *Spray Dryer*

COMPOSIÇÃO	PREPARAÇÕES		
	1	2	3
	Polpa de maracujá (1) Aerosil (2,5g) Água (500mL) Etanol (400mL) Gelatina (20g) Amido (2,5g)	Polpa de maracujá (2) Aerosil (2,5g) Água (500mL) Etanol (400mL) Gelatina (20g) Farinha de inhame (2,5g)	Polpa de maracujá (3) Aerosil (2,5g) Água (500mL) Etanol (400mL) Caseína (20g)

Fonte: Autora (2019)

As preparações foram elaboradas, inicialmente através do aquecimento da água a 50°C, e posterior adição agentes encapsulantes, na seguinte ordem: primeiro a gelatina, depois o amido, aerosil e por fim, a polpa e o etanol. Sempre sob agitação com o auxílio de um agitador magnético. As polpas de maracujá utilizadas não eram pasteurizadas ou com adição de aditivos. Das três preparações, somente a 1 e 2 apresentaram condições para passarem pelo processo de secagem por *Spray-Dryer*. A preparação 3 coagulou, inviabilizando o processo de secagem. Entretanto, ao final do processo de secagem, a preparação 2 apresentou alta higroscopicidade, tornando-se inviável a composição dessa preparação para continuação do experimento. O experimento foi conduzido com a elaboração de apenas 1 amostra de cada preparação.

Portanto, a preparação 1 foi a que apresentou melhor performance durante e após o processo de secagem, sendo portanto, utilizada como padrão de referência. A partir da composição da preparação 1, foi elaborado três diferentes formulações (A, B e C) (Tabela 3), para se verificar qual a formulação apresentaria maior proteção pelo agente encapsulante.

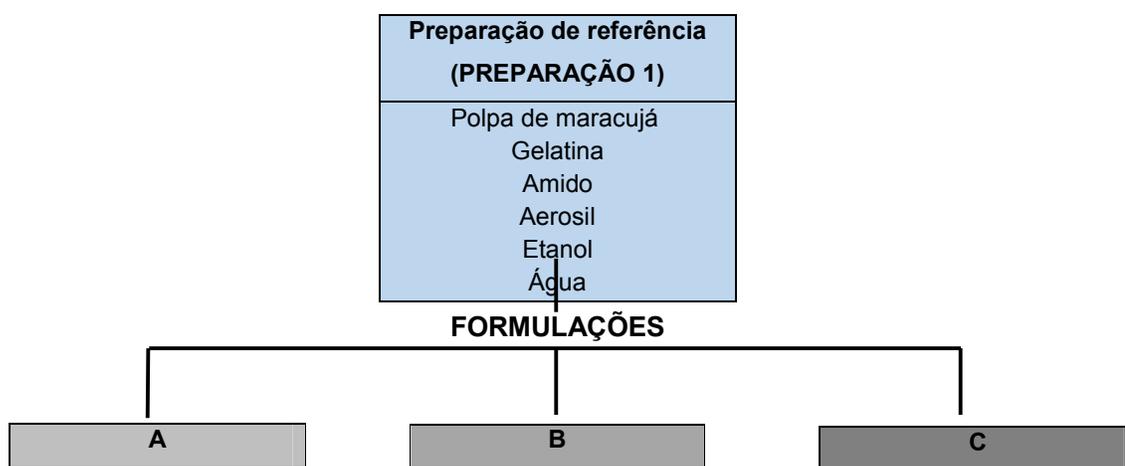
Tabela 3 - Formulações elaboradas a partir da preparação 1 para secagem por *Spray Dryer*

COMPOSIÇÃO	FORMULAÇÕES		
	A	B	C
	Polpa de maracujá (1) Gelatina (20g) Amido (2,5g) Aerosil (2,5g) Etanol (400 mL) Água (500 mL)	Polpa de maracujá (2) Gelatina (20g) Amido (2,5g) Aerosil (2,5g) Etanol (400 mL) Água (500 mL)	Polpa de maracujá (3) Gelatina (20g) Amido (5,0g) Aerosil(2,5g) Etanol (450 mL) Água (500 mL)

Fonte: Autora (2019)

Na formulação C foi utilizado uma quantidade de etanol maior que nas formulações A e B, ou seja, 450 mL de etanol, ocorrendo o mesmo para o amido, que foi utilizado o dobro da quantidade em relação as duas outras formulações (A e B). Foi necessário aumentar a quantidade de amido e etanol, para acompanhar o aumento de polpa de maracujá, que foi triplicada a quantidade (36g), em relação a formulação A. Na figura 7, é apresentado um fluxograma da elaboração das formulações, a partir da preparação 1.

Figura 7 – Fluxograma de elaboração das formulações



Fonte: Autora (2019)

4.3.2 Secagem do sistema emulsificante contendo polpa de maracujá usando *Spray Dryer*

O sistema emulsificante contendo polpa de maracujá foram submetidos a processo de secagem em *Spray-Dryer* sob agitação constante, usando agulha injetora de 1 mm. O *Spray-Dryer* foi regulado com as seguintes condições: temperatura de entrada 180°C, temperatura de saída 105 a 110°C, fluxo de bombeamento 10 mL/h e vazão de ar de 30 L/hora. Desta forma, foram obtidos pós no sistema emulsificante contendo polpa do maracujá e estes pós foram microencapsulados. Os microencapsulados obtidos poderão ser utilizados em diversas composições farmacêuticas, como pós, comprimidos, cápsulas gelatinosas, dentre outras.

4.4 Caracterização físico-química dos microencapsulados

As amostras das três formulações e a polpa de maracujá, foram submetidas a caracterização físico-química de análise térmica, difração de raio x, infravermelho, microscopia eletrônica de varredura – MEV e cromatográfica líquida de alta eficiência – CLAE, além da avaliação da atividade antioxidante (DPPH, ABTS e FRAP), teste *in vitro* e Concentração Inibitória Mínima.

4.4.1 Análise Termogravimétricas

Os microencapsulados nutracêuticos de polpa de maracujá foram submetidos aos ensaios térmicos através do aparelho modelo DTG, marca Shimadzu®. A curva termogravimétrica foi obtida em célula calorimétrica nas seguintes condições: razão de aquecimento: 10 °C/min; peso da amostra: aproximadamente 8 mg; faixa de temperatura: 25-900 °C; atmosfera dinâmica de nitrogênio; fluxo: 50,00mL/min; material da célula: platina.

4.4.2 Difração de Raio X

Os difratogramas de raio X foram obtidos em um difratômetro Bruker D8 (*Billerica - Massachusetts – USA*), à temperatura ambiente com radiação Cu K α ($\lambda=1.5405 \text{ \AA}$), tensão de 40 kV, corrente de 30 mA, velocidade angular de 0,05 °/s, em geometria θ - 2θ com 2θ variando de 3 a 35°.

4.4.3 Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier

O pó dos microencapsulados nutracêuticos de maracujá foi submetido à leitura em infravermelho na faixa de número de ondas de 4000 a 400 cm^{-1} . Utilizou-se pastilhas de KBr para FTIR-médio. Os estiramentos obtidos foram identificados e comparados com as tabelas e cartas da literatura para estiramento de carbonila (1715 cm^{-1}), OH (1040 a 1200 cm^{-1}) aromáticos (1550 a 1450 cm^{-1}) e alcenos referente à flavonoides e outros cinamatos presentes no extrato da polpa do maracujá.

4.4.4 Microscopia eletrônica de varredura – MEV

A MEV foi estudada por meio do microscópio *Tabletop Microscope Hitachi* (Japão) TM 3000, com o programa TM 3000. As micropartículas foram acomodadas em uma fita de carbono dupla face (*Ted Pella, Inc.*), e estas foram fixadas em stubs de alumínio. As imagens foram captadas com aceleração de voltagem de 5 kV, com corrente de 1750 mA.

4.4.5 Determinação do tamanho de partículas

Para a determinação do tamanho de partícula foi utilizado as técnicas de espalhamento de luz dinâmico e espalhamento de luz eletroforético, respectivamente, tendo como suporte o equipamento Zetasizer Nano ZS90 do Laboratório de Tecnologia de Nanosistemas Carreadores de Substâncias Ativas (TECNano) da Escola de Enfermagem e Farmácia (EENFAR). Para tais análises, 10 mg de cada uma das formulações foram solubilizadas em 10 mL de água Milli-Q e colocadas em tubos do tipo Falcon. Durante as análises todas as amostras diluídas foram mantidas em banho ultrassônico modelo USC-700. Alíquotas de cerca de 1 mL foram colocadas em uma célula (cubeta própria do equipamento) e levadas para leitura.

4.4.6 Identificação dos flavonoides via HPLC

A identificação dos flavonoides presentes nos microencapsulados e extratos de maracujá foram avaliados pelo o sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em cromatógrafo Shimadzu, modelo LC-10 VP, com uma bomba de alta pressão, um degaseificador DGU-20A5 (Shimadzu), um forno CTO-20AC, para acondicionar a coluna modelo Shimpack C18 (250 mm × 4.6 mm x 5µm), estabilizando em temperatura de 30°C e detector UV-vis 205 nm a 400 nm de comprimento de onda. Todo o sistema foi interfaciado por computador no Software LC-Solution e controladora CBM-20A da Shimadzu do Brasil. Foram injetados 20 µL de amostra no cromatógrafo, utilizando como fase móvel, solvente A (água, 0,1% ácido fórmico e acetronitrila) e solvente B (água, 0,1% ácido fórmico), sob um fluxo de 1,0 mL/minutos. Também foram injetados padrões analíticos de flavonoides (adquiridos da Sigma-Aldrich St. Louis, MO. USA), como referências para análise dos microencapsulados e extratos de maracujá.

O perfil cromatográfico da polpa de maracujá para identificação de fenóis e flavonoides, foi avaliado mediante três diferentes métodos de extração, que compreenderam:

Método 1: em um funil de separação foi colocado HCl e acetato de etila, após a mistura, retirou-se a parte inferior com acetato de etila, eliminando o ácido clorídrico. A parte com acetato de etila, foi colocada no rotaevaporador, até a evaporação total do acetato de etila. Após a evaporação, recuperou-se os flavonoides com metanol.

Método 2: neste método, foi utilizado HCl juntamente com clorofórmio e carbonato de sódio. Com a ajuda de um funil de separação os alcaloides foram separados do ácido clorídrico, sendo esse último descartado. A mistura clorofórmio e carbonato de sódio foi evaporada com o auxílio de um rotaevaporador, sendo os flavonoides recuperados com metanol.

Método 3: no método de extração 3, foi utilizado clorofórmio juntamente carbonato de sódio. A mistura clorofórmio e carbonato de sódio foi evaporada com o auxílio de um rotaevaporador, sendo os flavonoides recuperados com metanol.

4.4.7 Determinação de fenóis e flavonoides

A determinação dos compostos fenólicos totais foi realizada por espectrofotometria, por meio da reação de oxirredução com reagente de Folin-Ciocalteu, o qual reage com as hidroxilas presentes nos polifenóis, segundo a metodologia descrita por Singleton & Rossi (1965). Neste procedimento, o extrato foi diluído em solução extratora alcoólica acidificada, etanol:água:HCl (70:30:1), a seguir foi pipetado em tubo de ensaio, 200 μL do extrato diluído, 1000 μL do reagente de *Folin-Ciocalteu* (1:10 H_2O) e 800 μL de solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 7,0%. As leituras foram realizadas em triplicata das absorbâncias em espectrofotômetro UV-visível (HOMIS SF 200DM) em comprimento de onda de 765 nm, agitadas e permanecerem em repouso, ao abrigo da luz, por duas horas em temperatura ambiente. O cálculo do teor de compostos fenólicos foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrão de ácido gálico. Os resultados foram expressos em miligrama de equivalentes de ácido gálico® por litro (mg EAG L^{-1}).

4.5 Avaliação da atividade antioxidante por DPPH, ABTS e FRAP

4.5.1 Sequestro de radicais livres DPPH

O teste de sequestro de radicais livres seguiu o método descrito por Sanchez-Moreno et al. (2002). Em 400 µL de solução metanólica do éster, em concentrações de 5 a 30 µg/mL, foram adicionados 800 µL de uma solução metanólica do radical livre 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH, Sigma) em concentração aproximada de 20 µg/mL. Antes de utilizar a solução de DPPH, sua absorvância foi ajustada para um valor entre 0,7 e 0,8 a 517 nm, medida a partir de seu branco (800 µL da solução de DPPH + 400 µL de metanol). Esse valor foi utilizado como controle. Como branco da amostra, foram utilizados 400 µL de cada concentração do éster, acrescidos de 800 µL de metanol. Como substância de referência, foi utilizada a quercetina, nas mesmas concentrações. Após a adição do DPPH, as amostras foram agitadas e mantidas no escuro por 30 min. Após este tempo, foi feita a leitura da absorvância em espectrofotômetro UV-visível a 517 nm. O sequestro dos radicais livres DPPH pelos extratos de maracujá foi avaliado por comparação com o controle (DPPH + metanol). Os resultados foram expressos como porcentagem de sequestro do radical livre DPPH (através de seu descoramento) comparado ao controle, de acordo com a seguinte equação: $\% \text{ Aaox} = \frac{\text{Abs C} - (\text{AbsAm} - \text{Abs B}) \times 100}{\text{Abs C}}$. Onde Abs C=absorvância do controle; AbsAm=absorvância da amostra; Abs B=absorvância do branco.

4.5.2 Método ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico)

O método ABTS utilizado foi o descrito por Re et al. (1999) e modificado por Kuskoski et al. (2006). O radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ é formado por uma reação química com persulfato de potássio em uma relação estequiométrica de 1:0,5. Uma vez formado o radical ABTS^{++} , o mesmo foi diluído em etanol até obter-se uma medida de absorvância de 0,70 ($\pm 0,02$) a um comprimento de onda de 754 nm, a uma temperatura de equilíbrio de 30°C. A absorvância foi medida em espectrofotômetro modelo (*HewlettPackard* 8452^a), nos tempos 1;4 e 7 minutos após a adição da amostra. Foram preparadas curvas com soluções-padrão de Trolox (antioxidante sintético similar à vitamina E). Os resultados foram expressos em TEAC, atividade

antioxidante equivalente ao Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) em $\mu\text{mol TEACg}^{-1}$ de amostra.

4.5.3 Determinação do poder de redução do íon ferro - FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

O poder de redução da polpa de maracujá, pelo método de FRAP, foi avaliado de acordo com metodologia descrita por Sánchez-González et al. (2005), com algumas modificações. O reagente de FRAP foi preparado com 2,5 mL de uma solução 10mM TPTZ, em HCl 40mM foram adicionados a 2,5 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 25 mL de tampão acetato 0.3 mM pH 3.6. A solução foi incubada a 37°C por 30 minutos. Para a avaliação da atividade antioxidante, 900 μL do reagente FRAP preparado previamente, foi misturado com 90 μL de água destilada e 10 μL da amostra ou padrão. As amostras foram incubadas à 37°C , por 30 minutos e a leitura realizada a 595 nm. Soluções padrão com diferentes concentrações de Trolox (4,5; 7,5; 10,5; 12,0 e 18,0 $\mu\text{mol/L}$) foram utilizadas para calibração. Os resultados foram expressos como $\mu\text{mol/L}$ de Trolox / $\mu\text{g/mL}$ de amostra.

O potencial antioxidante de FRAP pode ser expresso em equivalente de padrão por grama de extrato (mg.g^{-1}). Tomando-se o ácido gálico como exemplo, inicialmente, transforma-se a curva padrão de ácido gálico, construída em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para μg de ácido gálico. Utilizando os valores de μg de ácido gálico, calculou-se a respectiva equação da reta, substituindo o valor de Y na equação da reta da curva padrão pela absorvância da amostra e calculando o valor de X, correspondente a equivalência em μg de ácido gálico na polpa de maracujá.

Por fim, foi realizado o cálculo da massa de amostra (mg ou g) na mistura de reação, e dividido o valor da amostra em equivalente de ácido gálico pela sua massa (μg equivalentes de ácido gálico/g de amostra). Adicionalmente, os resultados foram expressos com base no cálculo do EC50, concentração efetiva à qual o extrato induz metade do efeito máximo.

4.6 Teste *in vitro*

As soluções estoques das amostras foram preparadas com o tensoativo Tween 20 e solução salina estéril (NaCl 0,9%). Para a verificação da atividade antimicrobiana foram utilizadas microplacas de poliestireno estéreis de 96 poços,

com o fundo em formato de “U”, para permitir a melhor visualização do crescimento bacteriano. A leitura das placas foi realizada através de uma solução de TTC (cloreto de 2, 3, 5-trifeniltetrazólio) na concentração de 1,0%.

Os microrganismos utilizados no estudo foram cinco cepas padrão liofilizadas: *S. aureus* (CCCD – S007), *S. epidermidis* (CCCD – S010), *E. coli* (ATCC – 25922), *P. aeruginosa* (ATCC – 27853) e *C. albican* (CCCD – CC001).

As amostras foram preparadas da seguinte forma: em balança analítica foram pesados 0,2 g (200 mg) dos extratos, individualmente, a vidraria utilizada para pesagem foi o vidro de relógio. Após pesagem, foi adicionado 0,5 mL de tensoativo, Tween 20, em cada amostra, na sequência foi realizada homogeneização. Em seguida, foram 1,5 mL de solução salina (NaCl 0,9%) estéril e nova homogeneização foi realizada. A concentração obtida foi de 100 mg/mL. Uma solução estoque de Tween foi preparada para certificar que o tensoativo não está inibindo o crescimento microbiológico, sendo utilizado como controle negativo (CN), o processo de preparo foi o mesmo utilizado nas amostras anteriores.

4.6.1 Concentração Inibitória Mínima

A técnica utilizada para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi microdiluição, 100µL das amostras (formulações 1, 2 e 3) foram pipetadas em microplacas de poliestireno estéreis de 96 poços e solubilizadas em 100µL do meio de cultura Brain Heart Infusion (BHI) em concentrações decrescentes. Em seguida foram adicionados os microrganismos numa concentração de 10µL na escala McFarland (0,5%), obtendo em cada poço a concentração de aproximadamente $1,5 \times 10^6$ bactérias. Todo o experimento foi realizado em capela de fluxo laminar, com vidrarias, ponteiras e meios de cultura previamente esterilizados e em duplicata.

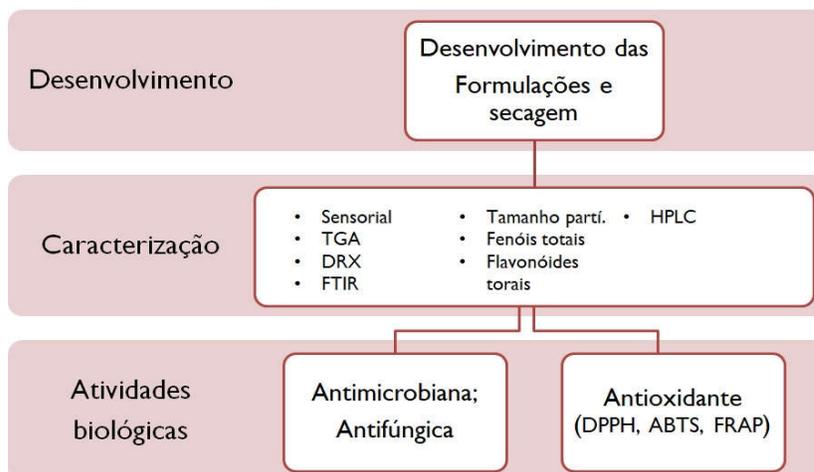
A viabilidade dos espécimes microbiológicos utilizados foi conferida através da produção de uma fileira na microplaca chamada de Controle Positivo (CP) de crescimento, onde foram adicionados o meio de cultura e os espécimes microbiológicos, para certificar-se da esterilidade da microplaca outra fileira contendo o meio de cultura foi reservada e esta chamada de Controle de Esterilidade (CE) de crescimento. Outra fileira foi feita para confirmar que o agente solubilizante não estava inibindo o crescimento microbiológico chamada de Controle

Negativo (CN). As microplacas foram fechadas e acondicionadas em estufa bacteriológica a 36°C por 24 horas.

Para a leitura, foi adicionado 20µL de uma solução de TTC (cloreto de 2, 3, 5-trifeniltetrazólio) na concentração de 1,0% em todos os poços. As microplacas foram novamente fechadas e acondicionadas em estufa bacteriológica a 36°C por mais 3 horas proporcionando a reação colorimétrica do TTC sobre os microrganismos viáveis. Após o tempo determinado foi realizada a análise visual, qualitativa, os poços que apresentaram coloração vermelha foram considerados como crescimento microbiológico positivo, já os poços que não revelaram a coloração vermelha foram considerados como crescimento microbiológico negativo. A CIM foi definida como a menor concentração do extrato em µg/mL capaz de impedir o crescimento microbiano.

Para a determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) foram retiradas alíquotas da microplaca, aproximadamente 10µL, na concentração igual e acima da CIM, sendo semeadas em placas de Petri contendo o meio de cultura ágar Mueller Hinton, depois foram acondicionadas em estufa bacteriológica a 36°C por 24 horas. O crescimento de colônias sobre a placa de ágar Mueller Hinton indicava que o microrganismo ainda continuava viável. A CBM foi definida como a menor concentração da formulação em µg/mL capaz de eliminar totalmente o crescimento microbiológico dos espécimes microbiológicos após a semeadura em meio de cultura ágar Mueller Hinton. A figura 8 apresenta o fluxograma do desenvolvimento da pesquisa.

Figura 8 – Fluxograma do desenvolvimento da pesquisa



Fonte: Autora (2019)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção das composições farmacêuticas, desenvolvimento e identificação dos microencapsulados da polpa do maracujá (*Passiflora edulis*)

5.1.1 Preparação do sistema emulsificante contendo polpa de maracujá

Como discutido na metodologia, diferentes preparações foram elaboradas para definir a melhor condição para realização da secagem dos sistemas sol-gel e emulsificante contendo polpa de maracujá. Além da polpa de maracujá, foi adicionado nas preparações gelatina, amido, aerosil, água, etanol, farinha de inhame e caseína. Das três preparações elaboradas, apenas a preparação com polpa de maracuja, gelatina, amido, aerosil, água e etanol, apresentou melhor estabilidade as condições de secagem, sendo portanto utilizada como referência para a otimização das formulações dos microencapsulados (Figura 9).

Figura 9 - Preparação contendo polpa de maracuja, gelatina, amido, aerosil, água e etanol, após o processo de secagem (PREPARAÇÃO 1)



Fonte: Autora (2019)

A preparação contendo polpa de maracuja, caseína, aerosil, água e etanol coagulou (Figura 10), antes mesmo do processo de secagem. A coagulação dessa preparação, possivelmente ocorreu devido a presença da caseína. A preparação contendo polpa de maracuja, gelatina, farinha de inhame, aerosil, água e etanol,

apresentou alta higroscopicidade após a secagem (Figura 11), dessa forma, a utilização dessa preparação, mostrou-se inviável para ser utilizada no experimento.

Figura 10 - Preparação contendo polpa de maracuja, caseína, aerosil, água e etanol, antes do processo de secagem (PREPARAÇÃO 2)



Fonte: Autora (2019)

Figura 11 - Preparação contendo polpa de maracuja, gelatina, farinha de inhame, aerosil, água e etanol, após o processo de secagem (PREPARAÇÃO 3)



Fonte: Autor (2019)

A gelatina adicionada nas preparações/formulações, é uma denominação genérica de uma mistura de frações protéicas purificadas, são utilizadas como aglutinante em comprimidos. O amido funciona como liga dos pós, permitindo a

formação de grânulos, atuando também como agente espessante (SILVA, 2013). O aerosil, é utilizado para melhorar as propriedades de fluxo das misturas em pó. A caseína é uma glicofosfoproteína encontrada no leite, atuando como cobertura dos microencapsulados, juntamente com a gelatina. Ela vem sendo estudada como material para preparação de sistemas de liberação controlada de fármacos (De CARVALHO, 1996).

BAYOMI et al. (1998) preparam microesferas de caseína e quitosana por coacervação em meio aquoso para liberação sustentada de diltiazem. Eles avaliaram a influência da concentração dos polímeros e o tempo de agitação no perfil de liberação do fármaco. A liberação do fármaco foi sustentada com o aumento da concentração de caseína e tempo de agitação. Entretanto, com o aumento da concentração de quitosana houve maior liberação do fármaco.

Quando se verifica o rendimento das formulações, observa-se que a formulação 1, apresentou melhor rendimento (38,9%), enquanto a formulação 3 apresentou o menor rendimento (8,6%). O baixo rendimento observado na formulação 3, possivelmente ocorreu devido a uma maior quantidade de polpa de maracujá, o que dificultou o processo de encapsulação. Os rendimentos são de cada formulação são apresentados na tabela 4.

Tabela 4 - Rendimento das formulações

Formulações	Peso da amostra seca antes da secagem	Peso da amostra após a secagem	Rendimento (%)
1	37g	14,4g	38,9%
2	49g	15,8g	32,3%
3	58g	4,9g	8,6%

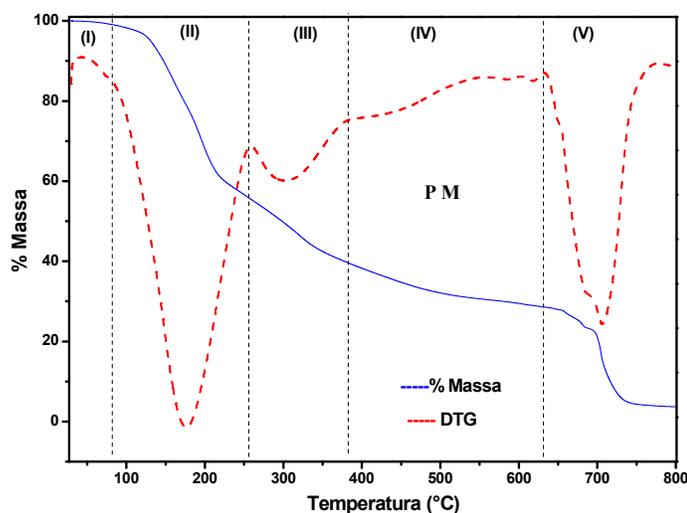
5.2 Caracterização físico-química

5.2.1 Análises termogravimétricas

A análise termogravimétrica (TG/DTG) é uma análise que se baseia na medida de perda de massa de uma determinada amostra, em função da temperatura ou do tempo, fornecendo informações sobre a estabilidade térmica do material analisado (TRIVEDI et al., 2015).

As figuras de 12 a 18 apresentam as curvas termogravimétricas de TG e DTG das amostras de polpa de maracujá (PM), formulação 01 (PF01), formulação 02 (PF02), formulação 03 (PF03), aerosil, amido e gelatina, respectivamente. As curvas de percentual de perda de massa e DTG apresentam perfis com comportamentos semelhantes, porém distintos divididos em eventos de perda de massa. Os eventos são atribuídos: (I) desidratação da água fisicamente absorvida nos poros e cavidades e/ou canais dos materiais, (II) perda de água estrutural, água que participa da composição do material e os eventos (III), (IV) e (V) são inerentes a degradação da matéria orgânica das amostras. As tabelas 5, 6, 7 e 8, observa-se os valores das perdas de massa das amostras, para cada evento e a perda de massa total versus temperaturas, obtidas por TG/DTG

Figura 12 - Curvas termogravimétricas de TG e DTG da polpa de maracujá (PM)



Fonte: Autora (2019).

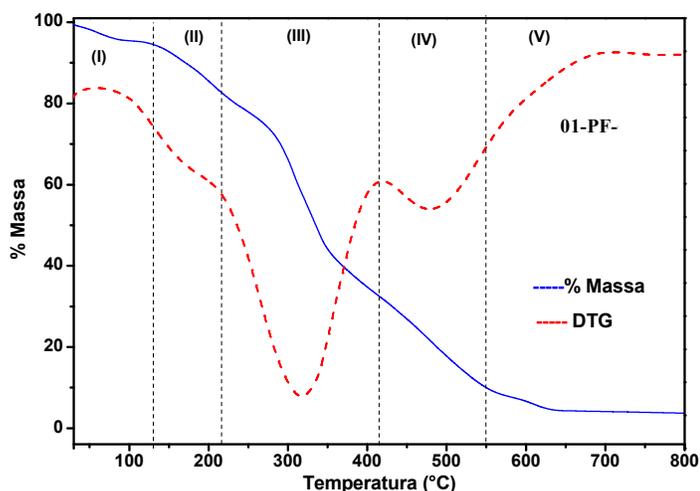
Tabela 5 - Perdas de massa versus temperaturas da polpa de maracujá

Amostras	Perda de massa (%) / Intervalo de Temperatura (°C)					Perda Total (%)
	I Temperatura ambiente até 90	II 90-255	III 255-390	IV 390-640	V 640-800	
Polpa de maracujá	3,0	40	14	10	30	97,0

Fonte: Autora (2019).

Por apresentar uma concentração elevada de água, observa-se uma perda significativa de água na polpa entre os eventos I e II (Tabela 5). Nos eventos seguintes (II ao V), ocorre a degradação gradativa do material, ocorrendo a degradação quase total no evento V.

Figura 13 - Curvas termogravimétricas de TG e DTG da formulação 01 (PF01)



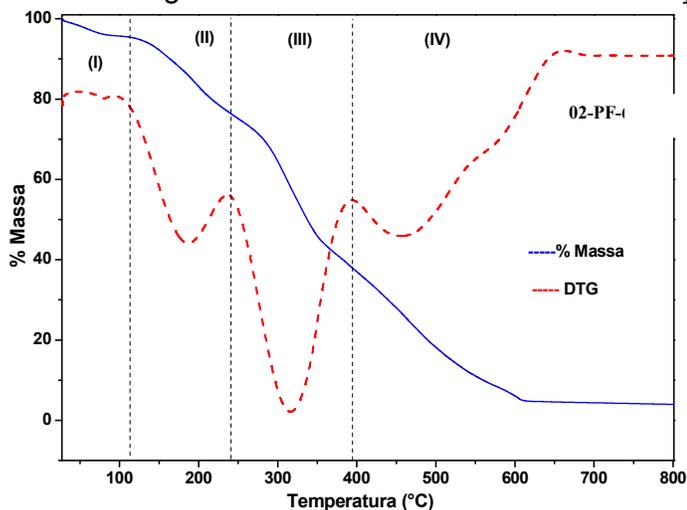
Fonte: autora (2019).

Tabela 6 - Perdas de massa versus temperaturas da formulação 1 (01 – PF)

Amostras	Perda de massa (%) / Intervalo de Temperatura (°C)					Perda Total (%)
	I Temperatura ambiente até 120	II 120-220	III 220-440	IV 440-550	V 550-800	
01-PF	4,3	17	47	24,4	4	96,7

Fonte: Autora (2019)

Na formulação 1 (Tabela 6), observa-se inicialmente a perda de água (evento I), porém de forma mais lenta, quando comparado com a polpa. Possivelmente essa menor perda de água, ocorre devido a uma proteção exercida pelos agentes encapsulantes. No evento III, observa-se uma maior perda de massa, e nos eventos seguintes (IV e V), ocorre a degradação total do material.

Figura 14 - Curvas termogravimétricas de TG e DTG da formulação 02 (PF02)

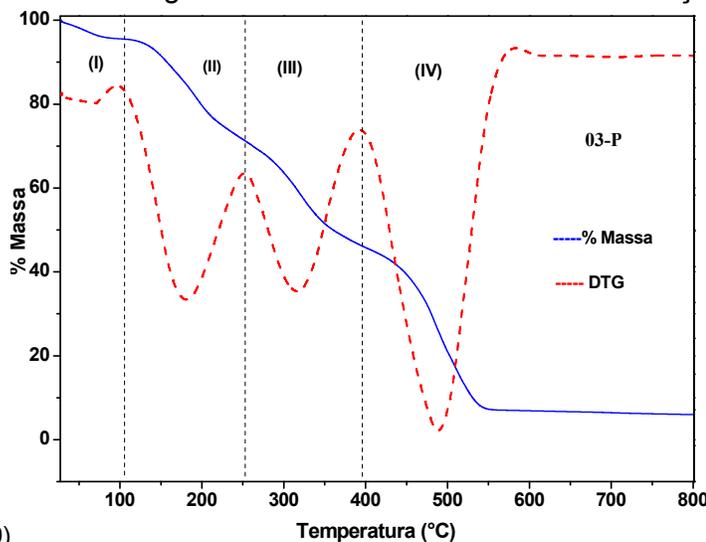
Fonte: Autora (2019).

Tabela 7 - Perdas de massa versus temperaturas da formulação 2 (02 – PF)

Amostras	Perda de massa (%) / Intervalo de Temperatura (°C)					Perda Total (%)
	I Temperatura ambiente até 120	II 120-240	III 240-325	IV 325-350	V 350-800	
02-PF	4,22	19,2	39	30	4,31	96,7

Fonte: Autora (2019).

Os efeitos da temperatura observados na formulação 2 (Tabela 7), são similares aos observados na formulação 1, com perda constante de massa a medida que aumenta a temperatura.

Figura 15 - Curvas termogravimétricas de TG e DTG da formulação 03 (PF03)

Fonte: Autora (2019)

Tabela 8 - Perdas de massa versus temperaturas da formulação 3 (03 – PF)

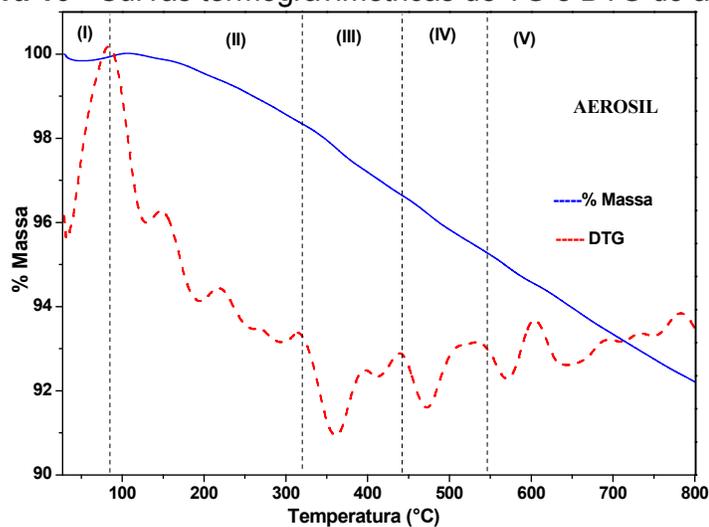
Amostras	Perda de massa (%) / Intervalo de Temperatura (°C)					Perda Total (%)
	I Temperatura ambiente até 105	II 105-250	III 250-390	IV 390-550	V 550-800	
03-PF	4,41	29	24,54	35,3	5,01	98,24

Fonte: Autora (2019).

Embora os eventos seja similares em todas as formulações, observou-se que a formulação 3 (Tabela 8), apresentou a maior perda de massa.

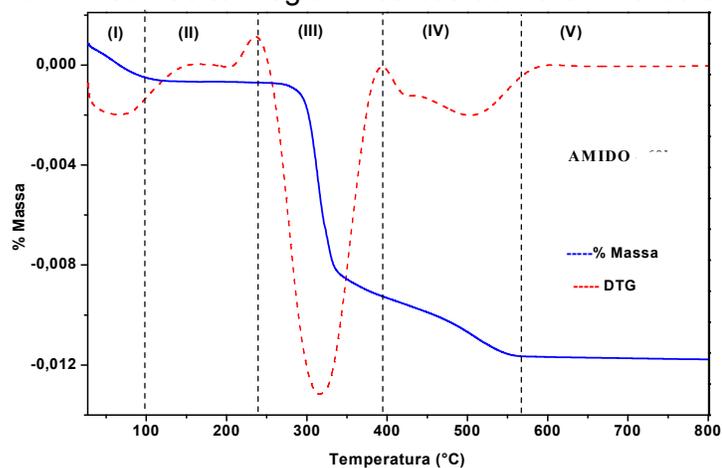
De maneira geral, ao se comparar a figura 12, da curva termogravimétrica da polpa de maracujá, com as formulações (Figuras 13, 14 e 15), observa-se uma menor perda de água e de degradação da matéria orgânica das amostras, demonstrando que os agentes encapsulantes atuaram na proteção dos componentes do maracujá presente nas formulações, sendo que, as formulações 1 e 2 (Figuras 13 e 14) apresentaram melhor proteção aos componentes do maracujá presente na formulação. O comportamento do aerosil, amido e gelatina mediante a análise térmica, é observado nas figuras 16, 17 e 18.

Figura 16 - Curvas termogravimétricas de TG e DTG do aerosil



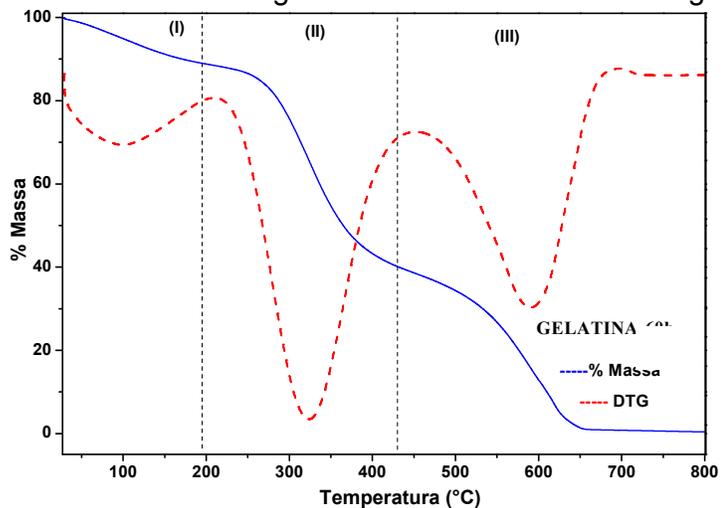
Fonte: Autora (2019).

Figura 17 - Curvas termogravimétricas de TG e DTG do amido



Fonte: Autora (2019).

Figura 18 - Curvas termogravimétricas de TG e DTG da gelatina



Fonte: Autora (2019)

Na figura 16, observa-se que o aerosil, conhecido como sílica coloidal ou dióxido de silício coloidal, não consegue quebrar a molécula, sendo volumoso e higroscópico. Devido a alta concentração de sílica esse material tem boa estabilidade e apresenta baixa perda de massa. O amido é bastante úmido, sendo um polissacarídeo formado pela união de moléculas de α -glicose da amilose e da amilopectina, tem baixa estabilidade perdendo muito massa (Figura 17). A gelatina mistura de poli e oligopeptídios derivados da hidrólise parcial do colágeno, com aspecto de geleia, obtida da pele, ossos e tecidos conjuntivos animais também foi observado uma grande perda de massa (Figura 18).

Mortari (2018), ao formular microencapsulados de *Spirulina*, observou que a utilização de goma arábica nas formulações, pode ser uma boa alternativa para aumentar o efeito protetor nos microencapsulados. A autora verificou que a goma arábica nas formulações de microencapsulados de *Spirulina*, proporcionou uma maior proteção quando comparado com as microcápsulas de *Spirulina* com maltodextrina, ao ser submetidas a uma temperatura de 200°C. Nas microcápsulas de *Spirulina* com maltodextrina, a degradação começou em torno de 160°C.

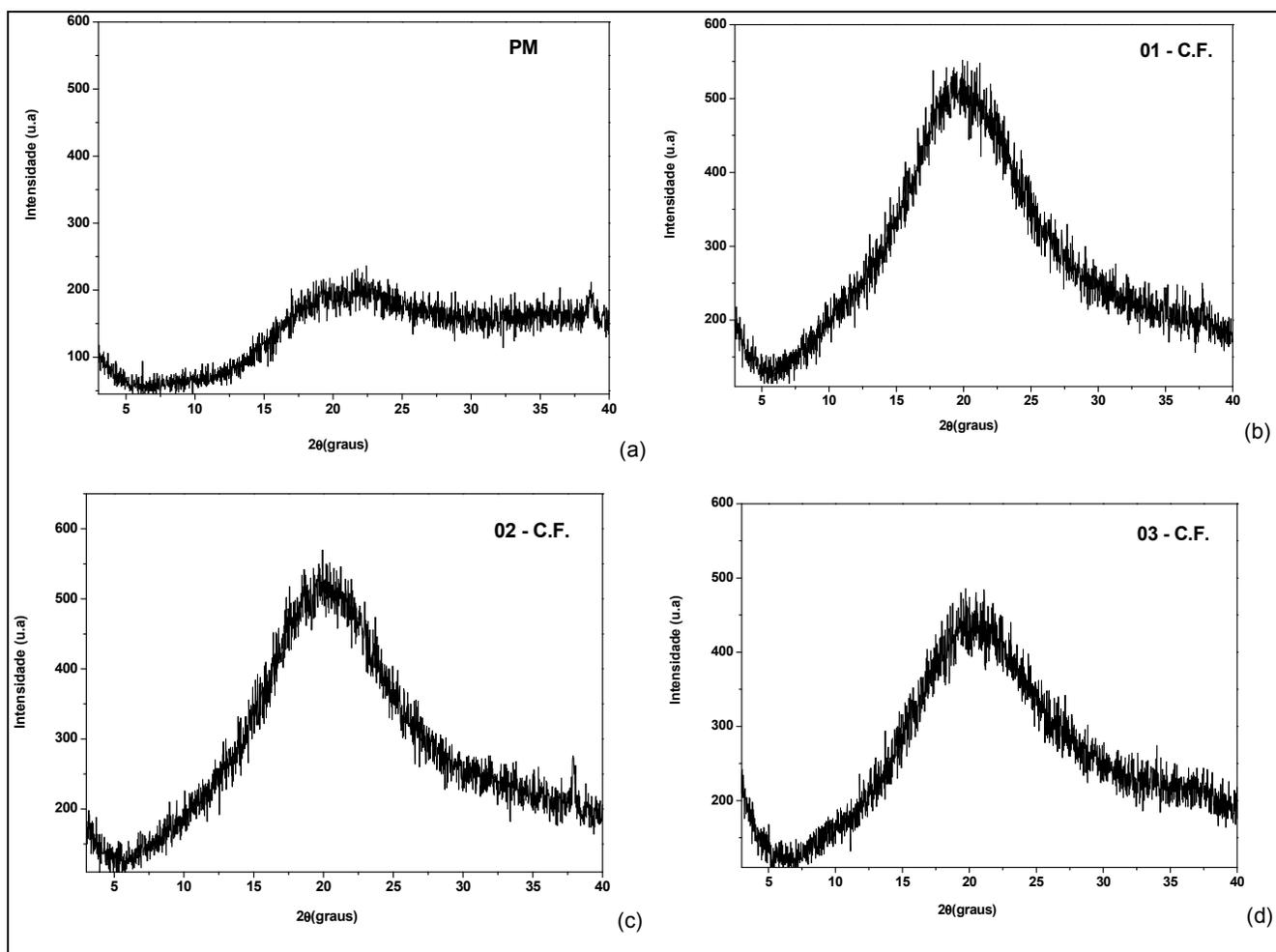
Portanto, a utilização de goma arábica nas formulações de polpa de maracujá, poderia ser uma alternativa para aumentar a proteção dos microencapsulados.

5.2.2 Análises de difratometria de Raio-X (DRX)

A difratometria de raios X foi usada para determinar a estrutura atômica e molecular de um cristal, pois os sólidos cristalinos são obstáculos para os agentes encapsulantes. Esse tipo de análise é realizada com o objetivo de verificar as propriedades de cristalinidade dos polissacarídeos presentes na polpa e nos microencapsulados, que podem afetar a cinética de liberação e a velocidade de degradação da matriz polissacarídica (CANEVAROLO-JUNIOR, 2004).

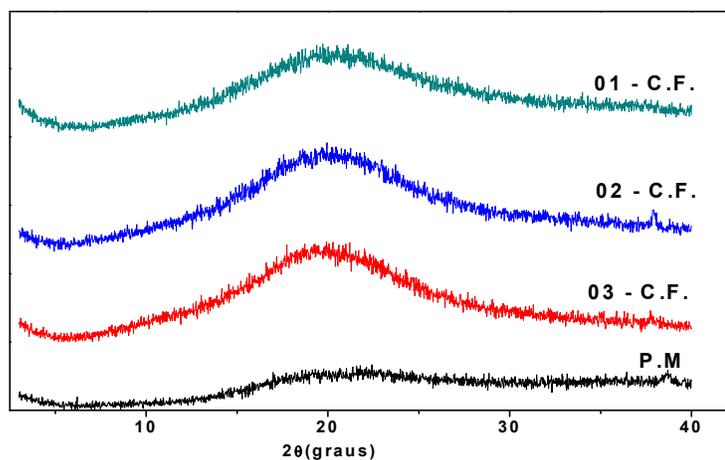
A difratometria de raios X das amostras (Figuras 19 e 20) foram realizadas utilizando um difratômetro da *Shimadzu*, modelo XRD-6000, com radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 0,1542 \text{ nm}$), filtro de Ni, voltagem de 4kV e corrente de 30mA. A aquisição dos dados foi realizada no intervalo de 2θ entre 3 e 40°, com velocidade de varredura de goniômetro de $2^\circ \cdot \text{min}^{-1}$ e passo de $0,02^\circ$.

Figura 19 – Comportamento da polpa de Maracujá (a) e das formulações 1, 2 e 3 (b, c e d) mediante a análise de difratometria de raios X - DRX



Fonte: Autora (2019).

Figura 20 - Comportamento da polpa de Maracujá das formulações na análise de DRX



Fonte: Autora (2019).

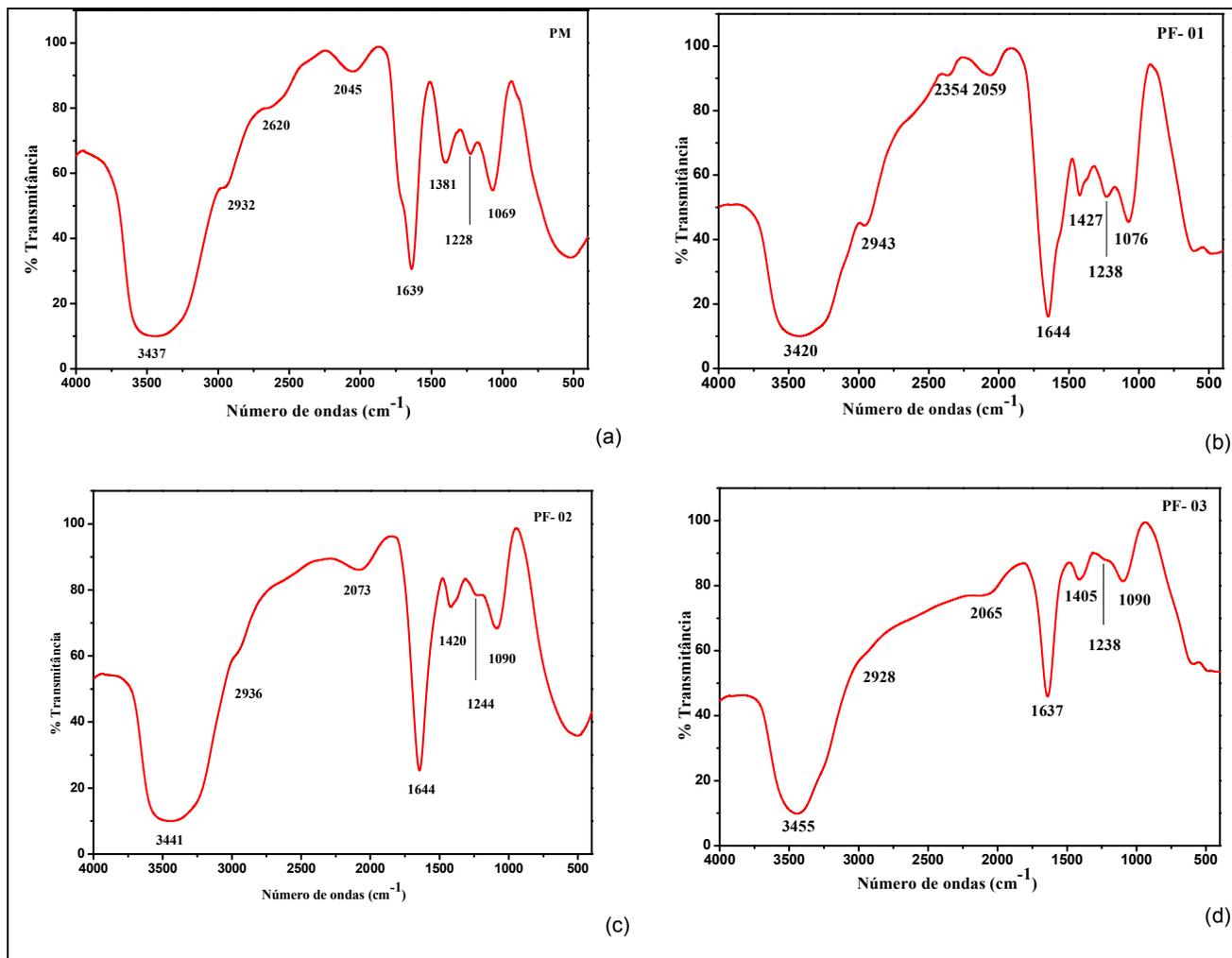
Embora tenha sido observado semelhança nas curvas da DRX da polpa de maracujá e das formulações (01, 02 e 03), não se pode afirmar que elas sejam iguais. Essas curvas se apresentaram amorfas, sem presença de picos, indicando ausência de formas cristalinas, demonstrando que o material é seguro para a produção dos microencapsulados.

De acordo com Muller (2011), a ausência região cristalina em micropartículas, pode ocorrer devido a rápida velocidade de secagem das amostras, não havendo tempo suficiente para que ocorra formação de estrutura com características cristalinas. Ao avaliar micropartículas de óleos essenciais, submetidos a secagem, o autor também curvas amorfas da DRX das micropartículas de óleos essenciais.

5.2.3 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

A espectroscopia de infravermelho, foi necessária para confirmar se processo de encapsulamento das amostras. A figura 21, apresenta o espectro de absorção na região do infravermelho (FTIR) da polpa do maracujá e das formulações 1, 2 e 3.

Figura 21 - Espectro de absorção na região do infravermelho (FTIR) da polpa do maracujá (a) e das formulações 1, 2 e 3 (b, c e d)



Fonte: Autora (2019).

A amostra da polpa do maracujá apresentou um pico intenso na região de 3437cm^{-1} característico dos modos de alongamento simétrico e assimétrico da ligação O-H, que indica a contribuição majoritária da molécula de água (H_2O), que aparece teoricamente em 3500cm^{-1} na maioria das frutas e hortaliças (DIAS, 2008).

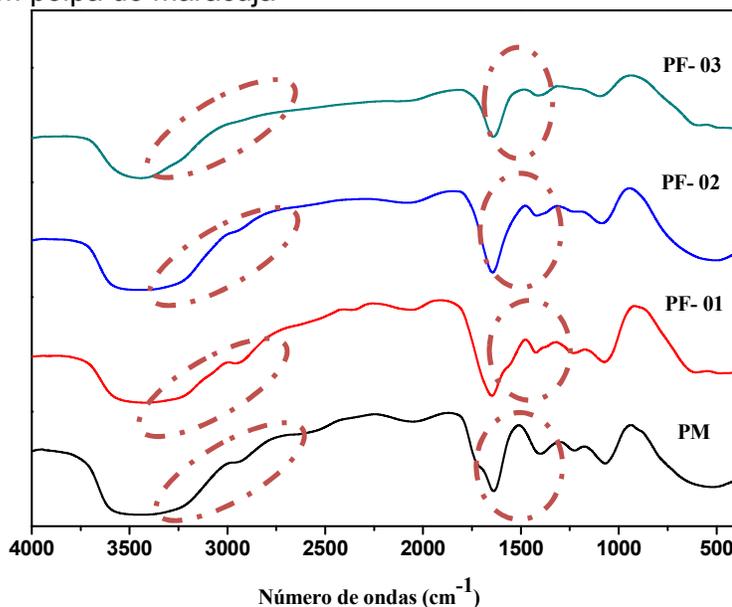
Foram observados também dois picos de baixa intensidade de absorção na região de 2932 e 2620cm^{-1} atribuídos ao alongamento das ligações C-H presentes em sistemas saturados, como nas ligações saturadas dos polissacarídeos (CERQUEIRA et al., 2012). Outro pico observado foi na região de 2045cm^{-1} , absorção nesta região é associada às vibrações de deformação axial de duplas ligações (não acumuladas) e deformações angulares de N-H e $-\text{NH}_2$ (aminas). Na

maioria dos casos, a posição da banda pode ser alterada por efeitos de conjugação ou efeito indutivo dos grupos substituintes.

O pico observado na região de 1639 cm^{-1} está relacionado à banda amida, referente ao grupo amida das proteínas, particularmente do alongamento da ligação $\text{C}=\text{O}$ (DOGAN; SIYAKUS; SEVERCAN, 2007). As bandas na região 1200 a 1000 cm^{-1} são consideradas bandas características desacarídeos e atribuídas ao alongamento das ligações $\text{C}-\text{C}$, $\text{C}-\text{O}$ com alguma contribuição das ligações $\text{C}-\text{O}-\text{H}$ (VAN SOEST et al., 1995).

Conforme observado na figura 22, o espectro de absorção na região do infravermelho (FTIR) da formulação 3, apresentou melhor resultado, em relação as outras formulações, demonstrando que os agentes encapsulantes e as quantidades utilizadas desses agentes nessa formulação, foram suficientes para promover um maior efeito protetor ao composto ativo presente na polpa de maracujá.

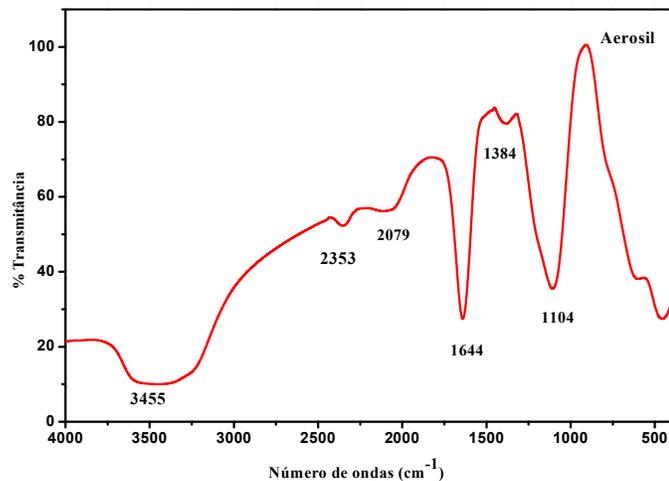
Figura 22 - Espectro de absorção na região do infravermelho (FTIR) da formulação 01, 02 e 03 com polpa do maracujá



Fonte: Autora (2019).

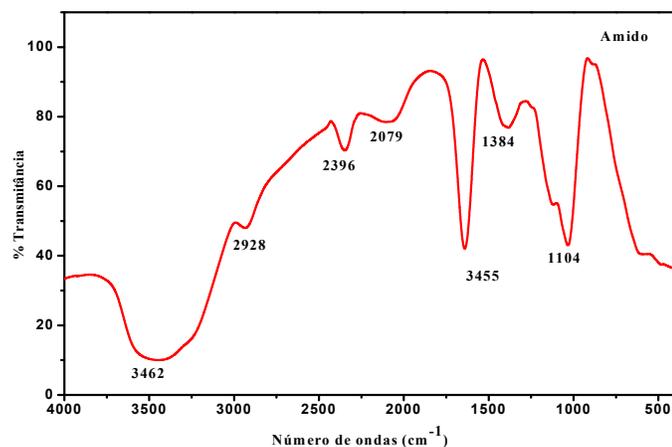
O comportamento dos excipientes farmacêuticos utilizados (aerosil, amido e gelatina), também foram analisados na região do infravermelho. Os espectros de absorção na região do infravermelho (FTIR) desses excipientes são apresentados nas figuras 23, 24, 25 e 26.

Figura 23 - Espectro de absorção na região do infravermelho (FTIR) do Aerosil



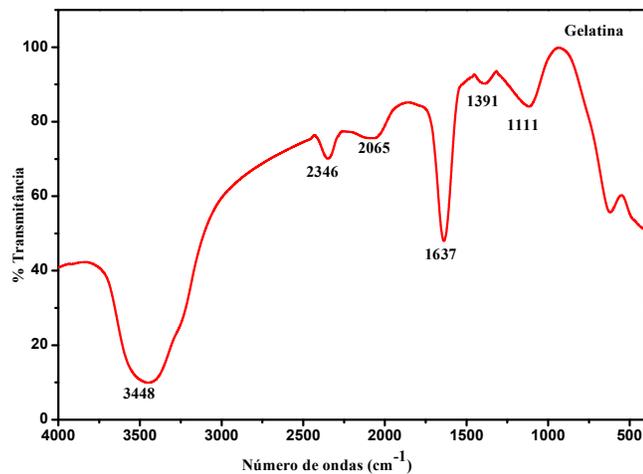
Fonte: autora (2019).

Figura 24 - Espectro de absorção na região do infravermelho (FTIR) do Amido



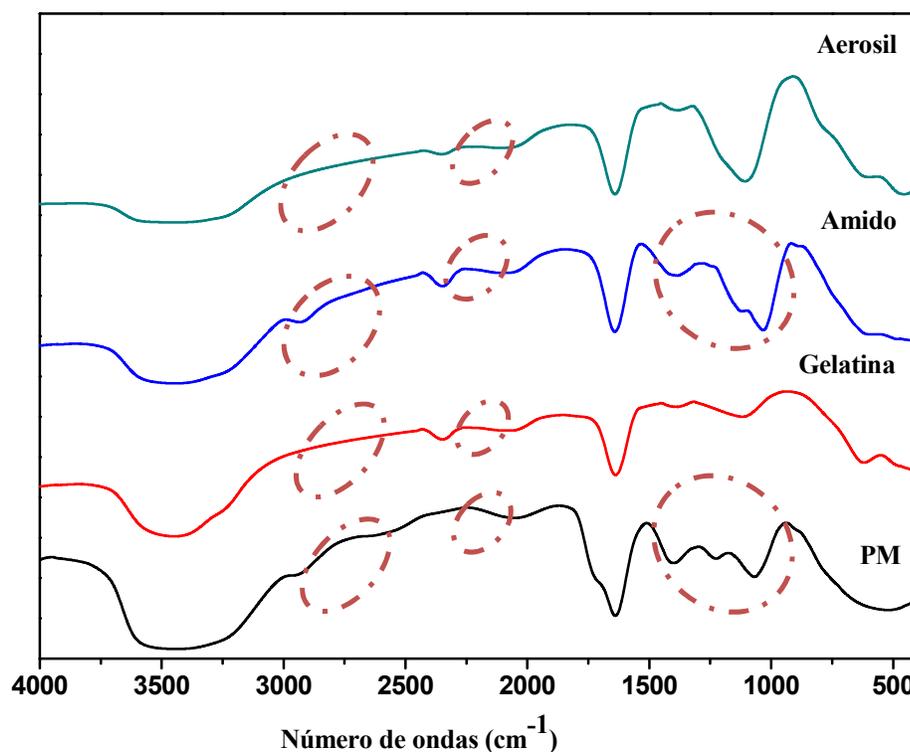
Fonte: Autora (2019).

Figura 25 - Espectro de absorção na região do infravermelho (FTIR) da Gelatina



Fonte: Autora (2019).

Figura 26 - Espectro de absorção na região do infravermelho (FTIR) da polpa do maracujá (PM), Aerosil, Amido e Gelatina



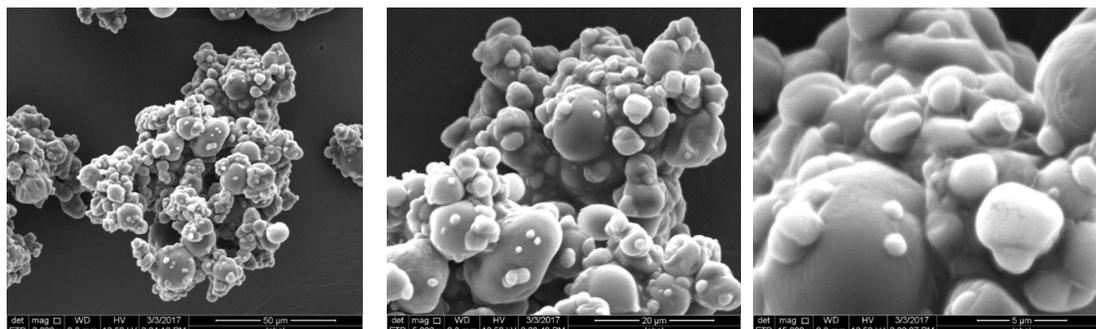
Fonte: Autora (2019).

Não foi possível identificar precisamente o grau de encapsulamento das amostras pela técnica de infravermelho, porém através da microscopia eletrônica de varredura (MEV), foi possível verificar claramente que houve encapsulamento das micropartículas em forma agregada e protegida pelo agente encapsulantes.

5.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

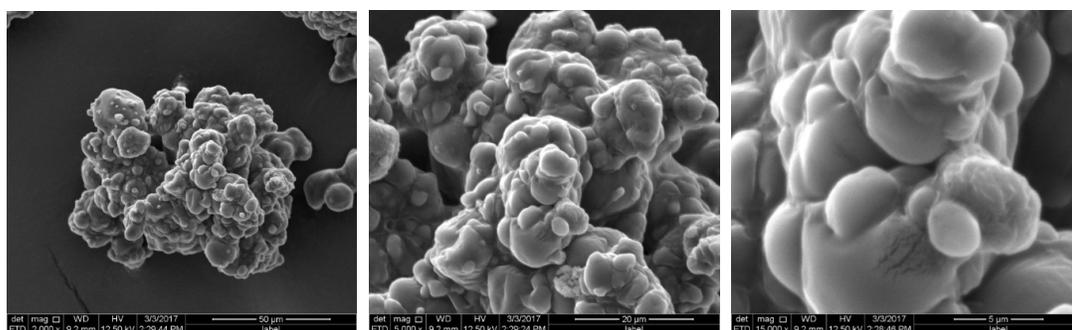
A técnica de MEV foi utilizada no intuito de avaliar a morfologia externa das micropartículas das formulações. Com a análise foi possível observar que a maioria das partículas se apresentaram esféricas, com paredes lisas e integras, sem aparente porosidade. Nas figuras 27 e 28 é apresentado a microscopia eletrônica de varredura com aumento de 2000, 5000 e 15000x, e a figura 29 apresenta aumento de 500, 2000, 5000x.

Figura 27 - Microscopia eletrônica de varredura da formulação 01



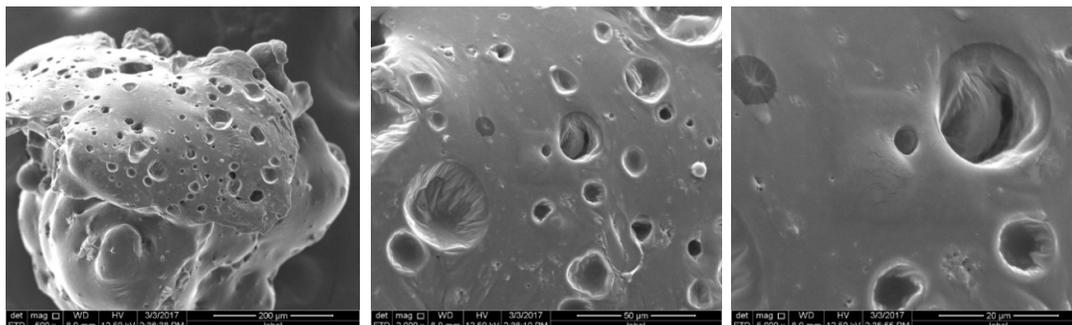
Fonte: Autora (2019)

Figura 28 - Microscopia eletrônica de varredura da formulação 02



Fonte: Autora (2019)

Figura 29 - Microscopia eletrônica de varredura da formulação 03



Fonte: Autora (2019)

Nas formulações 1 e 2 (Figuras 27 e 28), verificou-se que houve encapsulamento das micropartículas em forma agregada e protegida pelo agente encapsulantes, embora se observa que na formulação 2, o encapsulamento se apresentou levemente mais aglomerados. Em relação a formulação 03 (Figura 29), verificou-se que os agentes encapsulante atuaram na proteção dos microencapsulados, porém não foi de forma agregada, como observado nas

formulações 01 e 02. De acordo com Pereira (2000), a quebra de partículas poderá acarretar em perdas significativas de componentes voláteis.

Essa deficiência na agregação dos agentes encapsulantes ocorreu devido a grande quantidade de polpa de maracujá na formação 03. Portanto, as formulações 01 e 02, apresentaram melhor resultado, apresentando maior proteção às micropartículas agregadas.

Rosemberg et al. (1990) afirmam que a retenção de voláteis e a proteção de um produto microencapsulado estão relacionadas com a porosidade e por sua vez as propriedades de escoamento das microcápsulas estão ligadas à estrutura e à morfologia externa das partículas.

5.2.5 Determinação do tamanho de partícula

O estudo do tamanho e distribuição das partículas, é de suma importância para verificação da manutenção das propriedades adquiridas no processo de elaboração dos microencapsulados.

Os valores dos tamanhos de partículas em escala nanométrica variaram entre 1.381 nm (formulação 1) a 5.462 nm (formulação 3) com índice de polidispersão (PDI) entre 0,478 e 0,735 mostrando uma grande variabilidade na dispersão das nanopartículas. Observou-se que a formulação 1, apresentou menor índice de polidispersão, isso indica uma melhor distribuição do tamanho das partículas, e conseqüentemente, apresentou uma melhor microencapsulação quando comparada com as formulações 2 e 3, que apresentaram respectivamente um valor de PDI de 0,668 e 0,735 (Tabela 9).

Tabela 9 - Microscopia eletrônica de varredura da formulação 01

AMOSTRAS	TAMANHO DE PARTÍCULA	PDI
01 PF	1.381 nm	0,478
02 PF	4.763 nm	0,668
03 PF	5.462 nm	0,735

Fonte: Autora (2019)

Segundo Rodrigues (2004) as partículas de menor tamanho podem estar representando o material que não formou complexo (matriz/ativo), já as partículas maiores podem ser oriundas de aglomerações de partículas menores. Isso mostra

que as formulações apresentam uma população de partículas micrométricas (1.186-5.463 nm) e uma população submicrométrica com partículas entre 72-715 nm.

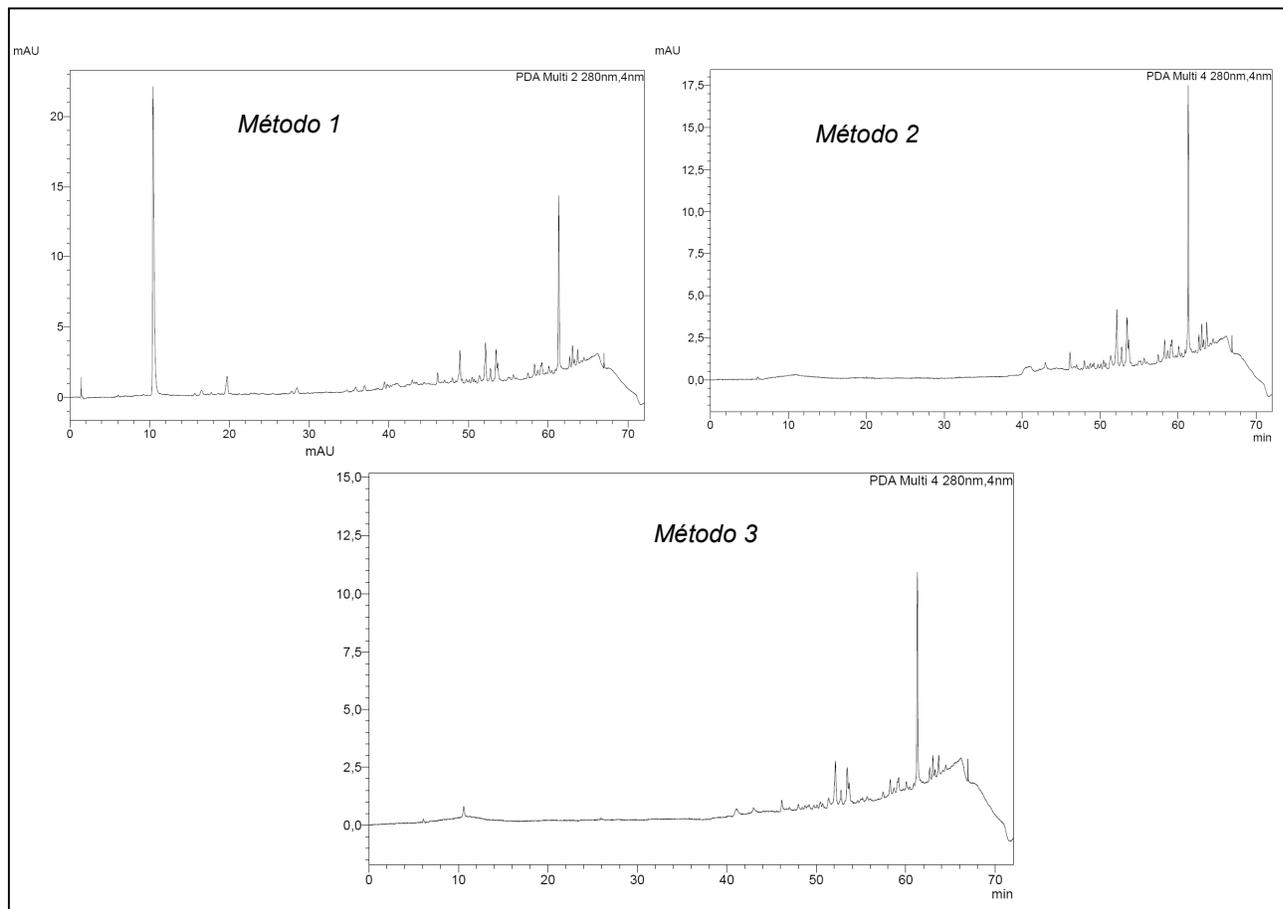
Os valores observados neste trabalho quanto ao tamanho de partícula, apresentou-se dentro dos valores obtidos por Mata et al. (2005), que ao produzirem microencapsulamento do umbu em pó, utilizando diferentes concentrações de maltodextrina (15%), goma arábica (3% e 5%) e β -ciclodextrina (3% e 5%), encontraram valores de tamanho de partícula entre 320 a 9030 nm, ou seja, os tamanhos observados foram menores e maiores aos verificadas no presente estudo.

KIM e MORRI (1996) evidenciam que o tamanho das partículas pode determinar a quantidade de substâncias voláteis na superfície da partícula, porém, a viscosidade não é considerada um fator determinante no estabelecimento do diâmetro das partículas.

5.2.6 Identificação e determinação de fenóis e flavonoides por HPLC

O perfil cromatográfico da polpa de maracujá para identificação de fenóis e flavonoides, foi avaliado mediante três diferentes métodos de extração, que compreenderam o método 1 (utilizando HCl e acetato de etila), método 2 (utilizando HCl juntamente com clorofórmio e carbonato de sódio) e o método 3 (usando clorofórmio juntamente carbonato de sódio). O perfil cromatográfico da polpa de maracujá foi avaliado em um comprimento de onda de 280 nm, para detecção de flavonoides, conforme observado na figura 30.

Figura 30 - Perfil cromatográfico da polpa de maracujá usando diferentes métodos de extração no comprimento de onda de 280nm para detecção de flavonoides

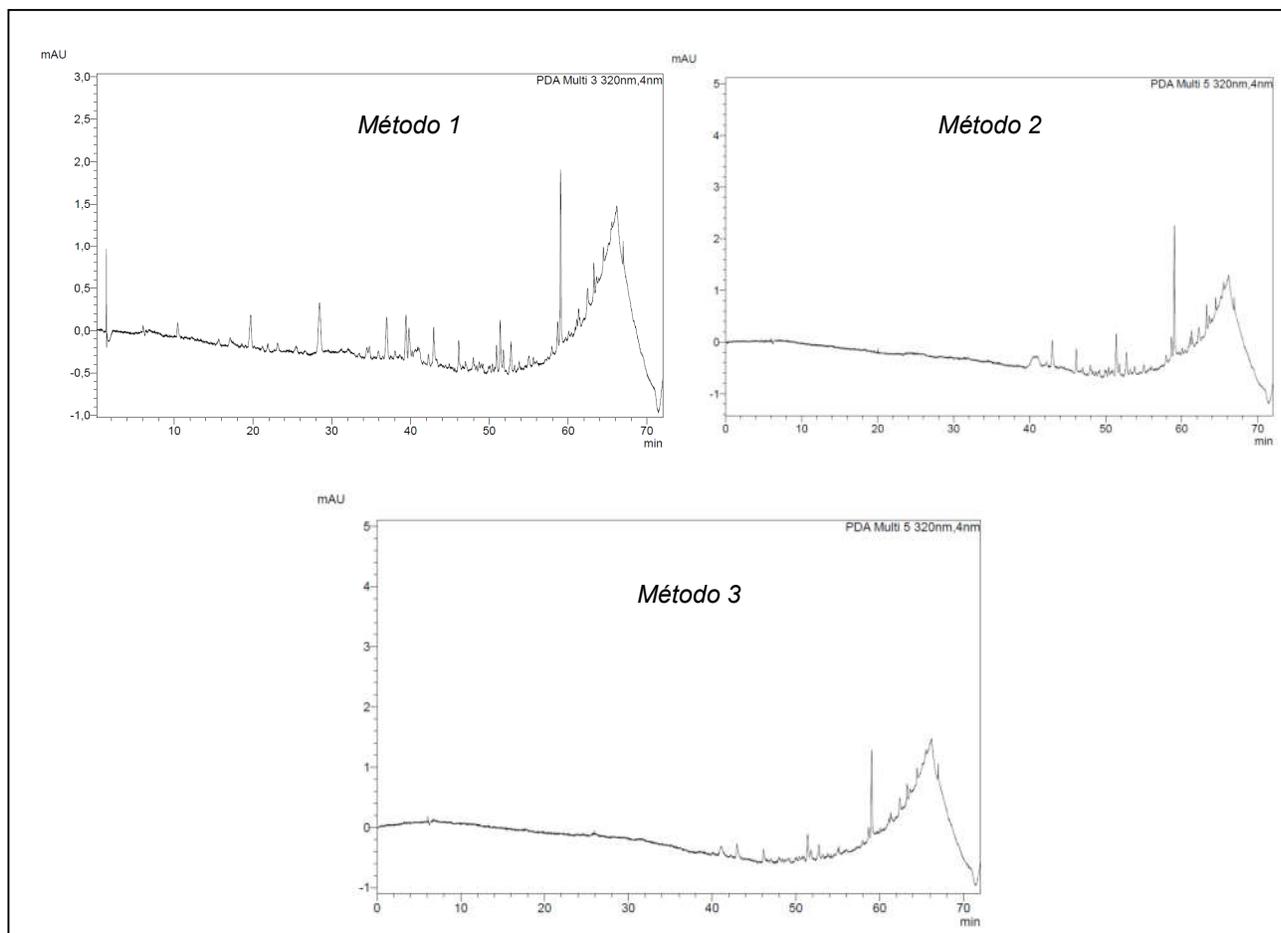


Fonte: Autora (2019)

O método 1, no qual foi utilizado HCl e acetato de etila, foi o método que apresentou melhor perfil para análise cromatográfica da polpa de maracujá para identificação de fenóis e flavonoides. No cromatograma da amostra proveniente do método de extração 1, observa-se dois picos bem definidos, com tempo de retenção de 10 e 61 minutos, enquanto que nos cromatogramas das amostras provenientes dos métodos 2 e 3, apareceu apenas um pico bem definido, com tempo de retenção de 61 minutos.

O perfil cromatográfico da polpa de maracujá, também foi avaliado no comprimento de onda de 320 nm, utilizando as amostras provenientes dos três métodos utilizados, conforme observado na figura 31.

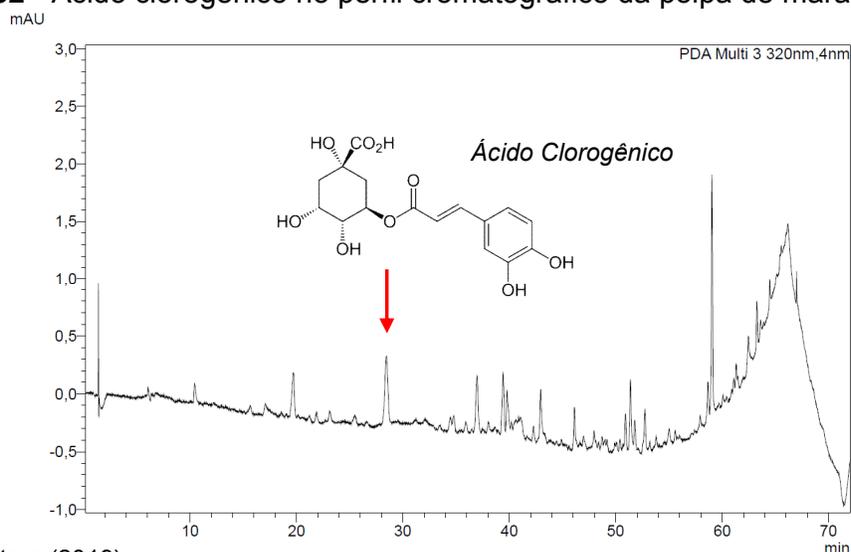
Figura 31 - Perfil cromatográfico da polpa de maracujá usando diferentes métodos de extração no comprimento de onda de 320nm para detecção de compostos fenólicos e ácidos fenólicos



Fonte: Autora (2019)

Com o comprimento de onda de 320 nm, foi observado vários picos, no cromatograma da amostra proveniente do método de extração 1. Nesse cromatograma, foi identificado o ácido clorogênico (Figura 32), e com o comprimento de onda de 365nm, foi identificado a apigenina (Figura 33), utilizando a mesma amostra da polpa de maracujá submetida ao método de extração 1.

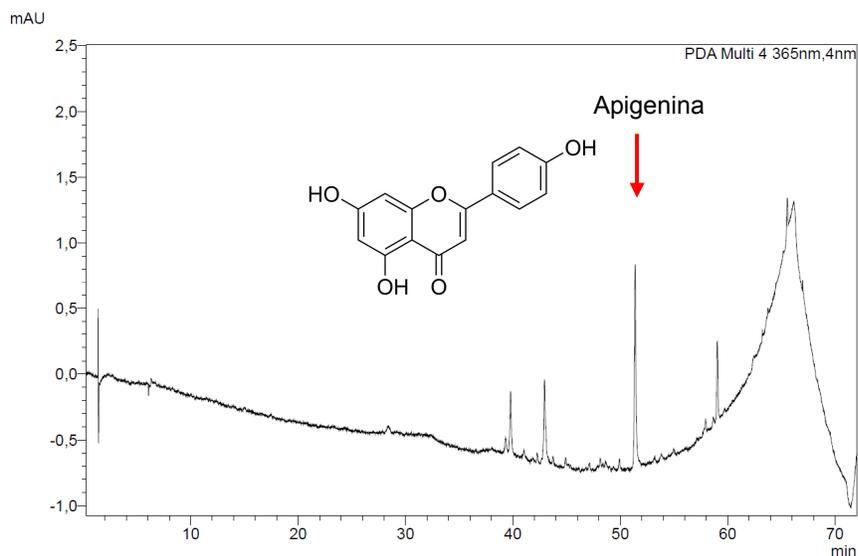
Figura 32 - Ácido clorogênico no perfil cromatográfico da polpa de maracujá



Fonte: Autora (2019)

O termo ácido clorogênico parece ter sido introduzido em 1846 para designar um composto fenólico com função ácida, de estrutura ainda desconhecida, que conferia cor verde ao meio aquoso quando em meio levemente alcalino e exposto ao ar. O ácido clorogênico designa uma família de ésteres formados pela esterificação de um ou mais derivados do ácido trans-cinâmico com o ácido quínico (De MARIA; MOREIRA, 2004). O ácido clorogênico, representa um polifenol juntamente com a quercitina, rutina, catequina, epicatequina entre outros (LOTITO; FREI, 2003), sendo os compostos fenólicos mais abundantes nos alimentos (GHONTHIER, et al., 2003).

Figura 33 - Apigenina no perfil cromatográfico da polpa de maracujá

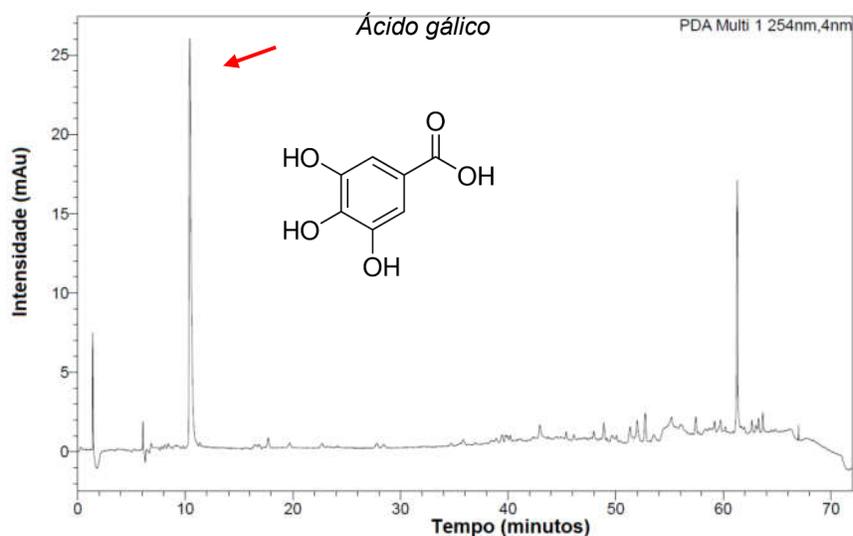


Fonte: Autora (2019)

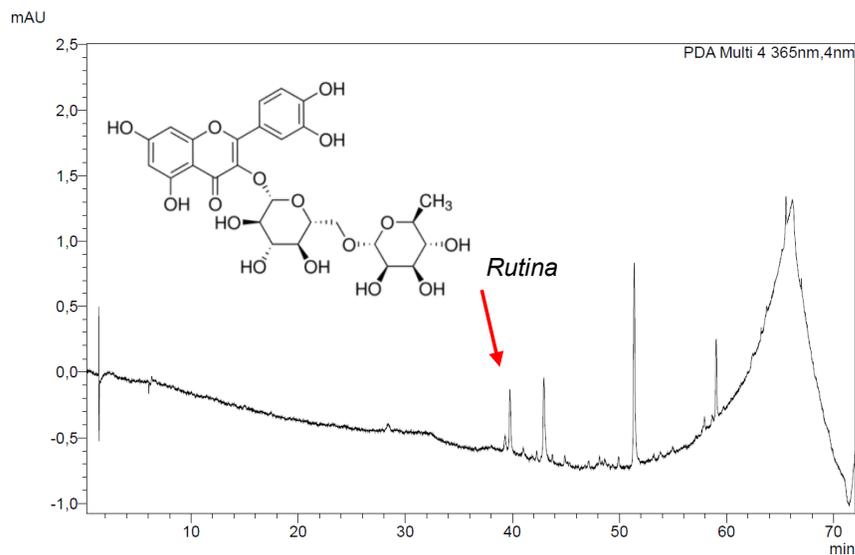
A apigenina, quimicamente denominada 4',5,7-trihidroxiflavona, é um membro da subclasse flavona dos flavonoides e está abundantemente presente em frutas, ervas e legumes comuns, como laranja, camomila, salsa, tomilho, aipo, cebola e pimentão (SILVA, 2014). Acredita-se que este composto tenha várias atividades biológicas, incluindo efeitos antiinflamatórios, antineoplásicos, antivirais, purgativos e propriedades removedoras de radicais livres. Esta flavona apresenta baixa toxicidade intrínseca e é declaradamente não mutagênica (SHUKLA; GUPTA, 2010; SILVA, 2014).

No comprimento de onda de 320nm, também foi possível identificar o ácido gálico, na amostra de polpa de maracujá submetida ao método de extração 1 (Figura 34), e no comprimento de onda de 365nm foi identificado a rutina (Figura 35).

Figura 34 – Ácido gálico no perfil cromatográfico da polpa de maracujá

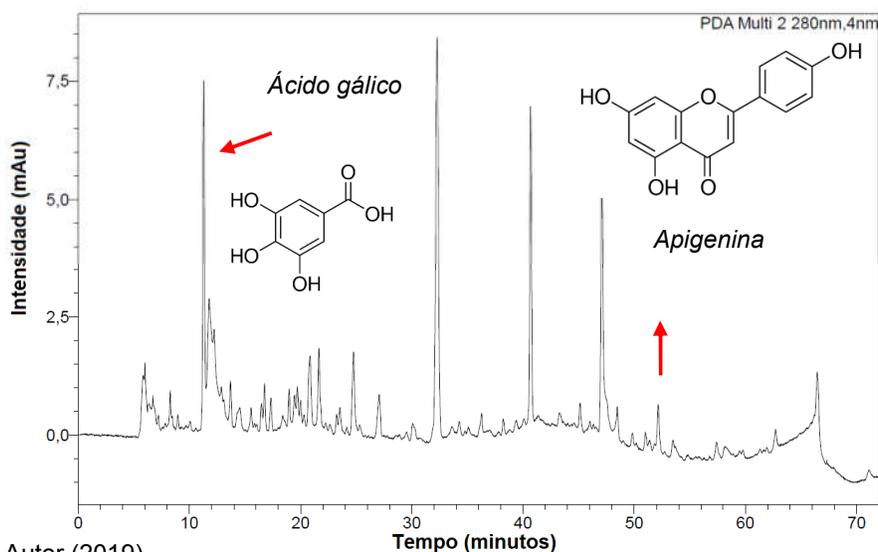


Fonte: Autora (2019)

Figura 35 – Rutina no perfil cromatográfico da polpa de maracujá

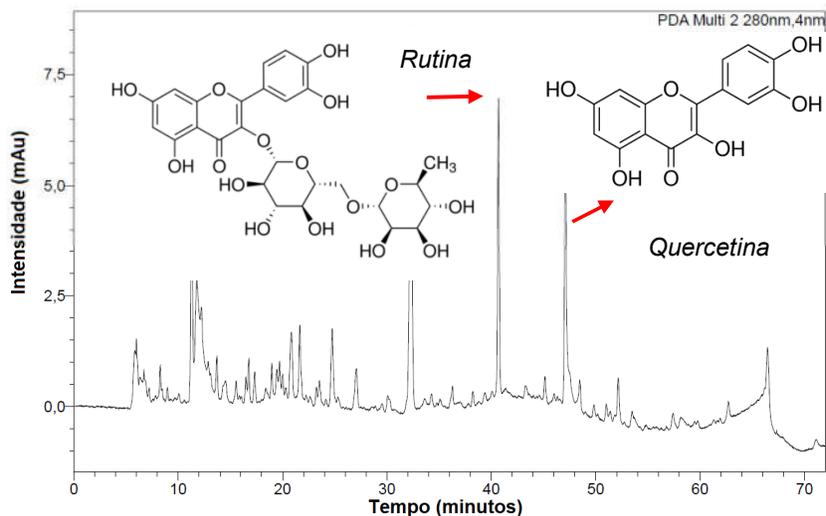
Fonte: Autora (2019)

No perfil cromatográfico dos microencapsulados da formulação 1 (Figuras 36 e 37), foi possível observar no comprimento de 280 nm, a presença de ácido gálico, apigenina, rutina e quercitina.

Figura 36 – Perfil cromatográfico dos microencapsulados da formulação 1 (Ácido gálico e Apigenina)

Fonte: Autor (2019)

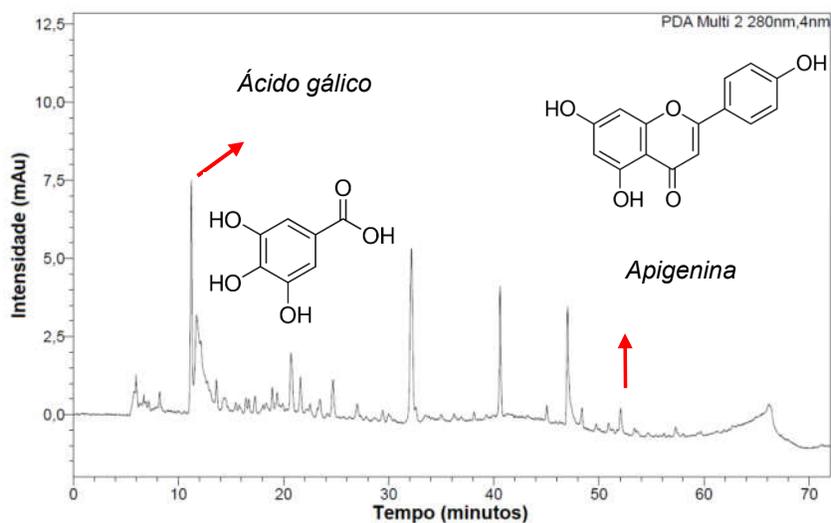
Figura 37 – Perfil cromatográfico dos microencapsulados da formulação 1 (Rutina e Quercitina)



Fonte: Autora (2019)

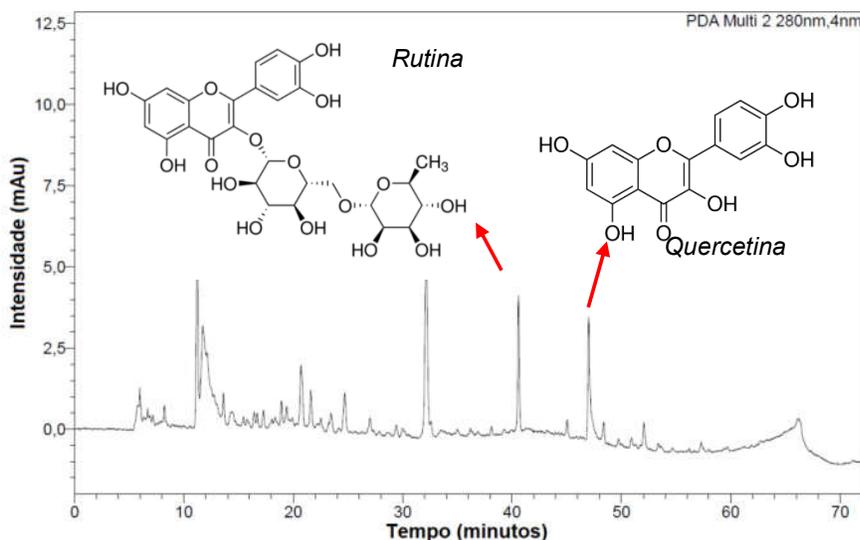
Entre os compostos fenólicos e ácidos fenólicos identificados, observa-se que o ácido gálico e a rutina apresentaram-se com maior intensidade. No perfil cromatográfico dos microencapsulados da formulação 2 (Figuras 38 e 39), com o comprimento de 280 nm, observou-se os mesmos compostos identificados nos microencapsulados da formulação 1, no entanto, a intensidade da rutina foi menor. O ácido gálico também foi o composto que apresentou maior intensidade.

Figura 38 – Perfil cromatográfico dos microencapsulados da formulação 2 (Ácido gálico e Apigenina)



Fonte: Autora (2019)

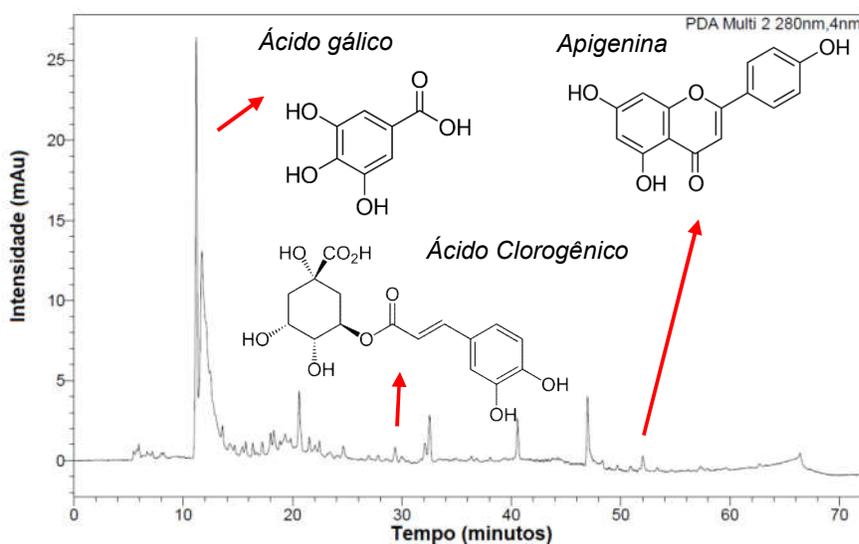
Figura 39 – Perfil cromatográfico dos microencapsulados da formulação 2 (Rutina e Quercitina)



Fonte: Autora (2019)

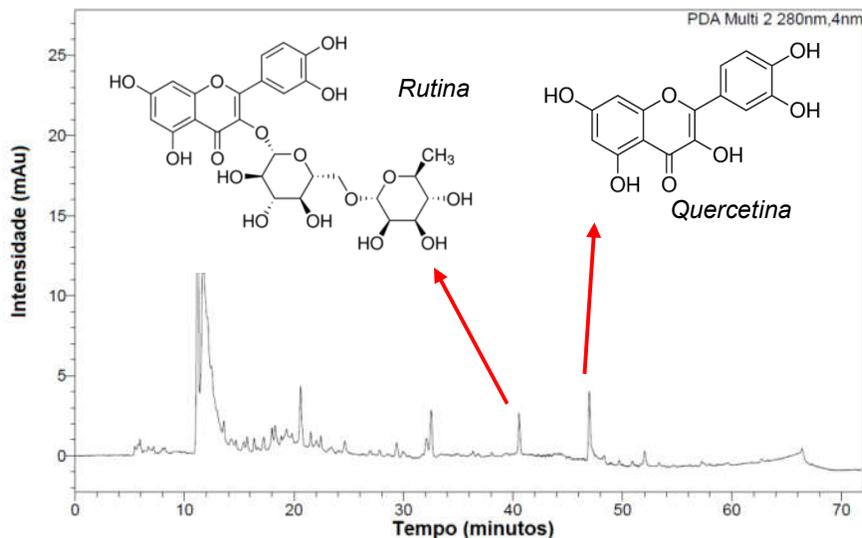
Nas figuras 40 e 41, observa-se o perfil cromatográfico dos microencapsulados da formulação 3. Nesses cromatogramas, foi possível identificar os mesmos compostos e ácidos fenólicos já observados nas formulações 1 e 2, utilizando o mesmo comprimento de onda, 280 nm. No entanto, nessas amostras, também foi identificado o ácido clorogênico (Figura 40).

Figura 40 – Perfil cromatográfico dos microencapsulados da formulação 3 (Ácido gálico, Ácido Clorogênico e Apigenina)



Fonte: Autora (2019)

Figura 41 – Perfil cromatográfico dos microencapsulados da formulação 3 (Rutina e Quercetina)



Fonte: Autora (2019)

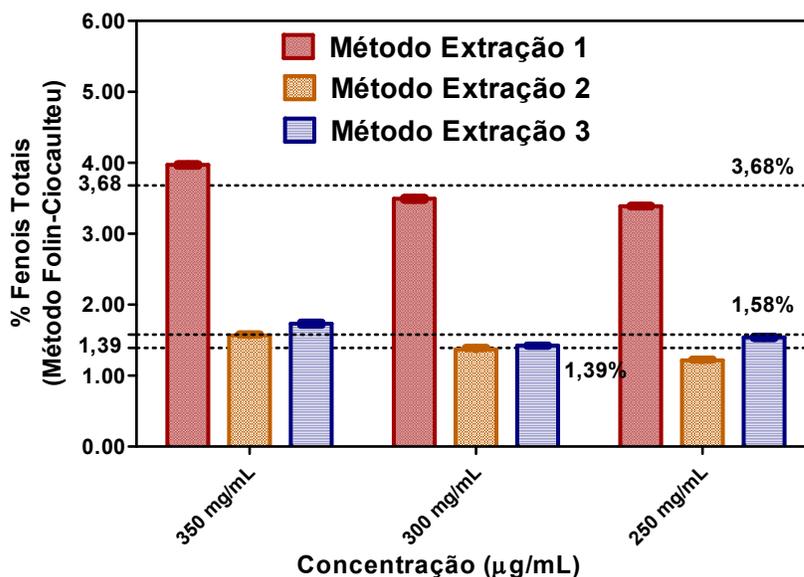
Observa-se que a presença de apigenina na casca do maracujá de espécies distintas, já vem sendo relatadas em alguns estudos (ZERAIK et al., 2012; SIMIRGIOTIS et al., 2013). A quercetina é o principal flavonoide presente na dieta humana, sendo encontrada em grandes concentrações em alguns alimentos como cebolas, maçãs, vinho tinto, brócolis e chás. A quercetina vem se destacando devido ao potencial antioxidante, anticarcinogênico e seus efeitos protetores aos sistemas renal, cardiovascular e hepático, atuando como um protetor contra as espécies reativas de oxigênio, neutralizando os radicais livres e ânions superóxido (BEHLING et al., 2004; PANCHAL et al., 2012; MACHADO et al., 2019). O efeito antioxidante também está relacionado a sua capacidade de inibir enzimas, tais como oxidase de xantina, da NADPH-oxidase e lipoxigenase, prevenindo a morte celular (MORAES; COLLA, 2006).

5.2.7 Determinação de fenóis e flavonoides na polpa de maracujá e nas formulações

Para a determinação das concentrações de fenóis e flavonoides na polpa de maracujá, utilizou-se as amostras provenientes dos três métodos de extração, utilizados na avaliação do perfil cromatográfico da polpa de maracujá. Os resultados

da determinação dos teores de fenóis na polpa de maracujá é apresentado na figura 42. As análises de fenóis totais foram realizadas pelo método *Folin – Ciocalteu*.

Figura 42 - Concentração de fenóis na polpa de maracujá



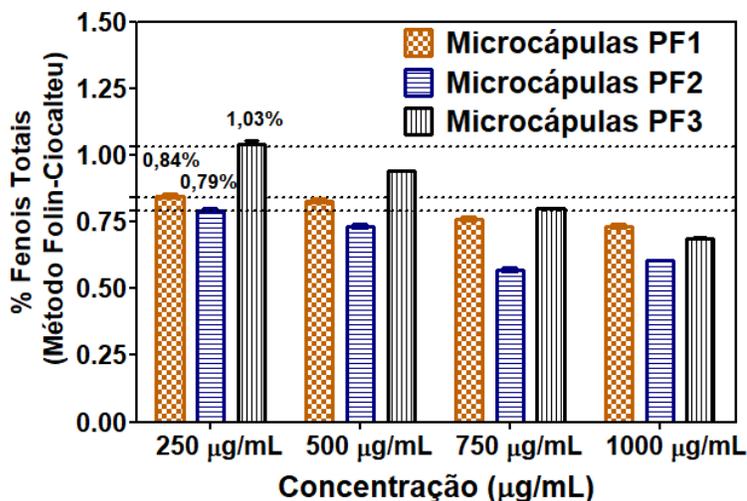
Fonte: Autora (2019)

Analisando os resultados da figura 39, é possível observar a presença de fenóis totais, em todas as amostras polpa de maracujá analisadas, independente do método de extração utilizado. No entanto, o método que extraiu uma maior quantidade de fenóis totais, foi o método de extração 1. Esse método, possibilitou uma maior extração de fenóis, nas concentrações testadas, 350 mg/mL, 300 mg/mL e 250 mg/mL.

Cazarin et al. (2014), também analisaram a concentração de fenóis em farinha obtida da casca do maracujá *Passiflora edulis*, utilizando três métodos de extração diferentes (extrato aquoso, metanólico + acetona e extrato etanólico). Os pesquisadores verificaram concentrações significativamente maiores no extrato aquoso (2,53 mg equivalentes de ácido gálico EAG g⁻¹ de amostra), quando comparado com os outros dois extratos.

Os resultados da determinação dos teores de fenóis nas formulações, são apresentados na figura 43.

Figura 43 - Concentração de fenóis de totais das microcápsulas da polpa de maracujá seca por *Spray Dryer*

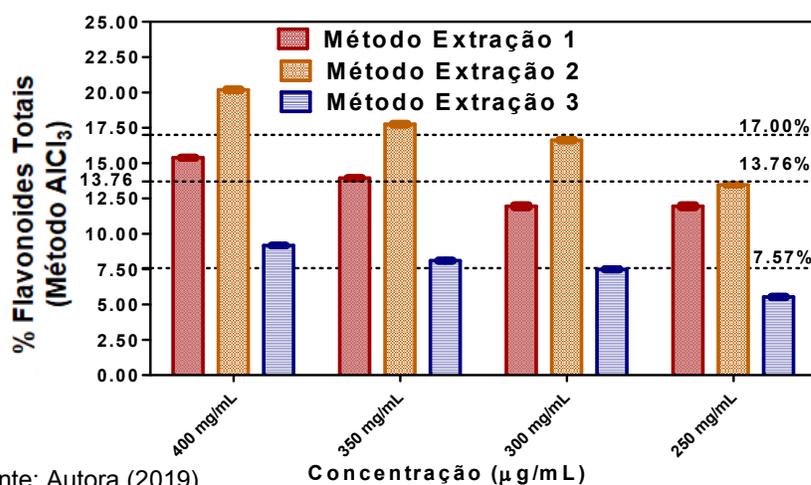


Fonte: Autora (2019)

Os microencapsulados da formulação 1, obteve o mesmo percentual de fenóis totais (0,79%) nas concentrações de 250 e 500 µg/mL. Porém, os microencapsulados da formulação 3, obtiveram maiores percentuais de fenóis, em três concentrações avaliadas (250, 500 e 750 µg/mL). O percentual de fenóis totais nos microencapsulados 2, foram as menores nas quatro concentrações testadas (250, 500, 750 e 1000 µg/mL).

A quantificação de flavonoides na polpa de maracujá e nos microencapsulados, são apresentados nas figuras 44 e 45. As análises de flavonoides foram realizados pelo método cloreto de alumínio (AlCl_3).

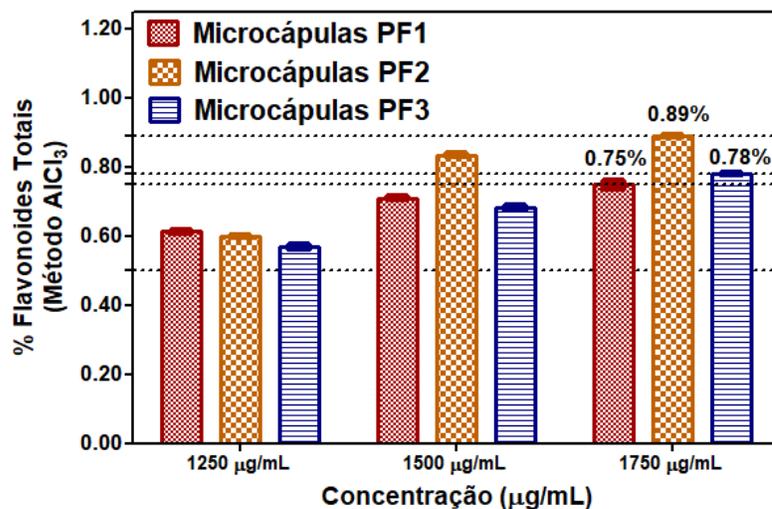
Figura 44 - Concentração de flavonoides na polpa de maracujá



Fonte: Autora (2019)

Quando se avalia os métodos de extração utilizados, observa-se que o método de extração 2, conseguiu extrair uma maior quantidade de flavonoides presentes na polpa, nas quatro concentrações analisadas (400 mg/mL, 350 mg/mL, 300 mg/mL e 250 mg/mL).

Figura 45 - Concentração de flavonoides nas amostras de microencapsulados (Formulações 1 – PF1, 2 – PF2 e 3 – PF3)



Fonte: Autora (2019)

Os microencapsulados da formulação 2 (Figura 45), apresentaram maior percentual de flavonoides nas concentrações de 1500 µg/mL e 1750 µg/mL, alcançando o valor percentual 0,89% na concentração de 1750 µg/mL. Os microencapsulados da formulação 3, apresentou os menores percentuais nas três concentrações analisadas (1250, 1500 e 1750 µg/mL).

A presença de compostos fenólicos no maracujá, já vem sendo relatada em alguns trabalhos. Araújo et al. (2017), ao realizarem a caracterização das propriedades funcionais presentes em pequenas frutas, de coloração vermelha e amarela, nativas do Rio Grande do Sul, verificaram na semente de maracujá uma quantidade de compostos fenólicos de $360,8 \pm 13,2$ mg/100g, sendo encontrado na casca e polpa do maracujá uma quantidade de $276,6 \pm 26,0$ mg/100g. Melo et al. (2008), observaram em polpas de maracujá congeladas comercializadas na cidade do Recife-PE, quantidades de compostos fenólicos totais que chegaram a $83,09 \pm 6,58$ mg/100g. Kuskoski et al. (2006), encontraram em frutos de maracujá,

concentração de $20,0 \pm 2,6$ mg $100g^{-1}$ de polifenóis totais pelo método de *Folin-Ciocalteu*.

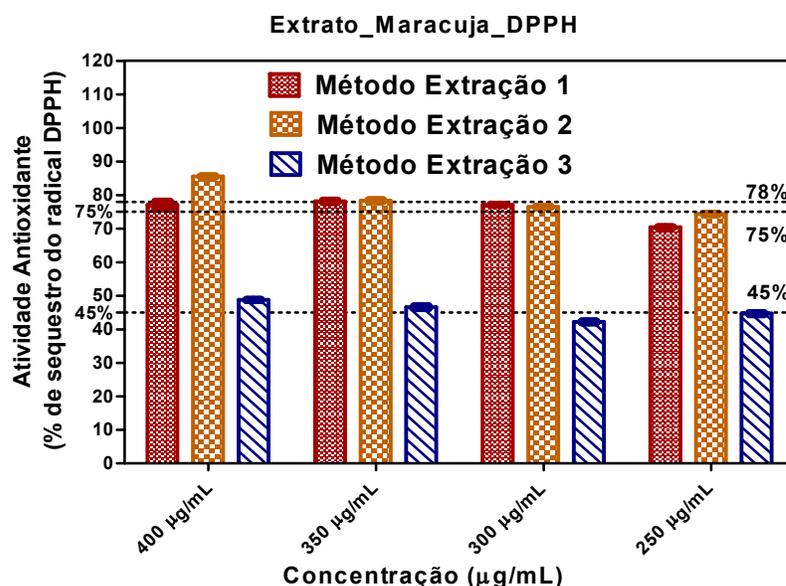
5.3 Avaliação do potencial antioxidante

As amostras provenientes dos três métodos de extração foram testadas quanto ao potencial antioxidante, sendo avaliado o sequestro de radicais livres/DPPH, ABTS e FRAP

5.3.1 DPPH

A capacidade de sequestro de radicais livres/DPPH da polpa de maracujá, está representado no figura 46.

Figura 46 - Sequestro de radicais DPPH utilizando polpa de maracujá



Fonte: Autora (2019)

O método que permitiu um maior sequestro de radicais DPPH, foi o método 2, com 78% de sequestro do radical DPPH. O método de extração 1, também possibilitou uma elevada porcentagem de sequestro do radical DPPH (75%). Já o método 3, apresentou um sequestro do radical DPPH de 45%. Embora o método 3 tenha apresentado uma atividade antioxidante menor, todos os resultados são importantes, pois demonstram o potencial antioxidante dos flavonoides presentes na polpa do maracujá.

Ao avaliar o potencial da atividade antioxidante do maracujá, utilizando o método do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), Kuskoski et al. (2006), encontraram um valor de $1,02 \pm 0,4 \mu\text{mol g}^{-1}$ de atividade antioxidante, equivalente ao Trolox após 60 minutos de reação. No experimento realizado por Lessa (2011) para análise de compostos fenólicos totais na polpa das espécies silvestres *Passiflora cincinnata* e *P. setacea* variaram entre 190,25 a 210,85 mg de ácido gálico equivalente 100g^{-1} .

5.3.2 ABTS e FRAP

O potencial antioxidante de FRAP e ABTS das amostras da polpa provenientes dos métodos de extração 1, 2 e 3 estão descritos na tabela 10. Os resultados estão expressos com base no cálculo do EC50, concentração efetiva à qual o extrato induz metade do efeito máximo.

Tabela 10 – Resultado do potencial antioxidante das amostras de polpa de maracujá avaliadas

Compostos	ABTS		FRAP	
	r	IC ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	r	A _{700 nm} ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$)
Ác. Gálico	0,9918	1,7	0,9956	0,833
Extrato 1	0,9869	159	0,9979	0,091
Extrato 2	0,9750	331	0,9739	0,084
Extrato 3	0,9754	623	0,9801	0,096

Fonte: Autora (2019)

O índice de IC50 é utilizado para expressar o potencial de sequestrar radicais livres, pois reflete a menor concentração necessária do extrato para reduzir ou inibir a oxidação do radical a 50%, no qual é considerada melhor atividade antioxidante (SOUZA, 2013). Miranda (2015), ao avaliar a capacidade antioxidante da folha, casca e polpa do maracujá cobra, utilizando o radical DPPH, verificou IC50 em $\mu\text{g mL}^{-1}$ de 580,65, 15.683,70 e 3.452,28, respectivamente. Os valores encontrados pela autora foram maiores que os observados neste estudo, ou seja, os valores de ABTS dos extratos 1, 2 e 3, apresentaram um potencial de sequestrar radicais livres, em concentrações menores, quando comparado com os valores encontrado por Miranda (2015).

Cabe ressaltar que a atividade antioxidante pode manifestar-se em outras espécie de maneira diferente como exemplo, a *Passiflora setaceae* que em um experimento apresentou cerca de 4 vezes maior potencial antioxidante na semente do que na folha (VIEIRA, 2013).

5.4 Teste *in vitro*

A concentração inibitória mínima (MIC) das formulações 1, 2 e da polpa de maracujá, que inibiu o crescimento de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*, é observada na tabela 11.

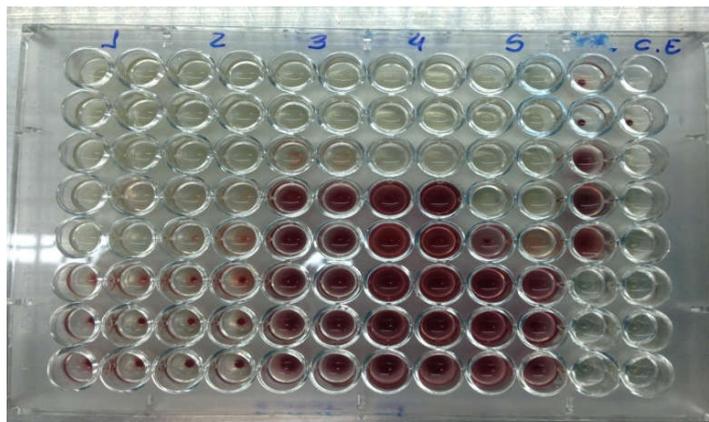
Tabela 11 - Concentração Inibitória Mínima das formulações 1 e 2, e da polpa de maracujá em inibir o crescimento de microrganismos

Preparações		Microrganismos				
		<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
MIC (mg/mL)	Polpa de Maracujá	50	50	50	25	50
	Formulação 1	12,5	12,5	25	12,5	6,25
	Formulação 2	3,12	6,25	25	12,5	12,5
	Formulação 3	Não testada devido ao efeito de coagulação				

Fonte: Autora (2019)

Ao analisar a tabela 11, observa-se que a formulação 2 apresentou melhor resultado na inibição do crescimento de *S. aureus*, *S. epidermidis*, visto que, inibiu o crescimento dessas duas bactérias em uma concentração menor, 3,12 e 6,25 mg/mL, respectivamente, que a apresentada pela formulação 1. Em relação a inibição de *E. coli* e *P. aeruginosa*, não houve diferença na concentração inibitória mínima apresentada pelas duas formulações (1 e 2), que foi de 25 e 12,5 mg/mL, respectivamente para *E. coli* e *P. aeruginosa*. Para *C. albicans*, a formulação 1 apresentou melhor resultado, visto que uma concentração de 6,25 mg/mL, já é suficiente para inibir a proliferação desse fungo. A avaliação da MIC, foi realizada através de placas (Figura 47), e a formulação 3 foi descartada nos ensaios *in vitro*, pois houve absorção de umidade (Figura 48).

Figura 47 - Placas utilizadas no ensaio da MIC



Fonte: Autora (2019)

Figura 48 – Fomulações utilizadas no ensaio da MIC



Fonte: Autora (2019)

Augusto (2006), afirma que a biodisponibilidade de carotenóides e polifenóis é variável e influenciada por fatores como transporte, biotransformação e excreção, que permanecem pouco compreendidos, sendo necessário mais estudos para o estabelecimento de recomendações dietéticas mais específicas desses compostos na alimentação.

Numerosos estudos *in vitro* indicam que polifenóis encontrados em plantas podem efetivamente participar de processos que possam ter implicações anti-carcinogênicas e anti-aterogênicas. Entre estes processos, o mais evidente é a

capacidade antioxidante destes compostos atribuída ao poder redutor do grupo hidroxila aromático, que reduz radicais livres reativos e produz o radical fenoxila estabilizado por ressonância (SUN et al., 2002; MCKAY; BLUMBERG, 2002; CERQUEIRA et al., 2007)

Estudos em humanos voltados para a relação entre consumo aumentado de polifenóis e proteção à saúde têm demonstrado, em alguns casos, reduções em indicadores de danos oxidativos a biomoléculas, como excreção urinária de 8-hidroxi-desoxiguanosina, quebra de fitas de DNA e LDL oxidada. Além dos efeitos antioxidantes, acredita-se que os polifenóis podem exercer efeitos diretos no trato gastrointestinal. Entre esses efeitos inclui-se a ligação a inibidores de telomerase, regulação de vias de transdução de sinal, inibição de ciclooxigenase e lipooxigenase, redução das atividades de xantina oxidase, de metaloproteinase de matriz e da enzima conversora de angiotensina, a competição com glicose para transporte transmembrana e a alteração da função de plaquetas (WILLIAMSON; MANACH, 2005).

O consumo dos microencapsulados nos alimentos aumentaria de forma significativa o aporte de polifenóis pelos consumidores, superando até mesmo, as quantidades ingeridas através da ingestão de alimentos ricos destes compostos, como é caso das frutas vermelhas, vinhos e do próprio maracujá. Portanto, os microencapsulados garantiriam ao consumo o acesso aos polifenóis em qualquer época e região do mundo.

6 CONCLUSÃO

Pode-se constatar que os microencapsulados preparados com gelatina, amido, aerossil, etanol e água, foram os que apresentaram melhor estabilidade ao processo de secagem. A caracterização físico-química desses microencapsulados demonstrou que os encapsulados apresentaram boa estabilidade térmica e perfil de difração de RX e infravermelho semelhante ao da polpa de maracujá.

A avaliação de compostos fenólicos totais na polpa de maracujá, demonstrou que o uso de HCl e acetato de etila foi o melhor método de extração desses compostos. No entanto, para extração de flavonoides, recomenda-se o uso de $AlCl_3$. Foi possível identificar na análise de HPLC da polpa de maracujá e dos microencapsulados a presença de apigenina, ácido gálico, rutina e ácido clorogênico, sendo esse último, identificado somente na polpa e nos microencapsulados da formulação 3. A quercitina também foi observada em todas as amostras das três formulações de microencapsulados.

Em relação a capacidade antioxidante, a polpa de maracujá mostrou melhor efeito antioxidante pelo método DPPH, em comparação com o FRAP e o ABTS. Quanto aos testes *in vitro*, as avaliações de inibição do crescimento de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*, indicaram que os microencapsulados com polpa de maracujá apresentam efeito inibitório no crescimento desses microrganismos, demonstrando possível potencial terapêutico no combate a infecções.

Pretende-se, aplicar os microencapsulados desenvolvidos em diversas formulações na indústria de alimentos, como na produção de “mousse”, bolos e sorvetes, por exemplo. Podendo ser aplicado também, em alimentos gelados, tipo Shake, e na indústria farmacêutica, na produção de fitoterápicos e cosméticos.

REFERÊNCIAS

- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Rev Bras Farmacogn.** 17: 114-140. 2007.
- ALAERTS, G.; MATTHIJS, N.; VERBEKE, J.; HEYDEN Y.; Chromatographic fingerprint development for herbal extracts: A screening and optimization methodology on monolithic columns. **Journal of Chromatography A**, v. 1172, n. 1, p. 1–8, 2007.
- ALBERS, A. P. F.; MELCHIADES, F. G.; MACHADO, R.; BALDO, J. B.; BOSCHI, A. O. Um método simples de caracterização de argilominerais por difração de raios X (A simple method for the characterization of clay minerals by X-ray diffraction). **Cerâmica**, v. 48, n.305, jan/fev/mar 2002.
- ALMEIDA, C. P. **Obtenção e caracterização de microencapsulados de caseinatos carregados com extrato de própolis vermelha.** 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Escola de Enfermagem e Farmácia, Universidade Federal de Alagoas. Maceió, 2017.
- ANDLAUER, W.; FÜRST, P. Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. **Food Research International.** v. 35, p. 171-176, 2002.
- ANJO, D. L. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro.** v. 3, n. 2, p. 145- 154, 2004.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, 127: 183-198. 2002.
- ARAUJO, V. F.; PEREIRA, E. S.; RIBEIRO, J. A.; RAPHAELLI, C. O.; CAMARGO, T. M.; VIZOTTO, M. Frutas nativas vermelhas e amarelas: a diversidade e suas propriedades funcionais Yellow and red native fruits: diversity and its functional properties. **Revista da 14ª Jornada de Pós-Graduação e Pesquisa.** 2017. Disponível em: <http://ediurcamp.urcamp.edu.br/index.php/rcjppg/article/view/685/396>. acesso em: 15 de julho de 2019.
- ARBURTO, L. C.; TAVARES, D. Q.; MARTUCCI, E. T. Microencapsulação de óleo essencial de laranja. **Cienc. Tecnol. Aliment.** n.18, p. 45–48, 1998.
- ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v.11, p. 419- 421, 2000.
- ASCHERI, D. P. R.; et al. Microencapsulação de óleo essencial de laranja: seleção de material de parede. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, p. 1-6, 2003.
- AUGUSTO, O. **Radicais Livres: Bons, maus e naturais, Oficina de Textos.** São Paulo, 2006

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2ª ed. Porto Alegre: Artemed, 2005.

BAKAN, J. Á. Microencapsulation of food and related products. **Food Technol.** Chicago, v. 27, n.11, p. 33–34, 1973.

BASTOS, D. S.; ARAÚJO, K. G. L.; ROCHA-LEÃO, M. H. M. Ascorbic acid retaining using a new calcium alginate – Capsul® based edible film. **J. Microencapsul**, v. 26, p. 97–103, 2009.

BAYOMI, M.A.; AL-SUWAYEH, S.A.; EL-HELW, A.M.; MESNAD, A.F. Preparation of casein-chitosan microspheres containing diltiazem hydrochloride by an aqueous coacervation technique. **Pharm Acta Helv**, v.73, p. 187-192, 1998.

BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Flavonóide Quercetina: Aspectos Gerais e Ações Biológicas. **Alim Nutr.**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BENZIE, I.; STRAIN, J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-76. 1996.

BENZIE, I.; STRAIN, J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. **Methods in Enzymology**, Academic Press, v. 299, p.15-27, 1999.

BORRMANN, D.; PIERUCCI, A. P. T. R.; LEITE, S. G. F.; LEÃO, M. H. M. R. Microencapsulation of passion fruit (*Passiflora*) juice with n-octenylsuccinate-derivatised starch using spray-drying. **Bioproducts processing**, v. 91, p. 23–27, 2013.

BRAGG. W. L. Proc. **Cambridge Phil. Soc.** v.17. n. 43, 1913.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RES 16, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para registro de Alimentos e ou Novos Ingredientes. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 3 dez. 1999.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC 2, de 07 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedade Funcional e ou de Saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 09 jan. 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Suplementos: Anvisa quer regulação específica. 2018. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=4697040&_101_type=content&_101_groupId=219201&_101_urlTitle=publicadas-novas-regras-para-suplementos-alimentares&inheritRedirect=true. Acesso em: 10 out. 2019.

- BRUICE, P. Y. **Química Orgânica**. 4. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2006.
- BRUSCHI, M. L. *et al.* Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray drying technique: preparation and characterization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 264, n. 1-2, p. 45-55, out. 2003.
- CANEVAROLO JR., S. V. **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber Editora, 2004.
- CARVALHO-OKANO, R. M.; VIEIRA, M. F.; BRUCKNER, C. H.; PICANÇO, M. C. Maracujá. Tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado. **Porto Alegre: Cinco Continentes**, p. 33. 2001.
- CAZARIN, C. B. B.; SILVA, J. K.; COLOMEU, T. C.; ZOLLNER, R. L.; MARÓSTICA-JUNIOR, M. R. Capacidade antioxidante e composição química da casca de maracujá (*Passiflora edulis*). **Ciência Rural, Santa Maria**, v.44, n.9, p.1699-1704, set. 2014.
- CEBALLOS, A. M.; GIRALDO, G. I.; ORREGO, C. E. Effect of freezing rate on quality parameters of freeze dried soursop fruit pulp, **J. Food Eng.**, v. 111, p. 360–365, 2012.
- CERQUEIRA, M. A.; SOUZA, B. W. S.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. Effect of glycerol and corn oil on physicochemical properties of polysaccharide films – A comparative study. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 1, p. 175–184, 2012.
- CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.
- CHAN, H. T.; CHANG, T. S. K.; CHENCHIN, E. Nonvolatile acids of passionfruit juice. **J Agric Food Chem.**, v. 20, p. 110-112, 1972.
- COZZOLINO, S. Nutracêuticos: o que Significa?, **ABESO**, v. 55, p.5-7, fev. 2012.
- CÓRDOVA, K. R. V.; GAMA, T. M. M. T. B.; WINTER, C. M. G.; NETO, G. K.; FREITAS, R. J. S. Características físico-químicas da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa* Degener) obtida por secagem. **Bol Cent Pesq Proc Alim.**, v. 23, p.221-230, 2005.
- DE CARVALHO, J. S. **Caracterização de filmes de caseína e caseína acilada**. Ribeirão Preto, 1996. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1996.
- DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Métodos para análise de ácido clorogênico. **Quim. Nova**, v. 27, n. 4, p. 586-592, 2004.
- DENARI, G. B.; CAVALHEIRO, E. T. G. **Princípios e aplicações de análise térmica**. São Carlos: IQSC, 2012. 40 p.
- DEWICK, P. M.; HASLAM, E. Phenol biosynthesis in higher plants. Gallic acid, **Biochem. J.**, v.113, p. 537–542, 1969.

DIAS, A. M. V. **Análise estrutural de farinhas e alguns dos seus componentes.** 2008. 148 f. Dissertação (Mestrado em Química e Qualidade dos Alimentos) – Universidade do Aveiro, Portugal, 2008.

DRASAR, P.; MORAVCOCA, J. Recent advances in analysis of Chinese medical plants and traditional medicines. **Journal of Chromatography B**, v. 812, n. 1, p. 3-21, 2004.

DZIEZAK, J. D. Microencapsulation and encapsulated ingredients. **Food Technol.** Chicago, v. 2, p. 36–51, 1988.

ESTEVES, B. N. **Influência do processo de secagem por pulverização mecânica (*Spray Dryer*) no tamanho de partícula e densidade aparente do café solúvel.** 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

FÄLDT, P.; BERGENSTÅHL, B. Fat encapsulation in spray-dried food powders. **J. Am. Oil Chem. Soc.** v. 72, p.171–176, 1995.

FALLER, A. L. K.; FIALHO, E. Disponibilidade de polifenóis em frutas e hortaliças consumidas no Brasil. **Rev Saú Públ.**, v. 43, n. 2, p. 211-218, 2009.

FARMACOPEIA BRASILEIRA (FARM.BRAS.) 5. ed. Brasília: Editora Fiocruz, 2010.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols - a review, **Trends Food Sci. Technol.**, v. 21, p. 510–523, 2010.

FARIAS, M. R. **Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Porto Alegre, RS; Florianópolis, SC: Editora da UFSC, Editora da UFRGS; 2004. p 263-288.

GHARSALLAOUI, A. A.; ROUDANT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: a review. **Food Research International**, v. 40, p. 1107–1121, 2007.

GHONTHIER, M. P. et al. Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. **J. Nutr.**, v. 133, n. 6, p. 1853-1859, 2003.

GONDIM, J. A. M.; MOURA, M. F. V.; DANTAS, A. S.; MEDEIROS, R. L. S.; SANTOS, K. M. Composição centesimal e de minerais em cascas de frutas. **Cien Technol Aliment.**, v. 25, p. 825-827, 2005.

GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 15, p. 330–347, 2004.

GOULA, A. M.; ADAMOPOULOS, K. G. Spray drying of tomato pulp in dehumidified air: II. The effect on the powder properties. **Journal of Food Engineering**, v. 66, p. 35-42, 2005.

HALLIWELL, B. et al. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**. v. 33, n. 7, p. 601–617, jul. 1995.

HE, X. G. identification of phytochemical constituents in botanical extracts by combined high-performance liquid chromatographic-diode array detection-mass spectrometric techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 880, n. 1-2, p. 203-232, 2000.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structureactivity relationships. **J Nutr Biochem**, v. 13, p. 572-584, 2002.

HENDRINKS, M. M. W. B.; CRUZ-JUAREZ, L.; BONT, D. D.; HALL, R. D. Preprocessing and exploratory analysis of chromatographic profiles of plant extracts. **Analytica Chimica Acta**, v. 545, n. 1, p. 53-64, 2005.

HOGAN, S. A.; MCNAMEE, B. F.; O'RIORDAN, E. D.; O'SULLIVAN, M. Microencapsulating properties of sodium caseinate. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, p. 1934-1938, 2001.

HOSTETTMAN K.; QUEIROZ; E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos, SP: EdUFSCar; 2003. p.152.

HUNGENHOLTZ, J.; SMID, E. J. Nutraceutical production with food-grade microorganisms. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 13, p. 497-507, 2002.

IAC (Instituto Agronômico de Campinas). Disponível em: www.iac.sp.gov.br/UniPesquisa/Fruta/Frutiferas/Maracuja.asp. Acesso em: 1 set. 2018.

IBGE 2007. Produção agrícola municipal. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2007/comentario.pdf>. Acesso em: 1 out. 2018.

IBGE 2019. Produção agrícola municipal, Sistema IBGE de Recuperação Automática (SIDRA). Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457>. Acesso em: 10 out. 2019.

ICHIMURA, T.; YAMANAKA, A.; ICHIBA, T.; TOYOKAWA, T.; KAMADA, Y.; TAMAMURA, T.; MARUYAMA, S. Antihypertensive effect of an extract of *Passiflora edulis* rind in spontaneously hypertensive rats. **Biosci Biotechnol Biochem.**, v. 70, p. 718-721, 2006.

INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. **Maracujá: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos**. Campinas: ITAL. 1994

JACKSON, L. S.; LEE, K. Microencapsulation in the food industry. **Lebensm Wiss Technol.**, v. 24, p. 289-297, 1991.

KAHN, H. (2001) Microscopia eletrônica de varredura e microanálise química. **Microscopia Eletronica de Varedurra**. Disponível em: http://www.angelfire.com/crazy3/qfl2308/1_multipart_xF8FF_4_MEV_PMI-2201.pdf. Acesso em: 1 out. 2018.

KEOGH, M. K.; O'KENNEDY, B. T.; KELLY, J.; AUTY, M. A.; KELLY, P. M.; FUREBY, A.; HAAHR, A. M. Stability to oxidation of spraydried fish oil powder microencapsulated using milk ingredients. **J. Food Sci.**, v. 66, p. 217–224, 2001.

KIDOY, L.; NYGARD, A. M.; ANDERSEN, O. M.; PEDERSEN, A. T.; AKSNES, D. W.; KIREMIRE, B. T. Anthocyanins in fruits of *Passiflora edulis* and *P. suberosa*. **J Food Compos Anal.**, v. 10, p. 49-54, 1997.

KIM, Y. D.; MORR, C. V. Microencapsulation properties of gum arabic and several food proteins: spray-dried orange oil emulsion particles. **J. Agric. Food Chem.** v. 44, p. 1314–1320, 1996.

KOBORI, C. N.; JORGE, N. Caracterização dos óleos de algumas sementes de frutas como aproveitamento de resíduos industriais. **Cien Agrotec**, v. 29, p. 1008 – 1014, 2005.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; MORALES, M. T.; FETT, R. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Cien Rural**, v. 36, p. 1283-1287, 2006.

KWAK, N.; JUKES, D. J. Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept. **Food Control.** v. 12, p.99-107. 2001a.

KWAK, N.; JUKES, D. J. Functional foods. Part 2: the impact on current regulatory terminology. **Food Control.** v. 12, p. 109-117. 2001b.

LESSA, A. O. **Determinação do teor de compostos fitoquímicos e estudo do potencial para processamento da polpa de frutos de maracujás da espécie silvestres (*Passiflora setacea* DC, *Passiflora cincinnata* MAST)** Bahia, 2011. 83 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Alimentos) - Programa de Pós-Graduação “Strito Senso” do curso de Especialização em Engenharia e Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2011.

LIN, C. C.; LIN, S. Y.; HWANG, L. S. Microencapsulation of squid oil with hydrophilic macromolecules for oxidative and thermal stabilization. **J. Food Sci.** 60, 36–39. 1995.

LOTITO, S. B.; FREI, B. Relevance of apple polyphenols as antioxidants in human plasma: contrasting in vitro and in vivo effects. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 36, n. 2, p. 201-211, 2003.

MACHADO, G.; FURINI PUTON, B.; DALLAZEM BERTOL, C. Nutracêuticos: aspectos legais e científicos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.16, n.E. 2019.

MAGALHÃES, L. M.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S.; LIMA, J. L. F. C. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, n.1, p. 1-19, 2008.

MALISK, A. M. Microscopia Eletrônica de Varredura. **Material Didático de Microscopia Eletrônica de Varredura e Microanálise**. Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Santa Catarina, 2000. Disponível em: http://www.usp.br/nanobiodev/wp-content/uploads/MEV_Apostila.pdf. Acesso em: 2 out. 2018.

- MARTINS, P. P.; NICOLETTI, M. A. Polifenóis no vinho: resveratrol e seus benefícios Polyphenols in wine: resveratrol and its benefits. **Infarma – Ciências Farmacêuticas**. v. 28, 4. ed., p. 216-225, 2016.
- MATA, M. E. R. M. C.; MEDEIROS, S. S. A.; DUARTE, M. E. M. Microencapsulamento do umbu em pó com diferentes formulações de maltodextrina: estudo do tamanho das partículas por microscopia eletrônica. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.7, n.1, p.59-70, 2005.
- MCKAY, D. L.; BLUMBERG, J. B. **J. Am. Coll. Nutr.** 21, 1. 2002.
- MELETTI, L. M. M. **Maracujá: produção e comercialização em São Paulo**. Campinas: IAC. 1996.
- MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.; SCHENKEL, E. P.; SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. ed. Rio Grande do Sul: UFSC, 2007. 1104 p.
- MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G.; ARAÚJO, C. R. Teor de fenólicos totais e capacidade antioxidante de polpas congeladas de frutas. **Alim. Nutr.** Araraquara, v.19, n.1, p. 67-72, jan./mar. 2008.
- MEYER, V. R. **Reversed-phase chromatography**. In: Practical HighPerformance Liquid Chromatography. Chichester: Wiley; 1993. p. 144-157.
- MIRANDA, C. E. P. **Compostos bioativos do maracujá cobra (*Passiflora trintae*)**. UBERABA – MG. 2015. 51 f. Dissertação de (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Campus Uberaba, Programa de Pós-Graduação do Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2015.
- MORAES F. P.; COLLA L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 99-112, 2006.
- MORTON, J. **Passionfruit**. 1987. Disponível em: <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/Passionfruit.html>. Acesso em: 14 dez. 2008.
- MÜLLER, P. S. **Microencapsulação de óleo essencial de laranja**. Curitiba, 2011. 98 f. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Paraná.
- MUNIN, A.; EDWARDS-LÉVY, F. Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. **Pharmaceutics**, v. 3, p. 793–829, 2011.
- MURUGESAN, R.; ORSAT, V. Spray drying for the production of nutraceutical ingredients - a review, **Food Bioprocess Technol.**, v.5, p. 3–14, 2012.
- NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Approved Standard-fifth Edition M7-A5 NCCLS, Wayne, PA, 2001.

NEDOVIC, V.; KALUSEVIC, A.; MANOJLOVIC, V.; LEVIC, S.; BUGARSKI, B. An overview of encapsulation technologies for food applications, **Procedia Food Sci.**, v.1, p.1806–1815, 2011.

NEUMANN, P., et al. Alimentos saudáveis, alimentos funcionais, fármaco alimentos, nutraceuticos, você já ouviu falar? **Higiene Alimentar**. v. 14, p. 19-23, 2002.

NOONAN, W. P.; NOONAN, C. Legal requirements for “functional foods” claims. **Toxicology Letters**. v. 150, p. 19-24, 2004.

NOONAN, W. P.; NOONAN, C. Legal requirements for “functional foods” claims. **Toxicology Letters**. v. 150, p. 19-24, 2004.

ONEDA, F.; RÉ, M. I. The effect of formulation variables on the dissolution and physical properties of spray-dried microspheres containing organic salt. **Powder Technology**. v. 130, n. 1–3, p. 377– 84, fev. 2003.

ORREGO, C. E.; SALGADO, N.; BOTERO, C.A. Developments and trends in fruit bar production and characterization, **CRC Crit. Rev. Food Sci.**, 53, 1–13. 2013.

OU, B.; HUANG, D.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J.; DEEMER, E. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study. **Journal of Agriculture, Food and Chemistry**, v. 50, p. 3122- 3128, 2002.

PAIVA, R. Leite com maracujá. **Rev Globo Rural**, v. 152, p. 9-15, 1998.

PANCHAL, S. K.; POUDYAL, H.; BROWN, L. Quercetin Ameliorates Cardiovascular, Hepatic, and Metabolic Changes in Diet-Induced Metabolic Syndrome in Rats. **J Nutr.**, v. 142, n. 6, p. 1026-1032, 2012.

PEREIRA, A. **Avaliação microestrutural de pós de suco de maracujá obtidos por spray drying**.2000. 62f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

PINHEIRO, A. M.; FERNANDES, A. G.; FAI, A. E. C.; DO PRADO, G. M.; DE SOUSA, P. H. M.; MAIA G. A. Avaliação química, físico-química e microbiológica de sucos de frutas integrais: abacaxi, caju e maracujá. **Cien Tecnol Aliment.**, v. 26, p. 98–103, 2006.

POTHAKAMURY, U. R.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Fundamental aspects of controlled release in food. **Trends Food Sci. Technol**. v.6, p. 397–407, 1995.

PRIOR, R.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4290-4302, 2005.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3396-3402, 2000.

RAFFIN, R. P. et al. Sodium pantoprazole-loaded enteric microparticles prepared by spray drying: effect of the scale of production and process validation. **International Journal of Pharmaceutics.**, v. 324, n. 1, p. 10–18, out. 2006.

RAMÍREZ, M. J.; I. G. G.; ORREGO, C. E. Modeling and stability of polyphenol in spray-dried and freeze-dried fruit encapsulates, **Powder Technology**, 277, 89–96. 2015.

RAMOS, E. R. F. **O uso de Passiflora spp. no controle do Diabetes mellitus: estudo qualitativo preliminar.** Maringá. 2004. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Centro Universitário de Maringá, Maringá, 2004.

RÉ, M. I. Microencapsulation by spray-drying. **Dry Technol.**, v. 16, p. 1195–1236, 1998.

RE, R.; PELEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 26, n. 9/10, p. 1231-1237, 1999.

RISCH, S. J. Encapsulation: overview of uses and techniques. In: Risch, S.J., Reineccius, G.A. (Eds.), **American Chemist's Society, Symposium Series**, vol. 590. Washington, DC, pp. 2–7. 1995.

ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**. v. 34, Suppl. 2, p. 105-10, 2002.

ROMERO-RODRIGUEZ, M. A.; VAZQUEZ-ODERIZ, M. L.; LOPEZ-HERNANDEZ, J.; SIMAL-LOZANO, J. Composition of babaco, feijoa, passion-fruit and tamarillo produced in Galicia (NW Spain). **Food Chem.**, v. 49, p. 23-27, 1994.

ROSENBERG, M.; KOPELMAN, I. J.; TALMON, Y. Factors affecting retention in spray-drying microencapsulation of volatile materials. **J. Agric. Food Chem.**, v.36, p. 1288-1294, 1990.

RUFINO, M.; ALVES, R.; SOUSA, E.; DE MORAIS, S.; DE GOES, C.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Metodologia científica: Determinação de atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). Comunicação Técnica online 125, **Embrapa**. 2006.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; JIMÉNEZ, J. P.; CALIXTO, F. D. S. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS^{•+}. Comunicado Técnico 128. **Embrapa**, Fortaleza, 2007.

RUGGIERO, C. Cultura do maracujazeiro. Ribeirão Preto: **Legis Summa**. 1987.

- SÁNCHEZ-GONZALEZ, I.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; SAURA-CALIXTO, F. In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (italian, espresso and filter). **Food Chemistry**, Oxford, v. 90, n. 2, p. 133-139, 2005.
- SANCHEZ-MORENO, C. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Sci Technol Int** ., v. 8, n. 3, p.121–137, 2002.
- SANSONE, F.; MENCHERINI, T.; PICERNO, M. D'AMORE, P.; AQUINO, R. P.; LAURO, M. R. Maltodextrin/pectin microparticles by spray drying as carrier for nutraceutical extracts, **J. Food Eng.**, v. 105, p. 468–476, 2011.
- SANTOS, A. O. **Difração de raios-X de n-feixes na caracterização estrutural de monocristais sob a ação de temperatura e campo elétrico externo**. 2006. Tese (Doutorado) - Instituto de Física “Gleb Wataghin”, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
- SANTOS, D. S. **Desenvolvimento de Método por CLAE-DAD para Determinação de Espilantol em *Spilantes acmella* (L.) Murray**. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, Universidade Federal de Sergipe, 2010.
- SHAHIDI, A.; HAN, X. Q. Encapsulation of food ingredients. **Crit. Rev. Food Sci.**, v. 33, p. 501–547, 1993.
- SHAHIDI, F.; ALASAVAR, C.; LIYANA-PATHIRANA, C. M. Antioxidant phytochemicals in hazelnut kernel (*corylus avellana* L) and hazelnut byproducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 55, n. 4, p. 1212 – 1220, jan. 2007.
- SHAPIRA, A. et al. β -casein nanoparticle-based oral drug delivery system for potential treatment of gastric carcinoma: stability, target-activated release and cytotoxicity. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 80, n. 2, p. 298 – 305, fev. 2012.
- SHUKLA S.; GUPTA S. Apigenin: A Promising Molecule for Cancer Prevention. **Pharm Res**. v. 27, n. 6, p. 962–978, 2010.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.
- SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**, 5ª ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1994.
- SILVA, D. C. **Ensaio físicos dos excipientes e avaliação das farmacopeias**. 2013. 53 f. (Monografia) - Pós-Graduação em Tecnologia Industrial Farmacêutica de Farmanguinhos, Instituto de Tecnologia em Fármacos, Rio de Janeiro, 2013.
- SILVA, F. F. **Estudo do efeito in vitro e in vivo da apigenina em *Leishmania amazonenses***. 2014. 69 f.. Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.

SIMIRGIOTIS, M.J. et al. The *Passiflora tripartita* (Banana Passion) fruit: a source of bioactive flavonoid c-glycosides isolated by HSCCC and characterized by HPLC-DAD-ESI/MS/MS. **Molecules**, v.18, n.2, p.1672-1692, 2013.

SNYDER, L. R., KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. New York: Wiley; 1997. p. 233-291. **Non-ionic samples: reversed and normal phase HPLC**. In: Practical HPLC method development.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev Nutr.**, v. 15, n. 1, p. 71-78, 2002.

SOUCI, S. W.; FACHMANN, W.; KRAUT, H. Food Composition and Nutrition Tables. **MedPharm Scientific Publishers**. 7th ed. 2008.

SOUZA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**. v. 30, n. 2, p. 351 – 355, jan. 2007.

SOUZA, P. H. M.; SOUZA NETO, M. H.; MAIA, G. A. Componentes funcionais nos alimentos. **Boletim da SBCTA**. v. 37, n. 2, p. 127-135, 2003.

SOUZA, W. **Avaliação da atividade antioxidante e compostos fenólicos de extratos vegetais**. 2013.(Trabalho de Conclusão de Curso) - Campus Campo Mourão, Curso Superior de Tecnologia em Alimentos, Univeridade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

SOUZA, A. M. *et al.* 2C DNA Contentent of 'red passionflower' (*Passiflora trinitae* Sacco; Passifloraceae). *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA. 59., 2013, Agua de Lindóia-SP. **Anais [...]**. Aguas de Lindóia-SP:[s.n], 2 abr. 2013.

SULERIA, H. A. R. et al. Marine-Based Nutraceuticals: An Innovative Trend in the Food and Supplement Industries. **Mar Drugs**, v. 13, n. 10, p. 6336-51, 2015.

SUN, J.; CHU, Y.F.; WU, X.; LIU, R. H. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits, **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 7449–7454, 2002.

SUNTORNUSUK, L.; GRITSANAPUN, W.; NILKAMHANK, S.; PAOCHOM, A. Quantification of vitamin C content in herbal juice using direct titration. **J. Pharmaceut. Biomed**. v. 1, p. 849–855. 2001.

SWATI, M. et al. Review on spray drying technology. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**. v. 4, n. 2, p. 219-225, 2014.

TAIPINA, M. S.; FONTS, M. A. S.; COHEN, V. H. Alimentos funcionais – nutracêuticos. **Higiene Alimentar**. v. 16, n. 100, p 28-29, 2002.

TAYLOR & FRANCIS, CRC PRESS BOOK. SUNTORNUSUK, L.; GRITSANAPUN, W.; NILKAMHANK, S.; PAOCHOM, A. Quantification of vitamin C content in herbal juice using direct titration. **J. Pharmaceut. Biomed**. v.1, p. 849–855, 2001.

TOGASHI, C. K.; FONSECA, J. B.; SOARES, R. T. R. N.; GASPAR, A.; DETMANN, E. Composição em ácidos graxos dos tecidos de frangos de corte alimentados com subprodutos de maracujá. **Rev Bras Zootec**, v. 36, p. 2063-2068, 2007.

- TONHL, E.; COLLINS, K. E.; JARDIM, I. C. S.; COLLINS, C. H. Fases, estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 616-623, 2002.
- URREA-VICTORIA, V.; PIRES, J.; TORRES, P. B.; SANTOS, D. Y. A. C.; CHOW, F. Ensaio antioxidante em microplaca do poder de redução do ferro (FRAP) para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**, p. 1-6, 2016.
- VAN SOEST, J. J. G.; TOURNOIS, H.; WIT, D.; VLIEGENTHART, J. F. G. Short-range structure in (partially) crystalline potato starch determined with attenuated total reflectance Fourier-transform IR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 279, n. 27, p. 201-214, 1995.
- VIEIRA, G. P. **Compostos fenólicos, capacidade antioxidante e alcaloides em folhas e frutos (pericarpo, polpa e sementes) de *Passiflora* ssp.** São Paulo, 2013. 81 f. Dissertação Mestrado em Ciências Farmacêutica) - Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêutica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
- WILLIAMSON, G.; MANACH, C. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 81, 243S, 2005.
- WATSON, R. R.; ZIBADI, R.; RAFATPANAH, H.; JABBARI, F.; GHASEMI, R.; GHAFARI, J.; AFRASIABI, H.; FOO, L. Y.; FARIDHOSSEINI, R. Oral administration of the purple passion fruit peel extract reduces wheeze and cough and improves shortness of breath in adults with asthma. **Nutr Res.**, v. 28, p. 166-171, 2008.
- WHISTLER, R. L.; DANIEL, J. L. Functions of polysaccharides in foods, in: A.L. BRANEN, P. M.; DAVIDSON, S. Salminen (Eds.), **Food Additives**, p. 395-424, 1990.
- YOU, B. R.; MOON, H. J.; HAN, Y. H.; PARK, W. H. Gallic acid inhibits the growth of HeLa cervical cancer cells via apoptosis and/or necrosis, **Food Chem. Toxicol.**, v.48, p. 1334-1340, 2010.
- YOSHII, H. et al. Flavor release from spray-dryer maltodextrin/gum arabic or soy matrices as a function of storage relative humidity. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. v. 2, n. 1, p. 51-61, mar. 2001.
- ZEISEL, S. H. Regulation of nutraceuticals. **Science**, v. 285, p.1853-55, 1999.
- ZERAIK, M. L.; LIRA, T. O.; VIEIRA, A. E.; YARIWAKE, J. H. Comparação da capacidade antioxidante do suco de maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener), da garapa (*Saccharum officinarum* L.) e do chá-mate (*Ilex paraguariensis*) In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 31., 2008, Águas de Lindóia. **Resumos** [...]. Águas de Lindóia: [s.n], 2008.
- ZERAIK, M. L.; YARIWAKE, J. H. Quantification of isoorientin and total flavonoids in *Passiflora edulis* fruit pulp by HPLC-UV/DAD. **Microchem J**, in press, doi:10.1016/j.microc.2010.02.003. 2010.

ZERAIK, M. L.; PEREIRA, C. A. M.; ZUIN, V. G.; YARIWAKE, J. H. Maracujá: um alimento funcional?, **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 20, n. 3, jun./jul. 2010.

ZERAIK, M.L. et al. Analysis of passion fruit rinds (*Passiflora edulis*): isoorientin quantification by HPTLC and evaluation of antioxidant (radical scavenging) capacity. **Química Nova**, v.35, p.541-545, 2012.

ZIBADI, S.; WATSON, R. R. Passion fruit (*Passiflora edulis*): composition, efficacy and safety (Review). **Evid Based Integrative Med.**; v. 3, p.183-187, 2004.

ZIBADI, S.; FARID, R.; MORIGUCHI, S.; L. U, Y.; FOO, L. Y.; TEHRANI, P. M.; ULREICH, J. B.; WATSON, R. R. Oral administration of purple passion fruit peel extract attenuates blood pressure in female spontaneously hypertensive rats and humans. **Nutr Res.**, v. 27, p. 408 -416, 2007.

ZUCOLOTTO, S. M. **Estudo fitoquímico das folhas, frutos e raízes de *P. edulis* forma *flavicarpa* Degener.** 2005. 127f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

ANEXO

ANEXO A – Registro de patente



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2019 003042 9

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24464109000148

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins

Cidade: Maceió

Estado: AL

CEP: 57072-970

País: Brasil

Telefone: 82-3214-1064

Fax: 82-3214-1035

Email: nit@propep.ufal.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): MICROCÁPSULAS DA POLPA DE MARACUJÁ (*Passiflora edulis*, PROCESSO DE OBTENÇÃO MICROCÁPSULAS DA POLPA DE MARACUJÁ (*Passiflora edulis*) E USOS

Resumo: A presente invenção na área de produtos nutracêuticos com utilidade na área da saúde humana, mais especificamente a aqueles dos sistemas de liberação modificada de princípios ativos de frutas comestíveis e/ou nutricionais, destinados a uma administração por via oral. São propostos microcápsulas de polpa de maracujá, processo de obtenção de microcápsulas de maracujá e usos. A produção de microcápsulas da polpa de maracujá utiliza a polpa de maracujá padronizada, contendo princípios ativos (flavonoides e ácido clorogênico) nas microcápsulas de maracujá que são revestidas com agentes adjuvantes biocompatíveis e biodegradável, seguido pela secagem usando técnica de Spray-Dryer, apresentando-se em forma de micropartículas aqui também chamados de microcápsulas da polpa de maracujá. Adicionalmente, as microcápsulas da polpa de maracujá podem ser utilizadas para a preparação de produtos alimentícios como sorvetes, mousses, bolos, pães, cookies, bebidas geladas, suplementos alimentícios esportivos ou ainda cápsulas nutracêuticas com aplicação em uma ampla gama de indústrias, como cosmética, farmacêutica e principalmente as alimentícias, devido a suas atividades antimicrobianas e antioxidantes.

Figura a publicar: 04