



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

Flávia Barbosa Schappo

Nanopartículas de óleo de palma bruto: estabilidade e citotoxicidade.

Florianópolis

2021

Flávia Barbosa Schappo

Nanopartículas de óleo de palma bruto: estabilidade e citotoxicidade.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Itaciara Larroza Nunes

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Barbosa Schappo, Flávia

Nanopartículas de óleo de palma bruto: estabilidade e
citotoxicidade. / Flávia Barbosa Schappo ; orientadora,
Itaciara Larroza Nunes, 2021.

124 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós
Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. nanocápsulas. 3. Elaeis
guineenses. 4. mesocarpo do maracujá. 5. toxicidade. I.
Larroza Nunes, Itaciara . II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos
Alimentos. III. Título.

Flávia Barbosa Schappo

Nanopartículas de óleo de palma bruto: estabilidade e citotoxicidade.

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Alessandro de Oliveira Rios.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Marcelo Farina.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a. Dr^a. Maria Manuela Camino Feltes.
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Ciência dos Alimentos.

Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Maisonnave Arisi
Coordenadora do Programa

Prof^a. Dr^a. Itaciara Larroza Nunes
Orientadora

Florianópolis, 29 de março de 2021.

Este trabalho é dedicado aos meus pais, Antonio e Denise.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Antonio e Denise, pelo amor incondicional, por todos os ensinamentos que me tornaram quem eu sou hoje e pelo apoio incansável. Tenho profunda admiração por vocês e sou extremamente privilegiada por tê-los como guias.

Ao meu irmão, André, pelas conversas, humor e amizade. Meus maiores aprendizados da vida vieram da nossa convivência, e sei que, mesmo as fases mais difíceis, tornaram-se mais fáceis só por te ter por perto. Muitas vezes, basta você.

Ao meu marido, namorado, parceiro e incentivador, por acreditar em mim mesmo quando nem eu acredito e por tornar tudo mais fácil e divertido. Especialmente neste último ano, sua companhia foi minha maior fonte de força e alegria.

À minha madrinha Monique, minha principal referência desde criança. Crescer com você por perto me ajudou a construir quem eu sou.

Aos meus amigos, Ytalla, Gi, Bel, Fê, Athenè, Youry, Tiago, por toda a parceria, conversas, apoio. Admiro cada um de vocês. Às amigas que a UFSC me proporcionou, Gabi, Fê, Mari, Suliana, Monnik, Ju e Dafne, por estarem sempre torcendo, incentivando e ajudando. Ter mulheres incríveis ao meu lado com certeza me fortalece.

À minha orientadora, professora Itaciara, pela oportunidade de trabalhar com pesquisa e por todos os ensinamentos nessa caminhada. Pra mim, você é exemplo e inspiração. Obrigada por tudo.

À Camila (Bahia) por, sem nem mesmo nos conhecermos pessoalmente, estar sempre presente, me ajudando e também incentivando.

A todos do Laboratório de Óleos e Gorduras e de Compostos Bioativos, em especial à professora Jane, por abrir as portas do laboratório, permitindo que este trabalho fosse realizado, e aos meus colegas Laércio, Gerson, Gabriela, Bruno, Marcela, Carlen, Edilene e Karol, pelas conversas, risadas e ajudas durante este período, e ao demais integrantes destes laboratórios.

A todos do Laboratório Experimental em Neuropatologias, em especial ao professor Marcelo Farina, pela parceria para a realização deste trabalho e à Aline, pela disponibilidade e paciência em me ensinar sobre cultura de células, e, principalmente, pela amizade que surgiu a partir disso.

A todos os professores que participaram da minha formação, que me trouxeram inspiração e motivação para buscar aprender cada vez mais.

À UFSC, pela oportunidade de um ensino gratuito de qualidade e aos laboratórios que permitiram a realização deste trabalho: Laboratório de Óleos e Gorduras, Laboratório

Interdisciplinar para o Desenvolvimento de Nanoestruturas, Laboratório Experimental em Neuropatologias e Laboratório de Frutas e Hortaliças.

Aos membros da banca, pela disposição em ouvir e colaborar com este trabalho.

À Agropalma pela doação do óleo de palma bruto e à Cargill pela doação da lecitina de soja.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq (Processo nº 423478/2016-8) pelo financiamento da pesquisa e pela bolsa de mestrado, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

E, finalmente, a todos que colaboraram de alguma forma para a realização deste trabalho: muito obrigada!

RESUMO

O óleo de palma bruto (OPB) é o mais produzido no mundo, e apresenta alto teor de bioativos, como carotenoides, que tem baixa estabilidade na presença de oxigênio, luz e temperatura elevada. A nanotecnologia tem apresentado efeitos positivos na preservação e aplicabilidade de óleos vegetais, embora pouco se saiba sobre sua segurança. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi investigar em base científica e de patentes o potencial tecnológico de nanoemulsões, e na literatura os aspectos relacionados à toxicidade de nanopartículas de óleos (NPO), bem como produzir e caracterizar nanopartículas de OPB (NP-OPB) com farinha do albedo do maracujá (FAM) como encapsulante, avaliando sua estabilidade e citotoxicidade. Foram utilizadas as bases de dados *Scopus*, Espacenet® e Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) para a prospecção e *Pubmed/Medline*, *Scopus* e *Science Direct* para o levantamento bibliográfico. Foram recuperados 7411 trabalhos científicos sobre nanoemulsões na base de dados *Scopus*, e 56 e 66 documentos de patentes nas bases *Espacenet®* e INPI, respectivamente. Os dados demonstraram crescimento expressivo e superior de artigos científicos sobre o tema (2001-2020) em relação às patentes. Na área de alimentos, a técnica de nanoemulsificação é utilizada, principalmente, com o intuito de preservar compostos bioativos. O Brasil, tem apenas 2 patentes depositadas, demonstrando uma lacuna na proteção da propriedade intelectual nesta área. No levantamento bibliográfico, foram encontrados apenas 14 trabalhos com NPO para aplicação em alimentos, que avaliavam a toxicidade, sendo 11 com óleos essenciais, 3 com óleos vegetais e 1 de óleo de alga marinha. O ensaio de viabilidade celular através do método de redução do brometo de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il) -2, 5-difeniltetrazólio (MTT) foi o mais usado (12). As NPO apresentaram efeito anticâncer em 6 estudos e antioxidante em 7. O levantamento evidenciou a necessidade de mais estudos, tanto *in vivo*, quanto com óleos vegetais, a fim de compreender melhor a segurança de NPO. Nos experimentos laboratoriais, foram produzidas NP-OPB por nanoemulsificação e caracterizadas quanto à morfologia, tamanho de partícula, índice de polidispersibilidade (PDI), potencial zeta (PZ), pH, cor e carotenoides totais. A estabilidade das características de tamanho, PDI, PZ, pH e cor das NP-OPB (60 dias/4 ± 2°C) foi verificada quinzenalmente, e sua citotoxicidade foi avaliada através dos ensaios MTT e incorporação do iodeto de propídeo (IP) em células imortalizadas do hipocampo de camundongos (HT22). As NP-OPB produzidas apresentaram morfologia esférica, tamanho inicial de 232,17 ± 0,84 nm, PDI de 0,25 ± 0,01, PZ de -43,67 ± 3,16 mV, pH de 5,04 ± 0,02, e tendência ao amarelo, indicando tamanho adequado (< 1000 nm), boa estabilidade ($|PZ| > 30$) e uniformidade (PDI < 0,3). O nanoencapsulamento preservou 55,85% dos carotenoides totais do OPB. Na avaliação de estabilidade, houve redução do valor do pH e da pigmentação amarela, mas os parâmetros de tamanho, PDI e PZ mantiveram-se estáveis. No ensaio MTT, as NP-OPB não diminuíram a viabilidade celular das células HT22 em nenhuma concentração testada ($2,5 \times 10^{-6}$ mg/mL a $2,5 \times 10^{-1}$ mg/mL), porém, o ensaio IP detectou citotoxicidade na maior concentração ($2,5 \times 10^{-1}$ mg/mL). Dessa forma, concentrações $\leq 2,5 \times 10^{-2}$ mg/mL foram consideradas seguras para as células HT22. O presente estudo demonstrou o potencial de uso de NPO no âmbito nacional e internacional e apontou lacunas que precisam ser preenchidas para a melhor compreensão sobre a segurança desta tecnologia. Além disso, as NP-OPB formuladas com FAM através da técnica de nanoemulsificação foram estáveis em 60 dias de armazenamento refrigerado e mostraram-se seguras em células HT22, em concentrações $\leq 2,5 \times 10^{-2}$ mg/mL, sendo consideradas promissoras para aplicação como corante natural em alimentos que tenham pH próximo à faixa de 4-5, em que as NP-OPB permaneceram ao longo do armazenamento.

Palavras-chave: nanocápsulas; *Elaeis guineenses*; mesocarpo do maracujá; toxicidade.

ABSTRACT

Crude palm oil (CPO) is the world most produced vegetable oil and has a high content of bioactive compounds, such as carotenoids, which have low stability in the presence of oxygen, light, and high temperature. Nanotechnology has shown positive effects on preservation and applicability of vegetable oils, although little is known about its safety. Thus, this work aims to investigate, on both scientific and patent basis, the technological potential of nanoemulsions and issues related to oil nanoparticles (ONP) toxicity, as well as to produce and characterize crude palm oil nanoparticles (CPO-NP) with passion fruit albedo flour (PAF) as an encapsulant, evaluating its stability and cytotoxicity. Scopus, Espacenet®, and National Institute of Industrial Property (INPI) databases were used for prospecting and Pubmed / Medline, Scopus, and Science Direct for the bibliographic research. On total, 7411 scientific papers about nanoemulsions were retrieved in the Scopus database, and 56 and 66 patent documents in the Espacenet® and INPI databases, respectively. The obtained data showed an expressive and superior growth of scientific articles on the subject (2001-2020) over patents. The nanoemulsification technique is commonly used in the area, to preserve bioactive compounds. Brazil has only 2 patents filed, which demonstrates a gap in the intellectual property protection in this area. In the bibliographic research, only 14 studies with ONP were found in the literature, for food application, involving toxicity evaluation: 11 with essential oils, 3 with vegetable oils, and 1 with seaweed oil. The cell viability assay using the 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide reduction method (MTT) was the most used (12). The ONP showed an anticancer effect in 5 studies and an antioxidant in 7. The research shows the need for more studies, both *in vivo* and with vegetable oils, to better understand the ONP safety. In the laboratory experiments, CPO-NP were produced by nanoemulsification and characterized in terms of morphology, particle size, polydispersity index (PDI), zeta potential (PZ), pH, color, and total carotenoids. The stability of CPO-NP (60 days/4 ± 2°C) was checked every two weeks for size, PZ, PDI, pH, and color, and its cytotoxicity was evaluated using both MTT assays and incorporation of propidium iodide (IP) in immortalized hippocampus cells of mice (HT22). The CPO-NP produced showed spherical morphology, initial size of 232.17 ± 0.84 nm, PDI of 0.25 ± 0.01, PZ of -43.67 ± 3.16 mV, pH of 5.04 ± 0.02, and yellow tendency, indicating adequate size (< 1000 nm), good stability ($|\text{PZ}| > 30$) and uniformity (PDI < 0.3). The nanoencapsulation preserved 55.85% of the total CPO carotenoids. In the stability evaluation, there was a reduction in the pH value and yellow pigmentation, but the parameters of size, PDI, and PZ remained stable. In the MTT assay, CPO-NP did not affect HT22 cells at any concentration tested (2, 5 x 10⁻⁶ mg/ml to 2.5 x 10⁻¹ mg/ml), however, the IP assay detected cytotoxicity in the highest concentration (2.5 x 10⁻¹ mg/ml). Thus, concentrations ≤ 2.5 x 10⁻² mg/mL were considered safe for HT22 cells. The present study demonstrated the potential for using ONP at the national and international levels and pointed out gaps that need to be filled to better understand this technology safety. Also, CPO-NP formulated with PAF through the nanoemulsification technique were stable in 60 days of cold storage and were safe in HT22 cells, in concentrations ≤ 2.5 x 10⁻² mg/mL, being considered promising for application as a natural dye in foods that have a pH close to the range 4-5, in which the CPO-NP remained stable.

Keywords: nanocapsules; *Elaeis guineenses*; passion fruit mesocarp; toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo II

Figura 1	Representação do aumento da área superficial encontrado em nanopartículas	06
Figura 2	Estrutura química da fosfatidilcolina	13
Figura 3	Partes da casca do maracujá amarelo	15

Capítulo III

Nanoemulsão e seu potencial de uso em alimentos: uma prospecção tecnológica e científica.

Figura 1	Número de artigos científicos que utilizaram nanoemulsões de acordo com a evolução anual de publicações (A), percentual por área de conhecimento (B) e distribuição por país ou território (C).	29
Figura 2	Número de patentes do <i>Espacenet</i> ® que utilizaram nanoemulsões de acordo com a evolução anual (A), tipos de matérias-primas presentes nas nanoemulsões (B) e distribuição por país ou território (C).	33
Figura 3	Número de patentes do INPI que utilizaram nanoemulsões de acordo com a evolução anual (A), distribuição por área de conhecimento (B) e distribuição por país ou território (C).	37

Capítulo III

Toxicidade de nanopartículas de óleos: uma revisão com foco na Ciência dos Alimentos.

Figura 1	Diferentes tipos de nanopartículas: NLS (A), NLE (B), NE (C), NC (D), NS (E), (NL) (F).	49
Figura 2	Diferença de estudos sobre NPO e estudos de toxicidade dos mesmos	51
Figura 3	Desenho do estudo e metodologia utilizada	52
Figura 4	Tipos de análises de toxicidade de NPO	58
Figura 5	Esquema representativo do ensaio de redução do MTT	59

Figura 6	Esquema representativo do ensaio Alamar Blue®	59
Figura 7	Ensaio representativo do ensaio Suforodamina B	60
Figura 8	Iodeto de propídeo em células saudáveis e danificadas	61
Figura 9	Efeitos protetores encontrados nos testes	66
Figura 10	Evolução anual de patentes encontradas na base de dados Espacenet®	70
Figura 11	Tipos de óleos encontrados nos documentos de patentes (Espacenet®)	71

Capítulo III

Estabilidade e citotoxicidade de nanopartículas de óleo de palma bruto.

Figura 1	Esquema da metodologia utilizada para o preparo das nanopartículas	80
Figura 2	Protocolo experimental para avaliação da citotoxicidade das nanopartículas	83
Figura 3	Micrografias obtidas por MET das NP-OPB	85
Figura 4	Imagem das NP-OPB logo após o encapsulamento (A) e Espectro de UV/Vis de 360 nm a 550 nm das NP-OPB (B)	88
Figura 5	Resultados de estabilidade dos parâmetros de tamanho médio de partícula (A), distribuição do tamanho de partícula (B), PDI (C) e potencial zeta (D) das NP-OPB	89
Figura 6	Variação do pH e dos parâmetros de cor L*, a* e b* das NP-OPB ao longo dos 60 dias de armazenamento	90
Figura 7	Efeito das NP-OPB na viabilidade de células HT22 avaliado pelos ensaios MTT (A) e IP (B).	92

LISTA DE QUADROS

Capítulo III

Nanoemulsão e seu potencial de uso em alimentos: uma prospecção tecnológica e científica.

Quadro 1	Número de publicações científicas no <i>Scopus</i> e busca de patentes por palavras-chave e códigos de Classificação Internacional de Patentes (CPI) nas bases de dados europeia (<i>Espacenet</i> ®) e brasileira (INPI).	28
-----------------	---	----

Capítulo III

Toxicidade de nanopartículas de óleos: uma revisão com foco na Ciência dos Alimentos.

Quadro 1	Estudos de toxicidade de NPO	53
-----------------	------------------------------	----

LISTA DE TABELAS

Capítulo II

Tabela 1	Estudos sobre nanoencapsulamento de óleos e suas respectivas técnicas	08
Tabela 2	Utilização da casca do maracujá como ingrediente de novos produtos alimentícios	15
Tabela 3	Principais características das nanopartículas e seus consequentes efeitos no organismo	19

Capítulo III

Nanoemulsão e seu potencial de uso em alimentos: uma prospecção tecnológica e científica.

Tabela 1	Palavras-chave e códigos de Classificação Internacional de Patentes (CIP) utilizados para a busca de patentes nas bases de dados <i>Espacenet</i> ® e INPI.	27
Tabela 2	Artigos publicados sobre nanoemulsão em revistas da área de alimentos em 2020 e 2021.	31
Tabela 3	Distribuição de códigos de patentes sobre nanoemulsão.	35

Capítulo III

Estabilidade e citotoxicidade de nanopartículas de óleo de palma bruto.

Tabela 1	Resultados de tamanho de partícula, PDI, potencial zeta, pH, parâmetros de cor L*, a* e b* e carotenoides totais de NP-OPB imediatamente após o preparo.	86
-----------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

nm	Nanômetro
µm	Micrômetro
A/O	Água/Óleo
O/A	Óleo/Água
TBHQ	Butil Hidroquinona Terciária
PDI	Índice de Polidispersibilidade
WPC	Concentrado de proteína de soro de leite
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
MTT	3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il) -2, 5-difeniltetrazólio
IP	Iodeto de Propídeo
PLLA	Poli (L – ácido láctico)
PHBV	Poli (hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
PBS	Tampão Fosfato-Salino
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
NE	Nanoemulsão
NLE	Transportadores lipídicos nanoestruturados
NS	Nanoesfera
NC	Nanocápsula
NP	Nanopartículas
IP	Iodeto de Propídeo
WPI	Proteína isolada do soro de leite

SB	Sulforodamina B
AB	Alamar blue®
Caco-2	Adenocarcionoma do cólon humano
HepG2	Carcinoma hepatocelular humano
THLE2	Células hepáticas humanas saudáveis
MCF-7	Células de câncer de mama
A127	Células de câncer de mama
A549	Células de câncer de pulmão
HT-29	Células de câncer de cólon
HaCaT	Queratinócitos
AGS	Adenocarcinoma gástrico
HeLa	Células de câncer de cólon humano
T24	Células de câncer de bexiga humana
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
CIP	Código Internacional de Patentes
Espacenet®	European Patent Office
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Industrial
NSFC	National Natural Science Foundation of China
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
OCDC	Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OPMI (WIPO)	Organização Mundial de Propriedade Intelectual

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	1
1 INTRODUÇÃO GERAL	2
2 OBJETIVOS	4
2.1 OBJETIVO GERAL.....	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
CAPÍTULO II.....	5
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1 NANOENCAPSULAMENTO DE ÓLEOS.....	6
3.1.1 Fase orgânica	9
3.1.1.1 Óleo de palma bruto	9
3.1.1.2 Lecitina de Soja.....	12
3.1.2 Fase aquosa - Farinha do albedo do maracujá.....	14
3.1.3 Caracterização de nanopartículas.....	16
3.1.4 Toxicidade de nanopartículas	18
3.1.4.1 Citotoxicidade	19
CAPÍTULO III.....	21
4 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO.....	22
Capítulo de livro: Nanoemulsão e seu potencial de uso em alimentos: uma prospecção tecnológica e científica.	23
1 INTRODUÇÃO.....	26
2 METODOLOGIA	27
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
3.1 PROSPECÇÃO CIENTÍFICA.....	28
3.2 PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA.....	32
3.2.1 <i>Espacenet</i> ®	32
3.2.2 INPI	36
4 CONCLUSÃO.....	38
5 REFERÊNCIAS.....	40

Artigo de revisão: Toxicidade de nanopartículas de óleos: uma revisão com foco na Ciência dos Alimentos.....	45
1 INTRODUÇÃO.....	48
2 ESTUDOS SOBRE NANOPARTÍCULAS DE ÓLEOS ESSENCIAIS, VEGETAIS E DE ALGAS	51
2.1 MÉTODOS UTILIZADOS PARA AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE ÓLEOS.....	57
2.2 EFEITOS DAS NANOPARTÍCULAS DE ÓLEOS NOS ENSAIOS DE TOXICIDADE.....	63
2.3 FATORES ASSOCIADOS À TOXICIDADE DAS NANOPARTÍCULAS EM CÉLULAS NORMAIS E CANCERÍGENAS	67
2.4 LACUNAS E ASPECTOS REGULATÓRIOS.....	68
2.5 TENDÊNCIAS MERCADOLÓGICAS.....	70
4 CONCLUSÃO.....	71
5 REFERÊNCIAS.....	72
Artigo experimental: Estabilidade e citotoxicidade de nanopartículas de óleo de palma bruto.....	75
1 INTRODUÇÃO.....	78
2 MATERIAL E MÉTODOS	79
2.1 PREPARO DA FARINHA DO ALBEDO DO MARACUJÁ	79
2.2 PREPARO DAS NP-OPB.....	79
2.3 CARACTERIZAÇÃO INICIAL DAS NP-OPB	80
2.3.1 Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	80
2.3.2 Tamanho de partícula, índice de polidispersibilidade e potencial zeta	80
2.3.3 pH.....	81
2.3.4 Cor.....	81
2.3.5 Carotenoides totais	81
2.4 ESTABILIDADE DAS NP-OPB.....	82
2.5 CITOTOXICIDADE.....	82
2.5.1 Cultivo celular.....	82

2.5.2	Tratamento	83
2.5.3	Ensaio redução do MTT	83
2.5.4	Ensaio Iodeto de Propídeo	84
2.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	84
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
3.1	CARACTERIZAÇÃO INICIAL DAS NP-OPB	84
3.1.1	Morfologia	84
3.1.2	Tamanho de partícula, índice de polidispersibilidade, potencial zeta, pH, cor e carotenoides totais.....	85
3.2	ESTABILIDADE DAS NP-OPB SOB REFRIGERAÇÃO	89
3.3	CITOTOXICIDADE DAS NP-OPB.....	91
4	CONCLUSÃO	94
5	REFERÊNCIAS	95
CAPÍTULO IV		97
5	CONCLUSÃO GERAL	98
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	99
7	REFERÊNCIAS	100

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO GERAL

O óleo de palma é o óleo mais cultivado no mundo, com uma produção de 73,23 milhões de toneladas em 2020 (USDA, 2021). Apesar de ser utilizado em diversas áreas (cosméticos, têxtil, biodiesel, farmacêutica), 71% é destinado ao setor de alimentos, principalmente para fabricação de margarinas, gorduras e óleo para fritura (GESTEIRO *et al.*, 2019).

O óleo de palma bruto (OPB) é rico em compostos bioativos, tais como os carotenoides. Estes consistem em um grupo de pigmentos naturais amplamente distribuídos na natureza, sendo o β -caroteno o majoritário no OPB (CODEX, 2019), e o principal responsável pela coloração alaranjada, característica desse óleo.

Apesar da importância funcional, os carotenoides são instáveis quando se trata de aplicação industrial, porque são muito propensos à isomerização e oxidação (FERREIRA *et al.*, 2016). A isomerização pode acarretar em diminuição da pigmentação, enquanto a oxidação conduz a degradação destes compostos com perda de suas funcionalidades.

A adição de pigmentos é frequentemente utilizada na indústria alimentícia, seja para adicionar pigmentos que tenham sido perdidos no processamento, seja para acrescentar e/ou intensificar cores que não são naturais ao alimento, com o intuito de melhorar a aparência e tornar o produto mais atrativo ao consumidor. Entretanto, devido à menor estabilidade dos corantes naturais, a indústria de alimentos muitas vezes opta pela utilização de corantes sintéticos (CHEQUER; DORTA; OLIVEIRA, 2011).

No entanto, a demanda por produtos elaborados com ingredientes naturais tem impulsionado pesquisas que busquem por alternativas para a redução do uso de aditivos artificiais, focando principalmente em melhorar a estabilidade dos compostos naturais isolados ou em matrizes. Uma das formas de obter esse aumento de estabilidade é através da nanotecnologia, que consiste no estudo, manipulação e desenvolvimento de materiais nanométricos (< 1000 nm) (KATOUZIAN; JAFARI, 2016).

A utilização da nanotecnologia é interessante porque a diminuição do tamanho das partículas leva a propriedades físico-químicas e funcionais que não são encontradas em escala macro (ASSIS *et al.*, 2012). Existem diversos tipos de nanopartículas, sendo as nanoemulsões e nanocápsulas exemplos entre as mais utilizadas para óleos vegetais. As nanoemulsões consistem em mistura de óleo e água com um disperso no outro na forma de

gotículas nanométricas, e apresentam maior estabilidade do que emulsões em tamanho maior (LISBÔA, 2012).

As nanocápsulas são produzidas através de um processo chamado nanoencapsulamento e uma das técnicas adequadas para sua produção é a nanoemulsificação (PRAKASH *et al.*, 2018). A principal diferença entre nanocápsulas produzidas através da técnica de nanoemulsificação e nanoemulsões, é a presença de uma membrana polimérica (material encapsulante) envolvendo o núcleo (material encapsulado). No nanoencapsulamento por nanoemulsificação, para que as nanopartículas produzidas tenham estabilidade físico-química, deve-se considerar as características do agente encapsulante (material de parede), dos solventes utilizados e dos compostos a serem encapsulados, além do agente emulsificante que atua na formação e estabilidade da emulsão (SOPPIMATH *et al.*, 2001).

A farinha do albedo do maracujá representa uma alternativa como encapsulante. Este material possui na sua composição cerca de 20% de pectina, que apresenta boa capacidade ligante, gelificante e estabilizante (GHAREHBEGLOU *et al.*, 2019). Além disso, o albedo do maracujá é considerado um resíduo da indústria de processamento de maracujá, que por utilizar apenas a polpa, gera um desperdício de 60% do fruto (FAO, 2015). Dessa forma, a utilização do albedo pode representar uma prática sustentável e agregar valor ao produto final, se enquadrando nos conceitos da economia circular, que presa pela redução, reutilização, recuperação e reciclagem de materiais e energia (MASSADAR, 2019).

Além da estabilidade, é preciso avaliar se as nanopartículas apresentam efeito tóxico, sendo esse tipo de estudo ainda muito escasso na literatura (HANDFORD *et al.*, 2014). É provável que este seja um dos motivos para a inexistência de uma regulamentação da nanotecnologia aplicada a alimentos em muitos países. Uma forma de avaliar a toxicidade de nanopartículas é através da realização de estudos em células (*in vitro*), em que se verificam alterações celulares que podem indicar tanto efeitos tóxicos quanto efeitos protetores às células (ROGERO *et al.*, 2003).

Com base no exposto, a realização do presente trabalho poderá contribuir com a ampliação do uso de uma matriz rica em compostos bioativos, o OPB, e de um resíduo agroindustrial, o albedo de maracujá, além de poder colaborar com o desenvolvimento e regulamentação da nanotecnologia aplicada em alimentos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar em base científica e de patentes o potencial tecnológico de nanoemulsões, e na literatura os aspectos relacionados à toxicidade de nanopartículas de óleos (NPO), bem como produzir e caracterizar nanopartículas de óleo de palma bruto (NP-OPB) com farinha do albedo do maracujá (FAM) como encapsulante, avaliando sua estabilidade e toxicidade.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar prospecção tecnológica e científica sobre nanoemulsões aplicadas a alimentos;
- Realizar levantamento bibliográfico sobre a toxicidade de nanopartículas de óleos para aplicação em alimentos;
- Preparar nanopartículas de óleo de palma bruto com farinha do albedo do maracujá como encapsulante (NP-OPB);
- Caracterizar as nanopartículas preparadas com relação à morfologia;
- Caracterizar as nanopartículas preparadas quanto ao tamanho de partícula, potencial zeta, índice de polidispersibilidade, pH, parâmetros de cor (L^* , a^* e b^* , da escala CIELab) e carotenoides totais imediatamente após o preparo;
- Avaliar a estabilidade das características de tamanho de partícula, potencial zeta, índice de polidispersibilidade, pH e cor das nanopartículas quinzenalmente durante 60 dias de armazenamento refrigerado;
- Avaliar a toxicidade das nanopartículas em células HT22 através de ensaios de viabilidade celular e morte celular.

CAPÍTULO II

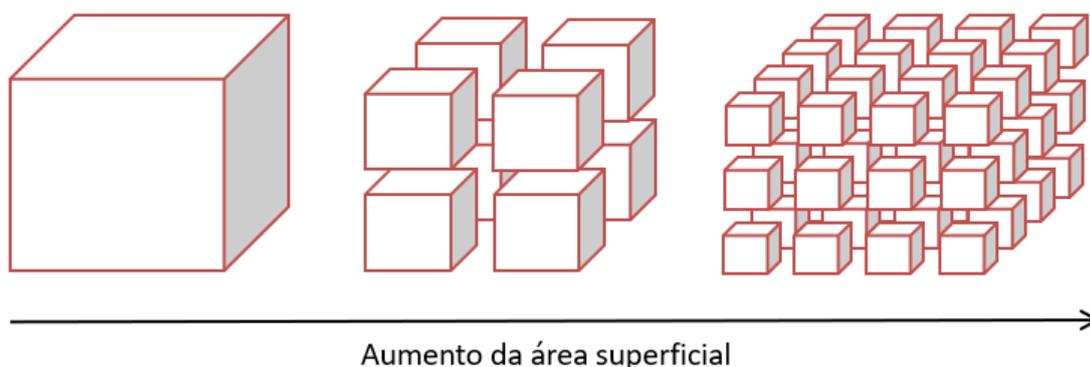
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 NANOENCAPSULAMENTO DE ÓLEOS

A nanotecnologia é uma ciência interdisciplinar que integra matérias de biotecnologia, física, química e engenharias (CHANDRA, 2016). Trata do desenvolvimento e da manipulação de materiais em escala nanométrica (tamanhos menores que 1000 nm) (SANGUANSRI; AUGUSTIN, 2006).

A diminuição do tamanho das partículas até a nanoescala tem como consequência propriedades funcionais particulares, que não são encontradas em tamanhos maiores (ASSIS *et al.*, 2012). Um dos motivos para tais mudanças refere-se ao fato de que à medida que se diminui o tamanho de determinado material, ocorre um aumento da área superficial em relação ao volume (Figura 1). Partículas menores podem apresentar maior biodisponibilidade e estabilidade físico-química, melhora da solubilidade, entre outras modificações nas propriedades dos compostos (KATOUZIAN; JAFARI, 2016).

Figura 1 – Representação do aumento da área superficial encontrado em nanopartículas.



Fonte: adaptado de Róz *et al.* (2015).

Por ter aplicação em diversos setores, os nanomateriais vêm apresentando grande impulso econômico. Há mais de 60 países com programas de pesquisa e desenvolvimento em nanotecnologia, sendo os Estados Unidos os maiores investidores, com mais de 27 bilhões de dólares investidos desde 2001 (NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE, 2019). Dentre os setores em que esta ciência possui aplicação, a área de alimentos apresenta destaque, podendo ser utilizada para a preservação de características sensoriais (como sabores, cor e aromas), potencialização de efeitos corantes, preservação de compostos bioativos ou pigmentos contra degradação, e melhoria de embalagens (auxiliando na conservação dos produtos e comunicação com o consumidor) (ASHRAF *et al.*, 2021).

O nanoencapsulamento trata de um processo desta área em que um material polimérico envolve outro material, que pode ser sólido, líquido ou gasoso, para formar nanopartículas capazes de liberar seu conteúdo em condições e taxas determinadas (ASSIS, *et al.*, 2012). O material encapsulado é chamado de núcleo, ingrediente ativo ou fase interna, e a cobertura tem nome de material de parede, carregador, membrana, casca ou revestimento (FERREIRA; NUNES, 2019). Neste contexto, tem-se estudado muito o nanoencapsulamento de óleos.

Os óleos vegetais possuem aplicação em diferentes áreas por apresentar compostos muito importantes nutricionalmente, como antioxidantes e vitaminas. Além disso, também podem apresentar características que auxiliam na preservação de produtos, como agentes antimicrobianos. Entretanto, estes compostos contidos nos óleos são muitas vezes instáveis frente à temperatura elevada, oxigênio, luz, dentre outros. Técnicas de encapsulamento são realizadas com o intuito de preservar estas características naturais e melhorar a sua solubilidade a fim de viabilizar sua aplicação na indústria de alimentos. A Tabela 1 apresenta alguns estudos realizados com nanoencapsulamento de óleos.

Os estudos relacionados ao nanoencapsulamento de óleos vegetais (Tabela 1) mostram que diversas metodologias podem ser aplicadas para o nanoencapsulamento de óleos. A nanoemulsificação vem sendo bastante utilizada por possuir grande aplicabilidade em matrizes hidrofílicas (PRAKASH *et al.*, 2018).

A metodologia utilizada pode influenciar diversos fatores, dentre eles, a estabilidade das características das nanopartículas formadas. Entretanto, nota-se que são poucos os estudos que realizam algum tipo de avaliação de estabilidade (Tabela 1). Ricaurte e colaboradores (2016) elaboraram nanopartículas de óleo de palma alto oleico por microfluidização, e avaliaram os parâmetros de viscosidade, tamanho de partícula, índice de polidispersibilidade e potencial zeta em duas temperaturas de armazenamento (25 e 4 °C), e concluíram que as nanopartículas eram mais estáveis quando armazenadas em temperatura de refrigeração. Já no trabalho de Campo *et al.* (2017) foi realizado estudo de estabilidade em nanopartículas de óleo de semente de chia produzidas por nanoemulsificação em condições de armazenamento acelerado por 28 dias a 40°C, e os resultados indicaram que elas se mantiveram estáveis em relação ao tamanho de partícula, potencial zeta, valor de *span* (indicador de uniformidade) e pH.

Tabela 1 - Estudos sobre nanoencapsulamento de óleos e suas respectivas técnicas

Tipo de óleo	Técnica	Emulsificante/ Polímero	Toxicidade	Estabilidade	Referência
Óleo de girassol	Emulsão/Difusão	Álcool polivinílico /Poli-ε-caprolactona	Não realizado.	Não realizado.	Zaragoza <i>et al.</i> , (2011)
Óleo de copaíba	Homogeneização a alta pressão a quente	<i>Span 80, Tween 80/</i> Palmitato de cetila	Não realizado.	Não realizado.	Svetlichny <i>et al.</i> , (2015).
Óleo de café torrado	Evaporação de solvente	<i>Tween 80</i> e lecitina / PLLA e PHBV	Não realizado.	Não realizado.	Freiberger <i>et al.</i> , (2015).
Óleo de palma alto oleico	Microfluidização	<i>Tween 20</i> / Soro de leite	Não realizado.	4 Dias 25 °C e 4 °C	Ricaurte <i>et al.</i> , (2016).
Óleo de semente de chia	Nanoemulsificação	<i>Tween 80</i> / Mucilagem de chia	Não realizado.	28 dias 40°C	Campo <i>et al.</i> , (2017).
Óleo de peixe	Extração supercrítica de fluido de emulsões Atomização de	<i>Tween 80/</i> Policaprolactona	Não realizado.	Não realizado.	Prieto e Calvo (2017)
Óleo de peixe	dióxido de carbono supercrítico líquido expandido	-- / Óleo de soja totalmente hidrogenado	Não realizado.	Não realizado.	Yang e Ciftci (2017)
Óleo de peixe	Lipossomas	Lecitina / Óleo de girassol e Glicerol	Não realizado.	Não realizado.	Ghorbanzade <i>et al.</i> (2017)
Óleo de palma bruto	Nanoemulsificação	<i>Tween 20</i> / Caseína e Goma arábica	Não realizado.	Não realizado.	Ferreira (2018).
Óleo de linhaça	Nanoemulsificação	<i>Tween 80/</i> Mucilagem de chia	Não realizado.	28 dias 40 ± 2°C	Stefani <i>et al.</i> , (2019).
Óleo de palma bruto	Nanoemulsificação	--/ Goma arábica e fécula de mandioca	Não foi realizado.	15 dias 60 ± 5°C	Donato <i>et al.</i> , (2020)

--: não foi utilizado emulsificante

Fonte: Autoria própria

No trabalho de Stefani *et al.* (2019), a avaliação da estabilidade oxidativa de óleo de linhaça encapsulado com mucilagem de chia em condições aceleradas demonstrou degradação dos ácidos graxos insaturados nos primeiros 7 dias, e a partir disso

mantiveram-se estáveis até o final do armazenamento (28 dias), indicando que o nanoencapsulamento conferiu estabilidade ao óleo, e que a variação inicial está relacionada ao óleo que não foi encapsulado. Donato *et al.* (2020) avaliaram a estabilidade do óleo de palma bruto encapsulado (OPB-NE) e detectaram valores iniciais de oxidação maiores para as OPB-NE do que para o óleo livre (OPB-L). Entretanto, ao longo do armazenamento, OPB-NE passaram a apresentar valores inferiores ao do OPB-L, também indicando que o nanoencapsulamento conferiu proteção contra a oxidação.

A estabilidade de óleos nanoencapsulados pode ser influenciada por diversos fatores, e esta avaliação pode ajudar a direcionar a melhor aplicação das nanopartículas formadas.

Ressalta-se ainda que na produção de nanopartículas através da técnica de nanoemulsificação, existe uma fase orgânica que é composta pelo óleo, por um solvente orgânico (como acetona ou etanol) e um emulsificante (esta será a fase interna das nanopartículas), e uma fase aquosa, que é composta pelo polímero e por água, compondo a fase externa das nanopartículas, sendo necessário fazer uma boa escolha de cada um destes componentes a fim de obter nanopartículas estáveis (LEGRAND *et al.*, 2007).

3.1.1 Fase orgânica

3.1.1.1 Óleo de palma bruto

O Dendzeiro (*Elaeis guineenses*) é uma planta originada no continente africano. Basicamente, seu fruto fornece dois tipos de óleo: óleo de palma bruto (OPB) ou azeite de dendê (quando extraído do mesocarpo) e óleo de palmiste (quando extraído da semente). Historicamente, seus frutos oleaginosos são utilizados como alimento desde antigas civilizações africanas, e foram trazidos por escravos para países de clima tropical, como o Brasil, no século XV (AGROANALYSIS, 2014). As primeiras populações foram registradas no Rio de Janeiro e na Bahia, porém, atualmente, o Pará é o estado brasileiro onde há a maior produção (SEDAP, 2020). Foi a partir de 1970 que a produção do óleo de palma começou a progredir, deixando de ser focada em demandas locais para tornar-se uma das maiores produções de óleo no mundo (AGROANALYSIS, 2014). Em 2020, a produção mundial foi de 73,23 milhões de toneladas (USDA, 2021).

Atualmente, o país que mais produz óleo de palma é a Indonésia, seguido pela Malásia. O Brasil se encontra na 9ª posição dentre os principais produtores, com 395 mil

toneladas por ano (SEDAP, 2020). As variedades de palma mais cultivadas no Brasil são a *dura*, *tenera* e *pisifera*, com diferenças na espessura da casca (OLIVEIRA, 2009).

Uma das vantagens de se cultivar a palma de óleo é a redução na área utilizada para a produção do óleo: com apenas 10% da área de cultivo utilizada para obtenção de óleo de soja, por exemplo, é possível produzir a mesma quantidade de óleo de palma. É a cultura de oleaginosa mais barata e que proporciona maior receita por hectare (AGROANALYSIS, 2014). Além disso, a cultura é capaz de se adaptar a diferentes tipos de solo, e, embora apresente uma produtividade excelente em solos com alta fertilidade, é possível ser cultivada mesmo em solos pobres, contanto que haja nutrição específica para as plantas.

Além das vantagens relacionadas à produção, o óleo de palma apresenta ainda uma grande gama de aplicações, sendo utilizado na indústria de cosméticos, alimentos, tecidos, biodiesel, fármacos, dentre outras. Cerca de 71% do óleo de palma têm demanda para a área de alimentos (GESTEIRO *et al.*, 2019), principalmente na produção de margarinas, gorduras e óleo para fritura. Entretanto, é importante destacar que a maior parte da utilização deste óleo é feita na forma refinada. Nesta forma, ele está presente em aproximadamente 50% dos produtos industrializados. Já na forma bruta, ele é utilizado apenas no Brasil e na África, para culinária típica regional (FERREIRA *et al.*, 2016).

A respeito das características nutricionais, aproximadamente 95% da composição do OPB é de triacilgliceróis, e uma propriedade que o diferencia dos demais óleos vegetais é sua composição em ácidos graxos, apresentando cerca de 50% de ácidos graxos saturados e 50% de insaturados, sendo os principais (CODEX, 2019):

- Ácido palmítico (C16:0): 39,3-47,5%;
- Ácido oleico (C18:1): 36-44%;
- Ácido linoleico (C18:2): 9-12% (ácido graxo essencial).

O OPB apresenta também uma elevada quantidade de compostos bioativos, como os carotenoides, tocoferóis e tocotrienóis. Uma das razões desses compostos serem de interesse para a indústria de alimentos é devido à ação corante encontrada nos carotenoides, e à ação antioxidante encontrada, tanto nos carotenoides, quanto nos tocois (CANALES; PALACIOS, 2012; EVANS; KODALI; ADDIS, 2002).

Os carotenoides são pigmentos naturais que possuem diversas funções biológicas e estão presentes em expressiva quantidade neste óleo na forma bruta (550-2500 mg/kg), especialmente o α - e o β -caroteno, que representam aproximadamente 32,70% e 51,64% dos carotenoides totais presentes no óleo, respectivamente (CODEX, 2019).

O β -caroteno é frequentemente utilizado como corante amarelo/alaranjado em alimentos industrializados. A adição de pigmentos em alimentos é de grande interesse, pois torna os produtos mais atraentes, chamando a atenção de consumidores. Entretanto, a utilização do β -caroteno sintético costuma ser uma opção mais viável, em função da instabilidade do β -caroteno natural (MORTENSEN, 2006). O próprio óleo de palma pode ser adicionado de β -caroteno sintético após o refino, pois este processo causa perda dos carotenoides presentes naturalmente no óleo (GIBON; GREYT; KELLENS, 2007).

Além da função corante, o β -caroteno, bem como os demais carotenoides, também podem atuar como antioxidantes. Esta ação está associada, principalmente, à capacidade de retenção física ou química do oxigênio *singlete*¹ de moléculas sensibilizantes (no caso de fotoxidação) ou retenção de radicais livres em reações de autoxidação lipídica (CANALES; PALACIOS, 2012). Na autoxidação lipídica, os carotenoides são conhecidos como inibidores de cadeia. Eles reagem com os radicais alquila, alcoxi e peroxil. Existem três mecanismos para estas interações: transferência de elétrons, adição, e transferência de hidrogênio (CANALES; PALACIOS, 2012).

Além da ação antioxidante, os carotenoides também podem apresentar uma ação antagônica, como pró-oxidantes. As circunstâncias que irão definir de que maneira estes compostos irão agir são muito específicas e dependem de uma série de fatores, alguns ainda não muito elucidados na literatura. Dentre as circunstâncias que podem influenciar na ação anti /pró-oxidante dos carotenoides: concentração dos mesmos, concentração do oxigênio, presença de outros antioxidantes e o próprio método utilizado para acompanhar as reações de oxidação (CANALES; PALACIOS, 2012).

Entretanto, embora existam estudos relacionados à ação pró-oxidante dos carotenoides na literatura, Ribeiro e colaboradores (2018), em revisão de diversos artigos científicos, relatam sobre produtos oxidantes advindos da reação de carotenoides com espécies reativas, entretanto, alegam que pouco se especifica sobre quais produtos oxidantes são estes e sobre qual papel fisiológico eles exercem, de modo que ainda é difícil afirmar o impacto desse comportamento dos carotenoides. Outro fato é que, muito embora a ação pró-oxidante exista, ela não anula o enorme potencial biológico encontrado nestes compostos.

A efetividade da ação corante e antioxidante pode ser afetada pela própria instabilidade dos carotenoides. Eles são propensos à isomerização da sua forma natural

¹ Espécie eletronicamente excitada da molécula de oxigênio molecular.

trans para a forma *cis* por ação da luz, calor e ácidos, levando à perda de parte do pigmento e da ação antioxidante. A oxidação também é um agente estressante aos carotenoides, sendo o principal meio de degradação destes compostos (RIBEIRO *et al.*, 2018).

Os tocoferóis e tocotrienóis são típicos antioxidantes fenólicos, e fazem com que o óleo seja mais estável, inibindo a reação de propagação da oxidação lipídica, evitando a formação de aldeídos (EVANS; KODALI; ADDIS, 2002). Eles são divididos em α (com três grupos metílicos), β e γ (dois grupos metílicos), e δ (apenas um grupo metílico). No OPB, a quantidade de tocois é de cerca de 150-1500 mg/kg, e os majoritários são o γ tocoferol (0 a 526 mg/kg) e γ tocotrienol (14 a 710 mg/kg) (CODEX, 2019).

Apesar de os antioxidantes e corantes naturais serem de grande interesse devido às suas funcionalidades, sua instabilidade faz com que a indústria muitas vezes opte por utilizar aditivos sintéticos. O antioxidante sintético mais utilizado para óleos vegetais é o TBHQ, considerado mais eficiente que os demais. Entretanto, os antioxidantes sintéticos, de modo geral, têm apresentado potencial tóxico em estudos (OUSJI; SLENO, 2020).

O corante sintético mais utilizado com o intuito de conferir cores amarelas e alaranjadas aos alimentos é o amarelo tartrazina, que também é associado a efeitos nocivos, especialmente alergias (CHECKER; DORTA; OLIVEIRA, 2011). A legislação brasileira determina que produtos que contenham amarelo tartrazina devem deixar explícito no rótulo a declaração do nome tartrazina por extenso. A justificativa é que existe a possibilidade do consumo do corante tartrazina provocar reações adversas em pessoas sensíveis, embora essas reações ainda não tenham sido comprovadas cientificamente dentro de uma relação de causalidade (BRASIL, 2002).

Dessa forma, alternativas que levem à maior estabilidade de compostos naturais isolados ou em matrizes alimentícias têm sido estudadas, a fim de viabilizar a aplicação destes em alimentos, com o intuito de diminuir a utilização de aditivos sintéticos e aumentar as possibilidades de aplicação de matrizes naturais.

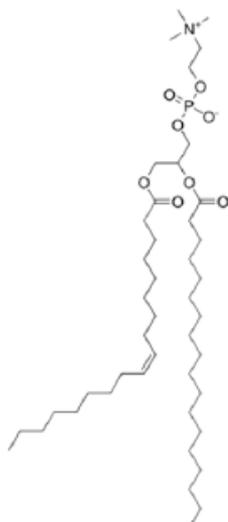
3.1.1.2 Lecitina de Soja

A fosfatidilcolina, também conhecida como lecitina, é um tensoativo natural, muito empregado na formação de nanoemulsões (FRONZA; CAMPOS; TEIXEIRA, 2004). Tensoativos, também conhecidos como emulsificantes, são anfílicos, ou seja, possuem grupos hidrofóbicos e hidrofílicos. Eles podem atrasar a separação de fases, levando à maior estabilidade de emulsões (LISBOA, 2002). A parte hidrofílica irá

interagir com a fase aquosa, e a hidrofóbica com a fase oleosa. Isso conduz a uma redução da tensão interfacial, fazendo com que ocorra a mistura de componentes, até então, imiscíveis.

As lecitinas, cuja estrutura química está apresentada na Figura 2, são misturas complexas de fosfolídeos, e podem ser extraídas de gemas de ovos ou da soja, sendo o maior componente, neste caso, a fosfatidilcolina. Seu valor de balanço hidrofílico/lipofílico (HBL) é de aproximadamente 11 (CASTEJON, 2015). Segundo Bobbio (1995), valores de HBL < 9 indicam maior aplicabilidade em emulsões água/óleo (A/O), devido à baixa solubilidade em água. Já valores > 11 sugerem aplicações em emulsões óleo/água (O/A), pois apresentam maior caráter hidrofílico. A lecitina, por apresentar um valor intermediário, pode ser adequada tanto para emulsões tipo O/A quanto A/O.

Figura 2 – Estrutura química da fosfatidilcolina



Fonte: Mertins (2008).

Devido às suas características emulsificantes, as lecitinas são muito utilizadas em técnicas de nanoemulsificação. Muitas vezes, são empregadas de forma concomitante com outros tensoativos, pois se considera que isto gera uma maior estabilidade à emulsão. Normalmente, os tensoativos utilizados em combinação são sintéticos, como os da família dos polissorbatos (*Tween 80* e *20*, por exemplo). Entretanto, a utilização da lecitina de forma individual é de grande interesse, pois apresenta maior biocompatibilidade.

Um estudo realizado por Vater e colaboradores (2019), avaliou a citotoxicidade de nanoemulsões contendo diferentes óleos e emulsificantes. Os óleos utilizados foram óleo de jojoba, óleo de girassol e triacilgliceróis de cadeia média e os emulsificantes foram

lecitina de soja Lipoid® S45, S75 e S100, Dodecil Sulfato de Sódio, Sulfato de éter laurílico de sódio, Plantacare 810 UP e Polissorbato 80 (*Tween 80*). A avaliação da citotoxicidade foi realizada em queratinócitos e fibroblastos humanos primários através do ensaio de redução do MTT, e as formulações com lecitina de soja apresentaram citotoxicidade significativamente inferior quando comparadas àquelas formuladas com os demais tensoativos utilizados.

No trabalho realizado por Barbosa (2018), a lecitina de soja foi utilizada isoladamente na produção de nanopartículas de OPB, e, quando comparada com outros dois emulsificantes (*Tween 80 e Tween 20*) apresentou os melhores resultados em relação ao tamanho das partículas, índice de polidispersibilidade (PDI) e potencial zeta.

3.1.2 Fase aquosa - Farinha do albedo do maracujá

O Brasil é o maior produtor mundial de maracujá amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa Degener*), atingindo 593.429 toneladas em 2019. Santa Catarina é o terceiro maior produtor nacional, e foi responsável por aproximadamente 7,5% da produção em 2019, atrás apenas da Bahia (28,4%) e do Ceará (24,5%) (EMBRAPA, 2020). No entanto, seu consumo costuma ser na forma *in natura* e utilização na produção de sucos. De modo geral, frutas que contêm bastante fibra e outros componentes que não costumam ser comestíveis (casca e sementes, por exemplo), geram alto teor de resíduos industriais – 60% no caso do maracujá amarelo (FAO, 2015). Estes resíduos agroindustriais podem ser utilizados para alimentação animal ou fertilizantes. A casca do maracujá pode ser utilizada na obtenção de farinhas e as sementes na extração de óleos para utilização em cosméticos (ZERAİK *et al.*, 2010).

A casca do maracujá amarelo é composta pelo exocarpo (amarelo ou amarelo-esverdeado) e mesocarpo (branco) (Figura 3) e pode representar mais de 60% da massa total do fruto. Segundo Abud e Narain (2009), esta casca apresenta grande valor funcional.

Figura 3 – Partes da casca do maracujá amarelo



Fonte: Adaptado de Oliveira (2016).

O exocarpo (também conhecido como flavedo) apresenta teores importantes de fibra alimentar e outros bioativos, e o mesocarpo (também chamado de albedo), apresenta grande quantidade de pectina, que é uma fibra solúvel muito utilizada na indústria de alimentos (OLIVEIRA *et al.*, 2016). Graças às propriedades funcionais e nutricionais encontradas, diversos estudos vêm sendo realizados com o intuito de transformar estes resíduos da indústria em ingredientes para formulação de novos produtos. A Tabela 2 apresenta alguns destes estudos.

Tabela 2 – Utilização da casca do maracujá como ingrediente de novos produtos alimentícios

Produto	Parte utilizada	Função no produto	Referência
Geleia de tamarindo	Albedo	Pectina	Souza, Barbosa e Rodrigues (2016)
Tapioca	Flavedo e Albedo	Fibra	Oliveira <i>et al</i> (2016)
Pão enriquecido com farinha	Flavedo e Albedo	Fibra	Damasceno <i>et al.</i> (2018)
Macarrão caseiro enriquecido com farinha	Flavedo e Albedo	Fibra	Costa <i>et al.</i> (2019)

Fonte: Autoria própria.

O material de parede ideal para nanopartículas formadas através da nanoemulsificação deve ter uma boa capacidade emulsificante, baixa higroscopicidade, baixo custo e alta disponibilidade, além de ser capaz de proteger o material que será encapsulado. Entretanto, é difícil encontrar algum material que apresente todas estas características desejadas (CARNEIRO, 2011). A presença da pectina na farinha do albedo do maracujá indica que este material pode apresentar bom potencial para formação de nano e micro partículas, tendo em vista que a pectina vem sendo empregada nestes processos

(WAGONER; FOEGEDING, 2017), devido às características de bom estabilizador de emulsão, propriedades gelificantes e capacidade ligante (GHAREHBEGLOU *et al.*, 2019).

Além do teor de pectina, o albedo do maracujá contém grande quantidade de fibra insolúvel (aproximadamente 30%) e minerais como cálcio, magnésio, potássio, fósforo, enxofre, ferro, zinco e cobre (SILVA *et al.*, 2016) e é considerado fonte de niacina (vitamina B3) (CÓRDOVA *et al.*, 2005). Também possui compostos fenólicos que possuem atividade antioxidante (ZERAİK *et al.*, 2012). Bezerra e colaboradores (2019) utilizaram este material no nanoencapsulamento de β -caroteno extraído da microalga *Spirulina* sp. LEB 18, obtendo partículas de tamanho entre $82,29 \pm 0,51$ e $86,83 \pm 0,50$ nm e eficiência de encapsulamento de 96,76% a 98,25%, concluindo que esta farinha tem um bom potencial para aplicação em processos de nanoencapsulamento.

Barbosa (2018) produziu nanopartículas de OPB com esta farinha como encapsulante, e avaliou a influência de três tipos de emulsificantes (*Tween 20*, *Tween 80* e Lecitina de Soja) nas formulações, obtendo tamanhos de partícula de $307,70 \pm 2,30$ nm (*Tween 20*), $298,53 \pm 2,31$ nm (*Tween 80*) e $232,17 \pm 0,84$ nm (Lecitina de Soja), concluindo que as formulações com lecitina apresentaram os melhores resultados. A eficiência de encapsulamento não foi realizada neste estudo.

3.1.3 Caracterização de nanopartículas

Tendo em vista que a redução do tamanho dos materiais é a principal responsável pelas diferentes propriedades atribuídas às nanopartículas, a caracterização das mesmas torna-se de extrema importância no desenvolvimento da nanotecnologia. Estes resultados irão garantir que o método foi capaz de obter um material em tamanho nanométrico, e também poderão direcionar para qual aplicação o produto obtido é mais adequado. As principais análises realizadas para caracterização são: tamanho de partícula, índice de polidispersibilidade, potencial zeta, pH, entre outros.

O tamanho das partículas é muito importante de ser avaliado. Primeiramente, porque essa medida indicará se o método utilizado para reduzir o tamanho das partículas até a escala nanométrica foi de fato efetivo. Além disso, existe uma grande tendência à sedimentação, ou seja, embora inicialmente as partículas possam estar em tamanho reduzido, pode acontecer de ao longo do armazenamento elas aumentarem seu tamanho devido à agregação, o que não é interessante quando se trata de aplicação em alimentos.

Dentre as técnicas existentes para avaliação deste parâmetro, as microscopias eletrônicas e técnicas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) são as mais utilizadas.

A técnica de DLS possui regulamentação pela ISO 13321² (MALVERN, 2014), e consiste em medir o tamanho das partículas quando elas estão dispersas em um líquido através da avaliação do movimento Browniano. Quando as partículas estão em solvente, ocorre um movimento aleatório devido ao bombardeamento que as moléculas do solvente causam. Este movimento é chamado movimento browniano. Basicamente, as partículas são iluminadas por um feixe de laser, o que faz com que elas espalhem radiação, e a intensidade da luz espalhada depende do tamanho das partículas. Partículas maiores se movimentarão mais lentamente, enquanto partículas menores se movimentarão de forma mais rápida. A relação entre o tamanho de uma partícula e sua velocidade devido ao efeito browniano é definida pela equação de Stokes-Einstein. Um detector capta o efeito resultante do espalhamento combinado por todas as partículas simultaneamente (formando um padrão), assim, cada partícula contribui com a evolução temporal do padrão total de espalhamento de forma distinta. O *software* detecta a mudança temporal do padrão total de espalhamento e com estes dados, determina a distribuição dos tamanhos das partículas contidas na solução (MALVERN, 2009).

Já as microscopias eletrônicas consistem em utilizar um microscópio eletrônico para obter a morfologia de determinada amostra. Estas técnicas usam como fonte de iluminação, um feixe de elétrons. A incidência deste feixe sobre uma amostra gera vários sinais, que, com os detectores adequados, podem ser coletados gerando uma imagem com resoluções muito altas (NAGATANI *et al.*, 1987). Estas técnicas podem ser utilizadas para definir o tamanho, morfologia e uniformidade das partículas obtidas.

Outra característica normalmente determinada para as nanopartículas é o potencial zeta, um parâmetro que indica a carga elétrica global da superfície das partículas. É um dado muito importante para avaliar a estabilidade do tamanho das partículas obtidas. Sabe-se que cargas iguais se repelem e cargas opostas se atraem. Dessa forma, se há uma grande quantidade de cargas iguais (sejam elas positivas ou negativas), o potencial zeta será mais alto, e indicará uma grande quantidade de forças repulsivas, sugerindo baixa tendência às partículas se agregarem ao longo do tempo. Por outro lado, baixos valores de potencial zeta indicam uma grande quantidade de forças de atração, sugerindo forte tendência à

² Regulamenta análises de tamanhos de partículas.

agregação ao longo do armazenamento, o que levaria ao aumento do tamanho das partículas.

Segundo Couvreur e colaboradores (2002), valores absolutos maiores ou próximos de 30 mV indicam boa estabilidade. Os materiais utilizados para a obtenção dos nanomateriais (encapsulante e emulsificante, por exemplo) podem interferir diretamente no potencial zeta, pois as cargas elétricas destas matérias primas irão influenciar na carga elétrica global da superfície das partículas.

Já a uniformidade dos diâmetros das partículas é dada pelo índice de polidispersibilidade (PDI). Quanto menor for o valor do PDI, mais uniformidade existe, e são considerados bons os valores de $PDI < 0,3$ (ZHANG; KOSARAJU, 2007).

A avaliação do pH poderá direcionar, de maneira mais específica, a aplicação do nanomaterial obtido, especialmente quando se trata de alimentos. Por exemplo, valores de pH muito baixos, indicam forte acidez, e podem levar a diminuição da estabilidade de compostos sensíveis a pH reduzidos (como os carotenoides) (LOBATO *et al.*, 2015). O valor da acidez também poderá interferir no sabor do produto.

3.1.4 Toxicidade de nanopartículas

Embora a nanotecnologia esteja sendo bastante difundida, existe uma preocupação sobre possíveis efeitos tóxicos que estes materiais podem apresentar. Mesmo que os componentes utilizados não apresentem toxicidade em seu tamanho natural, conhecer as características de uma molécula em tamanho macro, não fornece informações precisas sobre seu comportamento em tamanho nano (HANDFORD *et al.*, 2014).

O aumento da área superficial pode levar ao aumento da biodisponibilidade, levando também a uma maior toxicidade. Além disso, pode haver maior acesso ao organismo, prejudicar o sistema imune e levar a diferentes efeitos patológicos (MOMIN *et al.*, 2013). Segundo Pradhan e colaboradores (2015), a diminuição do tamanho pode levar a alterações na absorção, distribuição, metabolismo e extração dos materiais, o que pode influenciar os efeitos tóxicos.

Existem diversos efeitos tóxicos já relacionados às nanopartículas, tais como: danos oxidativos, toxicidade em células, genotoxicidade, disbiose, lesões hepáticas e inflamações gastrointestinais (ASHRAF *et al.*, 2021). McClements e Xiao (2017) realizaram um estudo de revisão destacando os principais mecanismos potenciais de toxicidade de diferentes nanopartículas de grau alimentício, onde apontam que a

composição, dimensão, propriedade interfacial e estado de agregação são fatores importantes que podem interferir na ação biológica das nanopartículas. Além disso, os autores apontam que é preciso levar em conta a interação das nanopartículas com a matriz alimentar, pois esta interação pode influenciar em suas propriedades físico-químicas, e, conseqüentemente, alterar fatores de absorção e toxicidade. A Tabela 3 mostra a relação de algumas características das nanopartículas com possíveis efeitos que são importantes para avaliar seu risco à saúde.

É possível notar que são diversos os efeitos que podem influenciar na toxicidade de nanopartículas, e, até o momento, ainda não existe um consenso a respeito da nanosseguurança (ASHRAF *et al.*, 2021). Na Tabela 1, dos 11 estudos sobre encapsulamento de óleos vegetais, nenhum apresentou algum tipo de análise de toxicidade.

As lacunas de conhecimento sobre o risco da nanotecnologia dificultam a criação de uma regulamentação eficiente para produtos que a utilizam. O investimento em estudos que ajudem a compreender melhor o comportamento de nanomateriais em matrizes alimentícias pode auxiliar na criação de uma regulamentação da nanotecnologia aplicada a alimentos, facilitando e aumentando o desenvolvimento, aplicação e segurança destes produtos.

Tabela 3 – Principais características das nanopartículas e seus conseqüentes efeitos no organismo

Característica	Efeito	Referência
Tamanho	Interação celular, grau de exposição, absorção, biodisponibilidade, toxicidade.	Ashraf <i>et al.</i> (2021)
Reatividade	Pode influenciar na produção de espécies reativas de oxigênio	Braakhuis <i>et al.</i> (2014)
Carga superficial	Distribuição sistêmica, absorção e toxicidade.	Fauss <i>et al.</i> (2012)
Revestimento	Determina as biomoléculas que aderem ao material, distribuição, absorção e toxicidade.	Fauss <i>et al.</i> (2012)
Forma	Influencia a capacidade de penetrar nas células	Verma e Stellacci (2010)
Impurezas	Toxicidade	Hull <i>et al.</i> (2009)

Fonte: adaptado de Sellers *et al* (2015).

3.1.4.1 Citotoxicidade

Uma das formas de avaliar a toxicidade de materiais é através de ensaios com cultura de células (humanas ou animais) (*in vitro*). Ensaios *in vitro* são rápidos, reprodutíveis e sensíveis. A avaliação consiste em colocar o possível agente tóxico em

contato com uma cultura de células e verificar alterações celulares por diferentes mecanismos (ROGERO *et al.*, 2003).

Os ensaios *in vitro* foram desenvolvidos com o intuito de substituir a utilização de animais para testes, pensando, dentre outros fatores, no bem estar animal. São utilizadas condições controladas de pH, temperatura, CO₂ e O₂, a fim de tornar o meio o mais próximo possível das condições fisiológicas encontradas *in vivo* (PRADO, 2012).

As células HT22, uma linhagem imortalizada do hipocampo de camundongos, vêm sendo bastante estudadas para avaliar efeitos decorrentes da oxidação, especialmente porque este processo está diretamente ligado às patogêneses neurodegenerativas. Alimentos que possuem compostos antioxidantes vêm sendo associados à redução do risco do desenvolvimento destas doenças (HWANG; SHIH; YEN, 2012; SCHULZ *et al.*, 2019). Mais informações sobre ensaios de toxicidade de nanopartículas de óleos serão abordadas no próximo capítulo deste trabalho.

CAPÍTULO III

4 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

Este trabalho foi dividido em 2 etapas: (Etapa 1) levantamento de dados científicos e tecnológicos (compreendendo a redação de 1 prospecção científica e tecnológica publicada como capítulo de livro e 1 artigo de revisão) e (Etapa 2) artigo experimental, conforme descrito abaixo:

Capítulo de livro: SCHAPPO, Flávia Barbosa; MELO, Ana Paula Zapelini de; RIBEIRO, Camila Duarte Ferreira; BARRETO, Pedro Luiz Manique; NUNES, Itaciara Larroza. **Nanoemulsão e seu potencial de uso em alimentos: uma prospecção tecnológica e científica**. Ensino e Pesquisa no Campo da Engenharia e da Tecnologia de Alimentos, p. 130-148, 8 fev. 2021. Atena Editora. <http://dx.doi.org/10.22533/at.ed.25021050116>.

Artigo de revisão: **Toxicidade de nanopartículas de óleos: uma revisão com foco na Ciência dos Alimentos**.

Artigo experimental: **Estabilidade e citotoxicidade de nanopartículas de óleo de palma bruto**.

Capítulo de livro:

Nanoemulsão e seu potencial de uso em alimentos: uma prospecção tecnológica e científica.

RESUMO

O uso de nanoemulsões vem sendo cada mais explorado no campo da nanotecnologia, com grande potencial de aplicação em alimentos. Dessa forma, este estudo prospectivo teve como objetivo realizar um mapeamento acerca dos estudos científicos e patentes relacionadas às nanoemulsões, a fim de avaliar seu potencial de uso em matrizes alimentícias. A metodologia utilizada consistiu na pesquisa avançada na base de dados científica *Scopus*, e na busca de patentes realizada nas bases de dados do *European Patent Office* (Espacenet®) e do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) do Brasil, durante os meses de outubro a novembro de 2020. Foram encontrados 7411 trabalhos científicos na base de dados *Scopus*, e a Índia (1370), Estados Unidos (1257) e China (1156) são os três países com maior número de publicações sobre o tema, seguidos pelo Brasil (652). Foram recuperados, 56 e 66 documentos de patentes nas bases de dados *Espacenet*® e INPI, respectivamente. A análise dos resultados mostrou que tanto a pesquisa quanto a proteção da propriedade intelectual sobre o tema estão crescendo de maneira expressiva, principalmente na última década, mas que, ainda assim, há uma grande diferença entre a produção científica e as patentes, sendo essa última 13,5 vezes menor. A China encontra-se bem à frente dos demais países em relação ao depósito de documentos de patentes, com 56,8% dos documentos encontrados na base dados *Espacenet*®. Os dados indicaram grande potencial de uso de nanoemulsões em matrizes alimentícias. Dentre as patentes da área de alimentos, o melhor aproveitamento de compostos bioativos é uma das principais finalidades. Apesar do nítido crescimento da nanotecnologia aplicada a alimentos, novos investimentos, desenvolvimento de políticas e programas de incentivo para impulsionar essa tecnologia são necessários nos países em desenvolvimento, como o Brasil. Para perspectivas futuras, espera-se que esse campo possa ser potencialmente explorado no âmbito de desenvolvimento de novos produtos alimentícios, de forma segura, economicamente viável, sustentável e com potencial nutricional importante.

Palavras-chave: propriedade intelectual; nanotecnologia; emulsão.

ABSTRACT

The use of nanoemulsions has been increasingly explored in the field of nanotechnology, with great potential for food application. This prospective study aimed to carry out a mapping about scientific studies and patents related to nanoemulsions, in order to assess their potential for use in food matrices. The methodology used consisted of advanced research in the scientific database Scopus, and the search for patents was carried out in the databases of the European Patent Office (Espacenet®) and the National Institute of Industrial Property (INPI) of Brazil, during the months from October to November 2020. 7411 scientific papers were found in the Scopus database, and India (1370), United States (1257) and China (1156) are the three countries with the largest number of publications, followed by Brazil (652). 56 and 66 patent documents were retrieved from the Espacenet® and INPI databases, respectively. The analysis of the results showed that both science and the protection of intellectual property on the subject are growing significantly, especially in the last decade, but, even so, there is a big difference between scientific production and patents, the latter being still 13.5 times smaller. China is quite beyond other countries about filing patent documents, with 56.8% of the documents found in the Espacenet® database. The data indicated great potential for the use of nanoemulsions in food matrices. Among food patents, one of the main purposes is improving the use of bioactive compounds. Despite the clear growth of nanotechnology applied to food, new investments, development of policies and incentive programs to boost this technology are necessary in developing countries, such as Brazil. For future perspectives, it is hoped that this field can be potentially explored in the context of developing new food products, in a safe, economically viable, sustainable and with important nutritional potential.

Keywords: intellectual property; nanotechnology; emulsion.

1 INTRODUÇÃO

Nanotecnologia é a ciência que estuda a criação e exploração de materiais em escala nanométrica. De maneira mais específica, nanotecnologia refere-se a estruturas com dimensões inferiores a 1000 nm (SANGUANSRI; AUGUSTIN, 2006).

A redução de partículas a escalas nanométricas faz com que elas apresentem propriedades funcionais únicas que não são encontradas em escala macro (ASSIS *et al.*, 2012), como maior solubilidade, aumento da biodisponibilidade e liberação de compostos ativos na concentração e taxa desejados (KATOUZIAN; JAFARI, 2016).

A nanotecnologia é considerada um dos principais objetos de pesquisa, desenvolvimento e inovação de países industrializados (ZANETTI-RAMOS; CRECZYNSKI-PASA, 2008). Dentre os campos emergentes para aplicação dela, a área de alimentos encontra-se em destaque. O desafio de produzir alimentos inovadores e com potencial nutricional de forma sustentável faz com que o uso desta tecnologia seja cada vez mais útil. Dentre as possíveis aplicações, pode-se destacar a preservação de sabor, aroma, proteção de compostos frente à degradação (SILVA-BUZANELLO, 2013), resistência de embalagens, conservação de produtos, dentre outros (NEETHIRAJAN; JAYAS, 2011).

Diversas metodologias podem ser utilizadas para formação de partículas em escala nanométrica, dentre elas, a nanoemulsificação. Esta metodologia tem sido a mais popularmente utilizada, devido à facilidade de execução e aplicabilidade em matrizes hidrofílicas (PRAKASH *et al.*, 2018). Quando dois líquidos imiscíveis são colocados em contato e um deles encontra-se na fase interna e o outro na fase externa, temos um sistema chamado de emulsão. A redução do tamanho das partículas acontece porque a fase interna tenta frequentemente se misturar e se separar como uma segunda fase (LISBÔA, 2002).

O grande interesse no desenvolvimento de sistemas nanoemulsionados para liberação de compostos ativos vem ganhando considerável atenção de cientistas, instituições e organizações privadas, devido às interessantes propriedades físico-químicas que estas partículas apresentam.

Diante deste contexto, o objetivo do presente estudo foi realizar um mapeamento acerca dos estudos científicos e patentes relacionadas às nanoemulsões, a fim de avaliar seu potencial de uso em matrizes alimentícias.

2 METODOLOGIA

O levantamento de publicações científicas sobre o tema foi realizado na base de dados *Scopus*. Foi utilizada a busca avançada em “título, resumo e palavras-chave” com o termo “*Nanoemulsion*”. Posteriormente, a fim de avaliar documentos específicos mais recentes da área de alimentos, o período de publicação foi limitado aos anos de 2020 e 2021 e as revistas foram limitadas àquelas pertencentes a esta área (*Food Chemistry*, *Journal of Food Engineering*, *International Journal of Food Microbiology*, *Journal of Food processing and preservation*, *Food Research International*, *International Journal of Food Science & Technology* e *Journal of Food Measurement and Characterization*). Nesses trabalhos, foram verificadas as principais matérias-primas utilizadas e o objetivo de cada trabalho por meio da leitura dos resumos.

A busca de patentes foi realizada nas bases de dados *European Patent Office (Espacenet®)* e Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) do Brasil. As informações foram coletadas durante os meses de outubro e novembro de 2020.

A pesquisa buscou dados relacionados à produção de nanoemulsões aplicadas à área de alimentos. Foi utilizada a busca avançada em título, com associação de códigos CIP (Classificação Internacional de Patentes), a fim de ampliar os resultados obtidos (Tabela 1). O código “A23 - Alimentos ou derivados e seu tratamento” foi escolhido devido à relação com a área de alimentos. As palavras-chave e os respectivos códigos associados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Palavras-chave e códigos de Classificação Internacional de Patentes (CIP) utilizados para a busca de patentes nas bases de dados *Espacenet®* e INPI.

Palavras-chave	Base de dados
Nanoemulsão/ <i>Nanoemulsion</i>	INPI, <i>Espacenet®</i> e <i>Scopus</i>
<i>Nanoemulsion and oil</i>	<i>Espacenet®</i>
<i>Nanoemulsion and “essential oil”</i>	<i>Espacenet®</i>
<i>Nanoemulsion and A23</i> e Nanoemulsão e A23	<i>Espacenet®</i> e INPI
<i>Nanoemulsion and oil and A23</i>	<i>Espacenet®</i>

Fonte: autoria própria.

Na base dados INPI, a utilização da palavra-chave sem o código CPI gerou maior número de documentos de patentes e, assim, eles foram avaliados individualmente.

Na base de dados *Espacenet*®, a utilização do código CPI trouxe documentos cujos descritores se adequavam mais ao tema a ser estudado e assim, eles foram avaliados individualmente para tratamento de dados.

Os dados obtidos foram exportados utilizando o programa CSV ed. 2.2.3, e os programas *Microsoft Excel* e *GraphPad Prism 7.00* foram utilizados para tratamento de dados e elaboração dos gráficos, respectivamente. O site “<http://www.visme.com>” foi utilizado para a construção dos mapas mundi. Os gráficos mostraram a distribuições dos artigos e documentos de patentes por país, ano e área de conhecimento.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O quadro 1 apresenta os resultados da busca utilizando palavras-chave e os códigos associados. Os dados selecionados estão apresentados em destaque e são discutidos nos tópicos posteriores.

Quadro 1 – Número de publicações científicas no *Scopus* e busca de patentes por palavras-chave e códigos de Classificação Internacional de Patentes (CPI) nas bases de dados europeia (*Espacenet*®) e brasileira (INPI).

Palavra-chave referentes ao <i>Scopus</i>	Palavras-chave	INPI	<i>Espacenet</i> ®	<i>Scopus</i>
		<i>Nanoemulsion</i>	-	-
Palavras-chave referentes ao INPI e <i>Espacenet</i> ®	Nanoemulsão/ <i>nanoemulsion</i>	66	550	-
	<i>Nanoemulsion and oil</i>	-	72	-
	<i>Nanoemulsion and “essential oil”</i>	-	8	-
	Nanoemulsão e A23/ <i>Nanoemulsion and A23</i>	2	56	-
	<i>Nanoemulsion and oil and A23</i>	0	8	-

Fonte: autoria própria.

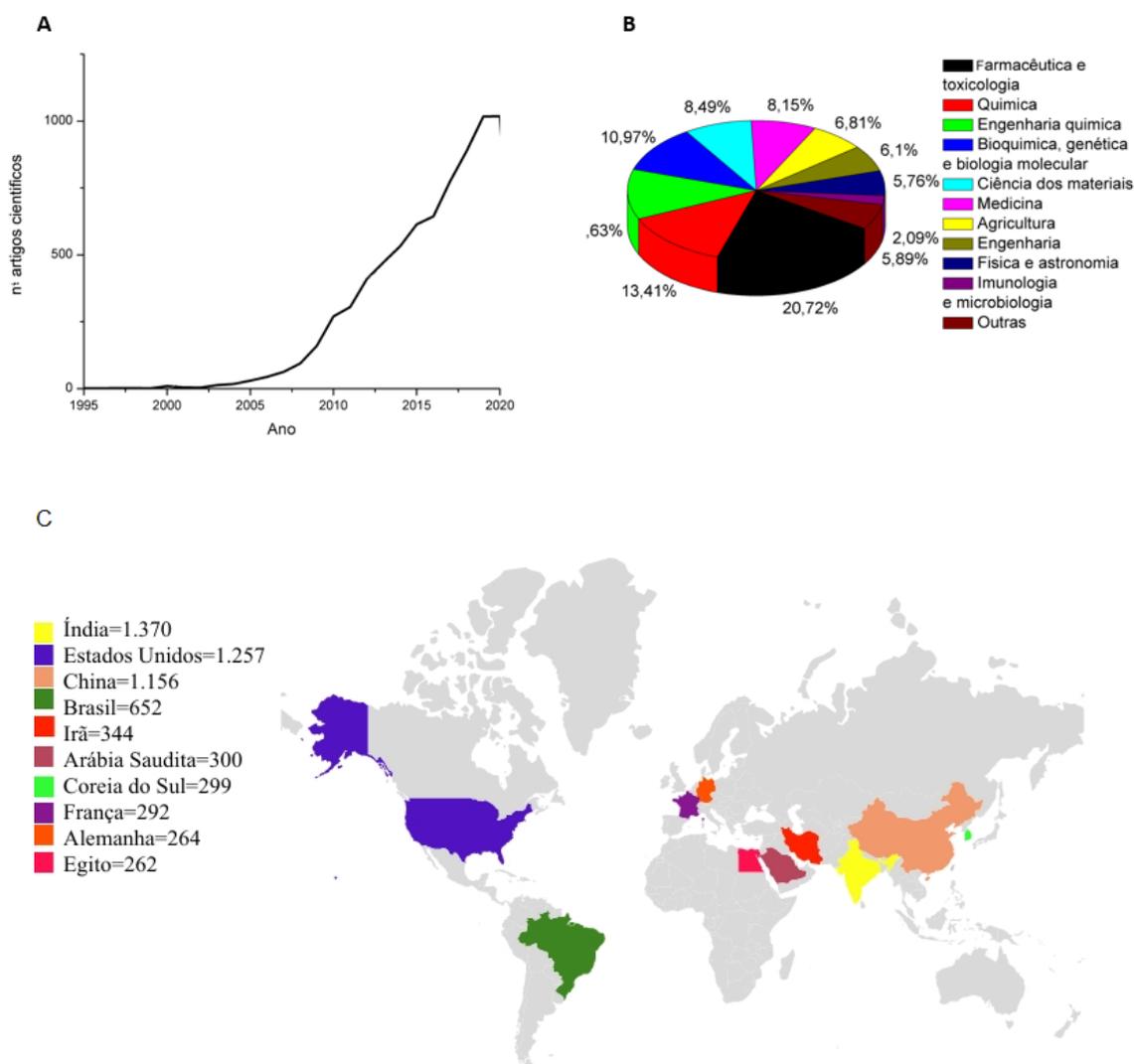
3.1 PROSPECÇÃO CIENTÍFICA

A busca na base de dados *SCOPUS* apontou 7411 artigos sobre nanoemulsões. A evolução anual de artigos científicos relacionados com o tema (Figura 1A) demonstra elevado crescimento. O padrão da curva mostra que estudos científicos sobre este tema cresceram rapidamente ao longo dos anos, principalmente a partir de 2009.

Dos estudos publicados, o primeiro foi no ano de 1995, na revista *Proceedings of the Controlled Release Society*, por pesquisadores espanhóis. O artigo aborda a utilização de nanoemulsões de poli- ϵ -caprolactona para aumentar a captação ocular de fármacos.

O primeiro estudo científico conduzido por brasileiros foi publicado no ano 2000, na revista *International Journal of Pharmaceutics*. O estudo teve como objetivo formular nanoemulsões e nanocápsulas de penicilina, avaliar suas características físico-químicas e estabilizadoras, e determinar sua atividade antimicrobiana e cinética de liberação *in vitro*. Os resultados indicaram formulações estáveis que fornecem uma forma de dosagem potencial para encapsular drogas mais facilmente solúveis.

Figura 1 – Número de artigos científicos que utilizaram nanoemulsões de acordo com a evolução anual de publicações (A), percentual por área de conhecimento (B) e distribuição por país ou território (C).



Fonte: autoria própria. Dados: *Scopus* (2020).

A última pesquisa publicada até o momento é de março de 2021, divulgada no periódico *Food Chemistry*, e retrata o processo de preparação de uma nanoemulsão de extrato de semente de anis (erva-doce). O emulsificante utilizado foi o *Tween 80*, e as nanoemulsões foram preparadas pelo método de ultrassom. A nanoemulsão de anis foi

comparada com o extrato, a fim de comparar a efetividade contra bactérias patogênicas, e os resultados indicaram que a nanoemulsão apresentou atividade antimicrobiana significativamente maior (GHAZY *et al.*, 2020).

A maior parte dos estudos sobre nanoemulsão enquadra-se nas áreas toxicológica e farmacêutica (21,1%) seguido pela química (13,3%) (Figura 1B). A ausência de uma classificação exclusiva para alimentos pode ser atribuída à abrangência desta classe, pois o campo da nanotecnologia é amplo e envolve quase todas as áreas.

O crescente número de artigos publicados, contendo a palavra “nanoemulsão” indica que há um grande investimento em pesquisas nessa área. Os artigos científicos experimentais são a principal forma de publicação atualmente (78,38%), seguida por artigos de revisão (14,07%).

A distribuição de artigos científicos por país ou território (Figura 1C), apresenta a Índia (1370), Estados Unidos (1257) e China (1156) como os países que detêm o maior número de publicações científicas. O Brasil vem logo em seguida, com 652 trabalhos.

Utilizando a busca avançada e avaliando apenas artigos mais recentes, datados de 2020 e 2021, e publicados apenas em revistas da área de alimentos (Tabela 2), nota-se que as nanoemulsões voltadas para alimentos vêm sendo pesquisadas, principalmente, para ampliar a aplicabilidade de compostos antioxidantes, antibacterianos, antifúngicos, melhoramento da biodisponibilidade e conservação, além do desenvolvimento de alimentos funcionais e fortificados. Dentre estes artigos, o Irã possui o maior número de trabalhos (4), seguido pela China, Estados Unidos e Índia (3 cada) e Brasil e Espanha (2 cada).

Em relação ao financiamento dos projetos de pesquisa, a organização chinesa *National Natural Science Foundation of China* (NSFC), é considerada uma das maiores patrocinadoras de estudos científicos do mundo. Em 30 anos mais de 390 mil projetos foram financiados (NSFC, 2019). No Brasil, os dois órgãos de maior destaque são: o conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ambos fundados em 1951 com o objetivo de fomentar o desenvolvimento de estudos e projetos científicos no país (CNPQ, 2019; CAPES, 2019), demonstrando o incentivo à inovação e à pesquisa científica de instituições brasileiras sobre o tema.

Tabela 2 – Artigos publicados sobre nanoemulsão em revistas da área de alimentos em 2020 e 2021

Referência	Matéria-prima	Função	País
Ghazy <i>et al</i> (2021)	Extrato de semente de anis	Antibacteriana	Egito
Li <i>et al</i> (2021)	Óleo de tomilho	Antibacteriana	China e Estados Unidos
Caballero e Daridov-Pardo (2021)	Luteína	Corante	Estados Unidos
Gholamian, Nourani e Bakhshi (2021)	Óleo essencial de sementes de cominho	Conservante, aromatizante, ação antifúngica e antibacteriana	Irã
Flores-Andrade <i>et al</i> (2021)	Carotenoides	Pigmento e ação antioxidante	México
Chang <i>et al</i> (2021)	Óleo de polpa de espinheiro marítimo	Antioxidante	China
Bento <i>et al</i> (2020)	Óleo essencial de laranja	Preservação de sucos de frutas	Brasil e Espanha
Nishad <i>et al</i> (2021)	Casca de toranja	Melhorar estabilidade oxidativa de óleo de mostarda	Índia
Lahidjani, Ahari e Sharifan (2020)	Curcumina	Conservação da truta <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Irã
Gahrue <i>et al</i> (2020)	Vitamina D3 e compostos bioativos de pétalas de açafrão	Melhorar biodisponibilidade	Irã
Sandoval-Cuellar <i>et al</i> (2020)	Óleo de palma alto oleico	Alimentos funcionais	Colômbia e México
Zhang <i>et al</i> (2020)	Ácido docosahexaenóico comestível (DHA) e ácido eicosapentaenóico (EPA)	Alimentos funcionais	China
Gani e Benjakul (2020)	Óleo de coco virgem β -glucano	Estabilidade de armazenamento do gel de surimi	Tailândia
Javanshir <i>et al</i> (2020)	Óleo essencial de <i>Ricinus communis</i> L.	Antioxidante e anticâncer	Irã
Jian, Liao e Charcosset (2020)	Curcumina	Antioxidante, antiinflamatória e anticâncer.	França
Wan <i>et al</i> (2020)	Óleo de cravo	Antifúngica	Estados Unidos
Barman, Chowdhry e Baruah (2020)	β -Caroteno	Corante	Índia
Chaudhari <i>et al</i> (2020)	α -Terpineol	Antifúngica	Índia
Abreu-Martins <i>et al</i> (2020)	β -Caroteno	Entrega de compostos bioativos	Espanha e Brasil

Fonte: autoria própria.

3.2 PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA

3.2.1 *Espacenet*®

O primeiro depósito de patente encontrado sobre nanoemulsões na base de dados *Espacenet*® foi em 2006 (resumo não disponível), quando os estudos científicos já estavam em crescimento (Figura 1A). A primeira patente que disponibiliza o resumo, tem data de 2007 e trata da composição de nanoemulsões e métodos de usos das mesmas, e afirma que a composição pode conter ingredientes individuais ou uma mistura sinérgica que pode ter açúcares redutores, polióis de açúcar, triglicerídeos de cadeia média, polissacarídeos, polifenóis, fosfolipídeos, quitosana, caseínas, dentre outros (MORA-GUTIERREZ e GURIN).

A última patente encontrada foi de outubro de 2020, e trata de formulações e métodos concentrados de nanoemulsões. Refere-se, especialmente, às nanoemulsões que contêm ingredientes ativos não polares, e destinam-se a uso em alimentos, bebidas, suplementos ou preparações farmacêuticas. O documento ainda especifica que a invenção envolve baixas quantidades de emulsificantes naturais e derivados, solventes não polares amigáveis ao consumidor, e com diâmetro de partícula médio inferior a 100 nm. A vantagem seria uma maior biodisponibilidade dos ingredientes ativos, além de transparência óptica (MICHAEL, 2020).

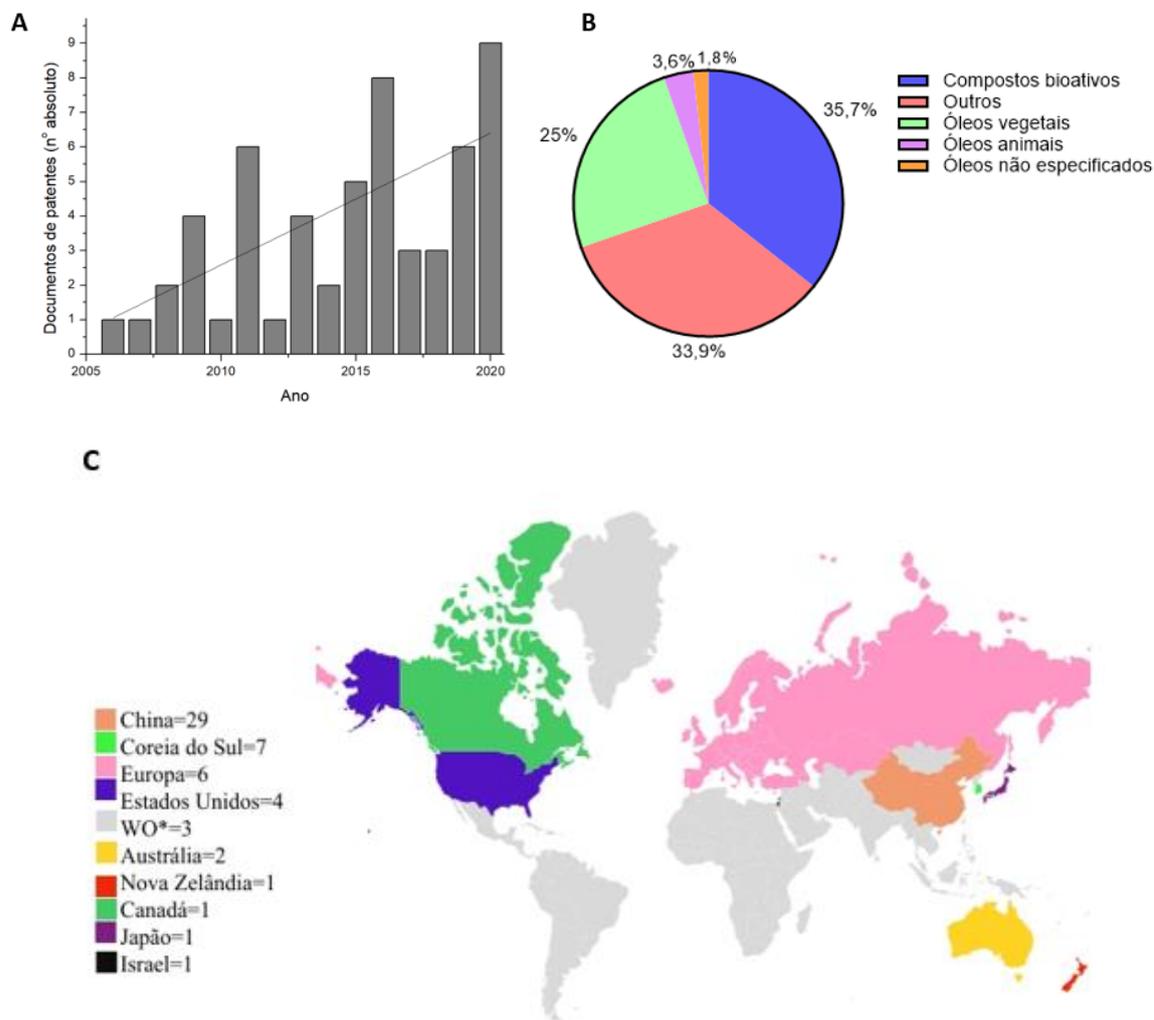
Ao longo dos anos, os depósitos de patentes não apresentam um crescimento linear, mas é possível perceber uma tendência de aumento que vem se mantendo ao longo dos próximos anos (Figura 2A). Este fato se deve, provavelmente, ao aumento de estudos e investimento nessas tecnologias, que é refletido nas patentes depositadas. Tendo em vista que é uma tecnologia relativamente nova e que o investimento na mesma tem aumentado, é esperado que este número cresça ainda mais nos próximos anos.

Em relação aos países (Figura 2C), a China tem o número mais expressivo, com 29 patentes, seguida pela República da Coreia (7), Europa (6) e Estados Unidos (4). Não foram encontradas patentes brasileiras na base de dados *Espacenet*®.

Segundo dados da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) de 2016, a China, junto com os Estados Unidos, possuem os maiores potenciais de inovação tecnológica do mundo. De acordo com esta pesquisa, a China tem avançado de forma rápida, deixando de ser dependente em manufatura e se tornando uma potência em inovação. Dessa forma, é justificado que a China, que busca inovação tecnológica e está à

frente dos demais no que se refere a novas tecnologias, seja o país com um número expressivamente maior de patentes sobre o tema.

Figura 2 – Número de patentes do *Espacenet*® que utilizaram nanoemulsões de acordo com a evolução anual (A), tipos de matérias-primas presentes nas nanoemulsões (B) e distribuição por país ou território (C).



(B) Outros: substâncias como mel, geleia real, documentos que citam diversos tipos de óleos e gorduras ou outras substâncias químicas, como ésteres e aromatizantes. Fonte: autoria própria. Dados: *Espacenet*® (2020).

O código A61K (preparações para fins médicos, odontológicos e para usos domésticos) foi o identificado no maior número de documentos sobre o tema (56 documentos) (Tabela 3). Este código está geralmente relacionado às matérias-primas utilizadas, que normalmente apresentam ação benéfica à saúde.

Um exemplo disso é a patente que trata de nanoemulsões de antioxidantes naturais encapsulados com intuito de preservar produtos alimentícios frescos ou minimamente processados, depositada pela Organização Mundial de Propriedade Intelectual – OMPI (WIPO), solicitada em 2017 e publicada em 2018. Ela utiliza este código referindo-se a *Anacardiaceae*, uma família botânica que apresenta várias espécies frutíferas com potencial antioxidante (CHAVES *et al.*, 2010).

Outro exemplo é a patente que trata de uma nanoemulsão comestível de óleo de chia, depositada pela Organização Mundial de Propriedade Intelectual (WIPO) em 2017 e publicada em 2018. Seus inventores são do Conselho Nacional de Investigações Científicas e Técnicas, e da Universidade de Buenos Aires. A nanoemulsão é apresentada como tendo alta estabilidade física e oxidativa, além de alta bioacessibilidade de ácidos graxos ômega-3, e são apresentados 3 métodos de preparação: homogeneização à alta pressão, ultrassom e moinho coloidal (ARZENI *et al.*, 2017)

O segundo código mais citado foi o A23L (39 patentes), que trata do preparo, tratamento, cozimento ou modificações nutritivas de alimentos. Das patentes encontradas, 19 apresentaram ambos os códigos (A23L e A61K).

Em relação aos depositantes, é possível observar o destaque das empresas privadas (58,2%) frente às agências governamentais e institutos de pesquisa (41,8%). Isso revela o interesse dos empreendedores em proteger as tecnologias desenvolvidas, além do investimento por parte de empresas neste segmento. Entretanto, nota-se que universidades e institutos de pesquisa também têm tido a preocupação de realizar a proteção das tecnologias desenvolvidas.

Embora a palavra-chave utilizada para recuperação de documentos refira-se a nanoemulsões, 5 patentes, dentre as 56, incluíram a utilização de polímeros em suas formulações, o que significa que pode ter ocorrido um encapsulamento. O termo nanopartícula é mais genérico e, portanto, é aplicável tanto para nanoemulsão (sem material de parede) quanto para nanocápsula (com material de parede revestindo o núcleo) (FERREIRA e NUNES, 2019). A nanoemulsão pode ser o ponto de partida de um processo de encapsulamento. O mesmo também ocorreu em alguns dos trabalhos científicos (FLORES-ANDRADE *et al* 2021; LI *et al.*, 2021; BENTO *et al.*, 2020).

Tabela 3 – Distribuição de códigos de patentes sobre nanoemulsão.

Código CPI	Nº de documentos	Significado do código
A61K	56	Preparações para fins médicos, odontológicos e para usos domésticos;
A23L	39	Alimentos, produtos alimentícios ou bebidas não alcoólicas, sua preparação e preservação de alimentos;
A61P	19	Atividade terapêutica específica de compostos químicos ou preparações medicinais;
A23K	10	Forragem;
A23D	7	Óleos e gorduras comestíveis;
A23C	4	Produtos lácteos e substitutos do leite;
B01F	4	Mistura, emulsão e dispersão;
A23P	3	Elaboração de alimentos inespecífica (não coberta por outra classificação);
A61Q	3	Uso específico de cosméticos ou preparações semelhantes;
A23B	3	Alimentos em conserva, produtos conservados, amadurados ou enlatados;
C09K	3	Materiais para aplicações diversas (não englobado por outra classificação);
A23J	3	Composição proteica para alimentos;
C02F	2	Tratamento de água;
B82B	1	Nanoestruturas formadas pela manipulação de átomos individuais, moléculas ou coleções limitadas de átomos ou moléculas;
C07F	1	Compostos acíclicos, carbocíclicos ou heterocíclicos, não contendo elementos que não são carbonos, hidrogênio, halogênio, oxigênio, nitrogênio, enxofre, selênio ou telúrio;
C12G	1	Vinho, bebidas alcoólicas e preparações;
A01G	1	Horticultura, cultivos vegetais, flores, arroz, frutas, vinhos, lúpulo, alga;
A01K	1	Criação animal, cuidados com pássaros, peixes, insetos;

Fonte: autoria própria. Dados: *Espacenet*® (2020).

Quanto às matérias-primas utilizadas nas tecnologias, percebe-se que existe um investimento na elaboração de nanoemulsões que tenham em sua composição compostos bioativos (Figura 2B). Dentre os bioativos encontrados, destacam-se os ácidos graxos (como ômega-3, eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA), ácido linoleico conjugado), vitamina E, quercetina, antocianinas, astaxantina e antioxidantes naturais não especificados. Além disso, foram encontrados alimentos ou substâncias como mel, própolis e geleia real, que contêm compostos bioativos.

Os principais óleos encontrados foram: óleo de peixe (2 documentos), óleo de chia, óleo essencial de *Litsea cubeb* (2 documentos), óleo de alga DHA, óleo de mostarda (com 2 patentes), óleo de cannabis (3 documentos), óleo de semente de oleífera, óleo de semente de pinho coreano, óleo de linhaça e óleo de *blumea*. Nestes casos, as nanoemulsões não envolveram diretamente compostos bioativos, porém, diversos óleos contêm compostos bioativos em sua composição, como ácidos graxos essenciais, vitaminas e compostos antioxidantes, o que demonstra que há investimento em nanoemulsões com o propósito de aumentar o potencial de uso de compostos bioativos tanto isolados quanto em matrizes oleosas.

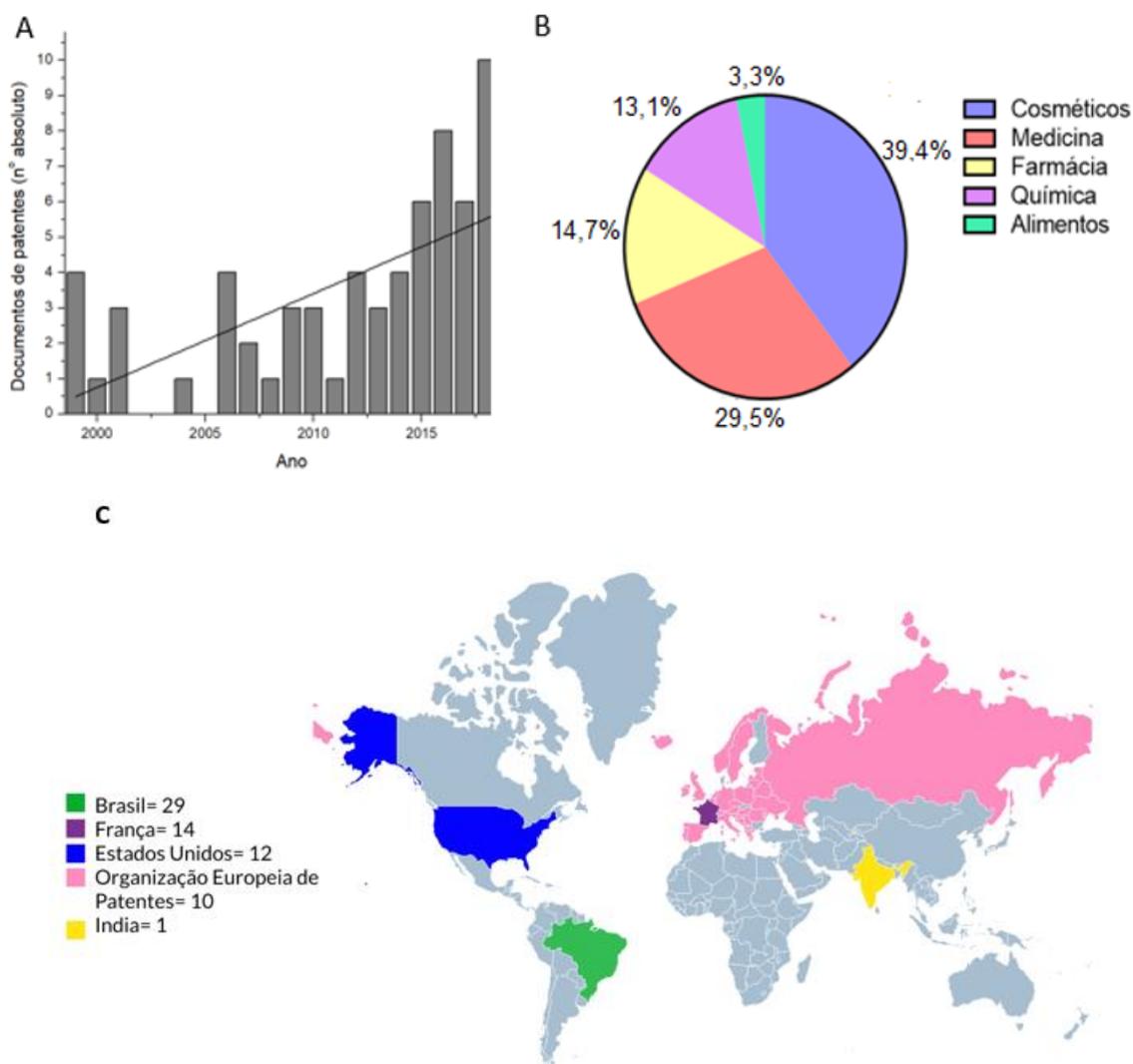
3.2.2 INPI

A primeira patente depositada no INPI sobre o tema nanoemulsão foi em 1999 pela empresa francesa *L'Oréal*, e trata-se de uma nanoemulsão para fins cosméticos e dermatológicos, para aplicação na hidratação da pele, tratamento para cabelos e tratamento oftalmológico (colírio para olhos) (SIMONNET; SONNEVILLE; LEGRET, 2001). Já a última, tem data de 2020 e trata de uma nanoemulsão óleo em água cujo resumo não se encontra disponível (NAKATA, 2020).

É evidente que o depósito de patentes sobre esse tema está aumentando ao longo dos anos (Figura 3A), especialmente a partir de 2010, ano em que o crescimento se tornou um pouco mais regular. Isto indica que os investimentos sobre esta tecnologia estão aumentando, possivelmente devido aos bons resultados obtidos pelos estudos.

Os documentos de patente recuperados na base do INPI estão distribuídos em cinco áreas (distintas ou em combinação numa mesma patente): Medicina, Farmácia, Cosméticos, Química ou Alimentos. A área de cosméticos é a que apresenta maior expressividade, com 39,4% das patentes depositadas, seguida pela medicina. A área de alimentos comporta 3,3% das patentes encontradas, com apenas duas patentes relacionadas ao tema. A distribuição das patentes encontradas por área está apresentada na Figura 3B.

Figura 3 – Número de patentes do INPI que utilizaram nanoemulsões de acordo com a evolução anual (A), distribuição por área de conhecimento (B) e distribuição por país ou território (C).



Fonte: autoria própria. Dados: INPI (2020).

Dentre os documentos encontrados, aproximadamente 63% pertencem à empresas privadas. Destas, apenas seis são depositadas por empresas brasileiras, sendo principalmente Botica Comercial Farmacêutica Ltda. e Natura Cosméticos S.A., com 3 e 2 documentos, respectivamente. Nota-se que há um grande número de empresas estrangeiras que já protegem suas invenções no Brasil (Figura 3C). A principal empresa estrangeira que depositou patentes no Brasil foi a empresa francesa *L’Oreal*, com nove patentes. Este fato se deve, provavelmente, ao grande número de consumidores desta marca aqui no Brasil, o

que faz com que a empresa precise proteger suas tecnologias no país para manter seu domínio de mercado frente às demais.

No Brasil, nota-se que, ao contrário do cenário mundial, a maior parte das patentes depositadas vem de universidades públicas, e não de empresas. Foram encontradas dezesseis patentes depositadas por universidades brasileiras, o que mostra que a ciência brasileira busca manter-se atualizada frente ao desenvolvimento de tecnologias que vem ganhando destaque no cenário mundial.

As duas patentes encontradas da área de alimentos foram depositadas pela *International Flavors & Fragrances Inc.*, empresa americana que desenvolve aromas e sabores para fragrâncias finas de beleza, detergentes e utensílios domésticos, bem como alimentos e bebidas. Ambas as patentes são a respeito de uma nanoemulsão e seu uso em bebidas líquidas e concentrado de bebidas líquidas, com uma pequena diferença no método: uma foi elaborada com dupla camada de lecitina de soja, enquanto a outra com apenas uma camada (LEE; WANG; YANG; VACCARI, 2018a; LEE; YAN; WANG; GABBARD, 2018b).

Por meio dos dados apresentados, é notório que o Brasil se apresenta em um panorama bem diferente do global, com a maioria das invenções patenteadas por universidades quando comparadas a empresas privadas, ou seja, enquanto as universidades brasileiras parecem estar atualizadas frente às tecnologias em desenvolvimento ao redor do mundo, as empresas brasileiras podem estar perdendo mercado, tendo em vista que empresas estrangeiras já estão protegendo suas tecnologias aqui no Brasil. Isto também sugere que a união entre universidades e empresas pode ser interessante, pois a troca de investimento/conhecimento pode favorecer as tecnologias, que conseqüentemente podem gerar desenvolvimento no país.

4 CONCLUSÃO

Os resultados encontrados mostraram o grande potencial de uso da técnica de nanoemulsificação em diversas áreas, inclusive na área de alimentos, e demonstraram que o Brasil necessita de mais investimentos na área de nanotecnologia a fim de acompanhar o desenvolvimento mundial.

A presente prospecção tecnológica demonstrou ainda que a tecnologia de nanoemulsões é estudada de maneira significativa em escala global, porém está

principalmente relacionada à área farmacêutica, medicinal e de cosméticos, mostrando uma lacuna, especialmente no Brasil, referente à área de alimentos.

Foi expressiva a diferença entre os estudos científicos sobre o tema e a proteção das invenções, o que indica que há mais incentivo às pesquisas científicas do que à proteção da propriedade intelectual.

Para perspectivas futuras, espera-se que esse campo possa ser potencialmente explorado no âmbito de desenvolvimento de novos produtos alimentícios, de forma inovadora, viável economicamente, sustentável e com potencial nutricional importante. Ademais, esse trabalho pode também servir de ponto de partida para empresas e pesquisadores que visam desenvolver ou aperfeiçoar essa tecnologia em distintas áreas, com destaque para a área de alimentos.

5 REFERÊNCIAS

- ABREU-MARTINS, H. de H. *et al.* The lipid type affects the in vitro digestibility and β -carotene bioaccessibility of liquid or solid lipid nanoparticles. **Food Chemistry**, v. 311, p. 126-024, 2020.
- ARZENI, C. *et al.* **Chia oil edible nanoemulsion**, WO n. WO2018029626A1. Depósito: 11 ago. 2016. Concessão: 25 out. 2017.
- ASSIS, L. M.; ZAVAREZE, E. R. Revisão: características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 2, p. 99-109, 2012.
- BARMAN, K; CHOWDHURY, D; BARUAH, P. K. Development of β -carotene loaded nanoemulsion using the industrial waste of orange (*Citrus reticulata*) peel to improve in vitro bioaccessibility of carotenoids and use as natural food colorant. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 44, n. 5, p. 1-10, 2020.
- BENTO, R. *et al.* Chitosan nanoemulsions of cold-pressed orange essential oil to preserve fruit juices. **International Journal of Food Microbiology**, v. 331, p. 108-786, 2020.
- CABALLERO, S; DAVIDOV-PARDO, G. Comparison of legume and dairy proteins for the impact of Maillard conjugation on nanoemulsion formation, stability, and lutein color retention. **Food Chemistry**, v. 338, p. 128-083, 2021.
- CAPES. Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. **História e missão**. Disponível em: <https://www.capes.gov.br/pt/historia-e-missao>. Acesso em: 03 de junho de 2019.
- CHANG, M. *et al.* Sea buckthorn pulp oil nanoemulsions fabricated by ultra-high pressure homogenization process: a promising carrier for nutraceutical. **Journal of Food Engineering**, v. 287, p. 110-129, 2020.
- CHAUDHARI, A. K. *et al.* Assessment of chitosan biopolymer encapsulated α -Terpineol against fungal, aflatoxin B1 (AFB1) and free radicals mediated deterioration of stored maize and possible mode of action. **Food Chemistry**, v. 311, p. 126-010, 2020.
- CHAVES, M. H. *et al.* Fenóis totais, atividade antioxidante e constituintes químicos de extratos de *Anacardium occidentale* L., Anacardiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Teresina, n. 20, p. 106-112, 2010.
- CNPq. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. **Institucional**. Disponível em: http://www.cnpq.br/web/guest/apresentacao_institucional/. Acesso em: 03 de junho de 2019.

DUNCAN, T. V. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 363, n. 1, p. 1-24, 2011.

ESPACENET. Patent Search. **Nanoemulsion and A23** Disponível em:

https://worldwide.espacenet.com/searchResults?submitted=true&locale=en_EP&DB=EPODOC&ST=advanced&TI=nanoemulsion&AB=&PN=&AP=&PR=&PD=&PA=&IN=&CPC=&IC=. Acesso em: 13 de junho de 2019.

FCF-USP. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. **Raul Cavalcante Maranhão**. Disponível em:

<http://www.fcf.usp.br/departamentos/perfil.php?membro=7934&departamento=2&departamento=2>. Acesso em: 09 de junho de 2019.

FERREIRA, C.D.; NUNES, L, I. Oil nanoencapsulation: development, application, and incorporation into the food market. **Nanoscale Research Letters**, v. 14, n. 1, p. 1-13, 2019.

FLORES-ANDRADE, E. *et al.* Carotenoid nanoemulsions stabilized by natural emulsifiers: whey protein, gum arabic, and soy lecithin. **Journal of Food Engineering**, v. 290, p. 110-208, 2021.

GAHRUIE, H. H. *et al.* Co-encapsulation of vitamin D 3 and saffron petals' bioactive compounds in nanoemulsions: effects of emulsifier and homogenizer types. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 44, n. 8, p. 1-10, 2020.

GANI, A; BENJAKUL, S. Effect of antioxidants in combination of VCO nanoemulsion on gel properties and storage stability of refrigerated sardine surimi gel. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 55, n. 6, p. 2451-2461, 2020.

GHAZY, O. A. *et al.* Ultrasound-assisted preparation of anise extract nanoemulsion and its bioactivity against different pathogenic bacteria. **Food Chemistry**, v. 341, p. 1-7, 2021.

GHOLAMIAN, S; NOURANI, M; BAKHSHI, N. Formation and characterization of calcium alginate hydrogel beads filled with cumin seeds essential oil. **Food Chemistry**, v. 338, p. 128-143, 2021.

INPI. INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL. **Nanoemulsão**. Disponível em: <https://gru.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController>. Acesso em: 23 de maio de 2019.

JAVANSHIR, A. *et al.* The antioxidant and anticancer potential of Ricinus communis L. essential oil nanoemulsions. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 14, n. 3, p. 1356-1365, 2020.

JIANG, T; LIAO, W; CHARCOSSET, C. Recent advances in encapsulation of curcumin in nanoemulsions: a review of encapsulation technologies, bioaccessibility and applications. **Food Research International**, v. 132, p. 109-035, 2020.

KATOUIZIAN, I.; JAFARI, S. M. Nano-encapsulation as a promising approach for targeted delivery and controlled release of vitamins. **Trends in Food Science and Technology**, v. 53, n. 7, p. 34-48, 2016.

LAHIDJANI, L. K; AHARI, H; SHARIFAN, A. Influence of curcumin-loaded nanoemulsion fabricated through emulsion phase inversion on the shelf life of *Oncorhynchus mykiss* stored at 4°C. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 44, n. 8, p. 1-11, 2020.

LEE, D. K. *et al.* **Nanoemulsão flavorizante translúcida metaestável, bebida líquida ou concentrado de bebida líquida, e, processo para preparação de uma nanoemulsão flavorizante translúcida metaestável.**

Titular: International Flavors & Fragrances Inc. Procurador: KASZNAR LEONARDOS PROPRIEDADE INTELECTUAL. US n. BR 11 2017 008067 2 A2. Depósito: 20 out. 2015. Concessão: 20 fev. 2018a.

LEE, D. K. *et al.* **Nanoemulsão flavorizante, bebida líquida ou concentrado de bebida líquida, e, método para preparar uma nanoemulsão.** Titular: International Flavors & Fragrances Inc. Procurador: KASZNAR LEONARDOS PROPRIEDADE INTELECTUAL. US n. BR 11 2017 008067 2 A2. Depósito: 20 out. 2015.

Concessão: 20 fev. 2018b.

LI, S. *et al.* Development of antibacterial nanoemulsions incorporating thyme oil: layer-by-layer self-assembly of whey protein isolate and chitosan hydrochloride. **Food Chemistry**, v. 339, p. 128-016, 2021.

LISBÔA, C. P. **Emulsões. Físico-química de solução de polímeros e surfactantes.** Unicamp. Disponível em: <http://chipre.iqm.unicamp.br/~wloh/offline/qp433/seminarios/2002/chrislane.pdf>. Acesso em: 10 de novembro de 2017.

MICHAEL, D. J. **A nanoemulsion concentrate formulations and methods.** Procurador: CANNASOL TECH LLC. US n. US2020315965A1. Depósito: 02 abr. 2020. Concessão: 08 out. 2020.

MORA-GUTIERREZ, A; GURIN, M. **Nanoemulsion compositions and methods of use thereof.**

Depositante: Texas A & M Univ Sys. US n. US2007085058A1. Depósito: 03 jan. 2006. Concessão: 19 abr. 2007.

NAKATA, C. **Nanoemulsão óleo em água e composição.** Titular: Unilever Nv (NL). Procurador: CAROLINA NAKATA. NL n. BR 11 2020 011757 9. Depósito: 21 set. 2019. Concessão: 20 out. 2020.

NEETHIRAJAN, S.; JAYAS, D. S. Nanotechnology for the food and bioprocessing industries. **Food Bioprocess Technology**, v. 28, n.1, p. 39-47, 2011.

NISHAD, J. *et al.* Ultrasound-assisted development of stable grapefruit peel polyphenolic nano-emulsion: optimization and application in improving oxidative stability of mustard oil. **Food Chemistry**, v. 334, p. 127-561, 2021.

NSFC. Natural Science Foundation of China. **NSFC at a Glance**. Disponível em: http://www.nsf.gov.cn/english/site_1/about/6.html. Acesso em: 07 de junho de 2019.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Gross domestic spending on R&D** (indicator). 2016. Disponível em: <https://data.oecd.org/rd/gross-domestic-spending-on-r-d.htm>. Acesso em: 10 de junho de 2019.

PASCUAL-PINEDA, L. A. *et al.* Kinetic and thermodynamic stability of paprika nanoemulsions. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 50, n. 5, p. 1174-1181, 2015.

PRAKASH, A. *et al.* Essential oil based nanoemulsions to improve the microbial quality of minimally processed fruits and vegetables: A review. **Food Research International**, v. 111, p. 509-523, 2018.

SANDOVAL-CUELLAR, C. E. *et al.* In-vitro digestion of whey protein- and soy lecithin-stabilized High Oleic Palm Oil emulsions. **Journal of Food Engineering**, v. 278, p. 109-918, 2020.

SANGUANSRI, P.; AUGUSTIN, M. A. Nanoscale materials development – a food industry perspective. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 10, p. 547–556, 2006.

SCOPUS. Elsevier's Scopus. **Nanoemulsion**. Disponível em: <https://www.scopus.com/search/form.uri?display=basic>. Acesso em: 02 de junho de 2019.

SILVA-BUZANELLO. **Obtenção de curcumina nanoencapsulada em polímeros biodegradáveis/biocompatíveis**. 2013. 110f. Dissertação. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2013.

SIMONNET, J.; SONNEVILLE, O; LEGRET, S. **Nanoemulsão, composição para uso tópico, suporte oftálmico, utilização cosmética da nanoemulsão, processo cosmético de cuidado e/ou hidratação, utilização da nanoemulsão e processo de preparação de uma nanoemulsão**. Procurador: L'oreal (FR). FR n. PI 9907330-7. Depósito: 06 dez. 1999. Concessão: 06 fev. 2001. Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

UMASS. **University of Massachusetts Amherst**. D. Julian McClements. Disponível em: <https://www.umass.edu/foodsci/faculty/d-julian-mcclements>. Acesso em: 29 de maio de 2019.

WAN, J. *et al.* Clove oil-in-water nanoemulsion: mitigates growth of *Fusarium graminearum* and trichothecene mycotoxin production during the malting of *Fusarium* infected barley. **Food Chemistry**, v. 312, p. 126-120, 2020.

WAN, J. *et al.* Physical properties, antifungal and mycotoxin inhibitory activities of five essential oil nanoemulsions: impact of oil compositions and processing parameters. **Food Chemistry**, v. 291, p. 199-206, 2019.

ZANETTI-RAMOS, B. G.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. O desenvolvimento da nanotecnologia: cenário mundial e nacional de investimentos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.89, n.2, p. 95-101, 2008.

ZHANG, L. *et al.* The formation, stability of DHA/EPA nanoemulsion prepared by emulsion phase inversion method and its application in apple juice. **Food Research International**, v. 133, p. 109-132, 2020.

Artigo de revisão:

Toxicidade de nanopartículas de óleos: uma revisão com foco na Ciência dos Alimentos.

RESUMO

Substâncias em tamanho nanométrico apresentam propriedades diferentes das mesmas substâncias em tamanhos maiores. Nanopartículas de óleos essenciais, vegetais e de algas (NPO) podem preservar o óleo, aumentar sua solubilidade e potencializar a ação dos bioativos, entretanto, pouco se discute sobre a sua segurança. Essa revisão teve como objetivo apresentar um panorama sobre a toxicidade de NPO para aplicações em alimentos. Apenas 5% do total de trabalhos encontrados (280) sobre o tema (*Scopus, Science direct e Pubmed/Medline*) realizaram avaliação de toxicidade. Destes, 71,3% trabalharam com óleos essenciais, e o restante foi relacionado a pesquisas com lipídios, dentre os quais, 21,4% óleos vegetais e 7,3% óleo de alga. Todos avaliaram a viabilidade celular através de estudos *in vitro*, sendo o ensaio de redução do MTT o mais comum (85%). Somente 1 trabalho realizou análise *in vivo* e *in vitro* (MTT), e nenhum utilizou exclusivamente análise *in vivo*. 6 trabalhos detectaram efeito anticâncer e 7 detectaram efeito antioxidante. Embora não haja um consenso sobre a segurança, já existem 97 patentes na área de alimentos que utilizam NPO, evidenciando a necessidade de mais estudos na área a fim de um aproveitamento seguro desta tecnologia inovadora.

Palavras-chave: nanotoxicidade, nanopartículas lipídicas, óleos essenciais, óleos vegetais, óleos de alga marinha.

ABSTRACT

Nano-sized substances have different properties than the same substances in larger sizes. Nanoparticles of essential, vegetable and algae oils (ONP) can increase oil solubility and enhance the action of their bioactive substances, but there is little discussion about their safety. This research provides an overview of the ONP toxicity for food applications. Only 5% of the total works (280) (Scopus, Science direct, and Pubmed/Medline) underwent toxicity assessment. 71.3% involved essential oils, and the others involved lipid oils, as vegetable (21.4%) and seaweed oils (7.3%). All of them evaluated cell viability through *in vitro* tests, and the MTT reduction assay was the most common (85%). 1 study used *in vivo* and *in vitro* (MTT) analysis, and none exclusively *in vivo*. 6 and 7 studies detected anti-cancer and antioxidant effects, respectively. Although there is no consensus on safety, there are already 97 patents using ONP in the food area, highlighting the need for further studies in the area to safely use this innovative technology.

Keywords: nanotoxicity; nanoparticle lipids; essential oil; vegetable oil; seaweed oil.

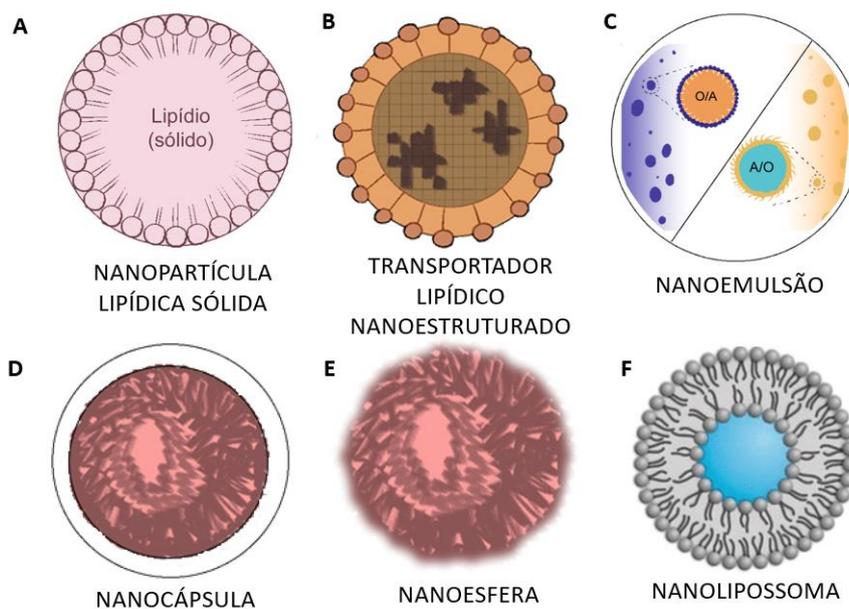
1 INTRODUÇÃO

Na natureza, existem diversos tipos de óleos com propriedades nutricionais e funcionais interessantes. Óleos essenciais, por exemplo, são compostos principalmente por terpenos, compostos voláteis cuja finalidade principal é proteger as plantas contra bactérias, fungos e pragas (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009), enquanto os óleos vegetais e de algas são compostos majoritariamente por triacilgliceróis, e possuem como constituintes minoritários compostos antioxidantes, anti-inflamatórios, vitaminas, pigmentos, dentre outros (SARAVANA *et al.*, 2019; FERREIRA; NUNES, 2019).

A nanotecnologia aplicada a óleos essenciais e demais óleos tem sido apontada como uma boa estratégia para auxiliar na preservação, potencialização e aumento da biodisponibilidade de seus compostos bioativos. Um dos motivos, refere-se ao fato de que a diminuição do tamanho de partícula leva a um aumento da área superficial em relação ao volume e, com isso, os materiais podem apresentar novas propriedades físico-químicas e biológicas. Partículas menores podem ajudar a proteger os óleos contra a oxidação, estabilizar compostos aromatizantes, melhorar solubilidade e estabilidade, enriquecer alimentos, amenizar odores e sabores fortes, proteger contra determinados microrganismos, entre outros (FERREIRA; NUNES, 2019; KATOUZIAN; JAFARI, 2016).

O termo “nanopartícula” é utilizado de forma genérica, podendo se referir, por exemplo, a nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), transportadores lipídicos nanoestruturados (NLE), nanoemulsões (NE) nanocápsulas (NC), nanoesferas (NS), nanolipossomas (NL), entre outros (Figura 1).

Figura 1 - Diferentes tipos de nanopartículas: NLS (A), NLE (B), NE (C), NC (D), NS (E), (NL) (F).



Fonte: adaptado de Ashraf *et al.* (2021).

As NLS (Figura 1A) são compostas exclusivamente por lipídios sólidos a temperatura ambiente. Já os NLE (Figura 1B) surgiram a partir de uma evolução das NLS, e consistem em misturas de lipídios, geralmente sólidos e líquidos, de modo a criar um arranjo desordenado, que pode aumentar a estabilidade quando comparado a uma NLS (REIS *et al.*, 2020).

A NE (Figura 1C) consiste na mistura de dois líquidos imiscíveis, e um acaba sendo disperso no outro na forma de glóbulos nanométricos. Podem ser de dois tipos: água/óleo (A/O), quando a parte polar fica na fase dispersa e a apolar na fase contínua, e óleo/água (O/A), quando ocorre o inverso (LISBÔA *et al.*, 2012). Nanoemulsões apresentam maior área superficial do que emulsões em tamanhos maiores e também têm menor tendência à sedimentação, devido ao efeito do movimento browniano (McCLEMENTS, 2005). Nas nanoemulsões, as nanopartículas aparecem dispersas na solução, e, quando apresentam material de parede, são chamadas de “nanocápsulas”, quando não, nanopartículas (FERREIRA; NUNES, 2019).

O nanoencapsulamento de óleos consiste em um processo em que um material polimérico envolve outro material. Este, pode ser sólido, líquido ou gasoso. A presença deste material polimérico faz com que o produto final do processo sejam NC. O óleo encapsulado fica na fase interna e é chamado de núcleo, enquanto o polímero é chamado de membrana, material de parede ou encapsulante (FERREIRA;NUNES, 2019,ASHRAF

et al., 2021). Quando o material encapsulado está em um núcleo delimitado pelo material polimérico, o nome dado é NC, e, quando está disperso por todo o interior da partícula, é NS.

Os NL são compostos por bicamas fosfolipídicas. Essas bicamadas apresentam características hidrofílicas e hidrofóbicas, de modo que podem interagir com componentes de diferentes polaridades (KUMARI *et al.*, 2014).

Existem diversos estudos utilizando a nanotecnologia em óleos e apresentando bons resultados em diversas aplicações, por exemplo: utilização como conservante natural devido à ação antibacteriana (óleo essencial de *eucalipto* (HERCULANO *et al.*, 2015; GODOI *et al.*, 2017) e óleo essencial de orégano (ALI *et al.*, 2020)), atividade anticâncer (óleo essencial de orégano (ALI *et al.*, 2020) e óleo de semente de romã (FERREIRA *et al.*, 2016)).

Por outro lado, evidencia-se a necessidade de determinar a toxicidade de nanopartículas de óleos essenciais, vegetais e de algas (NPO) em função do comportamento imprevisível que materiais em nanoescala têm demonstrado. Peroxidação lipídica, citotoxicidade, genotoxicidade, disbiose, lesões hepáticas e inflamações gastrointestinais estão entre os possíveis efeitos nocivos relacionados a nanomateriais. Especificamente, nanopartículas lipídicas já foram relacionadas à toxicidade sistêmica e quebra de membrana (ASHRAF *et al.*, 2021).

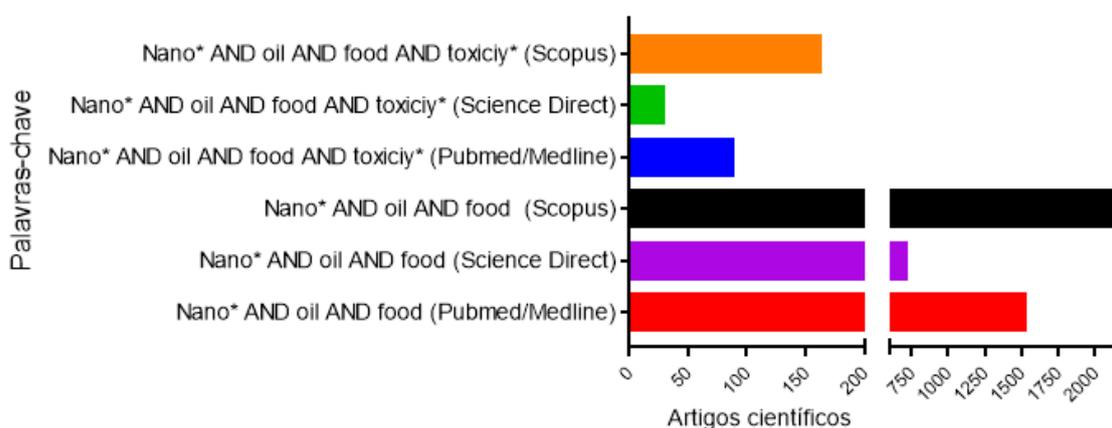
Diferentes fatores podem interferir na toxicidade de um nanomaterial. McClements e Xiao (2017) realizaram um estudo de revisão destacando os principais mecanismos potenciais de toxicidade de diferentes nanopartículas de grau alimentício (prata, óxido de ferro, dióxido de titânio, dióxido de silício, óxido de zinco, lipídios, proteínas e carboidratos), onde apontam que a composição, dimensão, propriedade interfacial e estado de agregação são fatores importantes que podem interferir na ação biológica das nanopartículas.

Esta revisão objetiva apresentar um panorama dos estudos com NPO com possibilidade de aplicações em alimentos que apresentam ensaios de toxicidade (relacionando as técnicas utilizadas para avaliação e os principais efeitos tóxicos apontados), bem como as lacunas que precisam ser preenchidas para um avanço na compreensão da segurança dessa tecnologia.

2 ESTUDOS SOBRE NANOPARTÍCULAS DE ÓLEOS ESSENCIAIS, VEGETAIS E DE ALGAS

Foi realizado um levantamento de artigos experimentais sobre NPO para aplicação em alimentos nas bases de dados *Pubmed/Medline*, *Science Direct* e *Scopus*. Para tal, foi utilizada a busca avançada em “título, resumo e palavras-chave” com as palavras-chave: *nanocapsule AND oil AND food*, *nanoemulsion AND oil AND food*, *nanoparticle AND oil AND food* e *nanoencapsulation AND oil AND food*. Essas combinações também foram associadas ao termo *toxicity** (Figura 2) para verificar quantos estudos fizeram essa avaliação em relação ao número total de trabalhos com NPO. O período de busca foi delimitado de 2010 a 2020.

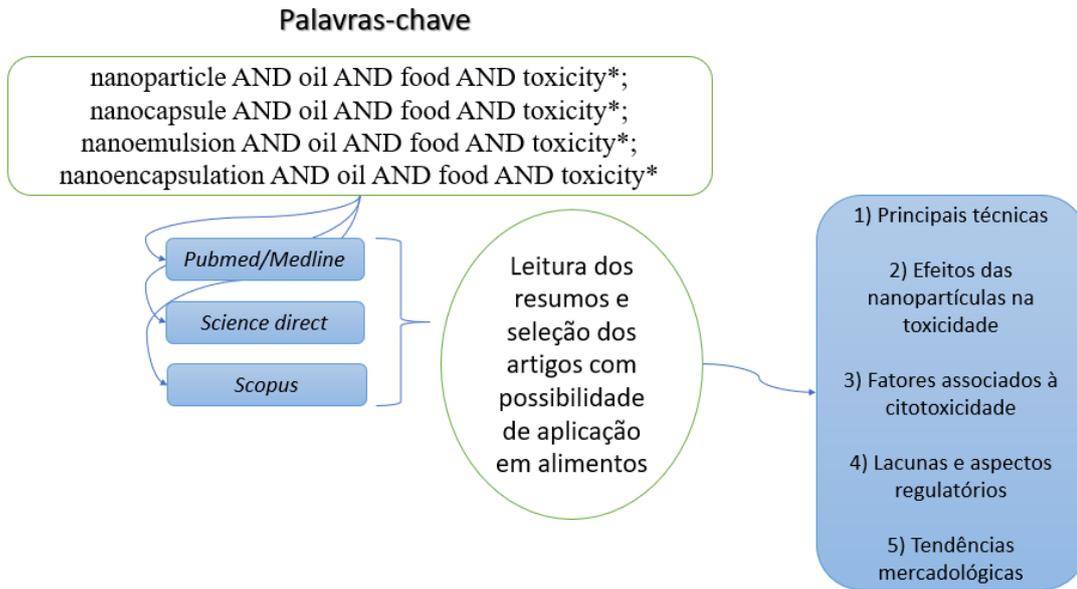
Figura 2 - Diferença de estudos sobre NPO e estudos de toxicidade dos mesmos



Nano*: nanoencapsulation, nanoparticle, nanoemulsion and nancapsule. Toxicity*: toxicity and cytotoxicity.

Os resumos dos artigos encontrados (associados à palavra-chave “toxicidade”) foram lidos com o intuito de excluir arquivos repetidos e selecionar aqueles que poderiam ser direcionados para aplicações em alimentos, restando apenas 14 trabalhos, que foram analisados, conforme representado na Figura 3. Destaca-se que muitos dos artigos encontrados ou tratavam-se de nanopartículas carregadas com fármacos e destinadas à aplicação em medicamentos, ou não avaliavam a toxicidade – os autores apenas citaram o termo no resumo (Figura 2). Dessa forma, o número de artigos analisados neste trabalho corresponde a apenas 5% do total de artigos encontrados associados ao termo “toxicidade”.

Figura 3 - Desenho do estudo e metodologia utilizada



Toxicity*: toxicity and cytotoxicity.

A pesquisa foi realizada entre os meses de maio e agosto de 2020 e os trabalhos estão apresentados no Quadro 1.

Quadro 1 - Estudos de toxicidade de NPO.

Tipo	Técnica	Composição	Características das nanopartículas	Análise de toxicidade	Efeito nas células	Referência
Óleos vegetais						
NE	Homogeneização à alta pressão à quente	Fase lipídica: Óleo de buriti, Fase aquosa: <i>tween</i> 80 (1,2%).	Não foi realizada caracterização.	Ensaio de sulforodamina B HepG2 e Caco-2 2 a 0,00001 µL de óleo / mL) calcein AM 2 µL de óleo / mL	Não foi detectada diminuição da viabilidade celular em células saudáveis.	REIS <i>et al.</i> 2020.
NLE		Fase lipídica: Óleo de buriti e Lipídio sólido Compritol 888 ATO (1:1) Fase aquosa: <i>tween</i> 80 (1,2%).				
NC	Deposição interfacial de polímero pré-formado	Monooleato de sorbitano (0,077%), óleo de romã (0,3%), sibilina (0,01%), etilcelulose (0,1%) <i>tween</i> 80 (0,077%).	Com sibilina: Tamanho: 157±3 nm PDI: 0,09±0,02 PZ:-- Sem sibilina: Tamanho: 160±7 nm PDI: 0,09±0,03 PZ: -15,8±1,9	Ensaio MTT Monócitos e linfócitos 14,5, 72,4, 145 e 724 µg/mL.	Não foi detectada diminuição da viabilidade celular em células saudáveis.	MARCHIORI <i>et al.</i> 2017.
NE	Emulsificação espontânea	Óleo de semente de romã (1,5 e 3%); <i>span</i> 80 (0,077g) e <i>tween</i> 80 (0,077g).	Tamanho: 219±29 nm PDI: 0,10±0,03 PZ: -23,20±3,74 mV	MTT Células mononucleares de sangue humano (0,1; 0,25 e 0,50 mg/mL) Glioma C6 de ratos e células de astrócitos (0,87, 1,74, 2,61, 4,35, 8,7%).	Não foi detectada diminuição da viabilidade celular em células saudáveis.	FERREIRA <i>et al.</i> , 2016.

Óleos essenciais						
NC	Homogeneização.	Óleo essencial de orégano (1%) / alginato de sódio (3%) / <i>tween</i> 20 (1%)	Tamanho: 34,65 ± 0,76 nm PDI: -- PZ: --	MTT / 200 a 6,25 µg/mL (HepG2) 600 a 6,25 µg/mL (THLE2)	HepG2 – IC50 40,95 µg/mL THLE2 – IC50 – 287,6 µg/mL	ALI <i>et al.</i> 2020.
NE	Homogeneização de alta pressão.	Óleo essencial de orégano (1%) / <i>tween</i> 20 (1%)	Tamanho: 26,8 ± 0,11 nm PDI: -- PZ: --		HepG2 – IC50- 54,93 µg/mL THLE2 – IC50 – 401,1 µg/mL	
NP	Gelificação iônica	Óleo essencial de cominho (0,5%), quitosana (1%), <i>tween</i> 60 (0,76%)	Tamanho: 301,9 nm PDI: – PZ: +22,8 mV	MTT 3T3, MCF-7 e A127 1,10,100 e 1000 µg/mL	Não foi detectada diminuição da viabilidade celular em células saudáveis.	AMIRI <i>et al.</i> 2020.
NE	Homogeneização por ultra-som e sonicação	Óleo essencial citrus <i>aurantium</i> L. (Rutaceae) (3%), surfactante não iônico (1%).	Tamanho: 76,9 ± 6,11 nm PDI: 0,19 PZ: -43,5mV	MTT HFF e A549 625; 312,2; 156,2; 78,1 µg/ml <i>In vivo</i> (análise histopatológica, amostragem de biópsia e coloração de tecido) 15 camundongos balb c fêmeas (20 ± 4 g)	A549 - IC50 - 152 µg/MI HFF – IC50 não informado pelos autores, porém houve diminuição da viabilidade celular conforme a concentração aumentou.	SHOORVARZI <i>et al.</i> 2020.

NLE	Homogeneização a alta pressão	Óleo de sucupira (0,5%), kollivax GMS II (1,425%), TPGS.	Tamanho: 148,1±0,1 PDI: 0,274±0,029 PZ: -0,00236±0,147mV	Alamar blue® CaCo-2 5,10,15 e 20 µg/mL	Não foi detectada diminuição da viabilidade celular em células saudáveis.	VIEIRA <i>et al.</i> 2020.
NE	Ultra-som	Óleo essencial de <i>Carum Carvi</i> , <i>tween 20</i> , <i>tween 80</i> (1:1).	Tamanho: 34,6 nm PDI: 0,241 PZ: --	MTT Huvec e HT-29 6,2, 12,5, 25 e 50 µg/mL	HT-29 – IC50 – 12,2 µg/mL Huvec – IC50 - 50 µg/mL	KHATAMIAN <i>et al.</i> 2019.
NE	Homogeneização a alta pressão	Óleo de sucupira (10%), <i>span 80</i> (1,4%), <i>tween 80</i> (3,6%).	Tamanho: > 150 nm PDI: > 0,2 PZ: --	MTT HaCaT 2 a 250 µg/mL	IC50 – 20 µg / ml	PACHECO <i>et al.</i> 2019.
NE	Nanoemulsão por homogeneização	Óleo de semente de cominho e óleo de milho (70:30) em diferentes quantidades, goma guar (0,2%) WPI (10%)	Tamanho: 70,45 a 292,4 nm PDI: 0,156 a 0,450 PZ: -35,5±0,5 a 36,5±0,5	MTT 3T3 0,1, 1, 10, 100 e 1000 µg/mL	Não foi detectada diminuição da viabilidade celular em células saudáveis.	FARSHI <i>et al.</i> 2019.
NE	Sonificação	Óleo de coco e óleo essencial de massoia, <i>tween 80</i> e PEG400,	Tamanho: 20,8 nm PDI: 0,391 PZ: --	MTT Vero 10,20,30,40 e 50 µg/mL	IC50 35,9 µg/mL	HERTIANI <i>et al.</i> 2019.

NE	Nanoemulsão por ultra-som	Óleo de semente de cominho, óleo de milho, caseinato de sódio (5%), goma guar (0,2%)	Tamanho: 155 ± 8 nm PDI: 0,145 ± 0,065 PZ: -40 ± 0,3 mV	MTT MCF-7 0,01, 0,1, 1, 10, 100 e 1000 µg/mL	Não foi detectada diminuição da viabilidade celular em células saudáveis.	FARSHI <i>et al.</i> 2017.
NE	Emulsificação sob alta agitação	Óleo de Eucalipto. <i>globulus</i> (5%), monooleato de sorbitano (2%), <i>tween</i> 80 (2%).	Tamanho: 75,57±5,85 nm PDI: 0,22±0,04 PZ: -9,42±1,15	Ensaio MTT PBMC 0,1, 0,2 e 0,3%.	Não foi detectada diminuição da viabilidade celular em células saudáveis.	GODOI <i>et al.</i> 2017.
Óleos de algas						
NE	Homogeneização	Óleo de alga marinha k-Car-brown (10%), <i>tween</i> 80 (3%), k-carragenina (1%) e agente antimicrobiano (0,04%).	Tamanho: 127,4±0,1 nm PDI: 0,216±0,05 PZ: -38,1±0,15mV	MTT HEK293, AGS, HeLa, HT-29, T24 50,100,250,500,750 e 1000 µg/mL	Não foi detectada diminuição da viabilidade celular em células saudáveis.	SARAVANA <i>et al.</i> 2019.

NE – Nanoemulsão; NLE – Transportadores lipídicos nanoestruturados; NC- Nanocápsula; NP – Nanopartícula; PDI – Índice de polidispersibilidade; PZ – Potencial Zeta; Compritol 888 ATO - lipídios sólidos; MTT - Brometo de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2- il) -2, 5-difeniltetrazólio; SB - Sulforodamina B; WPI- Whey protein isolate; Caco-2 - adenocarcinoma do cólon humano; HepG2 – carcinoma hepatocelular humano; THLE2- células hepáticas humanas saudáveis; MCF-7 e A127 – células de câncer de mama; HFF, 3T3, HEK293, Vero – Linhagens de células saudáveis; A549 – células de câncer de pulmão; HT-29 – células de câncer de cólon; HaCaT- queratinócitos; AGS - adenocarcinoma gástrico; HeLa - câncer de cólon humano; T24 câncer de bexiga humana; PBMC- Células mononucleares do sangue periférico, Glioma C6 – Células de câncer no cérebro.

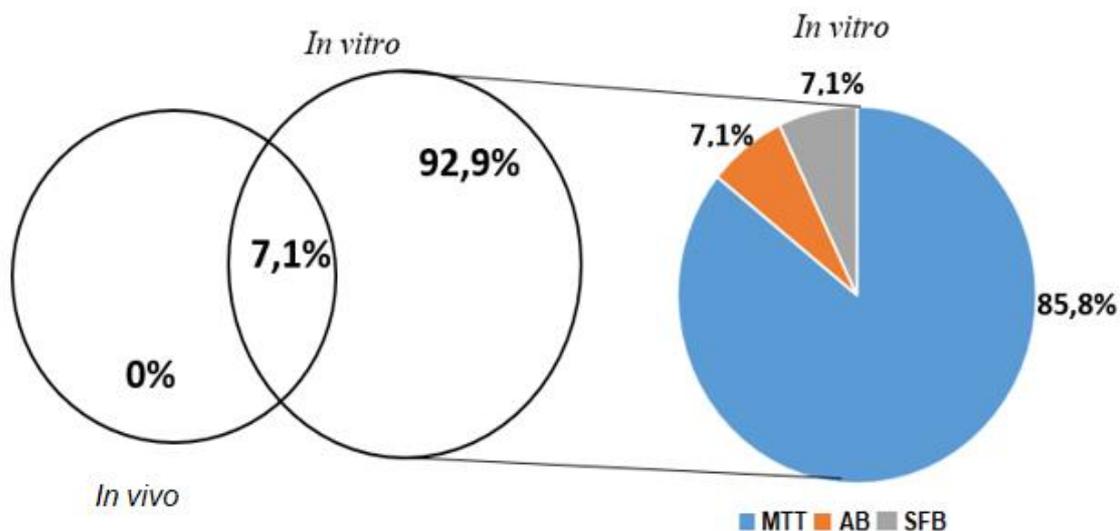
O Quadro 1 apresenta as técnicas utilizadas para produção das NPO, os tipos de NPO formulados, assim como a composição e caracterização primária (tamanho de partícula, índice de polidispersibilidade e potencial zeta) de cada NPO encontrada. Além disso, também apresenta os ensaios de toxicidade realizados e os principais resultados encontrados nos mesmos (dados que serão discutidos nos próximos tópicos deste trabalho). Destaca-se que a maior parte dos estudos encontrados relatou a utilização de nanoemulsões (78,6%), e os óleos essenciais foram os mais utilizados nas formulações (71,4%).

2.1 MÉTODOS UTILIZADOS PARA AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE ÓLEOS

A avaliação da citotoxicidade pode ser realizada por meio de estudo com cultura de células humanas ou animais (*in vitro*) e/ou estudos utilizando animais (*in vivo*). Nos estudos *in vitro*, coloca-se a substância investigada em contato com a cultura celular, e, a partir daí, verifica-se possíveis alterações celulares. Este tipo de teste foi criado com o intuito de substituir a utilização de experimentos com animais (PRADO, 2012).

A maior parte dos estudos encontrados utilizou métodos *in vitro* (92,9%) (ensaios MTT, Sulforodamina B e Alamar Blue®), como demonstra a Figura 4. É importante destacar que os ensaios do MTT e Alamar Blue® são baseados na capacidade metabólica das células viáveis de transformar um substrato em um produto mensurável por espectrofotometria. Entretanto, tais abordagens metodológicas são afetadas pela proliferação celular. Por exemplo, efeitos proliferativos e tóxicos simultâneos podem culminar em “nenhuma diferença significativa” em comparação com as células controle, o que pode levar à conclusões equivocadas. Testes de citotoxicidade adicionais, bem como análises de microscopia, são altamente recomendados para auxiliar na obtenção de conclusões adequadas sobre a segurança de NPO. Ainda em relação aos estudos encontrados, um deles utilizou abordagens *in vivo* baseadas em modelo de camundongo, embora também tenham sido realizadas análises *in vitro* (MTT). Não foram encontrados estudos baseados exclusivamente em testes *in vivo*.

Figura 4 - Tipos de análise de toxicidade de NPO



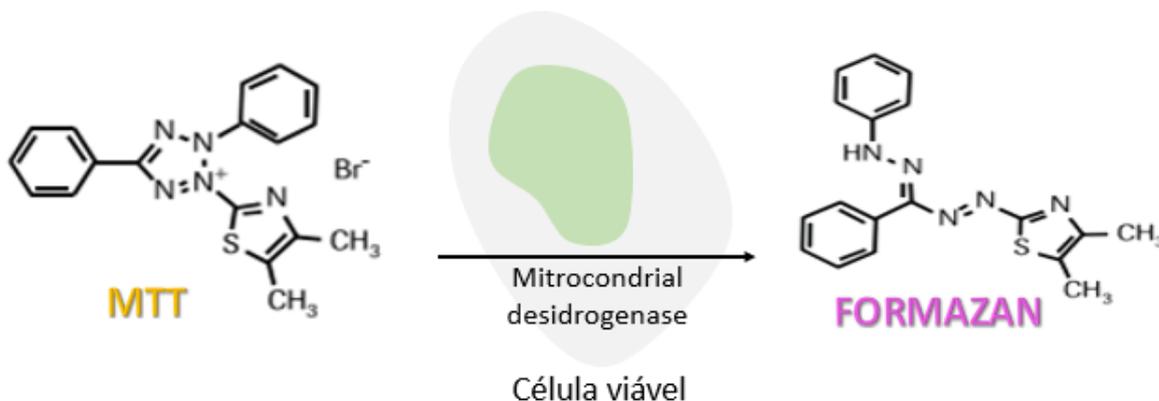
MTT: brometo de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2- il) -2, 5-difeniltetrazólio, AB: Alamar Blue®, SB: Sulforodamina B.

Além da avaliação em células saudáveis, no caso do óleo essencial de orégano (ALI *et al.*, 2020), óleo de buriti (REIS *et al.*, 2020), óleo essencial de *Citrus aurantium* L. bloom (SHOORVARZI *et al.*, 2020), óleo de alga marinha marrom (SARAVANA *et al.*, 2019), óleo essencial de *Carum Carvi* (KHATAMIAN *et al.*, 2019), óleo essencial de cominho (FARSHI *et al.*, 2017) e óleo de semente de romã (FERREIRA *et al.*, 2016), os autores também optaram por utilizar linhagens de células cancerígenas a fim de verificar se os óleos conduziam algum efeito nocivo a elas. Os resultados serão melhor explicados no próximo tópico. Neste tópico, será abordado o princípio dos métodos utilizados.

O principal método *in vitro* utilizado nos estudos foi o do brometo de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2- il) -2, 5-difeniltetrazólio (MTT) (ALI *et al.*, 2020; AMIRI *et al.*, 2020; SHOORVARZI *et al.*, 2020; KHATAMIAN *et al.*, 2019; PACHECO *et al.*, 2019; FARSHI *et al.*, 2019; HERTIANI *et al.*, 2019; SARAVANA *et al.*, 2019; FARSHI *et al.*, 2017; MARCHIORI *et al.*, 2017; GODOI *et al.*, 2017; FERREIRA *et al.*, 2016). Células com metabolismo normal, utilizam enzimas desidrogenases para reduzir este composto. O anel tetrazólio do MTT é clivado, levando à formação de cristais formazan [(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-3, 5- difenilformazan]. Estes cristais, de cor roxa, são solubilizados e quantificados por espectrofotometria (Figura 5). Este método indica se houve ou não dano na

mitocôndria das células (MOSMANN, 1983). É um dos métodos mais utilizados por ser simples, barato e bastante tradicional.

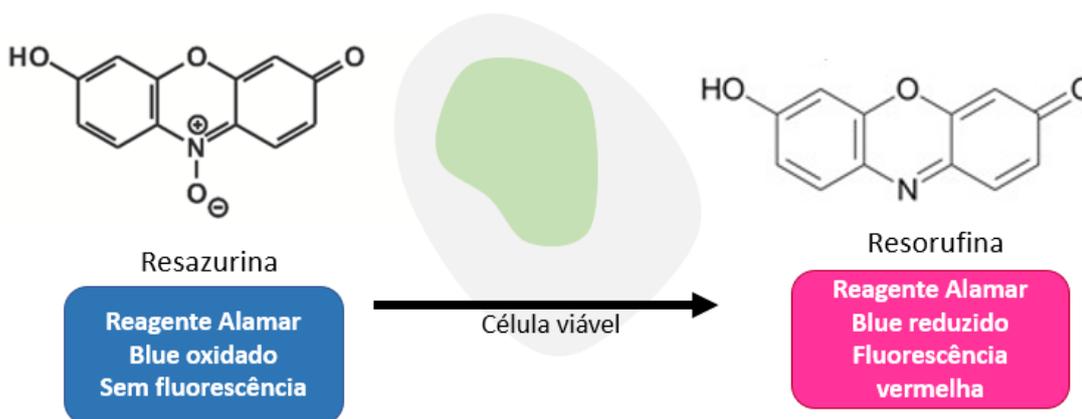
Figura 5 - Esquema representativo do ensaio de redução do MTT



Fonte: autoria própria.

Outro método utilizado foi o ensaio de Alamar Blue® (VIEIRA *et al.*, 2020). Ele baseia-se na coloração resazurina, que é reduzida à forma fluorescente por células metabolicamente ativas. O reagente muda de cor azul para vermelho e torna-se fluorescente, de modo que pode-se verificar tanto a fluorescência (excitação 530-560nm e emissão 590nm) quanto a absorbância (570nm) para avaliação das células viáveis (Figura 6).

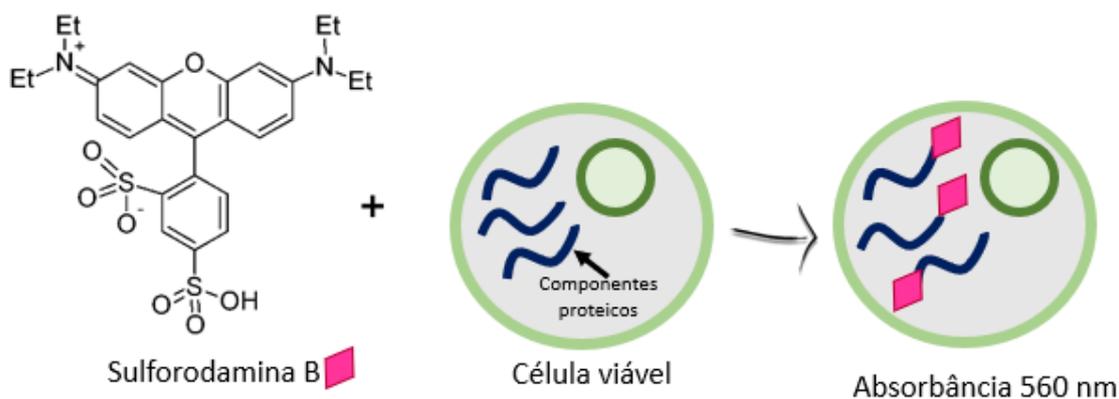
Figura 6 - Esquema representativo do ensaio de Alamar Blue®



Fonte: adaptado de AbpBioSciences (2020).

Um estudo (REIS *et al.*, 2020) utilizou o ensaio Sulforodamina B. Este composto é capaz de se ligar aos componentes proteicos das células fixadas por ácido tricloroacético. Neste ensaio, é utilizado o corante rosa aminoxantina. Este corante possui grupos sulfônicos, que se ligam aos aminoácidos das células fixadas, e a quantidade de corante extraído da célula durante o ensaio é proporcional à quantidade de proteína celular (SKEHAN *et al.*, 1990), que pode ser conferida através da medida da absorvância a 560nm (Figura 7).

Figura 7 - Esquema representativo do ensaio de Sulforodamina B

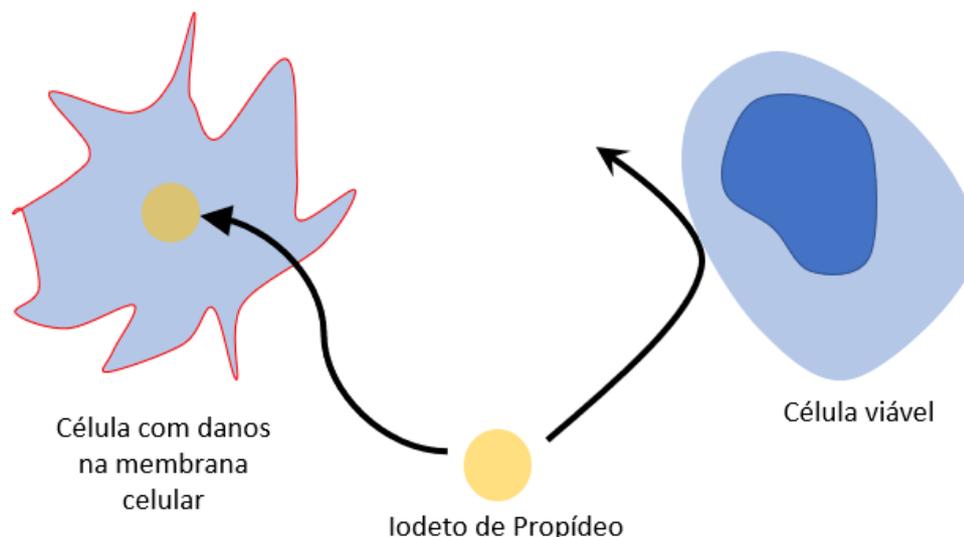


Fonte: adaptado de Cephamls (2021).

O estudo com nanopartículas de óleo essencial de *Citrus aurantium* L. bloom (SHOORVARZI *et al.*, 2020) utilizou concomitantemente os ensaios MTT e incorporação do iodeto de propídeo (IP). Este último consiste em um composto que é capaz de entrar nas células uma vez que haja alguma lesão na membrana celular (Figura 8). Quando isto ocorre, o IP intercala-se com o DNA, levando à morte das células (NAIME, 2017). A quantificação é realizada através da leitura em fluorímetro com comprimento de excitação de 535nm e emissão 617nm. A utilização dos dois métodos em conjunto pode ajudar a diferenciar se houve morte celular ou apenas diminuição do número de células viáveis, o que auxilia no entendimento da possível toxicidade causada. Além disso, a utilização de dois métodos com princípios diferentes pode auxiliar na obtenção de resultados mais confiáveis, tendo em vista que todo método possui limitações. No entanto, no caso do trabalho citado, a utilização do ensaio de incorporação do IP foi realizada apenas com o intuito de verificar morte celular de células cancerígenas.

Destaca-se que, nos ensaios de viabilidade celular, a escolha das células utilizadas não foi justificada nos estudos (Quadro 1). Quando o óleo utilizado nas nanopartículas apresenta potencial para propriedade anticâncer, foram escolhidas células cancerígenas para análise, mas não houve justificativa relacionada aos tipos específicos de células escolhidos.

Figura 8 - Iodeto de propídeo em células saudáveis e danificadas



Fonte: adaptado de RndSystems (2021).

Além de ensaios de viabilidade celular, alguns trabalhos também avaliaram outros efeitos: espécies intracelulares de oxigênio reativo (ERO), produção de óxido nítrico e ensaio da glutathiona (GSH) (REIS *et al.*, 2020), ensaio de cometa (GODOI *et al.*, 2017; MARCHIERI *et al.*, 2017), ensaio de proteína carbonil (VIEIRA *et al.*, 2020; MARCHIORI *et al.*, 2020; AMIRI *et al.*, 2020), avaliação de hemólise (MARCHIORI *et al.*, 2017; FERREIRA *et al.*, 2016), atividade catalase (FERREIRA *et al.*, 2016) e peroxidação lipídica (REIS *et al.*, 2020; GODOI *et al.*, 2017; MARCHIORI *et al.*, 2017).

O ensaio de espécie intracelular de oxigênio reativo tem como objetivo verificar espécies reativas de oxigênio no meio intracelular, e foi investigado para verificar possíveis efeitos colaterais mais sutis, não identificados na análise de viabilidade celular. A produção de óxido nítrico (um radical livre reativo) é um indicativo de processos físicos patológicos, e, por isso, também pode ser investigada para uma melhor compreensão dos efeitos nas células (REIS *et al.*, 2020).

O ensaio de proteína carbonil, também é um marcador de dano oxidativo. Alguns aminoácidos (prolina, arginina, lisina e treonina) podem sofrer oxidação da sua cadeia lateral, formando os grupamentos carbonílicos. Além disso, estes grupamentos podem ser incorporados às proteínas por meio de reações das cadeias laterais com produtos da peroxidação lipídica (DALLE-DONNE *et al.*, 2003).

A atividade catalase também é uma análise relacionada com parâmetros de oxidação. A catalase consiste em uma enzima de proteção antioxidante, que catalisa a reação de decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, e impede a reação em cascata que gera novos subprodutos das reações de oxidação (FERRO *et al.*, 2010; MARTINS; ENGLISH, 2014).

Ensaio de peroxidação lipídica foram feitos com maior frequência (28,5%) (REIS *et al.*, 2020; GODOI *et al.*, 2017; MARCHIORI *et al.*, 2017; FERREIRA *et al.*, 2016), provavelmente, devido à facilidade de óleos sofrerem oxidação. Este método avalia a reação entre o composto malondialdeído, produtos da oxidação lipídica e o ácido tiobarbitúrico. As substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico são produtos finais da peroxidação lipídica, que indicam degradação dos lipídios. Espécies reativas de oxigênio podem capturar elétrons dos lipídios nas membranas das células, o que acarreta em prejuízos às células (REIS *et al.*, 2020).

Já o ensaio da glutathiona foi realizado, pois o sistema antioxidante dependente de glutathiona (GSH), é uma das formas de proteção do organismo contra danos causados por oxidação, e é uma defesa essencial das células contra espécies reativas de oxigênio. O equilíbrio entre GSH na forma reduzida e na forma oxidada pode ser indicativo de toxicidade celular. As concentrações celulares de GSH são reduzidas de maneira brusca como resposta a patologias e danos oxidativos (GRIFFITH, 1999; REIS *et al.*, 2020).

O ensaio de cometa, também conhecido como eletroforese celular em microgel, detecta lesões no DNA das células. Quando ocorre lesão, a morfologia das células, conferida por microscópio, assemelha-se a um cometa, pois ocorre lise de membranas celulares, seguida pela indução da migração eletroforética do DNA liberado no gel de agarose (BRIANEZI *et al.*, 2009).

A hemólise consiste no rompimento da membrana plasmática levando à destruição das hemácias, liberando hemoglobina. Dessa forma, a avaliação da atividade de hemólise, é também um indicador de toxicidade (SCHICK; SRIKANTH, 2019).

Além das técnicas *in vitro*, foi encontrado um único trabalho que realizou técnicas *in vitro* (ensaio MTT) e *in vivo* em sua investigação (SHOORVARZI *et al.*, 2020).

Shoorvarzi *et al.* (2020) utilizaram 15 camundongos balb c fêmeas (20 g), mantidos em gaiola com controle de umidade, temperatura e luz, e dividiram-nas em 3 grupos. O grupo controle recebeu apenas água destilada, enquanto os outros receberam diariamente doses das nanoemulsões de óleo essencial de *Citrus aurantium* L. bloom por 30 dias. Ao final, os camundongos foram sacrificados e o fígado, rim e parte do jejuno foram preparados para análise histopatológica, amostragem de biópsia e coloração de tecido. Foi realizada análise do perfil de expressão gênica das biópsias hepáticas e também análise de peroxidação lipídica.

2.2 EFEITOS DAS NANOPARTÍCULAS DE ÓLEOS NOS ENSAIOS DE TOXICIDADE

Ali *et al.* (2020), produziram nanocápsulas e nanoemulsões de óleo essencial de orégano e avaliaram a seu efeito em células hepáticas humanas saudáveis (THLE2) e em células de câncer de fígado (Hep G2) através do ensaio MTT. As nanocápsulas apresentaram maior atividade inibidora do crescimento das células cancerígenas, com IC₅₀ de 40,95 µg/mL, enquanto as nanoemulsões apresentaram menor inibição, com IC₅₀ de 54,93 µg / mL. O IC₅₀ foi menor para as células cancerígenas do que para células saudáveis, o que os autores interpretaram como indicação de um efeito seletivo do óleo essencial de orégano. Para as células saudáveis, o IC₅₀ das nanocápsulas foi de 287,6 e para nanoemulsões 401,1 µg / mL. As nanocápsulas apresentaram maior teor dos componentes fenólicos timol e carvacrol, sendo esse fator associado com a diferença de citotoxicidade.

Óleo de semente de romã foi encapsulado pela técnica de emulsificação espontânea por Ferreira *et al.* (2016), e os autores avaliaram seu efeito em células mononucleares (MTT). Todas as concentrações testadas apresentaram aumento da viabilidade celular, quando comparadas com o controle. Além disso, foram realizados os ensaios de cometa, atividade catalase, atividade hemolítica, proteína carbonil e peroxidação lipídica, que não indicaram danos ao DNA nem danos oxidativos. Apenas a concentração de 0,5 mg/mL apresentou hemólise significativa e, ainda assim, na forma de nanoemulsões apresentou menor efeito hemolítico do que o óleo de semente de romã na forma livre (28,33 ± 0,73% para nanoemulsões contra 89,57 ± 0,25% na forma livre). Em

células cancerígenas, houve inibição de cerca de 40% da viabilidade celular, indicando que as nanoemulsões apresentavam, também, efeito seletivo contra as células cancerígenas estudadas.

No trabalho de Reis e colaboradores (2020), que produziram nanoemulsões e transportadores lipídicos nanoestruturados com óleo de buriti, foi avaliada citotoxicidade pelo ensaio de Sulforodamina B em células Caco2 (adenocarcinoma do cólon humano) e HepG2 (carcinoma hepatocelular humano). As amostras não diminuíram a viabilidade celular em nenhuma das células. Além disso, os autores apontaram que os compostos bioativos do óleo de buriti estavam, provavelmente, atuando como antioxidantes, uma vez que não foi detectado consumo de glutatona nas células.

Godoi *et al.* (2017) formularam nanoemulsões de óleo essencial de *Eucalyptus globulus* e avaliaram a toxicidade em células mononucleares do sangue periférico. No ensaio de viabilidade celular (MTT), não foi detectado efeito citotóxico, nem na forma livre, e nem na forma de nanoemulsão. Já no ensaio de peroxidação lipídica, os resultados mostraram que, conforme a concentração aumentava, a produção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico diminuía, o que indica um efeito protetor da forma nanoemulsionada. A forma nano também não apresentou danos ao DNA (ensaio do cometa). Entretanto, foi detectada hemólise na concentração a partir de 0,2%. Isto ocorreu tanto na forma de nanoemulsão quanto na forma de óleo livre, o que indica que esse dano não está associada à redução do tamanho de partícula. Como resultado final, tem-se que nanoemulsões deste óleo, em concentração de 0,1% foram seguras nas células testadas.

Suspensões de nanocápsulas com óleo de romã como núcleo foram desenvolvidas para encapsulação de sibilina, um flavonoide isolado de sementes e frutos da planta *Silybum marianum*. Neste estudo, a avaliação de citotoxicidade *in vitro* (MTT) mostrou que a forma nanoencapsulada teve viabilidade celular de 100%, enquanto a forma livre, tanto do óleo, quanto da sibilina, apresentaram redução de 30% da viabilidade celular nas concentrações de 145 e 724 µg/mL (óleo livre) e 50 µM (sibilina). Na avaliação de peroxidação lipídica, foi detectado que o óleo na forma livre apresentou maior oxidação quando comparado à forma nanoencapsulada (MARCHIORI *et al.*, 2017).

Saravana *et al.* (2019) produziram nanoemulsão à base de k-carragenina no encapsulamento de óleo de alga marinha marrom. Foi verificado que quanto menor o tamanho de gotícula, melhor a estabilidade oxidativa, digestão *in vitro* (avaliada utilizando

fluido de saliva simulada, fluido gástrico simulado e fluido de intestino delgado) e bioacessibilidade de fucoxantina (composto de interesse). A avaliação de viabilidade celular (MTT) não detectou efeito em células saudáveis (HEK293). Em células cancerígenas (AGS – adenocarcinoma gástrico, HT-29 (câncer de cólon humano), T24 (câncer de bexiga humana) e HeLa (câncer de colo no útero)), na menor concentração (50 µg/mL) não houve efeito, porém, nas demais concentrações, houve diminuição da viabilidade celular, o que, segundo os autores, indica um potencial para uso em alimentos funcionais.

No estudo de produção de nanoemulsões de óleo essencial de *Carum carvi* (KHATAMIAN *et al.*, 2019), quanto maior a concentração das nanoemulsões, maior a inibição celular (MTT) em células de câncer de cólon humano (HT-29), e não houve efeito colateral indesejável. O valor de IC₅₀ foi de 12,5 µg/mL para as células cancerígenas e 50 µg/mL para células normais (Huvec). Neste estudo, também foi avaliado o estado de apoptose, onde a expressão do gene cas-3 (gene apoptótico mais conhecido) foi considerada para conferir a morte apoptótica. Os resultados mostraram um aumento da expressão deste gene, indicando que as nanoemulsões desenvolvidas induziam via de apoptose em células cancerígenas.

Shoorvarzi *et al.* (2020) sintetizaram nanoemulsões de óleo essencial de *Citrus aurantium L. bloom* e conduziram ensaios de toxicidade *in vitro* (MTT) e *in vivo*. A apoptose foi conferida por meio da expressão do gene cas-3, e as nanoemulsões desencadearam morte apoptótica em células de câncer de pulmão (A549). Houve uma relação entre o aumento da concentração e a diminuição da viabilidade celular tanto para células cancerígenas (A549) quanto para células normais (HFF). Entretanto, esta associação foi muito mais leve para células normais. Os autores sugerem que sejam realizados mais estudos em diferentes tipos de células, tanto normais, quanto cancerígenas. Já no estudo *in vivo*, os resultados negaram qualquer efeito nocivo causado pelas nanoemulsões, e demonstraram que estas reduziram significativamente a peroxidação lipídica no fígado dos ratos.

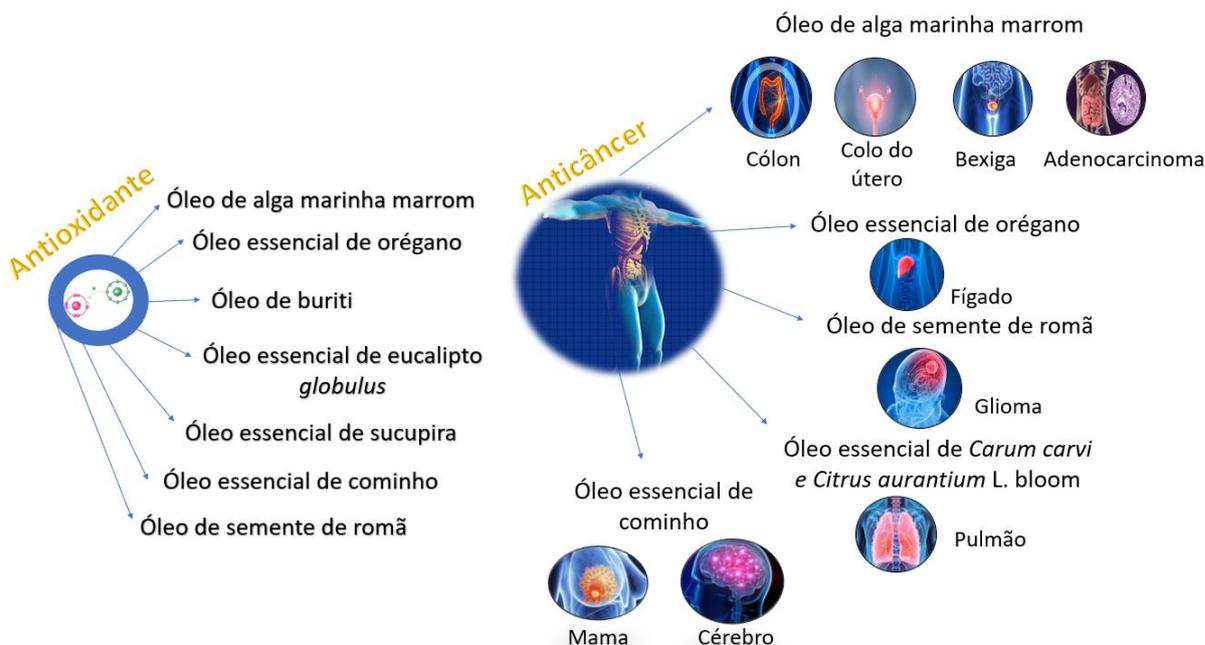
No trabalho de Hertiani *et al.* (2019), foi avaliada a toxicidade através do ensaio MTT de óleo essencial de casca de massoia (*Massoia aromatica* Becc., Lauraceae) em células Vero, e verificado que a forma nanoemulsionada levou a maior diminuição da viabilidade celular, quando comparada com o óleo livre, com IC₅₀ de 35,9 mg/mL para a

nanoemulsão contra 107,5 mg/mL na forma livre, fato que foi atribuído, justamente, à diminuição do tamanho das partículas. Neste trabalho, não houve vantagem na utilização do óleo na forma nano.

O estudo de Amiri *et al.* (2020) foi o único que realizou aplicação das nanopartículas produzidas em produto alimentício. Foram produzidas nanocápsulas de óleo essencial de cominho pelo método de gelificação iônica, e, após verificarem maior viabilidade celular (MTT) com o óleo encapsulado do que com o óleo livre, além de terem conferido efeito na prevenção de tumores de mama e cérebro (na maior concentração testada), os autores fizeram aplicação destas nanopartículas em maionese. Na maionese, as nanoemulsões reduziram significativamente o valor de peroxidase e ácido tiobarbitúrico durante o armazenamento, demonstrando um bom efeito conservante. Destaca-se que não foi realizado ensaio de viabilidade celular após a aplicação no produto alimentício.

Percebe-se que, de modo geral, os resultados são promissores. Além da segurança evidenciada, em alguma concentração, na maior parte dos estudos (92,9%), diversas nanopartículas elaboradas apresentaram algum efeito protetor (57,1%), especialmente com propriedades anticâncer e antioxidantes. (Figura 9).

Figura 9 - Efeitos protetores encontrados nos testes



Órgãos representam as células cancerígenas afetadas pelas nanopartículas. Dados: Reis *et al.* (2020), Marchiori *et al.* (2020), Ali *et al.* (2020), Amiri *et al.* (2020), Shoorvarzi *et al.* (2020), Saravana *et al.* (2020), Khatamian *et al.* (2019), Farshi *et al.* (2019), Godoi *et al.* (2017), Farshi *et al.* (2017), Ferreira *et al.* (2016). Fonte: autoria própria.

2.3 FATORES ASSOCIADOS À TOXICIDADE DAS NANOPARTÍCULAS EM CÉLULAS NORMAIS E CANCERÍGENAS

Dentre os seis trabalhos que detectaram alguma alteração na viabilidade celular de células saudáveis, (ALI *et al.*, 2020; SHOORVARZI *et al.*, 2020; KHATAMIAN *et al.*, 2019; PACHECO *et al.*, 2019; GODOI *et al.*, 2017, HERTIANI *et al.*, 2019), quatro deles apresentaram nanopartículas com tamanhos bastante reduzidos (menores que 100 nm). Apenas no trabalho de Pacheco e colaboradores (2019) nanocápsulas de óleo de sucupira de tamanho superior a 150 nm apresentaram diminuição da viabilidade celular de células saudáveis (IC₅₀ 20 µg / ml).

Marchiori *et al.* (2017) mostraram que a forma nano do óleo de romã não afetou negativamente a viabilidade celular de células saudáveis e apresentou efeito protetor contra danos oxidativos. O tamanho das partículas também foi destacado por Saravana *et al.* (2019) como um fator que influencia em diversos parâmetros. Os autores encontraram melhores resultados de estabilidade oxidativa, digestibilidade *in vitro* e bioacessibilidade quando os tamanhos de partícula eram menores. Mas, dependendo da técnica, composições e óleo utilizado, é possível que a diminuição do material aumente a toxicidade, justamente por aumentar a bioacessibilidade, como ocorreu no trabalho de Hertiani *et al.* (2019), em que a forma nanoemulsionada de óleo de massioa levou a diminuição da viabilidade celular em células saudáveis, superior a do óleo livre. Dessa forma, pode-se verificar que a toxicidade não depende apenas do tamanho das partículas, mas também da técnica utilizada na formulação, do tipo de nanopartícula e óleo encapsulado, e dos demais componentes do nanomaterial, como material de parede e emulsificantes.

No trabalho de Ali *et al.* (2019), por exemplo, em que foram produzidas nanocápsulas e nanoemulsões, o tipo de nanopartícula produzido interferiu na quantidade dos compostos voláteis, o que acabou levando também a diferenças no efeito encontrado nas células. Uma caracterização completa dos nanomateriais pode auxiliar na compreensão dos diferentes resultados.

Além do tamanho, o potencial zeta também é apontado como um parâmetro que pode afetar a toxicidade de nanomateriais. Ele mede a carga elétrica global da superfície das partículas, e esta carga pode influenciar na interação com componentes do trato gastrointestinal, capacidade de penetrar barreiras biológicas e também estado de agregação (McCLEMENTS, 2017). Entretanto, apenas um dos trabalhos que apresentou diminuição

da viabilidade em células saudáveis (SHOORVARZI *et al.*, 2020) realizou esta análise, o que impossibilita uma comparação de dados para que se estabeleça alguma relação.

No que diz respeito aos emulsificantes utilizados, percebe-se que todos os trabalhos optaram pela utilização de emulsificante sintético, com destaque para o *Tween 80*, utilizado em 57% dos trabalhos analisados. Outros emulsificantes encontrados foram *Tween 20* (14%) e *Tween 60* (7%). Destaca-se que um dos trabalhos utilizou concomitantemente o emulsificante *Span 80* e *Tween 80* e outro *Tween 20* e *Tween 80*. Tendo em vista que estes emulsificantes são todos semelhantes, não-iônicos e sintéticos, e que não foi encontrado nenhum emulsificante de origem natural ou que influenciasse na carga elétrica superficial das partículas, não foi possível estabelecer uma relação entre o emulsificante utilizado e seu efeito nas células.

Goma guar (2), etilcelulose (1), alginato de sódio (1), caseinato de sódio (1), quitosana (1) e k-carragenina (1) foram os materiais de parede encontrados. Dentre eles, apenas o trabalho que utilizou alginato de sódio apresentou diminuição da viabilidade celular em células saudáveis, no nanoencapsulamento de óleo essencial de orégano (Quadro1). Entretanto, neste trabalho, foram produzidos dois tipos de nanopartículas: nanoemulsões (sem material de parede) e nanocápsulas (com material de parede). As nanocápsulas apresentaram maior inibição de células saudáveis, mas que não foi atribuída à presença do material de parede e sim à quantidade de compostos voláteis carvacrol e timol, que foram superiores nas nanocápsulas.

2.4 LACUNAS E ASPECTOS REGULATÓRIOS

Dentre as lacunas encontradas, percebe-se que raramente foram encontrados estudos *in vivo*. Estes são mais caros, demorados e levam em conta questões éticas, devido ao uso de animais, o que pode justificar a maior quantidade de estudos *in vitro* encontrada nesta revisão. Entretanto, é preciso destacar que estudos *in vitro* são mais limitados, quando comparados aos estudos *in vivo*, pois não consideram o potencial de biotransformação de compostos padrão em metabólitos (que podem não ter efeitos biológicos ou apresentar alta toxicidade), efeitos hormonais, interações e diversidade de tipos de células, nem a toxicidade crônica, sendo esta última de grande importância na área de alimentos. Concentrações baixas de nanopartículas, que podem não apresentar toxicidade aguda, ao serem consumidas por períodos prolongados, podem ocasionar

prejuízos à saúde (McCLEMENTS, 2017). A biodisponibilidade de compostos presentes em NPO pode apresentar diferenças significativas dependendo da abordagem experimental; efeitos observados em condições *in vitro* podem estar ausentes em condições *in vivo* devido à baixa biodisponibilidade de problemas farmacocinéticos.

Além disso, também há necessidade de verificar a interação das nanopartículas com a matriz alimentar em que estarão em contato, e também o monitoramento de mudanças na composição, estrutura e tamanho que podem ocorrer em diferentes regiões do trato gastrointestinal (AMIRI *et al.*, 2020; McCLEMENTS;XIAO, 2017; McCLEMENTS, 2013), pois estes fatores podem afetar a toxicidade.

Destaca-se também que, dentre os 14 estudos encontrados, 10 realizaram análises de óleos essenciais, possivelmente por conta das propriedades terapêuticas frequentemente associadas aos mesmos. Quando ocorre toxicidade contra células cancerígenas, mas não contra células saudáveis, isto indica um efeito seletivo. Dessa forma, a avaliação da toxicidade pode ser realizada com o intuito de auxiliar na comprovação desta propriedade dos óleos essenciais, o que justifica o maior número de estudos realizados neste tipo de óleo. Já em óleos vegetais, percebe-se uma lacuna, pois foram encontrados apenas 3 estudos com essa avaliação.

A falta de conhecimento sobre os riscos à saúde da nanotecnologia aplicada a alimentos, dificulta a criação de uma regulamentação eficiente para produtos que a utilizam (ASHRAF *et al.*, 2021). Atualmente, ainda não existe uma regulamentação, mas alguns países já possuem recomendações ou legislações. Na União Europeia, todos os produtos que contenham nanomateriais como ingredientes devem explicitar isto no rótulo (AMENTA *et al.* 2015). A FDA (*Food and Drug Administration*) recomenda avaliação preliminar de segurança (TYLER, 2012). Órgãos de diversos países, como Austrália e Nova Zelândia, participam frequentemente de discussões acerca de uma regulamentação apropriada para nanoalimentos. Ashraf *et al* (2021) realizaram um trabalho de revisão sobre nanotecnologia agroalimentar, e concluíram que o papel de pesquisadores e cientistas, assim como de órgãos governamentais e indústria, é essencial para viabilizar aplicações seguras e inovadoras da nanotecnologia em alimentos.

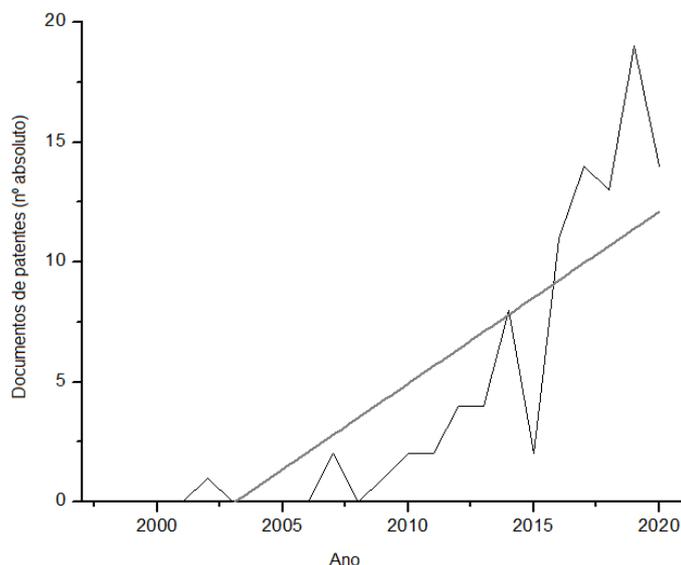
2.5 TENDÊNCIAS MERCADOLÓGICAS

A fim de avaliar as tendências mercadológicas, a base de dados *Espacenet*[®] (*European Patent Office*) foi utilizada para verificar se já existem patentes relacionadas ao tema, e quais óleos vêm sendo utilizados. A busca foi realizada em fevereiro de 2021.

O sistema de patentes consiste em uma troca entre o Estado e o inventor, em que o autor da tecnologia apresenta sua invenção à sociedade e, em troca, o Estado lhe concede um direito de exclusividade temporário. Dessa forma, a avaliação das patentes e seu respectivo crescimento sobre algum tema específico pode ajudar a elucidar o potencial de desenvolvimento e as tendências mercadológicas de determinado assunto.

A estratégia de busca consistiu na utilização das palavras-chave *nano** e *oil* no título, associadas ao código CPI (Classificação Internacional de Patentes) A23 (referente à “alimentos e seu tratamento”). Foram encontrados 97 documentos de patentes depositados. Nota-se que, a partir de 2010, o crescimento ficou mais constante, e a linha de tendência (Figura 10) demonstra que os investimentos para desenvolver NPO têm aumentado, o que se reflete diretamente no aumento do número de patentes.

Figura 10 - Evolução anual de patentes sobre nanopartículas de óleos graxos e essenciais encontradas na base de dados *Espacenet*[®]



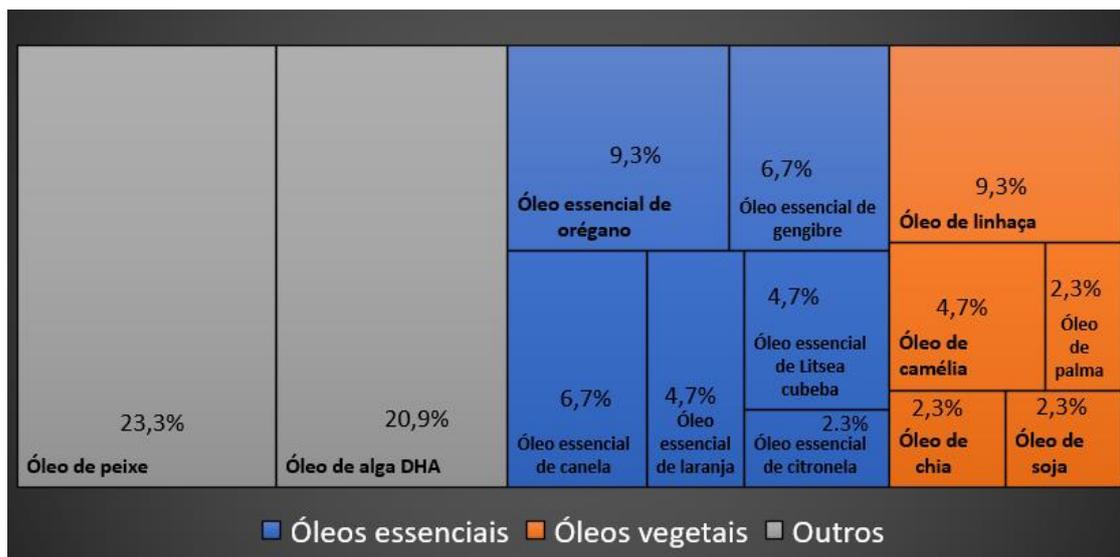
Fonte: autoria própria.

Dentre os documentos encontrados, 33% utilizaram óleos essenciais, 16,5% óleos vegetais, 12,4% óleos animais, 9,3% óleos de algas e 28,8% não especificaram o óleo

utilizado. Semelhante aos estudos científicos, que trabalharam, em sua maioria, com óleos essenciais, percebe-se que este tipo de óleo também detêm a maior parte das patentes. A Figura 11 mostra alguns dos óleos mais encontrados nos documentos.

Dentre os óleos encontrados nos documentos de patentes, foram encontradas análises de toxicidade apenas sobre os óleos essenciais de orégano e laranja.

Figura 11 - Tipos de óleos encontrados nos documentos de patentes (Espacenet®)



Fonte: autoria própria.

4 CONCLUSÃO

Constatou-se que os estudos sobre toxicidade de NPO são escassos na literatura, e insuficientes para uma conclusão sobre a segurança das mesmas. As avaliações em células detectaram atividade contra células cancerígenas para os óleo de alga marinha marrom e romã e óleos essenciais de orégano, *Citrus aurantium* L. bloom e *Carum carvi*, e efeito protetor contra danos oxidativos nas nanopartículas de óleos essenciais de orégano, eucalipto *globulus* e cominho e óleos de buriti, alga marinha marrom e romã. Destaca-se que o elevado número patentes sobre o tema, demonstra que, provavelmente estas NPO passem a ser utilizadas em produtos e comercializadas, reforçando a importância de um maior conhecimento sobre sua toxicidade. Percebe-se a necessidade de mais estudos relacionados a óleos vegetais, para que seja possível elaborar uma regulamentação que auxilie no aproveitamento desta tecnologia inovadora de forma segura.

5 REFERÊNCIAS

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDO, C. M. Oleos Essenciais No Brasil: Aspectos Gerais, Desenvolvimento e Perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p.588–594, 2006.

AlamarBlue. AbpBioScience. Disponível em: <http://abpbio.com/alarblue-1> Acesso em: 18. Fev. 2021.

ALI, H. *et al.* Effect of nanoencapsulation on volatile constituents, and antioxidant and anticancer activities of Algerian *Origanum glandulosum* Desf. Essential oil. **Scientific Reports**, v.10, n. 1, p. 1-9, 2020.

AMENTA, V. *et al.* Regulatory aspects of nanotechnology in the agri/feed/food sector in EU and non-EU countries. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 73, n. 1, p. 463-476, 2015.

AMIRI, A. *et al.* Fabrication of cumin loaded-chitosan particles: Characterized by molecular, morphological, thermal, antioxidant and anticancer properties as well as its utilization in food system. **Food Chemistry**, v. 310, p. 1-10, 2020.

ASHRAF, A.S. *et al.* Innovations in nanoscience for the sustainable development of food and agriculture with implications on health and environment. **Science of The Total Environment**, v. 768, p. 144-990, 2021.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BRIANEZI, G.; CAMARGO, J.L.V.; MIOT, H.A. Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 4, p. 1-10, 2009.

Cell metabolic assays. Cephamls. Disponível em: <https://www.cephamls.com/srb-cytotoxicity-assay-kit-colorimetric/>. Acesso em: 18. Fev. 2021.

DALLE-DONNE, I. *et al.* Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, v. 329, p. 23-28, 2003.

FARSHI, P. *et al.* Evaluation of Antioxidant Activity and Cytotoxicity of Cumin Seed Oil Nanoemulsion Stabilizes by Sodium Caseinate-Guar gum. **Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 23, p. 293-300, 2017.

FARSHI, P. *et al.* Whey protein isolate-guar gum stabilized cumin seed oil nanoemulsion. **Food Bioscience**, v. 28, p. 49-56, 2020.

FERREIRA, M.L. *et al.* Pomegranate seed oil nanoemulsions with selective antitumor activity: optimization and evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and oxidative effects on mononuclear cells. **Journal Pharmaceutical Biology**, v. 54, p. 2965-2977, 2016.

FERREIRA, C. D; NUNES, I, L. Oil nanoencapsulation: development, application, and incorporation into the food market. **Nanoscale Research Letters**, v. 14, n. 1, p.1-13, 7 janeiro de 2019.

FERREIRA, C.D. *et al.* Physicochemical characterization and oxidative stability of microencapsulated crude palm oil by spray drying. **Food and Bioprocess Technology**, v. 9, p. 124–136, 2016.

FERRO, O.C. *et al.* Atividade da catalase no pulmão, rim e intestino Delgado não isquemiado de ratos após reperfusão intestinal. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 37, n. 1, p. 31-38, 2010.

- GODOI, N.S. *et al.* Evaluation of Stability and in vitro security of nanoemulsions containing eucalyptus globulus oil. **BioMed Research International**, p. 1-10, 2017.
- GRIFFITH, O.W. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, p. 922-935, 1999.
- HERCULANO, D.E. *et al.* Physicochemical and antimicrobial properties of nanoencapsulated *Eucalyptus staigeriana* essential oil. **LWT-Food Science Technology**, v. 61, p. 484-491, 2015.
- HERTIANI, T. *et al.* Evaluation of the efficacy and toxicity of massoia oil nanoemulsion. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Science**, v. 32, n. 4, p. 1519-1528, 2019.
- KATOUIZIAN, I; JAFARI, S. M. Nano-encapsulation as a promising approach for targeted delivery and controlled release of vitamins. **Trends in Food Science & Technology**, v. 53, p. 34-48, 2016.
- KELLER, A.A. *et al.* Global life cycle releases of engineered nanomaterials. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 15, n. 6, p. 1-17, 2013.
- KHATAMIAN, N. *et al.* Synthesis of *Carum Carvi* essential oil nanoemulsion, the cytotoxic effect, and expression of caspase 3 gene. **Journal of Food Biochemistry**, v. 43, p. 1-8, 2019.
- MARCHIORI, L.C.M. *et al.* Nanoencapsulation Improves Scavenging Capacity and Decreases Cytotoxicity of Silibinin and Pomegranate Oil Association. **An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 18, p. 3236-3246, 2017.
- MARTINS, D.; ENGLISH, A. M. Catalase activity is stimulated by H₂O₂ in rich culture medium and is required for H₂O₂ resistance and adaptation in yeast. **Redox Biology**, v. 2, p. 308-313, 2014.
- McCLEMENTS, J. D. Food emulsion: principle, practice and techniques. 2 ed. **Boca Raton: CRC Press** 2005.
- MCCLEMENTS, J. D. Edible lipid nanoparticles: digestion, absorption, and potential toxicity. **Progress in Lipid Research**, v. 52, n. 4, p. 409-423, 2013.
- McCLEMENTS, J. D; XIAO, H. Is nano safe in foods? Establishing the factors impacting the gastrointestinal fate and toxicity of organic and inorganic food-grade nanoparticles. **Science of food**, v. 6, p. 1-13, 2017.
- PACHECO, T.M. Protective effect of sucupira oil nanoemulsion against oxidative stress in UVA-irradiated HaCaT cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 71, n. 10, p. 1532-1543.
- PRADO, P. A. F. **Avaliação do possível efeito dual (antioxidante e/ou próoxidante) e ação neuroprotetora do ebselen, ácido caféico e memantina em células neurais (Neuro-2a) in vitro**. 112 p. Dissertação (Mestrado em Neurociências) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.
- Propidium Iodide Cell Viability Flow Cytometry Protocol. RndSystems. Disponível em: <http://www.rndsystems/resources/protocols/flow-cytometry-protocol-analysis-cell-viability-using-propidium-iodide>. Acesso em: 18. Fev. 2021.
- REIS, C.V.L. *et al.* Evaluation of cytotoxicity of nanolipid carriers with structured Buriti oil in the Caco-2 and HepG2 cell lines. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, p. 1105-1118, 2020.
- SARAVANA, S.P. *et al.* Ultrasound-medates fucoxanthin rich oil nanoemulsions stabilizes by k-carrageenan: Process optimization, bio-accessibility and cytotoxicity. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 55, p. 105-166, 2019.

SCHICK, P. NAGALLA, S. Hemolytic Anemia. Disponível em:
<<https://emedicine.medscape.com/article/201066-overview#aw2aab6b2b3aa>>. Acesso em: 03 de julho de 2020.

SHOORVARZI, N.S. *et al.* *Citrus ausantium* L. bloom essential oil nanoemulsion: synthesis, characterization, cytotoxicity, and its potential health impacts on mice. **Journal of Food Biochemistry**, v. 44, n. 5, p. 1-11, 2020.

VIEIRA, R. *et al.* Sucupira Oil-Loaded Nanostructures Lipid Carriers (NLC): Lipid Screening, Factorial Design, Release Profile, and Cytotoxicity. **Molecules**, v. 25, n. 3, p. 685, 2020.

Artigo experimental:

Estabilidade e citotoxicidade de nanopartículas de óleo de palma bruto.

RESUMO

O óleo de palma bruto (OPB) apresenta alto conteúdo de carotenoides, pigmentos naturais que podem ser degradados nas condições usuais de processamento de alimentos. A formulação de nanopartículas de OPB (NP-OPB) é uma alternativa para aumentar sua estabilidade físico-química e aplicabilidade, mas a segurança dessas partículas em tamanho reduzido ainda não foi estudada. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi preparar e caracterizar NP-OPB utilizando farinha de albedo do maracujá (FAM) como encapsulante e lecitina de soja como emulsificante, e avaliar sua estabilidade (tamanho de partícula, índice de polidispersibilidade (PDI), potencial zeta (PZ), pH e cor) e citotoxicidade. As NP-OPB foram produzidas através da técnica de homogeneização e caracterizadas quanto à morfologia, tamanho de partícula, PDI, PZ, pH, cor e carotenoides totais. Os parâmetros de tamanho, PDI, PZ, pH e cor foram avaliados quinzenalmente (60 dias/4 ± 2°C), e sua citotoxicidade foi verificada através dos ensaios do brometo de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il) - 2, 5-difeniltetrazólio (MTT) e incorporação do iodeto de propídeo (IP) em células imortalizadas do hipocampo de camundongos (HT22). As NP-OPB apresentaram morfologia esférica, tamanho inicial médio de 232,17 ± 0,84 nm, PDI de 0,25 ± 0,01 e PZ de -43,67 ± 3,16 mV, ou seja, apresentaram tamanho nanométrico, boa uniformidade e estabilidade. Estes parâmetros mantiveram-se estáveis ao longo do armazenamento. Além disso, apresentaram pH de 5,04 ± 0,02, tendência ao amarelo e foram capazes de reter 55,85% dos carotenoides presentes no óleo livre. Com o armazenamento, houve perda da pigmentação amarela e diminuição do pH para 4,3 ± 0,01. No ensaio MTT, as NP-OPB não afetaram a viabilidade celular da linhagem HT22 em nenhuma concentração testada (2,5 x 10⁻⁶ mg/mL a 2,5 x 10⁻¹ mg/mL), porém, o ensaio IP detectou citotoxicidade na maior concentração (2,5 x 10⁻¹ mg/mL). Dessa forma, concentrações ≤ 2,5 x 10⁻² mg/mL foram consideradas seguras para as células HT22. Os resultados evidenciaram que a combinação da técnica, concentração do OPB, material de parede (FAM) e emulsificante (lecitina de soja) foram capazes de produzir NP-OPB de tamanho adequado, estáveis nas condições avaliadas, seguras para as células testadas em concentrações ≤ 2,5 x 10⁻² mg/mL e com potencial para aplicação como corante natural em alimentos, especialmente aqueles que tenham pH próximo à faixa em que as NP-OPB permaneceram durante o armazenamento.

Palavras-chave: nanotecnologia; *Elaeis guineenses*, *Passiflora edulis*, lecitina de soja; *tween*; toxicidade.

ABSTRACT

Crude palm oil (CPO) has a high content of carotenoids, natural pigments which can be degraded under the usual processing food conditions. The formulation of CPO nanoparticles (CPO-NP) is an alternative to increase their stability and applicability, but the safety of these particles in reduced size has not been studied yet. This research aimed to prepare and characterize CPO-NP using passion fruit albedo flour (PAF) as an encapsulant and soy lecithin as an emulsifier, and to evaluate their stability (size, polydispersity index (PDI), zeta potential (ZP), pH and color) and cytotoxicity. CPO-NP were produced using the homogenization technique and characterized in terms of morphology, particle size, PDI, ZP pH, color, and total carotenoids. The size parameters, PDI, PZ, pH, and color were evaluated every two weeks (60 days/4 ± 2°C), and their cytotoxicity was verified through the 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and propidium iodide incorporation (IP) assays in immortalized hippocampus cells of mice (HT22). The CPO-NP showed spherical morphology, average initial size of 232.17 ± 0.84 nm, PDI of 0.25 ± 0.01, and PZ of -43.67 ± 3.16 mV, which means, they presented nanometric size, good uniformity, and stability. These parameters remained stable throughout storage. Also, they had a pH of 5.04 ± 0.02, a tendency to yellow, and were able to retain 55.85% of the carotenoids present in the free oil. With storage, there was a loss of yellow pigmentation and a decrease in pH to 4.3 ± 0.01. In the MTT assay, CPO-NP did not affect cell viability of the HT22 cells at any concentration tested (2.5 x 10⁻⁶ mg/mL to 2.5 x 10⁻¹ mg/mL), however, the IP assay detected cytotoxicity in the highest concentration (2.5 x 10⁻¹ mg/mL). Thus, concentrations ≤ 2.5 x 10⁻² mg/mL were considered safe for HT22 cells. The results showed that the combination of the technique, CPO concentration, wall material (PAF), and emulsifier (soy lecithin) was able to produce CPO-NP of adequate size, stable in the evaluated conditions, safe for the cells tested in concentrations ≤ 2.5 x 10⁻² mg/mL and with high potential for food application, as a natural dye, especially those that have a pH value close to the range in which the CPO-NP remained stable.

Keywords: nanotechnology; *Elaeis guineenses*; *Passiflora edulis*; soy lecithin; tween; toxicity.

1 INTRODUÇÃO

O óleo de palma bruto (OPB) é o óleo mais produzido no mundo e destina-se, majoritariamente, ao setor alimentício. O mesmo possui alto teor carotenoides, pigmentos naturais responsáveis pela sua coloração amarelo alaranjada, sendo o β -caroteno o componente majoritário (CODEX, 2019; RICAURTE *et al*, 2016).

A adição de corantes é frequentemente utilizada na indústria alimentícia, com o intuito de melhorar a aparência dos produtos e atrair o consumidor. Entretanto, pigmentos naturais, como é o caso dos carotenoides, apresentam baixa estabilidade frente à exposição ao oxigênio, luz e alta temperatura, o que dificulta sua aplicação em alimentos industrializados. Tecnologias que ajudem na preservação de óleos podem ser utilizadas com o objetivo de expandir a aplicabilidade destas matérias-primas. O nanoencapsulamento pode ser uma boa estratégia para aumentar a estabilidade de óleos vegetais (KATOUZIAN; JAFARI, 2016).

Em muitos casos, o nanoencapsulamento começa com a produção de nanoemulsões, que são sistemas formados por uma fase oleosa e outra aquosa, as quais são misturadas com auxílio de um emulsificante (FERREIRA; NUNES, 2019). Quando o encapsulamento é realizado através da nanoemulsificação, a escolha do material de parede e do emulsificante pode ser determinante para a produção de nanopartículas estáveis.

A procura por polímeros biodegradáveis adequados para processo de nanoencapsulamento é frequente, tendo em vista a preocupação com aspectos sustentáveis no desenvolvimento de novas tecnologias. A utilização de resíduos da indústria pode ser uma alternativa para transformar esses materiais normalmente descartados em ingredientes de novos produtos.

Nesse contexto, destaca-se o albedo do maracujá como uma boa opção de material de parede em processos de encapsulamento. A industrialização do maracujá gera alto teor de resíduo (aproximadamente 60% do fruto) (FAO, 2015), dentre eles, o mesocarpo do maracujá, que é rico em pectina, o que demonstra bom potencial como material de parede. Bezerra *et al* (2019) utilizaram a farinha do albedo do maracujá no nanoencapsulamento de β -caroteno extraído da microalga *Spirulina* sp. LEB 18, obtendo partículas de tamanho entre $82,29 \pm 0,51$ e $86,83 \pm 0,50$ nm, e concluindo que este material tem um bom potencial para aplicação em processos de nanoencapsulamento.

Embora o OPB e a farinha do albedo do maracujá sejam frequentemente utilizados em alimentos, a segurança em relação às suas partículas em tamanho nanométrico ainda

não foi estabelecida. A diminuição de tamanho pode levar a propriedades particulares, não encontradas em tamanho maior. Efeitos nocivos, como disbiose, citotoxicidade e genotoxicidade já foram relatados em nanopartículas de diferentes materiais (ASHRAF *et al.*, 2021). Entretanto, há poucos estudos que investigam a toxicidade de nanopartículas de óleos, em especial óleos vegetais. Para este tipo de investigação, culturas de células podem ser utilizadas a fim de verificar alterações celulares após o contato da substância investigada com as células, revelando possíveis efeitos tóxicos.

Com base no exposto, este trabalho buscou utilizar um óleo rico em bioativos e pouco explorado na sua forma bruta (óleo de palma bruto), associado a um resíduo agroindustrial de baixo custo como material de parede para a produção de nanopartículas (farinha do albedo do maracujá), e avaliar a citotoxicidade das NP produzidas, sendo este o primeiro trabalho a realizar a avaliação do efeito das NP-OPB em células.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PREPARO DA FARINHA DO ALBEDO DO MARACUJÁ

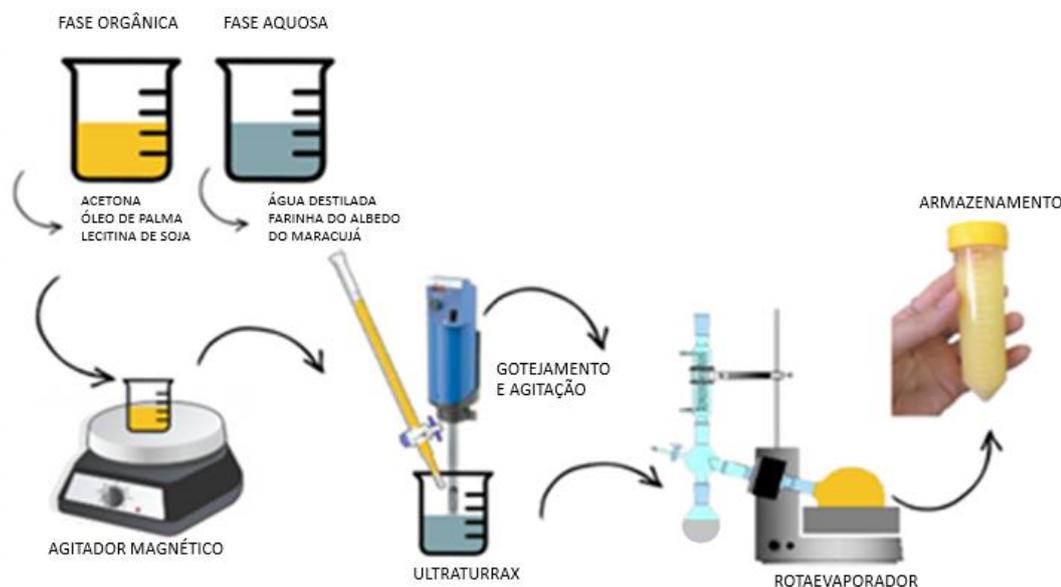
Seguiu o método de Oliveira *et al.* (2016), com adaptações. Os maracujás-amarelos foram adquiridos no comércio local, descascados, higienizados em água corrente e o albedo foi cortado em pedaços de aproximadamente 1cm. Estes pedaços foram colocados em estufa com circulação de ar (DeLeo, Brasil) no Laboratório de Frutas e Hortaliças do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, a 50°C por 8h, para secagem. Em seguida, foram triturados em liquidificador e peneirados (malha de 0,55 mm) para obtenção da farinha. O preparo das nanopartículas (item 2.2) foi realizado imediatamente após o preparo da farinha. A farinha foi armazenada em recipiente com tampa em temperatura ambiente.

2.2 PREPARO DAS NP-OPB

O preparo das NP-OPB foi realizado no Laboratório de Óleos e Gorduras do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, e seguiu o método proposto por Campo *et al.* (2017), com modificações: a fase orgânica (OPB/Agropalma (0,25 g), solvente (acetona p.a. 50 mL) e lecitina de soja (Cargill – 0,2 g) foi submetida à agitação magnética na velocidade 3 do agitador magnético DI-03 (Dist), por 15 minutos. Esta fase foi adicionada à fase aquosa (farinha do albedo do maracujá (0,5 g) e água destilada (100 mL) lentamente (gotejamento), em agitação constante (Ultra-Turrax) de 5000 rpm, por 20 minutos. Em seguida, a solução foi

transferida para o rotaevaporador com banho maria em 35 °C para eliminação do solvente. O esquema da metodologia está apresentado na Figura 1.

Figura 1 – Esquema da metodologia utilizada para o preparo das nanopartículas



Fonte: Autoria própria.

2.3 CARACTERIZAÇÃO INICIAL DAS NP-OPB

As amostras foram caracterizadas quanto à morfologia, tamanho de partícula, índice de polidispersibilidade, potencial zeta, pH, cor e carotenoides totais imediatamente após o preparo. Em seguida, foram armazenadas em frasco de vidro âmbar a temperatura de refrigeração ($4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) para avaliação da estabilidade.

2.3.1 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As NP-OPB foram colocadas em uma grade (filmes de suporte de carbono Formvar, 200 mesh) por 1 min. Em seguida, uma gota de solução de ácido fosfotúngstico a 1% também foi aplicada por 30 segundos. A grade foi colocada sob o microscópio eletrônico de transmissão operado a 80 kV com ampliação média de 80.000 vezes e escala de 0,2 e de 1 μm (adaptado de Campo *et al.*, 2017).

2.3.2 Tamanho de partícula, índice de polidispersibilidade e potencial zeta

As amostras foram diluídas em água ultra pura para a concentração final de 1/10 (v/v) (25°C) e os parâmetros foram determinados através do equipamento ZetaSizer® Nano ZS (Malvern) no Laboratório Interdisciplinar para o Desenvolvimento de

Nanoestruturas (LINDEN) do Departamento de Engenharia Química e de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina (JIMÉNEZ *et al.*, 2018).

2.3.3 pH

O pH foi mensurado a 25 °C usando um pHMetro W3B (BEL Engineering). A análise foi realizada no Laboratório de Óleos e Gorduras do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

2.3.4 Cor

A determinação da cor foi realizada no Laboratório de Frutas e Hortaliças do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina. As amostras foram colocadas em colorímetro CR-400 (Minolta, Osaka, Japan) com iluminante D₆₅, ângulo de observação de 2° e foi utilizada a escala CIELab, sendo (ANDREU-SEVILLA *et al.*, 2008):

- L* a luminosidade, variando de 0 (preto) a 100 (branco);
- a* intensidade de vermelho, variando de verde a vermelho (-a/+a);
- b* intensidade de amarelo, variando de azul a amarelo (-b/+b);

O valor de ΔE , que representa a diferença entre duas cores, foi calculado através da Equação 1 (MUTLU-SAGESEN *et al.*, 2005). As NP-OPB no tempo 0 foram consideradas como padrão.

$$\Delta E = \sqrt{(L1 - L2)^2 + (a1 - a2)^2 + (b1 - b2)^2} \quad (1)$$

2.3.5 Carotenoides totais

As análises foram realizadas no Laboratório de Óleos e Gorduras do departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina. Para a quantificação dos carotenoides totais das NP-OPB, foi seguido o método de YI *et al.* (2014), com adaptações. Para extração dos carotenoides, as amostras foram diluídas em hexano e metanol na proporção 2:2:1 (v/v), respectivamente, e colocadas em centrífuga (80- 2B, Daiki) por 10 min a 4000 rpm. As extrações foram repetidas exaustivamente até que a amostra ficasse incolor. Os extratos foram acondicionados em placa de petri previamente pesada e colocados em estufa (35 °C) para completa evaporação dos solventes. Após, os extratos foram diluídos em éter de petróleo e transferidos para balão volumétrico (10 mL), para realização da leitura da absorbância em espectrofotômetro

UV/Vis (Spectro S-2000, *Bel Engineering*– São Paulo/BR) no comprimento de onda máximo de absorção do β -caroteno (450 nm).

A quantificação de carotenoides totais do óleo livre foi feita com 0,04 g do óleo de palma bruto diluído em éter de petróleo, e leitura da absorbância nas mesmas condições das NP-OPB.

O total de carotenoides em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ foi calculado através da Equação (2).

$$\text{CT } (\mu\text{g/g}) = \frac{\text{Abs.Vol.}10^4}{E_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot P} \quad (2)$$

Sendo:

CT = Carotenoides totais

Abs = absorbância no $\lambda_{\text{máximo}}$

Vol = Volume da diluição (mL)

$E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2590$

P = Massa da amostra (g)

2.4 ESTABILIDADE DAS NP-OPB

A estabilidade das NP-OPB foi avaliada quinzenalmente ao longo de 60 dias com relação aos parâmetros de distribuição de tamanho de partícula, índice de polidispersibilidade, potencial zeta, pH e cor, conforme descritos nos itens 2.3.2, 2.3.3 e 2.3.4.

2.5 CITOTOXICIDADE

O cultivo celular e os ensaios de citotoxicidade foram realizados no Laboratório Experimental em Neuropatologias do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina.

2.5.1 Cultivo celular

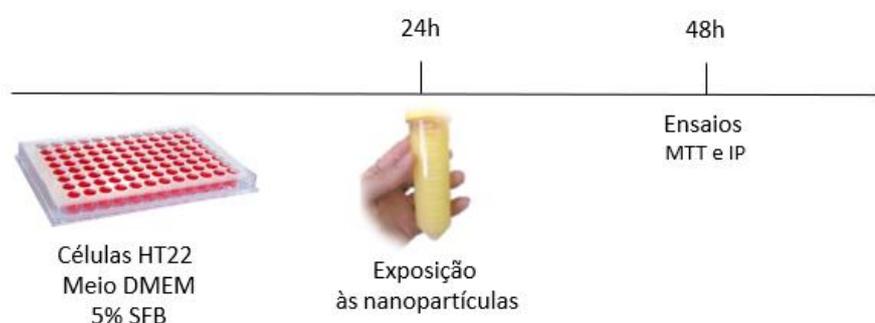
Foram utilizadas células HT22 (linhagem imortalizada das células do hipocampo de camundongos). As mesmas foram cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) e mantidas em atmosfera contendo 5% de CO_2 , a 37°C . O meio de cultivo foi trocado a cada 2 dias e, ao atingirem uma confluência de aproximadamente 85%, as células foram repicadas utilizando tripsina (0,05%). Os experimentos foram realizados utilizando células entre a 9ª e a 10ª passagem. As células foram transferidas para placas de 96 poços e o número de

células utilizado foi de 3500 células/poço, padronizado por meio da contagem em câmara de Neubauer.

2.5.2 Tratamento

Após 24 horas do plaqueamento das células, as mesmas foram tratadas com diferentes concentrações das NP-OPB: (1) $2,5 \times 10^{-1}$ mg/mL (nanopartículas não diluídas) e diluições seriadas (2) $2,5 \times 10^{-2}$ mg/mL, (3) $2,5 \times 10^{-3}$ mg/mL (4) $2,5 \times 10^{-4}$ µg/mL (5) $2,5 \times 10^{-5}$ mg/mL e (6) $2,5 \times 10^{-6}$ mg/mL (concentração final na placa, expressa em mg de OPB /mL). Os ensaios MTT e IP foram realizados nas mesmas células plaqueadas, após 24h da exposição das células às nanopartículas (Figura 2).

Figura 2 - Protocolo experimental para avaliação da citotoxicidade das nanopartículas



Fonte: Autoria Própria.

2.5.3 Ensaio redução do MTT

Foi realizado conforme descrito por Mosmann (1983). Logo após ensaio com Iodeto de Propídeo, o conteúdo líquido da placa de 96 poços (do ensaio IP) foi descartado por inversão e foram adicionados, em cada poço, 100 µL da solução de trabalho de MTT (0,5 mg/mL em HBSS) previamente mantido a 37 °C. As células foram mantidas em incubadora a 37°C na presença da solução MTT por 1 hora. Em seguida, o conteúdo foi descartado por inversão, e foram adicionados, em capela de exaustão, 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO p.a.) por poço. Após a completa solubilização dos cristais, foi realizada leitura a 540 nm no leitor de placas Multileitora Infinite M200 (TECAN) Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina). O branco corresponde ao meio de cultivo (sem células) + MTT.

2.5.4 Ensaio Iodeto de Propídeo

Foi realizado de acordo com protocolo proposto por Rosa *et al* (1997). Foram adicionados 10 µL de triton X100 2% sobre o meio das células controle (não-tratadas) que foram consideradas 100% mortas/inviáveis. A placa foi agitada e levada para a incubadora de CO₂ por aproximadamente 20 minutos. Foram adicionados 5 µL da solução de IP 0.147 mg/mL (IP/poço: 7,35 µg/mL) (no escuro) em todos os poços, incluindo o branco. A placa foi colocada em incubadora de CO₂ por 20 min a 37 °C e em seguida foi realizada leitura em multileitor de placas (Multileitora Infinite M200 - TECAN) no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina): comprimento de extinção 535 nm e emissão 617 nm. O branco corresponde ao meio de cultivo (sem células) + IP.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises de caracterização das NP-OPB foram realizadas em triplicata. Para a avaliação de toxicidade, foram realizados quatro experimentos em sextuplicata. Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Para a análise dos dados foi utilizado o Software *STATISTICA 13.3* (StatSoft Inc., Tulsa, EUA). O programa ORIGIN® 8.0 foi utilizado para elaboração das figuras.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CARACTERIZAÇÃO INICIAL DAS NP-OPB

3.1.1 Morfologia

A morfologia das NP-OPB determinada por MET indicou que as mesmas possuem formato esférico e ausência de agregados (Figura 3), características também evidenciadas para nanopartículas de óleo de sementes de chia (CAMPO *et al.*, 2017), óleo de linhaça (STEFANI *et al.*, 2019) e de OPB (FERREIRA, 2018), produzidas pela mesma técnica.

Figura 3 – Micrografias obtidas por MET das NP-OPB

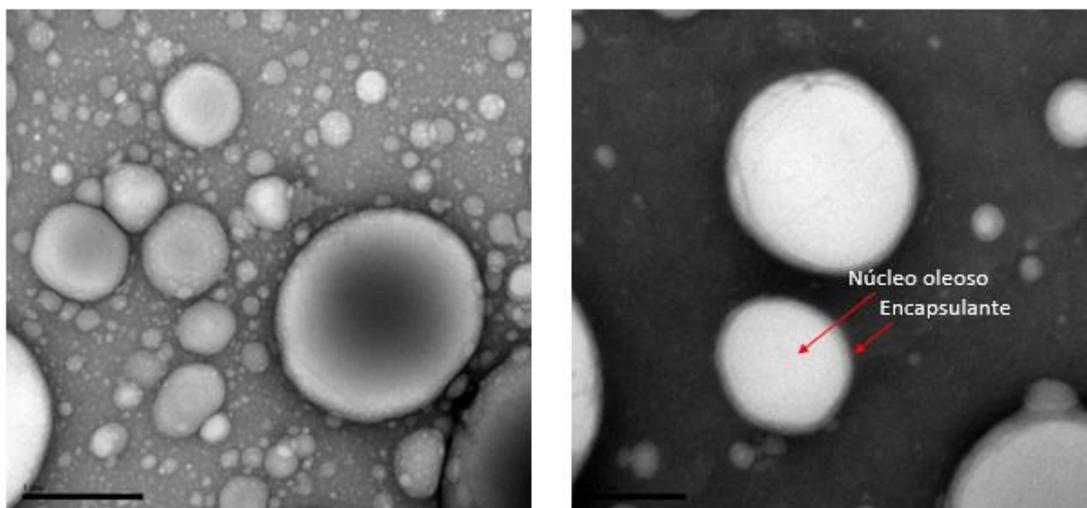


Imagem das NP-OPB bruto por MET (valor de barra = 1 μm (imagem à direita) e 0,2 μm (imagem à esquerda)).

3.1.2 Tamanho de partícula, índice de polidispersibilidade, potencial zeta, pH, cor e carotenoides totais

As NP-OPB apresentaram tamanho inicial de $232,17 \pm 0,84$ nm, considerado adequado para partículas nanométricas (< 1000 nm), PDI de $0,25 \pm 0,01$, indicando uniformidade nos diâmetros ($\text{PDI} < 0,3$) e PZ de $-43,67 \pm 3,16$ mV, indicando estabilidade ($\text{PZ} > -30$). A tabela 1 apresenta os resultados obtidos no presente estudo (em destaque) e de outros trabalhos que realizaram encapsulamento de OPB através da mesma técnica, para fins comparativos.

Ferreira (2018) encontrou tamanho de partícula e PDI menores no encapsulamento de OPB (Tabela 1) utilizando *Tween 80* como emulsificante. Tendo em vista que a técnica e a concentração do óleo foi a mesma, a variação do tamanho e PDI ocorreu, principalmente, devido ao emulsificante e material parede. Donato (2020) encontrou tamanho e PDI maiores encapsulando OPB na concentração de 20 mg/mL (Tabela 1). Neste caso, a maior concentração de óleo parece ser responsável pelo tamanho de partícula e PDI mais elevado.

Tabela 1 – Resultados de tamanho de partícula, PDI, potencial zeta, pH, parâmetros de cor L*, a* e b* e carotenoides totais de NP-OPB imediatamente após o preparo.

Característica	Resultados experimentais NP-OPB/FAM	Resultados Literatura		
		NP-OPB/Goma arábica ^a	NP-OPB/Caseína ^a	NP-OPB/Goma arábica/fécula de mandioca (1:1) ^b
Tamanho de partícula (nm)	232,17 ± 0,84	180,73 ± 2,23	180,83 ± 2,38	290 ± 0,02
PDI	0,25 ± 0,01	0,150 ± 0,00	0,140 ± 0,01	1,00 ± 0,00
PZ (mV)	- 43,67 ± 3,16	-31,46 ± 0,61	-19,33 ± 0,60	-41,80 ± 0,28
pH	5,04 ± 0,02	6,30 ± 0,10	5,70 ± 0,20	4,71 ± 0,01
L	43,05 ± 0,08	35,67 ± 1,16	41,16 ± 0,63	56,95 ± 0,29
a*	-3,99 ± 0,03	1,99 ± 0,17	2,84 ± 0,01	8,53 ± 0,01
b*	11,43 ± 0,04	4,84 ± 0,06	4,50 ± 0,04	57,34 ± 1,14
Carotenoides totais (µg/g) / % em relação ao óleo	347,99 ± 32,5 / 55,85	468,99 ± 5,60/ 68,32	517,79 ± 4,36/ 75,47	561,77 ± 10,97 / 99,10

^aFerreira (2018): OPB = 2,5mg/mL; ^bDonato (2020): OPB = 20 mg/mL

Campo e colaboradores (2017) encontraram tamanhos inferiores (205 nm) no encapsulamento de óleo de semente de chia em concentração de 1,25 mg/mL, e Stefani e colaboradores (2019) valores superiores (356 ± 2,83 nm) no encapsulamento de óleo de linhaça em concentração de 105 mg/mL (ambos utilizaram mucilagem de chia como encapsulante e *tween 80* como emulsificante). Segundo os autores, com o aumento da concentração do óleo, o tamanho de partícula tende a aumentar.

As NP-OPB apresentaram inicialmente comportamento monomodal (Figura 5B). Ferreira (2018) (Tabela 1) obteve comportamento bimodal nesta análise utilizando pectina como encapsulante, e monomodal com caseína e goma arábica. Isto indica que o encapsulante pode interferir na distribuição do tamanho das partículas, e que a farinha do albedo do maracujá é mais adequada para preparação destas nanopartículas do que a pectina cítrica isolada.

Em relação ao potencial zeta, os valores encontrados tiveram maior carga negativa, quando comparados aos valores verificados por Ferreira (2018) e Donato (2020) (Tabela 1), o que pode ter ocorrido por influência do polímero. A pectina, presente na farinha do albedo do maracujá, apresenta caráter ácido (HUBER; BEMILLER, 2017), o que pode ter influenciado na carga elétrica superficial das partículas. Nanopartículas de gomas aniônicas, como goma de caju, proteína do soro do leite e pectina do mesocarpo do

maracujá podem apresentar potencial zeta negativo devido à presença de grupos ácidos carboxílicos na forma carboxilada, que geram carga negativa. Os emulsificantes utilizados são não iônicos, de modo que a influência da carga vem essencialmente do material de parede e da interação entre os componentes (RICAURTE *et al.*, 2018; HERCULANO *et al.*, 2015).

De modo geral, os resultados evidenciaram que a combinação da técnica, concentração do OPB, material de parede (farinha do albedo do maracujá) e emulsificante (lecitina de soja) foram capazes de produzir NP-OPB com tamanho, PDI e PZ adequados.

O valor de pH inicial das NP-OPB foi de $5,04 \pm 0,02$. Ferreira (2018) encontrou valor de $5,7 \pm 0,2$ utilizando caseína e $6,30 \pm 0,1$ quando o encapsulante foi goma arábica, enquanto Donato (2020) encontrou pH de $4,71 \pm 0,01$ com goma arábica e fécula de mandioca (1:1), indicando que o encapsulante também pode influenciar neste parâmetro. Campo *et al* (2017), encontraram pH de $4,16 \pm 0,02$ para nanopartículas de óleo de semente de chia e Stefani *et al* (2019) pH de 4 para nanopartículas de óleo de linhaça. Nos dois estudos, os autores utilizaram mucilagem de chia como encapsulante, e relataram que foi realizada uma acidificação inicial, pois a diminuição do pH da solução leva à redução da repulsão eletrostática entre as partículas, reduzindo grupos com carga semelhante e consequentemente reduzindo o tamanho das partículas.

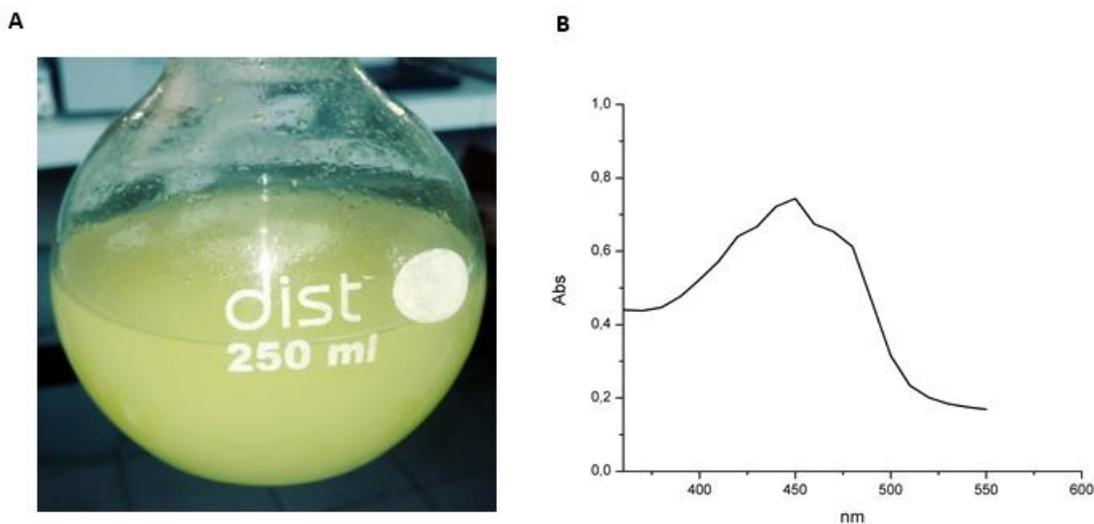
O valor de pH pode interferir em aspectos sensoriais e também nos compostos bioativos presentes nas nanopartículas (LOBATO *et al.*, 2015). As NP-OPB não apresentaram valor de pH extremo, o que não deve causar muitas restrições em suas aplicações, embora, por terem pH inicial de 5, sejam mais indicadas para aplicação em alimentos naturalmente ácidos, como iogurtes, que costumam ter um pH variando entre 3,6 - 4,5 (JAY, 2005) ou molhos pra salada, cujo pH varia de 3,2 a 4,0 (RODAS, 2001; DONATO, 2020).

As NP-OPB apresentaram tendência ao amarelo (Figura 4A), preservaram 55,85% dos carotenoides do óleo livre ($623,01 \pm 4,20 \mu\text{g/g}$) e o espectro do extrato confirmou o β -caroteno como carotenoide majoritário (Figura 4B).

A perda de parte dos carotenoides pode estar relacionada tanto ao processo de encapsulamento quanto ao método de extração desses pigmentos para a quantificação. A metodologia utilizada para extração dos carotenoides totais das NP-OPB inclui muitas etapas, tornando a análise mais suscetível à exposição ao oxigênio, que pode ter contribuído para a degradação dos carotenoides. Ainda assim, destaca-se que o teor de

carotenoides preservado foi especialmente eficaz quando comparado ao teor encontrado no óleo de palma refinado, que perde a maior parte destes compostos, e pode ser adicionado de β -caroteno sintético para substituir os carotenoides naturais (GIBON; GREYT; KELLENS, 2007).

Figura 4 – Imagem das NP-OPB logo após o encapsulamento (A) e Espectro de UV/Vis de 360 nm a 550 nm das NP-OPB (B)



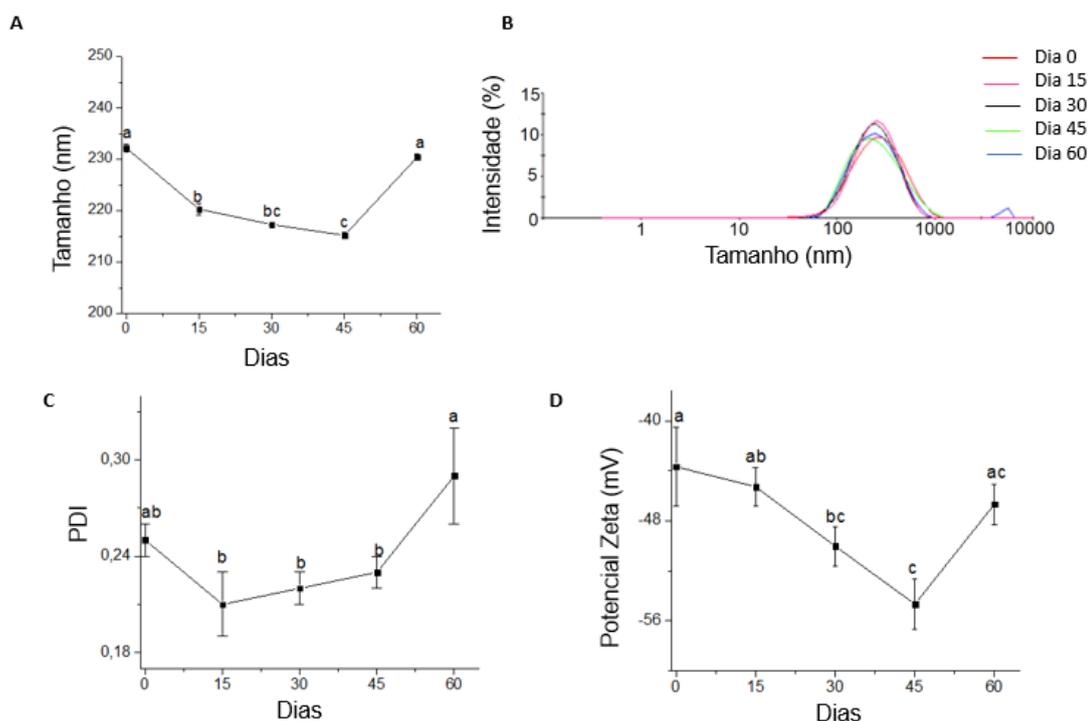
Ferreira (2018) obteve valores de L^* e a^* semelhantes ao presente trabalho, porém, os valores de b^* , que indicam tendência ao amarelo, foram inferiores (Tabela 1). A preservação de carotenoides totais foi de 68,32% (goma arábica) e 75,47% (caseína). Evidencia-se que o material de parede pode influenciar tanto nos parâmetros de cor quanto no teor de carotenoides preservado. Na análise para determinação de carotenoides totais, o material de parede também pode influenciar por dificultar a quebra da cápsula para extração dos pigmentos.

No estudo de Donato (2020) todos os parâmetros de cor foram superiores (Tabela 1), o que é justificado pela maior concentração de óleo utilizada, e também apresentaram maior preservação de carotenoides (99,1%) do que no presente trabalho. Isto pode ser justificado tanto pela maior concentração de óleo nas nanopartículas, que facilita a extração dos pigmentos, quanto pela técnica utilizada para extração, que incluiu duas etapas a mais: a utilização de vórtex após cada extração, e a secagem dos solventes sob nitrogênio, que pode ter auxiliado na otimização do processo de extração e/ou diminuído a perda de carotenoides por oxidação.

3.2 ESTABILIDADE DAS NP-OPB SOB REFRIGERAÇÃO

Com base na Figura 5 é possível verificar que o tamanho de partícula, PDI e PZ sofreram pequenas variações ao longo do armazenamento (Figura 5A, 5C e 5D), entretanto, não houve diferença significativa da amostra no tempo final (60 dias), em relação ao tempo inicial (tempo 0).

Figura 5 – Resultados de estabilidade dos parâmetros de tamanho médio de partícula (A), distribuição do tamanho de partícula (B), PDI (C) e potencial zeta (D) das NP-OPB



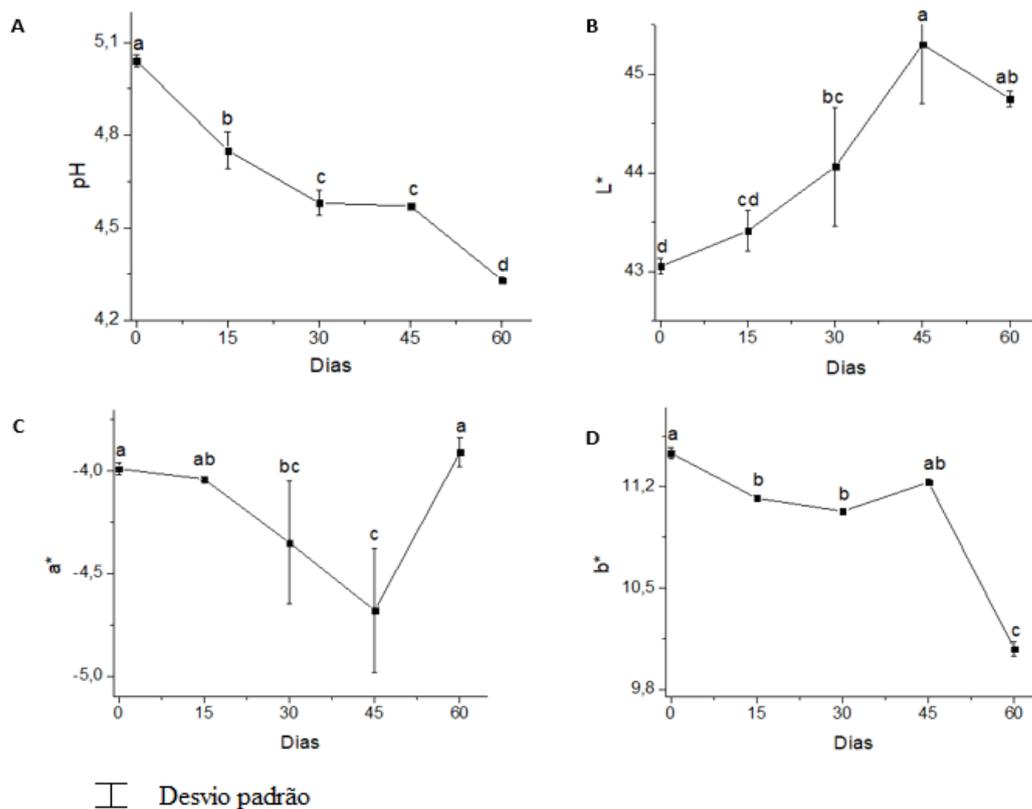
▮ Desvio padrão

A análise realizada ao fim dos 60 dias demonstrou aumento da presença de partículas em tamanho maior que 1000 nm, verificada através do segundo pico na Figura 5B, obtida por DLS. Isto indica que pode ter ocorrido agregação de algumas das partículas, o que levou ao aumento do tamanho, entretanto, essas partículas equivalem a apenas 2,1% da amostra, motivo pelo qual o tamanho médio não sofreu alteração (Figura 5A).

Houve uma redução do valor do pH ao longo do armazenamento (Figura 6A). Diversas reações químicas podem ser responsáveis por esta alteração, como degradação do encapsulante e crescimento bacteriano. No caso específico de nanopartículas lipídicas, essa diminuição também pode ocorrer devido à hidrólise dos triacilgliceróis e liberação de ácidos graxos livres. Campo e colaboradores (2017) também relataram diminuição do pH

de nanopartículas de óleo de semente de chia encapsuladas com mucilagem de chia e *Tween 80* como emulsificante em análise de estabilidade ao longo de 28 dias, e atribuíram esta diminuição à ionização ou dissociação de grupos de ácidos carboxílicos presentes no polímero.

Figura 6 – Variação do pH (A) e parâmetros de cor L* (B), a* (C) e b* (D) das NP-OPB ao longo dos 60 dias de armazenamento



Além do pH, também houve pequena diminuição do pigmento amarelo (b*) ao longo dos 60 dias de armazenamento (Figura 6D). Donato (2020) não encontrou variação nos parâmetros de cor quando encapsulou OPB com fécula de mandioca e goma arábica (1:1) como encapsulante em avaliação da estabilidade ao longo de 30 dias em armazenamento refrigerado. Embora no presente trabalho a avaliação tenha sido ao longo de 60 dias, nota-se que em 30 dias já houve variação de cor ($p < 0,05$) (Figura 6B, 6C e 6D). Entretanto, a concentração de óleo utilizada foi muito superior (20 mg/mL) a do presente trabalho (2,5 mg/mL) o que pode ter auxiliado a preservar a pigmentação por mais tempo.

O valor de ΔE comparando os parâmetros da análise realizada imediatamente após o preparo com os parâmetros obtidos na análise ao final dos 60 dias de armazenamento, foi

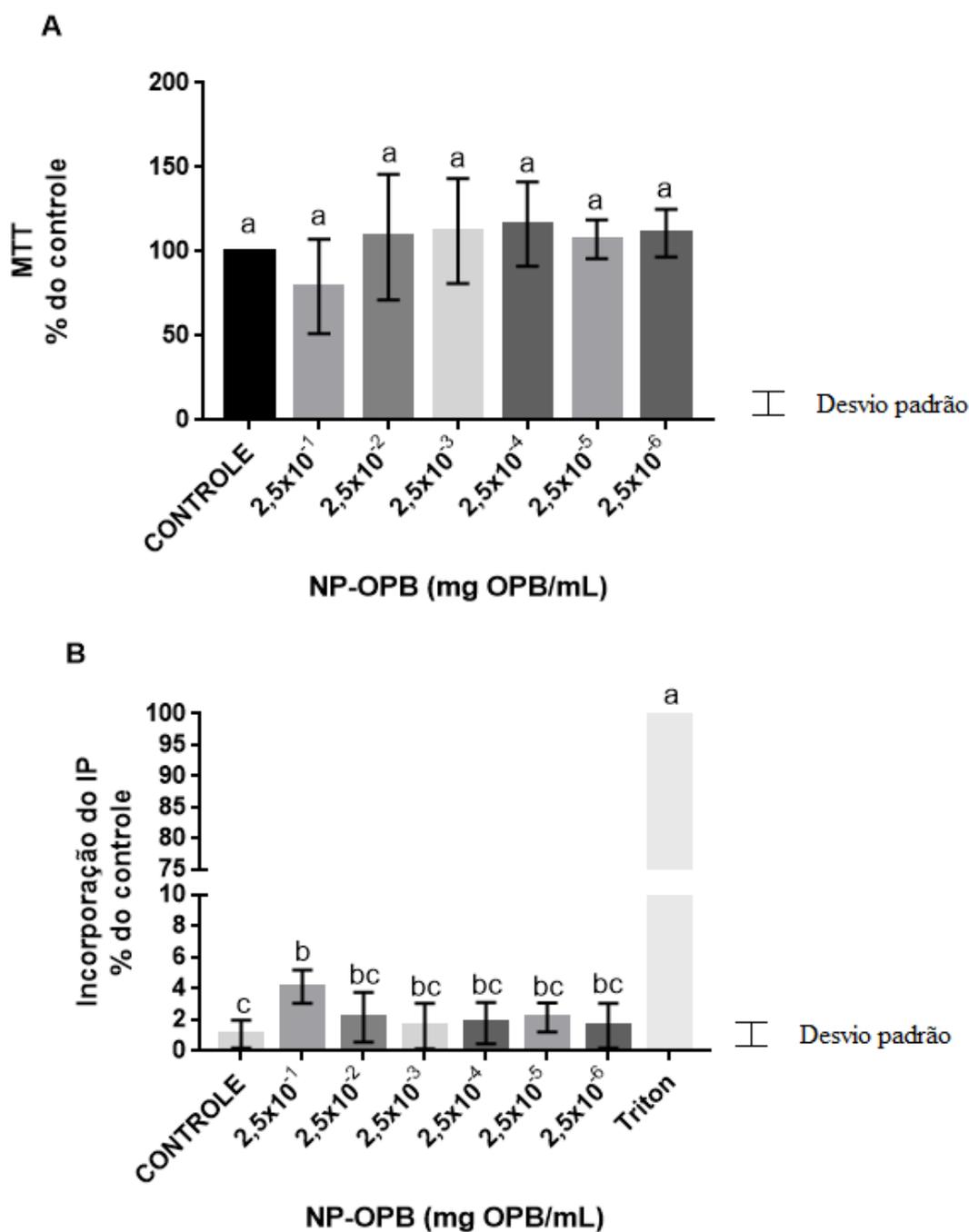
de 2,17. Valores de $\Delta E \leq 3,3$, indicam que a diferença é aceitável e provavelmente imperceptível a olho nu (MUTLU-SAGESEN *et al.*, 2005). Dessa forma, embora a análise tenha evidenciado mudança significativa na coloração ($p < 0,05$) (Figura 6B, 6C e 6D), essas alterações ainda não foram percebidas visualmente.

De modo geral, os resultados sugerem que o período máximo de armazenamento das nanopartículas é em torno de 60 dias, tendo em vista o início das alterações de características iniciais, especialmente cor e pH.

3.3 CITOTOXICIDADE DAS NP-OPB

As NP-OPB foram testadas quanto a viabilidade celular em células neuronais de camundongos (HT22), com o objetivo de investigar possíveis efeitos tóxicos. A análise de viabilidade celular obtida pelo MTT indicou que as NP-OPB não afetaram a viabilidade celular de células HT22 em nenhuma das concentrações testadas (Figura 7A). Entretanto, a análise de morte celular verificada através da incorporação do IP, mostrou que, na maior concentração testada ($2,5 \times 10^{-1}$ mg/mL), houve morte celular superior ao controle ($p < 0,05$) (Figura 7B).

Figura 7– Efeito das NP-OPB na viabilidade de células HT22 avaliado pelos ensaios MTT (A) e IP (B).



As análises de redução do MTT e de incorporação do IP apresentam princípios diferentes: o primeiro composto é metabolizado por células saudáveis, enquanto o segundo entra nas células apenas quando estas apresentam danos na membrana. Percebe-se que, no ensaio MTT, a concentração de $2,5 \times 10^{-1}$ mg/mL gerou uma diminuição da média da viabilidade celular de aproximadamente 20%, em relação ao controle (Figura 7A). No

entanto, não é observada diferença estatística ($p < 0,05$) entre esses dois resultados, provavelmente devido ao valor apresentado do desvio padrão, nessa concentração. Já no ensaio IP, percebe-se que o desvio padrão tem valor tal que pequenas variações tendem a ser estatisticamente significativas.

Os resultados demonstram que a maior concentração de NP-OPB segura para as células testadas é de $2,5 \times 10^{-2}$ mg/mL. Em ambas as análises, esta concentração não apresentou diferença estatística em relação ao controle.

A comparação com dados da literatura é dificultada, principalmente, devido ao escasso número de estudos. Foram encontrados apenas três trabalhos avaliando a toxicidade de nanopartículas de óleo vegetal: óleo de semente de romã (MARCHIORI *et al.*, 2017; FERREIRA *et al.*, 2016) e óleo de buriti (REIS *et al.*, 2020). O trabalho com óleo de buriti (REIS *et al.*, 2020) trata de uma nanoemulsão (NE) e de um transportador lipídico nanoestruturado (NLE), e a avaliação de toxicidade foi realizada com as concentrações de 2 a $0,00001 \mu\text{L/mL}$ através do ensaio Sulforodamina B, em que não foi detectada toxicidade. Entretanto, destaca-se que, além do ensaio ser diferente, o estudo trata de NE e NLE, que se diferenciam de nanocápsulas, principalmente devido à ausência do material de parede.

Os trabalhos com óleo de semente de romã realizaram a avaliação de toxicidade através do ensaio MTT, em concentrações de (0,1, 0,25 e 0,50 mg/mL (FERREIRA *et al.*, 2016) e $14,5 \times 10^{-3}$, $72,4 \times 10^{-3}$, $14,5 \times 10^{-2}$ e $72,4 \times 10^{-2}$ mg/mL (MARCHIORI *et al.*, 2017)). Os autores não encontraram toxicidade em nenhuma das concentrações testadas. Destaca-se que, além das concentrações e óleos diferentes, no presente trabalho, a citotoxicidade foi encontrada no ensaio de incorporação do IP, e não no ensaio de redução do MTT, o que pode justificar a diferença de toxicidade entre os trabalhos.

A escassez de dados relacionados à toxicidade de nanopartículas de óleos vegetais apenas corrobora a importância da realização deste tipo de análise. As NP-OPB, produzidas com farinha do albedo do maracujá como encapsulante e lecitina de soja como emulsificante, foram consideradas seguras para as células analisadas, em concentrações menores ou iguais a $2,5 \times 10^{-2}$ mg/mL, evidenciando seu potencial para aplicação em alimentos.

4 CONCLUSÃO

As NP-OPB formuladas com FAM e lecitina de soja através da técnica de nanoemulsificação apresentaram tamanho nanométrico (< 1000), PDI e PZ adequados ($PDI < 0,3$ e $|PZ| > 30$), que se mantiveram estáveis durante os 60 dias de armazenamento refrigerado. A solução apresentou pigmentação com tendência ao amarelo, que diminuiu ao longo do armazenamento, mas não foi perceptível visualmente. Houve pequeno decréscimo do pH desde os primeiros dias de armazenamento. As NP-OPB mostraram-se seguras em células HT22 em concentrações menores ou iguais a $2,5 \times 10^{-2}$ mg/mL, e mostraram-se promissoras para aplicação em alimentos que tenham o pH próximo à faixa em que as NP-OPB se mantiveram ao longo do armazenamento (4-5), com a função de corante. Os dados obtidos podem contribuir para o conhecimento da área de toxicidade de nanopartículas de óleos vegetais, auxiliando na elaboração de regulamentações sobre o assunto.

5 REFERÊNCIAS

- ANDREU-SEVILLA, A. *et al.* Mathematical quantification of total carotenoids in Sioma oil using color coordinates and multiple linear regression during deep-frying simulations. **European Food Research and Technology**, v.226, p.1283 - 1291, 2008.
- ASHRAF, S.A. *et al.* Innovations in nanoscience for the sustainable development of food and agriculture with implications on health and environment. **Science of The Total Environment**, v.768, p144-990, 2021.
- BEZERRA, P. Q. M. *et al.* Innovative functional nanodispersion: Combination of carotenoid from Spirulina and yellow passion fruit albedo. **Food Chemistry**, v.285, p.397-405, 2019.
- CAMPO, C. *et al.* Nanoencapsulation of chia seed oil with chia mucilage (*Salvia hispanica* L.) as wall material: Characterization and stability evaluation. **Food Chemistry**, v.234, p.1-9, 2017.
- CODEX STAN 210. CODEX ALIMENTARIUS (FAO/WHO) (2019). **Codex Standard for named vegetable oils**. Roma, 2019.
- DONATO, M. *et al.* Effect of nanoencapsulated crude palm oil addition on the oxidative stability of salad dressing in an accelerated oxidation test. **Research, Society and Development**, v. 9, n.9, 2020.
- DONATO, M. **Efeito da adição de óleo de palma bruto encapsulado na estabilidade aceitação sensorial de molho para salada**. 104p. Dissertação (Mestrado) – Curso de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2020.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **Food Losses and Waste in Latin America and the Caribbean**. Bulletin, v.2, p.1-39. 2015.
- FERREIRA, M.L. *et al.* Pomegranate seed oil nanoemulsions with selective antiangioma activity: optimization and evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and oxidative effects on mononuclear cells. **Journal Pharmaceutical Biology**, v. 54, p. 2965-2977, 2016.
- FERREIRA, C. D; NUNES, LARROZA, I. Oil nanoencapsulation: development, application, and incorporation into the food market. **Nanoscale Research Letters**, v.14, p.1-13, 2019.
- FREIBERGER, E. B. *et al.* Encapsulation of roasted coffee oil in biocompatible nanoparticles. **Lwt - Food Science and Technology**, v.64, p.381-389, 2015.
- GHORBANZADE, T. *et al.* Nano-encapsulation of fish oil in nano-liposomes and its application in fortification of yogurt. **Food Chemistry**, v.216, p.146–152, 2017.
- GIBON. V., de GREYT, W, KELLENS, M. Palm oil refining. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.109, p315-335, 2007.
- HERCULANO, E.D. *et al.* Physicochemical and antimicrobial properties of nanoencapsulated *Eucalyptus staigeriana* essential oil. **LWT - Food Science and Technology**, v.61, p.484–491, 2015.
- HERTIANI, T. *et al.* Evaluation of the efficacy and toxicity of massoia oil nanoemulsion. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Science**, v.32, p.1519-1528, 2019.
- JIMÉNEZ, M. *et al.* Elaboration and Characterization of O/W cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) and black pepper (*Piper nigrum*) emulsions. **Food hydrocolloids**, v.77, p.902-910, 2018.

- KATATA-SERU, L. *et al.* Application of Taguchi method to optimize garlic essential oil nanoemulsions. **Journal of Molecular Liquids**, v.244, p.279–284, 2017.
- KATOZIAN, I; JAFARI, S. M. Nano-encapsulation as a promising approach for targeted delivery and controlled release of vitamins. **Trends in Food Science & Technology**, v. 53, p. 34-48, 2016.
- LOBATO, K. B. S. *et al.* Evaluation of stability of bixin in nanocapsules in model systems of photosensitization and heating. **Food Science and Technology**, v.60, p.8-14, 2015.
- MARCHIORI, L.C.M. *et al.* Cruz, L. Nanoencapsulation Improves Scavenging Capacity and Decreases Cytotoxicity of Silibinin and Pomegranate Oil Association. **An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists**, v.18, p.3236-3246, 2017.
- MUTLU-SAGESEN, L. *et al.* Color stability of different dentureteeth materials: an in vitro study. **Journal of Oral Science**, v. 43, n.3, p. 193-205, 2001.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, 63, 45-55, 1983.
- OLIVEIRA, C. F.F. *et al.* Combined Effect of High-Pressure and Conventional Heating on Pectin Extraction from Passion Fruit Peel. **Food and Bioprocess Technology**, v.9, n.6, p.1021-1030, 2016.
- RICOURTE, L. *et al.* Production on high-oleic palm oil nanoemulsions by high-shear homogenization (microfluidization). **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.35, p75-85, 2016.
- RICOURTE, L. *et al.* Physical, thermal and thermodynamical study of high oleic palm oil nanoemulsions. **Food Chemistry**, v.256, p. 62-70, 2018.
- RODAS, A. B. M. et al. Caracterização físico-química histológica e viabilidade de bactérias lácticas em iogurtes com frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, n.3, p.304-309, 2001.
- ROSA, R., et al. Properties of ryanodine receptors in cultured cerebellar granule neurons: effects of hexachlorocyclohexane isomers and calcium. **Journal of Neuroscience Research**, v. 47, p. 27-33, 1997.
- STEFANI, da S. F. *et al.* Nanoencapsulation of linseed oil with chia mucilage as structuring material: Characterization, stability and enrichment of orange juice. **Food Research International**, v. 120, p. 872-879, 2019.
- YI, J *et al.* Cellular uptake of β -carotene from protein stabilized solid lipid nanoparticles prepared by homogenization-evaporation method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 5, p. 1096–1104, 2014.

CAPÍTULO IV

5 CONCLUSÃO GERAL

A prospecção evidenciou o grande potencial de uso de nanoemulsões em diversas áreas, inclusive na de alimentos, e demonstrou que o Brasil necessita de mais investimentos a fim de acompanhar o desenvolvimento mundial. Especialmente no segmento alimentício, o país tem apenas 2 patentes depositadas, revelando uma lacuna na proteção das invenções. Além disso, foi expressiva a diferença entre os estudos científicos sobre o tema e os documentos de patente, o que indica que há mais incentivo às pesquisas científicas do que à proteção da propriedade intelectual.

Constatou-se que NPO vêm apresentado efeitos protetores contra células cancerígenas e contra danos oxidativos. Entretanto, 43% dos estudos apresentaram dano também a células saudáveis, em alguma concentração. Considerando que os estudos são escassos, destaca-se a necessidade de mais pesquisas sobre o tema, para que seja possível elaborar uma regulamentação que auxilie no aproveitamento desta tecnologia de forma segura.

Os resultados experimentais obtidos neste trabalho demonstraram a viabilidade de produção de NP-OPB com FAM como material de parede. As nanopartículas mantiveram-se estáveis em 60 dias de armazenamento ($4 \pm 2^\circ\text{C}$) e foram consideradas seguras em células HT22 em concentrações menores ou iguais a $2,5 \times 10^{-2}$ mg/mL, revelando-se promissoras para aplicação como corante natural em alimentos que tenham pH na faixa de 4-5. Este trabalho pode contribuir para um maior conhecimento da área de toxicidade de nanopartículas de óleos vegetais.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar análises de atividade antioxidante e tocois das NP-OPB;
- Realizar avaliação da estabilidade físico-química das NP-OPB em temperatura ambiente e de aquecimento;
- Avaliar efeito protetor das NP-OPB em células HT22 contra insultos oxidativos.
- Aplicação das NP-OPB em alimentos, como iogurtes ou molhos para salada, e posterior análise de toxicidade das formulações elaboradas com adição das NP-OPB.

7 REFERÊNCIAS

- ABUD, A. K. S.; NARAIN, N. Incorporação da farinha de resíduo do processamento de polpa de fruta em biscoitos: uma alternativa de combate ao desperdício. **Brazilian Journal Of Food Technology**, v. 12, n. 04, p.257-265, 2010.
- AGROANALYSIS: A revista de agronegócio da FGV.** Fundação Getúlio Vargas: Fgv, v. 02, n. 34, 2014.
- AMENTA, V. *et al.* Regulatory aspects of nanotechnology in the agri/feed/food sector in EU and non-EU countries. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 73, n. 1, p.463-476, 2015.
- ANDREU-SEVILLA, A. *et al.* Mathematical quantification of total carotenoids in Sioma oil using color coordinates and multiple linear regression during deep-frying simulations. **European Food Research and Technology**, v. 226, p. 1283 - 1291, 2008.
- ASSIS, L. M.; ZAVAREZE, E. R. Revisão: características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 2, p. 99-109, 2012.
- BARBOSA, F. O. **Nanopartículas de óleo de palma bruto com farinha do albedo do maracujá como encapsulante:** Preparo, caracterização e influência de emulsificantes. 2018. 73 p. TCC (Graduação) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.
- BEZERRA, P. Q. M. *et al.* Innovative functional nanodispersion: Combination of carotenoid from Spirulina and yellow passion fruit albedo. **Food Chemistry**, v. 285, p.397-405, 2019.
- BOBBIO, P. A. Introdução a química de alimentos. 2.ed. Sao Paulo: Livraria Varela, **1995**. 223p. **Bonaerense**, v. 23, p. 558-66, 2004.
- BRAAKHUIS, H.M. *et al.* Physico-chemical characteristics of nanomaterials that affect pulmonary inflammation. Part. **Fibre Toxicol.** p.11-18, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 340, de 13 de fevereiro de 2002. Diário Oficial da União, Brasília, n. 57, 2002.
- CAMPO, C. *et al.* Nanoencapsulation of chia seed oil with chia mucilage (*Salvia hispanica* L.) as wall material: Characterization and stability evaluation. **Food Chemistry**, v. 234, p.1-9, 2017.
- CANALES, P. S. R.; PALACIOS, N. R. Carotenoides. In: BLOCK, J. M.; BARRERA-ARRELLANO, D. **Temas selectos en aceites y grasas.** São Paulo: Blucher, Cap. 14. p. 381-396, 2012.
- CARNEIRO, H.C. F. **Microencapsulação de óleo de linhaça por spray drying: influência da utilização de diferentes combinações de materiais de parede.** 113p. Dissertação (Mestrado) – Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.
- CASTEJON, L. V. **PARÂMETROS DE QUALIDADE NA CLARIFICAÇÃO DA LECITINA DE SOJA.** 2015. 188 p. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.
- CHANDRA, P. **Nanobiosensors for Personalized and Onsite Biomedical Diagnosis.** Guwahati, Assam, India: Indian Institute of Technology Guwahati (iitg), 638 p, 2016.
- CHEQUER, F.M.; DORTA, J.D.; OLIVEIRA, D.P. Azo dyes and their metabolites: does the discharge of the azo dye into water bodies represent human and ecological risks? **Advances in Treating Textile Effluent.** Croatia. p. 28-48, 2011.

CODEX STAN 210. CODEX ALIMENTARIUS (FAO/WHO) (2019). **Codex Standard for named vegetable oils**. Roma, 2019. Acesso em: 06 de julho de 2020.

CÓRDOVA, *et al.* Características físico-químicas da casca do maracujá amarelo (*passiflora edulisflavicarpadegener*) obtida por secagem. **B. CEPPA**, v. 23, 2005.

COSTA, B. B. *et al.* USO DA FARINHA DA CASCA DO MARACUJÁ AMARELO (*PASSIFLORA EDULIS* F. *FLAVICARPA* DEG. - FAMÍLIA *PASSIFLORACEAE*) NA FORMULAÇÃO DE MACARRÃO CASEIRO. **Visão Acadêmica**, v. 19, n. 4, p.1-14, 2019.

COUVREUR, P. *et al.* Nanocapsule technology: a review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 2, n.19, p. 99-134, 2002.

DAMASCENO, C. S. B. *et al.* EFEITO DA ADIÇÃO DE FARINHA DA CASCA DE MARACUJÁ (*Passiflora edulis*) NA ACEITABILIDADE DE PÃO. **Visão Acadêmica**, v. 19, n. 3, p.1-15, 2018.

DIAS, P. M. **NANOTECNOLOGIA**: São Paulo: Fundacentro, 2016. 75 slides, color.

DOSSIÊ ANTIOXIDANTES: Antioxidantes: Food Ingredients, v. 83, n. 6, 2009. Disponível em: <http://www.revista-fi.com/materias/83.pdf>. Acesso em: 12 de agosto de 2019.

DONATO, M. *et al.* Efeito da adição de óleo de palma bruto nanoencapsulado na estabilidade oxidativa de molho para salada em teste de oxidação acelerada. **Research, Society and Development**, v. 9, n.9, 2020.

DONATO, M. **Efeito da adição de óleo de palma bruto encapsulado na estabilidade e aceitação sensorial de molho para salada**. 104 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência dos Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2020.

EMBRAPA (Brasília). **Produção brasileira de Maracujá**. 2019. Disponível em: <http://www.cnpmf.embrapa.br/Base_de_Dados/index_pdf/dados/brasil/maracuja/b1_maracuja.pdf>. Acesso em: 10 out. 2019.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **Food Losses and Waste in Latin America and the Caribbean. Bulletin**, n. 2, p. 1-39. 2015.

FAUSS, E. K. *et al.* **Correlation of Disinfection A ction of Silver Nanoparticles to Silver Ion Release and Reactive Oxygen Species Generation Characteristics**. 2012.

FERREIRA, C. D; NUNES, LARROZA, I. Oil nanoencapsulation: development, application, and incorporation into the food market. **Nanoscale Research Letters**, v. 14, n. 1, p.1-13, 2019.

FERREIRA, A P.; SANT'ANNA, L.S. A Nanotecnologia e a Questão da Sua Regulação no Brasil: Impactos à Saúde e ao Ambiente. **Uniandrade**, v. 16, n. 3, p.119-128, 2016.

FERREIRA, C. D. **REINVENTANDO O AZEITE DE DENDÊ: UMA VERSÃO NA FORMA DE NANOPARTÍCULAS**. 173 f. Tese (Doutorado) - Curso de Alimentos, Nutrição e Saúde, Escola de Nutrição, Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2018.

FERREIRA, J.S. *et al.* PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS FARINHAS DO ALBEDO DO MARACUJÁ AMARELO E DA CASCA DE JABUTICABA. **Xxv Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**: Alimentação: a árvore que sustenta a vida., Gramado, p.1-6, 2016.

FREIBERGER, E. B. *et al.* Encapsulation of roasted coffee oil in biocompatible nanoparticles. **Lwt - Food Science And Technology**, v. 64, n. 1, p.381-389, 2015.

FRONZA, T.; CAMPOS, A.; TEIXEIRA, H. Nanoemulsões como Sistemas de Liberação para Fármacos Oftálmicos. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, p. 558-66, 2004.

- EVANS, J.C.; KODALI, D.R.; ADDIS, P.B. Optimal tocopherol concentrations to inhibit soybean oil oxidation, v. 79, p. 47-51, 2002.
- GESTEIRO, E. *et al.* Palm oil on the edge. **Nutrients**, v. 11, n.9, p. 1-36, 2019.
- GHAREHBEGLOU, P. *et al.* Pectin-whey protein complexes vs. small molecule surfactants for stabilization of double nano-emulsions as novel bioactive delivery systems. **Journal of Food Engineering**, v. 245, p.139-148, 2019.
- GHORBANZADE, T. *et al.* Nano-encapsulation of fish oil in nano-liposomes and its application in fortification of yogurt. **Food Chemistry**, v. 216, p.146-152, 2017.
- HANDFORD, E. C. *et al.* Implications of nanotechnology for the agri-food industry: Opportunities, benefits and risks. **Trends In Food Science & Technology**, v. 40, n. 2, p.226-241, 2014.
- HUBER, K.C; BEMILLER, J. N. Carbohydrates: pectin. In: FENNEMA, R. O; DAMODARAN, S.; L, P. K. **Fennema's Food Chemistry: pectin**. 5. ed. London: Crc Press, 2017. Cap. 3. p. 158-160.
- HULL, M.S. *et al.* Release of Metal Impurities from Carbon Nanomaterials Influences Aquatic Toxicity. **Environmental Science & Technology**, v. 43, n. 11, p.4169-4174, 2009.
- HWANG, S; SHIH, P; YEN, G. Neuroprotective Effects of Citrus Flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 4, p.877-885, 2012.
- JAY, J. M. *Microbiologia de Alimentos*. Porto Alegre: ARTMED. 6. ed, 2005
- JIMÉNEZ, M.; DOMÍNGUEZ J. A.; PASCUAL-PINEDA, L. A.; AZUARA, E.; BERISTAIN, C. I. Elaboration and Characterization of O/W cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) and black pepper (*Piper nigrum*) emulsions. **Food hydrocolloids**, v. 77, p. 902-910, 2018.
- KATOZIAN, I.; JAFARI, S. M. Nano-encapsulation as a promising approach for targeted delivery and controlled release of vitamins. **Trends in Food Science and Technology**, v. 53, n. 7, p. 34–48, 2016.
- KIM, K. Y. *et al.* L-Serine protects mouse hippocampal neuronal HT22 cells against oxidative stress-mediated mitochondrial damage and apoptotic cell death. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 141, p.447-460, 2019.
- KUMARI, A. *et al.* Nanoencapsulation for drug delivery. **EXCLI Journal Experimental and Clinical Sciences**, v. 13, p. 265-286, 2014.
- LEGRAND, P. *et al.* C.Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation. **International Journal of Pharmaceutical**, v. 344, p. 33-43, 2007.
- LISBÔA, C. P. **Emulsões. Físico-química de solução de polímeros e surfactantes**. Unicamp. 2002.
- LOBATO, K. B. S. *et al.* Evaluation of stability of bixin in nanocapsules in model systems of photosensitization and heating. **Food Science and Technology**, v. 60, p. 8-14, 2015.
- MALVERN. **Dynamic light scattering - common terms defined**. Version 1, Whitepaper, 2014.
- MALVERN. **Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes**. Version 4, Technical Note, 2014.
- MALVERN INSTRUMENTS: **Zetasizer nanoseries - User manual**. United Kingdom, 2009.

- MARCHIORI, M C. L. *et al.* Nanoencapsulation Improves Scavenging Capacity and Decreases Cytotoxicity of Silibinin and Pomegranate Oil Association. **Aaps Pharmscitech**, v. 18, n. 8, p. 3236-3246, 2017.
- MASSADAR, R. **ECONOMIA CIRCULAR: VOCÊ SABE O QUE É?** 2019. Disponível em: <https://financeone.com.br/economia-circular-voce-sabe-o-que-e/>. Acesso em: 11 jun. 2020.
- McCLEMENTS, D. **Food emulsion: principle, practice and techniques**. 2 ed. Boca Raton: CRC Press 2005.
- MERTINS, O. *et al.* Caracterização da pureza de fosfatidilcolina da soja através de RMN de 1H e de 31P. **Química Nova**, v.31, p.1856-1859,
- MOMIN, J; JAYAKUMAR, C.; PRAJAPATI, J. Potential of Nanotechnology in Functional Foods. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 25, n. 1, p.10-19, 2013.
- MORTENSEN, A. Carotenoids and other pigments as natural colorants. **Pure and Applied Chemistry**, v. 78, n. 8, p. 1477-1491, 2006.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 63, p. 45-55, 1983.
- NAGATANI, T.; SAITO S; SATO, M.; YAMADA, M. Development of an ultra high-resolution scanning electron microscope by means of a field emission source and in-lens system. **Scanning Microscopy**. v.11, p. 901 - 909, 1987.
- NAIME, A. A. **ESTUDO DA NEUROTOXICIDADE INDUZIDA PELO CLORPIRIFÓS E SEU METABÓLITO OXON EM CÉLULAS HT22**. 102 p. Dissertação (Mestrado) - Curso de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.
- NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE (Estados Unidos) (Ed.). **Official website of the United States National Nanotechnology Initiative**. 2019.
- NEETHIRAJAN, S.; JAYAS, D. S. Nanotechnology for the food and bioprocessing industries. **Food Bioprocess Technology**, v. 28, n.1, p. 39-47, 2011.
- NI, J. *et al.* The Neuroprotective Effects of Brazilian Green Propolis on Neurodegenerative Damage in Human Neuronal SH-SY5Y Cells. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, v. 2017, p.1-13, 2017.
- OLIVEIRA, C. F.F. *et al.* Combined Effect of High-Pressure and Conventional Heating on Pectin Extraction from Passion Fruit Peel. **Food And Bioprocess Technology**, v. 9, n. 6, p.1021-1030, 2016.
- OLIVEIRA, D. K. B. **Aplicação e aceitabilidade da farinha da casca do maracujá amarelo (Passiflora Edulis) na alimentação de um grupo de idosos**. 2016. 82 p. Dissertação (Mestrado) - Curso de Gerontologia, Escola de Saúde e Medicina, Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2016.
- OLIVEIRA, E. N. A. *et al.* OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MARGARINA CONVENCIONAL E LIGHT À BASE DE ÓLEO DE PEQUI. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 1-12, 31 dez. 2011.
- OUSJI, O; SLENO, L. Identification of In Vitro Metabolites of Synthetic Phenolic Antioxidants BHT, BHA, and TBHQ by LC-HRMS/MS. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 24, p. 95-25, 2020.
- Pectina: Propriedades e aplicações**. Food Ingredients, v. 380, n. 29, 2014. Disponível em: <http://www.revista-fi.com/materias/83.pdf>. Acesso em: 12 de agosto de 2019.

PRIETO, C; CALVO, L. The encapsulation of low viscosity omega-3 rich fish oil in polycaprolactone by supercritical fluid extraction of emulsions. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 128, p.227-234, 2017.

PRADHAN, N. *et al.* Facets of Nanotechnology as Seen in Food Processing, Packaging, and Preservation Industry. **Biomed Research International**, v. 2015, p.1-17, 2015.

PRADO, P. A. F. **Avaliação do possível efeito dual (antioxidante e/ou próoxidante) e ação neuroprotetora do ebselen, ácido caféico e memantina em células neurais (Neuro-2a) *in vitro*.** 112 p. Dissertação (Mestrado em Neurociências) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

PRAKASH, A. *et al.* Essential oil based nanoemulsions to improve the microbial quality of minimally processed fruits and vegetables: A review. **Food Research International**, v. 111, p.509-523, 2018.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, p. 755 – 760, 2006.

RIBEIRO, D. *et al.* Antioxidant and pro-oxidant activities of carotenoids and their oxidation products. **Food and Chemical Toxicology**, v. 120, p.681-699, 2018.

RICAURTE, L. *et al.* Production of high-oleic palm oil nanoemulsions by high-shear homogenization (microfluidization). **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 35, p.75-85, 2016.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; **A guide to carotenoid analysis in foods**, Ilsi: Washington, 2001.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; KIMURA, M.; GODOY, H.T., AMAYA-FARFAN, J. Updated brazilian database on food carotenoids: Factors affecting carotenoid composition. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 445– 463, 2008.

ROGERO, S. O. *et al.* Teste *in vitro* de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317 – 320, 2003.

ROSA, R., *et al.* Properties of ryanodine receptors in cultured cerebellar granule neurons: effects of hexachlorocyclohexane isomers and calcium. **Journal of Neuroscience Research**, v. 47, p. 27-33, 1997.

RUFINO, M. S. M. *et al.* Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS +. Fortaleza: EMBRAPA, 2007.

SALVI, A. *et al.* Protective Effect of Tempol on Buthionine Sulfoximine-Induced Mitochondrial Impairment in Hippocampal Derived HT22 Cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p.1-8, 2016.

SANGUANSRI, P; AUGUSTIN, M. Nanoscale materials development – a food industry perspective. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 10, p. 547–556, 2006.

SANTOS, H. S. *et al.* A terapia nutricional com vitaminas antioxidantes e o tratamento quimioterápico oncológico. **Rev Bras de Canc**, v. 19, n.01, p.23-28, 2010.

SANTOS, P. A., CALIARI, M., JUNIOR, M. S. S., VIANA, L. F., &LEITE, N. D. Whey Powder, Broken Rice Grains and Passion Fruit Peel Flour in Extruded Breakfast Cereals: Physical, Chemical and Functional Characteristics. **Food Science and Technology Research**, v. 21, p. 317-325, 2015.

SCHULZ, M. *et al.* Neuroprotective effect of juçara (*Euterpe edulis Martius*) fruits extracts against glutamate-induced oxytosis in HT22 hippocampal cells. **Food Research International**, v. 120, p.114-123, 2019.

SEAGRI – Secretaria da Agricultura, Pecuária, Irrigação, Pesca e Aquicultura, 1999. Disponível em: <http://www.seagri.ba.gov.br/dende.htm>. Acesso em: 03 de março de 2019.

SEDAP. **Dendê**. Secretaria de Estado de Desenvolvimento Agropecuário e da Pesca. Governo do Pará. Disponível em: <http://www.sedap.pa.gov.br/content/dend%C3%AA>. Acesso em 28 de fevereiro de 2021.

SELLERS, K. *et al.* **Grouping Nanomaterials, A Strategy toward Grouping and Read-across, RIVM Report 2015-0061. National Institute for Public Health and the Environment.** Ministry of Health, Welfare and Sport, Netherlands, 2015.

SHIM, S; KWON, J. Effects of [6]-shogaol on cholinergic signaling in HT22 cells following neuronal damage induced by hydrogen peroxide. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 5, p.1454-1459, 2012.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p.94-103, 1999.

SILVA-BUZANELLO. **Nanoencapsulação de curcumina em polímeros biodegradáveis/biocompatíveis**. 110f. Dissertação. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2013.

SILVA, E. C. O. *et al.* Obtenção e caracterização da farinha do albedo de maracujá (*Passiflora edulis* f. *Flavicarpa*) para uso alimentício. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 11, n. 3, p.69-74, 2016.

SOPPIMATH, K. S. *et al.* Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, n. 1-2, p.1-20, 2001.

SOUZA, F. G.; BARBOSA, F. F; RODRIGUES, F. M. Evaluation of tamarind jelly without pectin and pectin from the albedo of yellow passion fruit. **Journal of Bioenergy and Food Science**, v. 3, n. 2, p.78-88, 2016.

STELL, C. J; BLOCK, J. M.; BARRERA-ARRELLANO, D. Oxidación de lípidos. In: BLOCK, J. M.; BARRERA-ARRELLANO, D (org.). **Temas selectos en aceites y grasas**. São Paulo: Blucher, Cap. 2. v. 2, p. 37-56, 2012.

SVETLICHNY, G. *et al.* Solid lipid nanoparticles containing copaiba oil and allantoin: development and role of nanoencapsulation on the antifungal activity. **Pharmazie**, n. 3, p.155-164, 2015.

TYLER, L.C. FDA Issues Draft Guidance on Use of Nanotechnology in Food and Food Packaging. **Nanotechnol. Law Bus.** V.9, p. 149-155, 2012.

VATER, C. *et al.* Cytotoxicity of lecithin-based nanoemulsions on human skin cells and ex vivo skin permeation: Comparison to conventional surfactant types. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 566, p.383-390, 2019.

VERMA, A; STELLACCI, F. Effect of Surface Properties on Nanoparticle-Cell Interactions. **Small**, v. 6, n. 1, p.12-21, 2010.

WAGONER, T. B.; FOEGEDING, E. A. Whey protein-pectin soluble complexes for beverage applications. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p.130-138, 2017.

YANG, E; SONG, K. Andrographolide, a major component of *Andrographis paniculata* leaves, has the neuroprotective effects on glutamate-induced HT22 cell death. **Journal of Functional Foods**, v. 9, p.162-172, 2014.

YANG, J; CIFTCI, O. N. Encapsulation of fish oil into hollow solid lipid micro- and nanoparticles using carbon dioxide. **Food Chemistry**, v. 231, p.105-113, 2017.

YI, J., LAM, T. I., YOKOYAMA, W., CHENG, L. W.; ZHONG, F. Cellular uptake of β -carotene from protein stabilized solid lipid nanoparticles prepared by homogenization-evaporation method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 5, p. 1096–1104, 2014.

ZARAGOZA, M. I. Z., Silva, E. M., Cortez, E. G., Tostado, E. C., Guerrero, D. Q. Optimization of nanocapsules preparation by the emulsion diffusion method for food applications. *Food Science and Technology*. V. 44, p. 1362-1368, 2011.

ZHANG, L; KOSARAJU, S. L. Biopolymeric delivery system for controlled release of polyphenolic antioxidants. **European Polymer Journal**, v. 43, n. 7, p.2956-2966, 2007.

ZERAIK, M.L. YARIWAKE, J.H. Quantification of isoorientin and total flavonoids in *Passiflora edulis* fruit pulp by HPLC-UV/DAD. **Microchemical Journal**, v. 96, p.86–91, 2010.

ZERAIK, M.L. *et al.* Analysis of passion fruit rinds (*Passiflora edulis*): isoorientin quantification by HPTLC and evaluation of antioxidant (radical scavenging) capacity. **Química Nova**, v.35, p.541-545, 2011.