

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
NÍVEL MESTRADO ACADÊMICO

AMARILIS SANTOS DE CARVALHO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATO DE FOLHA DE
OLIVEIRA NANOENCAPSULADO FRENTE A OXIDAÇÃO LIPÍDICA DE ÓLEO
COMESTÍVEL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CAMPO MOURÃO
2022

AMARILIS SANTOS DE CARVALHO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATO DE FOLHA DE OLIVEIRA NANOENCAPSULADO FRENTE A OXIDAÇÃO LIPÍDICA DE ÓLEO COMESTÍVEL

Evaluation of the Antioxidant Potential of Nanoencapsulated Olive Leaf Extract against the Lipid Oxidation of Edible Oil

Dissertação, apresentada ao programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Fernanda Vitória Leimann

Coorientador: Prof. Dr. Lucio Cardozo Filho

CAMPO MOURÃO
2022



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite que outros remixem, adaptem e criem a partir do seu trabalho para fins não comerciais, desde que atribuam o devido crédito e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



**Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Medianeira**



AMARILIS SANTOS DE CARVALHO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATO DE FOLHA DE OLIVEIRA
NANOENCAPSULADO FRENTE A OXIDAÇÃO LIPÍDICA DE ÓLEO COMESTÍVEL**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestra Em Tecnologia De Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Tecnologia De Alimentos.

Data de aprovação: 03 de Maio de 2022

Fernanda Vitoria Leimann, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dr. Marcos Rogerio Mafra, Doutorado - Universidade Federal do Paraná (Ufpr)

Dr. Tamara Agner, Doutorado - Universidade Federal de Santa Catarina (Ufsc)

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 03/05/2022.

Dedico este trabalho a minha querida avó Enaura (*in memorian*), saiba que a Sra. sempre foi, e ainda é, fonte de fortaleza para mim!

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer em primeiro lugar a Deus por me permitir chegar até aqui, acredito que nenhuma folha é capaz de cair do galho de uma árvore sem que haja a permissão do Senhor, se hoje eu tenho a oportunidade de defender esta dissertação, tenho certeza de que foi Ele quem me permitiu, e à Nossa Senhora, pelas tantas vezes que ouviu meus desabafos!

Agradeço à minha família que embora distante, sempre se fez presente e permaneceu ao meu lado, me dando incentivo, força e ânimo de seguir em frente, tanto na área acadêmica quanto em meus anseios pessoais. Se não fosse o apoio e o amor de minha família, com toda a certeza não teria chegado tão longe. Aos meus pais, Marcos e Nilma e ao meu irmão Rafael, o meu muito obrigada! E mãe, obrigada por sempre, me ensinar lições de vida, destaco aqui uma delas “O conhecimento liberta”.

Agradeço aos meus mentores neste Programa de Pós-Graduação, especialmente à minha orientadora Prof^a. Dr^a. Fernanda Vitória Leimann, a quem considero fonte de inspiração e admiração! Prof^a., eu agradeço de coração por todo o tempo e disposição ao qual se empenhou em compartilhar tanto conhecimento, e também pelos cafés e risadas compartilhados, além de orientadora, eu tive uma incentivadora e uma amiga, obrigada por tanto!!! Também deixo o meu muito obrigada ao meu coorientador, Prof. Dr. Lúcio Cardozo Filho, quem sempre confiou no meu trabalho e dedicação, e me referiu importantes sugestões na realização deste trabalho. Agradeço ao Prof. Dr. Odinei Hess Gonçalves, especialmente pela mentoria no manuseio dos equipamentos do FTIR e DSC durante o programa, ao prof. Dr. Evandro Bona, quem sempre esteve disponível para dar um “help” aqui ou ali, sua disponibilidade é muito relevante, à prof^a. Dr^a. Patrícia Valderrama, também por todos ensinamentos que compartilhou comigo e por sua disponibilidade em ajudar! Enfim, a todos os professores que fazem parte do PPGTA e também aqueles que fizeram parte do corpo docente da minha graduação nesta instituição a qual eu tenho tanto carinho, afinal...o bom filho a casa torna.

Não poderia deixar de agradecer às amigas que ganhei durante o percurso no PPGTA, Luana Dallagrana, Patrícia Casarin, Gabrielle Donatto, Luis Gustavo Médice, Thaysa Moya e Anielle Oliveira, vocês foram muito importantes, seja para um bate papo na

salinha do café ou de estudos, ou no auxílio para com as atividades do laboratório, aprendi muito com cada uma de vocês!!!

Agradeço também ao meu noivo André, quem me dá o apoio moral que todo o estudante precisa quando o mundo acadêmico parece não fazer tanto sentido. André, apesar de sermos de mundos tão diferentes você me dá o ânimo para seguir em frente, obrigada por ser este incentivador!

Agradeço aos órgãos de fomento, sem os quais não seria possível que tantos acadêmicos permanecessem vinculados aos programas de pós-graduação, a Fundação Araucária Edital 15/2019 - PROPPG - Bolsa-Técnico Fundação Araucária, direcionado a Central Analítica Multi-Isuários (CAMULT-CM), no qual foram realizadas as análises deste trabalho.

Pesquisar é duvidar. É estar em constante questionamento com os resultados obtidos, é não se contentar com um “sim” ou um “não”, mas sim entender os “porquês” e os “comos”.
(autora)

RESUMO

As folhas de oliveiras (FO) são matéria-prima barata (bio-resíduo da produção de azeite e azeitonas), e fonte de compostos antioxidantes. Estes compostos podem perder atividade quando em contato com luz, calor e oxigênio e visando prolongar seu efeito, recorreu-se à nanoencapsulação por nanoprecipitação. A extração e nanoencapsulação do OLE foram realizadas concomitantemente, otimizando o tempo e reduzindo a quantidade de solvente. As FO e a zeína foram misturadas com o solvente (etanol:água, 80:20) sob agitação em sistema rotor-estator para garantir a extração dos compostos e a interação da zeína (agente encapsulante) com os mesmos. Após a centrifugação da mistura, foi realizada a nanoprecipitação pelo gotejamento desta em solução aquosa de caseinato de sódio (surfactante) a 12.000 rpm e finalmente as nanopartículas (NPs) foram secas em estufa. O OLE foi obtido na mesma proporção FO/etanol/água da encapsulação, mesma agitação, centrifugação e secagem em mesmas condições. Foram realizadas caracterizações das NPs e OLE por FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*), DSC (*Differential Scanning Calorimetry*) e TGA (*Thermogravimetric Analysis*). As NPs também foram analisadas por MET (Microscopia Eletrônica de Transmissão) e DLS (*Dynamic Light Scattering*). Com a caracterização térmica foi possível verificar uma massa residual maior das nanopartículas ao final da análise quando comparado ao extrato puro, indicando maior resistência térmica das mesmas. Verificou-se por FTIR, a redução de intensidade das bandas características dos grupamentos OH, CH e NH, indicando a interação entre os componentes e encapsulação efetiva, além de reticulação da zeína por ligações de hidrogênio com os compostos fenólicos. O DLS indicou índice de polidispersão (PDI) de $0,9 \pm 0,1$ e um diâmetro médio Dz igual a $638,5 \pm 55,8$ e a MET confirmou a morfologia em formato esférico e dimensão nanométrica (100 a 500 nm), contudo, aglomerados foram detectados. O OLE e as NPs foram aplicados em óleos comestíveis nas concentrações de 47,1, 94,2 e 141,3 mg_{OLE}/kg_{óleo}. Adicionou-se para fins de comparação o antioxidante sintético BHT (hidroxitolueno butilado) a 300 mg_{BHT}/kg_{óleo}, e como controle os óleos sem antioxidantes. Os óleos foram analisados por Rancimat, sendo o BHT o melhor antioxidante para o óleo de soja, o OLE não encapsulado a 141,3 mg_{OLE}/kg_{óleo} para o de palma, sendo estatisticamente semelhante ao contendo BHT. Para o óleo de palmiste as amostras adicionadas de 94,2 mg_{OLE}/kg_{óleo} de OLE não encapsulado e de 141,3 mg_{OLE}/kg_{óleo} de NPs apresentaram-se semelhantes à adicionada de BHT. As análises de ABTS, DPPH e FRAP, confirmaram a capacidade antioxidante das NPs. Por fim, o ensaio *Schaal Oven Test* foi realizado com a aplicação das nanopartículas no óleo de palmiste. Os espectros de UV-Vis foram analisados então pelo método quimiométrico PARAFAC em que se determinou a maior estabilidade do óleo adicionado de 300 mg_{BHT}/kg_{óleo} e 141,3 mg_{OLE}/kg_{óleo} de NPs (300 mg_{NPs}/kg_{óleo}). Conclui-se que as NPs podem ser produzidas utilizando solventes verdes e polímeros comestíveis pelo processo integrado de extração/encapsulação, garantindo capacidade antioxidante as mesmas com grande potencial a ser explorado quando comparado à capacidade antioxidante oferecida pelo BHT.

Palavras-chave: folha de oliveira; oxidação lipídica; nanoprecipitação; óleos comestíveis; compostos fenólicos; Rancimat.

ABSTRACT

Olive leaves (FO) are a bio-residue from the production of olive oil and olives and a source of antioxidant compounds, that can lose their activity. Aiming to prolong their effect the olive leaf extract (OLE) was submitted to nanoencapsulation by nanoprecipitation. The extraction and OLE nanoencapsulation were performed concomitantly, optimizing the time and solvent amount. FO and zein were mixed with the solvent (ethanol: water, 80:20) under stirring in a rotor-stator system to guarantee the compound's extraction and zein (encapsulating agent) interaction with them. After the mixture centrifugation, nanoprecipitation was performed by dripping this solution into an aqueous sodium caseinate (surfactant) solution at 12,000 rpm, and finally, nanoparticles (NPs) were dried in an oven. OLE was obtained under the same proportion of FO/ethanol/water used for encapsulation, same stirring rate, centrifugation, and drying conditions. The OLE and NPs were characterized by FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy), DSC (Differential Scanning Calorimetry), and TGA (Thermogravimetric Analysis). The NPs were also analyzed by TEM (Transmission Electron Microscopy) and DLS (Dynamic Light Scattering). With thermal characterization, it was possible to verify a higher residual mass for NPs at the end of the analysis when compared to OLE, indicating higher thermal resistance. By FTIR, it was verified an intensity reduction of the characteristic bands of OH, CN, and NH groupings, indicating an interaction between components and effective encapsulation, in addition to zein crosslinking by hydrogen bonding with the phenolic compounds. The DLS indicated a polydispersion index (PDI) equal to $0,9 \pm 0,1$ and the average diameter D_z equal to $638,5 \pm 55,8$ nm, and TEM images confirmed the morphology of spherical format and the nanometric dimensions (100 to 500 nm), however with particle agglomerates. OLE and NPs were applied to edible oils at the concentrations of 47.1, 94.2 e 141.3 mg_{OLE}/kg_{oil}. To allow a comparison BHT (butylated hydroxytoluene) was added at 300 mg_{BHT}/kg_{oil}, and as a control the oils without antioxidants. The oils were analyzed by Rancimat, being BHT the best antioxidant for soya oil, free OLE at 141.3 mg_{OLE}/kg_{oil} for palm oil, being statistically equal to BHT. To palm kernel oil the samples that were added with 94.2 mg_{OLE}/kg_{oil} of free OLE and 141.3 mg_{OLE}/kg_{oil} of NPs presented a similar stability to the BHT added sample. The ABTS, DPPH, and FRAP analyses confirmed the antioxidant capacity of NPs. Finally, the Schaal Oven Test was performed with the NPs in the palm kernel oil. The UV-Vis spectra were then analyzed by the PARAFAC chemometric method, where it was determined higher stability of the oil added with 300 mg_{BHT}/kg_{oil} and 141.3 mg_{OLE}/kg_{oil} of NPs (300 mg_{NPs}/kg_{oil}). It can be concluded that the NPs can be produced using green solvents and edible polymers by the integrated process of extraction/encapsulation, guaranteeing the antioxidant capacity with great potential to be explored compared to the antioxidant capacity offered by BHT.

Keywords: nanoprecipitation; soya oil; palm oil; palm kernel oil; phenolic compounds; Rancimat.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Região Mediterrânea	18
Figura 2 - Regiões de maior cultivo de oliveiras no Mediterrâneo	19
Figura 3 - Árvore de oliveira (<i>Olea europaea</i> L.)	21
Figura 4 - Folhas de <i>Olea europaea</i> L. fotografadas de diferentes ângulos	21
Figura 5 - Estrutura química da oleoropeína, tirosol e hidroxitirosol	24
Figura 6 - Número de artigos científicos publicados por ano, associados à busca no SCOPUS com as palavras-chave Olive AND Leaves AND Extraction.....	25
Figura 7 - Esquema representativo do método de nanoprecipitação	35
Figura 8 - Representação esquemática do procedimento adotado para a produção de nanopartículas de zeína carregadas com extrato de hibisco.....	36
Figura 9 - Mecanismo de ação do hidroxitolueno butilado (BHT) interrompendo a reação em cadeia ocorrida durante a peroxidação lipídica. Onde: ROO- = Radical livre genérico; ROOH = Radical livre genérico protonado impedido de sofrer reações de peroxidação em cadeia	37
Figura 10 - Reação entre o radical DPPH e o antioxidante BHT	38
Figura 11 - Reação entre os antioxidantes e o radical ABTS	39
Figura 12 - Reação da redução de Fe³⁺ a Fe²⁺ ocorre na presença de 2,4,6-tripridil-s-triazina.....	39
Figura 13 - Mecanismos de iniciação e propagação da oxidação lipídica, formando hidroperóxidos lipídicos	40
Figura 14- Esquema representativo do procedimento utilizado para: (A) a extração/encapsulação do OLE por nanoprecipitação em único passo; (B) Obtenção do OLE não encapsulado	45
Figura 15 - A) Folhas de oliveira utilizadas neste trabalho, variedades I) Arbequina, II) Arbosana e III) Koroneik. B) Extrato das folhas de oliveira (OLE) após etapa de secagem e C) NPs de zeína contendo OLE após etapa da secagem.....	46
Figura 16 - A) Extrato após etapa de centrifugação B) extrato após a secagem (OLE), C) mistura final após a etapa da nanoprecipitação, D) nanopartículas obtidas após secagem do nanoprecipitado.....	52
Figura 17- FTIR dos componentes das NPS, das NPS de uma mistura física dos componentes das NPS na mesma proporção.....	54
Figura 18- Curvas de DSC das amostras OLE, NPS contendo OLE, zeína, caseinato de sódio (NaCas) e mistura física (MF) dos três componentes (OLE, zeína e NaCas). 56	
Figura 19 – A) Curvas de perda de massa obtidas por TGA das amostras de OLE, NPS contendo OLE, zeína, caseinato de sódio (NaCas) e mistura física (MF) dos três componentes (OLE, zeína e NaCas). B) DTGA da zeína, C) DTGA do OLE, D) DTGA do caseinato de sódio, E) DTGA da mistura física dos componentes das NPs, na mesma proporção e que se encontram nas NPs e F) DTGA das nanopartículas contendo extrato de folha de oliveira.....	58

Figura 20 - Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) das nanopartículas de zeína produzidas por nanoprecipitação contendo o OLE	60
Figura 21- Tempo de indução determinado para os óleos de soja, palma e palmiste incorporados com BHT, OLE e nanopartículas contendo OLE em diferentes concentrações. Concentrações de OLE são equivalentes à proporção de OLE nas nanopartículas aplicadas.....	64
Figura 22 - Organização dos dados para aplicação da PARAFAC. (A) óleo sem antioxidante; (B) óleo com nanopartículas 150 mg/kg óleo; (C) óleo com nanopartículas 300 mg/kg óleo; (D) óleo com BHT 300 mg/kg óleo	67
Figura 23 - Resultados da PARAFAC (a) scores no fator 1 ‘•’; (b) loadings relativo aos dias de análise no fator 1 ‘—’; (c) loadings do modo espectral no fator 1 ‘—’. (d) scores no fator 2 ‘♦’; (e) loadings relativo aos dias de análise no fator 2 ‘---’; (f) loadings do modo espectral no fator 2 ‘---’. (g) scores no fator 3 ‘*’; (h) loadings relativo aos dias de análise no fator 2 ‘...’; (i) loadings do modo espectral no fator 3 ‘...’	69
Figura 24 - Espectro do BHT em isoctano na concentração de 0,001 mg/mL	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diferentes espécies que são exploradas para extração de biocomponentes e solventes utilizados.	23
Tabela 2 - Estudos de extração de bioativos das folhas de oliveira publicados a partir de 2016	26
Tabela 3 - - Métodos de micro e nanoencapsulação, materiais de parede, compostos ativos encapsulados e tamanho de partícula aproximado determinado pelos autores ..	32
Tabela 4 - Codificação das amostras de óleos comestíveis controle, contendo OLE, nanopartículas contendo OLE e BHT para avaliação da estabilidade oxidativa	50
Tabela 5 - Capacidade antioxidante das amostras por DPPH e ABTS expressos em termos de IC50 e FRAP em μmol equivalente em trolox (ET) por grama de amostra	61

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABTS	Radical 2,2'- azino – bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
BHT	Hidroxitolueno Butilado
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> – Espalhamento Dinâmico de Luz
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DSC	<i>Diferencial Scanning Calorimetry</i> – Calorimetria Diferencial de Varredura
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> - Poder Antioxidante de Redução do Ferro
FTIR	<i>Fourier-Transform Infrared Spectroscopy</i> – Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MF	Mistura Física dos componentes das nanopartículas (sem nanoencapsulação)
NaCas	Caseinato de sódio
NPs	Nanopartículas
OLE	Extrato de folha de oliveira
PKO	Óleo de palmiste
PLM	Óleo de palma
SOY	Óleo de soja
TGA	<i>Termogravimetric Analysis</i> – Análise termogravimétrica
TPTZ	2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina
TROLOX	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
UV-Vis	Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1 <i>Olea europaea</i> L.	18
3.2 Extrato de folha de oliveira.....	21
3.3 Nanoencapsulação de compostos bioativos por nanopreipitação.....	31
3.4 Extração/encapsulação simultâneas.....	36
3.5 Métodos de avaliação de atividade antioxidante.....	37
3.6 Prevenção da oxidação lipídica em óleos comestíveis.....	40
3.7 Atividade antioxidante de compostos encapsulados.....	42
4 MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1 Materiais.....	44
4.2 Extração/nanoencapsulação em único passo do OLE.....	44
4.3 Caracterização do OLE e nanopartículas contendo OLE.....	47
4.4 Capacidade antioxidante do OLE e nanopartículas contendo OLE.....	48
4.5 Aplicação do OLE e nanopartículas contendo OLE como antioxidantes em óleos comestíveis.....	49
4.6 Avaliação da estabilidade oxidativa dos óleos comestíveis contendo OLE ou OLE nanoencapsulado.....	50
4.7 Análise quimiométrica dos dados de estabilidade acelerada de Schaal.....	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1 Rendimentos de extração e do processo integrado de extração/encapsulação.....	52
5.2 Caracterização das nanopartículas.....	53
5.2.1 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier.....	53
5.2.2 Caracterização térmica	55
5.2.3 Caracterização morfológica e de tamanho de partícula.....	59
5.3 Capacidade antioxidante do OLE e nanopartículas contendo OLE.....	60
5.4 Aplicação das nanopartículas em óleos comestíveis.....	63
5.5 Estabilidade oxidativa de Schaal e PARAFAC.....	66
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	72
7 CONCLUSÕES.....	71
REFERÊNCIAS	74

1 INTRODUÇÃO

Existem diversas maneiras de processar alimentos e prepara-los para o consumo, e mesmo que muitos alimentos sejam ingeridos crus ou “*in natura*”, outros precisam ser cozidos para uma melhor disponibilização de nutrientes ou obtenção de diversos sabores, aromas e texturas que este processo pode proporcionar. O processo de cocção pode ocorrer por diversas técnicas, uma delas é por imersão em água ou em óleo em elevada temperatura. A imersão do alimento em óleo quente é popularmente conhecida como “fritura” e pode ser feita em diversos óleos comestíveis, como é o caso dos óleos de soja, de palma e de palmiste. Os óleos em decorrência da temperatura, da luminosidade e do contato com oxigênio, desencadeiam uma série de processos de peroxidação e oxidação lipídica, levando a formação de radicais livres. Esses produtos da oxidação lipídica são responsáveis por diminuir o tempo de prateleira dos óleos e o tempo que podem ser utilizados para preparação de frituras também (KO; NILE, 2021; LI *et al.*, 2022; MIRANDA *et al.*, 2010; XIAO *et al.*, 2022).

Para driblar a oxidação lipídica, a indústria de alimentos utiliza diversos antioxidantes sintéticos que são capazes de retardar os processos de oxidação através da doação de um próton de hidrogênio ao radical livre (WALSTRA, P; VAN VLIET, 2010). Entretanto, nas últimas décadas, a população tem tido um maior interesse por produtos “naturais”, o que abriu na indústria um leque de oportunidades na exploração de compostos bioativos naturais em substituição a compostos sintéticos. Sendo assim a substituição de antioxidantes sintéticos por antioxidantes naturais vem sendo explorada pela indústria a fim de criar um atrativo diferencial ao mercado consumidor (LIANG *et al.*, 2021; M. RANGARAJ *et al.*, 2021).

Existem diversos compostos naturais que apresentam capacidade antioxidante, estes são retirados das mais diversas fontes: folhas, flores, frutas, sementes, raízes, fungos e até mesmo bactérias. Dependendo de sua natureza podem apresentar comportamento hidrofílico ou hidrofóbico. Este trabalho se ateve aos componentes antioxidantes extraídos das folhas de oliveira, que além de serem mundialmente conhecidas, são consideradas bio-resíduos da produção de azeite e azeitonas de mesa (CHANDRA; SHARMA; ARORA, 2020a, 2020b; DE FREITAS *et al.*, 2018a; LFITAT *et al.*, 2021; MONTENEGRO-LANDÍVAR *et al.*, 2021; RUDKE *et al.*, 2019; SAVIC GAJIC; BOSKOV; SAVIC, 2021).

O cultivo de oliveiras (*Olea europaea* L.) é concentrado principalmente na região do Mediterrâneo, cerca 89,2% da produção mundial, e representa boa parte da economia nesta região, especialmente pela produção de azeite e azeitonas de mesa. A produção desses alimentos gera resíduos líquidos provenientes dos lagares de azeite e resíduos sólidos como ramos de oliveiras, bagaço e folhas. As folhas de oliveiras são ricas em compostos fenólicos sendo os biofenóis mais abundantes a oleuropeína, tirosol e hidroxitirosol. A folha de oliveira é uma matéria-prima barata e fonte de compostos contendo atividades antioxidantes e anti-inflamatórias que tem grande potencial de pesquisa para aplicação nas áreas de alimentos, farmacêutica e cosmética (GHOMARI; MERZOUKI; BENLEMLIH, 2020; REFAIT; RAHAL; MASMOUDI, 2020).

A maior parte dos componentes encontrados nas folhas de oliveira são de caráter hidrofílico, diferente dos encontrados nos frutos da oliveira, que por serem oleaginosos fornecem compostos hidrofóbicos. Os principais componentes extraídos das folhas da *Olea europaea* L. são a oleuropeína em maior quantidade, o hidroxitirosol, tirosol, o ácido cafeico, o ácido felúrico, a luteolina e ainda alguns outros (FLEMMIG *et al.*, 2014).

Diversas doenças degenerativas estão fortemente associadas à presença de radicais livres e outros agentes oxidantes no organismo, ácidos graxos saturados e compostos fenólicos têm a capacidade de combater esses radicais livres e sua ingestão diária vem sendo relacionada em diversas pesquisas com a prevenção de doenças cardiovasculares, câncer e com o equilíbrio entre LDL (*Low Density Lipoprotein*) e HDL (*High Density Lipoprotein*) (BAHLOUL; KECHAOU; MIHOUBI, 2014; BASTOS; ROGERO; ARÊAS, 2009; CAVALHEIRO *et al.*, 2014).

Além do interesse relativo à bioatividade, o uso de tais compostos se estende à aplicação como conservantes alimentares. O extrato de folhas de oliveira já foi utilizado por diversos autores para prevenção da oxidação lipídica de óleos comestíveis, em substituição aos antioxidantes sintéticos. Chiou *et al.* (2013) avaliaram a ação antioxidante do extrato em óleo de fritura de batatas fritas, sendo utilizados azeite de oliva, óleo de palma e de girassol. Os autores verificaram que os óleos suplementados com o extrato mantiveram suas concentrações de tocoferóis, fitosteróis e esqualeno. Difonzo *et al.* (DIFONZO *et al.*, 2018) avaliaram a efetividade do uso do extrato das folhas de oliveira como antioxidantes para *snacks* assados e concluíram que além de garantir maior tempo de prateleira para o produto,

houve um enriquecimento com potencial em bio-fenóis. Ademais, o extrato das folhas de oliveira foi aplicado como antioxidante em azeite extravirgem (ŞAHIN; SAYIM; BILGIN, 2017a), óleo de soja (TAGHVAEI; JAFARI, 2015) e de milho (NAZ *et al.*, 2004).

Apesar dos compostos bioativos oferecerem diversas vantagens, sua utilização na indústria pode ser um desafio devido à sua alta volatilidade, limitação de solubilidade de acordo com a polaridade apresentada, além de baixa estabilidade térmica e oxidativa (ADEL *et al.*, 2019). A nanotecnologia é uma ferramenta que está crescendo no âmbito de proteção de compostos ativos, oferece uma cobertura de proteção no material em questão em dimensões muito pequenas, em escalas micro ou até mesmo nanométricas. Por possuírem escalas infinitamente pequenas, as nanopartículas oferecem uma grande superfície de contato, essa característica permite melhorar a estabilidade e ação dos compostos ativos ali presentes. Existem diversos tipos de sistemas nanoestruturados como: nanocápsulas, nanoesferas, nanopartículas lipídicas sólidas, nanoemulsões, microemulsões, lipossomas e niossomas. Entre tantos métodos de produção de partículas, uma das que vem ganhando espaço no campo da pesquisa, por ser um método de simples aplicação é a técnica de nanoprecipitação, que oferece bom rendimento, é ecologicamente amigável e pode ser aplicada à nível industrial (BERTOLINO *et al.*, 2020a; DAUDT *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2020a; SICHERER; SAMPSON, 2014; SINGH; KUMARI; KUMAR, 2017a).

No contexto do extrato de folhas de oliveira, como estratégia para proteger e intensificar suas propriedades antioxidantes, Mohammadi *et al.* (2016a) nanoencapsularam o extrato em emulsão estabilizada por *Whey Protein Concentrate* e pectina. De acordo com Sharma, Dhanjal e Mittal (2017a), e Mohammadi *et al.* (2016a), estudos relacionados à nanoencapsulação e microencapsulação de extratos naturais à base de plantas precisam ser explorados para a melhor estabilidade oxidativa do óleo durante o armazenamento e processamento.

A encapsulação de compostos bioativos é utilizada nos mais diversos campos da ciência, na indústria de tintas e corantes, na indústria de cosméticos, plásticos, em produtos para tratamento de pedras naturais como mármore e granito, na indústria de cerâmica, na construção civil, na indústria têxtil e não poderia ser diferente na indústria de alimentos. Entretanto a indústria de alimentos requer a utilização de polímeros biodegradáveis e propícios à alimentação, deve ser um polímero que não ofereça risco a segurança alimentar,

sendo assim é preciso substituir os polímeros tradicionais à base de petróleo por biopolímeros tais quais polissacarídeos e proteínas (BERTOLINO et al., 2020; SINGH; KUMARI; KUMAR, 2017).

A utilização de biopolímeros derivados de recursos naturais pode criar uma nova classe de eco-compósitos de baixo custo, renováveis e totalmente biodegradáveis que podem ser amplamente utilizados como materiais de parede na encapsulação de compostos ativos, a fim de que essa matriz encapsulante regule a liberação do composto ativo sustentando a ação terapêutica ao longo do tempo (WADHWA et al., 2019).

A zeína é uma proteína proveniente dos grãos do milho que contém alto teor de aminoácidos apolares, que podem corresponder até 60 % das proteínas do grão. Entre 50 e 60 % dos aminoácidos da zeína, incluindo a leucina, alanina e prolina não são polares, o que caracteriza o comportamento hidrofóbico da zeína. Existem relatos de que a utilização da zeína como material encapsulante em que a oxidação foi significativamente inibida, bem como houve aumento na bioacessibilidade de bioativos como curcumina e rutina (GAGLIARDI et al., 2021; LI et al., 2020b).

A zeína pode ser aplicada como encapsulante na técnica de nanoprecipitação, que tem se mostrado um método fácil, rápido, eficiente em rendimento e ecológico para viabilizar a produção industrial (LE CORRE; ANGELLIER-COUSSY, 2014). Nesta técnica, é realizada a adição sucessiva de uma solução diluída composta pela zeína e o composto a ser encapsulado ao sistema antissolvente, que contém um estabilizante ou surfactante, o que leva à precipitação interfacial polímero-polímero em nanoescala (KAUR et al., 2018). Esta técnica já foi utilizada para encapsular diversos fármacos (RIVAS et al., 2017), monoterpenos fenólicos (DA ROSA et al., 2015), luteína (SILVA et al., 2017^a), curcumina (LEMES et al., 2017a) e extrato de *Hibiscus sabdariffa* (CALLIARI et al., 2020a).

A extração e encapsulação de compostos bioativos realizadas simultaneamente, conhecidamente como extração e encapsulação *in situ*, é muito interessante do ponto de vista industrial, visto que economiza tempo, uma vez que o processo de extração e encapsulação são realizados em única etapa, o que conseqüentemente reduz custos. Este tipo de extração é uma técnica com crescente desenvolvimento, como já apresentado no trabalho de Santos et al. (2018a).

Neste sentido, neste trabalho, o extrato de folhas de oliveira foi extraído e nanoencapsulado *in situ* em zeína e aplicado em óleos comestíveis visando prevenir a oxidação lipídica durante seu armazenamento.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a viabilidade de extração/encapsulação *in situ* do extrato de folhas de oliveira em nanopartículas de zeína e sua aplicação como antioxidante em óleos comestíveis.

2.2 Objetivos específicos

- Extrair os compostos da folha de oliveira com um solvente hidroalcolólico;
- Extrair/nanoencapsular *in situ* estes compostos em zeína por nanoprecipitação com caseinato de sódio como surfactante;
- Caracterizar as nanopartículas quanto à sua morfologia (Microscopia Eletrônica de Transmissão, MET), tamanho (Espalhamento Dinâmico de Luz), interações químicas (Espectrofotometria no Infravermelho com Transformada de Fourier, FTIR) e propriedades térmicas (Calorimetria Diferencial de Varredura, DSC e Termogravimetria, TGA);
- Analisar a capacidade antioxidante das nanopartículas e extrato por DPPH, ABTS e FRAP;
- Determinar o efeito da adição das nanopartículas em óleos comestíveis (soja, palma e palmiste) na prevenção da oxidação lipídica dos mesmos por Rancimat;
- Avaliar com o uso de ferramentas quimiométricas a estabilidade oxidativa dos óleos puros e adicionados das nanopartículas aqui produzidas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Olea europaea* L.

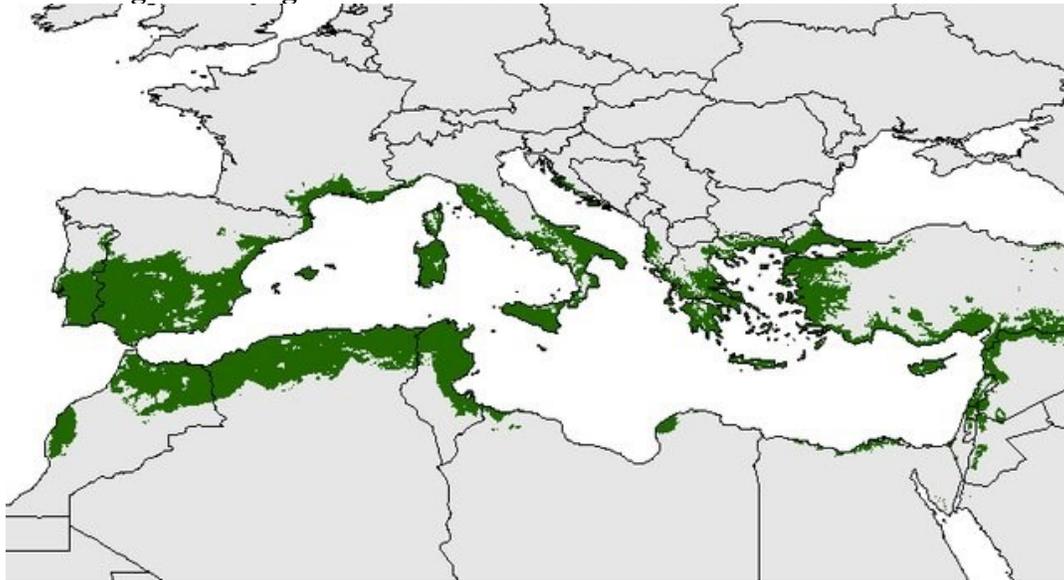
A oliveira é uma árvore cultivada desde tempos imemoriais, há registros da cultura há milênios em livros sagrados como a bíblia, em papiros do antigo Egito e outros registros nas regiões que hoje conhecemos como Mediterrâneo, que compreende países que são banhados pelo mar Mediterrâneo, pertencentes à União Europeia (Espanha, França, Mônaco, Itália, Malta, Eslovênia, Croácia, Bósnia, Hezergovina, Montenegro, Albânia, Grécia e Turquia), à Ásia, (Síria, Líbano, Israel e Palestina) e à África, (Egito, Líbia, Tunísia, Argélia e Marrocos). A oliveira é uma árvore perene, existem diversas delas que ultrapassam os 2 mil anos de existência, na Croácia por exemplo foi constatada, através de análise de carbono, uma oliveira de 1600 anos que, incrivelmente até os dias de hoje continua produzindo cerca de 30 quilos de azeitonas por ano (SIMIELLI, 2020; SINGH; DAVIDSON, 2016). O mapa da Figura 1 situa a região do mediterrâneo, que compreende três continentes simultaneamente, África, Europa e Ásia conectados pelo mar mediterrâneo. Já a Figura 2 aponta o nicho de cultivo de *Olea europaea* nesta região.

Figura 1 - Região Mediterrânea



Fonte: adaptado de Mundi (2021)

Figura 2 - Regiões de maior cultivo de oliveiras no Mediterrâneo



Fonte: Moreno (2014)

Apesar de ser proveniente da região mediterrânea, o cultivo de oliveiras vem aumentando no Brasil na última década, um dos prováveis motivos é que o país é o terceiro maior consumidor mundial de azeite. A região sudeste contabiliza pelo menos 200 produtores somando um total de 2 mil hectares de cultivos em 80 municípios sendo estes em São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo. Em 2018 a região atingiu 800 toneladas na safra de azeitonas (SILVA; ZAMBON; OLIVEIRA, 2019). Outra região que se destaca no cultivo da oliveira é o Sul, que compreende os estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, sendo este último o maior produtor. A Secretaria de Agricultura Pecuária e Desenvolvimento Rural, estima que a área plantada até o final de 2020 foi equivalente a 6200 hectares e estimativa de produção de 202 mil litros de azeite (SECRETARIA; AGRICULTURA, 2021)

Existem diversas cultivares de *Olea europaea* L. sendo listadas em três grupos principais: i) destinados principalmente à produção de azeite, são elas: *Arbequina* que é de origem espanhola, *Picual* também conhecida como *Andaluza*, *Lopereño*, *Marteño*, *Nevadillo* ou *Picúa*, representa 50% da produção de azeitonas advindas da Espanha e cerca de 20% da produção mundial, a *Koroneiki* de origem grega, *Frantoio* que é italiana, a *Arbosana* que apresenta características similares a *Arbequina* e ótima adaptação de produção no Rio Grande

do Sul -BR, a *Galega* também conhecida como *Alto D'Ouro* originária de Portugal e muito adaptável na região de Pelotas também no Rio Grande do Sul; ii) outro grupo destinados à produção de azeitonas de mesa, contando com os cultivares *Ascolana* de origem italiana e boa adaptação de produção nos estados brasileiros do Rio Grande do Sul, São Paulo e Minas Gerais, a *Cordovil de Serpa* também conhecida como *Panafiel* de origem portuguesa, a *Manzanilla de Sevilla* também denominada por *Carrasqueña*, *Manzanilla*, *Manzanilla Blanca*, *Temprano*, *Manzanilla Común* e *Varetuda* que uma das cultivares mais bem apreciadas; iii) o terceiro grupo que apresenta uma cultivar de dupla finalidade, a *Hojiblanca* que manifesta ótimas características para produção de azeitona de mesa e para a produção de azeites que apesar do baixo rendimento que possui, é apreciada pela qualidade (COUTINHO *et al.*, 2009).

As características macroscópicas da *Olea europaea* L. são de uma árvore robusta com altura variando entre 4 e 8 metros, que se não sofrer poda chega aos 15 metros. O crescimento desta árvore é lento e os troncos tendem a ser tortuosos e grossos, como pode ser observado na Figura 3, oliveiras mais antigas podem ter tronco de 2 metros de diâmetro. Já as folhas de oliveira, Figura 4, apresentam um formato de cunha na base e ápice mucronado, comprimento entre 3 e 9 centímetros de largura de 0,5 a 3 centímetros, sua extensão apresenta pecíolo de até 1,5 mm, as folhas têm característica coriácea rígida, tonalidade verde-acinzentada, brilhante e glabra na parte de cima e tonalidade cinzento-esbranquiçada (ALLIX, 2020).

Figura 3 - Árvore de oliveira (*Olea europaea* L.)



Fonte: Gardenia (2021)

Figura 4 - Folhas de *Olea europaea* L. fotografadas de diferentes ângulos



Fonte: adaptado de Allix (2020)

3.2 Extrato de folha de oliveira

Estima-se que pelo menos 10,6 milhões de hectares no mundo são ocupados por oliveiras, a região do Mediterrâneo destaca-se com a maior produção de azeitonas, hoje em dia cerca de 84%, e de azeites 97% da produção mundial para ambos (BERNARDI *et al.*, 2021). A produção de azeite e azeitonas de mesa gera alguns resíduos, sendo o maior deles as folhas de oliveira (ABI-KHATTAR *et al.*, 2021), durante o cultivo da oliveira, existem dois principais momentos em que as folhas deixam a árvore e se tornam resíduos, no momento da colheita, seja ela mecanizada ou manual, e no momento da poda que ocorre com intervalos de tempo pré-estabelecidos (BERNARDI *et al.*, 2021).

A intensidade da poda pode ser classificada como suave, média e severa, as quais eliminam, respectivamente, 17%, 25 a 33% e 50% de vegetação da copa (COUTINHO *et al.*, 2009). Na Espanha por exemplo, maior produtor mundial de azeite de oliva, a quantidade de folhas acumuladas anualmente pode facilmente ultrapassar 1 milhão de toneladas, essa quantidade gera uma preocupação ambiental e uma oportunidade de exploração econômica (LAMA-MUÑOZ *et al.*, 2020a).

Recentemente o extrato das folhas de oliveira, passou a receber uma atenção especial devido a seus principais constituintes, compostos fenólicos fortemente associados a atividade antioxidante (TOULABI *et al.*, 2021). O extrato de folhas de oliveira apresenta potencial para prevenção da peroxidação lipídica, protegendo uma parcela dos ácidos graxos insaturados de serem oxidados e transformarem-se em hidroperóxidos, o que impede o efeito cascata da oxidação lipídica, uma vez que os hidroperóxidos são mais susceptíveis a oxidação e são precursores dos produtos de oxidação secundários (OLIVEIRA *et al.*, 2022), aldeídos de cadeia curta e cetonas e álcoois não voláteis (FOOD INGREDIENTES BRASIL, 2014). Portanto os compostos contendo antioxidantes, estendem o tempo de prateleira dos alimentos porque são capazes de inibir a oxidação lipídica (LAVADO; LADERO; CAVA, 2021).

Diversas espécies de folhas e outros produtos naturais tais como ervas, sementes, e até mesmo cogumelos estão sendo explorados, justamente por estarem fortemente associados a atividade antioxidante e apresentarem grande potencial para aplicação em alimentos e bebidas (DE FREITAS *et al.*, 2018b; FRANCISCO *et al.*, 2018a; LORENZO *et al.*, 2018; RYAN *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2021; SHARMA; DHANJAL; MITTAL, 2017b; TOULABI *et al.*, 2021; YAO *et al.*, 2019). Embora não haja evidências que antioxidantes sintéticos ofereçam toxicidade ao ser humano, os consumidores cada vez mais estão optando por produtos de origem natural que podem oferecer além da atividade antioxidante, outras atividades biológicas atrativas que agregam um estilo de vida mais consciente e saudável (FERREIRA-SANTOS *et al.*, 2021).

Muitas pesquisas acadêmicas têm se voltado à extração de bioativos provenientes destas fontes naturais, a Tabela 1 compila algumas variedades de folhas, raízes, cascas, sementes e cogumelos, que por muitas vezes também são considerados resíduos advindos do processamento de outros alimentos e que se tornaram matérias-primas utilizadas para

extração de componentes bioativos. A Tabela 1 apresenta também quais foram os solventes utilizados para a realização da extração destes componentes.

Os trabalhos citados na Tabela 1 abrem um leque de oportunidades para a exploração de outros bio-resíduos, como é o caso das folhas de oliveira, que oferecem grande potencial para a extração de seus bio-compostos.

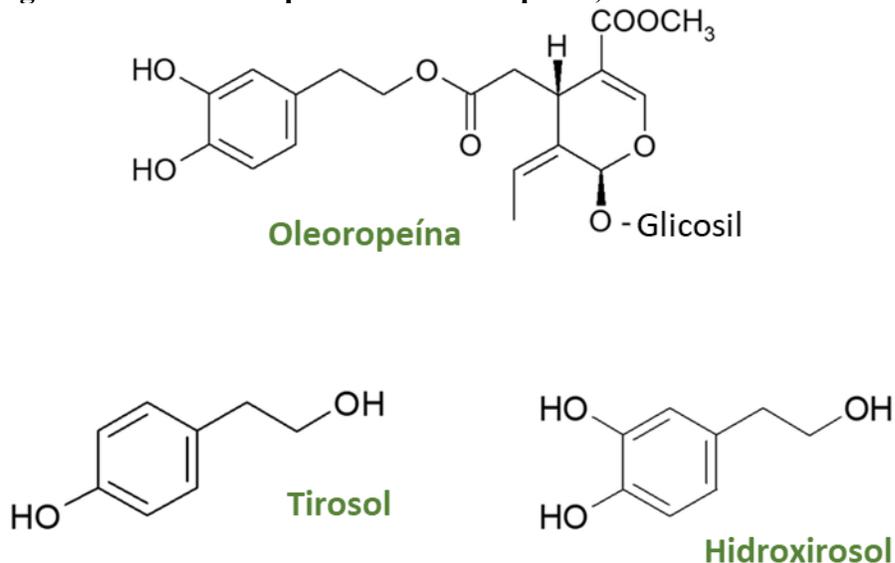
Tabela 1 - Diferentes espécies que são exploradas para extração de biocomponentes e solventes utilizados.

Espécie	Solvente(s) utilizados para a extração	Referência
Urtiga (<i>Urtica dioica</i> L.) e sálvia (<i>Salvia officinalis</i> L.)	Solução etanol:água (50:50 v/v)	Bigi <i>et al.</i> (2021)
Folha de oliveira (<i>Olea europaea</i> L.)	Solução etanol:água (70:30 v/v) + 1% ácido acético	Oliveira <i>et al.</i> (2022)
Folha de oliveira (<i>Olea europaea</i> L.)	solução etanol:água (70:30 v/v)	Toulabi <i>et al.</i> (2021)
Semente de <i>Araucaria angustifolia</i> (Bertol.) Kuntze	Etanol, e etanol:água (80:20 v/v)	Santos <i>et al.</i> (2018)
Rizomas de <i>Curcuma longa</i> L.	Etanol (99,8%)	Dos Santos <i>et al.</i> (2019)
Cogumelo <i>Agaricus bisporus</i> L.	Etanol	Francisco <i>et al.</i> (2018)
Sementes de <i>Araucaria angustifolia</i> (Bertol.) Kuntze	Água (cocção)	Silva <i>et al.</i> (2019)
Folha de feijoa (<i>Acca sellowiana</i> (O. Berg) Burret)	Etanol:água 50:50 v/v)	Santos <i>et al.</i> (2021)
Sementes de uva (<i>Vitis vinifera</i> L. var. Albariño) mulberry (<i>Morus nigra</i> L.)	Etanol:água (80:20)	Gómez-Mejía <i>et al.</i> (2021)
Jamelão <i>Sicana odorifera</i> (Vell.) Naudin Epicarp	Água	Albuquerque <i>et al.</i> (2021)
Juçara (<i>Euterpe edulis</i> Martius)	Etanol:água deionizada (70:30)	García <i>et al.</i> (2019).
Biorresíduos florais de <i>Crocus sativus</i> L.	água/HCl (100:1, v / v) a 40 ± 5 ° C	Serrano-Díaz <i>et al.</i> (2014)

Fonte: Autoria própria.

De uma maneira geral, os principais componentes bioativos encontrados nas folhas de oliveira e que apresentam atividade antioxidante são três: oleuropeína, tirosol e hidroxitirosol, na Figura 5 são apresentadas as estruturas químicas destas moléculas.

Figura 5 - Estrutura química da oleoropeína, tirosol e hidroxitirosol



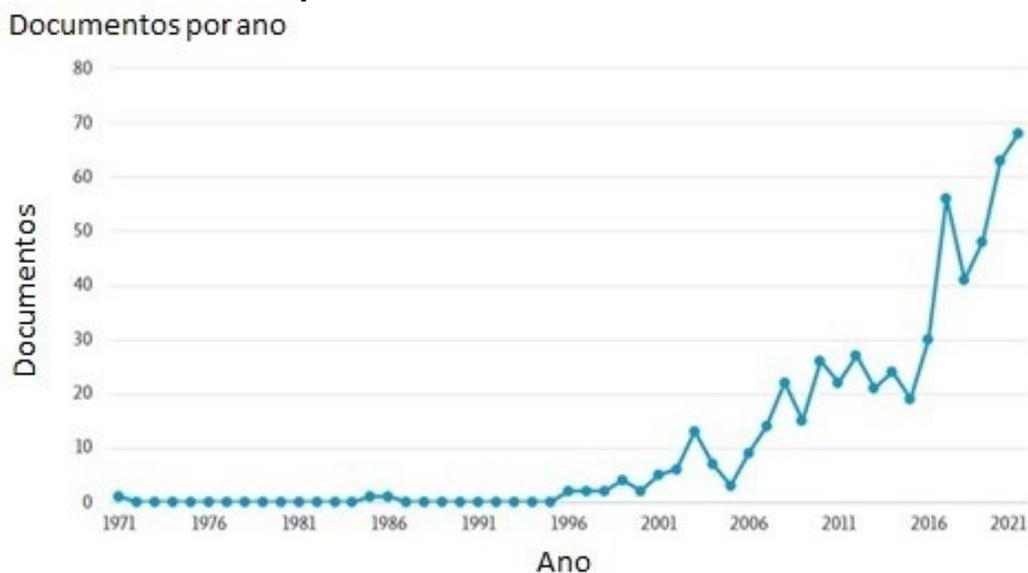
Fonte: Adaptado de Kritikou *et al.* (2020)

Justamente por estes serem os principais compostos estudados nas folhas de oliveira, Kritikou *et al.* (2020), comparou as diferentes concentrações de oleuropeína, tirosol e hidroxitirosol nas seguintes cultivares Koroneiki, Konservolia, Kalamon, Petrolia, Megaritiki, Agouromanakolia, Agrilia, Adramitiani e Kolovi. A quantificação foi realizada por UHPL (Cromatógrafo Líquido de Ultra Alta Pressão) acoplado a um espectrômetro de massa QTOF (Tecnologia de Quadrupolo e Tempo de Voo). A variedade Petrolia apresentou a menor concentração de oleuropeína, cerca de 6,4mg/kg enquanto a Agrilia apresentou maior concentração com 219 mg/Kg; na comparação de concentração de tirosol, a cultivar com menor quantidade foi a Petrolia com níveis não identificáveis e a de maior concentração foi a Kolovi com concentração na faixa de 97 a 121 mg/Kg. A variedade Kolovi apresentou a maior concentração de hidroxitirosol em média (394 mg/Kg) e a Konservolia a menor 28 mg/Kg. Outros componentes importantes, porém, em menores concentrações que são encontrados das folhas de oliveira são vanilina, luteolina, quercetina e a apigenina (KRITIKOU *et al.*, 2020).

Uma busca na base de dados Scopus utilizando em conjunto as palavras-chave *Olive, Leaves e Extraction* resulta em 554 documentos publicados a partir de 1971, sendo que os últimos 5 anos apresentam um destaque importante no aumento das publicações,

conforme apresentado na Figura 6. Na Tabela 2 estão listadas pesquisas deste período de maior crescimento nos estudos relacionados à extração dos compostos bioativos de folhas de oliveira, relacionando a técnica de extração e solventes utilizados. Nota-se que diferentes técnicas, bem como solventes, considerados “amigos do ambiente” já foram empregados para obtenção dos extratos bioativos a partir das folhas de oliveira.

Figura 6 - Número de artigos científicos publicados por ano, associados à busca no SCOPUS com as palavras-chave *Olive AND Leaves AND Extraction*



Fonte: Adaptado de Scopus (2021)

Tabela 2 - Estudos de extração de bioativos das folhas de oliveira publicados a partir de 2016

Variedade de <i>Olea europaea</i> L.	Técnica de extração	Solvente	Referência
<i>Olea europaea</i> L. provenietens da cidade de Thessaloniki na Grecia	Agitação contínua (180 rpm) sob banho maria (40,50 e 80± 1 °C)	Água, glicerol e hidroxipropil-b-ciclodextrina	Mourtzinos <i>et al.</i> (2016a)
Variedade Swebea Elgia, originária da Tunísia	Agitação contínua 280 rpm) (55 °C)	Água, etanol e metanol	Sifaoui <i>et al.</i> (2016)
<i>Olea europea</i> cv. <i>Oblica</i> provenientes da Croácia	Extração líquido pressurizado	Etanol:água (50:50, v/v) sonicado	Putnik <i>et al.</i> (2017)
<i>Olea europea</i> L. proveniente de Ayvalik (Edremit) na parte do Mar Egeu daTurquia	Extração assistida por micro-ondas sem solvente (250, 300, e 350 W)	Sem solvente	Şahin <i>et al.</i> (2017)
<i>Olea europaea</i> cv. Koroneiki Proveniente de Tarom no Irã	Extração assistida por ultrassom	Etanol:água (25:75, v/v)	Shirzad <i>et al.</i> (2017)
<i>Olea europaea</i> L. provenientes da província de Najaf, Iraque	Agitador 180 rpm 38 °C	Etanol/água (80:20 v/v) Metanol/água (80:20 v/v) Éter dietílico/água (80:20 v/v) Hexanol/água (80:20 v/v)	Altemimi <i>et al.</i> (2017)
<i>Olea europaea</i> L., cultivar Coratina proveniente de Bari na Itália	Pré-processamento em liquidificador Extração por ultrassom (35 ± 5 °C)	Etanol:água (70:30, v/v) Etanol:água (30:70, v/v) Apenas água	Difonzo <i>et al.</i> (2017)
<i>Olea europaea</i> L., cultivares Picual e Arbequina, provenientes de Jaen na Espanha	Ultra-turrax (2 x 30s vel. max.)	Dimetil-sulfóxido	Romero <i>et al.</i> (2017)
<i>Olea europaea</i> L., provenientes de diferentes lugares da Turquia	Ultra-turrax	Água:etanol (90:10, v/v)	Şahin; Sayim e Bilgin (2017b)

<i>Olea europaea</i> L., cultivar Chalkidiki, provenientes do norte da Grécia	Extração por ultrassom assistido	Etanol, metanol, acetona e água em diferentes concentrações	Irakli; Chatzopoulou e Ekateriniadou (2018)
Onze cultivares diferentes foram incluídos neste estudo: um marroquino autóctone e variedade predominante chamada ‘Picholine Marocaine’, e dez cultivares mediterrâneas recentemente introduzido em Marrocos (‘Arbequina’, ‘Hojiblanca’, ‘Frantoio’, ‘Koroneiki’, ‘Lechín’, ‘Lucque’, ‘Manzanilla’, ‘Picholine de Languedoc’, ‘Picual’ e ‘Verdal’)	Banho de ultrassom	Etanol-água (80:20, v / v)	Olmo-García <i>et al.</i> (2018)
<i>Olea europaea</i> L., provenientes de região de Leiria em Portugal	Agitação magnética 1000 rpm	Líquido iônico tensoativo	Cláudio <i>et al.</i> (2018)
<i>Olea europaea</i> L., cultivar Busa, proveniente de Vodnjan na Croácia	Extração assistida por ultrassom	Etanol:Água (80:20, v/v) 60°C	Giacometti; Žauhar e Žuvić (2018)
<i>Olea europaea</i> L., provenientes de Armutlu-Kemalpaşa, província de Izmir, Turquia	i) Maceração ii) Maceração iii) Extração com água superaquecida v) Extração de líquido superaquecido modificada	i) água deionizada ii) etanol, isopropanol (25, 50, 75 e 100%) iii) água deionizada v) etanol:água 75:25, v/v e etanol:isopropanol:água 50:25:25 v/v/v	Uzel <i>et al.</i> (2018)

<i>Olea Europaea</i> L. cultivar Arbequina, proveniente do Rio Grande do Sul no Brasil.	i) Extração assistida por micro-ondas ii) Extração assistida por ultrassom iii) Maceração	Água:etanol 60:40, v/v e etanol:água 70:30, v/v	da Rosa <i>et al.</i> (2019)
<i>Olea Europaea</i> L., cultivar Mari, da província de Fars no Irã.	Agitador 200 rpm Banho de ultrassom	Água deionizada	Ghelichkhani <i>et al.</i> (2019)
<i>Olea europaea</i> L., cultivar Coratina, provenientes de Acquaviva delle Fonti (Bari, Itália)	Extração assistida por ultrassom	Etanol:água 0, 30 e 70% de etanol	Flamminii <i>et al.</i> (2019)
<i>Olea europaea</i> L. cultivar Picual, provenientes de Jaén na Espanha	i) Agitação 350 rpm ii) Solvente acelerado Dionex™ ASE™ 350 extrator (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, EUA)	i) Diversas soluções de água e etanol (20, 40, 60, 80 e 96% de etanol) ii) Etanol:água 60:40 v/v	Lama-Muñoz <i>et al.</i> (2019)
<i>Olea europaea</i> L., cultivar Negrinha de Freixo, provenientes da cidade de Chapecó em Santa Catarina, Brasil.	i) Extração por fluido supercrítico ii) Extração por líquido pressurizado	Etanol:água 80:20	Rosa <i>et al.</i> (2019)
<i>Olea europaea</i> L. cultivar Picual, provenientes de Jaén na Espanha	Extração assistida por ultrassom	Etanol	Martínez-Patiño <i>et al.</i> (2019)
<i>Olea europaea</i> L.	Extração sólido-líquido Soxhlet Extração assistida por microondas Extração assistida por ultrassom	Acetona, metanol, etanol, n-hexano, acetato de etila, clorofórmio e éter dietílico, bem como	Borjan <i>et al.</i> (2020)

	Fluido supercrítico	misturas destes com água em diversas proporções	
<i>Olea europaea</i> L., provenientes da região de Maule no Chile.	Extração assistida por ultrassom	Solventes eutéticos profundos i) 1: 1 de cloreto de colina e ácido cítrico ii) 1: 2 de cloreto de colina e etilenoglicol iii) Etanol, metanol ou água	Plaza <i>et al.</i> (2020)
<i>Olea europaea</i> L., cultivar Oblica, provenientes da região de Hvar, Croácia	Extração assistida por ultrassom Extração assistida por micro-ondas	Etanol: água 50:50 v/v	Dobrinčić <i>et al.</i> (2020)
<i>Olea europaea</i> L. de seis diferentes cultivares: três de cultivo de azeitonas e azeite Arbequina, Picual e Roya e outras três cultivares selvagens	i) Soxhlet ii) Extração de líquido-pressurizado	Etanol-água (60:40, v/v)	Lama-Muñoz <i>et al.</i> (2020b)
<i>Olea europaea</i> L. cultivar Ayvalık, proveniente de Balıkesir-Ayvalık na Turquia	Extração assistida por microondas	Etanol:água Metanol:água (5, 25, 45, 65 e 85 %)	Vural <i>et al.</i> (2020)
<i>Olea europaea</i> L. variedade Chodrolia, Chalkidikis	Campo elétrico pulsado	Água: etanol (75:25, v/v)	Pappas <i>et al.</i> (2021)
<i>Olea europaea</i> L.	Extração assistida por ultrassom Extração assistida por micro-ondas	Etanol:água (70:30, v/v)	Markhali <i>et al.</i> (2021)
<i>Olea europaea</i> L. proveniente de Ayvalik na Turquia	Extração automática de solvente	Etanol:água (80:20, v/v)	Şahin <i>et al.</i> (2021)

<i>Olea europaea</i> L., cultivar Chondrolia Chalkidikis, proveniente de Karditsa, Grécia	Campo Elétrico pulsado	Etanol:água (0, 25, 50 e 75 e 100 %)	Pappas <i>et al.</i> (2021)
<i>Olea europaea</i> L. cultivar Koroneiki	Agitação (500rpm)	Solvente eutético profundo (Ácido L-láctico servindo como doador de ligação de hidrogênio e acetato de amônio, servindo como aceitador de ligação de hidrogênio nas razões 1:1, 3:1, 5:1, 7:1, 9:1 e 11:1)	Chakroun <i>et al.</i> (2021)
<i>Olea europaea</i> L. cultivar Arbequina, provenientes do Rio Grande do Sul, Brasil.	Extração assistida por micro-ondas Extração assistida por ultrassom	Água:etanol (diferentes proporções)	Rosa <i>et al.</i> (2021a)

Fonte: Autoria própria

3.3 Nanoencapsulação de compostos bioativos por nanopreipitação

Sabendo que o efeito funcional dos compostos fenólicos depende não apenas na quantidade ingerida, mas da sua biodisponibilidade (HOLST; WILLIAMSON, 2008), uma estratégia já empregada para este fim é a encapsulação dos compostos em questão. A técnica aplicada para a encapsulação é dependente principalmente da solubilidade do composto a ser encapsulado, da solubilidade do encapsulante (carreador) e da aplicação final deste material produzido, dentre outros fatores. No caso em que a aplicação final das micro/nanopartículas se dá em alimentos, o agente encapsulante deve ser preferencialmente classificado como GRAS (*Generally Recognized as Safe*) (LEIMANN *et al.*, 2019). Além disso, é preciso garantir que a obtenção de tais compostos ou extratos, que serão encapsulados, seja feita de forma amigável ao meio ambiente (PETTINATO *et al.*, 2020).

Existem diversas técnicas de micro/nanoencapsulação que podem ser aplicadas para compostos bioativos, como é mostrado na Tabela 4. A escolha da técnica é dependente do material/composto a ser encapsulado, da finalidade de uso e da disponibilidade do equipamento, e diferentes materiais de parede podem ser aplicados, como hidrocoloides, proteínas, amidos, dextrinas, lipídios, vários emulsificantes e fibras, sozinhos ou associados a outros compostos (RIBEIRO; VELOSO, 2021).

Tabela 3 - - Métodos de micro e nanoencapsulação, materiais de parede, compostos ativos encapsulados e tamanho de partícula aproximado determinado pelos autores

Método de encapsulação	Material de parede	Composto ativo	Tamanho aproximado	Referência
Homogeneização a quente	Cera de abelha	β -caroteno	10,4 a 344 nm	Carvalho <i>et al.</i> (2021)
	Cera de carnaúba	Óleo de chia	15 a 45 μ m	Almeida <i>et al.</i> (2018)
Nanoprecipitação	Zeína	Amido	229 a 564 nm	Li <i>et al.</i> (2021)
	Gelatina	Albumina de soro bovino	200 a 300 nm	Azimi <i>et al.</i> (2014)
	Zeína	Curcumina	\approx 190 nm (PDI = 0,25)	Lemes <i>et al.</i> (2017b)
Emulsificação/Evaporação de solvente	PLLA	Curcumina	\approx 180 nm (PDI \approx 0,2)	Silva-Buzanello <i>et al.</i> (2016a)
	PLLA	Óleo de café torrado	173 a 357 nm	Freiberger <i>et al.</i> (2015)
Coacervação complexa	Gelatina/Caseinato de sódio	Probiótico	\approx 12 a 386 μ m	Zhao <i>et al.</i> (2020)
	Gelatina/Mucilagem de chia	Óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i>	38 a 120 nm	https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106077 Hernández-Nava <i>et al.</i> (2020)
Gelificação iônica	Quitosana	Linalol	\approx 352 nm	Xiao <i>et al.</i> (2017)
	Pectina de baixa metoxilação amidada	Antocianinas de <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	\approx 1000 μ m (PDI \approx 0,5)	Moura <i>et al.</i> (2018)
Homogeneização de alta pressão	Sílica	Lisozima		Zhu <i>et al.</i> (2021)
	Amido	Carotenóides	\approx 200 nm	Chutia e Mahanta (2021)
Dispersão sólida (método da dissolução)	PVP	β -caroteno	0,337 a 0,602 μ m	Rocha <i>et al.</i> (2018)
	PVP	Curcumina	220 a 712 nm	Almeida <i>et al.</i> (2018a)

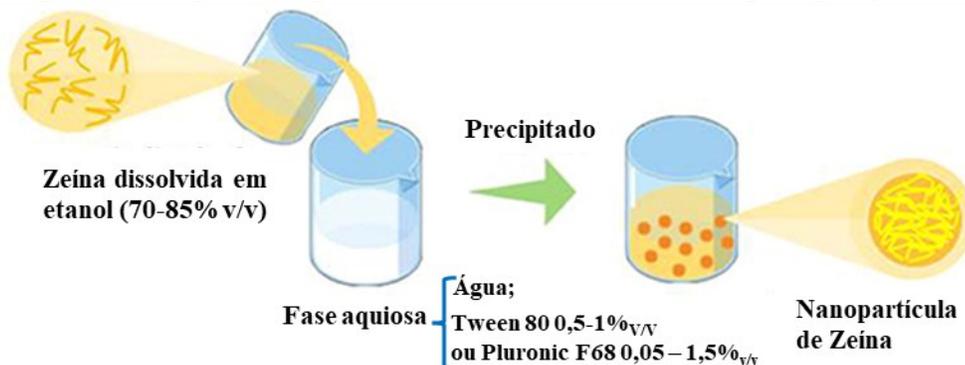
Atomização (<i>Spray drying</i> ou <i>Spray chilling</i>)	Cera de abelha, cera de carnaúba e miglyol	Curcumina	95 a 139 μm	Sorita <i>et al.</i> (2021)
--	---	-----------	------------------------	-----------------------------

Fonte: autoria própria

Uma das técnicas que vem ganhando espaço no campo da pesquisa e desenvolvimento, é a nanoprecipitação que além de ser um método de simples aplicação, oferece bom rendimento, é ecologicamente amigável e pode ser aplicada à nível industrial, (BERTOLINO *et al.*, 2020c). No método de nanoencapsulação por nanoprecipitação, também conhecido por “método de deslocamento de solvente”, ocorre uma emulsificação espontânea da fase orgânica contendo o polímero dissolvido e o composto de interesse, em um meio aquoso que induz a nanoprecipitação (PATEL; MISHRA, 2021). Na Figura 7 é possível observar um esquema representativo do método de nanoprecipitação que se utiliza das diferentes solubilidades da zeína em etanol e água sendo exploradas a fim de produzir nanopartículas. A interação do álcool e da água atua diminuindo a concentração do etanol, reduzindo a solubilidade da zeína e ocasionando sua produção na forma de nanopartículas (PASCOLI; DE LIMA; FRACETO, 2018).

Essa técnica possui algumas etapas sendo elas: supersaturação, nucleação, crescimento por condensação e crescimento por coagulação que leva a formação de nanopartículas. A supersaturação ocorre quando a solução contém mais soluto dissolvido que aquele dado pelo valor de saturação de equilíbrio, essa etapa pode afetar as propriedades do nanoencapsulado, caso ela seja muito elevada pode ocorrer uma diminuição na partícula. Posteriormente se inicia a nucleação onde ocorre uma estabilidade termodinâmica, ou seja, as flutuações locais na concentração causadas pela supersaturação levam a formação de núcleos primários, que por sua vez aumentam de tamanho pela associação de moléculas de soluto até atingir um tamanho crítico que seja estável contra a dissolução. Em seguida os núcleos aumentam de tamanho por condensação ou coagulação. A condensação é a adição de moléculas à superfície da partícula, esse processo ocorre em duas etapas: a difusional e a de degradação. Já a coagulação depende da frequência de colisão, da relação atrativa e repulsiva entre as partículas (MARTÍNEZ RIVAS *et al.*, 2017).

Figura 7 - Esquema representativo do método de nanoprecipitação



Fonte: Adaptado de Pascoli *et al.* (2018)

A zeína é uma proteína solúvel em álcool rica em prolamina, proteína encontrada no milho. Possui boa biodegradabilidade, alta resistência térmica, capacidade de formação de filme, biocompatibilidade e propriedades de barreira à umidade e oxigênio, proporcionando encapsulamento eficaz de compostos bioativos lipofílicos sensíveis. Os pesquisadores relataram que a proteína zeína é estável em condições gástricas simuladas por até 120 minutos, mas se torna instável no fluido intestinal simulado em 30 segundos. Isso significa que a zeína aumentará a proteção dos compostos bioativos sensíveis contra as condições gástricas e facilitará a liberação dos compostos bioativos apenas no fluido intestinal, melhorando assim a bioacessibilidade dos mesmos (MAHALAKSHMI *et al.*, 2020).

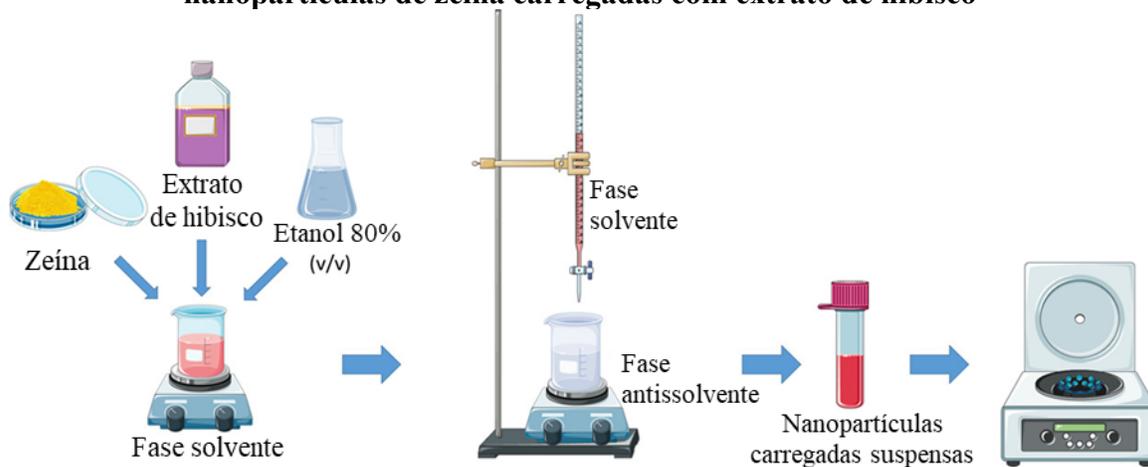
A zeína já foi utilizada em diversos estudos como agente encapsulante, como por exemplo: timol e carvacrol (WU; LUO; WANG, 2012), óleo de peixe (ZHONG; TIAN; ZIVANOVIC, 2009), quercetina (LI *et al.*, 2019), curcumina (LEMES *et al.*, 2017c), luteína (SILVA, J. T. do P. *et al.*, 2017a), resveratrol (LIANG *et al.*, 2018), extrato de hibisco (CALLIARI *et al.*, 2020b), própolis (ZHANG *et al.*, 2019), extrato de *Cyclea barbata* Miers (WONG *et al.*, 2020), entre outros. Apesar da zeína se mostrar um agente encapsulante versátil, sendo aplicado para encapsular compostos com diferentes características, destaca-se que o extrato de folha de oliveira ainda não foi encapsulado com a mesma, sendo um importante ponto a ser explorado.

3.4 Extração/encapsulação simultâneas

Visando a redução tanto do tempo de processo, quanto do uso de solventes, a extração/encapsulação simultânea vem sendo cada vez mais empregada, com diferentes técnicas, solventes e agentes encapsulantes. Nesse sentido a técnica de dispersão sólida foi utilizada por Santos *et al.* (2020) para extrair curcuminóides (etanol e água como solventes) a partir de *Curcuma longa* L. e encapsulá-los simultaneamente em polivinilpirrolidona. Os autores utilizaram um ultrassom para realizar a extração/encapsulação. Em outra abordagem Santana *et al.* (2019) utilizaram soluções dos surfactantes monooleato de polietilenoglicol 400 e dioleato polietilenoglicol 400 para extrair os compostos de folha de guaco (*Mikania glomerata* Spreng) e simultaneamente formar uma nanodispersão, neste caso somente a agitação magnética foi utilizada. Mourtzinos *et al.* (2016b) realizaram a extração/encapsulação simultânea de compostos das folhas de oliveira utilizando água e glicerol como solventes e ciclodextrina como agente encapsulante, utilizando a agitação mecânica como mecanismo de dispersão.

Calliari *et al.* (2020b) afirmam que utilizaram do conceito de extração/encapsulação simultânea pela técnica de nanoprecipitação. Contudo ainda o extrato foi obtido em uma etapa anterior à mistura com o agente encapsulante e à etapa de nanoprecipitação. Um esquema representativo do procedimento utilizados pelos autores é apresentado na Figura 8.

Figura 8 - Representação esquemática do procedimento adotado para a produção de nanopartículas de zeína carregadas com extrato de hibisco



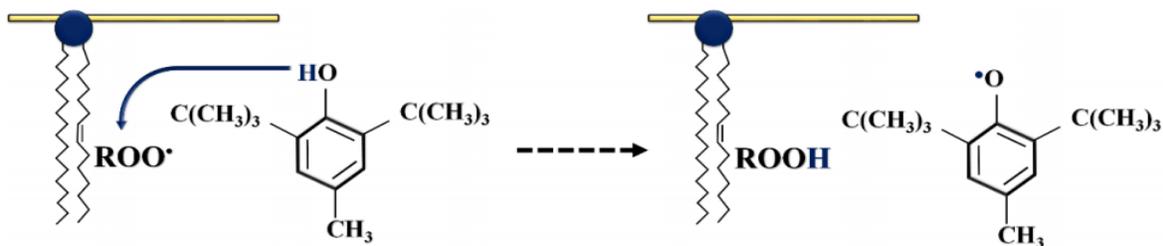
Fonte: Adaptado de Calliari *et al.* (2020b)

No presente trabalho espera-se obter nanopartículas de zeína contendo o extrato de folha de oliveira a partir de uma extração/encapsulação simultâneas, onde as folhas, a zeína e o solvente de extração/encapsulação são misturados numa etapa inicial, que permita a extração e interação dos compostos extraídos com o agente encapsulante, e ofereçam atividade antioxidante.

3.5 Métodos de avaliação de atividade antioxidante

O esquema apresentado na Figura 9 demonstra a reação entre um antioxidante sintético, o hidroxitolueno butilado (BHT) e um radical livre genérico. O mecanismo de reação acontece da seguinte maneira, a molécula com capacidade antioxidante, doa um próton H^+ para o radical livre, interrompendo a peroxidação lipídica (WALSTRA; VAN VLIET, 2010).

Figura 9 - Mecanismo de ação do hidroxitolueno butilado (BHT) interrompendo a reação em cadeia ocorrida durante a peroxidação lipídica. Onde: ROO⁻ = Radical livre genérico; ROOH = Radical livre genérico protonado impedido de sofrer reações de peroxidação em cadeia



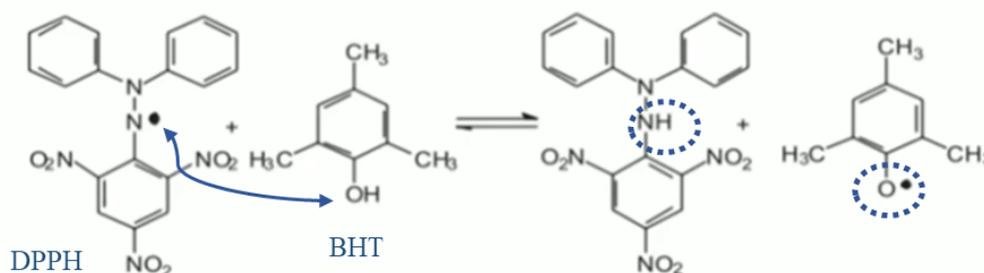
Fonte: Silva *et al.* (2017)

A principal funcionalidade do antioxidante, é protonar o radical livre de forma que este seja impedido de sofrer diversas reações de peroxidação em cadeia, inibindo assim a oxidação lipídica. Os compostos fenólicos presentes no extrato de folhas de oliveira possuem essa capacidade de protonar radicais livres, justamente devido às suas estruturas moleculares previamente apresentadas na seção 3.2. (hidroxilas e carbonílas ligadas ao anel aromático).

O efeito dos antioxidantes sobre os diferentes tipos de radicais pode ser avaliado por técnicas colorimétricas, por Espectrofotometria UV-Vis. Uma destas análises avalia o

radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil, espécie reativa), que pode ser neutralizado por um antioxidante (compostos fenólicos - doadores de próton H^+), formando assim um novo radical proveniente do antioxidante, que é bem menos reativo que o DPPH, devido as estruturas de ressonância que o fenol oferece. Conforme esta reação vai acontecendo a solução onde a reação ocorre vai mudando sua coloração de um rosa intenso para um amarelo bem claro, que pode ser então analisada em espectroscopia de UV-Vis na região de 517 nm (OLIVEIRA *et al.*, 2009). A Figura 10 esquematiza o mecanismo de reação entre o DPPH e um antioxidante sintético comumente utilizado na indústria de alimentos, o BHT.

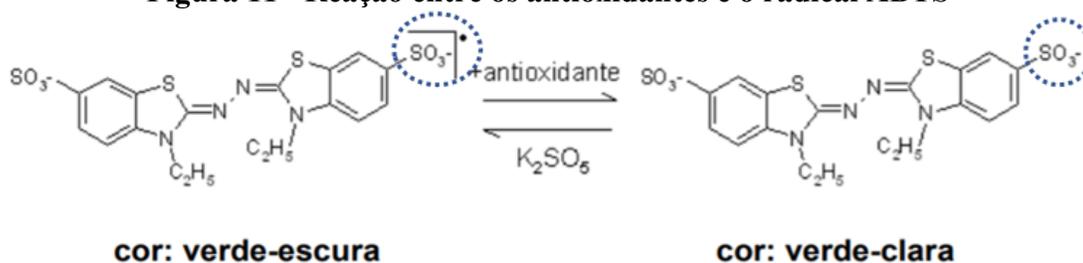
Figura 10 - Reação entre o radical DPPH e o antioxidante BHT



Fonte: adaptado de Oliveira *et al.* (2009)

Outro método bastante utilizado para a determinação de atividade antioxidante é através da captura do radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico), (radical ABTS), quanto maior o "consumo" de do radical ABTS, maior a atividade antioxidante apresentada pelo composto em análise. A Figura 11, representa a reação química que acontece com o radical. Conforme vai ocorrendo a reação entre os antioxidantes e o radical ABTS, a coloração da solução vai mudando de um verde escuro para um verde claro, que é então analisado por espectroscopia de UV-Vis na região de 734nm (PÉREZ-JIMÉNEZ, 2007).

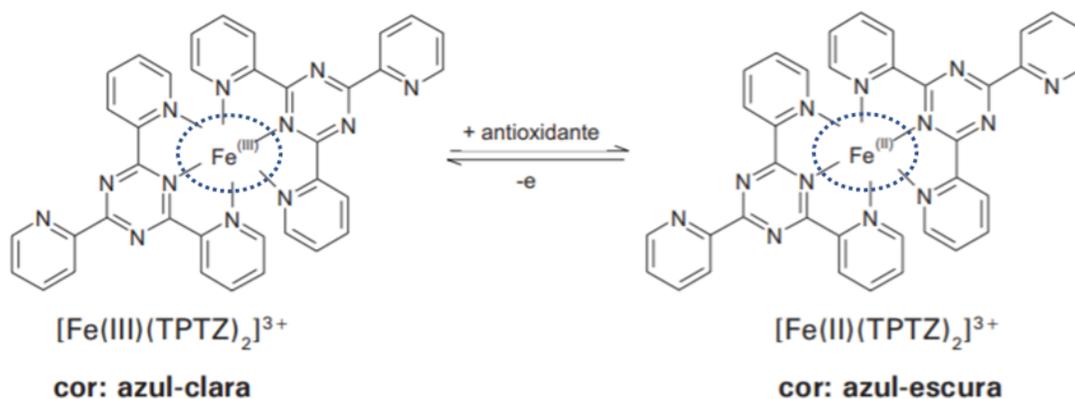
Figura 11 - Reação entre os antioxidantes e o radical ABTS



Fonte: adaptado de Pérez-jiménez (2007)

Ainda se tratando de poder antioxidante, uma alternativa desenvolvida para determinar a redução do ferro em fluidos biológicos e soluções aquosas de compostos puros é a metodologia FRAP. Diferente das demais técnicas que são baseadas na transferência de átomos de hidrogênio, esta metodologia é baseada na transferência de elétrons. Quando a redução de Fe^{3+} a Fe^{2+} ocorre na presença de 2,4,6-tripridil-s-triazina, a reação é acompanhada pela formação de um complexo colorido com Fe^{2+} passando de um azul-claro para um azul mais escuro que é analisado em espectroscopia de UV-Vis em 595 nm. Esta técnica pode ser aplicada tanto para verificação de atividade antioxidante em extratos de alimentos e bebidas, quanto para eficiência antioxidante de substâncias puras (PÉREZ-JIMÉNEZ, 2007). O esquema de reação é apresentado na Figura 12.

Figura 12 - Reação da redução de Fe^{3+} a Fe^{2+} ocorre na presença de 2,4,6-tripridil-s-triazina



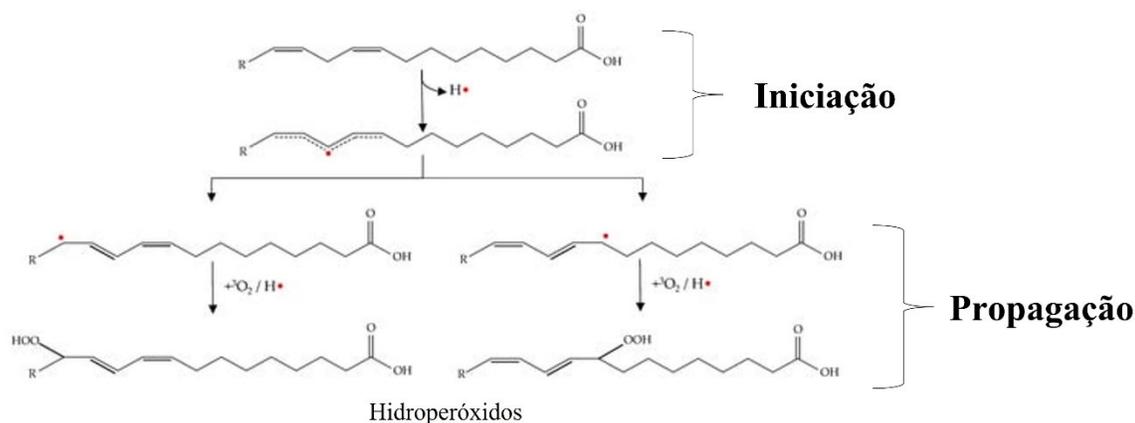
Fonte: adaptado de Pérez-jiménez (2007)

3.6 Prevenção da oxidação lipídica em óleos comestíveis

O termo “oxidação lipídica” é utilizado para uma série de alterações químicas complexas que ocorrem em decorrência da interação do oxigênio com lipídeos. Durante essas reações, os ácidos graxos esterificados em triacilgliceróis e fosfolipídeos, se decompõe e formam pequenas moléculas voláteis que produzem aromas indesejados conhecidos como “rancidez oxidativa”. Apesar de na maior parte das vezes a rancidez oxidativa ser indesejável e prejudicial na qualidade dos alimentos, existem exceções como são os casos de alguns alimentos fritos ou desidratados e em algumas qualidades de queijos em que esses compostos podem contribuir favoravelmente (FELLOWS, 2009).

O mecanismo de oxidação lipídica é bastante complexo e acontece por etapas, a iniciação, a propagação e a terminação. O elemento central da iniciação da cadeia oxidativa, é a espécie conhecida como radical livre, como descrito anteriormente, os radicais livres são caracterizados por possuírem um (ou mais) elétron não pareado que reagem facilmente com o oxigênio. Resumidamente, de acordo com a Figura 13, a iniciação é a fase onde vai ocorrer a abstração de um hidrogênio na estrutura molecular do lipídeo, mudando a configuração do triacilglicerol e formando radical alquil (FELLOWS, 2009).

Figura 13 - Mecanismos de iniciação e propagação da oxidação lipídica, formando hidroperóxidos lipídicos



Fonte: adaptado de Domínguez *et al.* (2019)

Com a formação do radical alquil dá-se início a etapa de propagação que é quando o oxigênio vai interagir com o radical alquil, e haverá a formação de novos radicais, o peróxil e hidroperóxidos de ácido graxo. A terminação ocorre quando na presença de oxigênio os radicais se combinam para a formação de espécies não radicais em uma taxa de reação limitada, havendo a formação de dímeros e polímeros de ácidos graxos (DOMÍNGUEZ *et al.*, 2019).

A prevenção da oxidação lipídica então, pode se dar pelo simples fato de incorporar mecanismos que contribuam no controle e estabilidade de radicais livres pró-oxidantes e intermediários das reações de oxidação. É possível avaliar o efeito da incorporação de compostos antioxidantes na estabilidade oxidativa de óleos de diferentes formas, sendo o teste mais confiável o teste de armazenamento, contudo esta análise pode levar até meses, assim métodos que reduzam o tempo de avaliação são muito importantes. Os mais usados incluem: Teste Rancimat, Teste *Schaal Oven* - teste termostático, e as determinações químicas do valor de peróxido, valor de anisidina e índice de ácido (MASZEWSKA *et al.*, 2018).

Na análise Rancimat determina-se quanto tempo a amostra permanecerá estável, sendo submetida a um fluxo constante de oxigênio (oxidação acelerada) e a uma elevada temperatura (constante). O fluxo de oxigênio que sai da amostra de óleo é borbulhado em água deionizada e os compostos voláteis ali presentes são então quantificados constantemente pela condutividade da água, que aumenta em função da presença dos ácidos orgânicos voláteis. O tempo final da indução oxidativa é determinado através do máximo da segunda derivada em relação ao tempo. Quanto maior o tempo de indução, maior a estabilidade do óleo, maior é capacidade antioxidante do composto adicionado ao óleo (TINELLO *et al.*, 2018).

Já o Teste *Schaal Oven* é realizado com a incubação das amostras lipídicas adicionadas de antioxidante em um forno com circulação forçada a 60°C sem presença de luz por um período de tempo especificado (GRAMZA-MICHALOWSKA; SIDOR; HES, 2011). O óleo testado pode ser então analisado por Espectrofotometria UV-Vis e informações relativas as modificações químicas da oxidação lipídica extraídas através de avaliações quimiométricas. Esta avaliação dos dados de UV-Vis já foi utilizada em diversos estudos através da aplicação de técnicas quimiométricas como *Multivariate Curve Resolution*

Alternating Least-Squares (MCR – ALS) (GUIMARÃES-INÁCIO *et al.*, 2018) e *Principal Component Analysis* (PCA, Análise de Componentes Principais) (MÜCKE *et al.*, 2021). O método PARAFAC (*PARAllel FACtor analysis*) já foi utilizado para a avaliação de dados de oxidação lipídica obtidos por Espectroscopia de Fluorescência 3D (BOTOSOIA; KAROUI, 2022), mas para dados de *Schaal Oven* determinados por UV-Vis ainda não. O PARAFAC pode ser considerado uma generalização da PCA para dados multidimensionais (SENA; TREVISAN; POPPI, 2005) .

3.7 Atividade antioxidante de compostos encapsulados

Como já descrito nesta revisão, compostos encapsulados passam a receber uma camada de proteção contra efeitos externos (luz e oxigênio por exemplo), e dependendo da técnica de encapsulação, podem se tornar mais ou menos hidrossolúveis. A encapsulação de compostos bioativos, faz com que estes tenham mais estabilidade e sejam capazes de prover sua atividade antioxidante gradualmente, esta liberação gradual confere à matriz que recebe os encapsulados, um maior tempo de vida de prateleira (AZARPAZHOOH *et al.*, 2019; FRANCISCO *et al.*, 2018b).

Foi relatado no trabalho de Silva-Buzanello *et al.* (2016b), que o conteúdo fenólico total das nanopartículas contendo curcumina e da curcumina sem ter sido encapsulada, foi o mesmo, destacando assim que a técnica de encapsulação não compromete a atividade antioxidante do composto bioativo. Alizadeh Sani *et al.* (2022) relatam que antocianinas encapsuladas conferiram aumento no tempo de prateleira de matrizes alimentares aos quais foram aplicadas, quando comparados com as mesmas sem terem sido encapsuladas, o que foi justificado pela liberação gradual dos compostos antioxidantes.

Como já descrito, a técnica de micro/nanoencapsulação tem o objetivo de proteger o material carregado de adversidades externas e proporcionar a este, uma liberação controlada no meio em que se encontra. Porém, como relatado no trabalho de Tkaczewska *et al.* (2019), foi verificado que a microencapsulação de um hidrolisado de pele de tilápia, levou a uma diminuição da atividade antioxidante do hidrolisado, tanto *in vitro* quanto em *in vivo* em ratos Wistar saudáveis. A hipótese apresentada foi de que ao proteger o hidrolisado, o material de parede também pode oferecer um certo impedimento de reação com o meio externo.

Tendo em vista a revisão vista a cima, no presente trabalho é proposta a realização da extração e encapsulação simultâneas de antioxidantes presentes nas folhas de oliveira (em zeína por nanoprecipitação), caracterização das partículas e extrato (não encapsulado), e por fim a aplicação destes em diferentes óleos comestíveis (soja, palma e palmiste) para verificar a viabilidade do seu uso como antioxidantes naturais para prevenção da oxidação lipídica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

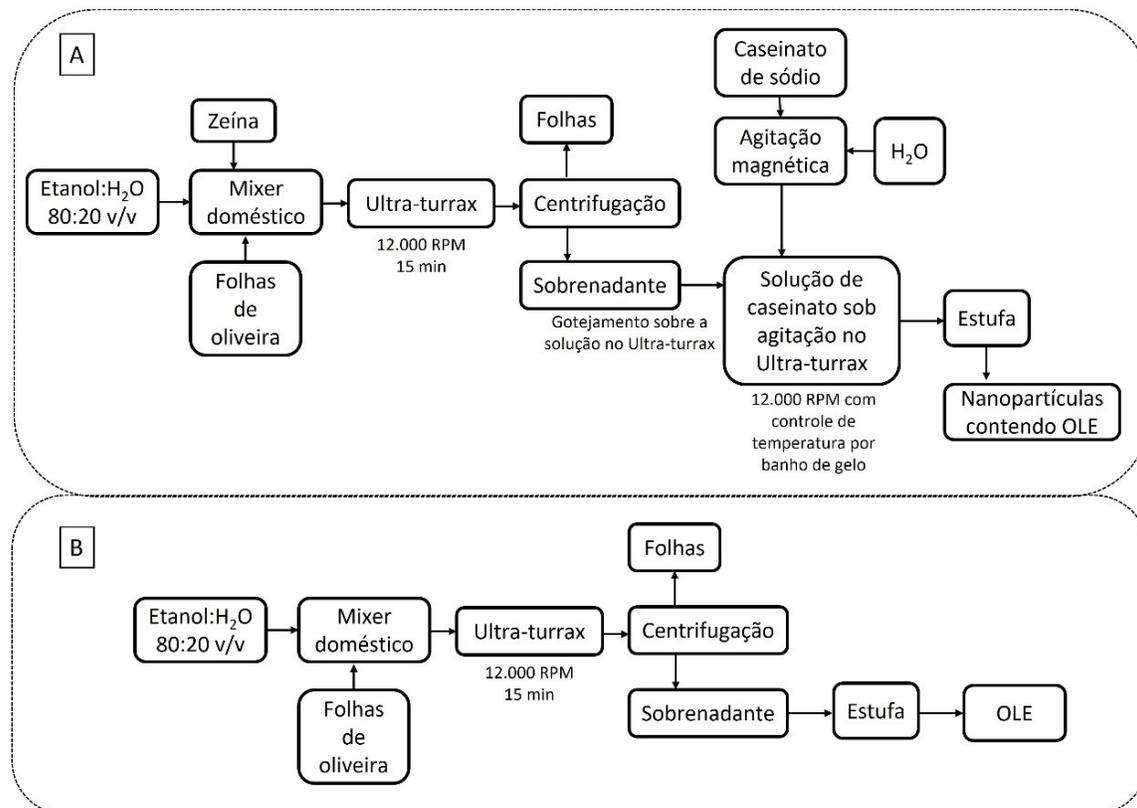
As folhas de oliveira utilizadas foram provenientes de um cultivo comercial, localizado em Águas da Prata na Serra da Mantiqueira no estado de São Paulo (22°00'48,6" S 46°37'59,4" W). As espécies de oliveira utilizadas foram das variedades Arbequina, Koroneiki e Arbosana. Para a nanoencapsulação foram utilizados a zeína e caseinato de sódio (Sigma-Aldrich). Foram utilizados os óleos de soja, palmiste e de palma sem adição de antioxidantes; brometo de potássio (KBr, grau espectroscópico, Vetec), isoctano (grau UV/HPLC, NEON), álcool etílico absoluto (99,8%, Dinâmica), e BHT (Êxodo Científica, 99% de pureza), ABTS (2,2'-azinobis [3-ácido etilbenzotiazolina-6-sulfônico]sal de diamônio, Sigma-Aldrich), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH, Sigma-Aldrich, Alemanha), Persulfato de Potássio (Neon, São Paulo-SP, Brasil), Ácido Clorídrico (Vetec, Rio de Janeiro-RJ, Brasil), 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ, Sigma-Aldrich), Cloreto Férrico hexahidratado (Synth, Diadema SP, Brasil), acetato de sódio (Dinâmica, Indaiatuba-SP, Brasil), Ácido Acético glacial (Dinâmica química contemporânea LTDA), Etanol (99,5% P.A.) (Dinâmica, Indaiatuba-SP, Brasil), filtros de seringa de PTFE hidrofílico (0,45 µm).

4.2 Extração/nanoencapsulação em único passo do OLE

A extração e nanoencapsulação dos compostos bioativos das folhas de oliveira, seguiu as metodologias citadas por Lemes *et al.* (2017c) e Santos *et al.* (2018a), o procedimento foi adaptado visando à redução das etapas necessárias para a obtenção do extrato e posterior encapsulação. Um esquema representativo do procedimento é apresentado na Figura 14 (A). As folhas de oliveira (43,75 g), a zeína (15 g), o etanol absoluto e a água (500 mL, 80:20 v/v) foram pré-homogeneizados em um mixer doméstico e em seguida mantidos sob agitação (12.000 rpm por 15 min) em sistema rotor-estator (Ultraturrax T25, IKA). Após esta etapa, a mistura foi centrifugada (10 min a 5.000 rpm, Novatecnica NT825) e o sobrenadante foi coletado e gotejado com auxílio de uma bureta em uma solução aquosa de caseinato de sódio (500 mL, 0,02 g/mL) imersa em banho de gelo a 12.000 rpm para que

a nanoprecipitação ocorresse. A dispersão das nanopartículas foi por fim, seca em estufa a 60°C, recolhida, triturada (gral e pistilo) e mantida sob refrigeração até as análises de caracterização. No caso do extrato não encapsulado, este foi obtido na mesma proporção folhas/etanol/água usada na encapsulação e mesma agitação em rotor-estator, sendo em seguida centrifugado e o sobrenadante seco em estufa nas mesmas condições (Figura 14 (B)). Já a Figura 15, é referente A) as folhas de oliveira utilizadas neste trabalho, B) extrato das folhas de oliveira OLE e C) as NPs produzidas neste trabalho, sendo B) e C) após a etapa de secagem.

Figura 14- Esquema representativo do procedimento utilizado para: (A) a extração/encapsulação do OLE por nanoprecipitação em único passo; (B) Obtenção do OLE não encapsulado



Fonte: Autoria própria

Figura 15 - A) Folhas de oliveira utilizadas neste trabalho, variedades I) Arbequina, II) Arbosana e III) Koroneik. B) Extrato das folhas de oliveira (OLE) após etapa de secagem e C) NPs de zeína contendo OLE após etapa da secagem



Fonte: Autoria própria

Foi determinado o rendimento da extração ($RE \%g_{\text{extrato}}/g_{\text{folhas}}$), relativo ao teor de extrato obtido com relação a massa de folhas de oliveira. Quanto ao rendimento calculado para o processo de produção das nanopartículas (RP), este foi determinado pela relação entre o teor de sólidos coletados ao final do processo, com o teor de sólidos inicialmente introduzidos na primeira etapa: zeína, caseinato de sódio e extrato (determinado a partir de

RE). Foram utilizadas as Equações (1) e (2) respectivamente, onde: V_t é o volume total de solvente utilizado na extração (mL), m_{sa} é a massa de sólidos da alíquota de extrato após a secagem (g), V_a é o volume da alíquota de extrato a ser seca para o cálculo do rendimento (mL), m_f é a massa de folhas utilizada na extração (g), m_{NP} é a massa seca de nanopartículas coletada ao final do processo (g), m_s é a massa de sólidos (zeína e caseinato de sódio) utilizados na extração/encapsulação em único passo (g) e m_{RE} representa a massa de extrato calculada a partir da Equação 1, presente na mesma alíquota de amostra coletada para a análise ao final do processo de extração.

$$RE (\%) = \left(\frac{V_t \cdot m_{sa}}{V_a \cdot m_f} \right) \cdot 100 \quad \text{Equação (1)}$$

$$RP(\%) = \left(\frac{m_{NP}}{m_s + (m_f \cdot RE)} \right) \cdot 100 \quad \text{Equação (2)}$$

4.3 Caracterização do OLE e nanopartículas contendo OLE

Para analisar a interação entre os compostos extraídos/encapsulante foi realizada a análise de FTIR com preparo de pastilhas de KBr que foram analisadas em FTIR IRAffinity-1 (Shimadzu), na faixa de 4000 a 500 cm^{-1} , utilizando 32 acumulações e resolução de 4 cm^{-1} . Foram analisados o OLE, a zeína, caseinato de sódio (NaCas) puros, a mistura física (MF) destes na mesma proporção em que se encontram presentes na formulação das nanopartículas (quantidade de OLE determinado pelo rendimento de extração/encapsulação), além das nanopartículas.

As análises de Calorimetria Diferencial de Varredura e Termogravimétricas foram realizadas em analisador térmico simultâneo (STA 6000, PerkinElmer, EUA). As amostras (de 8 a 10 mg) foram acondicionadas em porta amostra de platina e aquecidas até 600 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹ e atmosfera de nitrogênio (50 mL.min⁻¹). Foram avaliadas amostras de nanopartículas, OLE, zeína, caseinato de sódio e também a MF de zeína, caseinato de sódio e OLE.

Para a avaliação da morfologia das nanopartículas produzidas, realizou-se a análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Para tanto foi preparado um *grid* de cobre com recobrimento de carbono (200 mesh) com uma gota de dispersão de nanopartículas

recém preparadas (antes da secagem em estufa). O grid com a amostra seca foi analisado em um microscópio JEOL modelo JEM 2100, a 200 kV.

A análise de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS - *Dinamic Light Scattering*) foi realizada para determinar o tamanho médio em intensidade (Dz, nm) e o índice de polidispersão (PDI, adimensional) das nanopartículas em um instrumento Malvern Zetasizer – Nano Series. As amostras previamente secas, foram redispersas em água (0,1%p/v) e analisadas em seguida.

4.4 Capacidade antioxidante do OLE e nanopartículas contendo OLE

DPPH como radical livre: a metodologia foi realizada seguindo a metodologia descrita por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), com algumas alterações. Foram adicionados 10 µL de solvente (etanol:água, 80:20) em 140 µL de solução metanólica de DPPH 60 µmol/L (controle negativo) e, 10 µL de amostra (OLE ou nanopartículas em diferentes concentrações) em 140 µL de solução de DPPH, sendo o experimento realizado em triplicata. As soluções ficaram ao abrigo da luz por 30 minutos e então, foi realizada a leitura a 515 nm no leitor de microplacas (Thermo Plate, TP-Reader). A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) foi determinada conforme a Equação 3.

$$\%AA = \frac{(ABS_{controle} - ABS_{amostra})}{ABS_{amostra}} * 100 \quad \text{Equação (3)}$$

Em que $ABS_{controle}$ é a absorbância do controle negativo e $ABS_{amostra}$ é a absorbância da amostra. Os resultados de IC50 foram obtidos utilizando o *software* GraphPadPrism 5 e submetidos ao teste t-Student a um nível de 5% de significância ($p < 0,05$) por meio do *software* Matlab (R2021a).

Método de ABTS: foi avaliada seguindo o método descrito no trabalho de Thaipong et al. (2006). A solução de trabalho foi preparada pela mistura das duas seguintes soluções em quantidades iguais (20 mL cada): solução de 7,4 mmol/L de ABTS e solução 2,6 mmol/L de persulfato de potássio. A mistura reagiu durante 12 horas no escuro. Depois desse período, a solução de trabalho foi preparada com adição de 1 mL desta mistura à 60 mL de metanol. Foi realizada a leitura de absorção da solução de trabalho para verificar se o valor está

próximo de $1,10 \pm 0,02$ em espectrofotômetro UV-Vis (Ocean Optics, Red Tide USB 650 UV) a 734 nm. Sendo assim, para análise propriamente dita, foram misturados 150 μL de solução de OLE ou nanopartículas em diferentes concentrações com 2.850 μL da solução de trabalho em tubos de ensaio, ficando armazenados ao abrigo da luz durante duas horas. Então foram realizadas as leituras das absorbâncias das amostras a 734 nm. Os valores obtidos foram expressos em IC50 em $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Análise do Poder Antioxidante de Redução do Ferro (FRAP): foram feitas 5 soluções: 1) Solução de ácido clorídrico 40 mM - em um balão volumétrico adicionou-se 50 mL de água destilada e 333 μL de HCl (37 %), o balão foi então completado com água ultrapura; 2) Solução de TPZ 10 mM – foram dissolvidos 31,22 mg de TPTZ em 1 mL de HCl e completou-se esta solução com HCl até o volume de 10 mL; 3) Solução de cloreto férrico 20 mM – foram dissolvidos 0,3344 g de cloreto férrico hexahidratado em 100 mL de água destilada; 4) Tampão acetato de sódio 0,3 M com pH 3,6 – Foram dissolvidos 0,755g de acetato de sódio em 230 mL de água ultrapura, o pH foi ajustado para 3,6 com ácido acético glacial aos poucos, a solução foi transferida a um balão volumétrico de 250 mL com água destilada e verificou-se o pH. 5) Complexo-férrico – foram misturados 5 mL da solução TPTZ 10 mM, 4 mL da solução de cloreto férrico 20mM e 50 mL de tampão acetato de sódio 0,3 M. Esta análise foi realizada com as luzes apagadas, foram adicionados 100 μL (0,406 $\text{mg}_{\text{OLE}}/\text{mL}$ e 2,800 $\text{mg}_{\text{NP}}/\text{mL}$) de amostra, 370 μL de água destilada e 3000 μL de complexo férrico para a preparação da amostra e 470 μL de água destilada e 3000 μL de complexo férrico para o controle. Os tubos foram agitados e acondicionados em banho a 37 °C por 30 minutos. A leitura dos espectros foi realizada em UV-Vis a 595nm.

4.5 Aplicação do OLE e nanopartículas contendo OLE como antioxidantes em óleos comestíveis

A concentração de nanopartículas a ser incorporada nos óleos foi definida a partir da concentração recomendada pela RDC n° 281 de abril de 2019 (ANVISA, 2019) para os antioxidantes provenientes do extrato do alecrim (ácido carnósico e carnosol), que é de 30 a 300 $\text{mg}/\text{kg}_{\text{óleo}}$. Sendo o extrato de alecrim um antioxidante natural, e tendo os valores de

referência pela RDC aqui citada, foram então preparadas amostras de óleo contendo nanopartículas nas concentrações de 0, 150, 300 e 450 mg_{nanopartículas}/kg_{óleo}.

Foram também preparadas separadamente amostras de óleo contendo o OLE não encapsulado nas concentrações de 47,1 mg_{extrato}/kg_{óleo}, 94,2 mg_{extrato}/kg_{óleo} e a 141,3 mg_{extrato}/kg_{óleo}, que são referentes à quantidade equivalente de OLE presente nas nanopartículas (concentração de OLE nas nanopartículas determinada em função do rendimento de extração/encapsulação que indicou a concentração real de extrato nas mesmas). As amostras foram codificadas conforme a Tabela 4.

Tabela 4 - Codificação das amostras de óleos comestíveis controle, contendo OLE, nanopartículas contendo OLE e BHT para avaliação da estabilidade oxidativa

Tipo de óleo	Código do Tratamento	Antioxidante	Concentração(mg/kg _{óleo})
	Controle	-	0,0
Palma Palmiste Soja	47,1 NPs	Nanopartículas	47,1*
	94,2 NPs	Nanopartículas	94,2*
	141,3 NPs	Nanopartículas	141,3*
	47,1 OLE	OLE	47,1
	94,2 OLE	OLE	94,2
	141,3 OLE	OLE	141,3
	300 BHT	BHT	300

*Valores referentes à quantidade de OLE presente nas nanopartículas (150, 300 e 450 mg_{nanopartículas}/kg_{óleo}).

Fonte: Autoria própria

No caso dos óleos de palma e palmiste, estes foram aquecidos em banho maria a 40 °C para permitir a homogeneização da mistura, devido ao seu elevado ponto de fusão (óleo de palma de 30 a 40 °C, (SIGMA-ALDRICH, 2021) e óleo de palmiste 20 a 31 °C (LIU *et al.*, 2019).

4.6 Avaliação da estabilidade oxidativa dos óleos comestíveis contendo OLE ou OLE nanoencapsulado

Para verificar o tempo de indução, associado à estabilidade oxidativa dos óleos, foram realizados ensaios no Rancimat (892 Professional Rancimat, Metrohm) das amostras preparadas de acordo com a Tabela 3. Foram acondicionadas 3 g de cada amostra de óleo em

suporte para análise. A temperatura do equipamento foi mantida constante em 131°C, sob fluxo de oxigênio de 20 L.h⁻¹ e os resultados foram obtidos em equivalentes as horas com o auxílio do software StabNet 1.0 (Metrohm, Suíça), avaliando o tempo resultante para a degradação dos óleos a uma temperatura constante. O procedimento foi realizado em duplicata para cada uma das amostras. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey a um nível de 5% de significância ($p < 0,05$) por meio do programa Matlab (R2021a, MathWorks).

4.7 Análise quimiométrica dos dados de estabilidade acelerada de Schaal

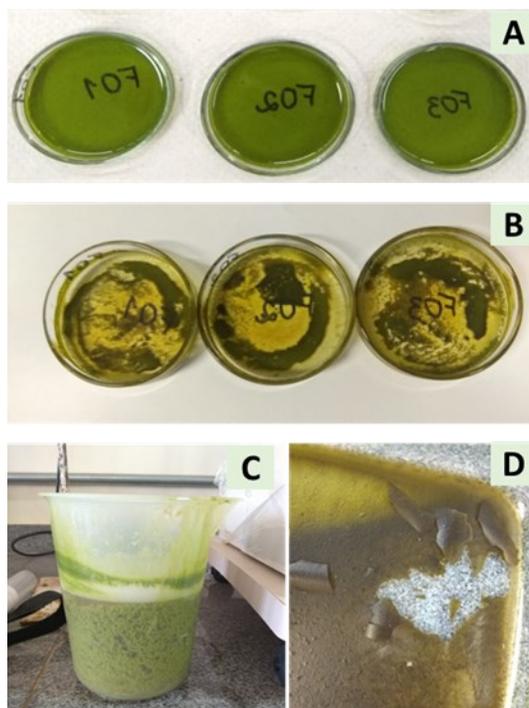
As nanopartículas contendo OLE e o BHT foram aplicados ao óleo de Palmiste a 150 e 300 mg_{nanop}/kg_{óleo} e 300 mg_{BHT}/kg_{óleo}, e acondicionadas em tubos eppendorf abertos (2 mL) em duplicata. As amostras foram levadas à estufa para avaliação da estabilidade acelerada de Schaal (*Schaal Oven Test*) (GUIMARÃES-INÁCIO *et al.*, 2018), onde foram mantidas por 7 dias a 60 °C. As amostras foram analisadas nos tempos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 dias, sendo retirado um tubo eppendorf para cada amostra (duplicatas), em cada dia. Os tubos foram então armazenados protegidos da luz e mantidos a -20 °C até o momento das análises em Espectrofotômetro UV-Vis. Para a obtenção dos espectros foram preparadas, em balão volumétrico, soluções de (1:1000 v:v) do óleo em isoctano. Antes da análise, as soluções foram filtradas com filtros de seringa de PTFE hidrofílico (0,45 µm) e então colocadas em cubeta de quartzo Vis (1 cm de caminho óptico). Foi realizada a varredura dos espectros inteiros, que então tiveram a linha de base corrigida pelo algoritmo *baseline* (software Matlab R2021a, MathWorks) e foram organizados no formato de um tensor de dados tridimensional, onde a ferramenta quimiométrica PARAFAC foi aplicada.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rendimentos de extração e do processo integrado de extração/encapsulação

Os rendimentos da extração (RE) e do processo de nanoencapsulação *in situ* (RP) determinados foram iguais a 27% de extrato com relação à massa de folhas (base úmida) e 69% de nanopartículas recuperadas com relação à massa de sólidos totais teórica no início do processo (considerando a massa de extrato presente na formulação obtida por RE). O rendimento de extrato com relação à massa de folhas em base seca, foi de 28,62%. Na Figura 16 podem ser observadas imagens do extrato obtido após a etapa de centrifugação (A), após a evaporação do solvente onde recupera-se o OLE (B), da mistura obtida ao final do processo de nanoprecipitação (C) as nanopartículas e D) nanopartículas obtidas após secagem do nanoprecipitado.

Figura 16 - A) Extrato após etapa de centrifugação B) extrato após a secagem (OLE), C) mistura final após a etapa da nanoprecipitação, D) nanopartículas obtidas após secagem do nanoprecipitado



Fonte: Autoria própria

Şahin e Şamli (2013) relataram uma melhor extração quando utilizaram como solvente um solução etanol:água (50:50) em relação a extração em etanol puro, a quantidade de extrato relatada foi de 201,2 mg de extrato por grama de folha de oliveira seca. Rosa *et al.* (2021b) encontraram rendimentos que variaram de 10,11 a 61,66 mg/g de folha seca pela extração por homogeneização e no caso da extração por ultrassom os valores variaram de 7,35 e 38,66 mg/g de folha seca. Nos dois casos foram utilizados água e etanol como solvente para extração em diferentes proporções. O rendimento de extração apresentado neste trabalho, foi superior a todos estes que foram relatados na literatura. O único trabalho que apresentou resultado de extração próximo ao deste trabalho foi o de Coppa *et al.* (2017) utilizando como solvente água/etanol obtiveram uma média de $25,94 \pm 0,63$ % de extrato em relação a massa de folhas, resultado cerca de 2% inferior ao deste trabalho.

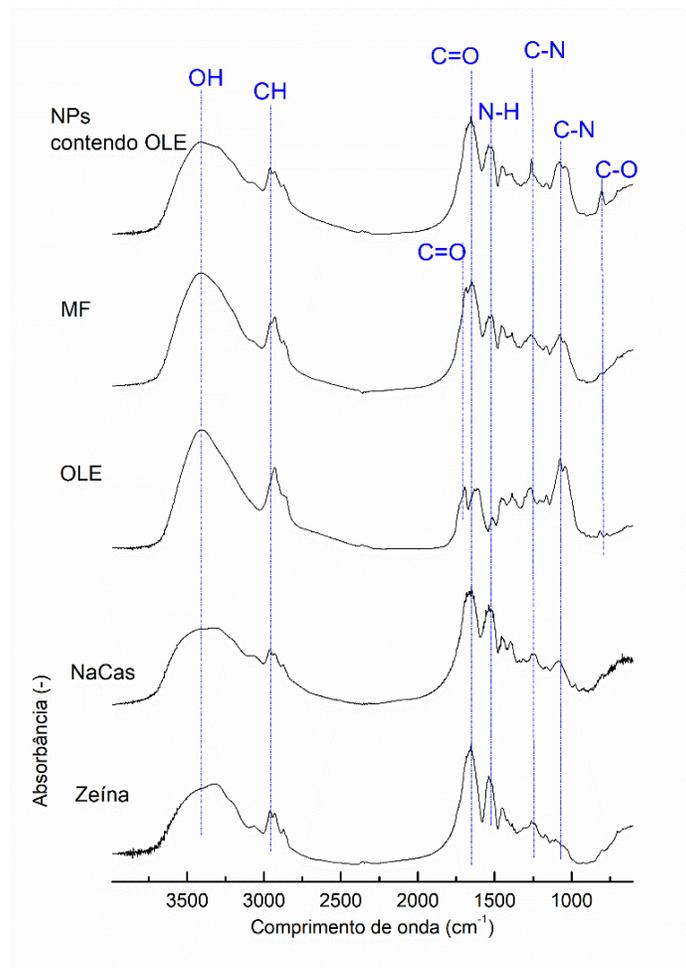
5.2 Caracterização das nanopartículas

5.2.1 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier

Na Figura 17, são mostrados os espectros obtidos para todos os componentes das nanopartículas separadamente, para as nanopartículas e para uma mistura física de todos os componentes das nanopartículas na mesma proporção contida nas nanopartículas.

Em todos os espectros foram identificadas bandas características de -OH, que aparecem na região entre 3600 e 3000 cm^{-1} , bem como bandas características de estiramento -CH em aproximadamente 2920 cm^{-1} , outras bandas encontradas em todos os espectros foram em aproximadamente 1530 cm^{-1} referentes às ligações C=O; 1250 cm^{-1} que estão relacionadas com ligações de amida N-H, e em 1080 cm^{-1} , também relacionadas a amida C-N. Para os espectros de extrato e de mistura física, verificou-se uma banda mais e menos acentuadas em 1700 cm^{-1} , relacionada a C=O presente em compostos fenólicos. No extrato e nas NPS verificou-se uma banda menos e mais acentuadas próximo a 800 cm^{-1} , muito provavelmente referente a ligações C-O.

Figura 17- FTIR dos componentes das NPS, das NPS de uma mistura física dos componentes das NPS na mesma proporção



Fonte: Autoria própria

De acordo com o trabalho de Zhu *et al.* (2021), observando as bandas da zeína, verificou-se bandas em 1633 cm^{-1} e 1520 cm^{-1} , características das amidas I e amida II de estruturas de folha- β presente em fibras. Para Hajjari *et al.* (2021a), foram encontrados resultados similares sendo as absorvâncias observadas na região de OH e atribuíram à água fisicamente absorvida nas respectivas amostras; nas regiões de 1645 , 1517 e 1447 cm^{-1} , as bandas foram relacionadas à grupos amida (N-H), e em 2930 cm^{-1} ao alongamento C-H.

Os resultados de FTIR demonstraram que as bandas características dos grupamentos -OH (3420 cm^{-1}) do extrato da folha de oliveira, bem como do grupamento -NH da zeína (1651 cm^{-1}) tiveram redução na intensidade, quando comparado à zeína pura e MF, indicando

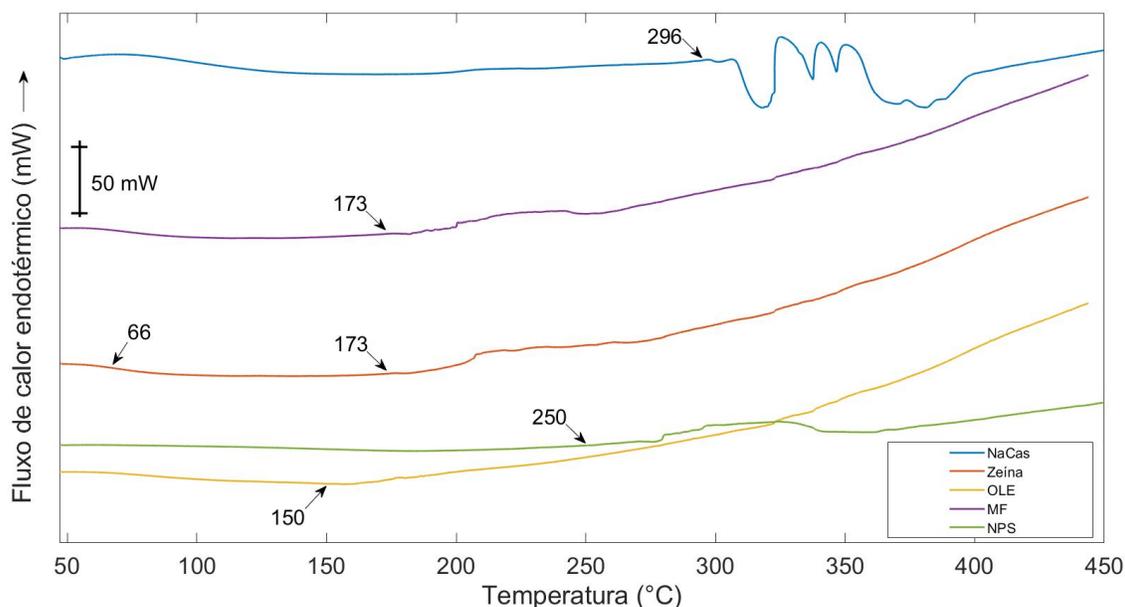
reticulação da zeína pela interação por ligações de hidrogênio com o extrato. Erdogan, Demir e Bayraktar (2015) produziram fibras eletrofiadas de zeína contendo extrato de folhas de oliveira e observaram nos espectros de FTIR o mesmo visto no presente trabalho, indicando que a reticulação da zeína ocorreu devido pela interação com os compostos polifenólicos do extrato. O mesmo efeito já foi observado por outros autores que encapsularam extratos contendo polifenóis em proteínas como gelatina (ZHAO; SUN, 2017) e proteína isolada de soja (DE SOUZA *et al.*, 2020).

A redução na intensidade das bandas localizadas em 2851 e 2928 cm^{-1} (estiramento -CH) indicam a criação de um envoltório de zeína sobre o extrato. O mesmo foi verificado para essa região, no trabalho de Tavares *et al.* (2021), por uma redução de intensidade similar para nanocápsulas de zeína que tiveram suas bandas deslocadas de 2966 cm^{-1} (puras) para 2959 cm^{-1} (carreadas de depois de *Origanum vulgare* Linneus e *Thymus vulgaris*), sendo esta encapsulação também realizada *in situ*.

5.2.2 Caracterização térmica

Os termogramas de DSC da caracterização térmica das amostras são apresentados na Figura 18. A zeína mostrou início da transição térmica em 66 °C e degradação a partir de 173 °C. Hajjari *et al.* (2021) relataram a degradação da zeína entre 250 e 450 °C e relacionaram a com degradação de ligações covalentes internas (FENG *et al.*, 2020a). Além disso, encontraram para zeína, uma transição térmica entre 143 e 186 °C e relacionaram a temperatura a um comportamento de transição vítrea (T_g). No presente trabalho, a transição que se iniciou em 173 °C, valor dentro da faixa de T_g indicada por Feng *et al.* (2020b). Estas variações podem estar associadas à variedade de milho do qual a zeína foi extraída, seu local de cultivo e as condições de tratamento do mesmo, que interferem na estrutura do polímero e conseqüentemente em sua temperatura de degradação térmica.

Figura 18– Curvas de DSC das amostras OLE, NPS contendo OLE, zeína, caseinato de sódio (NaCas) e mistura física (MF) dos três componentes (OLE, zeína e NaCas)



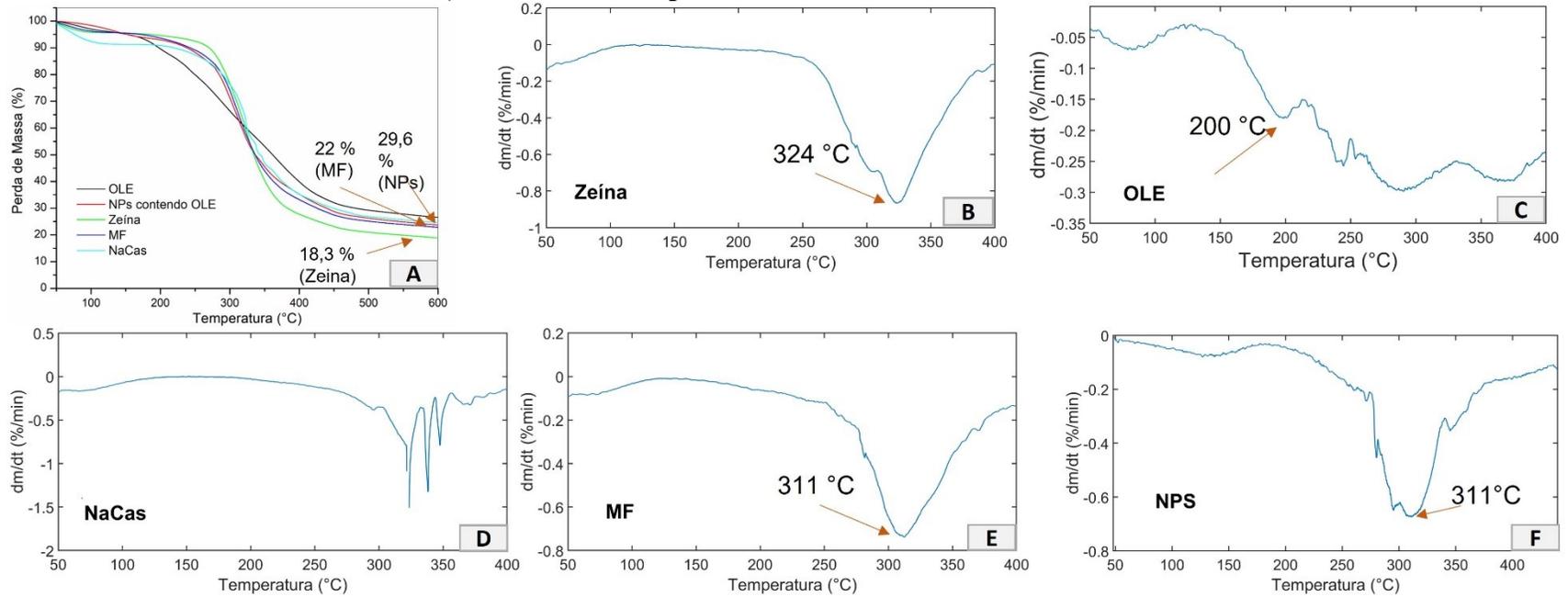
Fonte: Autoria própria

Foi observado que o extrato de folhas de oliveira, apresentou comportamento de transição térmica iniciando em aproximadamente 150 °C. A mistura física dos componentes das nanopartículas (zeína, caseinato de sódio e extrato misturados na mesma proporção em que estava presentes na encapsulação) apresentou um pico de transição térmica em 173 °C, da mesma forma que a zeína pura. Já as nanopartículas apresentaram o primeiro pico de transição em 181°C e início da degradação térmica em 267°C. Conforme relatado por Tavares *et al.* (2021) os compostos fenólicos formam ligações de hidrogênio com a estrutura da zeína, sendo assim, houve reticulação entre os compostos fenólicos do OLE e a zeína, aumentando a estabilidade térmica e indicando a formação da estrutura tridimensional. Além disso, na mistura física é possível detectar a temperatura de degradação do extrato, não observada nas nanopartículas. González-Ortega *et al.* (2020), microencapsularam extrato de folha de oliveira em malto-dextrina e trealose em diferentes proporções através da técnica de *freezy-drying* e encontraram estabilidade entre térmica 111 e 175 °C, ou seja, praticamente 100 °C a menos que os resultados encontrados nos termogramas referentes a nanoencapsulação descrita neste trabalho.

Os resultados de TGA estão apresentados na Figura 19, e para complementar a avaliação dos resultados, as curvas da TGA foram derivadas (1ª derivada, DTGA) e plotadas conforme pode se observar também na Figura 19. Com as curvas de TGA nota-se que a zeína pura apresenta uma massa residual ao final da análise (600 °C) de 18,3 %, a MF de 22 % e as nanopartículas contendo OLE de 29,6 %. Moreno *et al.* (2019) encontrou uma massa residual de fibras eletrofiadas de zeína pura em 600 °C de 17 %. Quando comparadas as massas residuais de MF e nanopartículas, a maior massa determinada para as nanopartículas indica maior resistência à degradação, resultante das ligações formadas na reticulação da zeína com os compostos polifenólicos do extrato (ERDOGAN; DEMIR; BAYRAKTAR, 2015), corroborando com os resultados de FTIR.

Com as curvas da DTGA, ficou mais claro que, o início da degradação térmica do OLE ocorre em torno de 150 °C com máximo em 200 °C, enquanto o início da degradação térmica para a zeína, MF e nanopartículas iniciou em torno de 265 °C. Hajjari *et al.* (2021a), encontraram degradação térmica para a zeína em duas faixas de temperatura, entre 47 e 85 °C (perda de umidade) e entre 295 e 354 °C (degradação das ligações covalentes internas da zeína).

Figura 19 – A) Curvas de perda de massa obtidas por TGA das amostras de OLE, NPs contendo OLE, zeína, caseinato de sódio (NaCas) e mistura física (MF) dos três componentes (OLE, zeína e NaCas). B) DTGA da zeína, C) DTGA do OLE, D) DTGA do caseinato de sódio, E) DTGA da mistura física dos componentes das NPs, na mesma proporção e que se encontram nas NPs e F) DTGA das nanopartículas contendo extrato de folha de oliveira



Fonte: Autoria própria

Ainda pode-se perceber na Figura 19, que os pontos máximos da degradação observados para a zeína e MF foram de 324 °C e 311 °C, respectivamente. As nanopartículas apresentaram a mesma temperatura máxima de degradação que a MF.

Os termogramas obtidos na análise mostram que a zeína possui uma elevada temperatura de início de degradação, indicando uma capacidade de proteger os compostos presentes no extrato de folha de oliveira, e assim ampliar a faixa de temperatura de processamento. Resultados semelhantes foram relatados por Hajjari *et al.* (2021a), que também verificaram o potencial de proteção térmica que a zeína apresenta. Esse potencial de proteção térmica é muito interessante no que diz respeito ao processamento de alimentos uma vez que, uma das principais operações unitárias em alimentos é a utilização de uma fonte de calor, seja para segurança alimentar, seja para aumentar a biodisponibilidade de nutrientes ou simplesmente para trabalhar os diferentes sabores e aromas que um alimento pode oferecer.

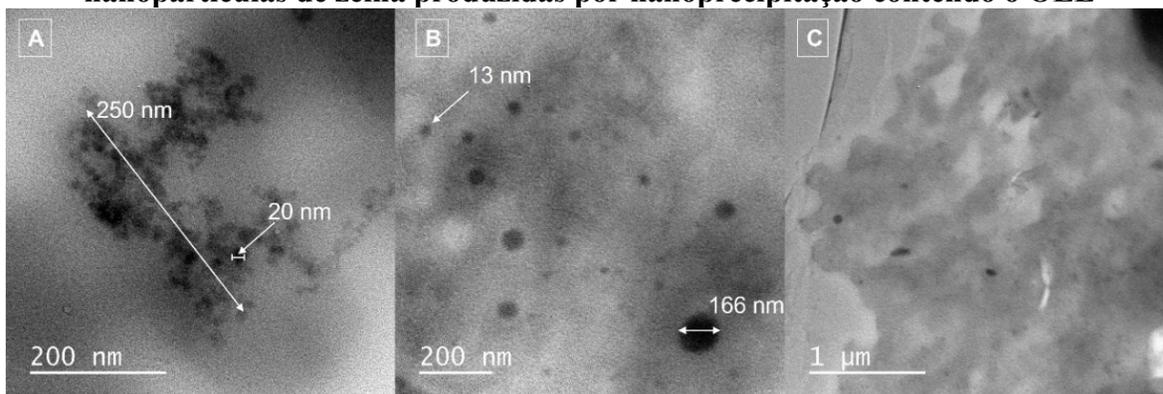
5.2.3 Caracterização morfológica e de tamanho de partícula

Os resultados da análise de DLS indicaram um índice de polidispersão (PDI) de $0,9 \pm 0,1$ e um diâmetro médio D_z igual a $638,5 \pm 55,8$ nm, sendo considerado um diâmetro médio elevado e uma larga distribuição de tamanhos (LEIMANN *et al.*, 2013). Tais resultados são superiores aos encontrados por Lemes *et al.* (2017c) que nanoencapsularam curcumina em zeína pela mesma técnica, obtendo um D_z igual a 190 ± 2 nm e PDI de $0,25 \pm 0,01$. Calliari *et al.* (2020a) nanoencapsulou o extrato de hibisco em zeína, também por nanoprecipitação e encontrou valores iguais a 216 ± 27 nm e $0,25 \pm 0,02$ para D_z e PDI, respectivamente. A diferença provavelmente se deve principalmente ao processo de extração encapsulação *in situ*, uma vez que a zeína possivelmente interage de maneira diferente com os compostos extraídos e também com os sólidos das folhas de oliveira durante esta etapa. Além disso, é possível que haja ainda a presença de partículas resultantes do processo de cisalhamento das folhas, que porventura não tenham sido separadas completamente na etapa de centrifugação, previamente à nanoprecipitação na solução de caseinato de sódio.

Na Figura 20, são apresentados os resultados das imagens da MET, que mostraram estruturas esféricas e de tamanho variando de 13 a 166 nm, contudo é possível verificar a

presença de grandes agregados destas nanopartículas. Na Figura 19 (A) nota-se que um aglomerado de aproximadamente 250 nm é formado por nanopartículas menores, da faixa de 20 nm. Na imagem da Figura 19 (C) nota-se um grande aglomerado, de aproximadamente 12 μm . Estes resultados reforçam a hipótese de que a interação entre os componentes durante o processo de extração/encapsulação pode ter afetado o tamanho das nanopartículas.

Figura 20 - Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) das nanopartículas de zeína produzidas por nanoprecipitação contendo o OLE



Fonte: Autoria própria

No trabalho de Silva *et al.* (2017b), onde foram utilizadas a mesma técnica de nanoencapsulação, mesmo material de parede (zeína) e mesmo surfactante (caseinato de sódio) para encapsularem luteína, foi encontrada uma morfologia muito semelhante com as apresentadas aqui, pela MET os tamanhos das partículas variaram entre 80 e 600 nm, intervalo um pouco maior do que o encontrado aqui para as nanopartículas de extrato de folhas de oliveira, enquanto que o DLS apresentou um tamanho médio de 242 ± 2 nm.

5.3 Capacidade antioxidante do OLE e nanopartículas contendo OLE

Os resultados referentes à capacidade antioxidante do OLE e nanopartículas contendo OLE estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Capacidade antioxidante das amostras por DPPH e ABTS expressos em termos de IC50 e FRAP em μmol equivalente em trolox (ET) por grama de amostra

	OLE	Nanopartículas contendo OLE
DPPH IC50 ($\text{mg}_{\text{amostra}}/\text{mL}$)	0,597 ^a \pm 0,009	2,502 ^b \pm 0,024
ABTS IC50 ($\text{mg}_{\text{amostra}}/\text{mL}$)	0,136 ^a \pm 0,015	0,675 ^b \pm 0,004
FRAP ($\mu\text{mol}_{\text{ET}}/\text{g}_{\text{amostra}}$)	4249,9 ^b \pm 25,7	412,8 ^a \pm 9,9

*Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste t-Student.

Fonte: Autoria própria

Avaliando os resultados obtidos, nota-se que as duas amostras apresentaram capacidade antioxidante. Nota-se que, tanto para o DPPH quanto para o ABTS, o extrato puro apresentou cerca de 5 vezes maior capacidade antioxidante, quando comparado com o extrato nanoencapsulado. Verificou-se ainda que, a concentração, tanto de OLE, quanto de nanopartículas, foi bastante inferior para a inibição de sequestro de radical livre para ABTS em relação ao DPPH.

No trabalho de Nobari Azar *et al.* (2021) o extrato de folha de oliveira foi nanoencapsulado em uma emulsão líquido-líquido, onde o extrato de folha de oliveira estava solubilizado em água, que foi gotejada na fase oleosa composta de manteiga de cacau e azeite, esta emulsão foi congelada a fim de obter-se cristais lipídicos. Neste caso a análise de DPPH foi feita no dia 1 e 30, para verificar a atividade antioxidante ao longo do tempo de armazenamento, o grupo não demonstrou os resultados não IC₅₀, porém verificaram que a atividade antioxidante do extrato de folha de oliveira regrediu 6% durante o intervalo, enquanto nas nanopartículas a redução foi apenas de 3%, e justificaram este comportamento pela liberação gradual dos compostos antioxidantes das nanocápsulas. Rikhtehgaran *et al.* (2021), fizeram um teste de liberação para nanopartículas de caseína contendo extrato de folha de oliveira em três simuladores de alimentos gordurosos, relataram que a nas primeiras três horas a taxa de liberação foi menor e que após essas horas iniciais, a liberação foi gradual ao longo do tempo (tempo total de análise – 90 horas).

A atividade antioxidante verificada ao longo deste trabalho, pode ser considerada bastante atrativa quando comparada com outros compostos antioxidantes e outras matrizes carreadoras como é o caso de nanopartículas de PVP contendo curcumina, que apresentaram

IC₅₀ com a concentração de 813 mg.mL⁻¹ no trabalho de Almeida *et al.* (2018b), e de nanopartículas de ouro, contendo extrato de *Turbinaria decurrens* Bory (*T. decurrens* - uma macroalga marrom marinha egípcia espalhada ao longo da costa do mar vermelho) apresentaram IC₅₀ de ABTS com 49,38 ± 0,42 µg.mL⁻¹ e para o DPPH com 33,02 ± 0,65 µg.mL⁻¹ no trabalho de Hasan *et al.* (2022). Já no trabalho de Lins *et al.* (2018) foi realizada nas folhas de oliveira, uma pré-extração em soxhlet com n-hexano para remoção de compostos hidrofóbicos, posteriormente foi feita uma extração em metanol:água (80:20_{v/v}) com agitação de 170 rpm e foi encontrado o IC₅₀ na concentração de 16,1 ± 1,2 µg.mL⁻¹, comparando com esta pesquisa verifica-se que o grupo de Lins *et al.* (2018), conseguiu utilizar uma menor concentração de extrato de folha de oliveira para alcançar o IC₅₀, entretanto vale ressaltar que o solvente utilizado foi uma solução metanol:água, que pode induzir uma extração de diferentes compostos fenólicos, e pode também oferecer toxicidade quando ingerido, sendo então um solvente não aplicável para os fins deste trabalho, que tem como objetivo a utilização de solventes renováveis e atóxicos que não oferecem risco a saúde humana, afim da aplicação em alimentos.

Aliyari *et al.* (2021) realizaram a extração apenas com água na proporção de 1:20 (folhas de oliveira com umidade < 1% : água), e adicionaram na proporção de 0,5 1, 1,5 e 2,5 em uma solução de caseinato de sódio, formando uma emulsão sólido/líquido, o grupo verificou um IC₅₀ para o ABTS na concentração de 5 mg.mL⁻¹, ou seja, resultado semelhante ao IC₅₀ das nanopartículas deste trabalho em relação ao ABTS. O mesmo grupo também verificou para estas emulsões, a atividade antioxidante em relação ao DPPH, em nenhuma das concentrações estudadas foi alcançado o IC₅₀, a amostra que chegou mais próxima de 50% de inibição de atividade oxidativa foi a que continha 2 mg.mL⁻¹, apresentando cerca de 43% de atividade antioxidante.

Os resultados de FRAP da Tabela 5, corroboram com as capacidades antioxidantes determinadas por ABTS e DPPH, indicando neste caso, que o OLE apresenta uma capacidade antioxidante aproximadamente dez vezes maior que o OLE nanoencapsulado. Lins *et al.* (2018), relataram a capacidade antioxidante de extrato de folha de oliveira (onde o solvente metanol/água (80:20, v/v) foi utilizado na extração), pela análise FRAP, foi de 281,8 ± 22,8 mg_{TE}/g. Para fins de comparação é o equivalente a 1125 µmol_{TE}/g_{amostra}, Este valor, é menor se comparado ao resultado do OLE para esta análise, neste trabalho, porém maior quando

comparado ao OLE encapsulado, em que se determinou $412,8 \mu\text{mol}_{\text{TE}}/\text{g}_{\text{amostra}}$. Ainda sobre esses resultados, é importante ressaltar que no trabalho de Lins *et al.* (2018) os autores utilizaram uma concentração de $20000 \mu\text{g}/\text{mL}$ de OLE, enquanto que a concentração de OLE da análise deste trabalho foi de $0,1170 \mu\text{g}/\text{mL}$ e das NPs foi de $0,8069 \mu\text{g}/\text{mL}$, ou seja, o grupo precisou de uma concentração muito maior de extrato de folha de oliveira para alcançar um resultado aproximado (intermediário entre OLE e NPs) aqui apresentados. Esses resultados diferentes podem ser atribuídos ao tipo de solvente utilizados para extração dos compostos da folha de oliveira.

A diferença de atividade antioxidante entre os extratos de folha de oliveira, ainda pode ser justificada pela época de colheita das folhas, sua espécie ou ainda condições do solo e região de cultivo, que podem ser mais propícios ao desenvolvimento de conteúdo antioxidante (LINS *et al.*, 2018). No trabalho de Elnahas *et al.* (2021) foi citado que a composição fitoquímica e conteúdo do extrato das folhas de oliveira são fortemente influenciados pelo genótipo, por fatores ambientais e agronômicos e também pelo dos sistemas de processamento das folhas. Sendo assim, cada cultivar e cada região de cultivo, oferecem uma determinada quantidade de antioxidantes, maior ou menor de acordo com as condições tanto intrínsecas quanto extrínsecas.

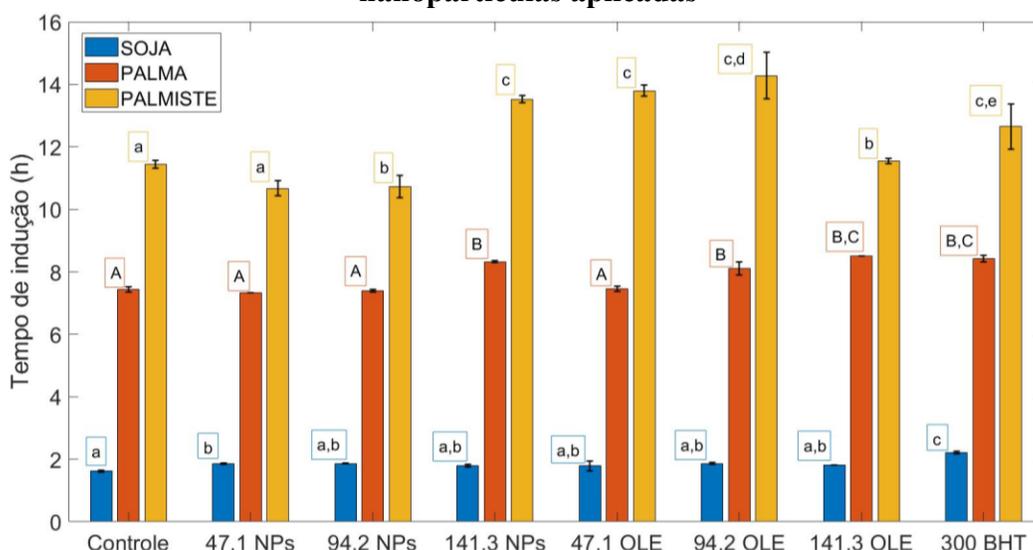
5.4 Aplicação das nanopartículas em óleos comestíveis

Na Figura 21, são apresentados os resultados determinados para o tempo de indução dos óleos de soja, palma e palmiste determinados pelo método Rancimat. É possível notar que dentre os óleos, independentemente do antioxidante avaliado, o óleo de soja apresentou menor tempo de indução, seguido do óleo de palma e por fim pelo óleo de palmiste. Esta diferença está relacionada à composição de ácidos graxos de tais óleos. Geralmente, os óleos comestíveis com maior grau de insaturação são mais suscetíveis à oxidação lipídica. O óleo de soja é tipificado por cerca de 20% de ácidos graxos saturados (KIM *et al.*, 2010), o de palma por 44% de ácidos graxos saturados (XIA *et al.*, 2019), já o óleo de palmiste possui cerca de 80% destes (NAINGGOLAN; SINAGA, 2021).

Referente as amostras de óleo de soja, o que apresentou maior tempo de indução oxidativa foi a amostra contendo BHT ($300 \text{mg}_{\text{BHT}}/\text{kg}_{\text{óleo}}$), com uma média de 2,21 horas.

Nenhuma das demais amostras apresentou semelhança estatisticamente com o óleo contendo BHT. Os demais tempos de indução encontrados apresentaram semelhança estatística entre si, além de apresentarem-se semelhantes ao tempo de indução da amostra controle (sem antioxidantes). Ou seja, nas concentrações avaliadas, o OLE e as nanopartículas contendo OLE não foram capazes de melhorar a estabilidade oxidativa do óleo de soja.

Figura 21- Tempo de indução determinado para os óleos de soja, palma e palmiste incorporados com BHT, OLE e nanopartículas contendo OLE em diferentes concentrações. Concentrações de OLE são equivalentes à proporção de OLE nas nanopartículas aplicadas



*Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. As comparações foram feitas entre os tratamentos diferentes para cada tipo de óleo separadamente.

Fonte: Autoria própria

Mohammadi *et al.* (2016b) nanoencapsularam por nanoemulsão extrato de folha de oliveira e aplicaram-no em óleo de soja nas concentrações de 100, 200 e 300 $\text{mg}_{\text{nanopartículas}}/\text{kg}$, e do extrato puro separadamente. Os autores verificaram pela análise de Rancimat, que as amostras contendo o extrato de folha de oliveira puro (sem nanoencapsular) apresentaram maior tempo de indução oxidativa, e explicaram o fato, pela possibilidade de que em amostras de óleo contendo antioxidantes encapsulados, possivelmente a camada dos biopolímeros em torno de gotículas de emulsão dispersa estão cobrindo os antioxidantes dentro deles e evitam sua atividade antioxidante em amostras de óleo.

Os resultados das análises do óleo de palma mostraram o maior tempo de indução oxidativa para a amostra contendo OLE não encapsulado na concentração de 141,3 mg_{OLE}/kg, sendo de 8,51 horas, além disso esta foi estatisticamente igual ($p > 0,05$) à amostra contendo BHT. Levando em conta que a concentração de extrato é metade da concentração de BHT utilizada, o resultado mostra um efeito significativo da ação antioxidante do extrato não encapsulado.

As amostras com menor tempo de indução oxidativa foram as controle, contendo nanopartículas nas concentrações de 47,1 e 94,2 mg_{OLE}/kg, bem como OLE não encapsulado a 47,1 mg_{OLE}/kg, sendo todas estatisticamente iguais ($p > 0,05$). No trabalho de De Leonardis e Macciola (2012), os autores encontraram um tempo de indução oxidativa para o óleo de palma, sem adição de antioxidante, de 7,35 horas, nas mesmas condições deste trabalho, 130 °C e fluxo de 20L.h⁻¹ de oxigênio, tempo ligeiramente menor, que o encontrado nesta pesquisa.

Para o óleo de palmiste, a amostra contendo OLE não encapsulado a 94,2 mg_{OLE}/kg, foi a que apresentou maior estabilidade oxidativa, chegando a 14,28 horas para o tempo de indução, sendo este o melhor resultado entre todas as amostras, superando inclusive o tempo de indução oxidativa verificado para a concentração de BHT (300 mg_{BHT}/kg_{óleo}). Pela análise estatística ($p > 0,05$), as amostras contendo nanopartículas em concentração de 141,3 mg_{OLE}/kg (13,52 h), OLE não encapsulado a 47,1 mg_{OLE}/kg (13,8 h) e BHT na concentração de 300 mg/kg apresentaram semelhança estatística com esta amostra. Assim como no caso do óleo de Palma, uma amostra natural apresentou resultado significativo para a preservação da oxidação lipídica.

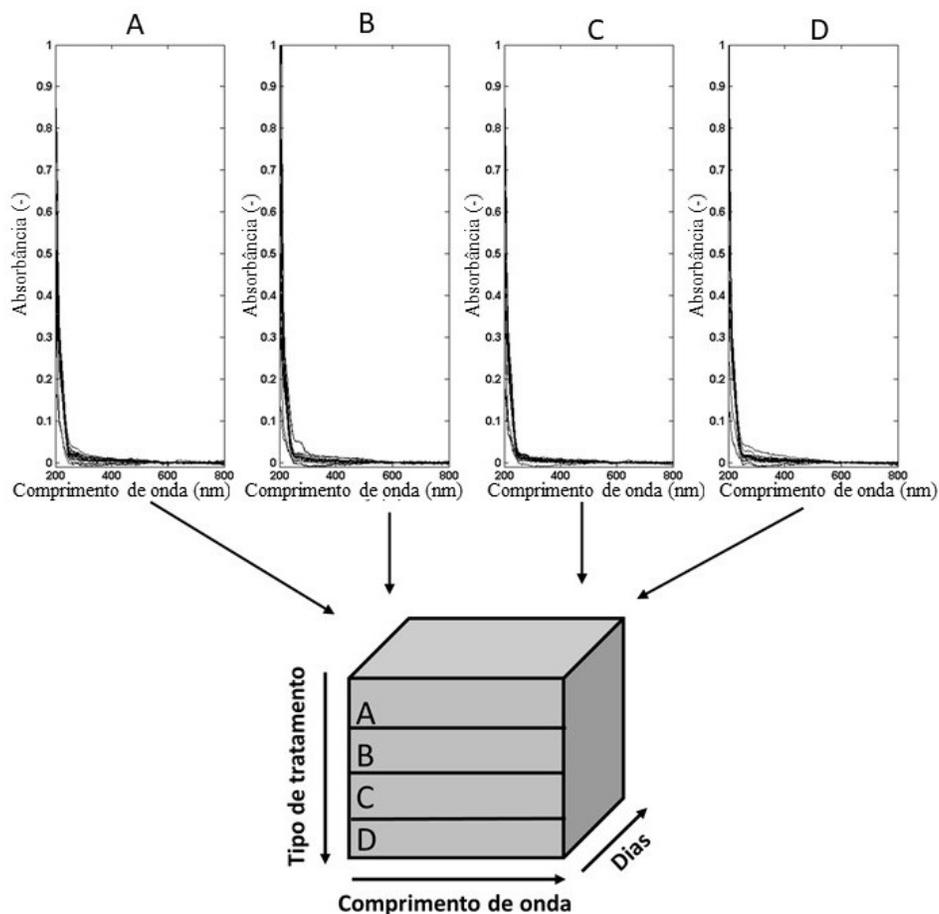
Entre os três tipos de óleos aqui analisados, de soja, de palma e de palmiste, este último foi o que apresentou maior tempo de oxidação. Essa estabilidade se deve à alta estabilidade oxidativa do óleo de palmiste devido a uma baixa proporção de ácidos graxos poli-insaturados (CERÓN *et al.*, 2018). Neste sentido, os antioxidantes naturais aqui avaliados (OLE e OLE nanoencapsulado) foram capazes de estabilizar de forma mais efetiva a oxidação do óleo de palmiste. Possivelmente para os óleos de soja e de palma, seja necessária uma maior concentração de antioxidantes para alcançar um resultado significativo.

5.5 Estabilidade oxidativa de Schaal e PARAFAC

O ensaio *Schaal Oven Test* foi realizado com a aplicação das nanopartículas no óleo de palmiste, na Figura 22, observa-se os espectros na região do UV-Vis, ao longo do tempo, das amostras de óleo sem antioxidante (A), com nanopartículas na concentração de 150 mg/kg óleo (B), com nanopartículas na concentração de 300 mg/kg óleo (C) e com BHT na concentração de 300 mg/kg óleo (D). Estes espectros tiveram sua linha de base corrigidas pelo algoritmo *baseline* e foram organizados no formato de um tensor de dados tridimensional, onde a ferramenta quimiométrica PARAFAC foi aplicada.

O tensor (Figura 22), com dimensões de 4 x 601 x 16, refere-se ao tipo de tratamento da amostra (2 concentrações de nanopartículas, 1 concentração de BHT e óleo sem antioxidantes) e dias (7 dias) nos quais os espectros foram adquiridos, respectivamente. Na deconvolução do tensor através da PARAFAC foram utilizados três fatores (GONÇALVES et al., 2018a; VIEIRA; REGITANO-D'ARCE, 1998a).

Figura 22 - Organização dos dados para aplicação da PARAFAC. (A) óleo sem antioxidante; (B) óleo com nanopartículas 150 mg/kg óleo; (C) óleo com nanopartículas 300 mg/kg óleo; (D) óleo com BHT 300 mg/kg óleo



Fonte: Autoria própria

Os resultados alcançados pela PARAFAC são apresentados na Figura 23. Nos *scores* fator 1 (Figura 23a) observa-se que os óleos sem antioxidante e os óleos com nanopartículas na concentração de 150 mg/kg óleo (tratamentos A e B, respectivamente) são semelhantes, enquanto os óleos com nanopartículas na concentração de 300 mg/kg óleo são mais parecidos com os óleos com BHT na concentração de 300 mg/Kg óleo (tratamentos C e D, respectivamente). Avaliando os *loadings* relativo ao modo espectral no fator 1 (Figura 22c), observa-se que se trata de produtos de oxidação primária (Monoeno 190 nm, α -Ácido cetônico 210 nm, Dieno 220-230 nm, Aldeído cetônico 220-250 nm) (GONÇALVES et al., 2018; VIEIRA; REGITANO-D'ARCE, 1998). De acordo com os *loadings* relativo aos dias de análise no fator 1 (Figura 23b), verifica-se uma redução desses produtos de oxidação ao

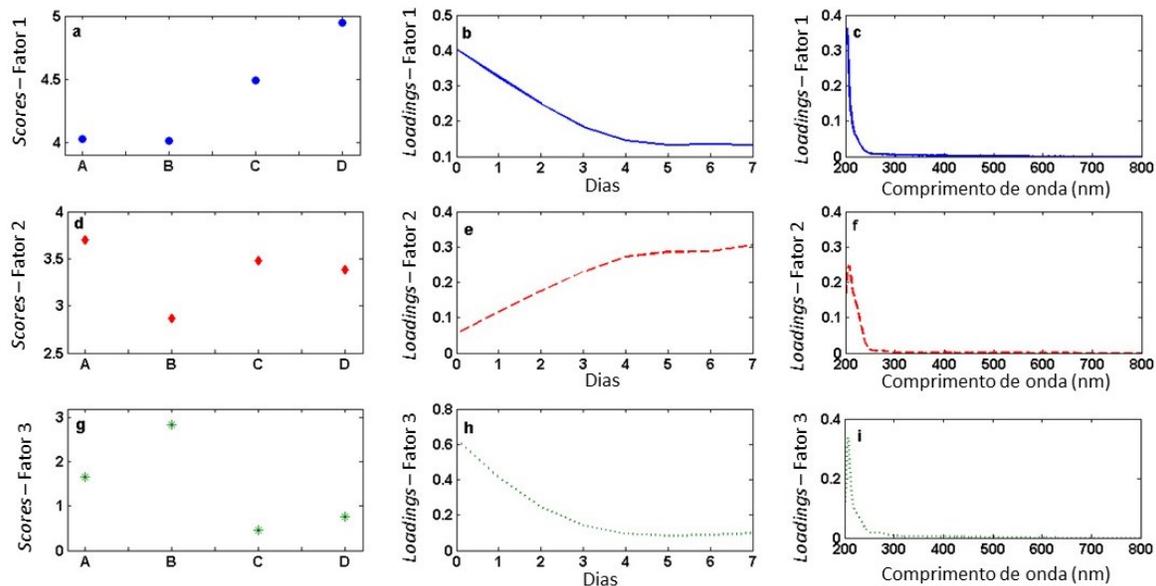
longo dos dias de exposição do óleo à temperatura, sendo que a partir do quarto dia esses produtos de oxidação primária desaparecem.

Nos *scores* do fator 2 (Figura 23d) é possível inferir que os tratamentos com 300 mg_{nanopart.}/kg_{óleo} (C) e 300 mg_{BHT}/kg_{óleo} (D) também apresentam efeitos semelhantes sobre as amostras. Por outro lado, a amostra de óleo com nanopartículas na concentração de 150 mg/kg óleo teve comportamento oposto, o que sugere que nesta concentração pode ter provocado um efeito pró-oxidante (GONÇALVES et al., 2018a; VIEIRA; REGITANO-D'ARCE, 1998a).

Os *loadings* relativo ao modo espectral no fator 2 (Figura 22f) referem-se a produtos de oxidação que vão se formando ao longo dos dias de exposição das amostras à temperatura de 60 °C (*loadings* relativo aos dias de análise no fator 2 – Figura 22e). De acordo com a literatura (GONÇALVES et al., 2018; VIEIRA; REGITANO-D'ARCE, 1998), trata-se dos produtos de oxidação relativo aos compostos α,β etileno (310 – 330 nm), Trieno (265 – 270 nm); Aldeído Cetônico (265 – 280 nm), β -Dicetona (274 nm), α -Dicetona (280 nm) e α -Cetoaldeído (282 nm).

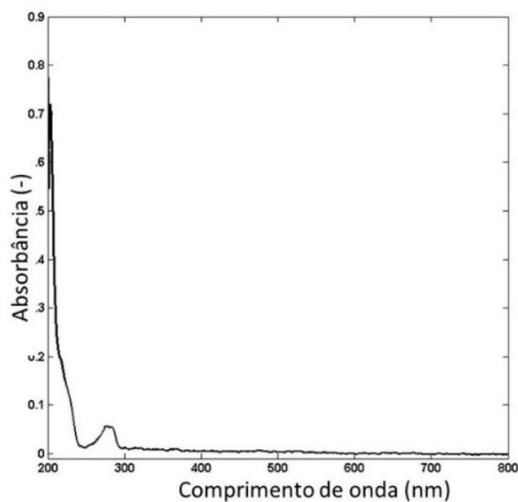
O fator 3 é caracterizado também por semelhanças entre os tratamentos 300 mg_{nanopart.}/kg_{óleo} (C) e 300 mg_{BHT}/kg_{óleo} (D) e o comportamento oposto para o tratamento 150 mg_{nanopart.}/kg_{óleo} (B) (*scores* do fator 3 – Figura 23g). Nos *loadings* relativo aos dias de análise no fator 3 (Figura 22h) observa-se que a concentração do constituinte responsável por este fator vai reduzindo ao longo dos dias de exposição das amostras. Ao avaliar os *loadings* relativo ao modo espectral no fator 3 (Figura 23i) observa-se que trata do perfil espectral de antioxidantes, em conformidade com o espectro do BHT na Figura 24.

Figura 23 - Resultados da PARAFAC (a) scores no fator 1 ‘●’; (b) loadings relativo aos dias de análise no fator 1 ‘—’; (c) loadings do modo espectral no fator 1 ‘—’. (d) scores no fator 2 ‘◆’; (e) loadings relativo aos dias de análise no fator 2 ‘---’; (f) loadings do modo espectral no fator 2 ‘---’. (g) scores no fator 3 ‘*’; (h) loadings relativo aos dias de análise no fator 2 ‘...’; (i) loadings do modo espectral no fator 3 ‘...’



Fonte: autoria própria

Figura 24 - Espectro do BHT em isotctano na concentração de 0,001 mg/mL



Fonte: autoria própria

Os resultados evidenciados pela avaliação dos espectros UV-Vis ao longo do tempo, com a ferramenta PARAFAC mostram maior estabilidade oxidativa para os tratamentos 300 mg_{nanopart.}/kg_{óleo} (C) e 300 mg_{BHT}/kg_{óleo} (D) e comportamento diferente para o tratamento 150 mg_{nanopart.}/kg_{óleo} (B).

6 CONCLUSÕES

Com este trabalho foi possível verificar o rendimento do extrato puro (cerca de 27% em base úmida e 29% em base seca) e do extrato nanoencapsulado (69%), esses valores são altos se comparados com os valores encontrados na literatura, o que confere uma vantagem na utilização da técnica aqui apresentada. Através da análise dos espectros de FTIR das nanopartículas e seus componentes separadamente, bem como a MF, foi possível identificar as principais bandas características de compostos fenólicos presentes nos componentes, foi constatada a presença de ligações -OH, C=C, C=O, C-O N-H, e C-N, que são muito características de anéis aromáticos presente em compostos fenólicos. Foi verificado também o deslocamento de algumas bandas no espectro, especialmente as de C=O, C-O, N-H, C-N, o que significa que houve reticulação entre a zeína e os compostos fenólicos do extrato nas NPs. Pelas análises de termogravimétricas, DSC e TGA, verificou-se um aumento de mais de 100°C na estabilidade do extrato de folha de oliveira, quando comparado o extrato puro com o extrato nanoencapsulado, e um aumento também na estabilidade de perda de massa em 265 °C de 24% de perda para 15%. Esses resultados são muito competitivos no que se diz respeito a aplicação em alimentos, pois geralmente possuem temperatura de processamento menores que 200°C.

Na morfologia das NPs, foi possível constatar pela análise DLS um índice de polidispersão (PDI) que indicou uma larga distribuição de tamanhos, e tamanho de partículas em intensidade acima de 600 nm. Para fins visuais, a MET mostrou estruturas esféricas e de tamanho homogêneo, contudo muitos aglomerados de nanopartículas.

Para confirmar na prática, a funcionalidade do potencial antioxidante do OLE e do OLE nanoencapsulado, estes foram adicionados em diferentes óleos comestíveis e tiveram o tempo de indução oxidativa avaliado por rancimat. Os resultados dessa análise confirmaram o poder antioxidante do extrato de folha de oliveira e das nanopartículas produzidas nesta pesquisa, principalmente para o óleo de palmiste. Contudo, para os óleos de soja e de palma, que possuem um maior teor de ácidos graxos poli-insaturados, uma maior concentração de antioxidantes naturais pode ser necessária para resultar em uma maior estabilidade.

As análises atividade antioxidante confirmaram o poder antioxidante que o extrato de folha de oliveira oferece e demonstraram a capacidade de liberação gradativa da atividade

antioxidante nas nanopartículas, o que contribui para um aumento do tempo de prateleira. No caso deste trabalho a matriz alimentar que mais apresentou estabilidade oxidativa após a adição das nanopartículas, foi o óleo de palmiste, inclusive tendo resultados superiores ao antioxidante sintético aqui usado para fins de comparação se levarmos em consideração a concentração de OLE em relação a concentração de BHT inseridos na amostra.

Os resultados das análises de ABTS, DPPH e FRAP demonstraram boa capacidade de inibição de oxidação pelo extrato e nanopartículas, com IC50 comparável com demais encontrados na literatura.

A análise Rancimat evidenciou uma melhor performance das nanopartículas quando aplicadas ao óleo de palmiste, na concentração de 300 mg/kg de óleo, apresentando resultados similares ao efeito da aplicação do antioxidante sintético BHT na concentração de 300 mg/kg.

O método PARAFAC evidenciou, o que já havia sido discutido nas análises anteriores, de que os óleos com tratamento A (sem adição de antioxidante) e os óleos com o tratamento B (concentração de 150 mg/kg) são semelhantes, enquanto os óleos com nanopartículas na concentração de 300 mg/kg óleo são mais parecidos com os óleos com BHT na concentração de 300 mg/Kg óleo (tratamentos C e D, respectivamente), confirmando que as nanopartículas de zeína contendo extrato de folha de oliveira podem oferecer atividade antioxidante semelhante ao BHT, quando presente na concentração de 300mg/Kg nos óleos de soja, palma e palmiste.

A extração/nanoencapsulação aqui utilizada mostrou que é possível proteger os compostos ativos presentes nas folhas de oliveira, conferindo proteção térmica e garantindo ação antioxidante. Conclui-se então que as nanopartículas aqui produzidas são verdadeiramente promissoras para aplicação em alimentos, uma vez que cumpriram com a proposta apresentada, além de serem atóxicas e comestíveis.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como foi observado durante a pesquisa, as nanopartículas de zeína contendo extrato de folha de oliveira são promissores antioxidantes para aplicação em óleos comestíveis. Para

complementação desta pesquisa, de acordo com os resultados observados neste trabalho, seria interessante repetir as análises com maior concentração de nanopartículas a fim de conferir o efeito na atividade antioxidante de acordo com a concentração de partículas. Também seria interessante, realizar as análises com nanopartículas de zeína sem a introdução de extrato de folha de oliveira, para comparar o efeito antioxidante que poderia ser atribuído a própria zeína. Outra análise bastante atrativa do ponto de vista da pesquisa, seria realizar o perfil dos compostos fenólicos (neste caso, em andamento) a fim de correlacionar os compostos com a atividade antioxidante aqui conferida.

REFERÊNCIAS

- ABI-KHATTAR, A. M.; RAJHA, H. N.; ABDEL-MASSIH, R. M.; HABCHI, R.; MAROUN, R. G.; DEBS, E.; LOUKA, N. “Intensification of Vaporization by Decompression to the Vacuum” (IVDV), a novel technology applied as a pretreatment to improve polyphenols extraction from olive leaves. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 342, n. Ivdv, p. 128236, 2021.
- ADEL, A. M.; IBRAHIM, A. A.; EL-SHAFEI, A. M.; AL-SHEMY, M. T. Inclusion complex of clove oil with chitosan/ β -cyclodextrin citrate/oxidized nanocellulose biocomposite for active food packaging. **Food Packaging and Shelf Life**, [s. l.], 2019.
- ALBUQUERQUE, B. R.; DIAS, M. I.; PEREIRA, C.; PETROVIĆ, J.; SOKOVIĆ, M.; CALHELHA, R. C.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; FERREIRA, I. C. F. R.; BARROS, L. Valorization of *Sicanaodorifera* (Vell.) Naudin Epicarp as a Source of Bioactive Compounds: Chemical Characterization and Evaluation of Its Bioactive Properties. **Foods**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 700, 2021.
- ALIYARI, M. A.; SALAMI, M.; HOSSEINI, E.; EMAM-DJOMEH, Z.; KARBOUNE, S.; WAGLAY, A. Biophysical, Rheological, and Functional Properties of Complex of Sodium Caseinate and Olive Leaf Aqueous Polyphenolic Extract Obtained Using Ultrasound-Assisted Extraction. **Food Biophysics**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 325–336, 2021.
- ALIZADEH SANI, M.; TAVASSOLI, M.; SALIM, S. A.; AZIZI-LALABADI, M.; MCCLEMENTS, D. J. Development of green halochromic smart and active packaging materials: TiO₂ nanoparticle- and anthocyanin-loaded gelatin/ κ -carrageenan films. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 124, p. 107324, 2022.
- ALLIX, B. **Olea europaea subsp. europaea var. europaea – Oliveira**. [S. l.], 2020. Disponível em: <http://www.arvoresearbustosdeportugal.com/portfolio-item/oliveira-olea-europaea-subsp-europaea-var-europaea/>. Acesso at: 1 Sep. 2021.
- ALMEIDA, H. H. S.; BARROS, L.; BARREIRA, J. C. M.; CALHELHA, R. C.; HELENO, S. A.; SAYER, C.; MIRANDA, C. G.; LEIMANN, F. V.; BARREIRO, M. F.; FERREIRA, I. C. F. R. Bioactive evaluation and application of different formulations of the natural colorant curcumin (E100) in a hydrophilic matrix (yogurt). **Food Chemistry**, [s. l.], v. 261, p. 224–232, 2018a.
- ALMEIDA, H. H. S.; BARROS, L.; BARREIRA, J. C. M.; CALHELHA, R. C.; HELENO, S. A.; SAYER, C.; MIRANDA, C. G.; LEIMANN, F. V.; BARREIRO, M. F.; FERREIRA, I. C. F. R. Bioactive evaluation and application of different formulations of the natural colorant curcumin (E100) in a hydrophilic matrix (yogurt). **Food Chemistry**, [s. l.], v. 261, p. 224–232, 2018b.

ALTEMIMI, A. A Study of the Protective Properties of Iraqi Olive Leaves against Oxidation and Pathogenic Bacteria in Food Applications. **Antioxidants**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 34, 2017.

ANVISA, A. N. de V. S. **RESOLUÇÃO - RDC Nº 281, DE 29 DE ABRIL DE 2019**. Diário Oficial da União - Brasil: [s. n.], 2019.

AZARPAZHOOH, E.; SHARAYEI, P.; ZOMORODI, S.; RAMASWAMY, H. S. Physicochemical and Phytochemical Characterization and Storage Stability of Freeze-dried Encapsulated Pomegranate Peel Anthocyanin and In Vitro Evaluation of Its Antioxidant Activity. **Food and Bioprocess Technology**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 199–210, 2019.

AZIMI, B.; NOURPANAH, P.; RABIEE, M.; ARBAB, S. Producing Gelatin Nanoparticles as Delivery System for Bovine Serum Albumin. **Iranian Biomedical Journal**, [s. l.], v. 17, p. 34–40, 2014.

BAHLOUL, N.; KECHAOU, N.; MIHOUBI, N. B. Comparative investigation of minerals, chlorophylls contents, fatty acid composition and thermal profiles of olive leaves (*Olea europaea* L.) as by-product. **Grasas y Aceites**, [s. l.], v. 65, p. 9, 2014.

BASTOS, D. H. M.; ROGERO, M. M.; ARÊAS, A. G. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade Effects of dietary bioactive compounds on obesity induced inflammation. **Arq Bras Endocrinol Metab**, [s. l.], v. 53, 2009.

BERNARDI, B.; FALCONE, G.; STILLITANO, T.; BENALIA, S.; BACENETTI, J.; DE LUCA, A. I. Harvesting system sustainability in Mediterranean olive cultivation: Other principal cultivar. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 766, n. xxxx, p. 142508, 2021.

BERTOLINO, V.; CAVALLARO, G.; MILIOTO, S.; LAZZARA, G. Polysaccharides/Halloysite nanotubes for smart bionanocomposite materials. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 245, p. 116502, 2020.

BIGI, F.; HAGHIGHI, H.; SIESLER, H. W.; LICCIARDELLO, F.; PULVIRENTI, A. Characterization of chitosan-hydroxypropyl methylcellulose blend films enriched with nettle or sage leaf extract for active food packaging applications. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 120, p. 106979, 2021.

BORJAN, D.; LEITGEB, M.; KNEZ, Ž.; HRNČIČ, M. K. Microbiological and Antioxidant Activity of Phenolic Compounds in Olive Leaf Extract. **Molecules**, [s. l.], v. 25, n. 24, p. 5946, 2020.

BOTOSOA, E. P.; KAROUI, R. 3D front face fluorescence spectroscopy as a tool for monitoring the oxidation level of edible vegetable oil during storage at 60 °C. **LWT**, [s. l.], v. 154, p. 112659, 2022.

CALLIARI, C. M.; CAMPARDELLI, R.; PETTINATO, M.; PEREGO, P. Encapsulation of Hibiscus sabdariffa Extract into Zein Nanoparticles. **Chemical Engineering and Technology**, [s. l.], v. 43, n. 10, p. 2062–2072, 2020.

CARVALHO, A. S. de; REZENDE, S. C. de; CALEJA, C.; PEREIRA, E.; BARROS, L.; FERNANDES, I.; MANRIQUE, Y. A.; GONÇALVES, O. H.; FERREIRA, I. C. F. R.; BARREIRO, M. F. β -Carotene colouring systems based on solid lipid particles produced by hot melt dispersion. **Food Control**, [s. l.], v. 129, p. 108262, 2021.

CAVALHEIRO, C. V.; ROSSO, V. D.; PAULUS, E.; CICHOSKI, A. J.; WAGNER, R.; DE MENEZES, C. R.; BARIN, J. S. Composição química de folhas de oliveira (*Olea europaea* L.) da região de caçapava do Sul, RS. **Ciencia Rural**, [s. l.], v. 44, p. 1874-1879, 2014.

CERÓN, A. A.; VILAS BOAS, R. N.; BIAGGIO, F. C.; DE CASTRO, H. F. Synthesis of biolubricant by transesterification of palm kernel oil with simulated fusel oil: Batch and continuous processes. **Biomass and Bioenergy**, [s. l.], v. 119, n. October, p. 166–172, 2018.

CHAKROUN, D.; GRIGORAKIS, S.; LOUPASSAKI, S.; MAKRIS, D. P. Enhanced-performance extraction of olive (*Olea europaea*) leaf polyphenols using L-lactic acid/ammonium acetate deep eutectic solvent combined with β -cyclodextrin: screening, optimisation, temperature effects and stability. **Biomass Conversion and Biorefinery**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 1125–1136, 2021.

CHANDRA, P.; SHARMA, R. K.; ARORA, D. S. Antioxidant compounds from microbial sources: A review. **Food Research International**, [s. l.], v. 129, p. 108849, 2020.

CHIOU, A.; KALOGEROPOULOS, N.; EFSTATHIOU, P.; PAPOUTSI, M.; ANDRIKOPOULOS, N. K. French Fries oleuropein content during the successive deep frying in oils enriched with an olive leaf extract. **International Journal of Food Science & Technology**, [s. l.], v. 48, n. 6, p. 1165–1171, 2013.

CHUTIA, H.; MAHANTA, C. L. Properties of starch nanoparticle obtained by ultrasonication and high pressure homogenization for developing carotenoids-enriched powder and Pickering nanoemulsion. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, [s. l.], v. 74, p. 102822, 2021.

CLÁUDIO, A. F. M.; COGNIGNI, A.; DE FARIA, E. L. P.; SILVESTRE, A. J. D.; ZIRBS, R.; FREIRE, M. G.; BICA, K. Valorization of olive tree leaves: Extraction of oleanolic acid using aqueous solutions of surface-active ionic liquids. **Separation and Purification Technology**, [s. l.], v. 204, p. 30–37, 2018.

COPPA, C. F. S. C.; ROSIM, R. E.; DE OLIVEIRA, C. A. F.; DA COSTA RODRIGUES, C. E.; GONÇALVES, C. B. **Extração de oleuropeína a partir de folhas de oliveira utilizando solvente hidroalcoólico**. [S. l.: s. n.], 2017.

COUTINHO, E. F.; CAPPELLARO, T. H.; RIBEIRO, F. C.; HAERTER, J. A. Introdução e Importância Econômica. **Sistemas de Produção: Cultivo de Oliveira (*Olea europaea* L.)**, [s. l.], v. 16, p. 125, 2009.

DA ROSA, C. G.; DE OLIVEIRA, M. V. B. M.; DE CARVALHO, S. M.; DE MELO, A. P. Z.; JUMMES, B.; DA SILVA, T.; MARTELLI, S. M.; VILLETTI, M. A.; BERTOLDI, F. C.; BARRETO, P. L. M. Characterization and evaluation of physicochemical and antimicrobial properties of zein nanoparticles loaded with phenolics monoterpenes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [s. l.], v. 481, p. 337–344, 2015.

DA ROSA, G. S.; VANGA, S. K.; GARIEPY, Y.; RAGHAVAN, V. Comparison of microwave, ultrasonic and conventional techniques for extraction of bioactive compounds from olive leaves (*Olea europaea* L.). **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, [s. l.], v. 58, p. 102234, 2019.

DAUDT, R. M.; EMANUELLI, J.; KÜLKAMP-GUERREIRO, I. C.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. A nanotecnologia como estratégia para o desenvolvimento de cosméticos. **Ciência e Cultura**, [s. l.], v. 65, 2013.

DE ALMEIDA, M. M. C.; FRANCISCO, C. R. L.; DE OLIVEIRA, A.; DE CAMPOS, S. S.; BILCK, A. P.; FUCHS, R. H. B.; GONÇALVES, O. H.; VELDERRAMA, P.; GENENA, A. K.; LEIMANN, F. V. Textural, Color, Hygroscopic, Lipid Oxidation, and Sensory Properties of Cookies Containing Free and Microencapsulated Chia Oil. **Food and Bioprocess Technology**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 926–939, 2018.

DE FREITAS, T. B.; SANTOS, C. H. K.; DA SILVA, M. V.; SHIRAI, M. A.; DIAS, M. I.; BARROS, L.; BARREIRO, M. F.; FERREIRA, I. C. F. R.; GONÇALVES, O. H.; LEIMANN, F. V. Antioxidants extraction from Pinhão (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze) coats and application to zein films. **Food Packaging and Shelf Life**, [s. l.], v. 15, n. March 2019, p. 28–34, 2018.

DE LEONARDIS, A.; MACCIOLA, V. Heat-oxidation stability of palm oil blended with extra virgin olive oil. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 135, n. 3, p. 1769–1776, 2012.

DE MOURA, S. C. S. R.; BERLING, C. L.; GERMER, S. P. M.; ALVIM, I. D.; HUBINGER, M. D. Encapsulating anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* L. calyces by ionic gelation: Pigment stability during storage of microparticles. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 241, p. 317–327, 2018.

DE SOUZA, K. C.; CORREA, L. G.; DA SILVA, T. B. V.; MOREIRA, T. F. M.; DE OLIVEIRA, A.; SAKANAKA, L. S.; DIAS, M. I.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F. R.; VALDERRAMA, P.; LEIMANN, F. V.; SHIRAI, M. A. Soy Protein Isolate Films Incorporated with Pinhão (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze) Extract for Potential

Use as Edible Oil Active Packaging. **Food and Bioprocess Technology**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 998–1008, 2020.

DIFONZO, G.; RUSSO, A.; TRANI, A.; PARADISO, V. M.; RANIERI, M.; PASQUALONE, A.; SUMMO, C.; TAMMA, G.; SILLETTI, R.; CAPONIO, F. Green extracts from Coratina olive cultivar leaves: Antioxidant characterization and biological activity. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 31, p. 63–70, 2017.

DIFONZO, G.; PASQUALONE, A.; SILLETTI, R.; COSMAI, L.; SUMMO, C.; PARADISO, V. M.; CAPONIO, F. Use of olive leaf extract to reduce lipid oxidation of baked snacks. **Food Research International**, [s. l.], v. 108, p. 48–56, 2018.

DOBRINČIĆ, A.; REPAJIĆ, M.; GAROFULIĆ, I. E.; TUĐEN, L.; DRAGOVIĆ-UZELAC, V.; LEVAJ, B. Comparison of Different Extraction Methods for the Recovery of Olive Leaves Polyphenols. **Processes**, [s. l.], v. 8, n. 9, p. 1008, 2020.

DOMÍNGUEZ, R.; PATEIRO, M.; GAGAOUA, M.; BARBA, F. J.; ZHANG, W.; LORENZO, J. M. A Comprehensive Review on Lipid Oxidation in Meat and Meat Products. **Antioxidants**, [s. l.], v. 8, n. 10, p. 429, 2019.

DOS SANTOS, P. D. F.; FRANCISCO, C. R. L.; COQUEIRO, A.; LEIMANN, F. V.; PINELA, J.; CALHELHA, R. C.; PORTO INEU, R.; FERREIRA, I. C. F. R.; BONA, E.; GONÇALVES, O. H. The nanoencapsulation of curcuminoids extracted from: *Curcuma longa* L. and an evaluation of their cytotoxic, enzymatic, antioxidant and anti-inflammatory activities. **Food and Function**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 573–582, 2019.

ELNAHAS, R. A.; ELWAKIL, B. H.; ELSHEWEMI, S. S.; OLAMA, Z. A. Egyptian *Olea europaea* leaves bioactive extract: Antibacterial and wound healing activity in normal and diabetic rats. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 427–434, 2021.

ERDOGAN, I.; DEMIR, M.; BAYRAKTAR, O. Olive leaf extract as a crosslinking agent for the preparation of electrospun zein fibers. **Journal of Applied Polymer Science**, [s. l.], v. 132, n. 4, p. n/a-n/a, 2015.

FELLOWS, P. J. **Food processing technology**. [S. l.]: Woodhead Publishing Limited, 2009.

FENG, S.; WANG, D.; GAN, L.; SHAO, P.; JIANG, L.; SUN, P. Preparation and characterization of zein/pectin-based phytosterol nanodispersions and kinetic study of phytosterol release during simulated digestion in vitro. **LWT**, [s. l.], v. 128, p. 109446, 2020.

FERREIRA-SANTOS, P.; GENISHEVA, Z.; BOTELHO, C.; ROCHA, C.; ANTÓNIO TEIXEIRA, J. Valorization of Natural Antioxidants for Nutritional and Health Applications. **Antioxidants [Working Title]**, [s. l.], n. March, 2021.

FLAMMINI, F.; DI MATTIA, C. D.; DIFONZO, G.; NERI, L.; FAIETA, M.; CAPONIO, F.; PITTIA, P. From by-product to food ingredient: evaluation of compositional and technological properties of olive-leaf phenolic extracts. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [s. l.], v. 99, n. 14, p. 6620–6627, 2019.

FLEMMIG, J.; RUSCH, D.; CZERWIŃSKA, M. E.; RAUWALD, H. W.; ARNHOLD, J. Components of a standardised olive leaf dry extract (Ph. Eur.) promote hypothiocyanite production by lactoperoxidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 549, p. 17–25, 2014.

FOOD INGREDIENTES BRASIL (FIB). Os Tipos e os Efeitos da Rancidez Oxidativa. **Food Ingredients**, N°29, [s. l.], p. 38–45, 2014.

FRANCISCO, C. R. L.; HELENO, S. A.; FERNANDES, I. P. M.; BARREIRA, J. C. M.; CALHELHA, R. C.; BARROS, L.; GONÇALVES, O. H.; FERREIRA, I. C. F. R.; BARREIRO, M. F. Functionalization of yogurts with *Agaricus bisporus* extracts encapsulated in spray-dried maltodextrin crosslinked with citric acid. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 245, n. September 2017, p. 845–853, 2018.

FREIBERGER, E. B.; KAUFMANN, K. C.; BONA, E.; HERMES DE ARAÚJO, P. H.; SAYER, C.; LEIMANN, F. V.; GONÇALVES, O. H. Encapsulation of roasted coffee oil in biocompatible nanoparticles. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 64, n. 1, p. 381–389, 2015.

GAGLIARDI, A.; PAOLINO, D.; COSTA, N.; FRESTA, M.; COSCO, D. Zein- vs PLGA-based nanoparticles containing rutin: A comparative investigation. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 118, n. August 2020, p. 111538, 2021.

GARCIA, J. A. A.; CORRÊA, R. C. G.; BARROS, L.; PEREIRA, C.; ABREU, R. M. V.; ALVES, M. J.; CALHELHA, R. C.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M.; FERREIRA, I. C. F. R. Chemical composition and biological activities of Juçara (*Euterpe edulis* Martius) fruit by-products, a promising underexploited source of high-added value compounds. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 55, p. 325–332, 2019.

GARDENIA. *Olea europaea* (Common Olive). [S. l.], 2021.

GHELICHKHANI, G.; MODARESI, M. H.; RASHIDI, L.; SHARIATIFAR, N.; HOMAPOUR, M.; ARABAMERI, M. Effect of the spray and freeze dryers on the bioactive compounds of olive leaf aqueous extract by chemometrics of HCA and PCA. **Journal of Food Measurement and Characterization**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 2751–2763, 2019.

GHOMARI, O.; MERZOUKI, M.; BENLEMLIH, M. Optimization of bioconversion of oleuropein, of olive leaf extract, to hydroxytyrosol by *Nakazawaea molendini-olei* using HPLC-UV and a method of experimental design. **Journal of Microbiological Methods**, [s. l.], v. 176, 2020.

GIACOMETTI, J.; ŽAUHAR, G.; ŽUVIĆ, M. Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Major Phenolic Compounds from Olive Leaves (*Olea europaea* L.) Using Response Surface Methodology. **Foods**, [s. l.], v. 7, n. 9, p. 149, 2018.

GÓMEZ-MEJÍA, E.; RORIZ, C. L.; HELENO, S. A.; CALHELHA, R.; DIAS, M. I.; PINELA, J.; ROSALES-CONRADO, N.; LEÓN-GONZÁLEZ, M. E.; FERREIRA, I. C. F. R.; BARROS, L. Valorisation of black mulberry and grape seeds: Chemical characterization and bioactive potential. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 337, p. 127998, 2021.

GONÇALVES, T. R.; ROSA, L. N.; GONÇALVES, R. P.; TORQUATO, A. S.; MARÇO, P. H.; MARQUES GOMES, S. T.; MATSUSHITA, M.; VALDERRAMA, P. Monitoring the Oxidative Stability of Monovarietal Extra Virgin Olive Oils by UV–Vis Spectroscopy and MCR–ALS. **Food Analytical Methods**, [s. l.], v. 11, n. 7, p. 1936–1943, 2018.

GONZÁLEZ-ORTEGA, R.; FAIETA, M.; DI MATTIA, C. D.; VALBONETTI, L.; PITTIA, P. Microencapsulation of olive leaf extract by freeze-drying: Effect of carrier composition on process efficiency and technological properties of the powders. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 285, p. 110089, 2020.

GRAMZA-MICHALOWSKA, A.; SIDOR, A.; HES, M. HERB EXTRACT INFLUENCE ON THE OXIDATIVE STABILITY OF SELECTED LIPIDS. **Journal of Food Biochemistry**, [s. l.], v. 35, n. 6, p. 1723–1736, 2011.

GUIMARÃES-INÁCIO, A.; FRANCISCO, C. R. L.; ROJAS, V. M.; LEONE, R. de S.; VALDERRAMA, P.; BONA, E.; LEIMANN, F. V.; TANAMATI, A. A. C.; GONÇALVES, O. H. Evaluation of the oxidative stability of chia oil-loaded microparticles by thermal, spectroscopic and chemometric methods. **LWT**, [s. l.], v. 87, p. 498–506, 2018.

HAJJARI, M. M.; GOLMAKANI, M.-T.; SHARIF, N.; NIAKOUSARI, M. In-vitro and in-silico characterization of zein fiber incorporating cuminaldehyde. **Food and Bioproducts Processing**, [s. l.], v. 128, p. 166–176, 2021.

HASAN, E. A.; EL-HASHASH, M. A.; ZAHRAN, M. K.; EL-RAFIE, H. M. Comparative study of chemical composition, antioxidant and anticancer activities of both *Turbinaria decurrens* Bory methanol extract and its biosynthesized gold nanoparticles. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], v. 67, p. 103005, 2022.

HERNÁNDEZ-NAVA, R.; LÓPEZ-MALO, A.; PALOU, E.; RAMÍREZ-CORONA, N.; JIMÉNEZ-MUNGUÍA, M. T. Encapsulation of oregano essential oil (*Origanum vulgare*) by complex coacervation between gelatin and chia mucilage and its properties after spray drying. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 109, p. 106077, 2020.

HOLST, B.; WILLIAMSON, G. Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. **Current Opinion in Biotechnology**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 73–82, 2008.

IRAKLI, M.; CHATZOPOULOU, P.; EKATERINIADOU, L. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds: Oleuropein, phenolic acids, phenolic alcohols and flavonoids from olive leaves and evaluation of its antioxidant activities. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 124, p. 382–388, 2018.

KAUR, J.; KAUR, G.; SHARMA, S.; JEET, K. Cereal starch nanoparticles-A prospective food additive: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], v. 58, n. 7, p. 1097–1107, 2018.

KIM, J.; KIM, D. N.; LEE, S. H.; YOO, S.-H.; LEE, S. Correlation of fatty acid composition of vegetable oils with rheological behaviour and oil uptake. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 118, n. 2, p. 398–402, 2010.

KO, E. Y.; NILE, S. H. Effect of different cooking methods on S-Alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides profile and antiplatelet activity of onion. **South African Journal of Botany**, [s. l.], 2021.

KRITIKOU, E.; KALOGIOURI, N. P.; KOLYVIRA, L.; THOMAIDIS, N. S. Target and Suspect HRMS Metabolomics for the Determination of Functional Ingredients in 13 Varieties of Olive Leaves and Drupes from Greece. **Molecules (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 25, n. 21, 2020.

LAMA-MUÑOZ, A.; DEL MAR CONTRERAS, M.; ESPÍNOLA, F.; MOYA, M.; ROMERO, I.; CASTRO, E. Characterization of the lignocellulosic and sugars composition of different olive leaves cultivars. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 329, n. April, p. 127153, 2020a.

LAMA-MUÑOZ, A.; CONTRERAS, M. del M.; ESPÍNOLA, F.; MOYA, M.; ROMERO, I.; CASTRO, E. Content of phenolic compounds and mannitol in olive leaves extracts from six Spanish cultivars: Extraction with the Soxhlet method and pressurized liquids. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 320, p. 126626, 2020b.

LAMA-MUÑOZ, A.; DEL MAR CONTRERAS, M.; ESPÍNOLA, F.; MOYA, M.; DE TORRES, A.; ROMERO, I.; CASTRO, E. Extraction of oleuropein and luteolin-7-O-glucoside from olive leaves: Optimization of technique and operating conditions. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 293, p. 161–168, 2019.

LAVADO, G.; LADERO, L.; CAVA, R. Cork oak (*Quercus suber* L.) leaf extracts potential use as natural antioxidants in cooked meat. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 160, n. July, p. 1–9, 2021.

LE CORRE, D.; ANGELLIER-COUSSY, H. Preparation and application of starch nanoparticles for nanocomposites: A review. **Reactive and Functional Polymers**, [s. l.], v. 85, p. 97–120, 2014.

LEIMANN, V. F.; GONÇALVES, O. H.; SORITA, G. D.; REZENDE, S.; BONA, E.; FERNANDES, I. P. M.; FERREIRA, I. C. F. R.; BARREIRO, M. F. Heat and pH stable

curcumin-based hydrophilic colorants obtained by the solid dispersion technology assisted by spray-drying. **Chemical Engineering Science**, [s. l.], v. 205, p. 248–258, 2019.

LEIMANN, F. v.; CARDOZO FILHO, L.; SAYER, C.; ARAÚJO, P. H. H. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) nanoparticles prepared by a miniemulsion/solvent evaporation technique: effect of phbv molar mass and concentration. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 369–377, 2013.

LEMES, G. F.; MARCHIORE, N. G.; MOREIRA, T. F. M.; DA SILVA, T. B. V.; SAYER, C.; SHIRAI, M. A.; GONÇALVES, O. H.; GOZZO, A. M.; LEIMANN, F. V. Enzymatically crosslinked gelatin coating added of bioactive nanoparticles and antifungal agent: Effect on the quality of Benitaka grapes. **LWT**, [s. l.], v. 84, p. 175–182, 2017.

LFITAT, A.; ZEJLI, H.; BOUSRAF, F. Z.; BOUSSELHAM, A.; EL ATKI, Y.; GOURCH, A.; LYOUSSI, B.; ABDELLAOUI, A. Comparative assessment of total phenolics content and in vitro antioxidant capacity variations of macerated leaf extracts of *Olea europaea* L. and *Argania spinosa* (L.) Skeels. **Materials Today: Proceedings**, [s. l.], v. 45, p. 7271–7277, 2021.

LI, Q.; LU, J.; CHANG, Y.; SHEN, G.; FENG, J. Effect of different cooking methods on nutritional intake and different storage treatments on nutritional losses of abalone. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 377, p. 132047, 2022.

LI, S.; HUANG, L.; ZHANG, B.; CHEN, C.; FU, X.; HUANG, Q. Fabrication and characterization of starch/zein nanocomposites with pH-responsive emulsion behavior. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 112, n. August 2020, p. 106341, 2020a.

LI, H.; WANG, D.; LIU, C.; ZHU, J.; FAN, M.; SUN, X.; WANG, T.; XU, Y.; CAO, Y. Fabrication of stable zein nanoparticles coated with soluble soybean polysaccharide for encapsulation of quercetin. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 87, p. 342–351, 2019.

LIANG, Q.; REN, X.; ZHANG, X.; HOU, T.; CHALAMAIAH, M.; MA, H.; XU, B. Effect of ultrasound on the preparation of resveratrol-loaded zein particles. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 221, p. 88–94, 2018.

LIANG, Z.; HAN, Dongfang; HAN, F.; WU, Z.; ZHAO, X.; FU, W.; WANG, W.; HAN, Dongxue; NIU, L. Novel strategy of natural antioxidant nutrition quality evaluation in food: Oxidation resistance mechanism and synergistic effects investigation. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 359, p. 129768, 2021.

LINS, P. G.; MARINA PICCOLI PUGINE, S.; SCATOLINI, A. M.; DE MELO, M. P. In vitro antioxidant activity of olive leaf extract (*Olea europaea* L.) and its protective effect on oxidative damage in human erythrocytes. **Heliyon**, [s. l.], v. 4, n. 9, p. e00805, 2018.

LIU, C.; MENG, Z.; CHAI, X.; LIANG, X.; PIATKO, M.; CAMPBELL, S.; LIU, Y. Comparative analysis of graded blends of palm kernel oil, palm kernel stearin and palm stearin. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 286, p. 636–643, 2019.

LORENZO, J. M.; VARGAS, F. C.; STROZZI, I.; PATEIRO, M.; FURTADO, M. M.; SANT'ANA, A. S.; ROCCHETTI, G.; BARBA, F. J.; DOMINGUEZ, R.; LUCINI, L.; DO AMARAL SOBRAL, P. J. Influence of pitanga leaf extracts on lipid and protein oxidation of pork burger during shelf-life. **Food Research International**, [s. l.], v. 114, p. 47–54, 2018.

MAHALAKSHMI, L.; LEENA, M. M.; MOSES, J. A.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Micro- and nano-encapsulation of β -carotene in zein protein: size-dependent release and absorption behavior. **Food & Function**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 1647–1660, 2020.

MAPAS MUNDI. [S. l.], 2021. Disponível em: <https://www.mapasmundi.com.br>. Acesso em: 11 de março de 2021

MARTÍNEZ RIVAS, C. J.; TARHINI, M.; BADRI, W.; MILADI, K.; GREIGE-GERGES, H.; NAZARI, Q. A.; GALINDO RODRÍGUEZ, S. A.; ROMÁN, R. Á.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 532, n. 1, p. 66–81, 2017.

MARTÍNEZ-PATIÑO, J. C.; GULLÓN, B.; ROMERO, I.; RUIZ, E.; BRNČIĆ, M.; ŽLABUR, J. Š.; CASTRO, E. Optimization of ultrasound-assisted extraction of biomass from olive trees using response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s. l.], v. 51, p. 487–495, 2019.

MASZEWSKA, M.; FLOROWSKA, A.; DŁUŻEWSKA, E.; WRONIAK, M.; MARCINIAK-LUKASIAK, K.; ŻBIKOWSKA, A. Oxidative Stability of Selected Edible Oils. **Molecules**, [s. l.], v. 23, n. 7, p. 1746, 2018.

MIRANDA, J. M.; MARTÍNEZ, B.; PÉREZ, B.; ANTÓN, X.; VÁZQUEZ, B. I.; FENTE, C. A.; FRANCO, C. M.; RODRÍGUEZ, J. L.; CEPEDA, A. The effects of industrial pre-frying and domestic cooking methods on the nutritional compositions and fatty acid profiles of two different frozen breaded foods. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 43, n. 8, p. 1271–1276, 2010.

MOHAMMADI, A.; JAFARI, S. M.; ESFANJANI, A. F.; AKHAVAN, S. Application of nano-encapsulated olive leaf extract in controlling the oxidative stability of soybean oil. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 190, p. 513–519, 2016a.

MONTENEGRO-LANDÍVAR, M. F.; TAPIA-QUIRÓS, P.; VECINO, X.; REIG, M.; VALDERRAMA, C.; GRANADOS, M.; CORTINA, J. L.; SAURINA, J. Fruit and vegetable processing wastes as natural sources of antioxidant-rich extracts: Evaluation of advanced extraction technologies by surface response methodology. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 105330, 2021.

MORENO, M. A.; ORQUEDA, M. E.; GÓMEZ-MASCARAQUE, L. G.; ISLA, M. I.; LÓPEZ-RUBIO, A. Crosslinked electrospun zein-based food packaging coatings containing bioactive chilito fruit extracts. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 95, p. 496–505, 2019.

MORENO, J. A. O. **Modelización del ciclo fenológico reproductor del olivo (Olea europaea L.)**. 2014. 21–22 f. TESIS DOCTORAL - UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA, Córdoba, ESP, 2014.

MOURTZINOS, I.; ANASTASOPOULOU, E.; PETROU, A.; GRIGORAKIS, S.; MAKRIS, D.; BILIADERIS, C. G. Optimization of a green extraction method for the recovery of polyphenols from olive leaf using cyclodextrins and glycerin as co-solvents. **Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 53, n. 11, p. 3939–3947, 2016.

MÜCKE, N.; DA SILVA, T. B. V.; DE OLIVEIRA, A.; MOREIRA, T. F. M.; VENANCIO, C. D. S.; MARQUES, L. L. M.; VALDERRAMA, P.; GONÇALVES, O. H.; DA SILVA-BUZANELLO, R. A.; YAMASHITA, F.; SHIRAI, M. A.; GENENA, A. K.; LEIMANN, F. V. Use of Water-Soluble Curcumin in TPS/PBAT Packaging Material: Interference on Reactive Extrusion and Oxidative Stability of Chia Oil. **Food and Bioprocess Technology**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 471–482, 2021.

NAINGGOLAN, M.; SINAGA, A. S. Characteristics of fatty acid composition and minor constituents of red palm olein and palm kernel oil combination. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 22, 2021.

NAZ, S.; SHEIKH, H.; SIDDIQI, R.; SAYEED, S. A. Oxidative stability of olive, corn and soybean oil under different conditions. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 88, n. 2, p. 253–259, 2004.

NOBARI AZAR, F. A.; PEZESHKI, A.; GHANBARZADEH, B.; HAMISHEHKAR, H.; MOHAMMADI, M.; HAMDIPOUR, S.; DALIRI, H. Pectin-sodium caseinat hydrogel containing olive leaf extract-nano lipid carrier: Preparation, characterization and rheological properties. **LWT**, [s. l.], v. 148, p. 111757, 2021.

OLIVEIRA, F. M.; OLIVEIRA, R. M.; GEHRMANN BUCHWEITZ, L. T.; PEREIRA, J. R.; CRISTINA DOS SANTOS HACKBART, H.; NALÉRIO, É. S.; BORGES, C. D.; ZAMBIAZI, R. C. Encapsulation of olive leaf extract (*Olea europaea* L.) in gelatin/tragacanth gum by complex coacervation for application in sheep meat hamburger. **Food Control**, [s. l.], v. 131, n. July 2021, 2022.

OLIVEIRA, A. C. de; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, [s. l.], v. 32, n. 3, p. 689–702, 2009.

OLMO-GARCÍA, L.; BAJOUB, A.; BENLAMAALAM, S.; HURTADO-FERNÁNDEZ, E.; BAGUR-GONZÁLEZ, M.; CHIGR, M.; MBARKI, M.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; CARRASCO-PANCORBO, A. Establishing the Phenolic Composition of *Olea europaea* L. Leaves from Cultivars Grown in Morocco as a Crucial Step Towards Their Subsequent Exploitation. **Molecules**, [s. l.], v. 23, n. 10, p. 2524, 2018.

PAPPAS, V. M.; LAKKA, A.; PALAIOGIANNIS, D.; ATHANASIADIS, V.; BOZINO, E.; NTOURTOGLOU, G.; MAKRIS, D. P.; DOURTOGLOU, V. G.; LALAS, S. I. Optimization of Pulsed Electric Field as Standalone “Green” Extraction Procedure for the Recovery of High Value-Added Compounds from Fresh Olive Leaves. **Antioxidants**, [s. l.], v. 10, n. 10, p. 1554, 2021.

PASCOLI, M.; DE LIMA, R.; FRACETO, L. F. Zein Nanoparticles and Strategies to Improve Colloidal Stability: A Mini-Review. **Frontiers in Chemistry**, [s. l.], v. 6, 2018.

PATEL, M.; MISHRA, S. Asian Journal of Nanoscience and Review Article A review : Application and production of nanoencapsulation in the food sector Monika Patel. [s. l.], v. 4, p. 213–228, 2021.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J. Metodologia Científica : Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre. [s. l.], p. 0–3, 2007.

PETTINATO, M.; TRUCILLO, P.; CAMPARDELLI, R.; PEREGO, P.; REVERCHON, E. Bioactives extraction from spent coffee grounds and liposome encapsulation by a combination of green technologies. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, [s. l.], v. 151, p. 107911, 2020.

PLAZA, A.; TAPIA, X.; YAÑEZ, C.; VILCHES, F.; CANDIA, O.; CABEZAS, R.; ROMERO, J. Obtaining Hydroxytyrosol from Olive Mill Waste Using Deep Eutectic Solvents and Then Supercritical CO₂. **Waste and Biomass Valorization**, [s. l.], v. 11, n. 11, p. 6273–6284, 2020.

PUTNIK, P.; BARBA, F. J.; ŠPANIĆ, I.; ZORIĆ, Z.; DRAGOVIĆ-UZELAC, V.; BURSAC KOVAČEVIĆ, D. Green extraction approach for the recovery of polyphenols from Croatian olive leaves (*Olea europaea*). **Food and Bioproducts Processing**, [s. l.], v. 106, p. 19–28, 2017.

RANGARAJ, V. M.; RAMBABU, K.; BANAT, F.; MITTAL, V. Natural antioxidants-based edible active food packaging: An overview of current advancements. **Food Bioscience**, [s. l.], v. 43, p. 101251, 2021.

REFAIT, P.; RAHAL, C.; MASMOUDI, M. Corrosion inhibition of copper in 0.5 M NaCl solutions by aqueous and hydrolysis acid extracts of olive leaf. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 859, 2020.

RIBEIRO, J. S.; VELOSO, C. M. Microencapsulation of natural dyes with biopolymers for application in food: A review. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 112, p. 106374, 2021.

RIKHTEHGARAN, S.; KATOUZIAN, I.; JAFARI, S. M.; KIANI, H.; MAIOROVA, L. A.; TAKBIRGOU, H. Casein-based nanodelivery of olive leaf phenolics: Preparation, characterization and release study. **Food Structure**, [s. l.], v. 30, p. 100227, 2021.

RIVAS, C. J. M.; TARHINI, M.; BADRI, W.; MILADI, K.; GREIGE-GERGES, H.; NAZARI, Q. A.; RODRÍGUEZ, S. A. G.; ROMÁN, R. Á.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 532, n. 1, p. 66–81, 2017.

ROCHA, F.; YUMI SUGAHARA, L.; LEIMANN, F. V.; DE OLIVEIRA, S. M.; DA SILVA BRUM, E.; CALHELHA, R. C.; BARREIRO, M. F.; FERREIRA, I. C. F. R.; PORTO INEU, R.; GONÇALVES, O. H. Nanodispersions of beta-carotene: effects on antioxidant enzymes and cytotoxic properties. **Food & Function**, [s. l.], v. 9, n. 7, p. 3698–3706, 2018.

ROMERO, C.; MEDINA, E.; MATEO, M. A.; BRENES, M. Quantification of bioactive compounds in Picual and Arbequina olive leaves and fruit. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [s. l.], v. 97, n. 6, p. 1725–1732, 2017.

ROSA, G. S. da; MARTINY, T. R.; DOTTO, G. L.; VANGA, S. K.; PARRINE, D.; GARIEPY, Y.; LEFSRUD, M.; RAGHAVAN, V. Eco-friendly extraction for the recovery of bioactive compounds from Brazilian olive leaves. **Sustainable Materials and Technologies**, [s. l.], v. 28, p. e00276, 2021.

ROSA, A. D.; JUNGES, A.; FERNANDES, I. A.; CANSIAN, R. L.; CORAZZA, M. L.; FRANCESCHI, E.; BACKES, G. T.; VALDUGA, E. High pressure extraction of olive leaves (*Olea europaea*): bioactive compounds, bioactivity and kinetic modelling. **Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 56, n. 8, p. 3864–3876, 2019.

RUDKE, A. R.; HELENO, S. A.; FERNANDES, I. P.; PRIETO, M. A.; GONÇALVES, O. H.; RODRIGUES, A. E.; FERREIRA, I. C. F. R.; BARREIRO, M. F. Microencapsulation of ergosterol and *Agaricus bisporus* L. extracts by complex coacervation using whey protein and chitosan: Optimization study using response surface methodology. **LWT**, [s. l.], v. 103, p. 228–237, 2019.

RYAN, D.; ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.; ROBARDS, K.; LAVEE, S. Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v. 445, p. 67–77, 2002.

SAFARZADEH MARKHALI, F. Roles of Drying, Size Reduction, and Blanching in Sustainable Extraction of Phenolics from Olive Leaves. **Processes**, [s. l.], v. 9, n. 9, p. 1662, 2021.

- ŞAHİN, S.; KURTULBAŞ, E.; TOPRAKÇI, İ.; PEKEL, A. G. A clean and green technology for oleuropein rich extract from *Olea europaea* by-product. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, [s. l.], v. 22, p. 100493, 2021.
- ŞAHİN, S.; SAMLI, R.; TAN, A. S. B.; BARBA, F. J.; CHEMAT, F.; CRAVOTTO, G.; LORENZO, J. M. Solvent-Free Microwave-Assisted Extraction of Polyphenols from Olive Tree Leaves: Antioxidant and Antimicrobial Properties. **Molecules**, [s. l.], v. 22, n. 7, p. 1056, 2017.
- ŞAHİN, S.; ŞAMLI, R. Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 595–602, 2013.
- ŞAHİN, S.; SAYIM, E.; BILGIN, M. Effect of olive leaf extract rich in oleuropein on the quality of virgin olive oil. **Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 54, p. 1721–1728, 2017.
- SANTANA, E. A. *et al.* Simultaneous extraction and obtention of a novel nano-dispersion from *Mikania glomerata* Spreng: Monitoring coumarin content and increasing the biological and industrial potential of a classical cultivated herb. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 135, p. 49–56, 2019.
- SANTOS, P. H.; KAMMERS, J. C.; SILVA, A. P.; OLIVEIRA, J. V.; HENSE, H. Antioxidant and antibacterial compounds from feijoa leaf extracts obtained by pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 344, n. April 2020, p. 128620, 2021.
- SANTOS, P. D. de F.; COQUEIRO, A.; BRUM, E. da S.; OLIVEIRA, S. M.; LEIMANN, F. V.; INEU, R. P.; BONA, E.; GONÇALVES, O. H. Endogenous antioxidant properties of curcuminoids from *Curcuma longa* L. obtained by a single-step extraction/nanoencapsulation approach. **Journal of Food Biochemistry**, [s. l.], v. 44, n. 12, 2020.
- SANTOS, C. H. K.; BAQUETA, M. R.; COQUEIRO, A.; DIAS, M. I.; BARROS, L.; BARREIRO, M. F.; FERREIRA, I. C. F. R.; GONÇALVES, O. H.; BONA, E.; DA SILVA, M. V.; LEIMANN, F. V. Systematic study on the extraction of antioxidants from pinhão (*araucaria angustifolia* (bertol.) Kuntze) coat. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 261, p. 216–223, 2018.
- SAVIC GAJIC, I. M.; BOSKOV, I. A.; SAVIC, I. M. Black locust flowers as a natural source of antioxidants: Sustainable production of high-quality oil from plum by-product and its incorporation in the moisturizing cream. **Cleaner Engineering and Technology**, [s. l.], v. 3, p. 100135, 2021.
- SCOPUS. [S. l.], 2021. Disponível em: <https://www.scopus.com>. Acesso at: 11 Apr. 2021.

SECRETARIA; AGRICULTURA, P. E. D. R. **Pró-Oliva**. [S. l.], 2021. Disponível em: <https://www.agricultura.rs.gov.br/pro-oliva>. Acesso at: 2 Sep. 2021.

SENA, M. M.; TREVISAN, M. G.; POPPI, R. J. PARAFAC: uma ferramenta quimiométrica para tratamento de dados multidimensionais. Aplicações na determinação direta de fármacos em plasma humano por espectrofluorimetria. **Química Nova**, [s. l.], v. 28, n. 5, p. 910–920, 2005.

SERRANO-DÍAZ, J.; SÁNCHEZ, A. M.; MARTÍNEZ-TOMÉ, M.; WINTERHALTER, P.; ALONSO, G. L. Flavonoid Determination in the Quality Control of Floral Bioresidues from *Crocus sativus* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 62, n. 14, p. 3125–3133, 2014.

SHARMA, D.; DHANJAL, D.; MITTAL, B. Development of Edible Biofilm Containing Cinnamon to Control Food-Borne Pathogen. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, [s. l.], p. 160–164, 2017.

SHIRZAD, H.; NIKNAM, V.; TAHERI, M.; EBRAHIMZADEH, H. Ultrasound-assisted extraction process of phenolic antioxidants from Olive leaves: a nutraceutical study using RSM and LC–ESI–DAD–MS. **Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 54, n. 8, p. 2361–2371, 2017.

SICHERER, S. H.; SAMPSON, H. A. **Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment**. [S. l.: s. n.], 2014.

SIFAOU, I.; MECHA, E.; SILVA, A.; CHAMMEM, N.; MEJRI, M.; ABDERABBA, M.; BRONZE, M. R. Optimized Extraction of Antioxidants from Olive Leaves Using Augmented Simplex Centroid Design. **Analytical Letters**, [s. l.], v. 49, n. 9, p. 1323–1333, 2016.

SIGMA-ALDRICH. [S. l.], 2021.

SILVA, J. T. D. P.; SILVA, A. C. D.; GEISS, J. M. T.; DE ARAÚJO, P. H. H.; BECKER, D.; BRACHT, L.; LEIMANN, F. V.; BONA, E.; GUERRA, G. P.; GONÇALVES, O. H. Analytical validation of an ultraviolet–visible procedure for determining lutein concentration and application to lutein-loaded nanoparticles. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 230, 2017.

SILVA, J. T. do P.; SILVA, A. C. da; GEISS, J. M. T.; DE ARAÚJO, P. H. H.; BECKER, D.; BRACHT, L.; LEIMANN, F. V.; BONA, E.; GUERRA, G. P.; GONÇALVES, O. H. Analytical validation of an ultraviolet–visible procedure for determining lutein concentration and application to lutein-loaded nanoparticles. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 230, p. 336–342, 2017.

SILVA, T. B. V. da; MOREIRA, T. F. M.; DE OLIVEIRA, A.; BILCK, A. P.; GONÇALVES, O. H.; FERREIRA, I. C. F. R.; BARROS, L.; BARREIRO, M.-F.; YAMASHITA, F.; SHIRAI, M. A.; LEIMANN, F. V. *Araucaria angustifolia* (Bertol.)

Kuntze extract as a source of phenolic compounds in TPS/PBAT active films. **Food & Function**, [s. l.], v. 10, n. 12, p. 7697–7706, 2019.

SILVA, L. F. M. C.; ARAUJO, E. A. B. de; OLIVEIRA, S. N. de; DALANEZI, F. M.; JÚNIOR, L. R. P. de A.; SOUZA, F. F. de; CRESPILO, A. M.; JUNIOR, J. A. D.; PAPA, F. O. MECANISMOS DE AÇÃO DOS PRINCIPAIS ANTIOXIDANTES UTILIZADOS NA CRIOPRESERVAÇÃO ESPERMÁTICA DE GARANHÕES. **Veterinária e Zootecnia**, [s. l.], n. ISBN eletrônico 2178-3764, p. 418–434, 2017.

SILVA, L. F. de O. da; ZAMBON, C. R.; OLIVEIRA, A. F. de. **Por que a olivicultura atrai produtores de todo o Brasil?**. [S. l.]: Revista Campo e Negocios, 2019.

SILVA-BUZANELLO, R. A. da; SOUZA, M. F. de; OLIVEIRA, D. A. de; BONA, E.; LEIMANN, F. V.; CARDOZO FILHO, L.; ARAÚJO, P. H. H. de; FERREIRA, S. R. S.; GONÇALVES, O. H. Preparation of curcumin-loaded nanoparticles and determination of the antioxidant potential of curcumin after encapsulation. **Polímeros**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 207–214, 2016a.

SIMIELLI, M. E. **Atlas geográfico escolar - Volume único**. 37. ed. [S. l.: s. n.], 2020.

SINGH, D. J.; DAVIDSON, J. **Introduction to Olives - Growing Olives in your Garden**. [S. l.: s. n.], 2016.

SINGH, R.; KUMARI, P.; KUMAR, S. Nanotechnology for enhanced bioactivity of bioactive phytomolecules. *In*: NUTRIENT DELIVERY. [S. l.: s. n.], 2017a. p. 413–415.

SORITA, G. D.; SANTAMARIA-ECHART, A.; GOZZO, A. M.; GONÇALVES, O. H.; LEIMANN, F. V.; BONA, E.; MANRIQUE, Y.; FERNANDES, I. P. M.; FERREIRA, I. C. F. R.; BARREIRO, M. F. Lipid composition optimization in spray congealing technique and testing with curcumin-loaded microparticles. **Advanced Powder Technology**, [s. l.], v. 32, n. 5, p. 1710–1722, 2021.

TAGHVAEI, M.; JAFARI, S. M. Application and stability of natural antioxidants in edible oils in order to substitute synthetic additives. [s. l.], v. 52, n. March, p. 1272–1282, 2015.

TAVARES, W. de S.; PENA, G. R.; MARTIN-PASTOR, M.; SOUSA, F. F. O. de. Design and characterization of ellagic acid-loaded zein nanoparticles and their effect on the antioxidant and antibacterial activities. **Journal of Molecular Liquids**, [s. l.], v. 341, p. 116915, 2021.

TINELLO, F.; LANTE, A.; BERNARDI, M.; CAPPIELLO, F.; GALGANO, F.; CARUSO, M. C.; FAVATI, F. Comparison of OXITEST and RANCIMAT methods to evaluate the oxidative stability in frying oils. **European Food Research and Technology**, [s. l.], v. 244, n. 4, p. 747–755, 2018.

TKACZEWSKA, J.; JAMRÓZ, E.; PIĄTKOWSKA, E.; BORCZAK, B.; KAPUSTA-DUCH, J.; MORAWSKA, M. Furcellaran-Coated Microcapsules as Carriers of Cyprinus

carpio Skin-Derived Antioxidant Hydrolysate: An In Vitro and In Vivo Study. **Nutrients**, [s. l.], v. 11, n. 10, p. 2502, 2019.

TOULABI, T.; DELFAN, B.; RASHIDIPOUR, M.; YARAHMADI, S.; RAVANSHAD, F.; JAVANBAKHT, A.; ALMASIAN, M. The efficacy of olive leaf extract on healing herpes simplex virus labialis: A randomized double-blind study. **Explore**, [s. l.], v. 000, 2021.

UZEL, R. A. Effect of extraction method and extraction solvent on recovery of phenolic compounds from olive leaves in Kemalpaşa-İzmir (Turkey): Oleuropein recovery as a case example. **Separation Science and Technology**, [s. l.], v. 53, n. 10, p. 1531–1539, 2018.

VIEIRA, T. M. F. S.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. STABILITY OF OILS HEATED BY MICROWAVE: UV - SPECTROPHOTOMETRIC EVALUATION. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 433–437, 1998.

VURAL, N.; ALGAN CAVULDAK, Ö.; KENAR, A.; AKAY, M. A. Green alcoholic solvent and UAE extraction of oleuropein from the *Olea europaea* L. leaves: Experimental design, optimization, and comparison with Pharmacopoeia method. **Separation Science and Technology**, [s. l.], v. 55, n. 10, p. 1813–1828, 2020.

WADHWA, A.; MATHURA, V.; RATHNANAND, M.; NAHA, A.; LEWIS, S. A. Compritol® 888 LIPID matrix via twin screw extruder. **International Journal of Applied Pharmaceutics**, [s. l.], v. 11, n. 1, 2019, p. 261–264, 2019.

WALSTRA, P.; VAN VLIET, T. **Química de Alimentos de Fennema**. [S. l.: s. n.], 2010.

WONG, J. J. L.; WONG, A. I. C.; XU, Y.; YULIARTI, O. Zein as a water insoluble excipient for spray dry encapsulation of hydrophilic bioactives. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 283, p. 110054, 2020.

WU, Y.; LUO, Y.; WANG, Q. Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid–liquid dispersion method. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 48, n. 2, p. 283–290, 2012.

XIA, Q.; AKANBI, T. O.; LI, R.; WANG, B.; YANG, W.; BARROW, C. J. Lipase-catalysed synthesis of palm oil-omega-3 structured lipids. **Food & Function**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 3142–3149, 2019.

XIAO, Y.; LIU, Hao; DU, P.; LIANG, X.; LI, H.; LU, Q.; LI, S.; LIU, Haiyan; HONG, Y.; VARSHNEY, R. K.; CHEN, X. Impact of different cooking methods on the chemical profile of high-oleic acid peanut seeds. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 379, p. 131970, 2022.

XIAO, Z.; XU, Z.; ZHU, G. Production and characterization of nanocapsules encapsulated linalool by ionic gelation method using chitosan as wall material. **Food Science and Technology**, [s. l.], v. 37, n. 4, p. 613–619, 2017.

YAO, Q.; SHEN, Y.; BU, L.; YANG, P.; XU, Z.; GUO, X. Ultrasound-assisted aqueous extraction of total flavonoids and hydroxytyrosol from olive leaves optimized by response surface methodology. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 49, n. 9, p. 837–845, 2019.

ZHANG, H.; FU, Y.; XU, Y.; NIU, F.; LI, Z.; BA, C.; JIN, B.; CHEN, G.; LI, X. One-step assembly of zein/caseinate/alginate nanoparticles for encapsulation and improved bioaccessibility of propolis. **Food & Function**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 635–645, 2019.

ZHAO, M.; HUANG, X.; ZHANG, H.; ZHANG, Y.; GÄNZLE, M.; YANG, N.; NISHINARI, K.; FANG, Y. Probiotic encapsulation in water-in-water emulsion via heteroprotein complex coacervation of type-A gelatin/sodium caseinate. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 105, p. 105790, 2020.

ZHAO, Y.; SUN, Z. Effects of gelatin-polyphenol and gelatin–genipin cross-linking on the structure of gelatin hydrogels. **International Journal of Food Properties**, [s. l.], v. 20, n. sup3, p. S2822–S2832, 2017.

ZHONG, Q.; TIAN, H.; ZIVANOVIC, S. ENCAPSULATION OF FISH OIL IN SOLID ZEIN PARTICLES BY LIQUID-LIQUID DISPERSION. **Journal of Food Processing and Preservation**, [s. l.], v. 33, n. 2, p. 255–270, 2009.

ZHU, J.; WU, H.; WANG, D.; MA, Y.; JIA, L. A Facile Strategy for Fabrication Lysozyme-Loaded Mesoporous Silica Nanotubes from Electrospun Silk Fibroin Nanofiber Templates. **Molecules**, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 1073, 2021.

ZHU, Y.; SUN, X.; DING, J.; FAN, F.; LI, P.; XIA, J.; LUO, X.; FANG, Y. Physicochemical and functional properties of a novel xanthan gum-lysozyme nanoparticle material prepared by high pressure homogenization. **LWT**, [s. l.], v. 143, p. 111136, 2021.