



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

ESCOLA DE ENGENHARIA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

ENG07053 – TRABALHO DE DIPLOMAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



MICROENCAPSULAÇÃO POR LIOFILIZAÇÃO DO EXTRATO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DA TORTA DE GIRASSOL

Autor: Nicole Figueredo Passaglia

Orientador: Prof.^a Dr.^a Lúgia Damasceno Ferreira Marczak

Coorientador: Dr.^a Renata Moschini Daudt

Porto Alegre, julho de 2019

Sumário

Agradecimentos	iv
RESUMO	v
Lista de Figuras	vi
Lista de Tabelas	vii
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica e Fundamentação Teórica	2
2.1. Cultura do Girassol	2
2.2. Compostos Fenólicos.....	3
2.3. Atividade Antioxidante	4
2.4. Atividade Antimicrobiana	5
2.5. Extração	6
2.6. Microencapsulação	6
2.6.1. Liofilização	7
2.6.2. Materiais de Parede	9
3. Materiais e Métodos	10
3.1. Matéria-Prima e Reagentes	10
3.2. Extração e Concentração de Compostos Fenólicos	11
3.3. Materiais de Parede	11
3.4. Preparação das Microcápsulas	12
3.5. Liofilização	12
3.6. Caracterização das Microcápsulas	14
3.6.1. Determinação de Fenólicos Totais.....	14
3.6.2. Atividade Antioxidante	15
3.6.3. Umidade	15
3.6.4. Atividade de Água.....	16
3.6.5. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....	16
4. Resultados e Discussões	17
4.1. Extração e Liofilização	17
4.1.1 Microencapsulação	17
4.2. Caracterização	17
4.2.1. Compostos Fenólicos Totais (CFT)	17
4.2.2. Atividade Antioxidante	18

4.2.3. Umidade	19
4.2.4. Atividade da Água.....	20
4.2.5. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....	21
4.2.6. Microscopia Ótica	27
5. Conclusões e Trabalhos Futuros	29
6. Referências.....	30

Agradecimentos

Primeiramente, quero agradecer aos meus pais, Mara e Pierre, pelo imenso apoio e incentivo durante todos esses anos.

Aos meus colegas de curso, alguns dos quais se tornaram grandes amigos e proporcionaram uma trajetória mais prazerosa.

A minha orientadora, Lígia, e coorientadora, Renata, pelo suporte e paciência durante esse projeto.

Ao Laboratório de Tecnologia e Processamento de Alimentos (LATEPA) e demais setores do departamento que auxiliaram na execução deste trabalho.

RESUMO

A necessidade de proteção ao meio ambiente tem gerado a busca por um maior aproveitamento das matérias-primas e dos resíduos. A extração do óleo de girassol produz um resíduo que contém compostos fenólicos, que precisam ser removidos para que esse resíduo - denominado torta - possa ser utilizado para ração animal, pois tais compostos prejudicam a digestibilidade das proteínas nos animais. Os compostos fenólicos podem ter ampla aplicação na indústria, tanto como antifúngico quanto como antioxidante em alimentos. Após a extração convencional por solvente, é possível melhorar sua estabilidade e armazenamento através da técnica de microencapsulação, na qual um material – denominado material de parede - é adicionado para envolver o produto e configurar-lhe outras características desejáveis, os materiais de parede escolhidos neste trabalho foram a maltodextrina e a pectina. Dentre as diferentes técnicas que podem ser usadas para a microencapsulação, destaca-se a liofilização, que consiste na remoção da água do material através da sua sublimação. Por operar em temperaturas baixas, evita a danificação e decomposição de substâncias sensíveis à temperatura, caso dos compostos em estudo. A análise do pó deu-se através da quantificação de fenólicos totais, análise antioxidante, teor de umidade, atividade de água, calorimetria diferencial de varredura (DSC) e microscopia ótica, que foram realizadas para o extrato puro e com os dois materiais de parede usados. Os teores de compostos fenólicos ficaram entre 42,23 g EAG/100 g \pm 0,01 e 23,96 g EAG/100 g \pm 0,02. Os materiais apresentaram uma atividade de água entre 0,334 \pm 0,009 e 0,399 \pm 0,005. A percentagem de umidade em base úmida dos produtos ficou entre 6,9 \pm 0,4 e 7,4 \pm 0,2. O termograma de DSC mostrou alterações nas temperaturas de transições térmicas comparando os extratos com e sem material de parede. As imagens em microscópio ótico, com aumento de 5x, comprovaram alterações estruturais nas microcápsulas em relação ao produto sem material de parede. Os resultados da atividade antioxidante foram inconclusivos. Os resultados indicaram que a técnica de liofilização é promissora para produzir pós de extratos fenólicos.

Palavras-chaves: torta de girassol, compostos fenólicos, microencapsulação, liofilização.

Lista de Figuras

Figura 1 - Plantação de girassol.	2
Figura 2 - Semente de girassol.	3
Figura 3 - Estrutura química do ácido clorogênico.	4
Figura 4 - Diagrama de fases da água.	8
Figura 5 - Extratora de óleo Home Up.	10
Figura 6 - Torta de girassol após extração em extratora Home Up.	10
Figura 7 - Placas Petri congeladas. (a) extrato puro; (b) extrato + maltodextrina; (c) extrato + pectina.	12
Figura 8 - Liofilizador de bandeja utilizado para microencapsulação do extrato.	13
Figura 9 - Amostras após liofilização. (a) extrato puro; (b) extrato + maltodextrina; (c) extrato + pectina.	13
Figura 10 - Amostras após trituração. (a) extrato puro; (b) extrato + maltodextrina; (c) extrato + pectina.	14
Figura 11 - Gráficos dos efeitos da atividade de água sobre os alimentos em relação a diferentes fatores.	20
Figura 12 - Termograma de DSC do extrato liofilizado sem material encapsulante.	22
Figura 13 - Termograma de DSC do extrato liofilizado encapsulado com maltodextrina.	23
Figura 14 - Termograma de DSC da maltodextrina.	24
Figura 15 - Termograma de DSC do extrato liofilizado encapsulado com pectina.	25
Figura 16 - Termograma de DSC da pectina.	26
Figura 17 - Micrografia do extrato puro.	27
Figura 18 - Micrografia do extrato com maltodextrina.	28
Figura 19 - Micrografia do extrato com pectina.	28

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Métodos de microencapsulação e seus respectivos materiais.	7
Tabela 2 - Valores de compostos fenólico totais.	17
Tabela 3 - Percentagem dos teores de umidade em base úmida do extrato puro e dos extratos microencapsulados.	19
Tabela 4 - Atividade de água dos produtos do processo.	20

1. Introdução

A necessidade de proteção ao meio ambiente tem gerado a busca por um maior aproveitamento das matérias-primas agrícolas e seus resíduos. No Brasil, em razão da intensa atividade agrícola, é gerada uma grande quantidade de resíduos da agroindústria, que podem possuir alto valor agregado.

A partir da semente de girassol é extraído o seu óleo, que é usado no setor alimentício e na produção de biodiesel. O subproduto do processamento de extração - denominado torta - possui alto valor nutricional e é utilizado para alimentação animal, entretanto a presença de compostos fenólicos prejudica a digestão de proteínas dos animais, sendo necessária a sua remoção. O extrato fenólico obtido dessa remoção pode ser utilizado em produtos que necessitam da adição de antioxidantes e/ou antimicrobianos.

A degradação dos compostos fenólicos que ocorre devido a fatores como temperatura, oxigênio, entre outros, constitui-se uma dificuldade para sua aplicação. Uma alternativa para diminuir a degradação é a utilização da técnica de microencapsulação, na qual consiste em envolver o composto de interesse em algum material - denominado material de parede -, para que desta forma o seu núcleo seja protegido, evitando reações adversas ou perdas de compostos. A microencapsulação pode ser realizada através de diferentes técnicas, dentre elas a liofilização, que consiste na sublimação da água em condições de baixas pressões e temperaturas.

Assim, o presente trabalho tem como objetivo extrair os compostos fenólicos da torta de girassol e microencapsulá-los através da técnica de liofilização, obtendo-se altos teores de fenólicos para aplicações futuras. As microcápsulas obtidas serão caracterizadas quanto à composição de fenólicos, atividade de água, umidade, atividade antioxidante, calorimetria diferencial de varredura (DSC) e microscopia ótica.

2. Revisão Bibliográfica e Fundamentação Teórica

2.1. Cultura do Girassol

O girassol (*Helianthus annuus L.*), mostrado na Figura 1, é uma oleaginosa cultivada em praticamente todos os continentes, pois se adapta muito bem a diversas condições climáticas; possui grande tolerância à seca e é uma ótima opção para a rotação de culturas. Atualmente, é utilizada para produção de óleos, consumida na forma de semente, farinhas, utilizada para ração animal, além do seu uso em decoração. No Brasil, a produção de girassol na safra 2017/18 foi de 142,2 mil toneladas, com expectativa de aumento para a próxima safra de 4,9% (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2019).



Figura 1 - Plantação de girassol.

Fonte: Super Interessante, 2015.

O grande interesse no óleo de girassol está no fato dele possuir em sua composição ácidos graxos poli-insaturados, especialmente o ácido linoleico, que é um ácido essencial que não é sintetizado pelo organismo humano, tornando sua ingestão importante; além disso é um dos óleos vegetais de melhor qualidade nutricional (DE CASTRO, 1996). Na semente, mostrada na Figura 2, as composições podem variar de acordo com o solo do plantio, mas, em geral, possui aproximadamente 5% de água, 25% de proteínas, 50% de óleos, 20% de carboidratos e 4% de resíduos minerais (CARRÃO-PANIZZI; MANDARINO, 1994).



Figura 2 - Semente de girassol.

Fonte: Revista em Dia, 2012.

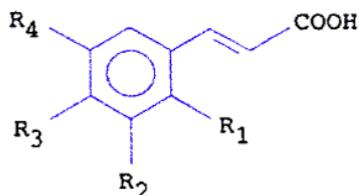
2.2. Compostos Fenólicos

Os fenólicos são compostos que possuem em sua estrutura química ao menos um anel aromático, na qual teve pelo menos um hidrogênio substituído por um grupo hidroxila. Eles podem ser divididos em flavonoides (antocianinas, flavonóis e seus derivados) e ácidos fenólicos (ácidos benzoico, cinâmico e seus derivados) e cumarinas. Esses compostos são responsáveis pela cor, adstringência, aroma e estabilidade oxidativa aos alimentos (ANGELO; JORGE, 2007).

Além disto, os fenólicos são um amplo grupo de substâncias químicas que são produzidas pelo metabolismo secundário das plantas, sendo sintetizados durante o desenvolvimento normal da planta (HARBORNE, 1982), mas também em resposta a condições de estresse, tais como: infecção, ferimentos ou radiação UV. Na planta, podem atuar como atrativos para polinizadores, contribuintes para a pigmentação da planta e antioxidantes (SHAHIDI; NACZK, 2004).

Tem sido atribuído a esses compostos atividade anticarcinogênica, relacionada à inibição dos cânceres de cólon, esôfago, pulmão, fígado, mama e pele. Os compostos fenólicos que possuem este potencial são o resveratrol, a quercetina, o ácido cafeico e os flavonóis (PIMENTEL; FRANCKI; GOLLÜCKE, 2005).

No girassol, o principal composto fenólico é o ácido clorogênico, cuja estrutura química está mostrada na Figura 3, onde os radicais R1, R2, R3 e R4 são normalmente representados pelos grupos -OH, -H e -OCH₃. Além desse ácido, o girassol também possui em sua composição quantidades de ácido cafeico, cinâmico, cumárico, ferúlico, sinápico, hidroxicinâmicos (PEDROSA *et al*, 2000).



Ácido clorogênico

Figura 3 - Estrutura química do ácido clorogênico.

Estudos *in vitro* e *in vivo* levaram, nas últimas décadas, os pesquisadores a atribuir diferentes funções farmacológicas aos ácidos clorogênicos, dentre elas: à ligação a centros opióides do cérebro; à atividade inibitória sobre as integrases que participam da replicação do vírus HIV; à indução da diminuição dos níveis de glicose do sangue; e ao efeito indutor na replicação e na mobilidade de macrófagos de camundongos, o que acarretaria um aumento da imunidade e característica anti-mutagênica (MONTEIRO; TRUGO, 2005).

2.3. Atividade Antioxidante

Antioxidantes são substâncias que bloqueiam os processos óxido-redutivos, que são desencadeados pelos radicais livres e espécies reativas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Nos compostos fenólicos, essa capacidade está associada ao sequestro de radicais livres, à doação de átomos de hidrogênio ou elétrons e à quelatação de cátions metálicos. O potencial antioxidante irá depender da estrutura química, ou seja, do número e da posição dos grupos hidroxilas, assim como na natureza dos substitutos no anel aromático (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

Os antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria alimentícia são o butil-hidroxi-anisol (BHA), o butil-hidroxitolueno (BHT) e o terc-butil-hidroquinona (TBHQ). Entretanto, estudos recentes têm atribuído a esses antioxidantes sintéticos efeitos colaterais, considerando-os tóxicos, cancerígenos e maléficos ao corpo humano quando ingeridos em doses elevadas, sendo que as quantidades limites são de difícil estimação (KAHL; KAPPUS, 1993). Em alguns países, os antioxidantes

sintéticos têm sido proibidos devido à sua toxidez; por exemplo, nos Estados Unidos, o BHT foi removido da lista de compostos geralmente reconhecidos como seguros (GRAS - Generally Recognized as Safe, FDA).

2.4. Atividade Antimicrobiana

Uma das funções dos compostos fenólicos produzidos pela planta é a proteção contra ataques patogênicos. O mecanismo de ação antimicrobiano baseia-se na capacidade de inibir a atividade de enzimas proteolíticas, de aumentar a permeabilidade da parede celular para as substâncias exógenas e, também, de interromper a síntese do ácido nucleico (CUSHNIE; LAMB, 2005).

Além disso, podem atuar como antifúngicos e inibidores da produção de micotoxinas, como a aflatoxina, por atuarem na regulação da peroxidação lipídica, inibindo a formação de peróxidos e consequente estresse oxidativo que está relacionado à biossíntese de aflatoxinas (OLIVEIRA *et al*, 2007).

A presença e o crescimento de fungos causam deterioração e inviabilizam o consumo de muitos alimentos. O uso de fungicidas sintéticos para controle de fungos fitopatogênicos pode levar a problemas de saúde e do ambiente, além de microrganismos resistentes (LÓPEZ-MENESES *et al*, 2015).

Alguns antimicrobianos quimicamente sintetizados e reconhecidos como GRAS (Generally Recognized as Safe, FDA) são o ácido propiônico e os propionatos; o ácido sórbico e os sorbatos; o ácido benzóico e os benzoatos; os parabenos; o diacetato de sódio; a nisina; o nitrito de sódio (SAUCEDA, 2011).

A taxa de deterioração microbiológica depende não apenas dos microrganismos presentes, mas também da composição química do produto e do tipo de carga microbiana inicial. Assim, o processamento de alimentos visa proporcionar alimentos seguros e nutritivos, além de atender às expectativas de sabor, aroma e aparência (SAUCEDA, 2011).

2.5. Extração

O óleo está presente nas células oleaginosas da planta, na qual está envolto por uma membrana e uma parede celular. Assim, é preciso rompê-las para que seu conteúdo possa ser utilizado. O método mais simples consiste na prensagem mecânica, na qual se aplica uma alta pressão sobre as sementes. Como resultado desse processo, após a separação do óleo, ocorre a formação de uma torta (SINGH; BARGALE, 2000).

Para a separação, identificação e utilização dos compostos bioativos de materiais vegetais, o método mais comum é a extração por diferentes solventes, usados juntamente com a aplicação de calor e/ou agitação. Entretanto é importante salientar que a temperatura não deve ser superior a 60°C para que não ocorra degradação de compostos. A eficiência do processo é fortemente dependente da escolha do solvente (COWAN, 1999). Os solventes mais utilizados para a extração destes compostos são o metanol, o etanol, a acetona, a água, o acetato de etila, o propanol, o dimetilformaldeído e suas combinações (NACZK; SHAHIDI, 2004).

2.6. Microencapsulação

A microencapsulação baseia-se no empacotamento de materiais sólidos, líquidos ou gasosos em cápsulas extremamente pequenas, utilizando diferentes técnicas, dentre elas: *spray drying*, *spray cooling*, coacervação, extrusão, extrusão centrífuga, recobrimento em leito fluidizado e liofilização. A técnica oferece proteção ao material encapsulado, além da possibilidade de liberá-lo de forma controlada sob condições específicas; assim deve ser escolhida de acordo com a aplicação, a não reatividade com o material que faz a encapsulação – denominado material de parede - e o mecanismo de liberação (FAVARO-TRINTADE; PINHO; ROCHA, 2008). Na Tabela 1 encontram-se as diferentes técnicas e os tipos de materiais que podem ser encapsulados. No presente trabalho, pelo fato de a microencapsulação ser realizada pela técnica de liofilização ela será apresentada com maiores detalhes a seguir.

Tabela 1 - Métodos de microencapsulação e seus respectivos materiais.

Métodos de encapsulação	Materiais encapsuláveis
Métodos físicos	
Extrusão estacionária	Líquido/sólido/gás
Bocal submerso	Líquido/sólido/gás
Extrusão centrífuga	Líquido/sólido/gás
Bocal vibrante	Líquido/sólido/gás
<i>Spray drying</i>	Líquido/sólido
Disco rotativo	Líquido/sólido
<i>Pan coating</i>	Sólido
Suspensão por ar	Sólido
<i>Spray chilling e spray cooling</i>	Líquido/sólido
Leito fluidizado	Sólido
Co-cristalização	Sólido/líquido
Liofilização	Líquido
Métodos químicos	
Polimerização interfacial	Líquido/sólido
Inclusão molecular	Líquido
Polimerização <i>in situ</i>	Líquido/sólido
Métodos físico-químicos	
Coacervação simples	Líquido/sólido
Coacervação complexa	Líquido/sólido
Lipossomas	Líquido/sólido
Lipoesferas (<i>solid lipid nanoparticles e nanostructured lipid carriers</i>)	Líquido/sólido
Evaporação do solvente	Líquido/sólido

Fonte: Southwest Research Institute (1991); Shahidi e Han (1993); Desai e Park (2005); e Madene et al. (2006).

2.6.1. Liofilização

A liofilização é uma técnica baseada na desidratação de um produto congelado por sublimação, sendo realizado, primeiramente, um congelamento rápido do produto seguido da sublimação do gelo sob vácuo (AZEREDO, 2005). Assim, a água passa do estado sólido diretamente para o gasoso, necessitando estar na região de temperatura abaixo do ponto triplo. Na Figura 4, mostra-se o diagrama de fases da água e seu ponto triplo, que acontece a 639,95 Pa e 273,15 K. Essa técnica destaca-se dentre as demais usadas na microencapsulação pela aplicação de baixas temperaturas, o que propicia a preservação do núcleo.

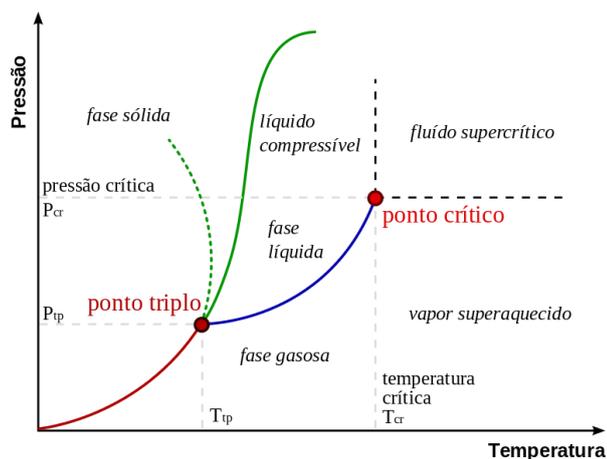


Figura 4 - Diagrama de fases da água.

Fonte: Wikipédia.

Nesse método, ocorre um enrijecimento da estrutura pelo congelamento da superfície do material, na qual ocorre a sublimação, que é útil para prevenir colapsos da matriz sólida após a secagem. O efeito é a formação de um poro que é facilmente reidratado com água. A proliferação das bactérias não fica viável no material seco, entretanto elas não são exterminadas por este tipo de secagem. Como não há água no meio, as atividades das enzimas são inativadas após a secagem, e as reações químicas oxidativas ou não-oxidativas ocorrem em baixa quantidade, trazendo resultados bastante satisfatórios (BOSS, 2004).

O processo de liofilização pode ser dividido em três etapas: congelamento rápido, secagem primária e secagem secundária. O congelamento rápido é essencial para as etapas seguintes, visto que ocorre a formação e distribuição dos tamanhos dos poros, que influenciam na qualidade do material. Na secagem primária, ocorre a sublimação e na secagem secundária, ocorre a remoção da umidade sublimada (JAYARAMAN; GUPTA, 1995).

A liofilização pode ser realizada em aparelho tipo bandeja, multibatelada, túnel, *Vacuum-Spray Freeze Dryers*, contínuo e por micro-ondas. A escolha será de acordo com o material. Esse processo é extremamente utilizado em fármacos (vacinas, antibióticos), materiais biológicos e alimentos (carnes, café, sopa, leite), cujas propriedades organolépticas são importantes e devem ser conservadas. A desvantagem desse processo é o alto custo, mas que pode ser contornado pela falta de manuseio específico e estocagem do produto em local refrigerado, principalmente se ele contiver alto valor agregado (BOSS, 2004).

2.6.2. Materiais de Parede

Os materiais de parede utilizados como encapsulantes na liofilização podem ser vários: goma arábica, ágar, alginato e carragena; os carboidratos amido, amidos modificados, dextrinas e sacarose; as celuloses carboximetilcelulose, acetilcelulose, nitrocelulose; os lipídios parafina, mono e diacilgliceróis, óleos e gorduras; os materiais inorgânicos sulfato de cálcio e silicatos; as proteínas do glúten, caseína, gelatina e albumina (FAVARO-TRINTADE; PINHO; ROCHA, 2008).

No presente trabalho, os materiais utilizados foram a maltodextrina e a pectina. As maltodextrinas são oligossacarídeos de amido que possuem equivalente de dextroses (DE), cujo termo é usado para representar o grau de hidrólise do amido, menor de 20 (LANGRISH; CHAN; KOTA, 2007). Elas são usadas isoladamente ou em combinação com outros materiais no processamento de extratos vegetais, aditivos aromáticos, carotenoides e vitaminas em alimentos e medicamentos (SANSONE *et al*, 2011).

A pectina é um polissacarídeo, que está presente na estrutura da parede celular das plantas superiores, e que é comercialmente disponível a partir da sua extração de plantas comestíveis e amplamente utilizada em alimentos como agente gelificante, estabilizante e espessante (SANSONE *et al*, 2011).

No presente trabalho, o extrato fenólico extraído do resíduo da extração de óleo de girassol será microencapsulação através da técnica de liofilização – usando como material de parede maltodextrina e pectina – e as microcápsulas obtidas serão caracterizadas através da análise de diferentes parâmetros.

3. Materiais e Métodos

3.1. Matéria-Prima e Reagentes

As sementes de girassol foram adquiridas no mês de março de 2019 no Mercado Público de Porto Alegre – Rio Grande do Sul. Após, foram extraídas em extrator de óleo (Extratora de óleo gourmet chef Erick Jacquim, Home Up, Brasil), mostrado na Figura 5, para a separação do óleo e a formação da torta, mostrado na Figura 6, e seu posterior uso na extração dos compostos fenólicos.



Figura 5 - Extratora de óleo Home Up.



Figura 6 - Torta de girassol após extração em extratora Home Up.

3.2. Extração e Concentração de Compostos Fenólicos

De acordo com Naczki e Shahidi (2004) ainda não se desenvolveu um método satisfatório para a extração de todos ou de um grupo específico de fenólicos presentes nos alimentos. Isso ocorre porque a solubilidade dos fenólicos varia com a polaridade do solvente utilizado, o grau de polimerização dos fenólicos e interações com outros constituintes dos alimentos. Contudo, para este trabalho, a extração dos compostos fenólicos da torta de girassol foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Zardo (2018), que otimizou o processo de extração. Assim, utilizou-se solução aquosa de etanol 43% na proporção de 1:10 (torta:solvente).

Adicionou-se uma amostra de 3 g de torta a um tubo Falcon de 50 mL e 30 mL de solução aquosa de etanol a 43%; após, extraiu-se em vortex (Phoenix Luferco, modelo AP56, Brasil) durante 5 minutos; A seguir, a solução foi centrifugada (Sigma, modelo 2-16 KL, Alemanha) a 5000 g (6861 rpm) durante 10 minutos, a 10 °C.

Transferiu-se o sobrenadante das amostras para um balão volumétrico e o resíduo sólido foi novamente submetido à extração com 30 mL de solvente. Após as duas extrações, as frações foram concentradas em rotaevaporador (Fisatom, modelo 804, Brasil), na temperatura de 55 °C, evitando que a temperatura ultrapassasse 60 °C, para impedir a degradação dos compostos fenólicos, permanecendo até a evaporação completa do etanol. Para obter-se a quantidade de amostra necessária para a realização de todas as análises, foram realizados 30 tubos Falcon, determinado em teste prévio.

3.3. Materiais de Parede

Os materiais de parede utilizados foram escolhidos de acordo com a disponibilidade e compatibilidade com o núcleo a ser encapsulado. Assim, os materiais utilizados neste trabalho foram: maltodextrina (Ingredion MOR REX® 1910) e pectina (CPKelco GENU® Pectin tipo USP/100).

3.4. Preparação das Microcápsulas

O extrato foi fracionado de modo que a liofilização ocorresse com três diferentes composições: extrato puro, extrato com maltodextrina e extrato com pectina. Assim, as amostras com o material de parede foram misturadas e homogeneizadas e dispostas em placas Petri. A massa de material de parede foi adicionada de modo que, quando finalizado o processo, a proporção de núcleo e material de parede fosse de 1:1.

3.5. Liofilização

As placas Petri foram mantidas no ultrafreezer durante 24h, mostradas na Figura 7. Após, foram colocadas no liofilizador (Terroni, modelo LS6000, Brasil), mostrado na Figura 8, e mantidas no equipamento para a sublimação da água contida na amostra, durante aproximadamente 24 horas.

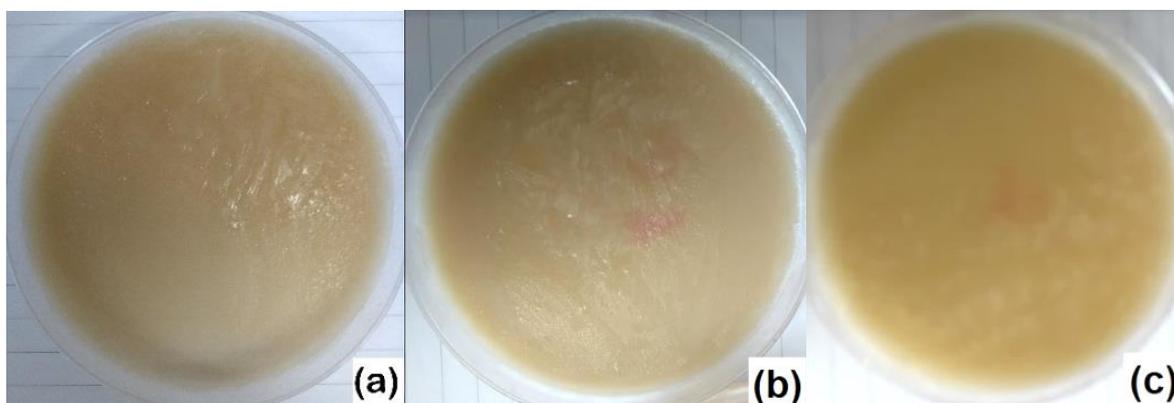


Figura 7 - Placas Petri congeladas. (a) extrato puro; (b) extrato + maltodextrina; (c) extrato + pectina.



Figura 8 - Liofilizador de bandeja utilizado para microencapsulação do extrato.

Após esse período, as placas foram retiradas do liofilizador e a Figura 9 mostra uma fotografia do resultado. Conforme pode ser observado, há uma nítida diferença entre os três tipos de amostras liofilizadas: extrato puro e extratos com os materiais de parede, tanto por alterações na coloração quanto no aspecto físico.

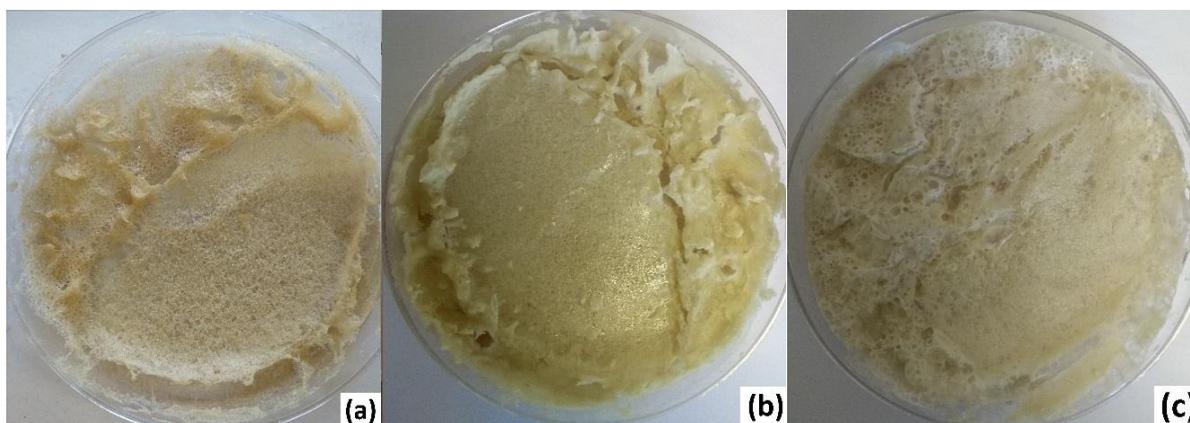


Figura 9 - Amostras após liofilização. (a) extrato puro; (b) extrato + maltodextrina; (c) extrato + pectina.

Após, as amostras foram removidas das placas Petri e trituradas com gral e pistilo, o resultado encontra-se na Figura 10. E em seguida, acondicionadas em frasco âmbar na ausência de luz e ar para posteriores análises.



Figura 10 - Amostras após trituração. (a) extrato puro; (b) extrato + maltodextrina; (c) extrato + pectina.

3.6. Caracterização das Microcápsulas

3.6.1. Determinação de Fenólicos Totais

Os teores de compostos fenólicos totais presentes nas amostras liofilizadas foram determinados pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, utilizando como padrão o ácido gálico, de acordo com a metodologia clássica proposta por Waterhouse (2011).

Para essa análise, realizou-se uma nova extração dos compostos liofilizados utilizando etanol 43% a fim de tê-los dissolvidos para a realização da análise; utilizou-se um volume de solvente de 15 mL na primeira e 20 mL na segunda extração. Na sequência, diluiu-se o extrato de cada amostra na proporção de 1:75 (v:v). A seguir, acrescentou-se 850 μ L de água ultra-pura, 200 μ L de solução do extrato diluído, 100 μ L do reagente Folin-Ciocalteu e, após alguns minutos, 850 μ L de carbonato de sódio 7%.

A amostras foram deixadas em repouso na ausência de luz durante um período de 1 h e, após, verificada a absorbância em espectrofotômetro (Espectrofotômetro UV-VIS T80, PG Instruments, Reino Unido), no comprimento de onda de 765 nm.

3.6.2. Atividade Antioxidante

Mediu-se a atividade antioxidante a partir da captura do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), que pode ser obtido diretamente por dissolução do reagente em meio orgânico, de acordo com Rufino *et al* (2007), com adaptações.

Inicialmente preparou-se uma curva padrão com diferentes concentrações de DPPH, para medir as absorvâncias a fim de compará-las com as encontradas nas amostras. Para tanto, pesou-se 1 g de amostra e adicionou-se 40 mL de metanol 50%; deixou-se 60 minutos em repouso a temperatura ambiente. A seguir, a amostra foi centrifugada (Sigma, modelo 2-16 KL, Alemanha) a 5000 g (6861 rpm) durante 15 minutos. Ao resíduo sólido adicionou-se 40 mL de acetona 70%; deixou-se 60 minutos em repouso a temperatura ambiente e centrifugou-se novamente durante 15 minutos. Ambos os sobrenadantes foram misturados e adicionou-se água destilada até completar 100 mL.

Adicionou-se 0,1 mL da solução em diferentes concentrações a 3,9 mL da solução com o reagente DPPH (realizada com 2,4 mg do reagente DPPH em 100 mL de álcool metílico), em duplicata, para confecção de curva para realização dos cálculos. Utilizou-se álcool metílico para o branco. As leituras foram realizadas no comprimento de 515 nm em espectrofotômetro (Espectrofotômetro UV-VIS T80, PG Instruments, Reino Unido).

3.6.3. Umidade

Verificou-se o teor de umidade através da secagem do material em estufa a 105 °C, durante 24 h, em triplicata. Utilizou-se aproximadamente 0,5 g de material, que foram pesados em cápsulas de alumínio, para assim ser aferida a diferença de massa antes e depois do processo de secagem e calculado o teor de umidade das amostras.

3.6.4. Atividade de Água

Analisou-se a atividade de água em instrumento de medição de atividade de água (Novasina, modelo LabMaster-aw, Suíça), em duplicata. A quantidade foi a necessária para cobrir o fundo do suporte de leitura. As amostras foram dispostas no aparelho e permaneceram até que o equilíbrio termodinâmico fosse atingido.

3.6.5. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Realizou-se a análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC 6000, Perkin Elmer, Massachusetts, USA) com o objetivo de analisar as propriedades térmicas das partículas, nas seguintes condições: atmosfera de ar sintético a uma vazão de 19,8 L/min e rampa de aquecimento de 10 °C/min, de -20 °C a 300 °C.

4. Resultados e Discussões

4.1. Extração e Liofilização

A partir de uma massa de 582 g de semente de girassol, o processo de extração na máquina extratora forneceu 299 g de torta, ou seja, rendimento de aproximadamente 50 %, assim como já mencionado por Carrão-Panizzi e Mandarino (1994).

4.1.1 Microencapsulação

Utilizou-se uma massa total de torta de 90,1 g que originou três tipos de amostras: 6,0512 g de extrato puro; 6,5618 g de extrato encapsulado com maltodextrina e 6,888 g de extrato encapsulado com pectina.

4.2. Caracterização

4.2.1. Compostos Fenólicos Totais (CFT)

Os resultados da concentração de compostos fenólicos para as diferentes amostras encontram-se na Tabela 2, sendo expressos em grama de equivalente de ácido gálico (EAG) por 100 gramas de material liofilizado.

Tabela 2 - Valores de compostos fenólico totais.

Composto	CFT (g EAG/100 g)
Extrato puro	42,24 ± 0,01
Extrato + maltodextrina	23,96 ± 0,02
Extrato + pectina	29,11 ± 0,01

Conforme pode ser observado, os valores de compostos fenólicos totais encontrados foram elevados, uma vez que as amostras foram liofilizadas, o que reduziu drasticamente a quantidade de água residual da extração, tornando o

produto mais concentrado. De fato, para que a absorvância permanecesse dentro da curva de calibração, foi necessária uma grande diluição da amostra (1:75).

Conforme esperado, a amostra sem o material encapsulante apresentou valores maiores, visto que as amostras com material encapsulante possuem aproximadamente metade de sua massa como material de parede - maltodextrina e pectina - que não apresentam compostos fenólicos em sua estrutura.

Entretanto, segundo Morelli e Prado (2012), o método Folin-Ciocalteu pode sofrer interferências devido à reação com outras substâncias redutoras presentes, como as proteínas. Assim, é possível que estes valores elevados tenham sofrido influências de outros compostos, que não apenas os compostos fenólicos.

Uma análise por HPLC (High Performance Liquid Chromatography) seria de grande valia para comprovar esses valores, pois Matthäus (2002) encontrou valores bem inferiores ao extrair compostos fenólicos da torta desengordurada do girassol com diferentes solventes: entre 0,270 e 3,880 g EAG/100 g de amostra. Já Zardo (2018), utilizando o mesmo procedimento de extração deste trabalho, encontrou valores substancialmente menores: entre 0,675 a 1,350 g EAG/100 g de torta, para extração dos compostos fenólicos da torta de girassol com aplicação de ultrassom em diferentes temperaturas, concentração de etanol e tempo de exposição do ultrassom. Não foram encontrados resultados da composição de fenólicos em extratos liofilizados para comparação com os resultados do presente trabalho.

Contudo, considerando-se a ausência de interferências, que poderiam ser confirmadas ou não com análises mais precisas, pode-se concluir que a extração foi muito eficiente, trazendo vantagens para futuras aplicações que possam vir a ocorrer com o uso desses extratos de compostos fenólicos.

4.2.2. Atividade Antioxidante

A análise antioxidante é realizada a partir de uma reação de oxirredução, na qual o radical DPPH (2,2- difenil-1-picril-hidrazil), que apresenta coloração violeta, é reduzido para DPPH-H, que apresenta coloração amarela e é estável. Portanto, quanto maior o consumo de DPPH, menor será a absorvância e conseqüentemente maior será sua atividade antioxidante. Não é um método específico, podendo ser utilizado para vários tipos de amostra (PIRES *et al*, 2017).

O mecanismo baseia-se na transferência de um elétron, assim permite-se detectar a capacidade de um potencial antioxidante em transferir um elétron e reduzir quaisquer substâncias: metais, carbonilas ou radicais (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). Assim, os compostos fenólicos agem como doadores quando são adicionados à solução de DPPH.

Entretanto, os resultados obtidos neste trabalho para esta análise lidos no espectrofotômetro ficaram fora da curva padrão, abaixo dela. Obtiveram-se valores muito próximos com diferentes concentrações e, assim não foi possível analisar sua capacidade antioxidante.

A principal causa associada ao problema das leituras de absorvância pode estar relacionada com a pequena massa inicial da amostra, aproximadamente 1 g, o que se mostrou ser uma massa insuficiente para aferir a capacidade antioxidante da amostra. Além disso, como o material encontrava-se na forma de pó, foi necessário diluí-lo novamente em solvente para realizar as análises, o que pode ter influenciado nos resultados.

4.2.3. Umidade

Na tabela 3, estão expressos os teores encontrados de umidade.

Tabela 3 - Percentagem dos teores de umidade em base úmida do extrato puro e dos extratos microencapsulados.

Composto	Umidade (%)
Extrato puro	6,9 ± 0,4 ^a
Extrato + maltodextrina (1:1)	6,8 ± 0,2 ^a
Extrato + pectina (1:1)	7,4 ± 0,2 ^a

Tratando-se de material liofilizado, era esperada uma percentagem baixa de umidade, visto que a maior parte da água foi removida por sublimação.

A análise estatística foi determinada por ANOVA e teste de Tukey, que resultaram em $p > 0,05$, ou seja, não existe diferença significativa entre as amostras.

4.2.4. Atividade da Água

A atividade de água refere-se à disponibilidade de água para a atividade microbiana e enzimática e é ela que determinará a vida útil de um produto (FELLOWS, 2000). Na Tabela 4, estão expressos os valores resultantes da atividade de água.

Tabela 4 - Atividade de água dos produtos do processo.

Composto	Atividade de Água
Extrato puro	0,334 ± 0,009
Extrato + maltodextrina (1:1)	0,367 ± 0,004
Extrato + pectina (1:1)	0,399 ± 0,005

A Figura 11 apresenta gráficos clássicos das taxas de deterioração em função da atividade da água em alimentos, importantes para definir níveis seguros que garantem que não irá ocorrer oxidação, atividade enzimática ou crescimento microbiano.

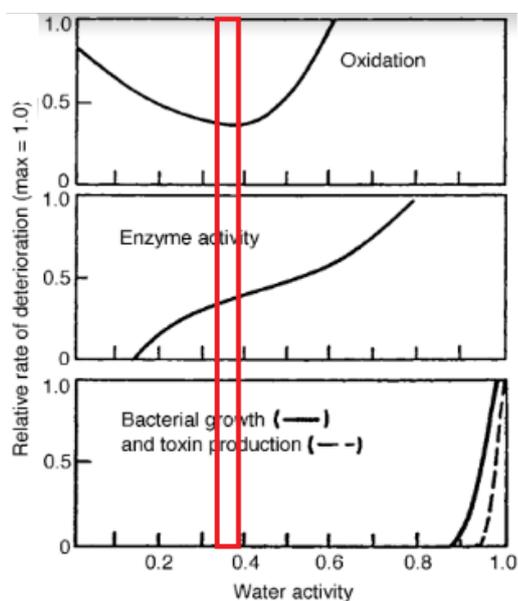


Figura 11 - Gráficos dos efeitos da atividade de água sobre os alimentos em relação a diferentes fatores.

Fonte: Adaptado de Fellows (2000).

A atividade de água das amostras ficou entre 0,334 e 0,399; essa faixa está indicada em vermelho nos gráficos para melhor visualização. Desta forma, as amostras apresentam um comportamento seguro no que diz respeito à oxidação, atividade enzimática e ao crescimento microbiano, sendo um fator de suma importância para futuras aplicações em alimentos.

Souza (2014), ao liofilizar antocianinas com diferentes materiais de parede e combinações entre eles, obteve valores de atividade de água menores, entre 0,053 e 0,162. Já Righetto (2003) encontrou valores entre 0,207 e 0,292 ao liofilizar suco de acerola verde com diferentes materiais de parede e combinações entre eles, valores também inferiores ao obtido no presente trabalho.

4.2.5. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A calorimetria diferencial de varredura tem por objetivo realizar a análise térmica do produto, podendo comprovar a efetividade da microencapsulação, visto que, com essa técnica, as transições térmicas devem sofrer alterações em relação ao extrato puro e seus materiais de parede. Nas Figuras 12, 13 e 15, estão representados os termogramas resultantes do DSC para o extrato puro, extrato com maltodextrina e extrato com pectina, respectivamente. Nas Figuras 14 e 16 estão representados os termogramas dos materiais de parede: maltodextrina e pectina.

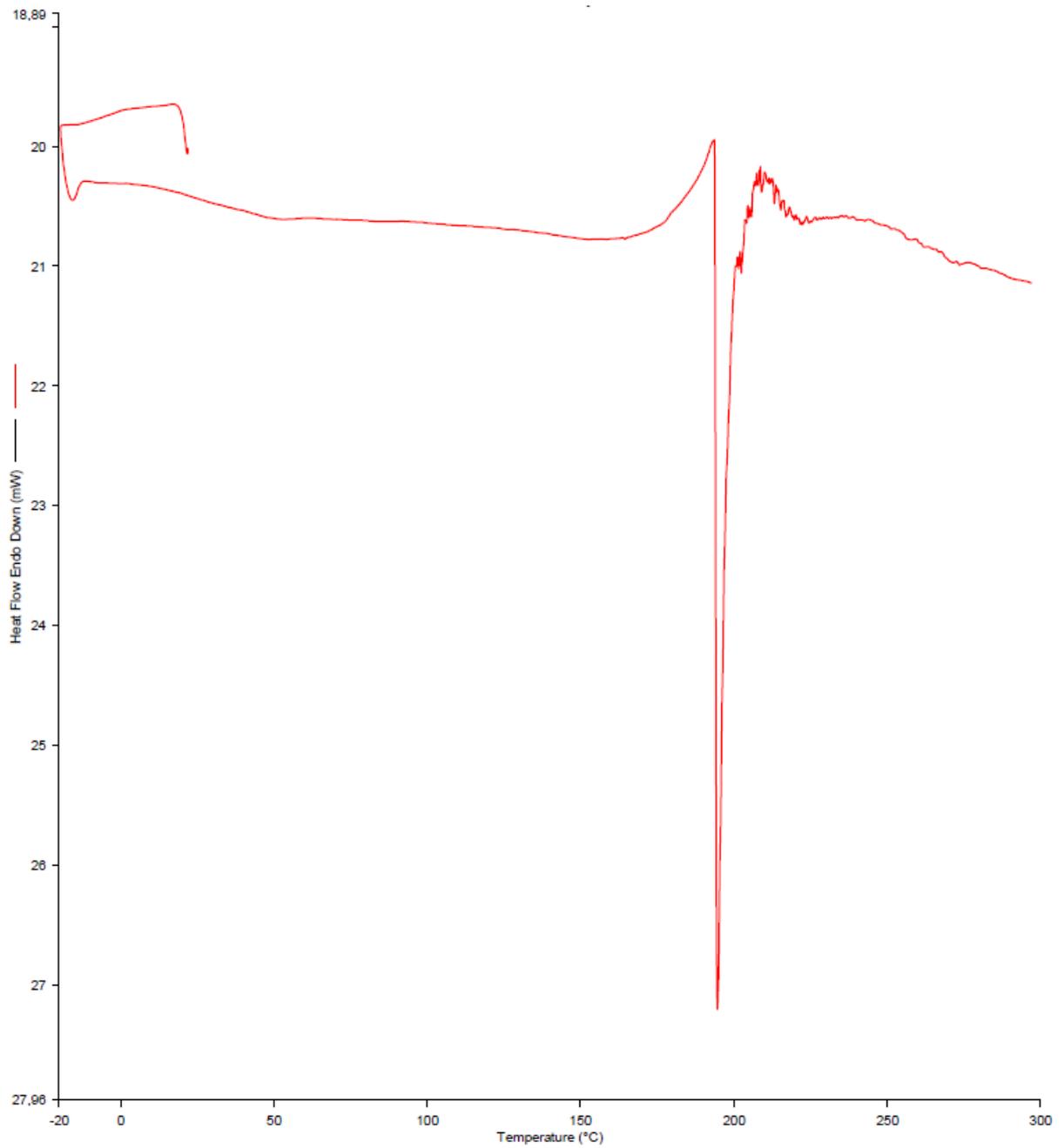


Figura 12 - Termograma de DSC do extrato liofilizado sem material encapsulante.

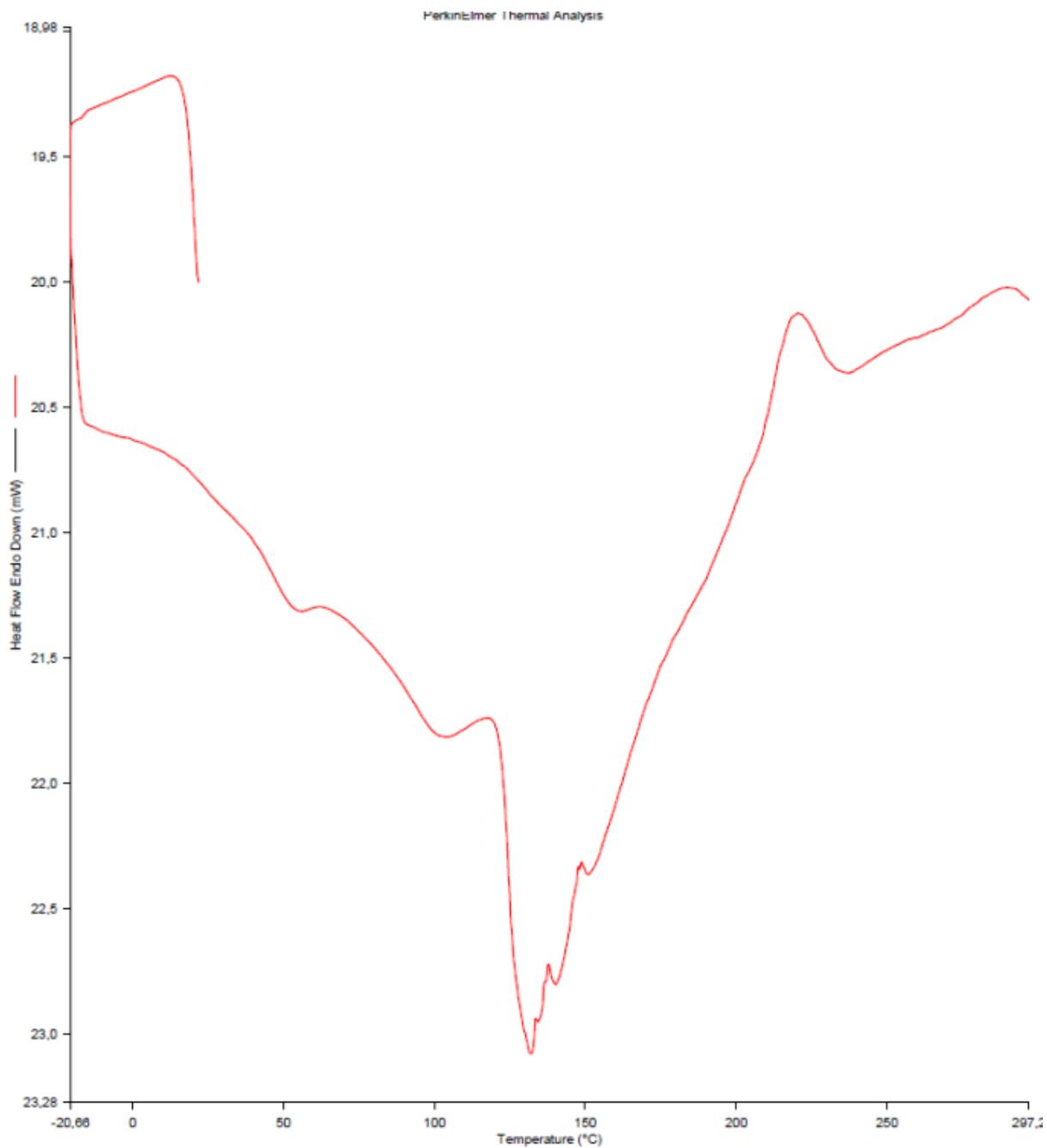


Figura 13 - Termograma de DSC do extrato liofilizado encapsulado com maltodextrina.

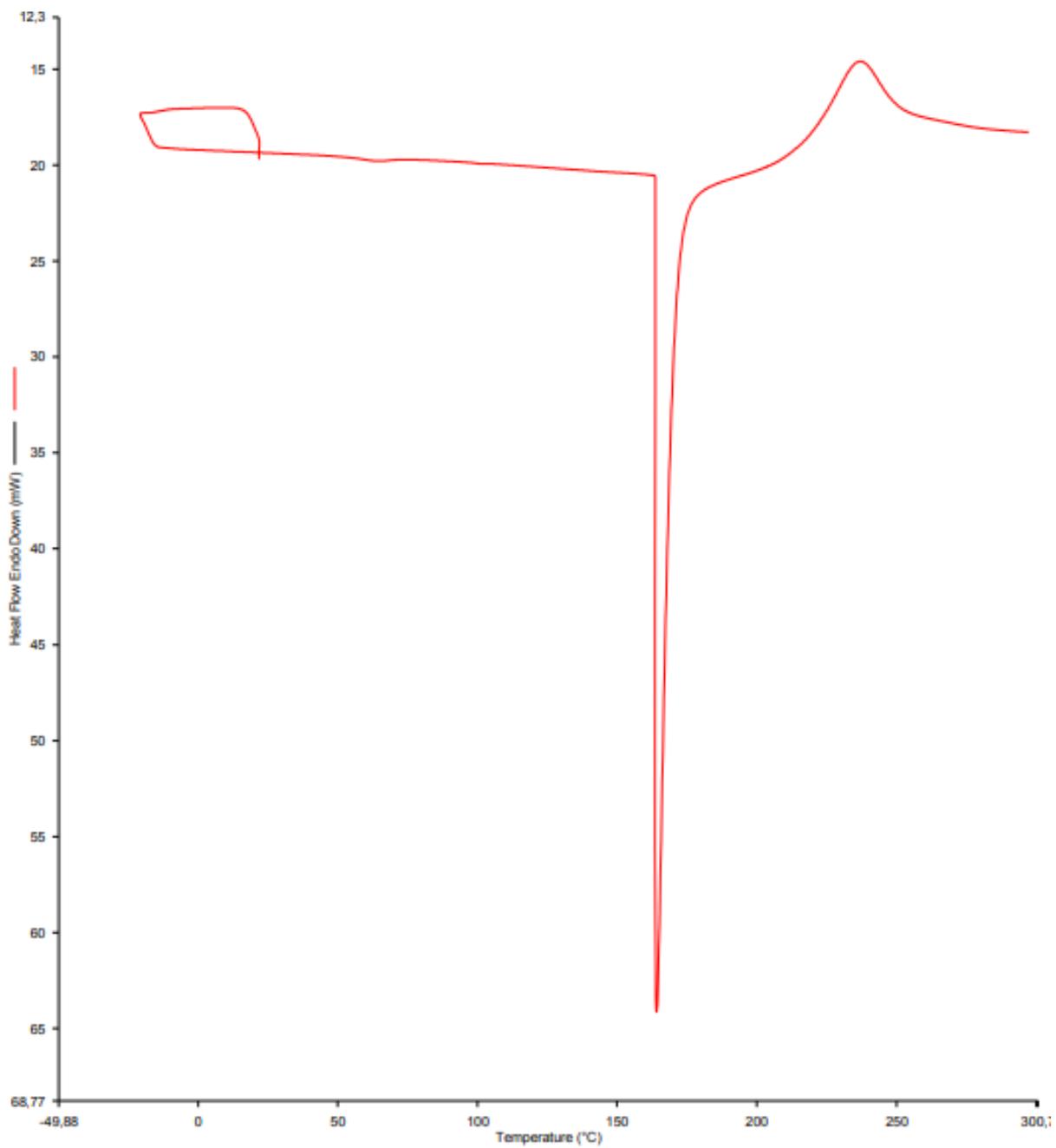


Figura 14 - Termograma de DSC da maltodextrina.

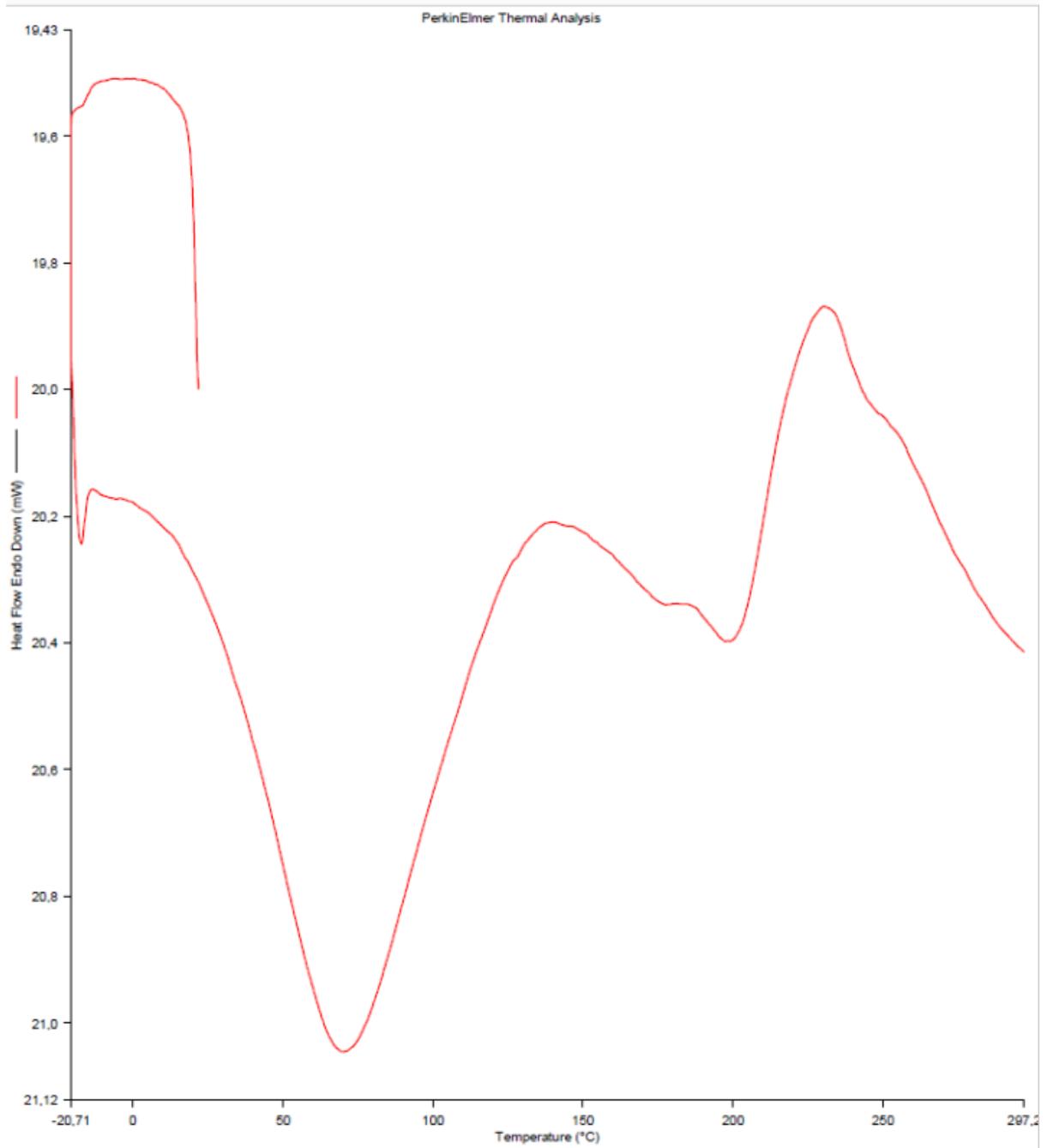


Figura 15 - Termograma de DSC do extrato liofilizado encapsulado com pectina.

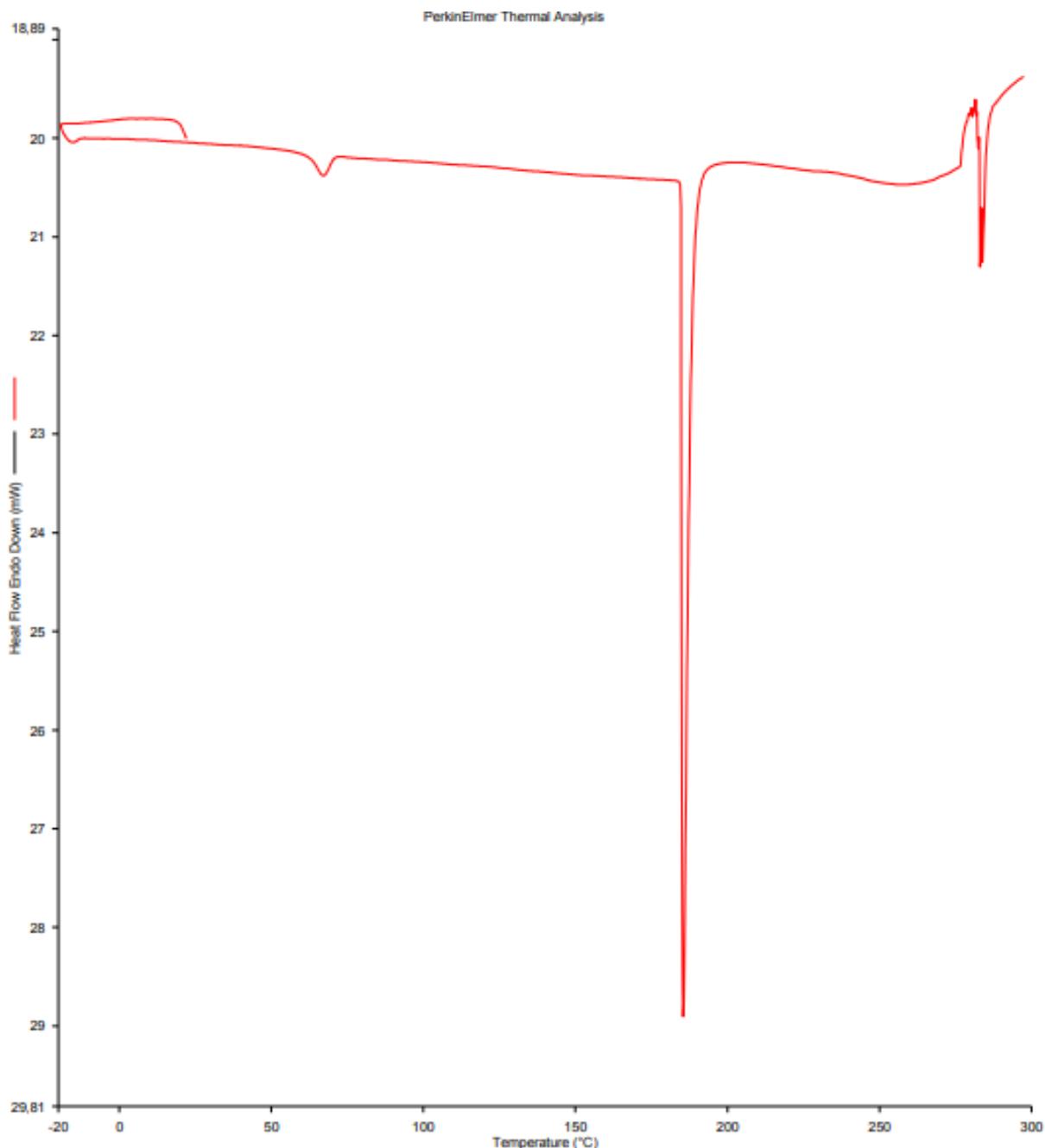


Figura 16 - Termograma de DSC da pectina.

Na Figura 12, que representa o extrato puro, é visível um pico endotérmico em 194°C, que representa o ponto de fusão do composto. Na Figura 13, que representa o extrato com maltodextrina, é possível visualizar um pico endotérmico suave até a temperatura de 140°C, que pode estar relacionado à evaporação de diferentes compostos do produto ao longo do aumento da temperatura, até sua total fusão. Análise de DSC individual da maltodextrina apresentou temperatura de fusão em 164°C (Figura 14); desta forma, percebe-se que ocorreram alterações em sua estrutura durante a liofilização, resultante da interação dos compostos fenólicos e da

maltodextrina, visto que esse ponto desapareceu e também o de 194°C, referente ao extrato sem material encapsulante.

Na Figura 15, que representa o material encapsulado com pectina, são bem visíveis dois picos endotérmicos nas temperaturas de 69°C e de 197°C. O primeiro pode estar relacionado à degradação dos compostos fenólicos, uma vez que a partir de 60°C esse fenômeno pode iniciar; é possível, também, que durante o aquecimento, além da água, outros compostos voláteis tenham sido evaporados. Análise de DSC individual da pectina (Figura 16) apresentou temperatura de fusão em 185°C, mostrando que também ocorreu interação dos compostos fenólicos e da pectina, visto que esse ponto desapareceu e também o de 194°C, referente ao extrato fenólico sem material encapsulante.

4.2.6. Microscopia Ótica

As amostras liofilizadas do extrato puro e com os dois materiais de parede foram analisadas utilizando microscópio ótico com aumento de 5x para analisar as alterações na estrutura dos pós. As Figuras 17, 18 e 19 mostram as micrografias para o extrato puro, com maltodextrina e com pectina, respectivamente.

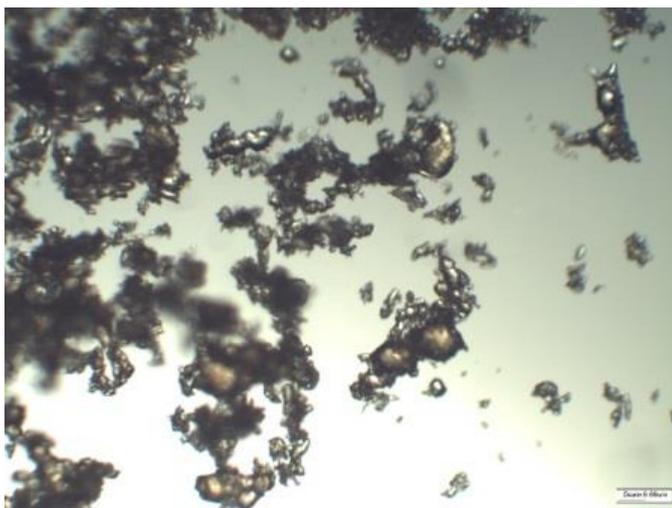


Figura 17 - Micrografia do extrato puro.

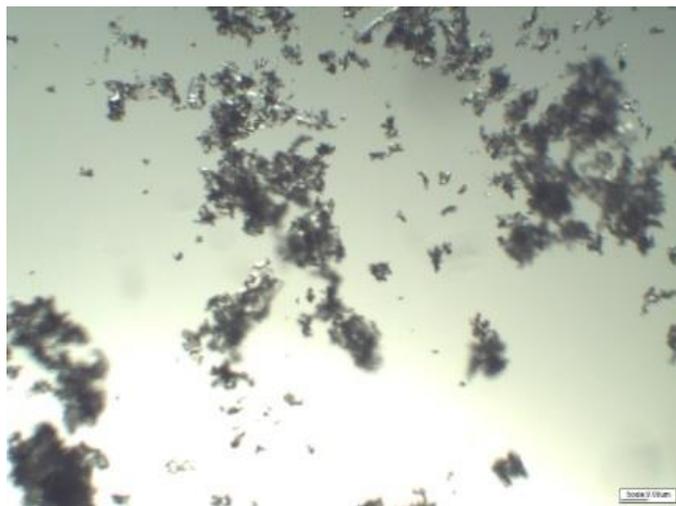


Figura 18 – Micrografia do extrato com maltodextrina.

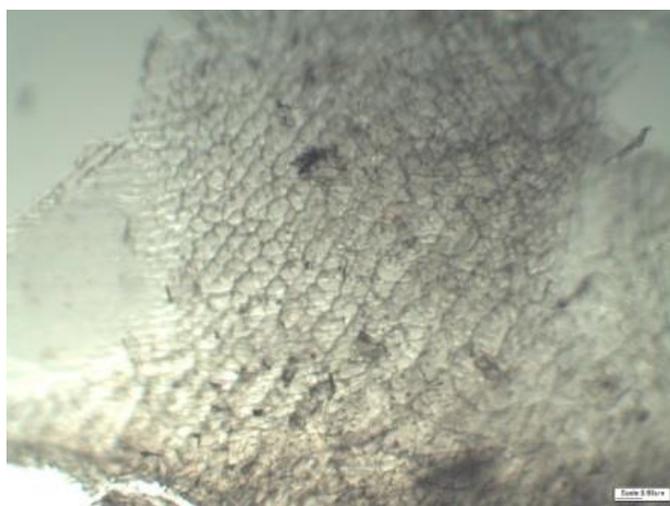


Figura 19 - Micrografia do extrato com pectina.

A partir das micrografias, é possível afirmar que houve uma alteração estrutural do material. Comparando-se o material não encapsulado com o encapsulado, percebe-se que a maltodextrina formou uma estrutura granulosa; já a pectina formou uma estrutura mais concisa, provavelmente em virtude da sua capacidade de formação de gel (GAVA; SILVA; FRIAS, 2008).

5. Conclusões e Trabalhos Futuros

A microencapsulação por liofilização dos compostos fenólicos da torta de girassol mostrou-se viável para obtenção de um produto em um estado físico adequado ao armazenamento e com alto teor de compostos fenólicos, atingindo-se o objetivo proposto.

Os materiais apresentaram valores de atividade de água em faixas que possuem baixa oxidação, baixa atividade microbiana e baixa atividade enzimática, fatores de suma importância para a aplicação em alimentos.

As percentagens de umidade em base úmida dos produtos também ficaram em uma faixa adequada onde é reduzida a proliferação de microorganismos, que porventura possam prejudicar a conservação dos alimentos.

A atividade antioxidante foi inconclusiva, pois os valores encontrados não estão dentro da faixa da curva de calibração, o que impossibilitou a análise, assim é necessário repetir a análise com uma maior massa de extrato, para assim verificar a capacidade antioxidante do pó.

A efetiva microencapsulação dos extratos pôde ser comprovada através da análise de DSC, que mostrou alterações nas temperaturas de transições térmicas, comprovando que ocorreram interações entre o extrato e o material de parede. As imagens em microscópio ótico, com aumento de 5x, também comprovaram alterações estruturais nas microcápsulas em relação ao produto sem material de parede.

Para dar continuidade a esse trabalho, pode-se sugerir:

- desengordurar a torta para aumentar a qualidade e quantidade da extração;
- analisar a solubilidade e estabilidade do material liofilizado;
- realizar análise dos compostos fenólicos por HPLC;
- realizar análises antioxidantes;
- testar outros materiais de parede;
- testar a aplicação do material liofilizado em alimentos, sugerindo-se analisar o crescimento de fungos em diferentes matrizes alimentícias.

6. Referências

ANGELO, P. M.; JORGE, J. *Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão*. Revista Instituto Adolfo Lutz, v. 66, 2007.

AZEREDO, H. M. C. *Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos*. Alimentos e Nutrição, v. 16, n. 1, p. 89-97, 2005.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. *Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses*. Food Chemistry, v.99, n. 1, p. 191-203, 2006.

BOSS, E. A. *Modelagem e Otimização do Processo de Liofilização: Aplicação para Leite Desnatado e Café Solúvel*. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; MANDARINO, J. M. G. *Girassol: derivados proteicos*. Embrapa – CNPSo, 1994.

COWAN, M. M. *Plant Products as Antimicrobial Agents*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. *Antimicrobial activity of flavonoids*. *International journal of antimicrobial agents*, v. 26, n. 5, p. 343-356, 2005.

DE CASTRO, C. et al. *A cultura do girassol*. Embrapa-CNPSo, 1996.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. *Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios*. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 11, n. 2, p.103-112, 2008.

FELLOWS, P. *Food Processing Technology: Principles and Practice*. 2 ed. Inglaterra: Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, 2000.

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS J. R. G. *Tecnologia em Alimentos: Princípios e Aplicações*. São Paulo: Nobel, 2008.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, USA, 2007.

HARBORNE, J.B. *Introduction to Ecological Biochemistry*. Academic Press, 2ed, New York, NY, 1982.

JAYARAMAN, K. S.; GUPTA, D. K. *Drying of Fruits and Vegetable*. In: MUJUMDAR, A. S. Handbook of Industrial Drying. Nova York: Marcel Dekker, p. 643-665, 1995.

KAHL, R.; KAPPUS, H. *Toxicology of the synthetic antioxidants BHA and BHT in comparison with the natural antioxidant vitamin E*. Zeitschrift fur Lebensmittel untersuchung undforschung, v. 196, n. 4, p. 329-338, 1993.

LANGRISH, T.; CHAN, W. C.; KOTA, K. *Comparison of maltodextrin and skim milk wall deposition rates in a pilot-scale spray dryer*. Powder Technology, Surrey, v. 179, n. 1-2, p. 84-89, 2007.

LÓPEZ-MENESES, A. K.; PLASCENCIA-JATOMEA, M.; LIZARDI-MENDOZA, J.; ROSAS-BURGOS, E. C.; LUQUE-ALCARAZ, A. G.; CORTEZ-ROCHA, M. O. *Antifungal and antimycotoxigenic activity of essential oils from Eucalyptus globulus, Thymus capitatus and Schinus molle*. Food Sci. Technol. V.35, n.4, Campinas, Out/Dez, 2015.

MATTHÄUS, B. *Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 50, n. 12, p. 3444-3452, 2002.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Conab - Campanha Nacional de Abastecimento. *Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos*. Brasília, 2019.

MONTEIRO, M. C.; TRUGO, L. C. *Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado*. Química Nova, v.28 n.4, São Paulo, jul/ago 2005.

MORELLI, L. L. L.; PRADO, M. A. *Extraction optimization for antioxidant phenolic compounds in red grape jam using ultrasound with a response surface methodology*. Ultrasonics sonochemistry, v. 19, n. 6, p. 1144-1149, 2012.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. *Extraction and analysis of phenolics in food*. Journal of Chromatography A, v.1054, p. 95-111, 2004.

OLIVEIRA, M. S.; DORS, G. C.; SOUZA-SOARES, L. A.; BADIALE-FURLONG, E. *Atividade antioxidante e antifúngica de extratos vegetais*. Alim. Nutr., Araraquara, v.18, n. 2, p. 267-275, 2007.

PEDROSA, M. M. *et al.* *Determination of caffeic and chlorogenic acids and their derivatives in different sunflower seeds*. Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 80, n. 4, p. 459-464, 2000.

PIMENTEL, C. V. M. B.; FRANCKI, V. M.; GOLLÜCKE, A. P. B. *Alimentos funcionais: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos*. São Paulo: Varela, 2005.

PIRES, J.; TORRES, P. B.; SANTOS, D. Y. A. C. dos; CHOW, F. *Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas*. Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, 2017.

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

Revista em Dia. *Semente de girassol é aliada da saúde cardiovascular*.

Jun 2012. Disponível em <<http://www.revistaemdia.com.br/net/semente-de-girassol-e-aliada-da-saude-cardiovascular/>>. Acesso em julho de 2019.

RIGHETTO, A. M. *Caracterização Físico-Química e Estabilidade de Suco de Acerola Verde Microencapsulado por Atomização e Liofilização*. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

RUFINO, M. do S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. de; MORAIS, S. M. de; SAMPAIO, C. de G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. *Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH*. Embrapa, 2007.

RUTZ, J. K. *Caracterização e Microencapsulação de Suco de Pitanga Roxa (Eugenia uniflora L.)*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2013.

SANSONE, F.; MENCHERINI, T.; PICERNO, P.; D'AMORE, M.; AQUINO, R. P.; LAURO, M. R. *Maltodextrin/pectin microparticles by spray drying as carrier for nutraceutical extracts*. Journal of Food Engineering, v.105, p.468-476, 2011.

SAUCEDA, E. N. R. *Uso de Agentes Antimicrobianos naturais na conservação de frutas e hortaliças*. México, Sinaloa. Ra Ximhai, janeiro-abril, v. 7, n. 1. p. 153-170, 2011.

SCHAUS, R. *Por que o girassol “acompanha” o Sol?* Super Interessante. Editora Abril. Jul 2015. Disponível em <<https://super.abril.com.br/mundo-estranho/por-que-o-girassol-acompanha-o-sol/>>. Acesso em julho de 2019.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. *Phenolics in Food and Nutraceuticals: Sources, Applications and Health*. Effects CRC Press, Boca Raton, FL, 2004.

SINGH, J.; BARGALE, P. C. *Development of a small capacity double stage compression screw press for oil expression*. Journal of Food Engineering, v. 43, n. 2, p. 75-82, 2000.

SOUZA, A. C. P. *Caracterização e estabilidade de micropartículas de antocianinas extraídas do bagaço da produção do suco de jabuticaba*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

WATERHOUSE, A. L. *Determination of total phenolics*. Nova York. 2001

Wikipédia. *Ponto crítico (termodinâmica)*. Disponível em [<https://pt.wikipedia.org/wiki/Ponto_cr%C3%ADtico_\(termodin%C3%A2mica\)>](https://pt.wikipedia.org/wiki/Ponto_cr%C3%ADtico_(termodin%C3%A2mica)>)
Acessado em julho de 2019.

ZARDO, I. *Extração de compostos fenólicos das tortas de canola e girassol e avaliação da aplicação in vitro do extrato obtido*. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.