



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia de Alimentos

KARINA MAGNA MACENA LEÃO

INFLUÊNCIA DA INTERESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE BURITI (*Mauritia Flexuosa* L. f. Arecacea), CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICA DE NANOEMULSÕES E SEU POTENCIAL BIOLÓGICO.

INFLUENCE OF ENZYMATIC INTERESTERIFICATION OF BURITI OIL (*Mauritia Flexuosa* L. f. Arecacea), PHYSICOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF NANOEMULSIONS AND THEIR BIOLOGICAL POTENTIAL.

CAMPINAS

2020

KARINA MAGNA MACENA LEÃO

INFLUÊNCIA DA INTERESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE BURITI
(*Mauritia Flexuosa* L.f. Arecacea), CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICA DE
NANOEMULSÕES E SEU POTENCIAL BIOLÓGICO.

INFLUENCE OF ENZYMATIC INTERESTERIFICATION OF BURITI OIL (*Mauritia
Flexuosa* L.f. Arecacea), PHYSICOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF
NANOEMULSIONS AND THEIR BIOLOGICAL POTENTIAL

Thesis presented to the Faculty of Food Engineering of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Food and Nutrition, in the area of Experimental and Nutrition Applied Food Technology.

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Alimentos e Nutrição, na área de Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos.

Supervisor/Orientador: Prof^a Dr^a Gabriela Alves Macedo

Coorientadora: Dr^a Paula Speranza

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELA ALUNA KARINA
MAGNA MACENA LEÃO,
ORIENTADA PELA PROF^a DR^a
GABRIELA ALVES MACEDO.

CAMPINAS

2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

L476i Leao, Karina Magna Macena, 1977-
Influencia da interesterificação enzimática do óleo de buriti (*Mauritia flexuosa* L.f. Arecaceae) características físico-química de nanoemulsões e seu potencial biológico / Karina Magna Macena Leão. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Gabriela Alves Macedo.
Coorientador: Paula Speranza.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Nanoemulsões. 2. Interesterificação enzimática. 3. Capacidade antioxidante. 4. Atividade biológica. I. Macedo, Gabriela Alves. II. Speranza, Paula. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Influence of enzymatic interesterification of buriti oil (*Mauritia flexuosa* L.f. Arecaceae) physicochemical characteristics of nanoemulsions and their biological potential

Palavras-chave em inglês:

Nanoemulsions
Enzymatic interesterification
Antioxidant capacity
Biological activity

Área de concentração: Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos

Titulação: Doutora em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora:

Gabriela Alves Macedo [Orientador]
Ana Paula Badan Ribeiro
Izabela Dutra Alvim
Luciana Francisco Fleuri
Thais Maria Ferreira de Souza Vieira

Data de defesa: 29-05-2020

Programa de Pós-Graduação: Alimentos e Nutrição

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-6750-8432>
- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/8008532744109414>

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª Drª Gabriela Alves Macedo

Orientadora
FEA / UNICAMP

Profª Drª Ana Paula Badan Ribeiro

Membro Titular
FEA/UNICAMP

Drª Izabela Dutra Alvim

Membro Titular
ITAL/SP

Profª Drª Luciana Francisco Fleuri

Membro Titular
IBB/UNESP

Profª Drª Thais Maria Ferreira de Souza Vieira

Membro Titular
LAN/ESALQ

Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

DEDICATÓRIA

Dedico a minha saudosa tia Nitinha (*in memoriam*) pelo amor
incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela graça, proteção, sustento e socorro bem presentes na hora de angústia. Sem Ele eu não teria forças para concluir.

Aos meus amados pais, Luiz e Josefina Leão (*in memoriam*), pelo sólido investimento em minha educação para toda a vida. A meus queridos irmãos Ianthus, Italus e sobrinhos amados. A todos aqueles que me apoiaram nos momentos de alegrias ou dificuldades, em especial à minha prima-irmã Aline.

Agradeço à Prof^ª Dr^ª Gabriela Alves Macedo, minha orientadora, pelo suporte e paciência durante este trabalho. Meu respeito e admiração. Obrigada!

Agradeço a minha coorientadora, Dr^ª Paula Speranza, que em todo o tempo foi auxílio fundamental para o desenvolvimento e a realização deste trabalho. Obrigada pela oportunidade de compartilhar de seus conhecimentos para que este estudo pudesse ser finalizado.

Agradeço a Prof^ª Dr^ª Ana Paula Badan Ribeiro, um anjo da guarda com sua gentileza e auxílio das análises no laboratório de óleos e gorduras da FEA. Obrigada pela contribuição e disponibilidade na interpretação dos resultados da difração de raios X realizada no Instituto de Física da Unicamp.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Bioprocessos Ádina Santana Amanda Ávila, Amanda Ruviano, Annayara Fernandes, Camila Rubia, Débora Kono, Isabela Martins, John, Júlia Zuin, Lívia Dias, Lívia Reis, Naice Santana, Paula Barbosa, Renata Gandra e Vanize Genova. Grata a todos pela contribuição, ensinamentos, carinho e paciência durante esses quatro anos, os melhores que já vivi até o momento.

Agradeço a Camila Delarmelina, do laboratório da Divisão de Microbiologia do CPQBA, pelos ensinamentos preciosos. À equipe do laboratório de Óleos e Gorduras pelo auxílio nas análises.

Agradeço à Universidade Estadual de Campinas e à Faculdade de Engenharia de Alimentos pela oportunidade na realização deste projeto, assim como a seu corpo docente e funcionários pelo valioso apoio durante esses anos de pós-graduação.

Ao Instituto Tecnológico e de Pesquisa do Estado de Sergipe (ITPS), obrigada pela oportunidade em minha qualificação profissional. Aos amigos Ana Virgínia Dantas Figueiredo, Cláudia Xavier, Margareth Pessoa, Simone Lessa, Lúcia Calumby, Marcus Sândalo e aos mais distantes que desde o início me apoiaram e incentivaram a realização deste sonho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo no Brasil e pela taxa de bancada [140883/2016-9]. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pelo apoio financeiro através do projeto de auxílio à pesquisa [2015/04555-2].

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço a todos que durante minha trajetória acompanharam, incentivaram, exerceu influência positiva e compartilhou experiências únicas.

Muito obrigada!

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo interesterificar por via enzimática o óleo de buriti utilizando a lipase Lipozyme TL IM e produzir nanoemulsões a partir do óleo interesterificado e não interesterificado em dois diferentes tempos de reação. O óleo foi caracterizado quanto à composição em ácidos graxos, triacilgliceróis, tocoferóis, esteróis e compostos fenólicos. O óleo interesterificado diferiu do óleo cru devido à modificação da distribuição dos ácidos graxos saturados e insaturados nas posições do triacilglicerol; no entanto, os compostos minoritários apresentaram resultados semelhantes entre os óleos caracterizados. Após essa etapa foram produzidas três nanoemulsões (NBO, NBO_{6h} e NBO_{24h}) acondicionadas em duas temperaturas (4 °C e 25 °C) e caracterizadas por 30 dias. As nanoemulsões produzidas com o óleo interesterificado (NBO_{6h} e NBO_{24h}) apresentaram tamanho médio de gotículas, entre 270 e 196 nm na temperatura ambiente, respectivamente. Inicialmente, observou-se que as gotículas das nanoemulsões armazenadas sob refrigeração sofreram coalescência ao longo do tempo, de acordo com as imagens microscópicas. Por outro lado, na nanoemulsão do óleo de buriti interesterificado por 24 horas observou-se efeito positivo quanto à Capacidade Radical de Absorção de Oxigênio (ORAC), que pode proteger moléculas de compostos minoritários contra a degradação química. Quanto à estrutura cristalina, observou-se que existem duas formas polimórficas predominantes $\beta + \beta'$ que ajudam a detectar uma estrutura estável para veiculação de substâncias com fins benéficos à saúde. Numa mesma condição de processo foi avaliado o potencial antimicrobiano das nanoemulsões. Os resultados mostraram que as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foram potencialmente inibidas numa concentração de 6,25 mg. mL⁻¹ de NBO_{24h}. Ocorreu, porém, atividade bacteriostática, ou seja, houve redução de mais de 50% de células viáveis. Dessa forma, é possível desenvolver nanoemulsões de óleos interesterificados que apresentam menor tamanho de gotículas, baixa taxa de oxidação, alta capacidade antioxidante e podem melhorar a inibição de bactérias patogênicas em sistemas biológicos.

Palavras-chave: sistemas coloidais, biotransformação enzimática, capacidade antioxidante, atividade biológica.

ABSTRACT

This work aimed to enzymatically interestify buriti oil using Lipozyme TL IM lipase and produce nanoemulsions from non-interesterified oil and non-interesterified oil in two different reaction times. We characterized the oil by its composition in fatty acids, triglycerides, tocopherols, sterols, and phenolic compounds. Interesterified oil differed from crude oil due to the modification of the distribution of saturated and unsaturated fatty acids in triacylglycerol positions; However, minority compounds showed similar results among the characterized oils. After this stage, we produced three nanoemulsions (NBO, NBO_{6h}, and NBO_{24h}), packed in two temperatures (4 °C and 25 °C) and characterized them for 30 days. Nanoemulsions produced with interesterified oil (NBO_{6h} and NBO_{24h}) showed an average droplet size between 270 and 196 nm at room temperature, respectively. Initially, we observed that the nanoemulsion droplets stored under refrigeration were coalesced according to microscopic images. On the other hand, nanoemulsion of interesterified buriti oil for 24 hours showed a positive effect on Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC), which can protect minority compound molecules against degradation. As for the crystalline structure, we observed two predominant polymorphic forms $\beta + \beta'$ that help to detect a stable structure for use in food products. We also evaluated the antimicrobial potential in the same process condition. *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteria were found to be best inhibited at a concentration of 6.25 mg. mL⁻¹ of NBO_{24h}. However, bacteriostatic activity occurred, i.e., there was a reduction of more than 50% of viable cells. Therefore, it is possible to develop nanoemulsions of interesterified oils that may have smaller average droplet size, low oxidation, high antioxidant capacity and improve the inhibition of pathogenic bacteria in biological systems.

Keywords: colloidal systems, enzymatic biotransformation, antioxidant capacity, biological activity.

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 1

Figura 1. Palmeira do buriti e fruto do buriti	24
Figura 2. Mecanismo de reação de interesterificação enzimática usando a lipase específica sn-1,3	28
Figura 3. Esquema da estrutura das nanoemulsões do tipo O/A e uso de surfactante. Adaptado de	31

CAPITULO 3

Figura 1. Curva de distribuição de gotículas de nanoemulsões do óleo de buriti e do óleo de buriti interesterificado por 6 e 24 horas de reação na temperatura ambiente (a) e temperatura refrigeração (b).	66
Figura 2. Microscopia confocal de varredura a laser de nanoemulsões de óleo de buriti (NBO) armazenadas a 4°C e 25°C (A e B); nanoemulsões do óleo de buriti interesterificadas por 6 horas (NBO _{6h}) armazenadas a 4°C e 25°C (C e D) e nanoemulsões do óleo de buriti interesterificadas durante 24 horas (NBO _{24h}), armazenadas a 4°C e 25°C (E e F) aos 1, 15 e 30 dias após a preparação. Barras de escala representam 25 µm.	71
Figura 3. Determinação da atividade antimicrobiana de nanoemulsões do óleo de buriti (NBO) e nanoemulsão do óleo de buriti interesterificado (NBO _{24h}) contra cepas de <i>E. coli</i> (A); <i>S. aureus</i> (B). A ausência da coloração vermelha indica inibição da atividade metabólica microbiana. *MO= Micro-organismo.	78
Figura 4. Gráfico de atividade antimicrobiana da nanoemulsão do óleo de buriti (NBO), nanoemulsão de óleo de buriti interesterificado 24 horas (NBO _{24h}) contra <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> . Os valores são apresentados como média das repetições (n=3). ...	79
Figura 5. Atividade de inibição de carreadores lipídicos nanoestruturados (NLCBO) e carreador lipídico nanoestruturado do óleo de buriti interesterificado (NLCBO _{24h}) contra <i>S. aureus</i> (a) <i>E. coli</i> (b).	80

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 1

Tabela 1. Composição em ácidos graxos de diferentes óleos vegetais.....22

Tabela 2. Composição em ácidos graxos (% m/m) óleo de buriti e azeite de oliva.....25

Tabela 1. Composição em ácidos graxos (%) óleo de buriti47

CAPITULO 2

Tabela 2. Classes de lipídios do óleo de buriti e óleo de buriti interesterificados.....49

Tabela 3. Composição em TAG do óleo de buriti e óleo de buriti interesterificados após 6 e 24 horas.....50

Tabela 4. Composição de tocoferóis no óleo de buriti e óleo de buriti interesterificados após 6 e 24 horas.....52

Tabela 5. β -caroteno total e compostos fenólicos totais do óleo de buriti e do óleo de buriti interesterificado após 6 e 24 h de reação.....53

Tabela 6. Composição total em fitoesterol ($\mu\text{g. g}^{-1}$) do óleo de buriti e óleo de buriti interesterificado por 24 horas de reação.....55

CAPITULO 3

Tabela 1. Diâmetro de gotas ($D_{3,2}$) e temperaturas do armazenamento (4 e 25°C) e tempo de armazenamento (1,15 e 30 dias) das nanoemulsões do óleo de buriti e óleo de buriti interesterificados.....67

Tabela 2. Potencial zeta nas temperaturas de armazenamento (4 e 25°C) e no tempo do armazenamento (1,15 e 30 dias) das nanoemulsões do óleo de buriti e óleo de buriti interesterificados.....69

Tabela 3. Estabilidade oxidativa TBARS (mg MDA mL^{-1}) de nanoemulsões de óleo de buriti (NBO) e óleo de buriti estruturado (NBO_{24h}) nos dias 1, 15 e 30 de armazenamento a 4°C e 25°C.....73

Tabela 4. Capacidade antioxidante de NBO, NBO_{24h} (FRAP e ORAC_{FL}).....74

Tabela 5. Espaçamentos curtos (*Short spacings*) e formas polimórficas do óleo de buriti (BO), NBO, NBO_{24h}, após 30 e 120 dias de armazenamento a 25°C.....77

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAPH	2,2'-Azobis(2-aminopropane) dihydrochloride
AGL	Free fatty acids
ANOVA	Analysis of variance
ATCC	American type culture collection
AUC	Area under curve
BO	Buriti oil
DAG	Diacylglycerols
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
FL	Fluorescein
FRAP	Ferric reducing antioxidant power
GC	Gas Chromatography
HPH	High-pressure homogenization
HPSEC	High Pressure Size Exclusion Chromatography
LE	Lipids Structure
LDL	Low-density lipoprotein
MAG	Monoacylglycerols
MIC	Minimum inhibitory concentration
NE	Nanoemulsion
NEOB	Nanoemulsion Buriti Oil
NEOB _{6h}	Nanoemulsion buriti oil 6 hours
NEOB _{24h}	Nanoemulsion buriti oil 24 hours
NLC	nanosstructured lipid carrier
NLCBO	Buriti oil nanosstructured lipid carrier
NLCBO ₆	Buriti oil nanosstructured lipid carrier 6 hours
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity
SD	Standard deviation
TAG	Triacylglycerol
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
TE	Trolox equivalent
TPTZ	4,6-tripryridyl-s-triazine

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	16
CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA - ÓLEOS VEGETAIS EXOTICOS COMO FONTE ALTERNATIVA AOS ÓLEOS VEGETAIS CONVENCIONAIS.....	19
1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Óleos e gorduras	20
1.2 Óleos vegetais	20
1.3 Óleo de Buriti.....	23
1.4 Composição em ácidos graxos do óleo de buriti	24
1.5 Processos de modificação de óleos e gorduras	25
2 INTERESTERIFICAÇÃO	26
2.1 Interesterificação Enzimática	26
3 NANOTECNOLOGIA APLICADA A ÓLEOS E GORDURAS PARA FINS ALIMENTÍCIOS.....	28
3.1 Composições da emulsão e nanoemulsão	28
3.2 Técnicas de produção de nanoemulsões	31
4 POTENCIAL BIOLÓGICO DE NANOEMULSÕES DE ÓLEO DE BURITI	32
4.1 Técnicas para avaliar a capacidade antioxidante.....	32
4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana	33
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	34
REFERÊNCIAS	34
CAPÍTULO 2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO ÓLEO DE BURITI (<i>MAURITIA FLEXUOSA</i> L.) APÓS INTERESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA.....	43
1 INTRODUÇÃO	44
2 MATERIAL E MÉTODOS	45
2.1 Material	45

2.2 Composição em ácidos graxos	45
2.3 Interesterificação enzimática.....	45
2.4 Classes de lipídios	46
2.5 Composição Triacilglicerólica (TAG).....	46
2.6 Tocoferol.....	46
2.7 Fitoesterol.....	47
2.8 β -caroteno total	47
2.9 Fenólicos totais.....	47
2.10 Análise estatística.....	48
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
3.1 Caracterização do óleo de buriti	48
3.2 Classes de lipídios	49
3.3 Composição Triacilglicerólica (TAG).....	51
3.4 Tocoferóis	52
3.5 β -caroteno total e compostos fenólicos totais	54
3.6 Fitoesteróis	55
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
AGRADECIMENTOS	57
REFERÊNCIAS	57
CAPÍTULO 3- CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE SISTEMAS DE NANOEMULSÕES CONTENDO ÓLEO DE BURITI INTERESTERIFICADO.....	61
1 INTRODUÇÃO	62
2 MATERIAL E MÉTODOS	63
2.1 Óleo de Buriti	63
2.2 Produção da nanoemulsão	63

2.3 Determinação do tamanho de gotículas e potencial Zeta.....	63
2.4 Microscopia confocal de varredura a laser	64
2.5 Estabilidade oxidativa	64
2.6 Capacidade antioxidante (FRAP e ORAC).....	64
2.7 Difração de Raios-X	65
2.8 Atividade antimicrobiana	65
2.9 Análise estatística	66
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
3.1 Tamanho de gotículas e potencial zeta	66
3.2 Microscopia confocal.....	71
3.3 Estabilidade oxidativa durante o armazenamento (TBARS).....	73
3.4 Capacidade antioxidante.....	75
3.5 Difração de raios-X.....	77
3.6 Atividade antimicrobiana	79
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	82
AGRADECIMENTOS	82
CAPITULO 4 - DISCUSSÃO GERAL.....	83
CAPITULO 5 - CONCLUSÃO GERAL.....	84
REFERÊNCIAS	85
ANEXOS	89

INTRODUÇÃO GERAL

A busca por novas fontes lipídicas que atendam às necessidades mercadológicas como fontes dietéticas, de qualidade funcional e nutricional, e que além dessas propriedades ainda tenham a capacidade de prevenir doenças, tem sido crescente na indústria alimentícia brasileira (RIBEIRO et al., 2007, FATHI et al., 2012)

O buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) é fruto de palmeira nativa do Brasil encontrada na região centro-norte do país, mais precisamente na região da Amazônia, a qual normalmente cresce em áreas periodicamente inundadas (FREITAS et al., 2017).

Do fruto do buriti é extraído o óleo que, sob o aspecto nutricional, é uma excelente fonte de compostos bioativos, como carotenoides, em especial β -caroteno. Esse fruto possui ainda alta concentração de ácidos graxos monoinsaturados, majoritariamente o ácido oléico, assim como quantidades importantes de tocoferóis e fitoesteróis. Sabe-se que esses antioxidantes sugerem potencial de utilização deste óleo como alternativa terapêutica, cosmética e biológica com atividade antimicrobiana. (BATISTA et al., 2012; COSTA et al., 2010; DE ROSSO; MERCADANTE, 2007; SPERANZA et al., 2018; ZANATTA et al., 2010).

Diante de algumas evidências, estudos com óleos e gorduras reportaram que o uso de reações de interesterificação podem ocasionar modificações nas propriedades nutricionais e biológicas com benefícios à saúde. A estratégia de modificar os óleos em gorduras para fins funcionais, nutricionais e tecnológicos inclui a interesterificação química ou enzimática. A interesterificação química, embora seja uma tecnologia há muito tempo dominada pela indústria, apresenta desvantagens devido à falta de especificidade, o que acaba conduzindo a uma distribuição aleatória dos ácidos graxos no triacilglicerol (RIBEIRO et al., 2007, SPERANZA e MACEDO, 2012).

Uma alternativa viável para a desvantagem da interesterificação química foi a interesterificação enzimática, que é uma técnica disponível para melhorar as propriedades físico-químicas de óleos e gorduras. A reação de interesterificação enzimática é catalisada por lipases, que oferecem maior controle sobre a distribuição posicional de ácidos graxos no produto final, trabalham sob condições brandas de temperatura (entre 40 a 45°C) e conservam os componentes minoritários nos óleos. Além disso, nessa reação é possível produzir lípidos com características antimicrobianas que podem influenciar diretamente a propriedade obtida nas emulsões formuladas a partir do óleo de buriti (SPERANZA et al., 2015).

Alguns estudos demonstraram que existe uma estreita relação entre as propriedades físico-químicas de nanoemulsões e potenciais efeitos como agentes antimicrobianos (CHANG; MCLANDSBOROUGH; MCCLEMENTS, 2013; KADRI et al., 2017).

Do ponto de vista físico-químico, as emulsões do tipo óleo em água (O/A) são pequenas gotículas esféricas de um líquido disperso (fase óleo) em um líquido contínuo (fase água) e são bastante usadas em aplicações industriais. O desenvolvimento de nanoemulsões, contudo, consiste em propriedades especiais em relação às demais. O tamanho das gotículas das nanoemulsões convencionais apresenta diâmetros na escala entre 10 a 200nm, revestidas por uma camada única de componentes emulsificantes que estabiliza contra agregação das gotículas (GUPTA et al., 2016; MCCLEMENTS, 2010, 2011; TADROS et al., 2004).

Recentemente, a nanotecnologia se tornou um dos principais campos de estudo para melhorar a biodisponibilidade de nutracêuticos em nanopartículas (CHEONG; TAN; NYAM, 2016; CHO et al., 2014; SALVIA-TRUJILLO et al., 2015a). Do ponto de vista tecnológico, produzir sistemas nanoemulsificados a partir do óleo de buriti bruto e interesterificado pode ser uma alternativa promissora, possibilitando um produto de alto valor agregado e de relevância econômica, pelo simples fato de que o óleo de buriti possui propriedades nutricionais e biológicas já conhecidas. Os Sistemas de nanoemulsões (NE) em sua composição apresentam um lipídio líquido (óleo), uma fase aquosa e um agente surfactante. (TAMJIDI et al., 2013).

Dentre outras particularidades da nanoemulsão destaca-se a atividade antimicrobiana. São raras, porém, as investigações sobre esse assunto quando o objeto de estudo são óleos vegetais fixos correlacionados à atividade antimicrobiana. Diante desta lacuna, nosso grupo de pesquisa observou o potencial biológico de emulsões formuladas com óleos de buriti interesterificados com forte influência na atividade antimicrobiana. (SPERANZA et al., 2015). Qualquer que seja a aplicação, o conhecimento das propriedades do óleo nanoemulsificado como potencial antimicrobiano com função biológica ainda é incipiente.

Esse trabalho teve como objetivo produzir e caracterizar nanoemulsões de óleo de buriti (*Mauritia flexuosa* L.f.) bruto e interesterificado, avaliando suas atividades biológica e antimicrobiana. Além disso, houve o interesse em realizar as reações de interesterificação enzimática do óleo de buriti com lipase comercial (Lipozyme TL-IM); caracterizar quimicamente o óleo de buriti bruto e interesterificado; formular as nanoemulsões (NE) com os dois óleos, de buriti bruto e buriti interesterificado; avaliar a capacidade antioxidante via sequestro de radicais livres das nanoemulsões do óleo de buriti bruto e interesterificado e avaliar o efeito quanto ao potencial antimicrobiano atuando em células microbianas patogênicas.

A apresentação dessa tese e os principais resultados estão organizados em três capítulos.

No primeiro capítulo é apresentada uma revisão bibliográfica que envolve os óleos e gorduras, interesterificação, nanoemulsões e atividade biológica.

O segundo capítulo é baseado no artigo “Improving the chemical properties of Buriti oil (*Mauritia flexuosa* L.f.)”, publicado na revista *Grasas y Aceites*, o qual descreve a caracterização química do óleo de buriti bruto e óleo de buriti por interesterificação enzimática.

O terceiro capítulo é baseado no artigo “Physicalchemical characterization and antimicrobial activity in novel systems containing buriti oil and structured lipids nanoemulsions”, publicado na revista “*Biotechnology Reports*”, que descreve a produção e caracterização físico-química das nanoemulsões e o efeito da insteresterificação quanto ao potencial biológico.

CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA - ÓLEOS VEGETAIS EXOTICOS COMO FONTE ALTERNATIVA AOS ÓLEOS VEGETAIS CONVENCIONAIS.

Karina Magna M. Leão^a; Paula Speranza^a, Gabriela Alves Macedo^{a*}

^aDepartamento de Alimentos e Nutrição – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos - CEP: 13083-862 Campinas, SP, Brasil, telefone: +55 (19) 3521-4085 – e-mail: (kmagnaleao@gmail.com).

Artigo a ser submetido na revista “*Natural Product Research*”

RESUMO

Os lipídios, de uma forma geral, são grupos de compostos que englobam os óleos e gorduras. Apresentam papel vital mediante o fornecimento de ácidos graxos essenciais e vitaminas lipossolúveis. Os lipídios são aplicáveis em diversas indústrias, no entanto novas fontes lipídicas têm sido abordadas devido ao crescimento populacional, ao desenvolvimento econômico e à busca por novas fontes dietéticas. A interesterificação é uma técnica de modificação da composição de triacilglicerol de óleos e gorduras bastante utilizada, que produz bases lipídicas desejáveis de cristalização, microestrutura e propriedades físicas para aplicação em produtos com valor agregado. Desta forma, há viabilidade em usar o óleo de buriti, que tem aspecto nutricional como outros óleos vegetais importantes por atuar como antioxidantes naturais e contribuir positivamente em sistemas de nanoemulsão para aplicações nas indústrias. Assim, a viabilidade em usar o óleo de buriti em sistemas de nanoemulsão parece ser promissora quanto ao potencial biológico.

Palavras-chave: óleo de buriti, interesterificação enzimática, potencial biológico

ABSTRACT

Lipids are generally groups of compounds that comprise oils and fats. They play a vital role by providing essential fatty acids and fat-soluble vitamins. Lipids are applicable in many industries, however, new lipid sources have been approached due to population growth, economic development and the search for new dietary sources. Interesterification is a widely used technique for modifying the triacylglycerol composition of oils and fats, which produces desirable lipid bases of crystallization, microstructure and physical properties for application to value-added products. Thus, it is feasible to use buriti oil, which has a nutritional aspect like other important vegetable oils because it acts as natural antioxidants and contributes positively to nanoemulsion systems for industrial applications. Thus, the feasibility of using buriti oil in nanoemulsion systems appears to be promising for biological potential.

Keyword: buriti oil, enzymatic interesterification, biological potential

1 INTRODUÇÃO

Os óleos e gorduras são usados pela humanidade há milênios como insumos para diversas áreas industriais devidos aos seus principais compostos químicos e seus efeitos benéficos à saúde. Os processos tecnológicos envolvidos para obtenção e caracterização desses lipídios são amplamente estudados.

1.1 Óleos e gorduras

Os lipídios, de uma forma geral, são grupos de compostos que englobam os óleos e gorduras. Estes, por sua vez, são nutrientes indispensáveis na dieta humana, apresentando papel vital mediante o fornecimento de ácidos graxos essenciais. Além disso, participam como estrutura da membrana biológica, atuam como agentes emulsificantes no trato gastrointestinal, fornecem energia e agem como veículo para as vitaminas lipossolúveis A, D, E e K (O'BRIEN, 2009; DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010).

Do ponto de vista químico, óleos e gorduras são misturas de um amplo número de compostos de triacilgliceróis (TAGs), que são ésteres de glicerol e ácidos graxos e representam cerca de 96 a 98% desses compostos. Adicionalmente, os monoacilgliceróis (MAGs), diacilgliceróis (DAGs), ácidos graxos livres (AGL), fosfolipídios, glicolipídios e esteróis encontram-se solubilizados na matriz triacilglicerólica (O'BRIEN, 2009; MICHALSKI et al., 2013). O tipo e a localização dos ácidos graxos na molécula do glicerol definem as características físicas e químicas dos óleos e gorduras, seu destino metabólico e benefícios à saúde (OSBORN; AKOH, 2002).

De acordo com dados da FAO (2016) houve aumento de 5% da produção global de óleos e gorduras e um crescimento de 3% no consumo desses lipídios durante os anos de 2016 e 2017 (DEL MUNDO; SUTHEERAWATTANANONDA, 2017). Atualmente a ciência dos alimentos, integrada à engenharia de novos processos, busca por inovações tecnológicas de produção, com processos que atendam às necessidades do mercado de consumo de óleos e gorduras (GUEDES et al., 2014).

1.2 Óleos vegetais

Os óleos são matéria-prima com aplicação em diversas indústrias, entre elas as de alimentos, química, cosmética e farmacêutica. A maioria dos óleos de origem vegetal são

obtidos de sementes de plantas cultivadas em climas relativamente temperados; outras, no entanto, são de árvores oleaginosas de climas quentes e o óleo é extraído da polpa do fruto (O'BRIEN, 2009). Segundo relatórios da FAO (2018) a produção de *commodities* das oleaginosas como soja, girassol, canola, milho e palma para produção dos seus óleos na safra 2018/2019 teve previsão de crescimento em torno de 4,6% em relação aos últimos anos, destacando-se os maiores produtores como China, Índia, Rússia, Malásia, Brasil e Indonésia. Além disso há um crescimento contínuo nas principais regiões consumidoras de óleo e uma demanda sustentada pelo setor do biodiesel que também impulsionou o crescimento do consumo de vários óleos vegetais (DIVISION, 2018).

Alguns óleos vegetais de maior produção no Brasil encontra-se o óleo de soja, seguido dos óleos de girassol, canola, amendoim etc, (ABOVE, 2018). Nos últimos anos descobertas de novas fontes lipídicas têm sido abordadas devido ao crescimento populacional e ao desenvolvimento econômico, além de constituírem excelente fonte dietética, com potencial nutricional, de prevenção a doenças, propriedades biológicas e até antimicrobianas (LI et al., 2015; SANTOS et al., 2018; SPERANZA et al., 2015).

O extrativismo de óleos naturais como açaí, patauá, andiroba, tucumã, palma, dendê é presente na biodiversidade da região Amazônica, representam uma alternativa para o desenvolvimento local devido ao alto valor antioxidante agregado, qualidade nutricional e potencialidade para produção de cosméticos, dentre eles, destaca-se o buriti que apresenta uma composição importante de ácido graxo monoinsaturado. A Tabela 1 são apresentados alguns óleos vegetais com composição de ácidos graxos insaturados. Do ponto de vista dos compostos minoritários, muitos óleos são ricos em substâncias que possuem constituintes antioxidantes.

Tabela 1. Composição em ácidos graxos de diferentes óleos vegetais

Óleos vegetais	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	aplicação industrial	maiores produtores
Óleo de buriti	18,50	0,10	1,30	70,30	5,20	6,50	-	Farmacêutica, cosmética e alimento.	Brasil, Peru, Venezuela e Guiana
Óleo Sacha	4,67	-	3,81	10,45	36,80	50,41	-	Nutricionais, cosmética e farmacêutica.	Peru e sudoeste do Brasil
Óleo de perilla	4,11	0,11	1,87	16,65	14,32	61,93	0,18	Alimentos e farmacêutica.	China, Japão, Vietnã
Óleo de uva	7,04	0,13	3,59	15,01	73,26	0,39	0,17	Alimentos, cosmética	Alemanha, França e Itália
Óleo de dendê	38,99	-	5,00	43,16	11,54	0,35	-	Cosmética, sabão e farmacêutica.	Malásia e Indonésia
Óleo de linhaça	5,88	0,10	4,62	20,06	14,80	52,94	0,17	Alimentos, tintas e vernizes.	Índia

Fonte: Base de dados Sciencedirect (Jan/ 2019).

1.3 Óleo de Buriti

O óleo do Buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) é extraído do fruto da palmeira nativa da Amazônia que pertence à família *Arecaceae* (Figura 1). Esta palmeira possui vida longa, cerca de 30 anos, haste única que pode atingir entre 30 a 40 m de altura e se desenvolve em áreas periodicamente inundadas ao longo dos rios no norte do Brasil (FREITAS et al., 2017). A região Amazônica apresenta clima tropical adequado para palmeiras nativas e exóticas com potencial de exploração e permite ser fonte de renda para a população local (GALDINO, 2007; KOOLEN et al., 2013).

Os carotenoides são pigmentos naturais importantes, responsáveis pela coloração vermelho-alaranjado; com forma predominante no óleo de buriti e maior concentração é o β -caroteno que apresenta atividade pró-vitamina A (DE ROSSO; MERCADANTE, 2007). Sabe-se que a presença de carotenoides, tocoferóis e fitoesteróis, que são formas antioxidantes, sugere potencial de utilização do óleo de buriti como alternativa terapêutica, cosmética e atividade antimicrobiana (ALBUQUERQUE et al., 2003; BATISTA et al., 2012; COSTA et al., 2010; SPERANZA et al., 2018). Devido aos compostos bioativos presentes no óleo de buriti, ele pode ser considerado um alimento *nutracêutico* (ACOSTA, 2009). Assim, o óleo de buriti também é usualmente aplicado como recurso alimentar e de uso medicinal por comunidades indígenas e ribeirinhas da região Norte do Brasil, sob a forma bruta ou refinada, com diferenças na sua composição nutricional. Certo estudo mencionou que a deficiência de vitamina A foi diagnosticada na população brasileira, e isto contribui para o desenvolvimento de doenças como infecção ocular e xerofthalmia (MEDEIROS et al., 2015).

O óleo extraído do fruto do buriti, além do aspecto nutricional, possui alta concentração de ácidos graxos monoinsaturados, majoritariamente o ácido oleico, com valores superiores aos encontrados no azeite de oliva ou de nozes do Brasil (FRANÇA et al., 1999).



Figura 1. Palmeira do buriti e seu fruto do buriti (GALDINO, 2007).

1.4 Composição em ácidos graxos do óleo de buriti

De acordo com o tamanho da cadeia carbônica, podemos classificar os ácidos graxos como de cadeia curta (C4:0 a C6:0), cadeia média (C8:0 a C12:0) ou cadeia longa (> C12:0). Os ácidos graxos presentes no óleo de buriti são predominantemente de cadeia longa, destacando-se o ácido graxo monoinsaturado oleico (C18:1), que representa cerca de 74% do total de ácidos graxos (FREITAS et al., 2017; SPERANZA et al., 2018). O segundo maior ácido graxo é o palmítico (C16:0), que representa 18 a 20% do total (ALBUQUERQUE et al., 2003; SPERANZA et al., 2018).

Os ácidos graxos de cadeia longa são metabolizados mais lentamente do que os ácidos graxos de cadeias curta e média (HUNTER, 2001; LOTTENBERG et al., 2012). A estrutura molecular destes compostos, incluindo a distribuição dos ácidos graxos entre

diferentes posições estereoespecíficas do esqueleto de glicerol, controla a funcionalidade de óleos e gorduras como ingredientes dos alimentos, influenciando propriedades físicas como a estrutura cristalina e o ponto de fusão. Além disso, possuem importantes efeitos fisiológicos como componentes da dieta humana. A ausência de equilíbrio dos triacilglicerois pode conduzir a diversas desordens, como doenças coronarianas, obesidade ou dislipidemia (LOTTENBERG et al., 2012).

O óleo de buriti possui uma composição em ácidos graxos semelhante ao azeite de oliva (Tabela 2), bastante presente na dieta mediterrânea e reconhecido pelos seus potenciais benefícios à saúde (FRANKEL, 2010).

Tabela 2. Composição em ácidos graxos (g/100g) óleo de buriti e azeite de oliva.

<i>Ácidos graxos</i>	<i>Óleo de Buriti (%)</i>	<i>Azeite de Oliva (%)</i>
<i>C16:0</i>	17,4 ± 0,1	16,5 ± 0,0
<i>C18:0</i>	3,3 ± 0,0	1,8 ± 0,0
<i>C18:1</i>	69,6 ± 0,1	67,7 ± 0,1
<i>C18:2</i>	7,3 ± 0,0	10,0 ± 0,0
<i>C18:3</i>	0,9 ± 0,0	0,6 ± 0,0
<i>Saturados</i>	21,4 ± 0,2	19,0 ± 0,0
<i>Insaturados</i>	78,7 ± 0,2	81,0 ± 0,0
<i>Índice de Iodo (g I₂/100g)</i>	76	83
<i>Índice de saponificação (mg KOH/g)</i>	193	193

Fonte: (FREITAS et al., 2017; MOREIRA et al., 2017).

1.5 Processos de modificação de óleos e gorduras

Alguns óleos e gorduras vegetais *in natura* apresentam limitações na sua aplicação para determinados fins industriais. Diferentes estratégias podem ser usadas para modificar a composição original de óleos e gorduras. Os principais processos de modificação são hidrogenação total, interesterificação e fracionamento (RIBEIRO et al., 2018).

De modo geral, para suprir as necessidades do mercado, a indústria utiliza métodos de modificação para obtenção de produtos com características desejáveis, como mudança no

comportamento de fusão, proporcionando consistência adequada às temperaturas ambiente e de refrigeração, além de alterar o comportamento cristalino, facilitando os processos de produção, diminuindo a recristalização durante a vida útil do produto (RIBEIRO et al., 2007b).

Existem dois tipos de interesterificação: a química e a enzimática, que são diferenciadas pelo tipo de catalisador utilizado.

2 INTERESTERIFICAÇÃO

O método de interesterificação é conhecido pela reestruturação ou modificação posicional nas moléculas do glicerol para alterar a composição de ácidos graxos (OSBORN; AKOH, 2002). A síntese dos lipídios pode ser realizada por métodos químicos ou enzimáticos.

A interesterificação química é um processo de baixo custo que utiliza um catalisador alcalino metóxido de sódio bastante utilizado em processos industriais escaláveis, contudo a reação distribui os ácidos graxos de forma aleatória no triacilglicerol e vários estudos avaliam estes efeitos nas características físico-químicas de lipídios (IMRAN; NADEEM, 2015; MASUCHI et al., 2014; RIBEIRO et al., 2009; ROUSSEAU; MARANGONI, 1998).

2.1 Interesterificação Enzimática

A interesterificação enzimática é uma técnica disponível para modificar a composição do triacilglicerol visando à produção de gorduras plásticas, com baixo teor de gorduras trans; possui comportamento de cristalização apropriado e textura desejável (OSBORN; AKOH, 2002; RIBEIRO et al., 2007a). Trabalhos demonstram que a interesterificação por catálise enzimática é mais eficiente e diz respeito à seletividade, ao controle da reação, e, assim, compara-se à catálise química.

A reação de interesterificação enzimática é realizada por agente catalisador, como as lipases, que podem ser extraídas a partir de plantas, animais e fontes microbianas. As lipases (E.C. 3.1.1.3) são uma classe de enzimas pertencentes ao grupo das serinas hidrolases, também denominadas triacilglicerol acilhidrolases, mais utilizadas em processos biotecnológicos e com capacidade de atuar em sistemas heterogêneos. Algumas podem apresentar resistência a condições severas de temperatura e pH, além da especificidade por diferentes substratos. Essas são justificativas para seu crescente uso (PAQUES; MACEDO, 2006).

Em condições apropriadas de reação as lipases promovem a formação de ésteres por meio de reações de ácidos e álcoois, conhecida por esterificação. As lipases são capazes de

catalisar uma grande gama de reações e seus substratos naturais são triglicerídeos, que apresentam maior afinidade por ácidos graxos de cadeia longa. Seu modo de ação assemelha-se ao das esterases, porém sua atividade é aumentada quando situada na interface polar/apolar. Sabe-se que parte da superfície da enzima (lipase) se encontra em melhor equilíbrio termodinâmico quando inserida na interface polar/apolar, e esta conformação coloca o sítio ativo da enzima em posição favorável para catálise.

Dentre as características mais importantes da interesterificação enzimática estão a especificidade da enzima, que possibilita a produção de lipídios com composições mais específicas para aplicações funcional e medicinal (WILLIS; LENCKI; MARANGONI, 1998) e a conservação dos compostos bioativos por condução branda durante a reação. A lipase comercial (Lipozyme TL-IM) pode hidrolisar nas posições *sn*-1 e *sn*-3, incorporando ácidos graxos nestes locais sem alterá-los na posição *sn*-2 (WANG et al., 2006). Nesse tipo de reação, devido à especificidade das lipases, o rearranjo dos ácidos graxos no TAG ocorre de forma mais controlada, possibilitando prever mais facilmente os produtos formados e a distribuição posicional, devido à seletividade e especificidade das lipases *sn*-1,3 de forma que obtém lipídios estruturados (ROUSSEAU; MARANGONI, 1998; WILLIS; LENCKI; MARANGONI, 1998).

A reação de interesterificação enzimática consiste na redistribuição dos ácidos graxos nas moléculas dos triacilgliceróis por meio da hidrólise simultânea de ligações ésteres existentes e da formação de novas ligações éster nas moléculas glicerídicas, resultando na modificação da composição triacilglicerídica, cuja característica final é totalmente determinada pela composição total em ácidos graxos das matérias-primas iniciais (O'BRIEN, 2009). A Figura 2 mostra o mecanismo de reação de interesterificação enzimática para produção de TAG com ácidos graxos de cadeia média e longa catalisada por lipase regio-seletiva *sn*-1,3 (IWASAKI; YAMANE, 2000). Essa redistribuição aleatória dos ácidos graxos nas moléculas de TAG pode levar a uma alteração substancial na funcionalidade da matriz lipídica, oferecendo contribuições importantes para o aumento e a otimização de seu uso nos produtos alimentícios.



Figura 2. Mecanismo de reação de interesterificação enzimática usando a lipase específica sn-1,3 (IWASAKI; YAMANE, 2000).

Existem alguns fatores que influenciam na velocidade da reação, como concentração da enzima, temperatura de reação, pH, atividade de água, pressão e compostos inibidores da atividade enzimática, por exemplo; assim como a presença de ácidos graxos livres e de oxigênio (XU et al., 2000). Nos últimos anos muitos pesquisadores têm investigado o uso de lipases imobilizadas em reações de interesterificação e observado mudanças nas condições experimentais, tornando possível alterar grandemente as propriedades físicas e químicas de óleos e gorduras (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; IFEDUBA; MARTINI; AKOH, 2016; KIM; AKOH, 2015; RUAN et al., 2014).

3 NANOTECNOLOGIA APLICADA A ÓLEOS E GORDURAS PARA FINS ALIMENTÍCIOS

Nos últimos anos, avanços em nanociência e nanotecnologia têm sido propostos em diversas áreas do conhecimento. A nanotecnologia é uma tecnologia emergente com o objetivo de melhorar as propriedades tecnológicas e o valor nutricional favorável em produtos alimentícios (OEHLKE et al., 2014). Pode também ser definida como a ciência que produz e usa materiais em escala de aproximadamente 1 a 100 nm (FATHI; MOZAFARI; MOHEBBI, 2012; TAMJIDI et al., 2013). No entanto, devido à diversidade de aplicações e processos de fabricação de nanoemulsões com tamanhos inferiores a 100 nm, ainda existe um desconsenso para uma definição clara dessa escala nanométrica.

3.1 Composições da emulsão e nanoemulsão

Emulsões são tradicionalmente definidas como a dispersão de dois ou mais líquidos imiscíveis, sendo uma fase dispersa e outra fase contínua. Existem três sistemas que são mais utilizados: emulsões e nanoemulsões; as principais diferenças entre elas são o tamanho médio

de gotículas e a estabilidade termodinâmica (KOMAIKO; MCCLEMENTS, 2016; MCCLEMENTS; RAO, 2011; OSTERTAG; WEISS; MCCLEMENTS, 2012). O termo nanoemulsão foi introduzido no final dos anos 50 referindo-se a sistemas cineticamente estáveis com estrutura de micelas de tamanho nanométrico. Esse termo é sinônimo de emulsões ultra-finas ou mini-finas (MCCLEMENTS, 2012a; SIVAKUMAR; YING; WEI, 2014).

As nanoemulsões (NE) fazem parte de uma ampla classe de sistemas coloidais, mas algumas fases líquidas cristalinas liotrópicas, também conhecidas como “fase micelar” ou “microemulsões” podem ser facilmente confundidas com nanoemulsões, principalmente com relação à estrutura na escala nano e à sua composição.

Na literatura encontramos frequentemente erros de conceitos nos últimos 30 anos, em função das características morfológicas (formato das gotículas) e ainda da faixa de tamanhos de gotas em escala nanométrica (MASON et al., 2006). Diversos trabalhos mencionam faixas de tamanhos de gotículas bem distintas: 50 – 200 nm (TADROS et al., 2004); 20 – 200 nm (DONSÌ; FERRARI, 2016; GUPTA et al., 2016); 10 - 100 nm (MCCLEMENTS; RAO, 2011; QIAN et al., 2012) e 20 – 500 nm (ANTON et al., 2007; KONG et al., 2011; SOLANS; SOLÉ, 2012). Entretanto, alguns pesquisadores esclarecem que raios acima de 100 nm são considerados emulsões convencionais (AHMED et al., 2012; OSTERTAG; WEISS; MCCLEMENTS, 2012).

As propriedades ópticas das nanoemulsões variam do leitoso ao quase transparente; possuem baixa viscosidade, são cineticamente estáveis, costumam ser mais lentas e termodinamicamente instáveis (IZQUIERDO et al., 2002; TADROS, 2002). Apresentam, no entanto, estabilidade física de longo prazo, o que as torna únicas (SIVAKUMAR; YING; WEI, 2014; TADROS et al., 2004). A estabilidade e a baixa turbidez das nanoemulsões as tornam adequadas para a incorporação de ingredientes ativos lipofílicos em alimentos e bebidas com base aquosa (MCCLEMENTS; RAO, 2011). Por esse motivo o uso de nanoemulsões tem aumentado em alimentos, cosméticos e na indústria farmacêutica.

Nanoemulsões são utilizadas para solubilizar compostos pouco solúveis. Óleos com potencial bioativo são ideais como carreadores, pois atravessam membranas biológicas com facilidade (DONSÌ; FERRARI, 2016). A sua aplicação passa por diversas áreas do conhecimento, destacando-se a área farmacêutica, que investe na obtenção de sistemas de liberação de drogas mais eficientes, e a cosmética, com a entrega eficiente de ingredientes ativos através da pele (KONG et al., 2011).

Nos últimos anos nota-se também o interesse da indústria alimentícia, devido à dificuldade em incorporar bioativos apolares em matrizes polares, além da necessidade de reduzir aditivos artificiais (BOVI; PETRUS; PINHO, 2017).

Além disso, as nanoemulsões apresentam diversas vantagens de aplicação, podendo ser preparadas com quantidades razoáveis de surfactantes, ao contrário das microemulsões, nas quais elevadas quantidades de surfactantes são necessárias para aumentar a biodisponibilidade e melhorar a estabilidade de compostos quimicamente instáveis (MCCLEMENTS; DECKER; WEISS, 2007). Assim, alguns efeitos potencialmente tóxicos das nanoemulsões estão relacionados à natureza dos ingredientes usados na sua formulação. Dessa forma, nanoemulsões com concentrações inferiores a 2% de surfactantes apresentam mais segurança toxicológica (FATHI; MOZAFARI; MOHEBBI, 2012).

As nanoemulsões podem ser do tipo água em óleo (A/O), em que as gotas de água estão dispersas na fase contínua de óleo, ou vice-versa, na presença de moléculas de surfactante, que desempenham um papel importante por reduzirem a tensão interfacial, prevenindo a coalescência das gotas recém-formadas. Desse modo, o uso de surfactantes é imprescindível para assegurar a formação de nanoemulsões com estabilidade ao longo do armazenamento (MCCLEMENTS; RAO, 2011; RAO; MCCLEMENTS, 2012; TADROS et al., 2004).

Para produzir nanoemulsões são necessários basicamente os mesmos componentes de uma microemulsão: óleo, água e surfactante. A estrutura da nanoemulsão O/A geralmente possui cauda apolar das moléculas de surfactante/tensoativo em volta do núcleo hidrofóbico do óleo, enquanto a cabeça polar das moléculas circula a fase aquosa, conforme mostra a Figura 3.

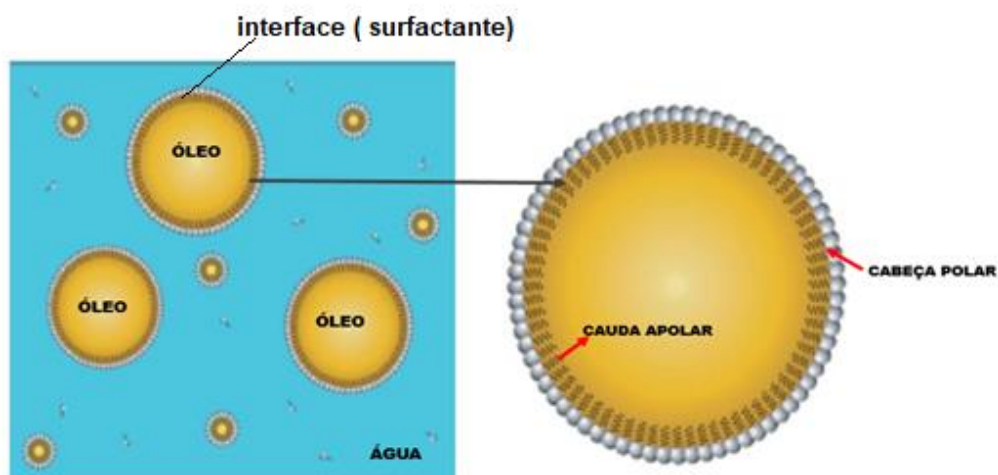


Figura 3. Esquema da estrutura das nanoemulsões do tipo O/A e uso de surfactante. Adaptado de (McClements, 2012).

3.2 Técnicas de produção de nanoemulsões

Emulsões e nanoemulsões normalmente são formadas pelos mesmos mecanismos de produção. Os mecanismos de produção são divididos em alta energia utilizando homogeneização de alta pressão, processos ultrassônicos, que em geral apresentam elevado índice de polidispersidade, ou ainda, mecanismos que usam técnicas de baixa energia que incluem métodos de inversão de fase, microfluidização, utilização de membranas, técnica de emulsificação espontânea, inversão de fase de temperatura, que são alternativas promissoras para futuras aplicações no campo da engenharia de alimentos (ZHANG; QIAO; CHEN, 2007).

As técnicas de alta energia com dispositivos mecânicos podem ser homogeneização a frio ou homogeneização a quente, realizada em alta pressão, com uso de sondas ou banhos ultrassônicos. Passar uma emulsão através de uma válvula de homogeneização de alta pressão (HPH) reflete na diminuição no diâmetro médio das partículas e na largura de distribuição, de acordo com o número de passagens (HÅKANSSON *et al.*, 2013). Assim, a vantagem do método de homogeneização de alta pressão atende à produção de emulsões alimentares, formulações cosméticas e farmacêuticas, porque fornece boas propriedades de textura e maior estabilidade após a homogeneização. A combinação de cisalhamento intenso, cavitação e a turbulência que rompe as gotículas de óleo relativamente pequenas ($d < 1\mu\text{m}$) irá formar as partículas na faixa de tamanho desejado (MCCLEMENTS, 2011).

Para ocorrer a homogeneização por alta pressão, no entanto, é necessária uma pré-emulsificação com agitadores de alto cisalhamento para obtenção de estruturas no tamanho desejável. O resultado desse processo, porém, depende das condições hidrodinâmicas dentro da zona de ruptura, da taxa de dissipação de energia, da viscosidade das fases e do tempo de permanência na zona de ruptura (MCCLEMENTS, 2012a). Dessa forma, o tamanho médio de gotas pelo método de alta energia depende das condições de operação (intensidade, temperatura e tempo) junto à composição da amostra (óleo utilizado e surfactante, ambos em suas respectivas concentrações) (QIAN; MCCLEMENTS, 2011). A produção de nanoestruturas por homogeneização de alta pressão destaca-se por ser uma técnica que permite a obtenção de nanopartículas de uma forma fácil e rápida e de simples ampliação de escala.

4 POTENCIAL BIOLÓGICO DE NANOEMULSÕES DE ÓLEO DE BURITI

4.1 Técnicas para avaliar a capacidade antioxidante

O óleo de buriti, assim como outros óleos vegetais, apresenta substâncias apolares (fitoesterol, tocoferol, carotenoides) que são importantes por atuar como antioxidantes naturais (DAMODARAN, PARKIN E FENNEMA, 2010). Os antioxidantes são substâncias que podem exercer diferentes mecanismos, como retardar a taxa de oxidação lipídica e inibir ou prevenir os radicais livres, aumentando a estabilidade do produto (LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007). A capacidade antioxidante de sistemas emulsionados tem recebido grande atenção devido à disponibilidade de entregar compostos lipofílicos importantes na promoção e prevenção à saúde (CHO *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2018).

A necessidade de pesquisar novos compostos antioxidantes utilizando a nanotecnologia é crescente, no entanto também desafiadora, devido a algumas limitações dos processos em gerar radicais pró-oxidantes. Geralmente os metais de transição são os principais pró-oxidantes nas emulsões, porque aceleram a oxidação lipídica. Isso torna-se um desafio, pois, devido à capacidade do ferro de interagir com hidroperóxidos lipídicos, ocorre uma atração desse ferro na superfície da emulsão (WARAHO *et al.*, 2009).

Considerando o óleo de buriti como agente potencial biológico, que apresenta uma excelente atividade antioxidante, esse contribui positivamente em sistemas de nanoemulsão para aplicações nas indústrias de alimentos ou farmacêutica (SPERANZA *et al.*, 2015). Além

disso, a composição e concentração dos componentes minoritários do óleo de buriti são fatores importantes para aumentar a estabilidade oxidativa (CHEN *et al.*, 2011).

4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana

A presença de microorganismos é anterior ao surgimento da espécie humana e nos acompanha desde o início da evolução. Em alguns casos bactérias são benéficas, como por exemplo as bactérias intestinais, que auxiliam no processo de digestão (SINGH *et al.*, 2017). As bactérias podem ser inativadas pelo rompimento de suas membranas celulares sob a ação de antibióticos (CAO *et al.*, 2017), detergentes ou soluções de etanol 70%, além de processos mecânicos ou ainda pelo uso de nanoemulsões com polímeros naturais (ZHANG *et al.*, 2014).

As bactérias patogênicas de maior ocorrência devido à elevada resistência aos agentes antimicrobianos são do grupo Gram-positiva *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e do grupo Gram-negativa *Escherichia coli*. O interesse por produtos naturais com potencial biológico tem crescido na tentativa de encontrar novas substâncias antimicrobianas de origem natural (MAJEED *et al.*, 2016).

Por volta da década de 50 os primeiros antibióticos foram descobertos, sendo eficientes para o tratamento de bactérias do grupo Gram-positivas. Entretanto, logo após essa descoberta, novas cepas tornaram-se resistentes a esses agentes antimicrobianos, aumentando os desafios (MOUSAVI KHANEGHAH; HASHEMI; LIMBO, 2018). A necessidade de buscar agentes com potencial biológico de baixo custo e fácil permeabilidade na membrana do patógeno tem levado a inúmeras hipóteses durante anos de pesquisa. Logo, algumas maneiras foram estudadas e formuladas para facilitar o mecanismo de ação dos compostos bioativos, lipofílicos e hidrofóbicos sobre a célula dos patógenos (BATISTA *et al.*, 2012; KADRI *et al.*, 2017; MAJEED *et al.*, 2016b).

Os óleos essenciais fazem parte de um grupo de substâncias hidrofóbicas. São metabolitos secundários de plantas e apresentam ação antimicrobiana atribuída aos compostos fenólicos. A penetração desses óleos na membrana celular causa vazamento de íons e conteúdo citoplasmático, o que leva à degradação celular (BURT, 2004; GUERRA-ROSAS *et al.*, 2017). Por outro lado, os óleos vegetais também apresentam hidrofobicidade. Devido aos compostos bioativos e aos ácidos graxos insaturados do óleo, apresentam atividade antimicrobiana (BORGES *et al.*, 2017; DONSI; FERRARI, 2016; NAZIF, 2002).

Portanto, a compreensão e a manipulação de propriedades físicas e químicas de substâncias hidrofóbicas na construção de sistemas nanoemulsificados são necessárias para

avaliar sua influência no potencial biológico (ACOSTA, 2009; ARTIGA-ARTIGAS; ACEVEDO-FANI; MARTÍN-BELLOSO, 2017; DONSI *et al.*, 2012).

O avanço da nanotecnologia nas últimas décadas impulsionou o desenvolvimento de técnicas com foco nas indústrias alimentícia e farmacêutica contra mecanismos de ação biológica de bactérias patogênicas (DONSI *et al.*, 2011). De forma geral, os trabalhos evidenciam que há poucos estudos relacionados à produção de nanoemulsões com óleos vegetais e que tenham avaliado o potencial antimicrobiano também relacionado ao tamanho de partículas.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As propriedades químicas do óleo de buriti, ao serem submetidas ao processo de interesterificação enzimática, podem potencializar as propriedades do óleo e agregar valor econômico. A exploração do óleo pode ocorrer mesmo com baixa produtividade comercial, pois, pode preservar as características físico-químicas do óleo, propõe melhoria nas propriedades funcionais e biológicas que são importantes para sua aplicação em sistemas de entrega de compostos bioativos com potencial biológico. Há uma possibilidade na abordagem multidisciplinar empregada na engenharia de sistemas nanoemulsionados com aplicações tecnológicas a serem exploradas.

REFERÊNCIAS

- ACEVEDO-FANI, A.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. Nanostructured emulsions and nanolaminates for delivery of active ingredients: Improving food safety and functionality. **Trends in Food Science and Technology**, v. 60, p. 12–22, [s.d.].
- ACOSTA, E. Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 14, n. 1, p. 3–15, 2009.
- AHMED, K. et al. Nanoemulsion- and emulsion-based delivery systems for curcumin: Encapsulation and release properties. **Food Chemistry**, v. 132, n. 2, p. 799–807, maio 2012.
- ALBUQUERQUE, M. L. S. et al. Infrared absorption spectra of Buriti (*Mauritia flexuosa* L.) oil. **Vibrational Spectroscopy**, v. 33, n. 1–2, p. 127–131, 2003.

ANTON, N. et al. Nano-emulsions and nanocapsules by the PIT method: An investigation on the role of the temperature cycling on the emulsion phase inversion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 344, n. 1–2, p. 44–52, nov. 2007.

AOCS, 2009. Determination of cis-, trans-, Saturated, Monounsaturated and Polyunsaturated Fatty Acids in Vegetable or Non-Ruminant Animal Oils and Fats by Capillary GLC (Ce 1h-05). In: **Official Methods and Recommended Practices of the AOCS**. [s.l: s.n.].

ARTIGA-ARTIGAS, M.; ACEVEDO-FANI, A.; MARTÍN-BELLOSO, O. Improving the shelf life of low-fat cut cheese using nanoemulsion-based edible coatings containing oregano essential oil and mandarin fiber. **Food Control**, 2017.

BATISTA, J. S. et al. Atividade antibacteriana e cicatrizante do óleo de buriti *Mauritia flexuosa* L. **Ciência Rural**, v. 42, n. 1, p. 136–141, 2012.

BORGES, A. et al. Prevention, removal and inactivation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* biofilms using selected monoterpenes of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 123, n. 1, p. 104–115, 2017.

BOVI, G. G.; PETRUS, R. R.; PINHO, S. C. Feasibility of incorporating buriti (*Mauritia flexuosa* L.) oil nanoemulsions in isotonic sports drink. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 10, p. 2201–2209, 2017.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223–253, ago. 2004.

CAO, Z. et al. Nanoemulsion is an effective antimicrobial for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in infected wounds. **Nanomedicine**, v. 12, n. 10, p. 1177–1185, 2017.

CHANG, Y.; MCLANDSBOROUGH, L.; MCCLEMENTS, D. J. Physicochemical properties and antimicrobial efficacy of carvacrol nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 37, p. 8906–8913, 2013.

CHEN, B. et al. Minor Components in Food Oils : A Critical Review of their Roles on Lipid Oxidation Chemistry in Bulk Oils and Emulsions Minor Components in Food Oils : A Critical Review of their Roles on Lipid Oxidation Chemistry in Bulk Oils. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, p. 901–916, 2011.

CHEONG, A. M.; TAN, C. P.; NYAM, K. L. In-vitro gastrointestinal digestion of kenaf seed oil-in-water nanoemulsions. **Industrial Crops and Products**, 2016.

CHO, H. T. et al. Droplet size and composition of nutraceutical nanoemulsions influences bioavailability of long chain fatty acids and Coenzyme Q10. **Food Chemistry**, v. 156, p. 117–122, 2014.

COSTA, P. A. DA et al. Phytosterols and tocopherols content of pulps and nuts of Brazilian fruits. **Food Research International**, v. 43, n. 6, p. 1603–1606, 2010.

DAMODARAN, S., PARKIN, K.& FENNEMA, O. (2010). In Artmed (Ed.). Química de Alimentos de Fennema.

DE ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 13, p. 5062–5072, 2007.

DEL MUNDO, D. M. N.; SUTHEERAWATTANANONDA, M. Influence of fat and oil type on the yield, physico-chemical properties, and microstructure of fat, oil, and grease (FOG) deposits. **Water Research**, v. 124, p. 308–319, 2017.

DIVISION, M. OILCROPS INDICES FOR OILSEEDS , VEGETABLE OILS WORLD OILCROP AND PRODUCT MARKET Contact : n. November, 2018.

DONSÌ, F. et al. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 9, p. 1908–1914, 2011.

DONSÌ, F. et al. Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: Effect of the emulsifier. **Journal of Biotechnology**, v. 159, n. 4, p. 342–350, 2012.

DONSÌ, F.; FERRARI, G. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. **Journal of Biotechnology**, 2016.

FATHI, M.; MOZAFARI, M. R.; MOHEBBI, M. Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. **Trends in Food Science and Technology**, v. 23, n. 1, p. 13–27, 2012.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 3–4, p. 197–212, 2010.

FRANÇA, L. F. DE et al. Supercritical extraction of carotenoids and lipids from buriti (*Mauritia flexuosa*), a fruit from the Amazon region. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 14, n. 3, p. 247–256, mar. 1999.

FRANKEL, E. N. Chemistry of Extra Virgin Olive Oil: Adulteration, Oxidative Stability, and Antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 10, p. 5991–6006, 26 maio 2010.

FREITAS, M. L. F. et al. Quality characteristics and thermal behavior of buriti (*Mauritia flexuosa* L.) oil ; Parámetros de calidad y comportamiento térmico del aceite de buriti (*Mauritia flexuosa* L.). **GRASAS Y ACEITES**, v. 68, n. 4, p. 9, 2017.

GALDINO, A. P. P. Estudos de mercado: andiroba, buriti/ muriti, murumuru. p. 34, 2007.

GAO, P. et al. Phytochemical Content, Minor-Constituent Compositions, and Antioxidant Capacity of Screw-Pressed Walnut Oil Obtained from Roasted Kernels. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 121, n. 1, p. 1800292, jan. 2019.

- GUEDES, A. M. M. et al. Physicochemical properties of interesterified blends of fully hydrogenated crambe abyssinica oil and soybean oil. **JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, n. 1, p. 111–123, 2014.
- GUERRA-ROSAS, M. I. et al. Antimicrobial activity of nanoemulsions containing essential oils and high methoxyl pectin during long-term storage. **Food Control**, 2017.
- GUPTA, A. et al. Nanoemulsions: Formation, properties and applications. **Soft Matter**, v. 12, n. 11, p. 2826–2841, 2016.
- HÅKANSSON, A. et al. A high-pressure homogenization emulsification model—Improved emulsifier transport and hydrodynamic coupling. **Chemical Engineering Science**, v. 91, p. 44–53, mar. 2013.
- HUNTER, E. J. Studies on effects of dietary fatty acids as related to their position on triglycerides. **Lipids**, v. 36, n. 7, p. 655–668, 2001.
- IFEDUBA, E. A.; MARTINI, S.; AKOH, C. C. Enzymatic Interesterification of High Oleic Sunflower Oil and Tripalmitin or Tristearin. **JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 93, n. 1, p. 61–67, 2016.
- IMRAN, M.; NADEEM, M. Triacylglycerol composition, physico-chemical characteristics and oxidative stability of interesterified canola oil and fully hydrogenated cottonseed oil blends. **Lipids in Health and Disease**, v. 14, n. 1, p. 138, 2015.
- IWASAKI, Y.; YAMANE, T. Enzymatic Synthesis of Structured Lipids. In: p. 151–171. 2000.
- IZQUIERDO, P. et al. Formation and stability of nano-emulsions prepared using the phase inversion temperature method. **Langmuir**, v. 18, n. 1, p. 26–30, 2002.
- KADRI, H. EL et al. Do oil-in-water (O/W) nano-emulsions have an effect on survival and growth of bacteria? **Food Research International**, v. 101, p. 114–128, 2017.
- KIM, B. H.; AKOH, C. C. Recent Research Trends on the Enzymatic Synthesis of Structured Lipids. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 8, p. C1713–C1724, 2015.
- KOMAIKO, J. S.; MCCLEMENTS, D. J. Formation of Food-Grade Nanoemulsions Using Low-Energy Preparation Methods: A Review of Available Methods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 2, p. 331–352, mar. 2016.
- KONG, M. et al. Investigations on skin permeation of hyaluronic acid based nanoemulsion as transdermal carrier. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 2, p. 837–843, 2011.
- KOOLEN, H. H. F. et al. Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) by UPLC-ESI-MS/MS. **Food Research International**, 2013.

LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. **Progress in Lipid Research**, 2007.

LEE, J. et al. Production of lipase-catalyzed structured lipids from safflower oil with conjugated linoleic acid and oxidation studies with rosemary extracts. v. 37, p. 967–974, 2004.

LI, H.-Z. et al. Optimization of ultrasound-assisted hexane extraction of perilla oil using response surface methodology. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 18–24, dez. 2015.

LOTTENBERG, A. M. et al. The role of dietary fatty acids in the pathology of metabolic syndrome. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, n. 9, p. 1027–1040, 2012.

MAJEED, H. et al. Bactericidal action mechanism of negatively charged food grade clove oil nanoemulsions. **Food Chemistry**, v. 197, p. 75–83, abr. 2016b. .

MARANGONI, A. G.; DÉRICK ROUSSEAU. Engineering triacylglycerols: The role of interesterification. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, p. 329–335, 1995

MASON, T. G. et al. Nanoemulsions: Formation, structure, and physical properties. **Journal of Physics Condensed Matter**, 2006.

MASUCHI, M. H. et al. Fats from chemically interesterified high-oleic sunflower oil and fully hydrogenated palm oil. **JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, n. 5, p. 859–866, 2014.

MCCLEMENTS, D. J. Emulsion Design to Improve the Delivery of Functional Lipophilic Components. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 1, n. 1, p. 241–269, abr. 2010.

MCCLEMENTS, D. J. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. **Soft Matter**, v. 7, n. 6, p. 2297–2316, 2011.

MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: Terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, v. 8, n. 6, p. 1719–1729, 2012a.

MCCLEMENTS, D. J. Crystals and crystallization in oil-in-water emulsions: Implications for emulsion-based delivery systems. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 174, p. 1–30, 2012b.

MCCLEMENTS, D. J.; LI, Y. Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 159, n. 2, p. 213–228, 2010.

MEDEIROS, M. C. et al. Buriti oil (*Mauritia flexuosa* L.) negatively impacts somatic growth and reflex maturation and increases retinol deposition in young rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 46, p. 7–13, 2015.

MICHALSKI, M. C. et al. Multiscale structures of lipids in foods as parameters affecting fatty acid bioavailability and lipid metabolism. **Progress in Lipid Research**, v. 52, n. 4, p. 354–373, out. 2013.

MOREIRA, D. K. T. et al. Production and characterization of structured lipids with antiobesity potential and as a source of essential fatty acids. **Food Research International**, v. 99, n. February, p. 713–719, 2017.

MOUSAVI KHANEGHAH, A.; HASHEMI, S. M. B.; LIMBO, S. Antimicrobial agents and packaging systems in antimicrobial active food packaging: An overview of approaches and interactions. **Food and Bioproducts Processing**, v. 111, p. 1–19, 2018.

NAZIF, N. M. Phytoconstituents of *Zizyphus spina-christi* L. fruits and their antimicrobial activity. **Food Chemistry**, v. 76, n. December 1999, p. 77–81, 2002.

O'BRIEN R.D. 2009. Fats and Oils: formulating and processing for applications. 3rd edn. CRC Press, United States of America.

OEHLKE, K. et al. Potential bioavailability enhancement of bioactive compounds using food-grade engineered nanomaterials: a review of the existing evidence. **Food & Function**, 2014.

OSBORN, H. T.; AKOH, C. C. Structured lipids-novel fats with medical, nutraceutical, and food applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 1, n. 3, p. 110–120, 2002.

OSTERTAG, F.; WEISS, J.; MCCLEMENTS, D. J. Low-energy formation of edible nanoemulsions: Factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 388, n. 1, p. 95–102, 2012.

PAQUES, F.; MACEDO, G. Revisão. **Quimica Nova**, v. 29, n. 1, p. 93–99, 2006.

POYATO, C. et al. Oxidative stability of O/W and W/O/W emulsions: Effect of lipid composition and antioxidant polarity. **Food Research International**, 2013a.

QIAN, C. et al. Inhibition of β -carotene degradation in oil-in-water nanoemulsions: Influence of oil-soluble and water-soluble antioxidants. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1036–1043, 2012.

QIAN, C.; MCCLEMENTS, D. J. Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: Factors affecting particle size. **Food Hydrocolloids**, 2011.

RAO, J.; MCCLEMENTS, D. J. Food-grade microemulsions and nanoemulsions: Role of oil phase composition on formation and stability. **Food Hydrocolloids**, 2012.

RIBEIRO et al. Interesterificação química: alternativa para obtenção de gorduras zero trans Ana. **Quim. Nova**, v. 30, n. 5, p. 1295–1300, 2007a.

RIBEIRO et al. Enzymatic synthesis of structured lipids from liquid and fully hydrogenated high oleic sunflower oil. **International Journal of Food Properties**, v. 21, n. 1, p. 702–716, 2018.

RIBEIRO, A. et al. Thermal behavior, microstructure, polymorphism, and crystallization properties of zero trans fats from soybean oil and fully hydrogenated soybean oil. **Food Biophysics**, v. 4, n. 2, p. 106–118, 2009.

ROUSSEAU, D.; MARANGONI, A. G. The effects of interesterification on physical and sensory attributes of butterfat and butterfat-canola oil spreads. **Food Research International**, 1998.

RUAN, X. et al. Characterisation of zero-trans margarine fats produced from camellia seed oil, palm stearin and coconut oil using enzymatic interesterification strategy. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 1, p. 91–97, 2014.

SALVIA-TRUJILLO, L. et al. In vitro and in vivo study of fucoxanthin bioavailability from nanoemulsion-based delivery systems: Impact of lipid carrier type. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 293–304, 2015a.

SALVIA-TRUJILLO, L. et al. Physicochemical characterization and antimicrobial activity of food-grade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils. **Food Hydrocolloids**, v. 43, 2015b.

SANTOS, J. S. et al. ¹H NMR combined with chemometrics tools for rapid characterization of edible oils and their biological properties. **Industrial Crops and Products**, v. 116, n. February, p. 191–200, 2018.

SINGH, P. et al. Development of carboxymethyl cellulose-chitosan hybrid micro- and macroparticles for encapsulation of probiotic bacteria. **Carbohydrate Polymers**, v. 175, p. 87–95, 2017.

SIVAKUMAR, M.; YING, S.; WEI, K. Ultrasonics Sonochemistry Cavitation technology – A greener processing technique for the generation of pharmaceutical nanoemulsions. **Ultrasonics - Sonochemistry**, v. 21, n. 6, p. 2069–2083, 2014.

SOLANS, C.; SOLÉ, I. Nano-emulsions: Formation by low-energy methods. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 17, n. 5, p. 246–254, 2012.

SPERANZA, P. et al. Improving the chemical properties of Buriti oil (*Mauritia flexuosa* L .) by enzymatic interesterification. v. 69, n. December, p. 1–8, 2018.

SPERANZA, P.; MACEDO, G. A. Lipase-mediated production of specific lipids with improved biological and physicochemical properties. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 1699–1706, dez. 2012.

SPERANZA, P.; RIBEIRO, A. P. B.; MACEDO, G. A. Lipase catalyzed interesterification of Amazonian pataúá oil and palm stearin for preparation of specific-structured oils. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 12, p. 8268–8275, 23 dez. 2015.

SPERANZA, P.; RIBEIRO, A. P. B.; MACEDO, G. A. Application of lipases to regiospecific interesterification of exotic oils from an Amazonian area. **Journal of Biotechnology**, v. 218, p. 13–20, jan. 2016.

TADROS, T. et al. Formation and stability of nano-emulsions **Advances in Colloid and Interface Science**, 2004.

TADROS, T. F. Emulsion Formation, Stability and Rheology. 2002.

TAMJIDI, F. et al. Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 19, p. 29–43, 2013.

WANG, X. Y. et al. Degree of oxidation depending on the positional distribution of linolenic acid in perilla oil and interesterified products. **Food Science and Biotechnology**, 2006.

WARAHO, T. et al. Prooxidant mechanisms of free fatty acids in stripped soybean oil-in-water emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2009.

WEN, X. et al. Characterisation of seed oils from different grape cultivars grown in China. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 7, p. 3129–3136, 20 jul. 2016.

WILLIS, W. M.; LENCKI, R. W.; MARANGONI, A. G. Lipid modification strategies in the production of nutritionally functional fats and oils. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, n. 8, p. 639–674, 1998.

XU, X. et al. Production of structured lipids by lipase-catalyzed interesterification in a flat membrane reactor. **JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 77, n. 10, p. 1035–1041, 2000.

YANG, R. et al. A review of chemical composition and nutritional properties of minor vegetable oils in China. **Trends in Food Science and Technology**, 2018.

YUKUYAMA, M. N. et al. Nanoemulsion: Process selection and application in cosmetics - A review. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 38, n. 1, p. 13–24, 2016.

ZANATTA, C. F. et al. Photoprotective potential of emulsions formulated with Buriti oil (*Mauritia flexuosa*) against UV irradiation on keratinocytes and fibroblasts cell lines. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 1, p. 70–75, 2010.

ZHANG, W.; QIAO, X.; CHEN, J. Synthesis of silver nanoparticles-Effects of concerned parameters in water/oil microemulsion. **Materials Science and Engineering B: Solid-State Materials for Advanced Technology**, 2007.

ZHANG, Z. et al. Effects of nisin on the antimicrobial activity of D -limonene and its nanoemulsion. **FOOD CHEMISTRY**, v. 150, p. 307–312, 2014.

ZHU, M. et al. Prediction of fatty acid composition in camellia oil by ¹H NMR combined with PLS regression. **Food Chemistry**, v. 279, n. September 2018, p. 339–346, maio 2019.

CAPÍTULO 2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO ÓLEO DE BURITI (*Mauritia Flexuosa* L.) APÓS INTERESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

Parte do conteúdo desse capítulo foi publicado no Journal of Grasas y Aceites Vol. 69, n. 4, p. 282 (<https://doi.org/10.3989/gya.022918>)

Paula Speranza¹, Karina Magna Macena Leão¹, Tauan S. Narciso Gomes¹, Livia Viana Castro Reis¹, Alessandra Pereira Rodrigues², Juliana Alves Macedo¹, Ana Paula Badan Ribeiro³ Gabriela Alves Macedo.

RESUMO

A maioria dos óleos vegetais comestíveis é avaliada como *commodities*, devido ao seu baixo valor agregado. Os óleos amazônicos apresentam potencial de aplicação, porém são pouco explorados em escala comercial. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da reação de interesterificação enzimática no óleo de buriti quanto à composição em triacilglicerol, classes de lipídios e compostos bioativos. Os resultados indicaram que a enzima lipase utilizada como catalisador na reação apresentou especificidade na posição sn-1,3 para o ácido graxo oleico e gerou lipídios estruturados mais insaturados. Os triacilgliceróis obtidos das reações de 6 e 24 horas representaram um aumento de 11% e de 12,5% do tipo (OOO), respectivamente. Os resultados mostraram que a alteração na estrutura química dos compostos pode produzir lipídios especiais e melhorar a solubilidade para aplicações em sistemas emulsificados.

Palavras-chave: β -caroteno; compostos minoritários; tocoferóis; óleos vegetais

ABSTRACT

Most edible vegetable oils are evaluated as commodities due to their low added value. Amazonian oils have a potential application, but they are little explored on a commercial scale. The objective of this study was to evaluate the effects of enzymatic interesterification reaction on buriti oil on triacylglycerol composition, lipid classes and bioactive compounds. The results indicated that the lipase enzyme used as a catalyst in the reaction presented sn-1,3 specificity for oleic fatty acid and generated more unsaturated structured lipids. Triacylglycerols obtained from the 6 and 24-hour reactions represented an increase of 11% and 12.5% of this type (OOO), respectively. The results showed that the alteration in the chemical structure of the compounds can produce special lipids and improve solubility for applications in emulsified systems.

Keywords: β -carotene; minority compounds; tocopherols; vegetable oils.

1 INTRODUÇÃO

O Buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) é fruto da palmeira nativa do Brasil encontrada na região centro-norte do país, mais precisamente na Amazônia, a qual normalmente cresce em áreas periodicamente inundadas (FREITAS et al., 2017). O óleo obtido do buritizeiro, sob o ponto de vista nutricional, é uma excelente fonte de carotenoides, em especial devido ao seu conteúdo de β -caroteno e à alta concentração de ácidos graxos monoinsaturados, majoritariamente o ácido oleico, assim como quantidades importantes de tocoferóis e fitoesteróis.

Sabe-se que os compostos conhecidos como antioxidantes no óleo de buriti são usados como alternativa terapêutica e biológica com referência à atividade antimicrobiana (BATISTA et al., 2012; COSTA et al., 2010; DE ROSSO; MERCADANTE, 2007; SPERANZA et al., 2018; ZANATTA et al., 2010). Segundo a literatura, o óleo de buriti possui diversas propriedades benéficas, como as ações antimicrobiana, antioxidante e antitrombótica (SPERANZA et al., 2016b; SIQUEIRA et al., 2014). As características biológicas do óleo de buriti estão relacionadas principalmente a seus compostos minoritários, em particular aos carotenoides, também conhecidos por seus efeitos benéficos à saúde. É ainda uma das maiores e conhecidas fontes de carotenoides (BATISTA et al., 2012; DE ROSSO; MERCADANTE, 2007; ZANATTA et al., 2010). Embora haja crescimento na extração e potencial de aplicação do óleo de buriti nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética, seu uso ainda é limitado.

Uma alternativa para alterar a funcionalidade das gorduras, visando a aumentar sua aplicação sem alterar a sua composição de compostos minoritários é conhecida como interesterificação enzimática. O uso de lipases nessas reações permite a redistribuição de ácidos graxos no triacilglicerol, alterando as funcionalidades das gorduras. Alguns estudos na literatura demonstraram os efeitos da interesterificação enzimática em óleos e gorduras (IFEDUBA; MARTINI; AKOH, 2016; RUAN et al., 2014; SPERANZA; RIBEIRO; MACEDO, 2016). Além disso, como as lipases atuam sob condições suaves de temperatura e pressão, os compostos minoritários são preservados durante essa reação (RESHMA et al., 2008; SPERANZA; MACEDO, 2012).

Este trabalho, portanto, teve como objetivo avaliar o efeito da interesterificação enzimática do óleo de buriti sob uma nova perspectiva da composição química. A mudança na distribuição de ácidos graxos no triacilglicerol e o teor dos compostos minoritários do óleo de buriti afetam as propriedades de lubrificação, desempenho mecânico, estrutura e propriedades nutricionais. Dessa forma, outros modelos de aplicações podem ser desenvolvidos a partir desse

óleo, como para novos produtos cosméticos, protetores solares, produção de corantes naturais visando atender às necessidades da indústria de alimentos e ainda como agente antimicrobiano.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

O óleo de buriti foi comprado da Beraca Sabará (São Paulo, Brasil). A lipase comercial purificada e imobilizada de *T. lanuginosa* (Lipozyme TL-IM) foi fornecida pela Novozymes América Latina Ltda. Todos os outros reagentes foram de grau analítico.

2.2 Composição em ácidos graxos

A determinação da composição em ácidos graxos do óleo de buriti foi realizada em duplicata, utilizando cromatógrafo em fase gasosa GCMS-QP2010S acoplado ao detector FID. Após, a reação de esterificação das amostras foi realizada segundo o método HARTMAN e LAGO (1973). Os ésteres metílicos dos ácidos graxos foram separados de acordo com o procedimento AOCS Ce 1f-96 (2009), realizado em uma coluna capilar DB-23 Agilent (50% Cyanopropyl-methylpolysiloxano), com as seguintes dimensões: comprimento 60 m, Diâmetro interno 0,25mm e espessura do filme 0,25µm. As condições de análise foram: gás de arraste: hélio, em vazão de 1,0 mL/min; velocidade linear 24 cm/s; temperatura do detector 280 °C; temperatura do injetor 250 °C; temperatura do forno 110 - 215 °C a 5 °C/min, 215 °C por 24 min; injeção modo *split* razão 1:50; volume injetado: 1,0 µL. A composição qualitativa foi realizada por comparação dos tempos de retenção dos picos com os dos respectivos padrões de ácidos graxos.

2.3 Interesterificação enzimática

A reação de interesterificação enzimática foi realizada de acordo com a metodologia desenvolvida no grupo de pesquisa (SPERANZA; RIBEIRO; MACEDO, 2016) e produziu os lipídios estruturados (LE). Foram pesados 10 g de óleo de buriti em frascos de vidro âmbar. Adicionaram-se 2,5% (m/m) da enzima comercial Lipozyme TL-IM (Novozyme). A reação ocorreu em banho-maria Dubnoff a 40 °C sob agitação orbital 150 rpm durante 6 e 24 horas. Ao final das reações de interesterificação, o óleo foi filtrado e a lipase removida com membrana Millex (PTFE) 0,45 µm de poro e 33 mm de diâmetro. O lipídio estruturado foi

armazenado em frasco de vidro âmbar, adicionando-se gás nitrogênio para evitar oxidação. O armazenado foi feito em freezer convencional a -18 °C.

2.4 Classes de lipídios

A determinação de classes de lipídios triacilglicerol (TAG), diacilglicerol (DAG), monoacilglicerol (MAG) e Ácidos Graxos Livres (AGL) foi realizada por cromatografia líquida de alta performance por exclusão de tamanho (HPSEC), de acordo com a metodologia descrita por (GUEDES et al., 2014). As famílias de compostos foram identificadas por comparação dos tempos de eluição dos picos com respectivos padrões de ácidos graxos livres e glicerídeos. A análise foi realizada em duplicata. Os ácidos graxos livres monoacilglicerois e diacilglicerois foram removidos de acordo com a metodologia de (FARMANI et al., 2007). Os óleos foram congelados a -18 °C na presença de nitrogênio para posterior análise.

2.5 Composição Triacilglicerólica (TAG)

A composição em triacilglicerois foi obtida segundo o método AOCS Ce 5-86 (2009), em cromatógrafo gasoso GC Agilent 6850 Series GC System Catalog:122-1811 (50% fenil-metilpolisiloxano), com dimensões 15 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,15 µm de espessura de filme. As condições de operação do cromatógrafo foram: fluxo da coluna = 1,0 ml/min; velocidade linear = 40 cm/seg; temperatura do detector 375 °C; temperatura do injetor 360 °C; temperatura do forno: 280 - 340 °C a 2 °C/min e 340 °C por 40 min; gás de arraste: hélio; volume injetado 1,0 µL, injeção split, razão 1:100; concentração amostra 10 mg/ml de tetrahidrofurano. A identificação dos TAGs foi realizada através da comparação dos tempos de retenção, de acordo com (FILHO; MENDES; LANÇAS, 1995) realizado em duplicata para cada amostra.

2.6 Tocoferol

A determinação dos isômeros α , β , γ e δ -tocoferóis foi realizada pelo método AOCS Ce 8-89 (AOCS, 2009). As amostras foram diluídas em hexano a uma concentração de 0,1 g / ml e injetadas no cromatógrafo líquido UHPLC. O experimento foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Speranza, Ribeiro, and Macedo (2015b). Realizada em triplicata.

2.7 Fitoesterol

As análises foram realizadas em cromatografia líquida de alta eficiência segundo método oficial AOCS (2009), com detector UV (Perkin Elmer, modelo Flexar) em $\lambda = 205$ nm. A separação cromatográfica foi realizada através da utilização de uma coluna C18 de fase reversa, com dimensões de 250 mm $\times$ 4,6 mm $\times$ 5 μ m. Os analitos foram eluídos em modo isocrático com metanol e acetonitrila, na proporção de 80:20, respectivamente, com vazão de 1,2 mL, min⁻¹ e tempo total de eluição de 15 min. Foram identificados os fitoesteróis totais e suas frações, comparados com tempo de retenção de padrões puros.

2.8 β -caroteno total

O teor de caroteno das amostras foi determinado pelo método espectrofotométrico UV/VIS (FRANÇA *et al.*, 1999). Foi diluído 0,1 g de óleo de buriti em 25ml da mistura dos solventes hexano e acetona (7:3 v/v) e realizada a leitura em comprimento de onda 433nm. Foi construída uma curva padrão com diferentes concentrações de β -caroteno. O resultado foi expresso em μ g de β -caroteno por g de amostra de óleo de buriti. As análises foram realizadas em triplicata.

2.9 Fenólicos totais

Compostos fenólicos totais do óleo de buriti foram medidos pelo método de Folin-Ciocalteu. A extração dos compostos deu-se a partir de uma solução com hexano e 60% da solução metanol (v/v), de acordo com a metodologia descrita por (SPERANZA *et al.*, 2016b). Nas alíquotas de extrato metanólico foi adicionado o reagente Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos, foi adicionada uma solução de Na₂CO₃ carbonato de sódio (35% m/v) e a mistura foi guardada em local escuro e temperatura ambiente por 2 horas. O ensaio foi realizado em leitor de microplacas NovoStar (BMG LABTECH, Alemanha) com filtros de absorbância de 725nm de comprimento de onda. O ácido gálico foi utilizado como padrão e construção da curva de calibração. Os resultados foram expressos como μ g.mL⁻¹ de ácido gálico (HRNCIRIK; FRITSCH, 2004).

2.10 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey, utilizando o Minitab v.16 (Minitab Inc., State College, EUA) para avaliar diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os valores médios.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização do óleo de buriti

Antes da reação de interesterificação, o óleo de buriti foi caracterizado por composição de ácidos graxos (Tabela 1). A proporção do ácido graxo monoinsaturado no óleo de buriti é representada pelo ácido graxo majoritário oleico (74,2%), seguido do ácido graxo saturado palmítico (19,8%). Estudos anteriores que abordam a composição em ácidos graxos do óleo de buriti o confirmam como excelente fonte de ácido oleico (BATAGLION *et al.*, 2015; FREITAS *et al.*, 2017b; SPERANZA *et al.*, 2016b).

Tabela 1. Composição em ácidos graxos (%) óleo de buriti.

Ácidos graxos	Óleo de buriti (%)
Ácido mirístico (C14:0)	-
Ácido palmítico (C16:0)	19.85±1.14
Ácido esteárico (C18:0)	1.43±0.02
Ácido oléico (C18:1)	74.17±1.04
Ácido linoléico (C18:2)	1.27±0.13
Ácido linolênico (C18:3)	0.85±0.13
Ácido araquídico (C20:0)	-
Ácido araquidônico (C20:1)	0.48±0.07
Outros	1.39
Σ Saturados	21.28
Σ Monoinsaturados	74.65
Σ Poliinsaturados	2.12

Nota: os valores obtidos são médias de duas replicatas ± desvio padrão.

O interesse sobre o ácido graxo monoinsaturado tem sido colocado porque este pode ser mais resistente à oxidação do que outros ácidos graxos insaturados. Além disso, do ponto de vista nutricional, o ácido oleico é conhecido como ácido graxo ômega-9, um dos

ácidos graxos mais encontrados na natureza. Poucos são os óleos conhecidos na natureza que possuem alto conteúdo de ácido oleico, como o azeite de oliva. Sabemos que a demanda por esse tipo de ácido graxo é crescente, devido à sua possibilidade de reduzir a oxidação de lipoproteína de baixa densidade (LDL) *in vivo* ou *in vitro*, sendo benéfico para a saúde (PACHECO *et al.*, 2008; POLYCHNIATOU; TZIA, 2018).

Alguns óleos, como soja e canola, são geneticamente modificados para terem uma composição em ácido graxo oleico semelhante à já encontrada naturalmente no óleo de buriti (O'BRIAN, 2009). Os resultados obtidos na literatura para o ácido oleico corroboram com os encontrados neste trabalho, variando entre 61 e 74%. Para o ácido palmítico, varia de 16 a 23% (FREITAS *et al.*, 2017; SERRA *et al.*, 2019). Poucos óleos naturais, como os óleos de oliva, pracaxi e pataúá, exibem uma concentração mais alta de ácido oleico (MEDEIROS *et al.*, 2015; SERRA *et al.*, 2019).

3.2 Classes de lipídios

A análise de classes lipídicas classificou os compostos em triacilgliceróis (TAG), diacilgliceróis (DAG), monoacilgliceróis (MAG) e ácidos graxos livres (AGL). Na (Tabela 2) essa análise indica que o óleo de buriti é essencialmente composto por TAG (93,4%), o que comprova a hidrólise seguida de síntese. A análise não detectou a presença de MAG ou AGL no óleo, provavelmente por ter sofrido um refino brando. No entanto, para 6,7% de DAG pode haver relação com a colheita e o manejo dos frutos, o que contribui para a ação de enzimas lipolíticas, provocando a hidrólise dos glicerídeos no fruto e o consequente aumento do conteúdo (SPERANZA *et al.*, 2016a). Mesmo assim, os resultados confirmam a qualidade inicial do óleo de buriti, condição indispensável para que a enzima atue de forma eficiente na reação de interesterificação. Óleos com valores superiores de acidez (>4%) podem causar desnaturação da enzima, impedindo seu desempenho de maneira eficiente e específica (ROUSSEAU; MARANGONI, 1998).

Tabela 2. Classes de lipídios do óleo de buriti e óleo de buriti interesterificado

ÓLEO	ÁREA (%)		
	TAG	DAG	MAG+AGL
Óleo de buriti	93,3±0,16	6,7±0,16	-
Óleo de buriti interesterificado (6h)	90,7±0,14	9,3±0,14	-
Óleo de buriti interesterificado (24h)	90,8±0,09	9,2±0,09	-

*Os valores são médias de duas replicatas $\pm$ desvio padrão. Triacilglicerol (TAG); diacilglicerol (DAG); monoacilglicerol (MAG) e ácidos graxos livres (AGL) presentes no óleo de buriti e óleo de buriti interesterificado.

Na interesterificação enzimática ocorrem duas reações opostas: hidrólise parcial e re-síntese de ésteres. Isso significa que, além do TAG, uma certa quantidade de acilglicerois parciais estará presente no produto final (XU *et al.*, 2000). Estes constituintes podem promover a cristalização (SILVA *et al.*, 2014) e modular todo o processo de cristalização, desde a nucleação até o polimorfismo e teor de gordura sólida.

A análise por cromatografia mostrou que a estrutura TAG foi mantida após 6 e 24 h de interesterificação do óleo de buriti. Na reação, a formação de uma pequena concentração de DAG ocorreu e não houve formação de MAG ou AGL. Esses resultados iniciais indicaram que as condições de reação foram adequadas para o desempenho da lipase e não favoreceram a hidrólise prolongada de TAG em acilglicerois parciais ou AGL.

Outros estudos confirmam a formação de uma pequena quantidade de lipídios menores, com maior polaridade e estrutura anfifílica após a interesterificação enzimática, utilizando diferentes substratos e condições de reação. Na reação utilizando banha de porco, óleo de linhaça e óleo de peixe, catalisados por Lipozyme RM-IM a 50 ° C por 4 h, houve um aumento de 4,1% no teor de acilglicerois parciais e 0,2% no conteúdo de ácidos graxos livres (WIRKOWSKA-WOJDYLA *et al.*, 2016). O teor de ácidos graxos livres apresentou variação de acordo com a temperatura utilizada na reação. Quanto maior a temperatura, menor a formação de ácidos graxos livres (MARANGONI; DÉRICK ROUSSEAU, 1995).

3.3 Composição Triacilglicerólica (TAG)

A composição em TAG do óleo de buriti e de óleos interesterificados está apresentada na (Tabela 3). Os resultados estão relacionados com a concentração parcial de acilglicerois dos óleos interesterificados produzidos. Os principais tipos de TAGs no óleo de buriti são POO (38,9%) e OOO (32,7%), que, nesta fração, indicam predominância de triacilglicerois di-insaturados e tri-insaturados. Também é possível enfatizar a presença de TAGs tipo PPO (9,8%) e POL (3,9%).

Tabela 3. Composição em TAG do óleo de buriti e óleo de buriti interesterificado após 6 e 24 horas

TAG	BO (%)	BO _{6h} (%)	BO _{24h} (%)
PPP	0,41 ± 0,01	1,01 ± 0,02	0,91± 0,01
PPO	9,76 ± 0,07	10,12± 0,04	8,34± 0,03
PSO	1,80 ± 0,10	1,63 ± 0,07	1,04± 0,07
POO	38,91± 0,09	34,17± 0,04	32,67± 0,03
POL	3,85 ± 0,01	4,47 ± 0,01	4,24± 0,13
POL _n	2,81 ± 0,03	2,86 ± 0,03	2,82± 0,08
SOO	6,14 ± 0,07	3,63 ± 0,09	4,27± 0,09
OOO	32,72 ± 0,02	36,30± 0,10	36,81±0,02
OOL	2,78 ± 0,04	3,48 ± 0,13	5,44± 0,08
OOL _n ;	0,82 ±0,08	2,33 ± 0,08	3,47± 0,07
Soma	100,0	100,0	100,0
Total SSS	0,41	1,01	0,91
Total SUS	11,56	11,75	9,38
Total SUU	51,57	45,13	43,99
Total UUU	36,32	42,11	45,72

*Os TAGs, em que: P-Palmítico (C16:0); S-Esteárico (C18:0); O-Oleico (C18:1); L-Linoleico (C18:2); L_n -Linolênico (C18:3), SSS: tri-saturado; SUS: di-saturado-insaturado; SUU: di-insaturado-saturado; UUU: tri-insaturado. Óleo de buriti (BO), óleo de buriti interesterificado 6 horas de reação (BO_{6h}), óleo de buriti interesterificado 24 horas de reação (BO_{24h}).

A interesterificação do óleo de buriti BO_{6h} e BO_{24h} formou novos compostos devido à redistribuição dos ácidos graxos, principalmente os ácidos oleico e palmítico, que compõem

majoritariamente o óleo de buriti. Dentre os principais tipos do TAG do óleo de buriti interesterificado, o POO reduziu em 12,1% após 6 horas de reação e 16,2% após 24 horas de reação. Entretanto, o aumento do TAG tri-insaturado OOO foi de 11% após 6 horas de reação e de 12,5% após 24 horas de reação. As modificações na composição de TAG dos lipídios estruturados em relação ao óleo de buriti alteram a funcionalidade desses óleos. Os TAG do tipo U₂S possuem um intervalo de fusão na faixa de 1 a 23 °C, enquanto o tipo U₃ possui um intervalo de fusão entre 1 e 14 °C (RODRIGUES e GIOIELLI, 2003). Alguns estudos enfatizam que, durante a reação de interesterificação enzimática em óleos e gorduras, a temperatura e o tempo são fatores importantes na determinação da extensão da migração do grupo acil (IFEDUBA; MARTINI; AKOH, 2016).

Com o aumento na concentração de TAG mais insaturado, houve redução na faixa de fusão do óleo, a qual interfere nas suas propriedades de lubrificação, desempenho mecânico, estruturação e propriedades nutricionais (O'BRIEN, 2009). Além disso, alguns estudos confirmam os efeitos positivos para a saúde após o aumento do consumo de ácidos graxos insaturados (MERICLI *et al.*, 2017).

KARABULUT, KAYAHAN e YAPRAK (2003) estudaram o processo de interesterificação usando misturas de estearina de palma totalmente hidrogenada ou estearina de palma com óleos de canola e algodão em diferentes proporções. O processo resultou em menor ponto, consistência e teor de gordura sólida para todos os lipídios estruturados produzidos devido à diminuição dos teores mais saturados de TAG.

NORIZZAH *et al.* (2004) estudaram o efeito da interesterificação de misturas de estearina de palma e oleína de palmiste em diferentes proporções. Os resultados indicaram que todos os óleos interesterificados apresentaram maior teor de TAGs, que foram mais insaturados e com um menor ponto de fusão em comparação com as misturas iniciais.

3.4 Tocoferóis

As principais formas de tocoferol no óleo de buriti e seus estruturados ajudam a explicar por que são considerados importantes antioxidantes naturais que ajudam a prevenir a peroxidação lipídica. Os resultados na (Tabela 4) mostram que o óleo de buriti possui os quatro isômeros do tocoferol e, nestes, o isômero β foi predominante. No trabalho anterior realizado pelo nosso grupo com o óleo de buriti os quatro isômeros também foram detectados, sendo os constituintes α e γ responsáveis por mais de 90% do teor total de tocoferol (SPERANZA *et al.*,

2016b). Os isômeros com maior concentração foram β -tocoferol e δ -tocoferol, assemelhando-se aos resultados encontrados por (SERRA *et al.*, 2019). Preparações comerciais a partir do óleo de soja consistem em mais de 80% de γ e δ -tocoferol.

Tabela 4. Composição de tocoferóis no óleo de buriti e óleo de buriti interesterificado após 6 e 24 horas

Óleo	α -Tocoferol (mg kg ⁻¹)	β -Tocoferol (mg kg ⁻¹)	γ -Tocoferol (mg kg ⁻¹)	δ -Tocoferol (mg kg ⁻¹)	Σ Tocoferóis (mg kg ⁻¹)
BO	15,71 $\pm$ 0,32 ^a	83,62 $\pm$ 1,82 ^a	5,52 $\pm$ 0,78 ^a	17,40 $\pm$ 0,35 ^a	122,2^a
BO_{6h}	10,09 $\pm$ 0,02 ^b	71,27 $\pm$ 1,10 ^b	3,66 $\pm$ 0,24 ^b	14,61 $\pm$ 0,35 ^b	99,7^b
BO_{24h}	7,44 $\pm$ 0,19 ^c	60,42 $\pm$ 0,92 ^c	1,82 $\pm$ 0,37 ^c	12,50 $\pm$ 0,36 ^b	82,2^c

Óleo de buriti (BO); Óleo de buriti interesterificado por 6h de reação (BO_{6h}); Óleo de buriti interesterificado por 24h de reação (BO_{24h}). Todos os valores são a médias de três repetições $\pm$ desvio padrão. Diferenças significativas entre as médias foram determinadas pela análise de variância e teste de Tukey. As mesmas letras na mesma coluna indicam que houve diferença significativa entre as amostras (p<0.05).

Durante as reações de 6 e de 24 horas o conteúdo de β -tocoferol foi reduzido em 15% e 28%, respectivamente, comparado ao óleo de buriti bruto. Os resultados indicam que houve uma variação no teor de tocoferol, dependendo do tipo de refino aplicado ao óleo. Essa variação tem grande influência na estabilidade do óleo. Assim, mais avaliações podem ser necessárias em diferentes fornecedores de óleo, a fim de obter resultados mais representativos em relação ao teor de tocoferol do óleo de buriti em função do grau de refino aplicado. Alguns estudos mostraram que uma das principais fontes de tocoferóis naturais é o óleo de soja, assim como o óleo de buriti (LEE *et al.* 2004; SPERANZA *et al.*, 2016b).

Na reação de interesterificação do óleo houve perda de tocoferóis, especialmente após 24 horas de reação. Embora a interesterificação tenha ocorrido sob condições de branda de temperatura (40°C), a perda pode ter sido causada pelo longo tempo de reação (sendo necessária otimização das reações). RESHMA *et al.* (2008) relataram que não houve influência da reação de interesterificação do óleo sobre o conteúdo de qualquer isômero de tocoferol. A reação, no entanto, ocorreu sob condições mais elevadas de temperatura (60° C) por 6 horas de reação.

De acordo com a literatura, os tocoferóis são vitaminas lipossolúveis importantes em óleos vegetais devido ao seu potencial antioxidante, que tem sido correlacionado na prevenção de doenças degenerativas, como o Alzheimer (CHEN *et al.*, 2011). Há uma ordem

quanto à atividade vitamina E, α -tocoferol > β -tocoferol > γ -tocoferol > δ -tocoferol, observada sua potência antioxidante relativa, comparada a óleos e gorduras *in vitro* (KAMAI-ELDIN; APPELQVIST, 1996). Dessa forma, os tocoferóis, quando oxidados, provocam mudança na coloração dos óleos vegetais.

3.5 β -caroteno total e compostos fenólicos totais

Os carotenoides também são conhecidos como potentes antioxidantes. Além disso, desempenham papel fundamental na redução do risco de doenças como câncer, catarata e envelhecimento celular. O óleo de buriti é uma das maiores fontes já conhecidas de carotenoides, com aproximadamente 90% em sua composição, os quais estão na forma de β -caroteno, provitamina A que é muito superior ao encontrado na maioria das frutas brasileiras (FREITAS *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2009).

Na tabela 5 os resultados confirmam que o óleo de buriti apresenta alta concentração de β -caroteno. Após 6 e 24 horas de reação, os óleos interesterificados formados apresentam a mesma concentração de β -caroteno. Alguns estudos também confirmam que a interesterificação enzimática não influenciou o teor de carotenoides em misturas iniciais (RESHMA *et al.*, 2008; SPERANZA *et al.*, 2016a). Mistura de carotenoides e tocoferóis agem em sinergia (REISCHE; DORRIS; RONALD, 1998).

Tabela 5. β -caroteno total e compostos fenólicos totais do óleo de buriti e do óleo de buriti interesterificado após 6 e 24 h de reação

Amostra	β -caroteno ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Equivalente de ácido gálico ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Óleo de Buriti	2786,83 $\pm$ 113,09 ^a	292,31 $\pm$ 6,81 ^c
Óleo de Buriti interesterificado 6h	2892,18 $\pm$ 101,20 ^a	325,72 $\pm$ 9,34 ^b
Óleo de Buriti interesterificado 24h	2665,85 $\pm$ 98,24 ^a	329,75 $\pm$ 10,15 ^b

*Todos os valores são média de três repetições $\pm$ desvio padrão. Diferenças significativas entre as médias foram determinadas pela análise de variância e teste de Tukey. As mesmas letras na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa entre as amostras ($p > 0,05$).

Os resultados da (tabela 5) mostram que o óleo de buriti usado neste estudo também é rico em compostos fenólicos. Os compostos fenólicos apresentam alto potencial biológico, especialmente na prevenção do estresse oxidativo, das inflamações e infecções bacterianas, sendo cada vez mais utilizados em formulações de cosméticos e nutracêuticos. Quando

comparado a outros óleos vegetais, o valor é próximo ao encontrado no azeite (564,8 - 293,5 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de equivalente de ácido gálico), conhecido pela sua alta concentração de compostos fenólicos. É superior aos óleos de noz (210 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de equivalente de ácido gálico); de amêndoa (124 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de equivalente de ácido gálico); de avelã (159 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de equivalente de ácido gálico) e de castanha do Brasil (153 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de equivalente de ácido gálico) (KOTSIOU; TASIOULA-MARGARI, 2016).

3.6 Fitoesteróis

É essencial entender as propriedades físicas dos esteróis, porque também são nutricionalmente importantes na maioria dos óleos e gorduras, posto que constituem a maior fração insaponificável presente no lipídio, como por exemplo os fitoesteróis. Os fitoesteróis do óleo de buriti e do óleo de buriti interesterificado foram analisados. Os resultados do perfil total de fitoesteróis do óleo de buriti observado na (Tabela 6) mostra que o óleo de buriti bruto apresentou os níveis mais baixos em relação à composição química do óleo de buriti. Os predominantes foram sitosterol e o estigmasterol, que representam com $\sim 86\%$, portanto os mais abundantes. Além disso foram também detectados $\sim 2,30\%$ de Δ^5 -de avanasterol e colesterol, respectivamente.

No azeite de oliva a proporção de β -sitosterol é em torno de 75-90% na fração total. Com base no perfil do óleo de buriti interesterificado por 24 horas, é possível observar que a interesterificação apresentou β -sitosterol cerca de 1,2% maior do que o óleo de buriti bruto e cerca de 20% foi observado em Δ^5 -avanasterol, como mostra a (Tabela 6). O perfil de fitoesterol depende do tipo de óleo. Quando produzidos pela interesterificação, obteve-se maior vantagem, possibilitando melhor lipossolubilidade e a capacidade de ser hidrolisado no corpo humano, além de possuir atividade fisiológica eficiente. Os compostos de β -sitosterol, campesterol e estigmasterol são os mais abundantes fitoesteróis na natureza. Apresentam vários efeitos positivos, isto é, função anti-inflamatória, anticâncer e efeito hipocolesterolêmico, além de importantes componentes estruturais das membranas vegetais para estabilizar as bicamadas fosfolipídicas, assim como o colesterol em células animais (CAÑABATE-DÍAZ *et al.*, 2007; POKKANTA *et al.*, 2018; VIEIRA DA SILVA; BARREIRA; OLIVEIRA, 2016). Por outro lado, os fitoesteróis podem ser usados como modificadores na cristalização, estruturação de sistemas lipídicos e obtenção de matrizes lipídicas com propriedades físicas específicas e alto ponto de fusão (GODOI *et al.*, 2017).

Tabela 6. Composição total em fitoesterol ($\mu\text{g. g}^{-1}$) do óleo de buriti e óleo de buriti interesterificado por 24 horas de reação.

Fitoesterol	*BO $\mu\text{g.g}^{-1}$	*BO _{24h} $\mu\text{g.g}^{-1}$
Colesterol	3,67 $\pm$ 0,08	3,39 $\pm$ 0,04
Brasicasterol	0,55 $\pm$ 0,10	0,31 $\pm$ 0,01
Campesterol	6,61 $\pm$ 0,31	6,39 $\pm$ 0,38
Estigmasterol	13,24 $\pm$ 0,55	12,84 $\pm$ 0,90
Clerosterol	1,09 $\pm$ 0,25	0,88 $\pm$ 0,21
β-sitosterol + sitostanol	72,51 $\pm$ 1,26	73,38 $\pm$ 0,45
Δ^5-avenasterol	2,34 $\pm$ 0,16	2,82 $\pm$ 0,67
Fitoesteróis totais (%)	100	100

*Cada valor é uma média $\pm$ desvio padrão (SD) de uma duplicata de análises das respectivas amostras.

A análise do perfil de fitoesteróis é usada para avaliar o grau de pureza do óleo e a ausência de adulteração com mistura de outros óleos (CAÑABATE-DÍAZ *et al.*, 2007). Segundo ABIDI, (2001) os óleos vegetais comestíveis como canola, algodão, oliva, palma, girassol, soja e linhaça apresentam entre (40 – 92%) de sitosterol e (1.5 – 29%) de Δ^5 - de avanasterol. Há relatos de que β -sitosterol + sitostanol e estigmasterol são os principais fitoesteróis na polpa do buriti e representam cerca de (154,50 e 38,50 mg.100g), respectivamente (COSTA *et al.*, 2010). A quantidade de dados disponíveis na literatura, contudo, é pequena, possivelmente devido à complexidade tanto da metodologia quanto do domínio da técnica.

Portanto, foi importante discutir todos os resultados anteriormente apresentados quanto à composição química do óleo de buriti, principalmente para ajudar no entendimento da sua composição quando misturado em sistemas coloidais.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O óleo de buriti interesterificado potencializou a concentração de ácido graxo oleico em relação ao óleo de buriti bruto, além de preservar importantes compostos minoritários, que são excelentes fontes antioxidantes. Foi observado que a lipase agiu especificamente no óleo de buriti atuando nas posições sn-1 e sn-3 do TAG.

AGRADECIMENTOS

Ao apoio financeiro da FAPESP (outorga 2014/16530). Os autores também agradecem as bolsas concedidas pelo CNPq (processo n° 140883/2016-9).

REFERÊNCIAS

- ABIDI SL. Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils. **Journal of Chromatography A**, v. 935, p. 173–201, 2001.
- BATAGLION, G. A. et al. Determination of the phenolic composition from Brazilian tropical fruits by UHPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 180, p. 280–287, 2015.
- BATISTA, J. S. et al. Atividade antibacteriana e cicatrizante do óleo de buriti *Mauritia flexuosa* L. **Ciência Rural**, v. 42, n. 1, p. 136–141, 2012.
- CAÑABATE-DÍAZ, B. et al. Separation and determination of sterols in olive oil by HPLC-MS. **Food Chemistry**, v. 102, n. 3, p. 593–598, 2007.
- CHEN, B. et al. Minor Components in Food Oils : A Critical Review of their Roles on Lipid Oxidation Chemistry in Bulk Oils and Emulsions Minor Components in Food Oils : A Critical Review of their Roles on Lipid Oxidation Chemistry in Bulk Oils. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, p. 901–916, 2011.
- COSTA, P. A. DA et al. Phytosterols and tocopherols content of pulps and nuts of Brazilian fruits. **Food Research International**, v. 43, n. 6, p. 1603–1606, 2010.
- DE ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 13, p. 5062–5072, 2007.
- FARMANI, J. et al. Trans-free Iranian vanaspati through enzymatic and chemical transesterification of triple blends of fully hydrogenated soybean, rapeseed and sunflower oils. **Food Chemistry**, v. 102, n. 3, p. 827–833, 2007.
- FILHO, N. R. A.; MENDES, O. L.; LANÇAS, F. M. Computer prediction of triacylglycerol composition of vegetable oils by HRGC. **Chromatographia**, v. 40, n. 9–10, p. 557–562, 1995.
- FRANÇA, L. F. DE et al. Supercritical extraction of carotenoids and lipids from buriti (*Mauritia flexuosa*), a fruit from the Amazon region. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 14, n. 3, p. 247–256, mar. 1999.
- FREITAS, M. L. F. et al. Quality characteristics and thermal behavior of buriti (*Mauritia flexuosa* L.) oil ; Parámetros de calidad y comportamiento térmico del aceite de buriti (*Mauritia flexuosa* L.). **GRASAS Y ACEITES**, v. 68, n. 4, p. 9, 2017.
- GODOI, K. R. R. et al. Dispersed free phytosterols as structuring agents in lipid systems with reduced saturated fat. v. 68, n. December, 2017.
- GUEDES, A. M. M. et al. Physicochemical properties of interesterified blends of fully hydrogenated *crambe abyssinica* oil and soybean oil. **JAACS, Journal of the American Oil**

Chemists' Society, v. 91, n. 1, p. 111–123, 2014.

HRNCIRIK, K.; FRITSCH, S. Comparability and reliability of different techniques for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 106, n. 8, p. 540–549, ago. 2004.

IFEDUBA, E. A.; MARTINI, S.; AKOH, C. C. Enzymatic Interesterification of High Oleic Sunflower Oil and Tripalmitin or Tristearin. **JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 93, n. 1, p. 61–67, 2016.

KAMAI-ELDIN, A.; APPELQVIST, L.-. The Chemistry and Antioxidant Properties of Tocopherols and Tocotrienols. **Lipids**, v. 31, n. 7, p. 671–701, 1996.

KARABULUT, I.; KAYAHAN, M.; YAPRAK, S. Determination of changes in some physical and chemical properties of soybean oil during hydrogenation. **Food Chemistry**, v. 81, p. 453–456, 2003.

KOTSIU, K.; TASIOULA-MARGARI, M. Monitoring the phenolic compounds of Greek extra-virgin olive oils during storage. **Food Chemistry**, v. 200, p. 255–262, jun. 2016.

LEE, J. et al. Production of lipase-catalyzed structured lipids from safflower oil with conjugated linoleic acid and oxidation studies with rosemary extracts. v. 37, p. 967–974, 2004.

MARANGONI, A. G.; DÉRICK ROUSSEAU. Engineering triacylglycerols: The role of interesterification. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, p. 329–335, 1995.

MEDEIROS, M. C. et al. Buriti oil (*Mauritia flexuosa* L.) negatively impacts somatic growth and reflex maturation and increases retinol deposition in young rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 46, p. 7–13, 2015.

MERICLI, F. et al. Fatty acid composition and anticancer activity in colon carcinoma cell lines of *Prunus dulcis* seed oil. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 1239–1248, 2017.

NORIZZAH, A. R. et al. Effects of chemical interesterification on physicochemical properties of palm stearin and palm kernel olein blends. **Food Chemistry**, v. 86, n. 2, p. 229–235, 2004.

PACHECO, Y. M. et al. A meal rich in oleic acid beneficially modulates postprandial sICAM-1 and sVCAM-1 in normotensive and hypertensive hypertriglyceridemic subjects. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 19, n. 3, p. 200–205, 2008.

POKKANTA, P. et al. Simultaneous determination of tocopherols, γ -oryzanols, phytosterols, squalene, cholecalciferol and phylloquinone in rice bran and vegetable oil samples. **Food Chemistry**, v. 271, n. June 2018, p. 630–638, 2018.

POLYCHNIATOU, V.; TZIA, C. Evaluation of surface-active and antioxidant effect of olive oil endogenous compounds on the stabilization of water-in-olive-oil nanoemulsions. **Food Chemistry**, v. 240, n. February 2017, p. 1146–1153, 1 fev. 2018.

REISCHE; DORRIS, A. L.; RONALD. 15. Antioxidants. In: “**Antioxidants**” In: Akoh, C. & Min, D.B. **Food lipids**. [s.l: s.n.]. p. 423–48.

RESHMA, M. V. et al. Lipase catalyzed interesterification of palm stearin and rice bran oil blends for preparation of zero trans shortening with bioactive phytochemicals. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 11, p. 5011–5019, 2008.

RODRIGUES, J. N. & L. A. G. Chemical interesterification of milk fat and milk fat-corn oil blends. **Food research international**, v. 36, p. 149–159, 2003.

ROUSSEAU, D.; MARANGONI, A. G. The effects of interesterification on physical and sensory attributes of butterfat and butterfat-canola oil spreads. **Food Research International**, 1998.

RUAN, X. et al. Characterisation of zero-trans margarine fats produced from camellia seed oil, palm stearin and coconut oil using enzymatic interesterification strategy. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 1, p. 91–97, 2014.

SERRA, J. L. et al. Alternative sources of oils and fats from Amazonian plants: Fatty acids, methyl tocols, total carotenoids and chemical composition. **Food Research International**, v. 116, n. December 2018, p. 12–19, fev. 2019.

SILVA, R. C. et al. Effect of diacylglycerol addition on crystallization properties of pure triacylglycerols. **Food Research International**, v. 55, p. 436–444, 2014.

SILVA, S. M. et al. Characterization of Oil Extracted from Buriti Fruit (*Mauritia flexuosa*) Grown in the Brazilian Amazon Region. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 86, n. 7, p. 611–616, 30 jul. 2009.

SPERANZA, P.; MACEDO, G. A. Lipase-mediated production of specific lipids with improved biological and physicochemical properties. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 1699–1706, dez. 2012.

SPERANZA, P.; RIBEIRO, A. P. B.; MACEDO, G. A. Lipase catalyzed interesterification of Amazonian pataúá oil and palm stearin for preparation of specific-structured oils. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 12, p. 8268–8275, 23 dez. 2015.

SPERANZA, P.; RIBEIRO, A. P. B.; MACEDO, G. A. Application of lipases to regiospecific interesterification of exotic oils from an Amazonian area. **Journal of Biotechnology**, v. 218, p. 13–20, jan. 2016.

SPERANZA, P. et al. Amazonian Buriti oil: chemical characterization and antioxidant potential. **Grasas y Aceites**, v. 67, n. 2, p. e135, 30 jun. 2016.

SPERANZA, P. et al. Improving the chemical properties of Buriti oil (*Mauritia flexuosa* L.) by enzymatic interesterification. **Grasas y Aceites**, v. 69, n. December, p. 1–8, 2018.

VIEIRA DA SILVA, B.; BARREIRA, J. C. M.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Natural phytochemicals and probiotics as bioactive ingredients for functional foods: Extraction, biochemistry and protected-delivery technologies. **Trends in Food Science & Technology**, v. 50, p. 144–158, abr. 2016.

XU, X. et al. Production of structured lipids by lipase-catalyzed interesterification in a flat membrane reactor. **JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 77, n. 10, p. 1035–1041, 2000.

ZANATTA, C. F. et al. Photoprotective potential of emulsions formulated with Buriti oil (*Mauritia flexuosa*) against UV irradiation on keratinocytes and fibroblasts cell lines. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 1, p. 70–75, 2010.

WIRKOWSKA-WOJDYLA M, BRYN J, GÓRSKA A, OSTROWSKA-LIGEZA E. 2016.

Effect of enzymatic interesterification on phys- iochemical and thermal properties of fat used in cookies. **LWT - Food Science Technol.** 74, 99–105.

CAPÍTULO 3- CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE SISTEMAS DE NANOEMULSÕES CONTENDO ÓLEO DE BURITI INTERESTERIFICADO.

Karina Magna Macena Leão^a, Livia Viana Castro Reis^a, Paula Speranza^a, Alexsandra Pereira Rodrigues^b, Ana Paula Badan Ribeiro^c, Juliana Alves Macedo^a, Gabriela Alves Macedo^{a*}.

(Parte do conteúdo desse Capítulo foi publicado no artigo da revista *Biotechnology Reports* DOI: 10.1016/j.btre.2019 e00365).

RESUMO

A reação de interesterificação enzimática de óleos tem sido empregada como alternativa para desenvolvimento de novos produtos com propriedades específicas voltados para o destino tecnológico. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da interesterificação por caracterização físico-química e avaliar o potencial antimicrobiano das nanoemulsões. Amostras foram armazenadas e avaliadas de acordo com as temperaturas 4°C e 25°C durante 30 dias. O diâmetro médio das gotículas de nanoemulsões variou entre 196 a 270 nm. Houve vantagem da nanoemulsão de óleo interesterificado por 24 horas (NBO_{24h}) com estabilidade oxidativa em temperaturas mais baixas e capacidade antioxidante aproximadamente 31% melhor do que a nanoemulsão do óleo de buriti bruto (NBO). O resultado da atividade antimicrobiana das nanoemulsões teve efeito bacteriostático para *Escherichia coli* O157:H7 e *Staphylococcus aureus*. De forma geral, a NBO_{24h} apresentou melhor potencial para aplicação tecnológica nas indústrias alimentícia, farmacêutica ou cosmética.

Palavras-chave: antioxidantes, buriti, tamanho de gotículas, nanoemulsões, peroxidação lipídica.

ABSTRACT

The enzymatic interesterification reaction of oils has been employed as an alternative for the development of new products with specific properties aimed at technological purposes. This study aimed to evaluate the effect of interesterification by physicochemical characterization and to evaluate the antimicrobial potential of nanoemulsions. We stored the samples at 4°C and 25°C and evaluated them for 30 days. The average diameter of the nanoemulsion droplets ranged from 196 to 270 nm. There was an advantage in the 24-hour interesterified oil nanoemulsion (NBO_{24h}) with oxidative stability at lower temperatures and approximately 31% better antioxidant capacity than crude buriti oil (NBO) nanoemulsion. The result of nanoemulsion antimicrobial activity had a bacteriostatic effect for *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus*. Overall, the NBO_{24h} presented the best potential for technological applications in food, pharmaceutical or cosmetic industries.

Keywords: antioxidants, buriti, droplet size, nanoemulsions, lipid peroxidation.

1 INTRODUÇÃO

A interesterificação enzimática tem sido bastante empregada pela indústria de alimentos. Envolve redistribuição de ácidos graxos dentro da molécula do triacilglicerol, apresentando uma estereoquímica diferente, que resulta em novas características físico-químicas e em propriedades nutricionais e funcionais (FARFÁN *et al.*, 2013; KIM; AKOH, 2015). Esse óleo formado é definido como lipídio estruturado, e é ainda conhecido como nova geração de nutraceuticos (OSBORN; AKOH, 2002).

Geralmente, a interesterificação enzimática de óleos e gorduras auxilia na sua aplicação comercial, visando à obtenção de novos produtos na forma de nanoemulsões. Essas nanoemulsões possuem aplicações práticas em muitas áreas além da alimentícia, da farmacêutica e da cosmética, chegando a atuar como promissores sistemas de carreadores de tamanhos nanométricos (MCCLEMENTS; LI, 2010; TADROS *et al.*, 2004). Algumas medidas de controle precisam ser adotadas como alternativas valiosas para o encapsulamento de compostos bioativos lipofílicos de natureza hidrofóbica que conseguem manter afinidade com sistema de natureza hidrofílica. Além disso, estudos recentes confirmam as vantagens das nanoemulsões na indústria, enfatizando que este sistema pode ser utilizado para melhoria da biodisponibilidade e entrega de substâncias antioxidantes em matrizes alimentares complexas. Essa prática pode prolongar a vida de prateleira do produto (ÖZOGUL *et al.*, 2016; SALVIA-TRUJILLO; MCCLEMENTS, 2016).

O óleo de buriti extraído do fruto da palmeira do buriti é tradicionalmente usado para fins medicinais e culinários (BATISTA *et al.*, 2012; FREITAS *et al.*, 2017). O óleo bruto apresenta excelentes níveis de compostos minoritários, como β -caroteno, tocoferóis e esteróis, que podem ajudar na redução dos níveis de colesterol total e lipoproteínas de baixa densidade e, assim, diminuir o risco de doenças coronarianas (SILVA *et al.*, 2009; SPERANZA *et al.*, 2016a). Além disso, o óleo de buriti apresenta alto conteúdo dos ácidos oleico e palmítico, que também exercem efeitos positivos sobre a saúde (BATISTA *et al.*, 2012; SPERANZA; RIBEIRO; MACEDO, 2015).

De acordo com os resultados obtidos por nosso grupo de pesquisa, é fundamental entender se a interesterificação enzimática em óleos amazônicos produz lipídios com características especiais de plasticidade, estabilidade oxidativa e atividade antioxidante (SPERANZA; RIBEIRO; MACEDO, 2015). O objetivo deste trabalho, portanto, foi

desenvolver nanoemulsões de óleo de buriti e óleo de buriti interesterificado pela enzima Lipozyme TL-IM e avaliar seu efeito nas propriedades físicas, químicas e antimicrobianas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Óleo de Buriti

O óleo de buriti foi comprado da empresa Beraca/Sabará (São Paulo, Brasil). A lipase comercial purificada e imobilizada *Thermomyces lanuginosa* (Lipozyme® TL-IM) foi adquirida da Novozymes (São Paulo, Brasil). O óleo de buriti foi interesterificado segundo (SPERANZA; RIBEIRO; MACEDO, 2016). O Tween 80 (monooleato de polioxietileno sorbitano) foi comprado da Dinâmica (São Paulo, Brasil). O corante Vermelho do Nilo foi comprado da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). As cepas dos micro-organismos *Escherichia coli* O157: H7 ATCC 11775 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 foram cedidas pelo Centro de Pesquisa Pluridisciplinar de Química, Biológico e Agrícola (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas, Brasil.

2.2 Produção da nanoemulsão

O óleo de buriti foi interesterificado por 6 e 24 h de reação segundo o método de (SPERANZA *et al.*, 2016). Nanoemulsões do tipo óleo-água foram compostas por 10% da fase oleosa e preparadas de acordo (OZTURK *et al.*, 2015). Três diferentes formulações foram preparadas variando a fase oleosa: nanoemulsões do óleo de buriti (NBO), nanoemulsões do óleo de buriti interesterificadas por 6 h (NBO_{6h}) e nanoemulsões do óleo de buriti interesterificadas por 24 h (NBO_{24h}). As emulsões foram pré-preparadas em Ultra-turrax na temperatura 80°C e depois submetidas a um homogeneizador de alta pressão (GEA Niro Soavi, Parma, Itália) durante 3 ciclos a 11600 Psi. Após a homogeneização, alíquotas de 100 mL de cada amostra foram armazenados em frascos de vidro âmbar e mantidas no escuro a 4 e 25 ° C por 30 dias.

2.3 Determinação do tamanho de gotículas e potencial Zeta

O diâmetro médio das gotículas ($d_{3,2}$) das nanoemulsões foi medido pelo sistema de dispersão de luz estática (Mastersizer 2000, Malvern Instruments Ltda., Malvern, UK). Alíquotas de nanoemulsões foram diluídas com água destilada antes da medição sob agitação constante (1750 rpm), até atingir uma taxa de obscuração de 5%. As nanoemulsões foram analisadas após 1, 15 e 30 dias de armazenamento em refrigeração (4° C) e em temperatura ambiente (25 ° C). Cada amostra foi analisada em triplicata.

A carga superficial de nanoemulsões durante o período de armazenamento (1, 15 e 30 dias nas temperaturas de 4°C e 25°C) foi determinada usando um Zetasizer Nano-Z (Malvern Instruments Ltda., Malvern, Reino Unido). As medições foram realizadas em triplicata.

2.4 Microscopia confocal de varredura a laser

A Microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) foi realizada usando uma lente objetiva de 63× (TCS SP5 II C1 Digital Eclipse, Leica, Tokyo, Japan). As amostras foram coradas com vermelho do Nilo, um corante fluorescente solúvel em gordura, misturando-se 100 mL de amostra com 20 µl de 1 mg mL⁻¹ de vermelho de Nilo em propilenoglicol. Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram respectivamente de 488 nm e 515 nm. As imagens foram processadas usando software LAS Lite (Zeiss Inc., Toronto, Canada) (Zeiss Inc., Toronto, Canada).

2.5 Estabilidade oxidativa

O ensaio de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) baseia-se na medida espectrofotométrica do pigmento rosa produzido pela reação do ácido tiobarbitúrico (TBA) com malondialdeído (MDA) e outros produtos secundários de peroxidação lipídica. O ensaio foi realizado adicionando-se 100 µL de nanoemulsão e 1 mL de 2-TBA em tubos de tampa de rosca, agitando-se a mistura e lendo-se a absorbância a 532 nm (KE; WOYEWODA, 1979). TEP (1,1,3,3-tetraethoxypropane) foi usado para construir uma curva padrão.

2.6 Capacidade antioxidante (FRAP e ORAC)

A capacidade antioxidante das nanoemulsões foi determinada pelo uso do poder antioxidante redutor de ferro (FRAP) de acordo com a metodologia descrita por (BENZIE; STRAIN, 1996), com modificações. Foi preparada uma solução de TPTZ (2, 4, 6-tripiridils-triazina) em HCl 40 mM e outra de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20 mM) com água destilada. As nanoemulsões foram diluídas na proporção 1:2, 1:3 e 1:5 e a absorbância medida a 595 nm num leitor de microplacas de 96 poços. A capacidade antioxidante foi expressa em μmol Trolox Equivalente (TE) mL^{-1} da amostra. O ensaio de capacidade de absorção de radicais oxigênio (ORAC_{FL}) foi executado pelo método (HUANG; BOXIN; PRIOR, 2005), com modificação. O padrão Trolox e as amostras foram distribuídos em placa de 96 poços de parede preta; em seguida foi feita a adição de fluoresceína. A reação foi iniciada pela adição da solução AAPH. A fluorescência foi monitorizada a cada 56 s durante 75 min num leitor de microplacas a 37 ° C com filtro de excitação de 485 nm e filtro de emissão de 520 nm. Os valores de ORAC foram calculados pela diferença entre a área sob a curva de decaimento da fluorescência da amostra e a do branco. Uma curva padrão foi construída usando Trolox e os resultados expressos como μmol Trolox equivalente por mL de amostra.

2.7 Difração de Raios-X

A forma polimórfica dos cristais do óleo de buriti, nanoemulsões do óleo de buriti e óleo de buriti interesterificado foram determinados por difração de Raios-X, segundo o método Cj 2-95 (AOCS, 2009). As análises foram realizadas em difratômetro Philips (PW 1710, Holanda), utilizando a geometria Bragg-Brentano ($\theta:2\theta$) com radiação de $\text{Cu-K}\alpha$ ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$, tensão de 40 KV e corrente de 30 mA). As medidas foram obtidas com passos de $0,02^\circ$ em 2θ e tempo de aquisição de 2 segundos, com varreduras de 15 a 40° (escala 2θ). A preparação das amostras após 30 dias de armazenamento para a primeira análise seguiu o protocolo: fusão em forno de micro-ondas a aproximadamente 80°C e estabilizadas a -25°C , seguindo-se outra leitura após 120 dias. A quantidade de cada forma cristalizada foi estimada pela intensidade relativa do *short spacings* (RIBEIRO *et al.*, 2013).

2.8 Atividade antimicrobiana

A concentração mínima inibitória (MIC) de NBO e NBO24h contra *E. coli* 0157: H7 ATCC 11775 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 foi determinada utilizando-se o método

de microdiluição em caldo (NCCLS CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2005). Resumidamente, alíquotas de 50 µL de cada nanoemulsão (NBO e NBO_{24h}) foram sequencialmente diluídas (25,0 - 0,39 mg mL⁻¹) em uma placa de 96 poços contendo 100 µL de caldo Mueller-Hinton. A concentração final da suspensão bacteriana foi ajustada para $1,5 \times 10^6$ unidades formadoras de colônia (UFC) mL⁻¹. As placas foram incubadas a 37°C durante 24 h. O cloranfenicol foi utilizado como controle positivo.

2.9 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey, utilizando-se o Minitab v. 16 (Minitab Inc., State College, EUA) para avaliar diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os valores médios.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Tamanho de gotículas e potencial zeta

O tamanho médio $D_{3,2}$ das NBO, NBO_{6h}, NBO_{24h} armazenadas sob as condições (4°C e 25 °C) foi analisado e avaliado durante um período de 30 dias. A NBO apresentou gotas maiores durante o armazenamento (Tabela 1). Houve diferença significativa nos diâmetros médios de gotas das NBO_{6h} e NBO_{24h}. O efeito da interesterificação do óleo de buriti por 24 horas na nanoemulsão de buriti (NBO_{24h}) apresentou menores tamanho de gotas durante todo o armazenamento $D_{3,2} < 200$ nm. Quanto aos tamanhos de gotículas das nanoemulsões do óleo interesterificado NBO_{6h} e NBO_{24h}, essas mostraram ser 25% e 29% menores, respectivamente, do que a nanoemulsão do óleo de buriti não-interesterificado. Com base em nossos resultados e nos de outros autores, podemos supor que as características entre os pontos de fusão dos óleos interesterificados e não-interesterificados estão diretamente ligadas (SPERANZA *et al.*, 2015).

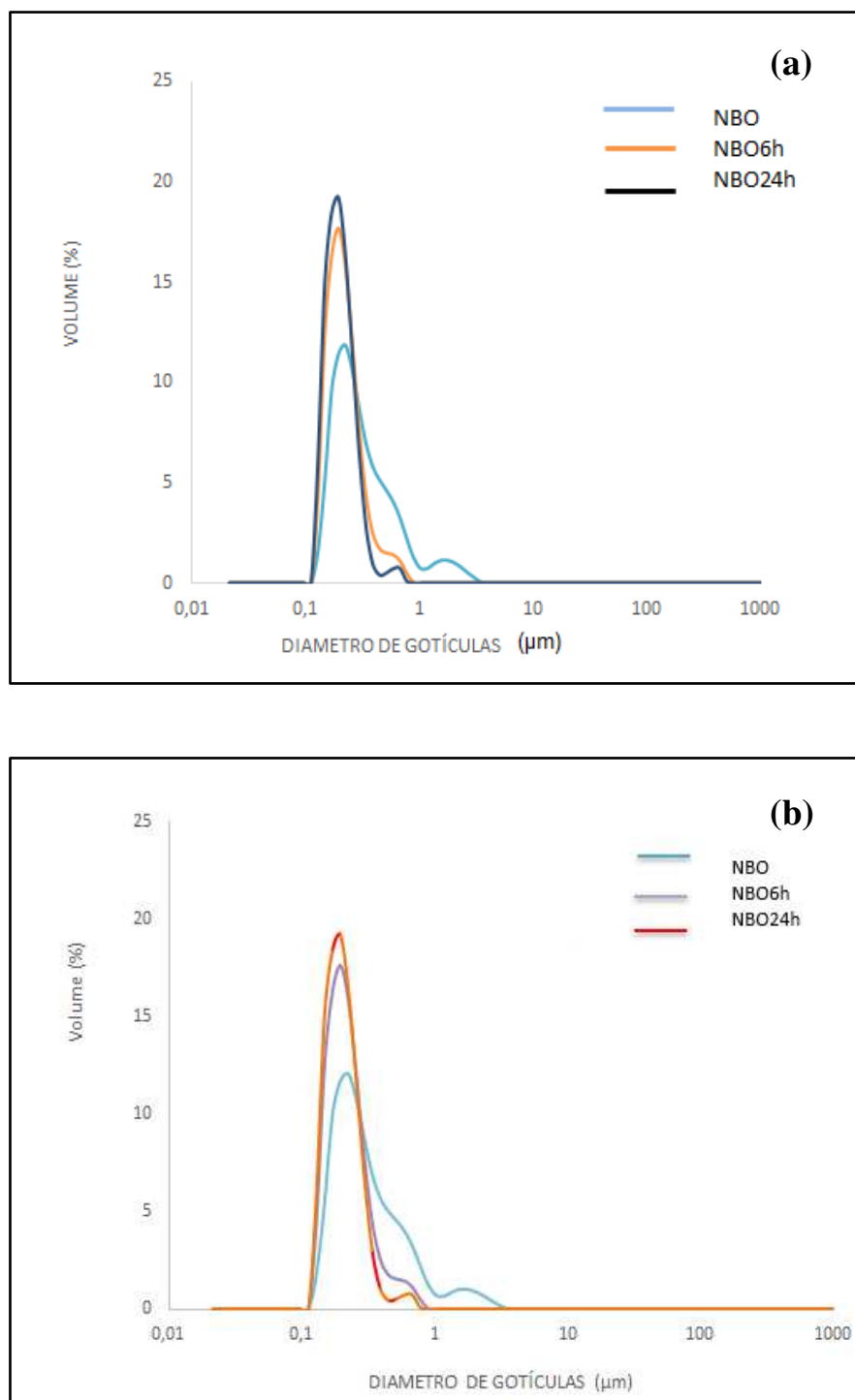


Figura 1. Curva de distribuição de gotículas de nanoemulsões do óleo de buriti e do óleo de buriti interesterificado por 6 e 24 horas de reação na temperatura ambiente (a) e temperatura refrigeração (b).

O efeito da interesterificação do óleo de buriti pode ser também observado na (Figura 1), em que o volume de distribuição de gotículas da nanoemulsão do óleo de buriti interesterificado 6h e 24h apresenta tamanho nanométrico 200 nm e distribuição monomodal.

Nenhuma alteração no tamanho médio das gotas foi observada ao longo do armazenamento. No entanto, gotículas maiores foram observadas em nanoemulsões do óleo de buriti não interesterificado com tamanho de aproximadamente 270 nm e características de polidispersão. Quando as partículas são menores que 200nm, podem ser mais facilmente absorvidas e produzem camada mais homogênea ao redor da gota, aumentando a estabilidade (GOULD; VIEIRA; WOLF, 2013).

Tabela 1 Diâmetro de gotas ($D_{3,2}$) e temperaturas do armazenamento (4 e 25°C) e tempo de armazenamento (1, 15 e 30 dias) das nanoemulsões do óleo de buriti e óleo de buriti interesterificado.

Tempo de armazenamento		Diâmetro médio de gotas (nm) na temperatura	
Dias	Amostras	4°C	25°C
1	NBO	271±0,03 ^b	269±0,02 ^b
	NBO _{6h}	208±0,01 ^c	209±0,01 ^c
	NBO _{24h}	196±0,01 ^d	196±0,01 ^d
15	NBO	275±0,02 ^a	275±0,02 ^a
	NBO _{6h}	206±0,01 ^c	206±0,01 ^c
	NBO _{24h}	196±0,01 ^d	196±0,01 ^d
30	NBO	268±0,02 ^b	268±0,02 ^b
	NBO _{6h}	206±0,01 ^c	206±0,01 ^c
	NBO _{24h}	196±0,01 ^d	195±0,01 ^d

*Nanoemulsão de óleo de buriti (NBO), nanoemulsões de óleo de buriti interesterificadas por 6 h (NBO_{6h}) e nanoemulsões de óleo de buriti interesterificadas por 24 h (NBO_{24h}).

^{a,b,c,d}Médias de uma mesma coluna seguidas por letras diferentes diferem significativamente em $p < 0,05$.

As mudanças físico-químicas nos TAGs causadas pela reação de interesterificação resultam em uma predominância de ácidos graxos insaturados nas posições sn-1 e sn-3, levando à formação de TAGs tri-insaturados, que são ricos em ácido oléico e, portanto, reduzindo a

faixa de fusão do óleo de buriti. Além disso, a substituição do ácido palmítico por ácido oleico nas posições sn-1 e sn-3 do TAG em óleo de buriti estruturado pode ter contribuído para a redução do tamanho das gotículas (SPERANZA *et al.*, 2018). Quanto menor o intervalo de fusão de um lipídio estruturado, menor a sua viscosidade, o que afeta diretamente o tamanho das gotas. O ácido oleico tem um certo grau de mobilidade proporcionado pela presença de uma ligação dupla, e isso pode alterar o arranjo cristalino e a densidade na qual as cadeias podem ser empacotadas (CHAMBI *et al.*, 2008).

Outro fator importante associado à estabilidade do tamanho das gotículas durante o armazenamento é a eficiência da homogeneização, que depende das propriedades físico-químicas dos lipídios que formam a emulsão, pois gotículas menores são formadas quando a fase lipídica é menos viscosa. Quando as gotículas de óleo são mais viscosas elas tornam-se mais difíceis de serem dissolvidas pelo homogeneizador, porque podem sair da zona de quebra antes de se deformar e se romper (TRONCOSO; AGUILERA; MCCLEMENTS, 2012). Os surfactantes, por sua vez, também desempenham um papel importante na preparação de nanoemulsões, porque reduzem a tensão interfacial e facilitam a formação de pequenas gotículas durante a homogeneização através da adsorção da interface óleo-água. No entanto, se o balanço hidrofílico-lipofílico for muito alto, a tensão interfacial do surfactante pode ser muito alta para formar gotículas de óleo mais homogêneas (BAI *et al.*, 2016; CHANG; MCCLEMENTS, 2014).

Por outro lado, o processo de homogeneização de alta energia, combinado com a reação de interesterificação, produziu nanoemulsões mais estáveis. Embora nenhum estudo tenha investigado o efeito da posição do ácido graxo nos TAGs sobre a estabilidade da nanoemulsão, alguns autores avaliaram o efeito do tipo de óleo na estabilidade e o comportamento de diferentes nanoemulsões durante a digestão *in vitro* (CHEONG; TAN; NYAM, 2016; MAJEED *et al.*, 2016a). Ainda assim, após a formação de gotículas, a estabilidade das nanoemulsões depende da composição da fase oleosa, pois os óleos diferem em polaridade e solubilidade da água (DAVIDOV-PARDO; MCCLEMENTS, 2015). Um estudo anterior mostrou que nanoemulsões contendo pequenas gotículas ($D_{3,2} < 200$ nm) podem encontrar aplicação prática nas indústrias farmacêutica, alimentícia e cosmética devido à sua estrutura e fácil manipulação (BAI *et al.*, 2016).

Para os resultados do potencial zeta, valores próximos a 30 mV foram obtidos para as nanoemulsões. A estabilidade de NBO, NBO_{6h} e NBO_{24h} armazenados a 4 ° C e 25 ° C foi observada durante 30 dias (Tabela 2). As cargas apresentaram magnitude variando de -23,5 a -30,8 mV. Isto pode indicar que essas gotículas são estáveis eletrostaticamente, o que pode

reduzir a chance de agregação e coalescência durante o armazenamento. Foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores do potencial zeta de NBO, NBO_{6h} e NBO_{24h} durante o armazenamento.

Tabela 2 Potencial zeta nas temperaturas de armazenamento (4 e 25°C) e no tempo do armazenamento (1,15 e 30 dias) das nanoemulsões do óleo de buriti e óleo de buriti interesterificado

Amostras x temperatura	Período de armazenamento (dias)		
	1	15	30
25 °C			
NBO	$-26,20 \pm 0,61^{ef}$	$-30,86 \pm 0,71^a$	$-30,53 \pm 0,97^{ab}$
NBO _{6h}	$-25,56 \pm 0,74^e$	$-28,23 \pm 0,47^{cde}$	$-29,40 \pm 0,10^{abc}$
NBO _{24h}	$-28,50 \pm 1,48^{bcd}$	$-30,13 \pm 0,06^{abc}$	$-26,63 \pm 0,06^{def}$
4 °C			
NBO	$-28,8 \pm 0,40^{acd}$	$-30,17 \pm 0,66^a$	$-29,30 \pm 0,26^{cf}$
NBO _{6h}	$-26,13 \pm 0,49^f$	$-23,50 \pm 0,36^e$	$-27,63 \pm 0,21^{cdf}$
NBO _{24h}	$-27,43 \pm 0,72^{df}$	$-29,33 \pm 1,10^{cf}$	$-28,43 \pm 0,93^{acd}$

*Valores de potencial zeta de nanoemulsões de óleo de buriti (NBO), nanoemulsões de óleo de buriti interesterificadas por 6 h (NBO_{6h}) e nanoemulsões de óleo de buriti interesterificadas por 24 h (NBO_{24h}) após 1, 15 e 30 dias de armazenamento a 25 e 4 ° C.

^{a,b,c,d,e,f} Médias dentro de uma linha seguidas por letras diferentes diferem significativamente em $p < 0,05$.

A NBO_{24h} armazenada a 25 ° C apresentou o maior valor absoluto do potencial zeta, 30,6 mV. As análises estatísticas mostraram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os potenciais zeta de NBO e NBO_{6h} armazenados na temperatura de refrigeração. Contudo também as nanoemulsões armazenadas sob refrigeração apresentaram valores menores que as armazenadas em temperatura ambiente. Os potenciais zeta de todas as amostras foram negativos, devido à preferência de a interface óleo-água adsorver os íons hidroxílicos de água ou moléculas de Tween 80 (TRONCOSO; AGUILERA; MCCLEMENTS, 2012). Ainda assim, os sistemas de nanoemulsão de alto potencial zeta absoluto são geralmente estáveis, por causa da repulsão eletrostática entre gotículas (HEURTAULT *et al.*, 2003; SALVIA-TRUJILLO *et al.*, 2015b), o que minimiza a agregação (YUKUYAMA *et al.*, 2016). Potencial zeta semelhante aos nossos resultados foram relatados em nanoemulsões da mistura de óleo de copaíba e

triacilgliceróis de cadeia média armazenados em 4° C e 25 ° C (DIAS *et al.*, 2014). Entretanto, neste trabalho, a estabilidade das nanoemulsões durante o armazenamento pode se dar devido às propriedades dos emulsificantes, que fornecem importante mecanismo contra a desestabilização. Assim também os efeitos positivos da interesterificação enzimática, com importante papel para aplicações práticas.

3.2 Microscopia confocal

A microscopia confocal avaliou imagens de partículas individuais das nanoemulsões estudadas. A (Figura 2) mostra que os lipídios estavam presentes como nanopartículas dispersas em suspensão. NBO, NBO_{6h} e NBO_{24h} (Fig. 2-IB, ID e IF), respectivamente, armazenados em temperatura ambiente (25° C), exibiram um padrão de distribuição muito semelhante com gotículas lipídicas inferiores a 1 µm. Já NBO, NBO_{6h} e NBO_{24h} armazenados a 4°C (Fig. 2-IA, IC e IE), respectivamente, apresentaram maior suscetibilidade à agregação de gotas do que as nanoemulsões armazenadas na temperatura ambiente.

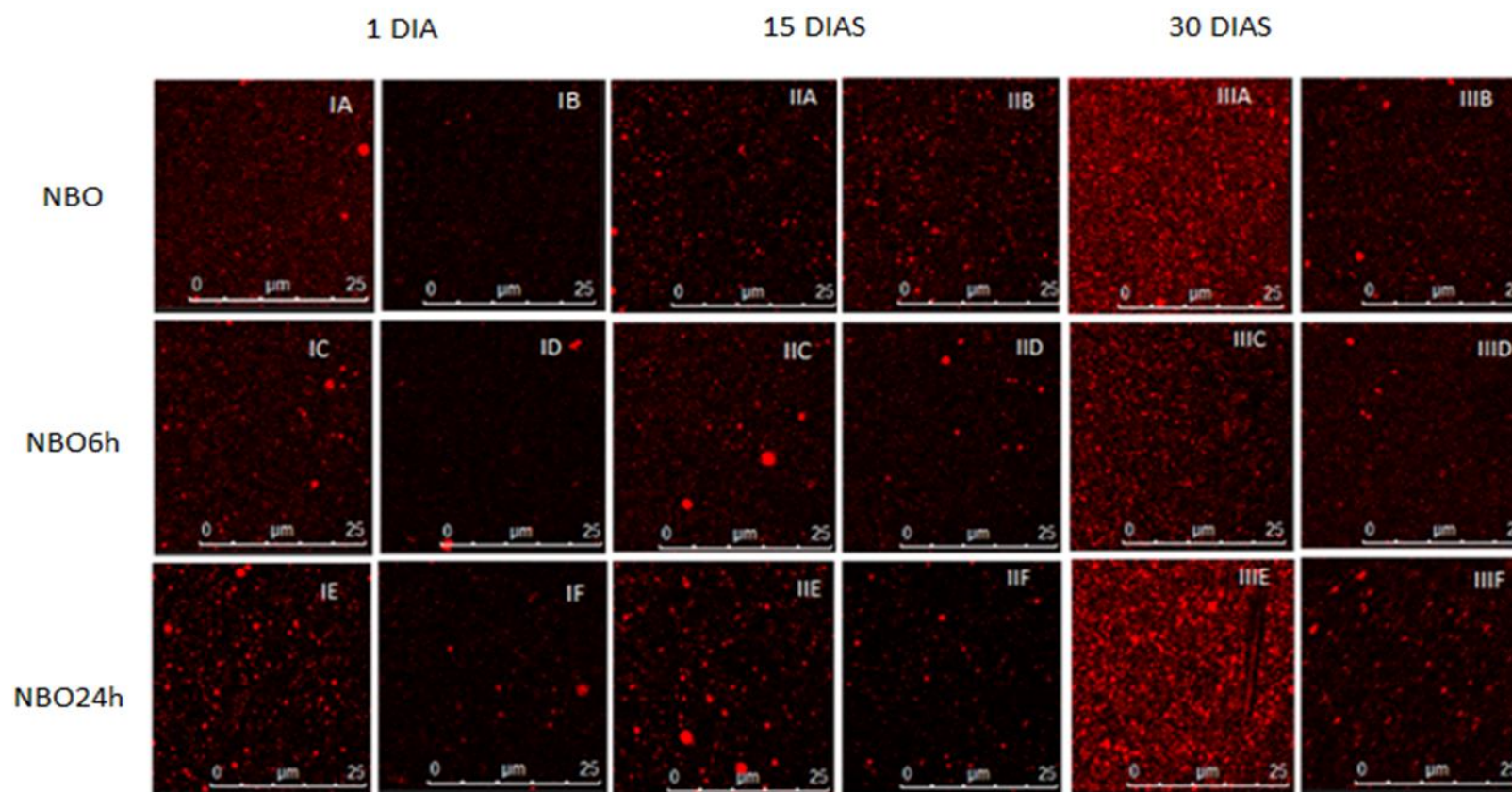


Figura 2. Microscopia confocal de varredura a laser de nanoemulsões de óleo de buriti (NBO) armazenadas a 4°C e 25°C (A e B); nanoemulsões do óleo de buriti interesterificadas por 6 horas (NBO6h) armazenadas a 4°C e 25°C (C e D) e nanoemulsões do óleo de buriti interesterificadas durante 24 horas (NBO_{24h}), armazenadas a 4°C e 25°C (E e F) aos 1, 15 e 30 dias após a preparação. Barras de escala representam 25 μm.

Embora a temperatura não tenha afetado a estabilidade das gotículas na análise de tamanho de gotículas, as imagens da microestrutura forneceram evidências de que pode haver maior coalescência na temperatura de refrigeração (4°C) ao longo do armazenamento. Em geral, as nanoemulsões, quando submetidas a temperaturas extremas, apresentaram uma faixa de tamanho de gotículas relativamente grande, polidispersas, sem forma definida (ROSSEAU, 1998).

A distribuição de gotículas com o óleo interesterificado NBO_{24h} durante os primeiros 15 dias de armazenamento mostra-se mais homogênea, ou seja, não se percebeu aglomeração das gotas de óleo. Isso pode ser explicado pela sua composição química e por possuir mais triacilglicerol insaturado, com menor ponto de fusão e menor viscosidade. Essas propriedades físico-químicas podem influenciar a formação e estabilidade das gotículas (SPERANZA *et al.*, 2018). A NBO_{6h} mostrou comportamento similar, mas a agregação da gotícula foi menor do que a da NBO após 30 dias de armazenamento.

Majeed *et al.* (2016a) relataram que, na ocorrência de partículas lipídicas de nanoemulsões, essas eram aglomeradas de formato irregular pela microscopia confocal durante o processo de digestão, mas que eram mais resistentes à coalescência do que as emulsões. Diferentes morfologias de nanoemulsões são observadas quando usados diferentes microscópios. Essa diferença na morfologia pode ser atribuída ao tipo de tensoativo, à composição do lipídio ou ainda ao método aplicado para desenvolver as nanoemulsões. Em geral observa-se que, quanto menor a partícula, mais alto é o valor do potencial zeta absoluto, levando a uma alta repulsão eletrostática (MULLER; GOHLA; MADER, 2000). As nanoemulsões produzidas com lipídios interesterificados apresentaram resultados semelhantes entre si; logo, a NBO_{6h} foi descontinuada do estudo nas etapas posteriores.

3.3 Estabilidade oxidativa durante o armazenamento (TBARS)

A estabilidade oxidativa da NBO e NBO_{24h} foi monitorada durante 30 dias de armazenamento, sendo medida a formação de produtos de oxidação secundária (TBARS). Os resultados apresentados (Tabela 3) são indicativos de oxidação lipídica e mostram diferença significativa ($p < 0,05$) entre as NBO e NBO_{24h} ao 30º dia do armazenamento à temperatura de 25°C. Entretanto, ao comparar os valores entre as amostras na primeira e na última semana de armazenamento na temperatura 4°C, foi observada menor formação de produtos de reação

secundária da NBO_{24h} em relação a NBO. Nos valores obtidos, segundo Nejadmansouri et al. (2016), observa-se um aumento significativo para TBARS na temperatura 4°C em nanoemulsões com óleo de peixe incorporado de tocoferol.

A relação do tamanho das gotas e a área interfacial influenciam a oxidação lipídica em nanoemulsões óleo em água, assim como parâmetros de temperatura e componentes estruturais (NEJADMANSOURI et al., 2016). O emulsificante Tween 80 também é conhecido por desempenhar um papel na oxidação de lipídios emulsionados através da formação de hidroperóxidos (MONTES DE OCA-ÁVALOS; CANDAL; HERRERA, 2017). O valor adotado nesta pesquisa, no entanto, foi bem abaixo, não relacionando a oxidação lipídica ao emulsificante.

Tabela 3 Estabilidade oxidativa TBARS (mg MDA mL⁻¹) de nanoemulsões de óleo de buriti (NBO) e óleo de buriti estruturado (NBO_{24h}) nos dias 1, 15 e 30 de armazenamento a 4°C e 25°C^{A,B} Médias de três repetições ± desvio padrão. Diferentes letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa relacionada à temperatura em comparação ao tempo de armazenamento. O nível de probabilidade é (p <0,05) de acordo com o teste de Tukey.

Temperatura	NBO (dias)			NBO _{24h} (dias)		
	1	15	30	1	15	30
4 °C	11.90 ± 0.24 ^A	5.67 ± 0.04 ^A	16.07 ± 1.43 ^A	9.87 ± 0.56 ^B	5.93 ± 0.28 ^A	10.33 ± 0.55 ^B
25 °C	10.29 ± 0.62 ^A	6.12 ± 1.13 ^A	17.44 ± 0.82 ^A	10.35 ± 0.81 ^A	5.34 ± 0.98 ^A	11.95 ± 0.73 ^B

Com base nos resultados apresentados, acredita-se que a interesterificação enzimática ajudou a retardar a oxidação lipídica nas nanoemulsões do óleo de buriti interesterificado por 24 horas na temperatura refrigerada. Em geral, quantidades significativas de compostos de oxidação secundária são formadas quando cadeias de ácidos graxos com três ou mais ligações duplas, diferentes do ácido linoleico ou ácido oleico, estão envolvidas (ZOU; AKOH, 2015). Assim como (WANG *et al.*, 2014), o nosso resultado pode ter favorecido positivamente a estabilidade dos óleos, retardando ou prevenindo a oxidação.

Este estudo apresenta importantes implicações para o desempenho e uso de nanoemulsões como sistemas de entrega para fins industriais. Além de que, devido ao processo de interesterificação e consequente menor tamanho de gotas, a NBO_{24h} parece ser menos suscetível à formação de produtos de oxidação secundária ao longo do período de armazenamento, nas temperaturas estudadas. Sabe-se que o mecanismo de oxidação lipídica

em emulsões O/A é muito complexo e difere do que ocorre em sistemas lipídicos a granel (WARAHO; MCCLEMENTS; DECKER, 2011a).

Os lipídios nanoemulsionados são altamente suscetíveis à oxidação, devido à área superficial maior, que facilita as interações entre os radicais livres dos lipídios e metais de transição solúveis em água (MCCLEMENTS; RAO, 2011; NEJADMANSOURI *et al.*, 2016; POYATO *et al.*, 2013a). Assim, estratégias combinadas são necessárias para retardar as reações de oxidação e melhorar a vida de prateleira dos produtos.

3.4 Capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante é a função de se combinar com radicais peroxila antes de propagar a peroxidação dos lipídios, como a vitamina E, antioxidante lipossolúvel que não permite reação oxidativa (CAROCHO; FERREIRA, 2013). Os resultados da capacidade antioxidante da NBO_{24h} (Tabela 4) foram aproximadamente 1.5 vezes superiores ao NBO, de acordo com os ensaios de FRAP e ORAC. O aumento de ORAC do (NBO_{24h}) foi cerca de 31% superior a (NBO), porque essas reações são baseadas na reação de sequestrar os radicais livres através da doação de átomos de hidrogênio (HUANG; BOXIN; PRIOR, 2005). O método FRAP, por sua vez, indica a capacidade de determinar a redução do ferro 3+ de fluidos biológicos ou soluções aquosas de compostos puros (HUANG; BOXIN; PRIOR, 2005). Os resultados dos ensaios ORAC e FRAP estão apresentados na (tabela 4).

Tabela 4. Capacidade antioxidante de nanoemulsões (NBO e NBO_{24h}) pelos ensaios FRAP e ORAC_{FL}.

Amostras	ORAC _{FL}	FRAP
	Trolox equivalente (μmol TE. mL ⁻¹ amostra)	Trolox equivalente (μmol TE. mL ⁻¹ amostra)
NBO	3089,7 ± 36,40 ^b	419,8 ± 7,30 ^b
NBO _{24h}	3640,6 ± 23,25 ^a	611,4 ± 7,53 ^a

*Os dados foram expressos como média da triplicata ± desvio padrão; H-ORAC_{FL}= hidrofílico; NBO: óleo de buriti de nanoemulsão; NBO₂₄: nanoemulsão de óleo de buriti interesterificado por 24 horas. Letras iguais na mesma coluna são estatisticamente iguais se (P < 0,05) pelo teste de Tukey.

A capacidade antioxidante em ambos os ensaios foi 18% maior na NBO_{24h} em comparação ao NOB. O valor do FRAP, por sua vez, foi aproximadamente 46% maior para a NBO_{24h} demonstrando que há influência da interesterificação enzimática do óleo de buriti na capacidade antioxidante de nanoemulsões. Segundo alguns trabalhos encontrados na literatura, a presença de compostos minoritários, como β -caroteno, tocoferóis e compostos fenólicos em óleos promove a eliminação de radicais livres por transferência de elétrons, doação de hidrogênio ou quelação de metais de transição através de vários mecanismos químicos (ZOU; AKOH, 2015). Além disso, outros estudos correlacionam a atividade entre as propriedades antioxidantes dos compostos minoritários com efeito benéfico à saúde (ACOSTA, 2009; CHEN et al., 2011; LACATUSU *et al.*, 2012). Observou-se que nanoemulsões com óleo de buriti interesterificado foram eficazes na doação de elétrons ou hidrogênio para estabilizar radicais livres e demonstraram efeito antioxidante.

Para tanto, a presença de ácidos graxos livres promove um aumento na oxidação lipídica, que pode estar relacionada à sua localização na interface óleo-água, que da mesma forma aumenta a carga negativa das gotas do óleo e pode atrair metais de transição como Fe^{2+} ou Fe^{3+} para a superfície da gota (WARAHO *et al.*, 2009; WARAHO; MCCLEMENTS; DECKER, 2011b). Assim, é importante ressaltar que na caracterização do óleo de buriti usado para produzir a nanoemulsão não se apresentem ácidos graxos livres (SPERANZA et al., 2018). Quando o metal ferro está presente no óleo, na água ou no surfactante, a oxidação é catalisada por esses metais; portanto, a oxidação lipídica não pode ser evitada apenas por um antioxidante na eliminação de radicais livres, pois um quelante metálico torna-se necessário (NEJADMANSOURI *et al.*, 2016). Haeiwa *et al.* (2014) relataram que os ácidos graxos insaturados, particularmente o ácido oleico, aumentam os níveis intracelulares dos produtos de peroxidação lipídica, indicando que o ácido oleico pode promover resposta adaptativa.

O ensaio ORAC mediu a degradação oxidativa da molécula fluoresceína, a qual, quando inibida, indica capacidade antioxidante (MIRALIKBARI; SHAHIDI, 2008). Até onde sabemos, nenhum artigo publicado avaliou ORAC com nanoemulsões de óleo interesterificado. Os resultados desses estudos não podem ser comparados com precisão aos relatados por (ZOU; AKOH, 2015), mas eles podem servir como referência. Estudos anteriores mostraram uma diferença na quantidade de antioxidantes em relação à presença de compostos fenólicos na fração do óleo de buriti, conhecido por ter um alto potencial antioxidante.

No entanto, os sistemas podem diferir em composição e concentração fitoquímica, além de possuírem outros compostos que interagem de forma antagônica (KOOLEN *et al.*, 2013; SPERANZA *et al.*, 2016b). Assim, NBO_{24h} apresentou no ensaio de ORAC maior

capacidade antioxidante do que a NBO; isto pode ser confirmado com outros ensaios de estabilidade oxidativa. A capacidade antioxidante de compostos bioativos está associada com a inibição da iniciação da cadeia de radicais livres pela reação com o oxigênio ou quelação de íons de metais catiônicos. Essa reação retarda a oxidação, previne a abstração contínua de hidrogênio, protege o DNA, as proteínas e os lipídios dos danos oxidativos (MARINELI *et al.*, 2014; SPERANZA *et al.*, 2016a).

Segundo estudo de Poyato *et al.* (2013b), a capacidade antioxidante medida pelo método de ORAC-L (capacidade de absorção do radical oxigênio lipofílico) em emulsões à base de azeite (1978,9 μmol equivalente de trolox / 100 g de óleo) foi menor do que os valores encontrados nas nanoemulsões do óleo de buriti. Sabe-se ainda que a presença do ácido graxo palmítico (C16:0) pode apresentar uma atividade antioxidante com redução de radicais livres derivados de oxigênio (LACATUSU *et al.*, 2012).

Assim, resultados obtidos neste trabalho sugerem que nanoemulsões com o óleo interesterificado podem ser usadas em algumas aplicações, incluindo formulações para fins alimentícios, farmacêuticos e cosméticos.

3.5 Difração de raios-X

As transições polimórficas de óleos ainda são bastante desafiantes para a indústria. As moléculas de triacilgliceróis (TAG) são capazes de empacotar em diferentes arranjos cristalinos, que geralmente são medidos por difração de raios-X para investigar a disposição das cadeias de ácidos graxos (RIBEIRO *et al.*, 2013, 2015).

Os difratogramas obtidos do óleo de buriti (BO) e das nanoemulsões NBO e NBO_{24h}, após 30 dias de produzidas e armazenadas à temperatura de 25°C, estão representados na Tabela 5. Os picos de cristalização e as formas polimórficas correspondentes são caracterizadas por espaçamento curto específico ou distância entre as cadeias de ácidos graxos. O BO apresentou espaçamento curto em aproximadamente 4.4 Å referente ao padrão de difração da forma β e da forma β' , (4.2 e 3.9 Å) devido à sua diversificada composição de ácidos graxos e, principalmente, aos ácidos oleico e palmítico.

Tabela 5. Espaçamentos curtos (*Short spacings*) e formas polimórficas do óleo de buriti (BO), NBO, NBO_{24h}, após 30 e 120 dias de armazenamento a 25°C.

Amostras	Short spacings (Å)					Formas polimórficas
	4.4	4.2	4.0	3.9	3.8	
BO	4.38(vs)	4.19(vs)	--	3.93(vs)	--	β' + β
NBO (30)	4.44(s)	4.24(vs)	3.97(vs)	--	--	β' + β
NBO _{24h} (30)	4.44(vs)	4.23(vs)	--	3.88(s)	--	β' + β
NBO (120)	4.42(s)	4.23(s)	--	3.88(vs)	3.77(m)	β' + β
NBO _{24h} (120)	4.43(vs)	4.24(vs)	--	3.88(vs)	--	β' + β

*Intensidade: vs. muito forte; s. forte; w. fraco; m. médio. NBO: nanoemulsão do óleo de buriti; NBO24: nanoemulsão do óleo de buriti interesterificado por 24 horas de reação.

As transições polimórficas do óleo de buriti devem-se provavelmente aos triacilgliceróis do óleo. A presença do diacilglicerol (DAG) cuja composição seja maior que 5% no óleo pode propiciar a formação do polimorfo β' (HAGEMANN, 1998). Assim, a interesterificação reduz a faixa de fusão do TAG, formando mais ácidos graxos insaturados e causando alterações nas formas polimórficas. Os TAGs geralmente cristalizam primeiro nas formas α e β' , embora a forma β seja mais estável. Fatores como taxa de resfriamento, calor de cristalização, nível de agitação e formulação podem afetar o número e o tipo de cristais. No entanto, se os lipídios são misturas complexas de TAGs, diferentes formas polimórficas podem coexistir a uma certa temperatura (RIBEIRO *et al.*, 2015).

A reorganização polimórfica para níveis mais organizados e energeticamente mais favoráveis é apontada como um problema na encapsulação de ativos, porque esta reorganização poderia provocar expulsão do composto bioativo (JENNING; THU; GOHLA, 2000). Segundo (BUNJES; UNRUH, 2007), a difração por raios-X permite obter informações inequívocas em relação às transformações polimórficas e pode também ajudar a detectar separação de fases. No entanto, os resultados obtidos são incompreendidos, posto que não se percebe diferença entre as nanoemulsões do estudo.

3.6 Atividade antimicrobiana

Os resultados referentes à atividade antimicrobiana das nanoemulsões estudadas estão apresentados na Figura 3 e indicam as concentrações testadas para cada micro-organismo (0,39 a 25 mg. mL⁻¹). Durante o período de incubação das células bacterianas com as nanoemulsões do óleo de buriti e óleo de buriti interesterificado, nota-se que não houve a inibição de todas as células de *Escherichia coli* O157: H7 ATCC 11775 e *Staphylococcus aureus* ATCCC 6538. Por sua vez, não foi possível encontrar a concentração mínima inibitória (MIC) dessas amostras.

Os resultados encontrados no presente trabalho foram obtidos a partir das leituras realizadas pela absorbância num espectrofotômetro (leitor de placas), considerando-se a leitura das cavidades com as amostras, a leitura de cor da amostra como um material de referência (branco), a leitura do meio de cultura (esterilidade do meio), a leitura do controle com o micro-organismo e a leitura com o padrão comercial (controle +), conforme estão apresentados na (figura 3).

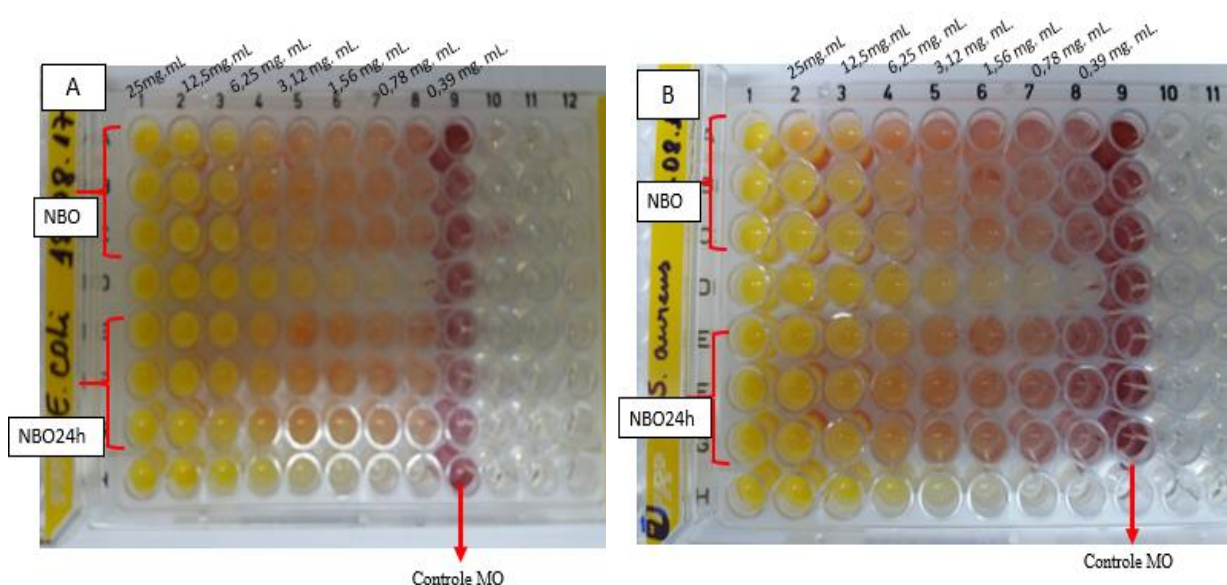


Figura 3. Determinação da atividade antimicrobiana de nanoemulsões do óleo de buriti (NBO) e nanoemulsão do óleo de buriti interesterificado (NBO24h) contra cepas de *E. coli* (A); *S. aureus* (B). A ausência da coloração vermelha indica inibição da atividade metabólica microbiana. *MO= Micro-organismo.

A concentração estudada (25 mg. mL⁻¹) para a NBO_{24h} inibiu os micro-organismos *E. coli* e *S. aureus* em 70% e 60%, respectivamente. Por sua vez, a NBO teve inibição um pouco inferior, de aproximadamente 60%. Considere-se o fato de que, dentro do gradiente das concentrações testadas, a NBO na concentração (6,25 mg. mL⁻¹) apresentou inibição maior, com aproximadamente 65% de inibição para ambas as bactérias deste estudo, propiciando o efeito bacteriostático na maioria das concentrações usadas.

Nos resultados de antimicrobianos com compostos encontrados em óleos essenciais, eles apresentam características de baixa viscosidade, alta volatilidade e predomínio de moléculas pequenas, de baixa concentração, em nanoemulsões nas quais são responsáveis pelos efeitos antimicrobianos (GHADERI *et al.*, 2017; SALVIA-TRUJILLO *et al.*, 2014, 2015b). Quando comparadas ao óleo bruto, observa-se que, embora algumas cepas tenham sido inibidas em altas concentrações (25 mg. mL⁻¹), é notável que existe uma inibição vantajosa do ponto de vista de controle microbiano, pois inibem mais de 50% dessas cepas nas concentrações.

Alguns outros estudos também revelam que o potencial antimicrobiano influencia sobre o tamanho das gotículas, a composição química do óleo e também na estrutura do sistema de nanoemulsões (ACOSTA, 2009; SALVIA-TRUJILLO *et al.*, 2013; SPERANZA *et al.*, 2015).

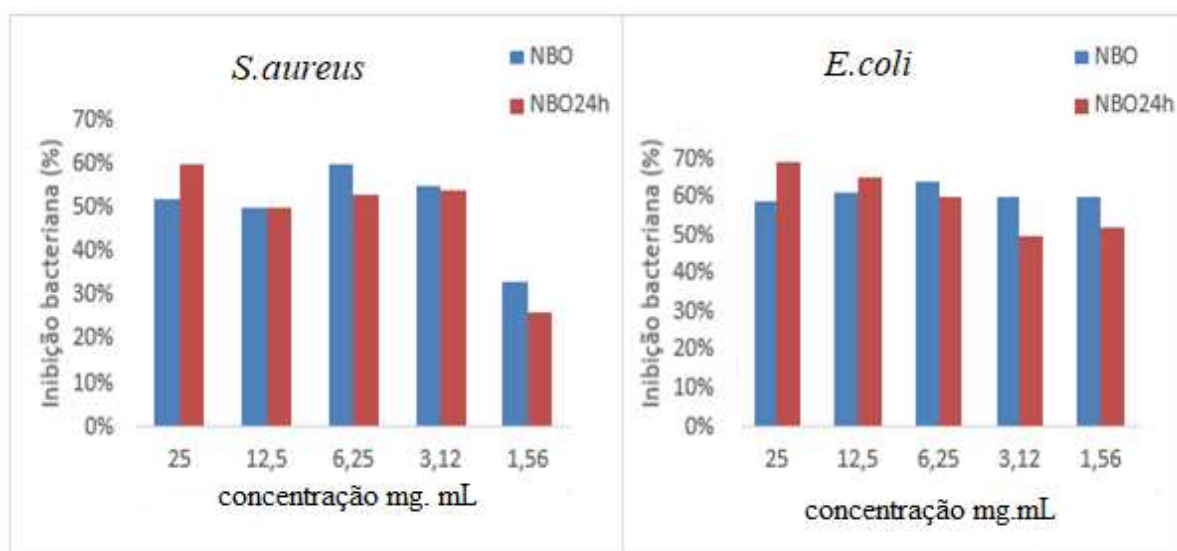


Figura 4. Gráfico de atividade antimicrobiana da nanoemulsão do óleo de buriti (NBO), nanoemulsão de óleo de buriti interesterificado 24 horas (NBO_{24h}) contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Os valores são apresentados como média das repetições (n=3).

Existe um pequeno número de trabalhos com nanoemulsões a partir de óleo fixo com atividade antimicrobiana. Desta forma, a perspectiva por eventos múltiplos de natureza biológica ou das substâncias presentes nos óleos com maior atividade antimicrobiana pode favorecer o potencial antimicrobiano das nanoemulsões com óleo de buriti ou óleo de buriti interesterificado. Isto pode ser potencialmente útil para a indústria de alimentos, levando-se em consideração o controle de contaminação por bactérias patogênicas.

Ainda assim foi realizado testes experimentais com outro tipo de matriz carreadora. O uso de nanocarreadores lipídicos também com referência à atividade antimicrobiana; os efeitos do óleo de buriti interesterificado, associado ao carreador lipídico nanoestruturado, dependeu do micro-organismo alvo. Este tipo de formulação de NLCBO_{24h} parece ter encontrado valores menores de inibição contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus*, conforme demonstra a (figura 5).

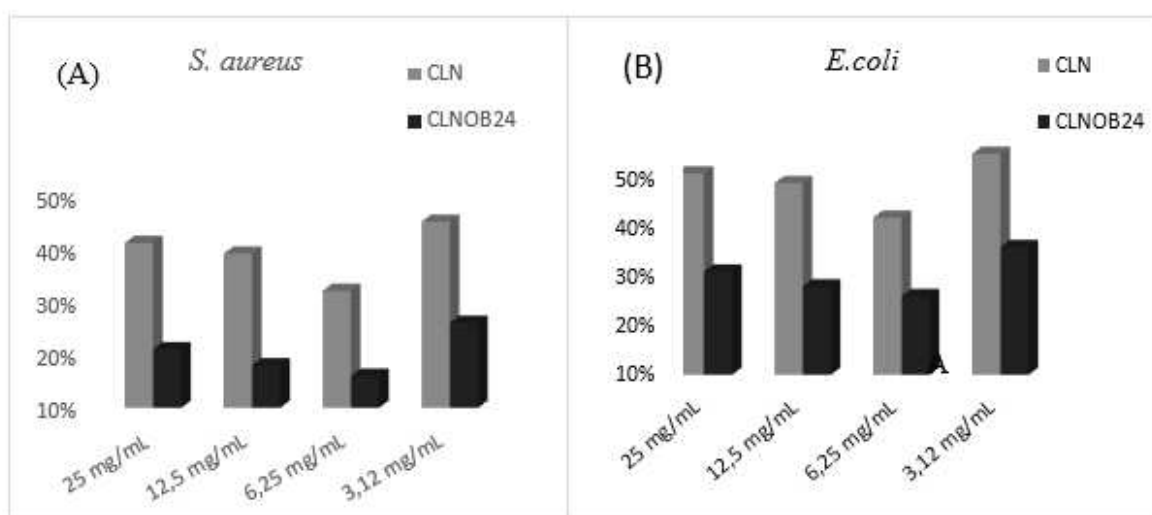


Figura 5. Atividade de inibição de carreadores lipídicos nanoestruturados (NLCBO) e carreador lipídico nanoestruturado do óleo de buriti interesterificado (NLCBO_{24h}) contra *S. aureus* (a) *E. coli* (b).

Sabe-se ainda que muito se usa nanocarreadores com os óleos essenciais que protegem de possível degradação térmica, garantem maior estabilidade e consequentemente podem prolongar a vida útil do carreador lipídico nanoestruturado (PIRAN *et al.*, 2017). Apesar disso, pouca pesquisa sistemática tem sido encontrada com nanocarreadores lipídicos sem a presença de óleos essenciais. Logo, poucos exemplos podem ser comparados aos carreadores lipídicos de óleo de buriti interesterificado como potencial antimicrobiano.

Em todo caso, a relação das características físico-químicas dos carreadores, como solubilidade em água, parece ser dependente da composição e concentração inicial do óleo de buriti. Isso ocorre porque o óleo dentro do carreador lipídico pode atravessar as membranas celulares, penetrar no interior da célula e interagir com sítios intracelulares mais facilmente (PATEL; DEWETTINCK, 2015).

No entanto, os resultados dos carreadores lipídicos com o óleo interesterificado NLCBO24h apresentaram uma resposta bastante diferente da NBO24h. Verificou-se que os resultados tendem à não uniformidade. Os resultados comparando os dois tipos de sistemas denotam a ideia de que, dependendo da aplicação preterida, com nanoemulsões ou carreadores lipídicos nanoestruturados, são necessários testes adicionais para outras concentrações. É necessário ainda encontrar a mínima concentração inibitória e controlar possíveis problemas que não puderam ser controlados durante este trabalho.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os sistemas de nanoemulsões formuladas com o óleo de buriti interesterificado, apresentou características de tamanho de partículas em escala que possibilitaram ser reconhecida como nanométrica. A atividade antimicrobiana dessas amostras apresentou mecanismo de ação variável de acordo com a concentração das nanoemulsões. Enquanto que comparando com as características dos carreadores lipídicos nanoestruturados apresentaram também com efeito bacteriostático para as bactérias patogênicas.

AGRADECIMENTOS

Ao apoio financeiro da FAPESP (outorga 2014/16530). Os autores agradecem as bolsas do CNPq (processo nº 140883/2016-9).

CAPITULO 4 - DISCUSSÃO GERAL

A caracterização do óleo de Buriti quanto as propriedades químicas, antes e após o processo de interesterificação enzimática por 6 e 24 horas, foram obtidos sendo o majoritário ácido graxo oleico (74,2%), seguido do ácido graxo saturado palmítico (19,8%). Quanto à análise de classe de lipídios do óleo de buriti apresentaram essencialmente composto por TAG (93,4%), que ajuda a comprovar uma hidrólise seguida de síntese. Apesar do teor de ácidos graxos livres apresentarem variação de acordo com a temperatura utilizada na reação, foi observado que quanto maior a temperatura, menor a formação de ácidos graxos livres. Foram utilizadas as reações de 6 e de 24 horas, as principais formas de tocoferol no óleo de buriti mostram a importância dos antioxidantes naturais presentes no óleo e o teor de β -tocopherol foi reduzido em 15% e 28%, justificando a necessidade de mais avaliações para diferentes fornecedores de óleo, a fim de obter resultados mais representativos em relação ao teor de tocoferol do óleo de buriti em função do grau de refino aplicado. Quanto ao teor de betacaroteno após a reação de interesterificação nos óleos não apresentaram alterações significativas na concentração de β -caroteno. Devido a isso, foram utilizadas medidas para discutir os resultados apresentados quanto à composição química do óleo de buriti, principalmente para ajudar no entendimento da sua composição quando misturado em sistemas coloidais.

Na etapa seguinte, foi avaliado o processo de formação das nanoemulsões por homogeneização de alta pressão. Foram usados óleos interesterificados e não interesterificado, e avaliado o comportamento de acordo com a temperatura do armazenamento proposto. De forma geral, o tamanho de partícula para a nanoemulsão com o óleo interesterificado por 24 horas de reação, foi mais estável ao longo do armazenamento, comparada as outras nanoemulsões produzidas por diferentes tempos de reação. Do mesmo modo, a estabilidade oxidativa da nanoemulsão interesterificada por 24 horas monitorada pela formação de produtos de oxidação secundária, foram menos suscetíveis à formação desses compostos de oxidação ao longo do armazenamento a temperatura ambiente. É importante levar em consideração que presença de compostos fenólicos, antioxidantes do óleo de buriti pode ajudar a explicar o potencial biológico observado e com algum mecanismo de ação variável e efeito bacteriostático de acordo com a concentração da nanoemulsão utilizada.

CAPITULO 5 - CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram estabelecer que o uso da lipase comercial Lipozyme TL-IM (Novozymes) foi capaz de catalisar reações de interesterificação do óleo de buriti, com produtos de características físico-químicas distintas. Foi possível observar que houve maior especificidade da enzima para os ácidos graxos insaturados. Assim, a interesterificação enzimática promoveu o aumento nos triacilglicerois tri-insaturados e a diminuição dos triglicerídeos di-insaturado-monossaturados.

As nanoemulsões formuladas com o óleo de buriti interesterificado por 24 horas geraram tamanho de gotas do óleo menores e, conseqüentemente, ajudou a formar nanoemulsões cineticamente mais estáveis, com baixa polidispersidade. Foi verificada, ainda, estabilidade oxidativa e no armazenamento na temperatura de refrigeração, observou-se uma desestabilização mais acentuada das nanoemulsões ao longo do período de armazenamento. Tanto a nanoemulsão de óleo de buriti bruto quanto a nanoemulsão de óleo de buriti interesterificado apresentaram efeito bacteriostático contra bactérias *E. coli* e *S. aureus*, para testes como potencial antimicrobiano, esse efeito sobre as bactérias patogênicas foi acima de 60% de inibição em ambas bactérias utilizadas.

De forma geral, o efeito do processo de interesterificação pode ser considerado positivo na caracterização físico-química. No entanto, há necessidade de pesquisa futura incorporando algum composto bioativo de baixo custo e alta eficiência para controle bactericida de microorganismos em alimentos aplicado a partir desse sistema nanoemulsificado.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, E. Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 14, n. 1, p. 3–15, 2009.
- AOCS, 2009. Determination of cis-, trans-, Saturated, Monounsaturated and Polyunsaturated Fatty Acids in Vegetable or Non-Ruminant Animal Oils and Fats by Capillary GLC (Ce 1h-05). In: **Official Methods and Recommended Practices of the AOCS**.
- BAI, L. et al. Fabrication of oil-in-water nanoemulsions by dual-channel microfluidization using natural emulsifiers: Saponins, phospholipids, proteins, and polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 703–711, 2016.
- BATISTA, J. S. et al. Atividade antibacteriana e cicatrizante do óleo de buriti *Mauritia flexuosa* L. **Ciência Rural**, v. 42, n. 1, p. 136–141, 2012.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996.
- BUNJES, H.; UNRUH, T. Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 6, p. 379–402, 2007.
- CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, 2013.
- CHAMBI, H. N. M. et al. Solid lipid microparticles containing water-soluble compounds of different molecular mass: Production, characterisation and release profiles. **Food Research International**, v. 41, n. 3, p. 229–236, 2008.
- CHANG, Y.; MCCLEMENTS, D. J. Optimization of orange oil nanoemulsion formation by isothermal low-energy methods: Influence of the oil phase, surfactant, and temperature. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 10, 2014.
- CHEN, B. et al. Minor Components in Food Oils : A Critical Review of their Roles on Lipid Oxidation Chemistry in Bulk Oils and Emulsions Minor Components in Food Oils : A Critical Review of their Roles on Lipid Oxidation Chemistry in Bulk Oils. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, p. 901–916, 2011.
- CHEONG, A. M.; TAN, C. P.; NYAM, K. L. In-vitro gastrointestinal digestion of kenaf seed oil-in-water nanoemulsions. **Industrial Crops and Products**, 2016.
- DAVIDOV-PARDO, G.; MCCLEMENTS, D. J. Nutraceutical delivery systems: Resveratrol encapsulation in grape seed oil nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. **Food Chemistry**, v. 167, p. 205–212, jan. 2015.
- DIAS, D. DE O. et al. Optimization of Copaiba oil-based nanoemulsions obtained by different preparation methods. **Industrial Crops and Products**, 2014.
- FARFÁN, M. et al. The effect of interesterification on the bioavailability of fatty acids in structured lipids. **Food Chemistry**, 2013.
- FREITAS, M. L. F. et al. Quality characteristics and thermal behavior of buriti (*Mauritia*

flexuosa L.) oil ; Parámetros de calidad y comportamiento térmico del aceite de buriti (*Mauritia flexuosa* L.). **GRASAS Y ACEITES**, v. 68, n. 4, p. 9, 2017.

GHADERI, L. et al. Development of antimicrobial nanoemulsion-based delivery systems against selected pathogenic bacteria using a thymol-rich *Thymus daenensis* essential oil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 123, n. 4, p. 832–840, 2017.

GOULD, J.; VIEIRA, J.; WOLF, B. Cocoa particles for food emulsion stabilisation. **Food and Function**, v. 4, n. 9, p. 1369–1375, 2013.

HEURTAULT, B. et al. **Physico-chemical stability of colloidal lipid particles** *Biomaterials*, 2003.

HUANG, D.; BOXIN, O. U.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841–1856, 2005.

JENNING, V.; THU, A. F.; GOHLA, S. H. Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids. v. 199, p. 167–177, 2000.

KE, P. J.; WOYEWODA, A. D. Microdetermination of thiobarbituric acid values in marine lipids by a direct spectrophotometric method with a monophasic reaction system. **Analytica Chimica Acta**, 1979.

KIM, B. H.; AKOH, C. C. Recent Research Trends on the Enzymatic Synthesis of Structured Lipids. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 8, p. C1713–C1724, 2015.

KOOLEN, H. H. F. et al. Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) by UPLC-ESI-MS/MS. **Food Research International**, 2013.

LACATUSU, I. et al. Highly antioxidant carotene-lipid nanocarriers: Synthesis and antibacterial activity. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 14, n. 6, 2012.

MAJEED, H. et al. Influence of carrier oil type, particle size on invitro lipid digestion and eugenol release in emulsion and nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, 2016.

MARINELI, R. DA S. et al. Chemical characterization and antioxidant potential of Chilean chia seeds and oil (*Salvia hispanica* L.). **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 2P2, p. 1304–1310, 2014.

MCCLEMENTS, D. J.; LI, Y. Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 159, n. 2, p. 213–228, 2010.

MCCLEMENTS, D. J.; RAO, J. Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 4, p. 285–330, 25 mar. 2011.

MIRALIAKBARI, H.; SHAHIDI, F. Antioxidant activity of minor components of tree nut oils. **Food Chemistry**, v. 111, n. 2, p. 421–427, nov. 2008.

MONTES DE OCA-ÁVALOS, J. M.; CANDAL, R. J.; HERRERA, M. L. **Nanoemulsions: stability and physical properties** *Current Opinion in Food Science*, 2017.

MULLER, R. H.; GOHLA, S.; MADER, K. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled

drug delivery ± a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 161–177, 2000.

NCCLS CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico : Norma Aprovada - Sexta Edição**, 2005.

NEJADMANSOURI, M. et al. Physicochemical properties and oxidative stability of fish oil nanoemulsions as affected by hydrophilic lipophilic balance, surfactant to oil ratio and storage temperature. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 2016.

OSBORN, H. T.; AKOH, C. C. Structured lipids-novel fats with medical, nutraceutical, and food applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 1, n. 3, p. 110–120, 2002.

ÖZOGUL, Y. et al. Comparative study of nanoemulsions based on commercial oils (sunflower, canola, corn, olive, soybean, and hazelnut oils): Effect on microbial, sensory, and chemical qualities of refrigerated farmed sea bass. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 33, p. 422–430, fev. 2016.

OZTURK, B. et al. Nanoemulsion delivery systems for oil-soluble vitamins: Influence of carrier oil type on lipid digestion and vitamin D₃ bioaccessibility. **Food Chemistry**, 2015.

PATEL, A. R.; DEWETTINCK, K. Current update on the influence of minor lipid components, shear and presence of interfaces on fat crystallization. **Current Opinion in Food Science**, v. 3, p. 65–70, 2015.

PIRAN, P. et al. Formulation of Menthol-Loaded Nanostructured Lipid Carriers to Enhance Its Antimicrobial Activity for Food Preservation. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 7, n. 2, p. 261–268, 30 jun. 2017.

POYATO, C. et al. Oxidative stability of O/W and W/O/W emulsions: Effect of lipid composition and antioxidant polarity. **Food Research International**, 2013.

RIBEIRO, A. P. B. et al. Hardfats as crystallization modifiers of cocoa butter. **European Journal of Lipid Science and Technology**, 2013.

RIBEIRO, A. P. B. et al. Crystallization modifiers in lipid systems. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 7, p. 3925–3946, 2015.

SALVIA-TRUJILLO, L. et al. Effect of processing parameters on physicochemical characteristics of microfluidized lemongrass essential oil-alginate nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, 2013.

SALVIA-TRUJILLO, L. et al. Impact of microfluidization or ultrasound processing on the antimicrobial activity against *Escherichia coli* of lemongrass oil-loaded nanoemulsions. **Food Control**, 2014.

SALVIA-TRUJILLO, L. et al. Physicochemical characterization and antimicrobial activity of food-grade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils. **Food Hydrocolloids**, v. 43, 2015.

SALVIA-TRUJILLO, L.; MCCLEMENTS, D. J. Influence of Nanoemulsion Addition on the

Stability of Conventional Emulsions. **Food Biophysics**, 2016.

SILVA, S. M. et al. Characterization of Oil Extracted from Buriti Fruit (*Mauritia flexuosa*) Grown in the Brazilian Amazon Region. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 86, n. 7, p. 611–616, 30 jul. 2009.

SPERANZA, P. et al. Influence of emulsion droplet size on antimicrobial activity of interesterified Amazonian oils. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 1, p. 207–212, jan. 2015.

SPERANZA, P.; RIBEIRO, A. P. B.; MACEDO, G. A. Lipase catalyzed interesterification of Amazonian pataúá oil and palm stearin for preparation of specific-structured oils. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 12, p. 8268–8275, 23 dez. 2015.

SPERANZA, P.; RIBEIRO, A. P. B.; MACEDO, G. A. Application of lipases to regiospecific interesterification of exotic oils from an Amazonian area. **Journal of Biotechnology**, v. 218, p. 13–20, jan. 2016.

SPERANZA, P. et al. Amazonian Buriti oil: chemical characterization and antioxidant potential. **Grasas y Aceites**, v. 67, n. 2, p. e135, 30 jun. 2016b.

SPERANZA, P. et al. Improving the chemical properties of Buriti oil (*Mauritia flexuosa* L .) by enzymatic interesterification. v. 69, n. December, p. 1–8, 2018.

TADROS, T. et al. **Formation and stability of nano-emulsions** *Advances in Colloid and Interface Science*, 2004.

TRONCOSO, E.; AGUILERA, J. M.; MCCLEMENTS, D. J. Fabrication, characterization and lipase digestibility of food-grade nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, 2012.

WANG, X. Y. et al. Degree of oxidation depending on the positional distribution of linolenic acid in perilla oil and interesterified products. **Food Science and Biotechnology**, 2014.

WARAHO, T. et al. Prooxidant mechanisms of free fatty acids in stripped soybean oil-in-water emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2009.

WARAHO, T.; MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. **Mechanisms of lipid oxidation in food dispersions** *Trends in Food Science and Technology*, 2011a.

WARAHO, T.; MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Impact of free fatty acid concentration and structure on lipid oxidation in oil-in-water emulsions. **Food Chemistry**, 2011b.

YUKUYAMA, M. N. et al. Nanoemulsion: Process selection and application in cosmetics - A review. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 38, n. 1, p. 13–24, 2016.

ZOU, L.; AKOH, C. C. Oxidative stability of structured lipid-based infant formula emulsion: Effect of antioxidants. **Food Chemistry**, 2015.

ANEXOS

ANEXO I – Autorização da editora La Editorial CSIC para inclusão na tese parte do artigo de pesquisa publicado.

Código seguro de verificación : 0204-3a78-ebab-a22a-e231-6dbe-da55-827a-a5a8 | Puede verificar la integridad de este documento en la siguiente dirección : <https://portaltrasmis.redcra.es>



MINISTERIO
DE CIENCIA, INNOVACIÓN
Y UNIVERSIDADES



CSIC

EDITORIAL CSIC
DIRECTOR

Dña. Karina Magna M. Leão
Laboratory of Bioprocesses
Department of Food and Nutrition (DEPAN)
Faculty of Food Engineering (FEA)
State University of Campinas
São Paulo, Brazil

En relación con su solicitud de autorización para la reproducción del artículo completo, P. Speranza, K. M. M. Leão, T. S. Narciso Gomes, L. V. C. Reis, A. P. Rodrigues, J. Alves Macedo, A. P. B. Ribeiro and G. Alves Macedo (2018): "Improving the chemical properties of Buriti oil (Mauritia flexuosa L.) by enzymatic interesterification", publicado en la revista *Grasas y Aceites* 69/4, e282, <https://doi.org/10.3989/gya.0229181>, para ser incluido como apéndice en la tesis doctoral de doña Karina Magna M. Leão, que será previsiblemente finalizada en 2019, le informamos:

La Editorial CSIC autoriza a Karina Magna M. Leão a proceder a la reproducción del artículo antes citado como apéndice de su tesis doctoral, incluyendo sus sucesivas reimpresiones y reediciones, en inglés.

En el trabajo para el que se concede esta autorización, la mención a la contribución original publicada en el CSIC debe figurar donde corresponda de la siguiente forma (o en otro estilo de cita similar que contenga la misma información):

Speranza, P., K. M. M. Leão, T. S. Narciso Gomes, L. V. C. Reis, A. P. Rodrigues, J. Alves Macedo, A. P. B. Ribeiro and G. Alves Macedo (2018): "Improving the chemical properties of Buriti oil (Mauritia flexuosa L.) by enzymatic interesterification", *Grasas y Aceites* 69/4, e282, <https://doi.org/10.3989/gya.0229181>

Atentamente,

Ramón B. Rodríguez

ramon.rodriguez@csic.es

Vicente B.
28006 Madrid
Tel.: 91 523 94 70
91 521 48 11
Fax: 91 411 30 77

CSV : 0204-3a78-ebab-a22a-e231-6dbe-da55-827a-a5a8

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN : <https://portaltrasmis.redcra.es>

FIRMANTE(1) : RAMON RODRIGUEZ MARTINEZ | FECHA : 05/02/2019 09:35 | NOTAS : F



ANEXO II- Autorização da editora Elsevier para uso do artigo de pesquisa na tese, publicado na revista Biotechnology Reports.



Karina Magna Leao <kmagnaleao@gmail.com>

Re: Request for Elsevier Authorization [191001-015361]

2 mensagens

JM-BTRE <btire@elsevier.com>
 Responder a: JM-BTRE <btire@elsevier.com>
 Para: kmagnaleao@gmail.com

5 de outubro de 2019 03:40

Dear Dr. Leao,

Thank you for your e-mail.

There is no problem with using the content in the thesis, but please make sure to log a request through Copyright clearance/RightsLink. The link for this is found on ScienceDirect. See the highlighted link on the screen shot. Then fill in the appropriate information, and there is no charge to use it.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2215017X1930164X>

<https://s100.copyright.com/AppDispatchServlet?publisherName=ELS&contentID=S2215017X1930164X&orderBeanReset=true>



Biotechnology Reports
 Volume 24, December 2019, e00365



Physicochemical characterization and antimicrobial activity in novel systems containing buriti oil and structured lipids nanoemulsions

K.M.M. Leão^{a,*}, L.V.C. Reis^a, P. Speranza^a, A.P. Rodrigues^a, A.P.B. Ribeiro^a, J.A. Macedo^a, G.A. Macedo^a

[Show more](#)



Physicochemical characterization and antimicrobial activity in novel systems containing buriti oil and structured lipids nanoemulsions

Author: K.M.M. Leão, L.V.C. Reis, P. Speranza, A.P. Rodrigues, A.P.B. Ribeiro, J.A. Macedo, G.A. Macedo

Publication: Biotechnology Reports

Publisher: Elsevier

Date: December 2019

© 2019 The Authors. Published by Elsevier B.V.

Welcome to RightsLink

Elsevier has partnered with Copyright Clearance Center's RightsLink service to offer a variety of options for reusing this content.

Note: This article is available under the [Creative Commons CC-BY-NC-ND](#) license and permits non-commercial use of the work as published, without adaptation or alteration provided the work is fully attributed.

For commercial reuse, permission must be requested below.

ANEXO III- Comprovante de cadastro realizado na plataforma SisGen.



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A691E64

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético/CTA, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A691E64**
 Usuário: **UNICAMP**
 CPF/CNPJ: **46.068.425/0001-33**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético/CTA**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Oenocarpus bataua
Mauritia flexuosa
Astrocaryum murumuru
óleos fixos de plantas da Amazonia

Fonte do CTA

CTA de origem não identificável

Título da Atividade: **Produção de lipídios especiais por interesterificação enzimática de óleos da Amazônia e influência na atividade biológica**

Equipe

Gabriela Alves Macedo UNICAMP
Juliana Alves Macedo UNICAMP