



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**ENCAPSULAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE LARANJA EM NANOPARTÍCULAS
DE QUITOSANA: DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE
IN VITRO DO PRODUTO FINAL**

ANTÔNIO MATIAS NAVARRETE DE TOLEDO

Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em
Engenharia e Ciência de
Alimentos

Prof^ª Dr^ª LEONOR ALMEIDA DE SOUZA SOARES
Orientadora

RIO GRANDE, RS

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**ENCAPSULAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE LARANJA EM NANOPARTÍCULAS
DE QUITOSANA: DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE
IN VITRO DO PRODUTO FINAL**

ANTÔNIO MATIAS NAVARRETE DE TOLEDO

Engenheiro de Alimentos

Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em
Engenharia e Ciência de
Alimentos

Prof^ª Dr^ª LEONOR ALMEIDA DE SOUZA SOARES
Orientadora

RIO GRANDE, RS

2015

Catálogo na fonte:

Bibliotecária Camila Oliveira Cruz – CRB 10/2005

Toledo, Antonio Matias Navarrete de.

Encapsulação do óleo essencial de laranja em nanopartículas de quitosana: desenvolvimento e avaliação da citotoxicidade in vitro do produto final / Antonio Matias Navarrete de Toledo. – Rio Grande, RS, Brasil, 2015.

64 f. : il.

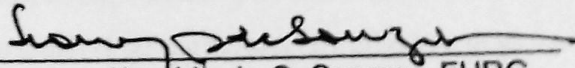
Orientador: Leonor Almeida de Souza.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande, Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos.

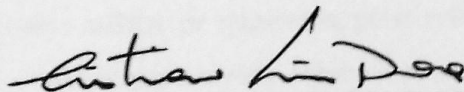
1. Quitosana. 2. Nanopartículas. 3. Citotoxicidade. 4 Encapsulação. 5. Óleo essencial de laranja. 6. Zebrafish. I. Souza, Leonor Almeida de.. II. Universidade Federal do Rio Grande - Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. III. Título.

APROVAÇÃO

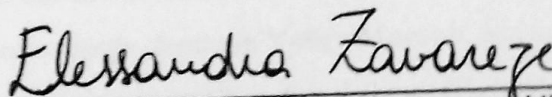
Dissertação defendida por Antônio Matias Navarrete e aprovada em 23 de fevereiro de 2015, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:



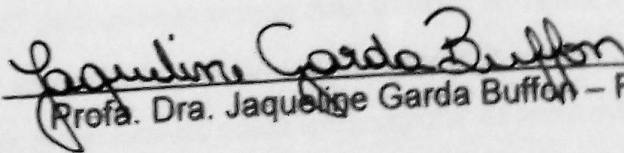
Profa. Dra. Leonor Almeida de S. Soares - FURG



Profa. Dra. Cristiana Lima Dora - FURG



Profa. Dra. Elessandra da R. Zavareze - UFPEL



Profa. Dra. Jaqueline Garda Buffon - FURG

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** por ter me concedido esta jornada repleta de lições, cada dia vivido é uma lição aprendida.

Agradeço **minha família**, minha maior torcida desde sempre, meu porto seguro. Vocês são como um alicerce que me sustenta, onde consigo força e coragem. Obrigado!

Agradeço a **Profª Leonor** pelo aceite em minha orientação, pela paciência, pelas lições que tive contigo, não somente no campo da ciência. Obrigado pelo exemplo de vida, professora!

Agradeço imensamente a **Profª Ana Votto** por participar ativamente deste projeto, pela confiança em meu potencial desde o início, pelo entusiasmo em transmitir conhecimento.

Profª, foi uma experiência incrível ter participado do grupo de pesquisa do Laboratório de Cultivo Celular da FURG.

Agradeço a **Profª Cristiana Dora** pela ajuda na construção deste trabalho, desde a época da qualificação.

Agradeço a **Profª Eliana Furlong**, por estar sempre presente em nossa rotina laboratorial, pelas valiosas lições sobre análise de alimentos, pelas reflexões acerca da vida, da ciência, e da ciência na vida. Minha eterna admiração.

Agradeço a **Profª Jacqueline Buffon**, pelas colaborações em minha pesquisa, pela presença motivadora no laboratório, pelo exemplo da nova geração de professores.

Agradeço imensamente ao **Professor João Henrique Zimnoch** do Instituto de Química da UFRGS que aceitou em colaborar com as análises deste trabalho e me apresentou mais que uma colaboradora, uma amiga chamada **Yolice Moreno**, pesquisadora da UFRGS, com uma boa vontade raramente encontrada nos dias de hoje. Obrigado Yolice pelas análises, pela ajuda, por elevar este trabalho a um patamar superior.

Agradeço a **todos os integrantes do Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos** nos anos de 2013-2014: Cada bom dia, cada palavra de conforto, cada conselho e cada lição aprendida estarão guardados em minhas lembranças!!

Um “VIVA!” para minhas amigas **Ana Feltrin, Adriana Machado e Raquel de Oliveira**, mais do que amizade, foram pessoas fundamentais em todo meu processo de aprendizagem, de evolução, me aceitaram como amigo apesar de meus defeitos como ser humano. Vocês moram em meu coração, vocês são parte deste trabalho concretizado.

Agradeço imensamente todo o pessoal do Laboratório de Cultivo Celular, em especial as pesquisadoras **Priscila Antikeira, Fernanda Lopes, Aline Lettnin, Renata Vasconcelos**, o técnico e amigo de muitos anos, **Márcio de Oliveira**, e as professoras **Daza Moraes e Marta**

de Souza. Foram anos de um tema fascinante que eu espero ter oportunidade de algum dia trabalhar novamente.

Agradeço minhas amigas **Nivia Streit, Daniela Nogueira, Bibiana da Silva, Kelly Massarolo, Sabrina Garcia, Rosana Kraus, Vanessa Amaral, Luciana Prietto, Renata Heidtmann e Maria de Jesus (Dízus)** pela presença alegre em minha rotina, pelos abraços, pelos sorrisos. Fizeram meu caminho mais feliz.

Agradeço meu amigo de todas as horas **Carlos Alam**, pela lealdade, pela parceria, pelos conselhos, pela amizade sincera, pela presença nos momentos bons e ruins.

Agradeço o **CEME-SUL da FURG** por me receber sempre tão bem nas suas dependências, pelas lições sobre microscopia, pelas análises de MEV deste trabalho, pelo mate nos dias de inverno rigoroso. Obrigado **Rudi, Érica, Louise, Meritaine e Michele!**

Agradeço a amiga e secretária do PPG em Engenharia e Ciência de Alimentos, **Islanda Passos**, uma pessoa com um alto astral contagiante, uma pessoa maravilhosa, com quem eu sempre pude contar. Obrigado Islanda por fazer o EQA brilhar mais.

Agradeço o apoio financeiro da **FAPERGS** através do Processo:

2485.271.13638.270202013- PVSRS.

Agradeço a **FURG** como um todo, por ser esta instituição organizada, promissora, que sempre cresce, tenho orgulho de ser egresso desta grande universidade.

Dedico este trabalho a meus queridos irmãos que sempre se fazem presentes durante minha jornada: Ricardo, Livia e Laura.

Como a gente mede o tempo? E como determinar o tempo correto para que uma pessoa alcance o sucesso? Não existe um tempo certo. Na verdade, o tempo é de cada um.

Prof^a Eliana Badiale Furlong

RESUMO

Nanopartículas de quitosana já são empregadas na área farmacêutica em sistema de liberação controlada de fármacos. Na área de alimentos, estas nanopartículas são de grande interesse em processos de encapsulação, por promoverem a proteção de um núcleo instável às condições do processamento e armazenamento e, simultaneamente, contribuir com a melhora na absorção de nutrientes e na textura do alimento. Entre os compostos de interesse em nanoencapsulação está o óleo essencial de laranja, que possui potencialidades na tecnologia de alimentos, porém, é altamente suscetível à oxidação. Apesar das inúmeras vantagens da aplicação de nanopartículas em alimentos, seu avanço esbarra em questões de toxicidade. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi preparar e caracterizar nanopartículas de quitosana contendo óleo essencial de laranja e avaliar seu potencial citotóxico *in vitro* utilizando hepatócitos de zebrafish. Primeiramente foi realizado um estudo sobre nanopartículas de quitosana preparadas pelo método de geleificação iônica utilizando-se como poliânions tripolifosfato de sódio e lecitina de soja. As nanopartículas de quitosana obtidas por quatro formulações distintas se mostraram monodispersas e nanométricas, com valores de tamanho médio variando entre 587,5 e 814,05 nm. O potencial zeta das nanopartículas variou entre 15,6 mV e 30,7mV. As análises de MEV para liofilizados destas suspensões mostraram que estas possuem formato folhoso, poroso e com pouca rugosidade. A encapsulação do óleo essencial de laranja foi realizada em três ensaios, onde se variou a proporção entre núcleo e material de parede. Menores quantidades adicionadas de núcleo (óleo essencial de laranja), promovem tamanhos nanométricos variando entre 801,95 nm à 895,1 nm. As eficiências de encapsulação variaram entre 61,05% à 99,32% e também são afetadas pela quantidade de núcleo. A incorporação do óleo essencial de laranja pelas nanopartículas de quitosana afetou positivamente os parâmetros físico-químicos, promovendo estabilidade coloidal às suspensões e saturando sua morfologia, indicando que o núcleo estava adsorvido na superfície das partículas, caracterizando estes nanoencapsulados como nanoesferas. A etapa de citotoxicidade *in vitro* foi realizada para o solvente ácido acético, para as nanopartículas de quitosana e para nanoencapsulados de óleo essencial. Foi constatada a citotoxicidade de soluções de ácido acético com concentrações a partir de 0,04 mM. Foi verificado que nanopartículas de quitosana e nanoencapsulados de óleo essencial de laranja, em faixa de concentrações que variaram entre 0,1 µg/mL e 100 µg/mL, não são citotóxicos para hepatócitos de zebrafish em um tempo de exposição de até 72h.

Palavras-chave: quitosana; nanopartículas; citotoxicidade; encapsulação; óleo essencial de laranja; zebrafish.

ABSTRACT

Encapsulation of orange essential oil in chitosan nanoparticles: Development and *in vitro* cytotoxicity evaluation of final product.

Chitosan nanoparticles have been extensively used in the pharmaceutical field for controlled release of pharmaceutical ingredients. In the food technology industry, these nanoparticles have received increasing attention in the encapsulation processes because of their protective effect of an unstable nucleus into the processing and storage conditions, at the same time that improving the absorption of nutrients and food texture. Among the numerous effective compounds for nanoencapsulation, the orange essential oil has high potential in food technology, although it is susceptible to oxidation. Despite the potential benefits that nanotechnology could bring to the food, its progress is often hampered by toxicity issues. This way, this article aims to prepare and characterize nanocapsules with orange essential oil, as well evaluate their cytotoxic potential *in vitro* using zebrafish hepatocytes. The study was initially conducted with chitosan nanoparticles prepared by a method based on ionic gelation using as polyanions sodium tripolyphosphate and soya lecithin. Chitosan nanoparticles were obtained from four different formulations and showed nanometric and monodisperse distribution, with an average size ranged 587 nm to 814.05 nm. The Zeta potential values of chitosan nanoparticles range between 15.6 mV and 30.7 mV. Analysis of suspensions by scanning electron microscopy (SEM) for lyophilisates demonstrated that the nanoparticles appeared 'leaf-like', porous and low roughness. For the encapsulation of orange essential oil, were performed three trials with variations in the ratio between nucleus and the wall material. When smaller amounts of nucleus were added (orange essential oil), it was demonstrated that promotes changes in nanometric size, with range from 801 nm to 895.1 nm. Values obtained for the encapsulation efficiency ranged from 61.05-99.32% and were also affected by the amount of the nucleus. It was shown that by incorporation of orange essential oil in chitosan nanoparticles had a positive affect the physical and chemical parameters, giving colloidal stability to suspensions and changing their morphology for higher saturation. Both features indicate the nucleus was adsorbed on the surface of particles, been allowed call these nanocapsules as nanospheres. *In vitro* evaluation of cytotoxicity assays were performed using solvent acetic acid, chitosan nanoparticles and orange essential oil nanocapsules. Solutions containing acetic acid concentrations above 0.04mM, cytotoxicity was observed. For chitosan nanoparticles and orange essential oil nanocapsules, concentrations that ranged between 0.1 µg/mL and 100 µg/mL were not considered cytotoxic to zebrafish hepatocytes during an exposure time up to 72 hours.

Keywords: chitosan; nanoparticles; cytotoxicity; encapsulation; orange essential oil; zebrafish.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Componentes presentes nas formulações de nanopartículas de quitosana.....	32
Tabela 2 – Componentes presentes nas formulações de encapsulados de óleo essencial de laranja.....	34
Tabela 3 - Tamanho médio e índice de polidispersão de nanopartículas de quitosana.....	38
Tabela 4 – Potencial zeta de nanopartículas de quitosana.....	41
Tabela 5 - Tamanho médio e índice de polidispersão de nanopartículas brancas (F1) e contendo óleo essencial de laranja em diferentes quantidades.....	44
Tabela 6 – Potencial zeta de nanopartículas brancas (F1) e contendo óleo essencial de laranja em diferentes quantidades.....	45
Tabela7 -Eficiência das formulações de encapsulados de óleo essencial de laranja.....	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática do Potencial Zeta.....	17
Figura 2 – Representação das estruturas primárias de quitina e quitosana onde n é o grau de polimerização.....	21
Figura 3 – Esquema de obtenção de nanopartículas pelo método de geleificação iônica.....	22
Figura 4 – Estrutura molecular do limoneno, componente majoritário do óleo essencial de laranja.....	25
Figura 5 – Propriedades físico-químicas de nanopartículas que podem influenciar sua biocompatibilidade.....	26
Figura 6 – Redução do MTT pelas enzimas mitocondriais à formazan.....	28
Figura 7 – Hepatócitos de D.rerio aderidos em garrafas de cultura.....	30
Figura 8 – Preparo de nanopartículas de quitosana pelo método de geleificação iônica.....	32
Figura 9 – Garrafas de cultura contendo células da linhagem ZFL.....	35
Figura 10 – Gráficos da distribuição de tamanho das formulações de nanopartículas de quitosana.....	40
Figura 11 – Morfologia de liofilizados das formulações de nanopartículas de quitosana. Aumento de 500X.....	42
Figura 12 - Morfologia de liofilizados das formulações de nanopartículas de quitosana. Aumento de 2000X.....	42
Figura 13 – Morfologia de encapsulados produzidos por liofilização. Aumento de 50X.....	46
Figura 14 - Morfologia de encapsulados produzidos por liofilização. Aumento de 2000X.....	47
Figura 15 - Resultados de viabilidade celular em função dos tratamentos realizados com diferentes concentrações de ácido acético.....	49
Figura 16 - Resultados de viabilidade celular em função dos tratamentos realizados com diferentes concentrações de nanopartículas de quitosana.....	51
Figura 17 - Resultados de viabilidade celular em função dos tratamentos realizados com diferentes concentrações de nanopartículas de quitosana contendo óleo essência de laranja.....	53

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. Objetivo geral.....	17
2.2. Objetivos Específicos.....	18
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	18
3.1. Nanociência e Nanotecnologia.....	18
3.1.1. Nanotecnologia em Alimentos.....	19
3.2. Caracterização físico-química de nanopartículas.....	19
3.2.1. Tamanho médio de partícula.....	19
3.2.2. Potencial Zeta.....	20
3.2.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	21
3.3. Encapsulação de compostos ativos.....	22
3.4. Quitosana.....	24
3.4.1. Nanopartículas de quitosana.....	25
3.5. Lecitina de soja.....	27
3.6. Óleo essencial de laranja (<i>Citrus sinensis</i>).....	28
3.7. Toxicologia de Nanopartículas.....	29
3.7.2. <i>Danio rerio</i>	33
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1. Material.....	34
4.2. Estratégia experimental.....	35
4.3. Métodos.....	35
4.3.1. Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana.....	35
4.3.2. Desenvolvimento de encapsulados de óleo essencial de laranja.....	37
4.3.3. Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i>	39
4.3.4. Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> do solvente ácido acético.....	39
4.3.5. Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> de nanopartículas de quitosana.....	41
4.3.6. Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> de nanopartículas de quitosana contendo óleo essencial de laranja.....	41
4.3.7. Análise estatística.....	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1. Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana.....	42
5.1.1. Caracterização físico-química de nanopartículas de quitosana.....	42
5.2. Desenvolvimento de encapsulados de óleo essencial de laranja.....	48
5.2.1. Caracterização físico-química de encapsulados de óleo essencial de laranja.....	48
5.2.2. Eficiência de Encapsulação.....	51
5.3. Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i>	52
5.3.1. Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> do solvente ácido acético.....	52
5.3.2. Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> de nanopartículas de quitosana.....	54
5.3.3. Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> de nanopartículas de quitosana contendo óleo essencial de laranja.....	56
6. CONCLUSÕES.....	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

1. INTRODUÇÃO

O conceito de nanotecnologia surgiu quando o físico norte-americano Richard Philips Feynman, em sua conferência proferida em 1959 no Instituto de Tecnologia da Califórnia – EUA propôs que os materiais pudessem ser obtidos e trabalhados em escala atômica. Mais tarde, nos anos de 1980, a construção de microscópios de alta resolução permitiu que a ciência, especialmente a química, pudesse desenvolver trabalhos na área da nanociência e, entre a última década do século vinte até o presente, diversos progressos foram realizados. Estruturas nesta escala apresentam propriedades funcionais únicas que não são encontradas na escala macro. Nesse sentido, nanotecnologias em eletrônica, informática, fármacos, cosméticos, agroquímica, entre outros, vem sendo disponibilizados (SARGENTELI, 2012; SAHOO, PARVEEN, PANDA, 2007; CHAU, WU, YEN, 2007; MELO, PIMENTA, 2004).

Dentre os temas desenvolvidos em nanotecnologia estão os processos de encapsulação. Estes podem ser definidos como o processo de empacotamento de materiais em carreadores extremamente pequenos, os quais podem liberar seu conteúdo de forma controlada e sob condições específicas. Essa técnica tem solucionado limitações no emprego de ingredientes alimentícios, visto que pode suprimir ou atenuar sabores e odores indesejáveis, reduzir a volatilidade e a reatividade e aumentar a estabilidade destes em condições ambientais adversas, como na presença de luz, oxigênio e pH extremos (REBELLO, 2009).

Os óleos essenciais podem ser encontrados em todo tecido vivo de plantas, geralmente concentrados nas cascas, folhas, caules, raízes, flores, rizoma e nas sementes (GOMES et al., 2010) e se originam do metabolismo secundário de plantas aromáticas. O óleo essencial obtido a partir de cítricos é uma mistura de hidrocarbonetos do grupo de terpenos e sesquiterpenos, também a partir de compostos oxigenados como aldeídos, cetonas, ácidos, ésteres, éteres, fenóis, lactonas e pequenas quantidades de parafinas e ceras. Estes se oxidam facilmente na presença do ar, luz e umidade, e os compostos resultantes desta oxidação contribuem para a rancificação dos produtos que o possuem em sua formulação (ARAÚJO, J., 1999), por estes fatores torna-se importante a encapsulação destes compostos.

O Brasil tem lugar de destaque na produção de óleos essenciais, ao lado da Índia, China e Indonésia, que são considerados os quatro grandes produtores mundiais. A posição do Brasil deve-se aos óleos essenciais obtidos de cítricos, sendo estes subprodutos da indústria de sucos (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009). Assim, é de grande interesse a proteção deste

composto químico pelo processo de encapsulação (ASCHEI; MARQUEZ; MARTUCCI, 2003; ARAÚJO, J., 1999).

Um dos polímeros utilizados como material de parede em processos de encapsulação é a quitosana. A descoberta da quitosana data do século XIX, no entanto, somente nas últimas duas décadas a importância deste polímero tem crescido significativamente, em função deste ser proveniente de uma fonte renovável e biodegradável, sua utilização também apresenta um recente aumento no conhecimento da sua funcionalidade nas aplicações tecnológicas e biomédicas. A quitosana é um polissacarídeo de cadeia linear constituída, quase que exclusivamente, por unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosas unidas por ligações $\beta(1\rightarrow4)$ (SILVA, H.; SANTOS; FERREIRA, 2006; TAVARES, 2011; LARANJEIRA; FÁVERE, 2009).

As nanopartículas de quitosana já são bastante estudadas na área farmacêutica como sistemas carreadores de fármacos, resultado de processos de encapsulação. As principais vantagens de se utilizar nanopartículas de quitosana são a sua simplicidade e baixo custo de preparação, não necessitando de calor e solventes orgânicos; são reprodutíveis e estáveis; aplicáveis a uma grande categoria de substâncias: moléculas pequenas, proteínas e polinucleotídeos (TYIBOONCHAI, 2003).

Apesar das inúmeras vantagens da utilização das nanopartículas, seu uso em alimentos esbarra na falta de estudos sobre sua citotoxicidade. Dependente da matéria-prima que se origina, como metais pesados, nanopartículas podem ser citotóxicas, gerando espécies reativas de oxigênio e estas estresse oxidativo, o que leva à mudanças na permeabilidade de membrana, danos à proteínas e DNA, entre outros malefícios (SILVA, A., 2011; ROY et al., 2013).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento, a caracterização físico-química e a avaliação do potencial citotóxico de nanopartículas de quitosana contendo óleo essencial de laranja em hepatócitos de zebrafish (*Danio rerio*).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolver, caracterizar e avaliar o potencial citotóxico de nanopartículas de quitosana contendo óleo essencial de laranja em cultivo de hepatócitos de zebrafish (*Danio rerio*).

2.2. Objetivos Específicos

- Obter nanopartículas de quitosana pelo método de geleificação iônica;
- Avaliar estrutura morfológica, estabilidade coloidal e o tamanho médio de nanopartículas de quitosana brancas;
- Promover encapsulação do óleo essencial de laranja em nanopartículas de quitosana e caracterizar estes encapsulados com relação à suas características físico-químicas e sua morfologia;
- Avaliar o potencial citotóxico de nanopartículas de quitosana brancas e nanopartículas de quitosana contendo óleo essencial de laranja através de ensaios *in vitro* com células da linhagem ZFL;

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Nanociência e Nanotecnologia

Os termos nanociência e nanotecnologia se referem, respectivamente, ao estudo e às aplicações tecnológicas de objetos e dispositivos que tenham ao menos uma de suas dimensões físicas menores que, ou da ordem de, algumas dezenas de nanômetros (MELO; PIMENTA, 2004). A nanotecnologia abarca uma série de diferentes tecnologias baseadas na manipulação da matéria em escala nanométrica. Um nanômetro equivale a um bilionésimo do metro (FOLADORI; INVERNIZZI, 2008).

Os conceitos sobre a matéria em escala nanométrica deram início com o físico americano Richard Feynman, ao fim da década de cinquenta. Feynman discorreu sobre como os cientistas poderiam manipular e controlar átomos individuais e moléculas. Uma década após, o Professor Norio Taniguchi cunhou o termo nanotecnologia, porém, esta área teve seu desenvolvimento efetivo somente a partir de 1981, com a descoberta do microscópio de varredura por tunelamento (FERREIRA; RANGEL, 2009).

A nanotecnologia possui aspectos que podem contribuir em significativos avanços em diversos setores, como a indústria química, têxtil e automobilística. A matéria em escala nanométrica tem suas propriedades físicas e químicas modificadas, podendo, por exemplo, aumentar a absorção de nutrientes pelo organismo. Estas novas propriedades podem ser manipuladas para a fabricação de produtos com múltiplas funções, que possam interagir de maneira inteligente com o meio onde estarão (FOLADORI; INVERNIZZI, 2008).

Considerada a tecnologia-chave do século XXI, a nanotecnologia tem grande potencial de vendas. Através dela será possível produzir medicamentos mais eficazes,

materiais mais resistentes, computadores com maior capacidade de armazenamento, além de acarretar benefícios socioambientais (BRASIL, 2010).

3.1.1. Nanotecnologia em Alimentos

A nanotecnologia tem potencial para revolucionar a área de alimentos como sistemas de segurança alimentar, entrega inteligente de nutrientes, marcadores para biologia celular e molecular, sensores para a detecção de patogênicos e pesticidas, materiais para embalagens e proteção contra vírus. Estes são exemplos do importante impacto que a nanotecnologia pode dar na ciência e engenharia de alimentos (BOUWMEESTER et al., 2009; MORARU et al., 2003).

As quatro maiores áreas na indústria de alimentos que provavelmente serão beneficiadas com a nanotecnologia serão o desenvolvimento de novos materiais funcionais; micro e nano processamento; desenvolvimento de novos produtos e métodos e instrumentação para segurança alimentar e biossegurança (MORARU et al., 2003). As recentes pesquisas em nanotecnologia no setor produtivo agro-alimentar estão focadas no desenvolvimento de ingredientes e aditivos em tamanho nanométrico, sistemas de liberação controlada de compostos bioativos e embalagens funcionais para alimentos (CHAUDHRY et al., 2008).

Nanopartículas já são utilizadas na indústria de alimentos como aditivos e suplementos alimentares (nanopartículas de ZnO) e em refrigeradores (nanopartículas de prata) como revestimento antimicrobiano (BOUWMEESTER et al., 2009).

3.2. Caracterização físico-química de nanopartículas

3.2.1. Tamanho médio de partícula

No desenvolvimento de nanotecnologia, tão importante quanto o desenvolvimento de novos métodos de preparo são as análises de caracterização físico-química destes sistemas nanométricos. Fatores como tamanho, forma, composição, carga elétrica superficial, cor, atividade catalítica e estabilidade são dados cruciais que determinam se os objetivos estabelecidos para aquela síntese foram alcançados.

Entre as determinações fundamentais na compreensão dos materiais nanométricos está o tamanho médio de nanopartículas. É com o tamanho nanométrico que se obtém uma grande área superficial e, conseqüentemente, propriedades diferenciadas em relação ao material em escala macro (BRUST e KIELY, 2002). Entre as principais técnicas utilizadas para a determinação deste parâmetro pode-se citar o espalhamento de luz dinâmico (DLS), a espectroscopia e microscopia eletrônicas.

A determinação de tamanho médio e distribuição de partículas pela técnica de espalhamento de luz dinâmico são regulamentadas pela ISO 13321 (MALVERN, 2014a). Esta técnica, por vezes referida como espectroscopia de correlação de fótons ou espalhamento de luz quasi-elástica, é uma técnica classicamente utilizada para a medição do tamanho de partículas na região nanométrica, dispersas num líquido. A técnica mensura o movimento Browniano e relaciona-os com o tamanho das partículas. Movimento Browniano é o movimento aleatório das partículas devido ao bombardeamento por moléculas de solvente que as rodeiam. Quanto maior for a partícula ou molécula, mais lento será o movimento Browniano. Partículas menores são mais movimentadas pelas moléculas de solvente e, conseqüentemente, movem-se mais rapidamente (JOHNSON e GABRIEL, 1995).

A velocidade do movimento Browniano é definida por uma propriedade conhecida como coeficiente de difusão de translação (definida como G). A partir do conhecimento destes dados, o tamanho hidrodinâmico das nanopartículas é calculado pela equação de Stokes-Einstein (MALVERN, 2014b).

3.2.2. Potencial Zeta

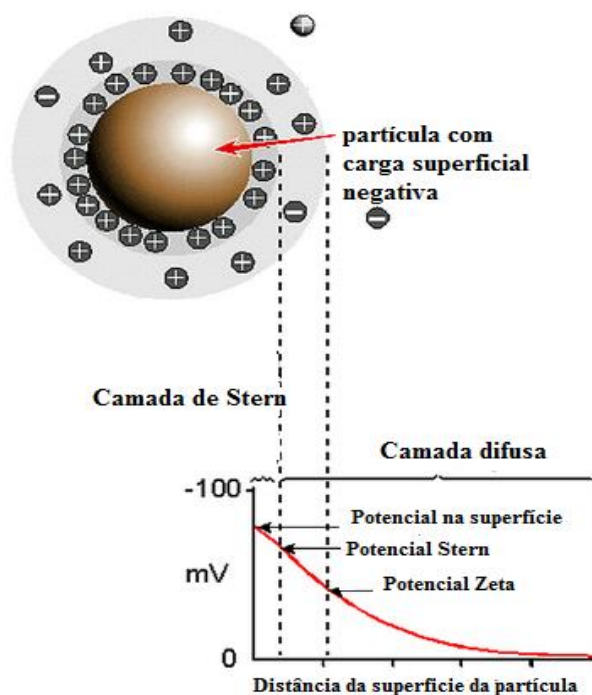
O potencial zeta é uma medida da magnitude da repulsão ou da atração eletrostática ou das cargas entre partículas, sendo um dos parâmetros fundamentais que, sabidamente, afetam a estabilidade. Sua medição oferece uma visão detalhada sobre as causas da dispersão, agregação ou floculação, podendo ser aplicada para melhorar a formulação de dispersões, emulsões e suspensões (MALVERN, 2014c).

O potencial zeta é determinado por mobilidade eletroforética, a qual é determinada por eletroforese. Quando um campo elétrico é aplicado em uma solução contendo eletrólitos, as partículas carregadas em suspensão são atraídas para o eletrodo de carga oposta. Forças viscosas atuam sobre as partículas se opondo a este movimento. Quando o equilíbrio é atingido entre estas duas forças opostas, as partículas movem-se com velocidade constante. Esta velocidade depende da intensidade do campo elétrico, da constante dielétrica do meio, da viscosidade do meio e do potencial zeta. A velocidade de uma partícula em uma unidade de campo elétrico é referida como a sua mobilidade eletroforética, e o potencial zeta está relacionado com este dado (MALVERN, 2014c).

A Figura 1 ilustra o potencial zeta. A camada de líquido que rodeia uma partícula existe em duas partes: uma região interna (camada de Stern), onde os íons são fortemente ligados e uma região externa (difusa), onde são menos firmemente associados. Dentro da

camada difusa, há um limite no qual íons e partículas formam uma entidade estável. Quando uma partícula se move (por exemplo, devido à gravidade), íons dentro deste limite irão se mover. Esses íons se situam na interface e o potencial desta interface (a superfície de cisalhamento hidrodinâmico) é o potencial zeta (MALVERN, 2014c).

Figura 1 – Representação esquemática do potencial zeta



Fonte: Adaptado de MALVERN, 2014.

3.2.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura é um aparelho que pode fornecer rapidamente informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos de uma amostra sólida. Sua utilização é comum em biologia, odontologia, farmácia, engenharia, química, metalurgia, física, medicina e geologia (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007)

O MEV é um dos mais versáteis instrumentos disponíveis para a observação e análise de características microestruturais de objetos sólidos. A principal razão de sua utilidade é a alta resolução que pode ser obtida quando as amostras são observadas: valores da ordem de 2 a 5 nanômetros são geralmente apresentados por instrumentos comerciais, enquanto instrumentos de pesquisa avançada são capazes de alcançar uma resolução melhor que 1 nm (NAGATANI et al. 1987). Outra característica importante do MEV é a aparência tridimensional da imagem das amostras, resultado direto da grande profundidade de campo. Permite, também, o exame em pequenos aumentos e com grande profundidade de foco, o que

é extremamente útil, pois a imagem eletrônica complementa a informação dada pela imagem óptica (DEDAVIDI; GOMES; MACHADO, 2007).

O princípio de um microscópio eletrônico de varredura (MEV) consiste em utilizar um feixe de elétrons de pequeno diâmetro para explorar a superfície da amostra, ponto a ponto, por linhas sucessivas e transmitir o sinal do detector a uma tela catódica cuja varredura está perfeitamente sincronizada com aquela do feixe incidente. Por um sistema de bobinas de deflexão, o feixe pode ser guiado de modo a varrer a superfície da amostra segundo uma malha retangular. O sinal de imagem resulta da interação do feixe incidente com a superfície da amostra. O sinal recolhido pelo detector é utilizado para modular o brilho do monitor, permitindo a observação. A maioria dos instrumentos usa como fonte de elétrons um filamento de tungstênio (W) aquecido, operando numa faixa de tensões de aceleração de 1 a 50 kV. O feixe é acelerado pela alta tensão criada entre o filamento e o ânodo. Ele é, em seguida, focalizado sobre a amostra por uma série de três lentes eletromagnéticas com um spot menor que 4 nm. O feixe interagindo com a amostra produz elétrons e fótons que podem ser coletados por detectores adequados e convertidos em um sinal de vídeo (DEDAVIDI; GOMES; MACHADO, 2007)

Vários autores na literatura utilizaram MEV em estudos de caracterização de sistemas nanométricos, não somente para a avaliação morfológica: Santos-Magalhães e colaboradores (2000), através de MEV, verificaram a presença de uma segunda população de partículas, com cerca de 2 μm de diâmetro, em uma suspensão de nanocápsulas de PLGA, poli(L-ácido láctico-co-ácido-glicólico), após 3 meses da preparação, a qual apresentava diâmetro inicial de 180 ± 52 nm. Costa et al. (2006) descreveram a morfologia de nanopartículas de TiO_2 a partir de micrografias de MEV e com o auxílio destas em programa computacional, determinaram o tamanho médio das nanopartículas. Blanco (2011) comparou por MEV as formas de nanopartículas de quitosana secas por liofilização e pela técnica de *spray-drying*. Blanco pode comparar tamanho, forma e textura das partículas a partir de micrografias de MEV.

3.3. Encapsulação de compostos ativos

O processo de encapsulação foi primeiramente reportado por Todd (1970) que o definiu como sendo a tecnologia de empacotamento com finas coberturas poliméricas aplicáveis em sólidos, gotículas de líquidos ou material gasoso, formando pequenas partículas denominadas microcápsulas, que podem liberar seu conteúdo sob velocidade e condições

específicas. O desenvolvimento da técnica evoluiu ao longo dos anos e hoje o processo de encapsulação é abordado de forma mais ampla, abrangendo uma maior gama de materiais na formação do material de parede e incorporando conceitos de nanotecnologia em suas aplicações, a denominada nanoencapsulação (ASSIS et al., 2012).

De acordo com Gibbs et al. (1999), dois são os componentes que podemos identificar em um encapsulado: O núcleo, material a ser encapsulado, e o encapsulante, material que forma a cápsula protetora. As cápsulas são classificadas, de acordo com o modo de proteção do núcleo, em sistemas reservatórios (cápsulas) e sistemas matriciais (esferas). A diferença entre estes dois sistemas se encontra na localização do núcleo: Em cápsulas o núcleo se encontra envolto e circundado por um filme definido e contínuo do material de parede e em esferas o núcleo é uniformemente disperso em uma matriz sólida (AZEREDO, 2005). Porém, o termo ‘encapsulação’ tem sido usado englobando tanto a formação de cápsulas quanto de esferas (DEYPERE et. al., 2003).

Entre as principais vantagens do uso deste processo encontram-se a proteção de um núcleo instável, conservando suas propriedades como cor, aroma e características nutricionais (AZEREDO, 2005; REBELO, 2009) e a liberação controlada deste núcleo, a partir de determinado evento. A liberação controlada tem inúmeras aplicações na área farmacêutica, no desenvolvimento de drogas que podem ser entregues em um sítio específico de ação. Na área de alimentos, a liberação controlada pode auxiliar no desenvolvimento de processos mais eficazes e econômicos (GARCIA; FORBE; GONZALEZ, 2010; GOMES, 2011).

Já são encontrados na literatura autores desenvolvendo nanoencapsulados com diversos objetivos finais. Gomes (2011) produziu sistemas lipídicos sólidos para a encapsulação de β -caroteno, obtendo bons resultados na preservação deste núcleo. Freitas (2012) nanoencapsulou compostos triazenos, moléculas importantes no tratamento de vários tipos de câncer, em nanopartículas poliméricas, obtendo valores de eficiência de encapsulação acima de 60%. Buzanello (2013) nanoencapsulou curcumina, um corante natural, em nanopartículas poliméricas biocompatíveis. O autor verificou que as cápsulas formadas são do tipo esferas e que o uso de lecitina de soja, um surfatante biocompatível, levou à eficiências de encapsulação superiores em comparação com outros surfactantes como o lauril sulfato de sódio.

3.4. Quitosana

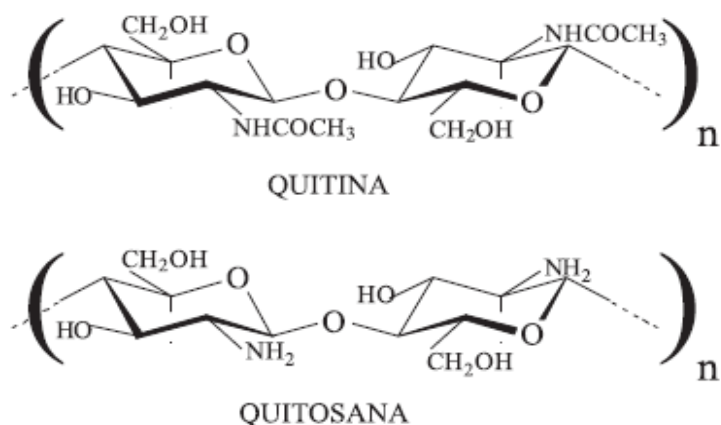
Quitosana é um polímero natural, obtido pela desacetilação alcalina da quitina, um biopolímero encontrado em abundância na natureza, presente nos exoesqueletos de diversos crustáceos, na parede celular de fungos e em outros materiais biológicos. Quitina é o nome usual do biopolímero β -(1-4)-N-acetil-D-glucosamina e é a maior fonte para a obtenção da quitosana. A descoberta da quitosana data do século XIX, porém, somente nas últimas décadas a importância deste polímero tem crescido significativamente em função de ser uma fonte renovável, biodegradável e biocompatível. Há também um recente aumento no conhecimento de sua funcionalidade nas aplicações tecnológicas e biomédicas, além de possuir comprovada atividade antimicrobiana e antifúngica (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009; MOURA et al., 2006; QI et al., 2004).

A quitosana é uma poliamina linear, também considerada uma amina catiônica, que possui grupamentos disponíveis para reações químicas, as quais são atribuídas as propriedades de maior interesse. Tais grupamentos podem adquirir uma carga positiva em presença de soluções ácidas, daí sua capacidade de solubilizar-se em ácidos orgânicos, uma das principais diferenças em relação à quitina. A Figura 2 mostra a diferença estrutural entre quitina e quitosana, sendo a quitosana composta por unidades β - 1,4 D-glucosamina ligadas a resíduos de N-acetilglucosamina (FAI et al, 2008; MOURA et al., 2006).

Dentre as propriedades biológicas da quitosana, a atividade antibacteriana está entre as de maior relevância. Tal propriedade é influenciada por diversos fatores tais como o tipo de quitosana, seu grau de polimerização, pH da solução e algumas outras propriedades físico-químicas. Esta propriedade é mais acentuada contra bactérias Gram-positivas (QI et al., 2004). Este polímero possui grande potencial industrial biomédico já consagrado sendo utilizado também em sistemas de liberação de fármacos, engenharia de tecidos, como analgésico e glicosamina no combate à artrite (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009, SILVA, H. et al., 2006).

A quitosana é extensivamente estudada devido à sua grande gama de propriedades que lhe conferem um aproveitamento bem versátil. No Quadro 2 são exemplificadas algumas de suas funções na indústria de alimentos. No que tange à legislação vigente no país, a ANVISA regulamenta o uso de quitosana como alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde. Sua alegação é de que a quitosana auxilia na redução da absorção de gordura e colesterol e seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis (ANVISA, 2009).

Figura 2 – Representações das estruturas primárias de quitina e quitosana, onde n é o grau de polimerização.



Fonte: Adaptado de BATTISTI; CAMPANA-FILHO, 2008

Dentre as aplicações da quitosana na indústria de alimentos, esta geralmente é utilizada como aditivo orgânico (como conservante, estabilizante e antioxidante), podendo também auxiliar em embalagens ativas (na formação de filmes e aumentando a barreira contra a perda de umidade) e na purificação da água e clarificação de sucos de frutas (FAI et al., 2008).

3.4.1. Nanopartículas de quitosana

Nanopartículas de quitosana são partículas sólidas coloidais com diâmetros na escala nanométrica. Estas são preparadas a partir de macromoléculas e podem ser utilizadas terapêuticamente como um adjuvante em vacinas e carreadores de substâncias, onde o composto ativo está dissolvido, retido, encapsulado, adsorvido ou quimicamente ligado (TIYABOONCHAI, 2003).

Sistemas coloidais, como lipossomas e nanopartículas, já são bastante investigados na área farmacêutica para o controle da liberação de fármacos em sítios de ação específicos, visando a velocidade de cedência e regime de dosagem de substâncias (SCHAFFAZICK; GUTERRES, 2003). As nanopartículas constituídas de polímeros biodegradáveis têm atraído mais atenção dos pesquisadores em relação aos lipossomas, devido às suas potencialidades terapêuticas, a sua maior estabilidade nos fluidos biológicos e durante o armazenamento (SOPPIMATH et al., 2001).

A quitosana por ser mucoadesiva, promove um prolongamento do contato entre o substrato e a membrana celular, e seu tamanho nanométrico facilita a absorção das

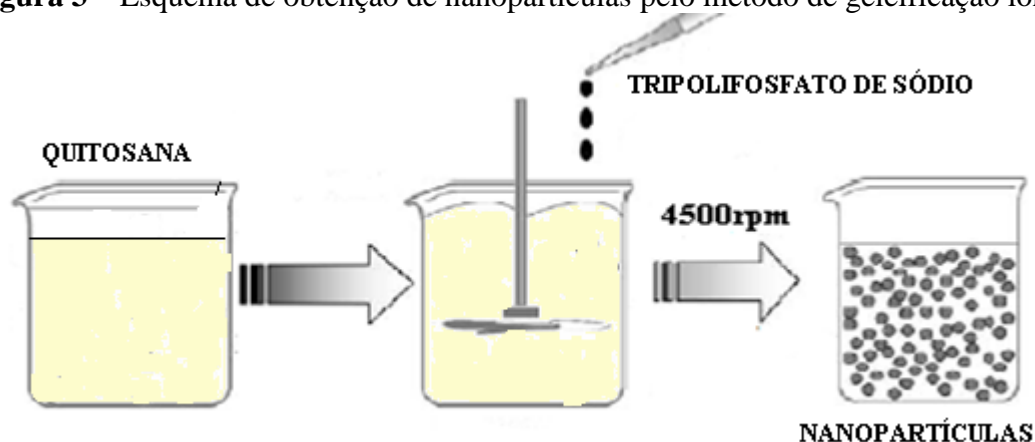
substâncias através da membrana. O polímero quitosana pode ser modificado fisicamente, sendo esta uma de suas vantagens mais interessantes - a sua grande versatilidade em ser preparado em diferentes formas, tais como pós, flocos, microesferas, nanopartículas, membranas, esponjas, colméias, fibras e fibras ocas (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009; TIYABOONCHAI, 2003.)

Os métodos de preparação de nanopartículas devem ser estudados cuidadosamente, pois deles resultam as propriedades desejadas. Diferentes técnicas são utilizadas de acordo com o polímero utilizado: polimerização, polímeros pré-formados e geleificação iônica, sendo este último, o método mais adequado para polímeros hidrofílicos como quitosana (NAGAVARMA et al., 2012).

O método de geleificação iônica utilizando tripolifosfato de sódio foi descrito por Calvo et al. (1997). Nesta técnica, as cargas positivas dos grupos amino da quitosana interagem com as cargas negativas do poliânion tripolifosfato de sódio e formam coacervados de tamanho nanométrico. Estes coacervados são formados como um resultado das interações eletrostáticas entre as duas fases aquosas, enquanto que geleificação iônica envolve a transição de materiais da forma líquida para a forma de gel (CALVO et al., 1997; NAGAVARMA et al., 2012).

O método de geleificação iônica é ilustrado pela Figura 3. O procedimento não se utiliza de instrumentação sofisticada e é realizado a temperatura ambiente. No procedimento, sob homogeneização de 10000 rpm, duas soluções são homogeneizadas, resultando nas nanopartículas de quitosana e tripolifosfato de sódio.

Figura 3 – Esquema de obtenção de nanopartículas pelo método de geleificação iônica.



Fonte: Adaptado de NAGAVARMA et al., 2012.

3.5. Lecitina de soja

A lecitina corresponde a um conjunto de fosfatídeos ou fosfolipídios, que normalmente são extraídos de fontes oleaginosas, como a soja. A lecitina é utilizada em aplicações industriais ou para fins nutricionais, apresentando-se em geral no estado pastoso e de cor acastanhada e suas aplicações são determinadas com base em suas propriedades funcionais, regidas pelas conformações estruturais de seus principais componentes, os fosfolipídios (CASTEJON, 2010).

Os fosfolipídios são estruturas de caráter anfifílico que possuem em sua estrutura ácidos fosfóricos ligados a bases nitrogenadas (aminas secundárias ou primárias) e a álcool cíclico formando compostos como a fosfatidilcolina, fosfatidiletalona e fosfatidilinositol. Estas três estruturas basicamente compõem a lecitina comercial, porém, podem conter outras substâncias associadas como fibras e carboidratos (CASTEJON, 2010)

A lecitina é usada comercialmente tanto como emulsionante, quanto como lubrificante, em diversas atividades econômicas, como na indústria farmacêutica ou alimentar. A lecitina é considerada como um surfactante não tóxico, bem tolerado pelo organismo, pois é parte integral das membranas celulares e pode ser totalmente metabolizada. Foi classificada nos Estados Unidos da América, pela Food and Drug Administration, como sendo geralmente reconhecida como produto seguro para o consumo humano. A lecitina é reconhecida como aditivo alimentar pela União Europeia com o número E E322 (MACHADO et al, 2014).

Outra vantagem da lecitina da soja é que ela pode ser usada como ingrediente alimentar, servindo como estabilizador vitamínico, protegendo as vitaminas A e E contra oxidações, e também servindo como fonte de colina, inositol e outros componentes estimulantes do crescimento (MACHADO, 2012).

No desenvolvimento de materiais nanoestruturados, lecitina vem sendo empregada com constância, sendo utilizada como tensoativo no auxílio de núcleos lipofílicos em nanopartículas de caráter hidrofílico (ADORNE et al., 2013), ou parte integrante destes materiais. Mertins (2004) utilizou a lecitina em grande quantidade para o desenvolvimento de nanovesículas lipossômicas. Dalagnol (2011) preparou complexos micro e nanoestruturados constituídos de quitosana e lecitina com o objetivo de desenvolver a liberação controlada de compostos ativos. Machado (2012) desenvolveu lipossomas a partir de lecitina de soja e estudou o seu uso na encapsulação de *Spirulina* em tamanhos micro e nanométricos.

3.6. Óleo essencial de laranja (*Citrus sinensis*)

As frutas cítricas como laranjas, limas e limões integram a família das Rutáceas (ou *Rutaceae*), pertencendo ao gênero *Citrus*, sendo a laranja a fruta de maior cultivo no mundo. A produção de laranjas e a industrialização do suco estão concentradas em quatro países, sendo o Brasil o primeiro deles, respondendo por um terço da produção mundial da fruta e quase 50% do suco fabricado. O óleo essencial de laranja, extraído do pericarpo do fruto, é um subproduto da indústria do suco. Derivados deste óleo são utilizados na indústria farmacêutica e de alimentos. Na linha de produção de sucos cítricos, durante a etapa de esmagamento destas frutas, os óleos essenciais são obtidos tendo como rendimento máximo na extração de 0,4%. Ou seja, para cada uma tonelada de fruta cítrica processada, obtém-se 4 kg de óleo (BARROS, 1986; BRAGA, 1971; SILVA-SANTOS, 2006; BIZZO, HOVELL, REZENDE, 2009).

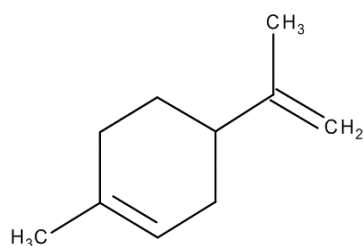
Segundo Bizzo, Hovell e Resende (2009), o Brasil tem lugar de destaque na produção de óleos essenciais, ao lado da Índia, da China e da Indonésia, que são considerados os quatro grandes produtores mundiais. Para os mesmos autores, o Brasil aparece entre os principais países fornecedores dos óleos essenciais de laranja, de limão, de lima e de outros cítricos, contribuindo com 5% do total de óleos importados e entre os grandes exportadores internacionais.

Os óleos essenciais constituem os elementos voláteis contidos em muitos órgãos vegetais, e estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra micro-organismos. Ainda, tem sido estabelecido cientificamente que cerca de 60% dos óleos essenciais possuem propriedades antifúngicas e 35% exibem propriedades antibacterianas (LIMA et al., 2006)

O óleo essencial de laranja é uma mistura complexa que pode conter até 300 diferentes compostos químicos que se dividem em duas frações. A fração não volátil, composta principalmente por carotenóides, flavonóides e cumarinas, e a volátil composta por aldeídos, cetonas, hidrocarbonetos terpênicos, como: limoneno, mirceno e valenceno, álcoois como: linalol e ésteres. Devido à composição do óleo essencial de laranja, este apresenta baixa solubilidade em água e alta tendência à oxidação. A fração volátil dos óleos cítricos, em geral, representa de 94 a 98% do óleo total e consiste de mais de 100 compostos, muitos dos quais estão presentes somente em níveis traço. A época e o local de coleta, a forma de cultivo, as condições climáticas, a idade do material vegetal, o período e as condições de armazenamento podem influenciar na composição do óleo essencial (FERNANDES et al., 2013).

Nos óleos essenciais, mesmo quando apresentam um componente majoritário, não necessariamente será o único responsável pelo seu aroma; é o caso dos óleos essenciais de cítricos, nos quais os terpenóides oxigenados contribuem com maior intensidade no aroma mesmo sendo o D-limoneno o componente majoritário (FERNANDES et al., 2013). Os óleos essenciais de cítricos são encontrados em glândulas localizadas na superfície da casca da fruta e podem ser removidos por diferentes métodos de extração. Os métodos mais comuns são hidrodestilação ou destilação por arraste de vapor, extração por solvente, prensagem a frio e extração supercrítica (ARAÚJO, J., 1999; FIGUEIREDO, 2010).

Figura 4 – Estrutura molecular do limoneno, componente majoritário do óleo essencial de laranja.



Fonte: www.merckmillipore.com

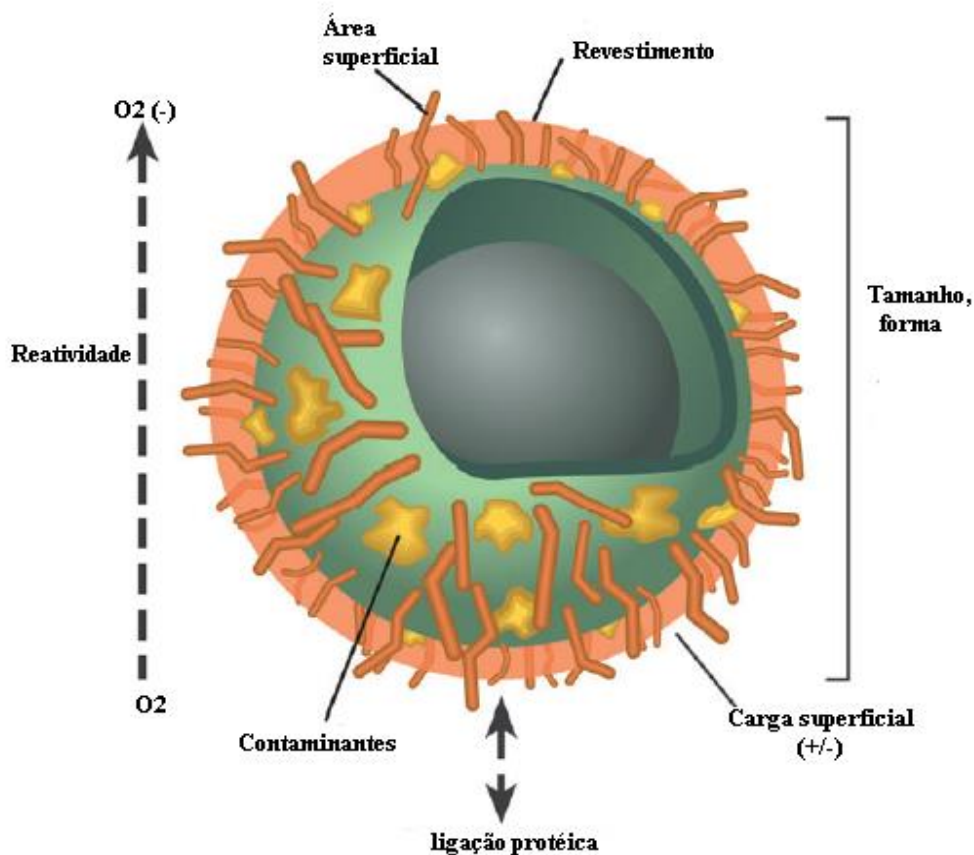
3.7. Toxicologia de Nanopartículas

O objeto fundamental do estudo da toxicologia é a intoxicação sob todos seus aspectos. Por intoxicação entende-se a manifestação (clínica e/ou laboratorial) de efeitos adversos que se revelam em um estado patológico ocasionado pela interação de um toxicante, isto é, de um agente químico, com o organismo. Os agentes tóxicos, seriam, portanto substâncias químicas que rompem o equilíbrio orgânico, ou seja, substâncias que provocam alterações na normal homeostase do organismo (LARINI, 1987).

Novas drogas, cosméticos e aditivos alimentares passam por intensos testes de toxicidade antes de serem lançados para uso dos consumidores. Estes testes geralmente envolvem um grande número de experimentos com animais e existe muita pressão, tanto humana como econômica, para que pelo menos parte destes testes sejam realizados *in vitro* (FRESHNEY et al., 2005). Os estudos de toxicidade *in vitro* são realizados, inicialmente, para estabelecer o direcionamento dos testes *in vivo*, porém, em relação às nanopartículas, esses testes estão sendo realizados concomitantemente por diversos pesquisadores (SILVA, A., 2011).

As variações estruturais das nanopartículas são consideradas importantes em estudos toxicológicos, devido às suas propriedades que são modificadas nestas dimensões. A superfície destas nanopartículas também pode ser atribuída como fator de toxicidade. Estas superfícies, reativas, juntamente com lacunas nas membranas celulares permitem a passagem de íons e moléculas para o interior das células. A Figura 5 ilustra estas características que podem influenciar em sua biocompatibilidade (ROY et al., 2013).

Figura 5 – Propriedades físico-químicas de nanopartículas que podem influenciar sua biocompatibilidade



Fonte: Adaptado de STERN; McNEIL, 2008.

Para evidenciar a problemática envolvida neste trabalho, apresentam-se resumos no Quadro 1 os possíveis efeitos deletérios causados por materiais nanoestruturados e os respectivos efeitos patológicos, baseados em evidências experimentais e clínicas. Analisando o quadro, é possível observar claramente a necessidade de atuação na caracterização da toxicidade de materiais nanoestruturados para a utilização em alimentos.

Quadro 1 - Possíveis efeitos citotóxicos de nanopartículas.

Efeito de nanopartículas	Possíveis efeitos patológicos
Geração de espécies reativas de oxigênio	Danos em proteínas, DNA e membranas.
Estresse oxidativo	Inflamação e distúrbio mitocondrial
Distúrbio mitocondrial	Danos na membrana interna, mudanças na permeabilidade
Inflamação	Infiltração de células inflamatórias nos tecidos, fibrose, granulomas, aterogênese, fase aguda de expressão de proteínas
Captura pelo sistema retículo endotelial	Capturas assintomáticas e estocagem em fígado, baço e linfonodos. Possibilidade de aumento de órgão e disfunção.
Desnaturação e degradação de proteínas	Perda de atividade enzimática e auto-antigenicidade.
Captura pelo núcleo	Danos em DNA, agregação de proteínas nucleares, auto-antígenos.
Captura pelo tecido neuronal	Danos cerebrais e do sistema nervoso periférico
Disfunção no sistema endotelial	Aterogênese, trombose, ataque do coração.
Alterações na regulação do ciclo celular	Proliferação celular
Danos ao DNA	Mutagênese, metaplasia, carcinogênese.

Fonte: SILVA, A., 2011.

3.7.1. Citotoxicidade

Toxicidade é um evento complexo *in vivo*, onde podem ocorrer danos celulares diretos, como os efeitos de um medicamento anticâncer, efeitos fisiológicos como mudanças na permeabilidade de membrana nos rins ou neurotoxicidade no cérebro, efeitos inflamatórios, tanto no lugar de aplicação como em outros, e outros efeitos sistêmicos. Atualmente é difícil monitorar efeitos sistêmicos e fisiológicos *in vitro*, então os ensaios determinam estes efeitos a nível celular, a chamada citotoxicidade (FRESHNEY et al., 2005).

Os estudos com culturas de células ou citotoxicidade são realizados com células de vários tecidos, tanto de origem humana quanto animal, desde que a proliferação celular ocorra e que seja possível sua análise. É um teste rápido, reprodutível e sensível, além disso, existem diversas vantagens em utilizar cultura celular, como o controle de pH,

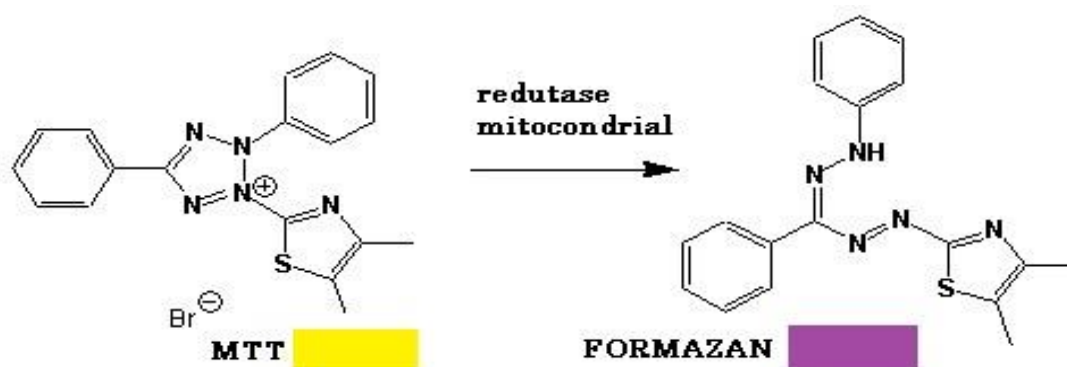
concentração de CO₂ e O₂, de temperatura e da pressão osmótica. As condições fisiológicas podem ser relativamente constantes, fatores que não são encontrados nos testes com animais (ROGERO et al., 2003; PRADO, 2012).

Estes testes de citotoxicidade consistem em colocar o agente tóxico direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células, verificando-se as alterações celulares por diferentes mecanismos, entre os quais a incorporação de corantes vitais e a inibição da formação de colônias celulares. O parâmetro mais utilizado para avaliar a toxicidade é a viabilidade celular (ROGERO et al., 2003).

Entre os testes de viabilidade celular, um dos mais utilizados é o método colorimétrico do MTT. O método do MTT baseia-se na utilização de um corante, o Brometo de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio ou Thiazolyl blue (MTT), para determinar a viabilidade celular através da atividade mitocondrial. O MTT é um sal de tetrazólio solúvel em água, o qual é convertido em formazan púrpura insolúvel após a clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais, conforme reação química ilustrada pela Figura 6. O formazan púrpura é determinado em 540 nm sendo proporcional à viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

Os ensaios de citotoxicidade *in vitro*, bem como outros bioensaios, tiveram seu desenvolvimento como forma de substituição do uso de animais nos testes de toxicologia, em meados da década de cinquenta. O projeto que discutia esta questão foi iniciado pela Federação das Universidades para o Bem estar Animal (The Universities Federation for Animal Welfare – UFAW’s), e resultou na publicação dos Princípios das Técnicas Experimentais Humanas (*The principles of Humane Experimental Technique*) em 1959, por Willian Russell e Rex Burch, considerados os iniciadores da filosofia 3Rs (CAZARIN; CORRÊA; ZAMBRONE, 2004).

Figura 6 – Redução do MTT pelas enzimas mitocondriais à formazan.



Fonte: www.openwetware.org, adaptado.

O programa 3Rs é assim denominado em função das iniciais, em inglês, de seus principais objetivos: 1) redução (*Reduction*), 2) refinamento (*Refinement*) e 3) substituição (*Replacement*), que de forma resumida significam a redução do número de animais utilizados na pesquisa, a melhora na condução dos estudos no sentido de reduzir o sofrimento ao mínimo possível e a busca de métodos alternativos que, por fim, substituam os testes *in vivo*. Os dois primeiros representam os objetivos a curto-prazo e o último, a meta máxima a ser alcançada (HAYES, 2001; VITALE; MANCIOCCO; ALLEVA, 2009).

3.7.2. *Danio rerio*

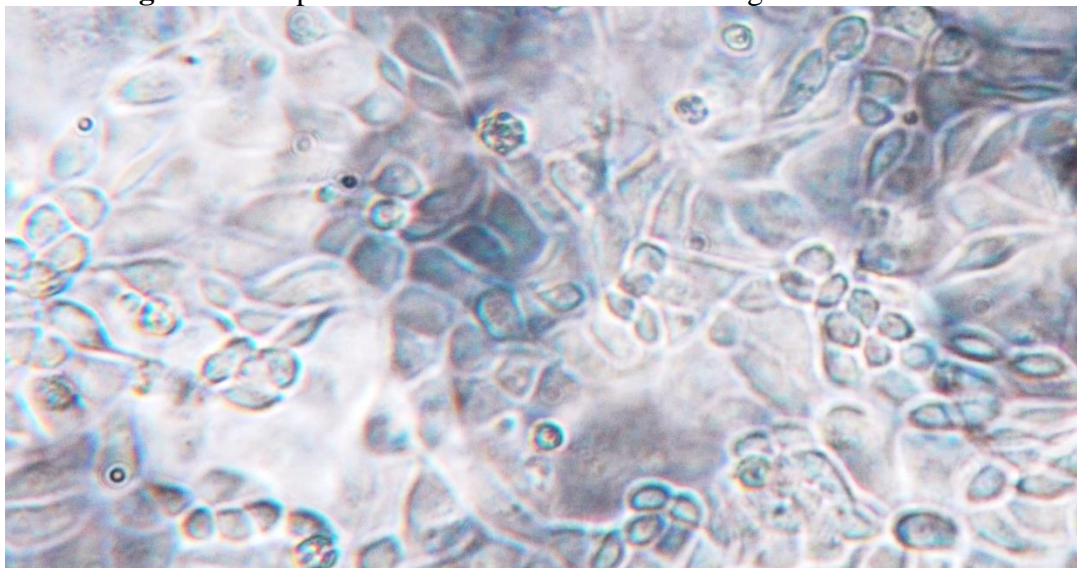
Danio rerio, também conhecido como Zebrafish ou Paulistinha, é um peixe tropical de água doce proveniente dos rios do Sul da Ásia, principalmente do Norte da Índia, Paquistão, Butão e Nepal. Pertence à família *Cyprinidae*, classe *Actinopterygii* e ordem *Teleostei* (ARAÚJO F., 2012).

Como modelo animal de experimentação científica em ascensão, o *Danio rerio* tem sido utilizado em estudos relacionados a diversos campos científicos. Este modelo biológico possui vantagens em relação aos animais tradicionalmente utilizados para experimentação como ratos e camundongos, pois estes são pequenos, não necessitam de grandes espaços físicos nem de equipamentos sofisticados, possuem rápido ciclo de vida, e uma excelente homologia imunológica, fisiológica e celular com mamíferos (PEDROSO, 2011; ROSEMBERG et al., 2008). Outro aspecto importante que tange ao Zebrafish é o mapeamento completo de seu genoma. Com estes dados, *Danio rerio* se tornou um ótimo modelo biológico no estudo de doenças de aspectos toxicológicos e de desenvolvimento (GUYON et al., 2007).

Cultura de células de fígado (hepatócitos) é um valioso modelo em estudos de toxicologia *in vitro*. Estas células podem ser utilizadas para estudar fatores que influenciam a expressão e regulação do sistema de oxidação do citocromo P450, bem como verificar a produção de metabólitos bioativos por compostos xenobióticos (COLLODI et al., 1992).

Hepatócitos de Zebrafish, ilustrados na Figura 7, estão sendo cada vez mais utilizados nestes ensaios desde que as pesquisas de Gosh et al. (1994), demonstraram que células desta linhagem, apresentam propriedades em cultura que são associadas com diferentes células de fígado, *in vivo*.

Figura 7 – Hepatócitos de zebrafish aderidos em garrafa de cultura.



Fonte: O autor (2015).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

As matérias-primas utilizadas na realização do presente trabalho foram quitosana (QS) purificada com massa de 74,03 kDa e grau de desacetilação de 95% (Polymar Ltda, Brasil), lecitina de soja (LEC) de grau alimentício (Delaware S/A, Brasil) e óleo essencial de laranja (OE), puro (Phytoterápica, Brasil). Para a realização dos testes de citotoxicidade foi utilizada a linhagem ZFL de hepatócitos de *D. rerio* (CRL2643- American Type Culture Collection - ATCC).

Os reagentes e solventes utilizados no desenvolvimento das nanopartículas e dos nanoencapsulados de óleo essencial de laranja foram tripolifosfato de sódio (TPP) de grau alimentício (Synth), ácido acético (P.A., Sigma-Aldrich) e água deionizada (Millipore Corporation). Os equipamentos envolvidos nestas etapas foram agitador magnético (modelo ARE, Velp Científica), pHmetro (modelo pH-206, Lutron), homogeneizador ultraturrax (modelo T25-DS25, Ika) e liofilizador (modelo LIOB 003, Biosan)

Para a etapa de caracterização das nanopartículas de quitosana e nanoencapsulados de óleo essencial de laranja foram utilizados os equipamentos Nanozetaser (modelo Nano ZS, Malvern) e Microscópio Eletrônico de Varredura (modelo JSM – 6610LV, Jeol) equipado com espectrômetro de energia dispersiva (EDS) (Thermo Scientific, Ultra Dry).

Na etapa de avaliação da citotoxicidade foram utilizados para manutenção das células o meio de cultura RPMI 1640 (Gibco) e tripsina (Gibco) 0,1% p/v. Os reagentes utilizados foram 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT, Sigma) e dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma). Os equipamentos para esta etapa experimental foram um espectrofotômetro ELISA (ELX 800 Universal Leitora, Bio-TEK) acoplado à computador, estufa à 28°C, câmara de fluxo laminar, além de vidraria comum de laboratório.

4.2. Estratégia experimental

Os métodos utilizados para a concretização deste trabalho foram sintetizados no Quadro 2. O projeto foi dividido em três grandes etapas, sendo as duas primeiras realizadas no Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos (FURG) e Laboratório Síncrotron (Campinas) e a última, no Laboratório de Cultivo Celular (FURG).

Quadro 2 - Síntese dos experimentos realizados para a concretização do trabalho

Desenvolvimento de nanopartículas	Preparo e caracterização de nanopartículas constituídas de quitosana, tripolifosfato de sódio e lecitina de soja
Encapsulação do óleo essencial de laranja	Preparo e caracterização de nanopartículas constituídas de quitosana, tripolifosfato de sódio e lecitina de soja contendo óleo essencial de laranja em diferentes quantidades
Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i>	Estudo da citotoxicidade de nanopartículas brancas e nanopartículas contendo óleo essencial de laranja em cultivo de células da linhagem ZFL

4.3. Métodos

4.3.1. Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana

4.3.1.1. Preparo de nanopartículas de quitosana

Para o preparo das nanopartículas de quitosana foi utilizada a técnica de geleificação iônica reportada por Calvo et al. (1997), com modificações. A geleificação iônica realizada neste trabalho foi obtida com dois agentes aniônicos: tripolifosfato de sódio e lecitina de soja, ambos de grau alimentício.

Inicialmente foram preparadas três soluções aquosas que posteriormente foram homogeneizadas: uma solução ácida de quitosana (5 mg/mL), uma solução de tripolifosfato de sódio (10 mg/mL) e uma solução de lecitina de soja (7 mg/mL). Estas concentrações

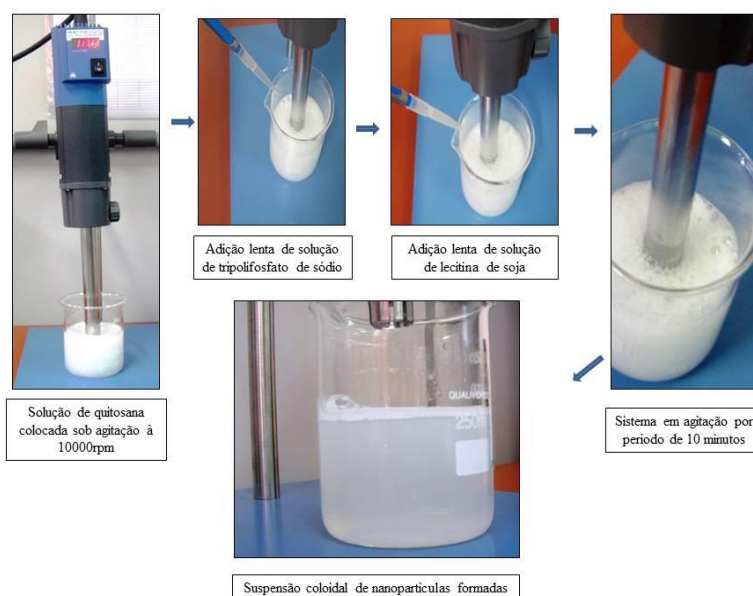
foram baseadas em estudos dirigidos por Calvo et al. (1997). Quitosana foi solubilizada em uma solução de ácido acético 1% v/v. Esta foi colocada sob agitação constante por 12 horas para sua completa solubilização. Prepararam-se posteriormente as soluções de tripolifosfato de sódio e de lecitina de soja, ambas com água deionizada. As soluções foram homogeneizadas, afim de que ao final da reação as concentrações estivessem conforme descritas na Tabela 1. O volume final das três soluções homogeneizadas foi de 200 mL.

Tabela 1 – Componentes presentes nas formulações de nanopartículas de quitosana

Formulação	Quitosana (QS) (mg/mL)	Tripolifosfato de sódio (TPP) (mg/mL)	Lecitina de soja (LEC) (mg/mL)
F1	1,2	0,20	0,12
F2	1,2	0,15	0,12
F3	1,0	0,20	0,10
F4	1,0	0,15	0,10

Com as soluções prontas para uso, submeteu-se primeiramente a solução de quitosana à agitação em homogeneizador Ultraturrax à 10000 rpm. Sob agitação, as soluções de tripolifosfato de sódio e lecitina de soja foram lentamente adicionadas com o auxílio de micropipetas, ficando nesta condição por um período de 10 minutos. As nanopartículas foram formadas espontaneamente durante esta etapa do processo. A Figura 8 ilustra o processo da geleificação iônica. Após a formação das nanopartículas estas foram armazenadas em temperatura de refrigeração para posterior caracterização.

Figura 8 – Preparo de nanopartículas de quitosana pelo método de geleificação iônica



4.3.1.2. Caracterização físico-química de nanopartículas

As nanopartículas produzidas foram caracterizadas através de medidas de tamanho médio, potencial zeta e índice de polidispersão conforme estudos semelhantes realizados por Jardim (2013). A morfologia das nanopartículas liofilizadas foi observada por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

As análises de tamanho médio foram realizadas por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS). Estas medições foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, em Campinas, Brasil, empregando o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument Ltd., UK), equipado com laser de 633 nm e usando uma cubeta retangular de 2 mL. O ângulo de dispersão foi estabelecido a 90°. As medições foram realizadas a 25°C, adicionando 10 µl de amostra em 1,0 ml de água deionizada. As soluções foram homogeneizadas durante 5 minutos. A função de correlação auto-dependente do tempo foi adquirida com quinze aquisições para cada execução. Cada dado é uma média de cinco das tais aquisições. As funções de correlação gravadas foram convertidas em distribuições de tamanho. Os dados obtidos foram analisados por meio da Dispersão Software Malvern (MALVERN, 2014).

As medições de potencial zeta foram realizadas no Laboratório de Catalise Ziegler-Natta, do Instituto de Química da Universidade Federal Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. A determinação da carga de superfície de amostras foi realizada utilizando um instrumento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido), operando com laser de 633 nm, utilizando células zeta descartáveis. O instrumento foi calibrado pela medição de uma solução de zeta- padrão (55 ± 5 mV) fornecido pela Malvern. As soluções foram estabilizadas durante 2 min a 25°C antes de iniciar as medições. Um campo elétrico foi aplicado às soluções, o que causou o movimento das partículas. A velocidade associada a este movimento está relacionada com o potencial zeta.

As análises de morfologia foram feitas através de microscopia eletrônica de varredura, realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica (CEME-SUL) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Uma pequena quantidade de amostra liofilizada foi colocada sobre um suporte metálico (stub), recoberta com ouro, sob vácuo, e submetidas à microscopia.

4.3.2. Desenvolvimento de encapsulados de óleo essencial de laranja

4.3.2.1. Incorporação e encapsulação do óleo essencial de laranja

Para a encapsulação do óleo essencial de laranja foi escolhida a formulação de nanopartículas F1. Esta escolha foi dada de forma aleatória com base em dados semelhantes

encontrados na literatura. É com esta formulação que três quantidades diferentes de óleo foram encapsuladas. As proporções estabelecidas, em massa, de material de parede : núcleo foram 1:1 (F5), 3:1 (F6) e 5:1 (F7). A Tabela 2 mostra as quantidades de cada composto utilizado nas respectivas formulações.

Tabela 2 – Componentes presentes nas formulações de encapsulados de óleo essencial de laranja

Formulação	Quitossana (QS) (mg/mL)	Tripolifosfato de sódio(TPP) (mg/mL)	Lecitina de soja (LEC) (mg/mL)	Óleo essencial de laranja (OE) (mg/mL)
F5	1,2	0,20	0,12	1,2
F6	1,2	0,20	0,12	0,4
F7	1,2	0,20	0,12	0,24

A incorporação do óleo essencial pelas nanopartículas foi realizada de modo análogo à geleificação iônica: Submeteu-se primeiramente a solução de quitossana à agitação em homogeneizador Ultraturrax a 10000 rpm. Sob agitação, as soluções de tripolifosfato de sódio e lecitina de soja foram lentamente adicionadas com o auxílio de micropipetas à agitação, ficando nesta condição por um período de 10 minutos. Após este período, o óleo essencial de laranja foi adicionado e mais um período de 10 minutos, sob agitação, foi contabilizado, incorporando assim o composto ativo. Após esta etapa, as suspensões foram submetidas à liofilização, onde o processo de encapsulação foi efetivado.

4.3.2.2. Caracterização dos encapsulados de óleo essencial de laranja

As três formulações de encapsulados foram caracterizadas com relação ao tamanho médio, potencial zeta e índice de polidispersão, conforme descritos no item 4.3.1.2.

4.3.2.3. Eficiência de encapsulação

Para a determinação da eficiência de encapsulação do processo, volumes de 800 mL das três formulações de encapsulados foram preparados a fim de viabilizar a determinação do óleo essencial de laranja livre por gravimetria.

Após a incorporação do óleo essencial pelas nanopartículas, o sistema foi levado à centrifugação à 15500 g, em temperatura ambiente, por um período de 30 minutos para a separação dos nanoencapsulados do meio aquoso, conforme estudos semelhantes realizados por Fernández-Urrusuno et al. (1999). Uma nova centrifugação foi realizada com o sistema concentrado em centrífuga (modelo CT-5000R, Cientec). Ao sobrenadante foi então

adicionado clorofórmio, em proporção em volume 1:10 e realizada extração líquido-líquido em funis de separação, com o intuito de remover o óleo essencial de laranja da solução aquosa e da lecitina de soja excedente.

O solvente clorofórmio contendo óleo essencial livre foi levado à evaporador rotativo em uma temperatura de 60°C. Após a evaporação do solvente, os balões foram resfriados em dessecador e, assim, o óleo essencial de laranja foi determinado por gravimetria. Esta técnica foi realizada conforme estudos semelhantes realizados Gonsalves et al. (2009). A eficiência de encapsulação foi calculada a partir da Equação 1, abaixo:

$$EE (\%) = \frac{MI (g) - MF (g)}{MI (g)} \times 100 \quad (1)$$

*Onde MI = massa inicial de óleo essencial adicionado e MF = massa de óleo essencial de laranja não encapsulado

4.3.3. Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

Para a realização desta etapa foi utilizada a linhagem ZFL de hepatócitos de *D. rerio* (CRL2643- American Type Culture Collection - ATCC). A linhagem foi mantida com meio de cultura RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico e antimicótico, em garrafas de cultura em estufa à 28°C. Os estudos desta etapa foram realizados no Laboratório de Cultivo Celular, ICB - FURG. A Figura 9 mostra as células em cultivo.

Figura 9 – Garrafas de cultura contendo células da linhagem ZFL



4.3.4. Avaliação da citotoxicidade *in vitro* do solvente ácido acético

Para a avaliação da toxicidade em cultura de células, é necessária uma solução de concentração conhecida dos possíveis agentes tóxicos. Sendo assim, para a avaliação da toxicidade de nanopartículas de quitosana e nanoencapsulados de óleo essencial de laranja, optou-se por solubilizar estes em solução de ácido acético.

Como não foi encontrado na literatura dados de citotoxicidade deste ácido em cultura de células da linhagem ZFL, foi feito assim o teste de viabilidade celular pelo método colorimétrico do MTT com concentrações deste ácido variando entre 0,088 a 1,75 mM. Juntamente com estas concentrações foi realizado um tratamento controle, onde as células foram expostas somente à água utilizada no preparo das soluções (água deionizada, Millipore Corporation).

4.3.4.1. Tratamento das células com ácido acético

As células da linhagem ZFL (3×10^5 células mL^{-1}) foram incubadas por 24 h em placas de cultura de 96 poços a 28°C, para sua aderência. Após esta etapa, as células foram tratadas com diferentes concentrações de ácido acético, que variaram entre 0,088 a 1,75 mM. As células controle receberam o mesmo volume do veículo utilizado para a solubilização do ácido acético, neste caso água de imersão (Novafarma, Brasil). Após, a linhagem celular foi incubada a 28 °C por até 72 h.

4.3.4.2. Análise da viabilidade celular: método MTT

A viabilidade celular foi avaliada pelo método 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il,2,5-difeniltetrazolium) (MTT) nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas após a exposição. O teste MTT é colorimétrico e se baseia na redução do composto MTT pelas enzimas mitocondriais das células viáveis. Quando este composto é reduzido sua coloração e estado físico mudam de amarelo (líquido) para violeta (sólido). A diferença entre as colorações é então determinada por absorbância em leitor de placas ELISA e, posteriormente, a viabilidade é calculada atribuindo a absorbância do grupo controle como 100% de células viáveis (MOSMANN, 1983).

Conforme descrito por Silva, A. (2011), as células após a exposição, foram lavadas com tampão PBS e adicionados 180 μL de meio de cultura e 20 μL de solução de MTT (5 mg mL^{-1}) em cada poço. As placas foram incubadas por 3 horas a 28 °C. Após esta etapa, o meio contendo MTT foi removido e os cristais de formazan foram dissolvidos em 200 μL de dimetilsulfóxido (DMSO). Os valores de absorbância a 490 nm foram então determinados no ELISA (ELX 800 Universal Leitora, Bio-TEK).

4.3.5. Avaliação da citotoxicidade *in vitro* de nanopartículas de quitosana

Após estudos sobre a citotoxicidade de soluções de ácido acético, utilizou-se a concentração que não promovia morte celular para a solubilização das nanopartículas de quitosana. A triagem de concentrações de nanopartículas escolhida para avaliação da citotoxicidade foi dependente da formação de uma solução homogênea de nanopartículas, sendo estes valores estabelecidos entre 0,1 µg/mL e 100 µg/mL.

4.3.5.1. Tratamento das células com nanopartículas de quitosana

As células da linhagem ZFL (3×10^5 células mL⁻¹) foram incubadas por 24 h em placas de cultura de 96 poços a 28°C, para sua aderência. Após esta etapa, as células foram tratadas com diferentes concentrações de nanopartículas, que variaram entre 0,1 µg/mL à 100µg/mL. As células controle receberam o mesmo volume do veículo utilizado para a solubilização das nanopartículas. Após, a linhagem celular foi incubada a 28 °C por até 72 h.

4.3.5.2. Análise da viabilidade celular: método MTT

A análise de viabilidade celular foi realizada conforme o item 4.3.4.2

4.3.6. Avaliação da citotoxicidade *in vitro* de nanopartículas de quitosana contendo óleo essencial de laranja

A partir dos estudos de citotoxicidade de nanopartículas de quitosana brancas, realizaram-se os estudos de citotoxicidade de nanopartículas de quitosana contendo óleo essencial de laranja, sendo a formulação F7 a escolhida para esta etapa do projeto.

A triagem de concentrações de nanoencapsulados escolhidas para avaliação da citotoxicidade foi dependente da formação de uma solução homogênea de nanopartículas, sendo estes valores estabelecidos entre 0,1 µg/mL e 100 µg/mL.

4.3.6.1. Tratamento das células com nanoencapsulados de óleo essencial

As células da linhagem ZFL (3×10^5 células mL⁻¹) foram incubadas por 24 h em placas de cultura de 96 poços a 28°C, para sua aderência. Após esta etapa, as células foram tratadas com diferentes concentrações de nanoencapsulados, que variaram entre 0,1 µg/mL à 100µg/mL. As células controle receberam o mesmo volume do veículo utilizado para a solubilização dos nanoencapsulados. Após, a linhagem celular foi incubada a 28 °C por até 72h.

4.3.6.2. Análise da viabilidade celular: método MTT

A análise de viabilidade celular foi realizada conforme o item 4.3.4.2.

4.3.7. Análise estatística

Os dados dos experimentos foram apresentados como médias \pm desvio padrão, analisados utilizando ANOVA com pós-teste de Tukey, utilizando o programa estatístico *GraphPad Prism (version 5.0)*. Os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana

5.1.1. Caracterização físico-química de nanopartículas de quitosana

5.1.1.1. Tamanho médio de partícula e Índice de polidispersão

Os resultados de tamanho médio e índice de polidispersão são mostrados na Tabela 3, a seguir:

Tabela 3 - Tamanho médio e índice de polidispersão de nanopartículas de quitosana

Ensaio	Quitosana(QS) (mg/mL)	Tripolifosfato de sódio(TPP) (mg/mL)	Lecitina de soja (LEC) (mg/mL)	Tamanho médio (nm)	PDI
F1	1,2	0,20	0,12	668,93 \pm 03,2 a	0,394
F2	1,2	0,15	0,12	814,05 \pm 34,3 b	0,300
F3	1,0	0,20	0,10	587,50 \pm 38,9 a,c	0,362
F4	1,0	0,15	0,10	718,53 \pm 34,6 a,b	0,323

*Médias na mesma coluna com letras iguais não diferem significativamente pelo Teste de Tukey HSD ($p \geq 0,05$)

** QS = Quitosana; TPP = Tripolifosfato de sódio; LEC = Lecitina de soja; PDI = Índice de polidispersão.

As formulações propostas estudaram a influência das concentrações de quitosana(QS), do agente geleificante tripolifosfato de sódio (TPP) e do emulsificante lecitina de soja (LEC) no tamanho médio das nanopartículas. Foram realizados quatro ensaios, sendo os dois primeiros com uma concentração maior de quitosana (1,2 mg/mL) e os dois últimos com concentração de quitosana de 1 mg/mL. Nestes quatro ensaios variou-se a quantidade do agente geleificante tripolifosfato de sódio (0,20 mg/mL e 0,15 mg/mL) e fixou-se constante a

massa de lecitina de soja em cada formulação ficando estabelecida como 10% em peso da massa total de quitosana da respectiva formulação.

Analisando os dados, pode-se perceber que o fator determinante para esta característica é a proporção entre quitosana e tripolifosfato de sódio. É verificado que uma maior quantidade do agente geleificante em relação à quantidade de quitosana favorece a formação de partículas menores. Este fato foi relatado por diversos autores na literatura (CALVO et al., 1997; AOUADA, 2009; BLANCO, 2011). Calvo et al. (1997) estudaram a influência das concentrações de quitosana e tripolifosfato de sódio no tamanho médio das nanopartículas formadas, tendo encontrado para formulações semelhantes à F3 e F1, valores de tamanho médio inferiores ($263,8 \pm 23,6$ nm e $307,6 \pm 14,6$ nm). Esta diferença no tamanho médio pode ser atribuída à adição de lecitina de soja nas formulações deste trabalho.

Em concentrações mais elevadas de quitosana (1,2 mg/mL), presentes nas formulações F1 e F2, os valores de tamanho médio de partícula foram maiores em relação às formulações em que estes componentes estão em menor quantidade (F3 e F4). Este fato se deve à um pequeno aumento na viscosidade da solução de preparo o que favorece a formação de partículas maiores (JAWAHAR e BALASUBRAMANIAN, 2006). O líquido mais viscoso dificulta as interações entre os materiais que formam as nanopartículas, favorecendo a formação de partículas maiores, ou seja, que não necessitam de energia favorável à reação.

Outro fator que influenciou em valores maiores de tamanho médio para as formulações F1 e F2 foi a adição de uma maior quantidade, em massa, de lecitina. Segundo Dalagnol (2011), a lecitina de soja atua também como poliânion no processo de interação iônica, formando assim, juntamente com o tripolifosfato de sódio, as nanopartículas e conseqüentemente, aumentando o tamanho médio destas. Este fato pode ser verificado analisando os resultados da ANOVA na Tabela 3: Apesar de F3 e F1 não diferirem significativamente entre si, o valor de F3 é inferior devido à menor quantidade de lecitina em sua formulação.

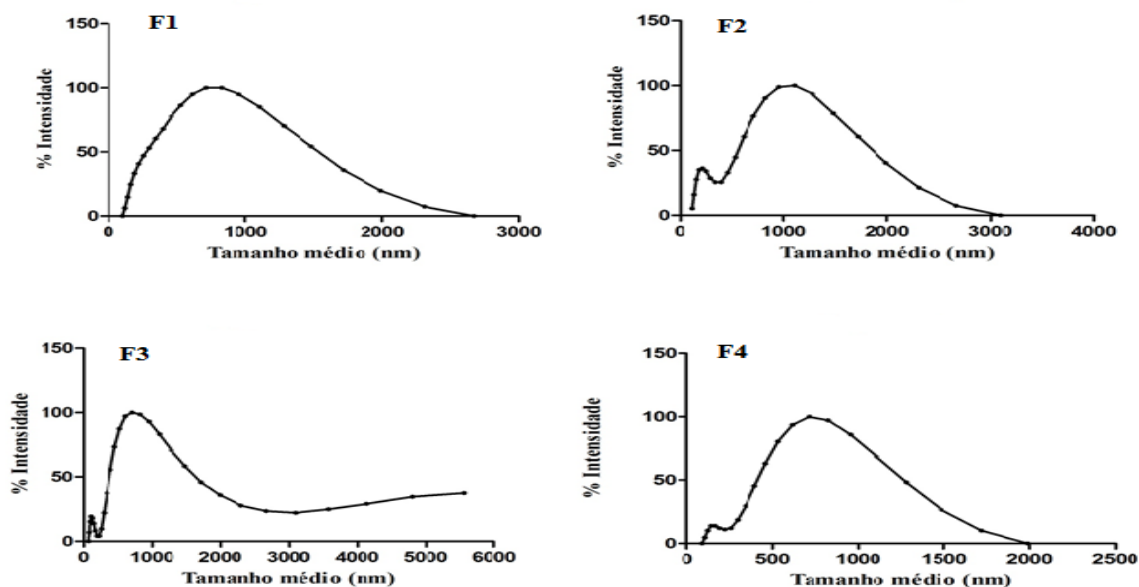
Outros parâmetros utilizados para estudar o tamanho das partículas formadas são o índice de polidispersão e a distribuição granulométrica destas, em suspensão. O índice de polidispersão (PDI) fornece informações sobre a homogeneidade da distribuição dos tamanhos de partícula. Este índice representa a faixa de distribuição de diâmetro da partícula, sendo que valores altos indicam heterogeneidade no diâmetro das partículas em suspensão.

Segundo Malvern (2014a) índices de polidispersão em torno de 0,3 são ideais por representarem que a distribuição do diâmetro de partículas se encontra em uma estreita faixa. Observando os resultados da Tabela 3, todas as formulações apresentam uma boa

uniformidade. É possível concluir que a concentração do agente geleificante influencia este parâmetro, tendo as formulações com concentrações mais baixas de tripolifosfato os índices mais próximos do ideal ($F2 = 0,300$ e $F4 = 0,323$).

A Figura 10 representa a distribuição de tamanho de partículas das formulações estudadas, o que corrobora com os resultados dos índices de polidispersão. Com exceção da formulação 1, todas apresentam uma distribuição bimodal, o que representa uma fração de partículas com tamanho médio diferenciado, diminuindo assim a heterogeneidade das mesmas.

Figura 10 – Distribuição de tamanho de partícula das formulações desenvolvidas



5.1.1.2. Potencial Zeta

Outro parâmetro importante na caracterização de nanopartículas é a medida de potencial zeta. Este parâmetro representa a carga superficial das partículas e é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, devido a dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou pela adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso (SCHAFFAZICK et al., 2003). Em geral busca-se maximizar as forças repulsivas entre as partículas, a fim de minimizar as interações que levam à formação de agregados e consequente desestabilização das suspensões coloidais (AOUADA, 2009). Na Tabela 4 são mostrados os resultados do potencial zeta para as formulações estudadas.

Tabela 4 – Potencial zeta de nanopartículas de quitosana

Ensaio	QS (mg/mL)	TPP (mg/mL)	LEC (mg/mL)	Potencial zeta (mV)
F1	1,2	0,20	0,12	15,6 ± 3,50 b
F2	1,2	0,15	0,12	21,1 ± 3,36 b
F3	1,0	0,20	0,10	17,4 ± 3,20 b
F4	1,0	0,15	0,10	30,7 ± 3,67 a

*Médias na mesma coluna com letras iguais não diferem significativamente pelo Teste de Tukey HSD ($p \geq 0,05$)

** QS = Quitosana; TPP = Tripolifosfato de sódio; LEC = Lecitina de soja; PDI = Índice de polidispersão.

Segundo Pimentel e colaboradores (2007), os fosfolipídeos como as lecitinas, e os polímeros constituintes das nanopartículas são os principais componentes presentes nas formulações capazes de influenciar o potencial zeta. Isto é verificado pelos dados da Tabela 4, onde os valores de potencial zeta das quatro formulações estudadas são positivos. Este fato se deve às características catiônicas das cadeias de quitosana em pH baixo, onde os grupamentos NH_3^+ estão em grande quantidade. Em termos biológicos, nanopartículas com potencial zeta positivo são interessantes, pois facilitam a interação destas com membranas fosfolipídicas celulares contribuindo para o desenvolvimento de liberação controlada de compostos (RAMPINO et al., 2013).

A lecitina promoveu a diminuição do potencial zeta quando adicionada em uma maior quantidade, como visto nas formulações F1 e F2, porém, assim como no tamanho médio, a proporção entre quitosana e tripolifosfato de sódio rege estes valores.

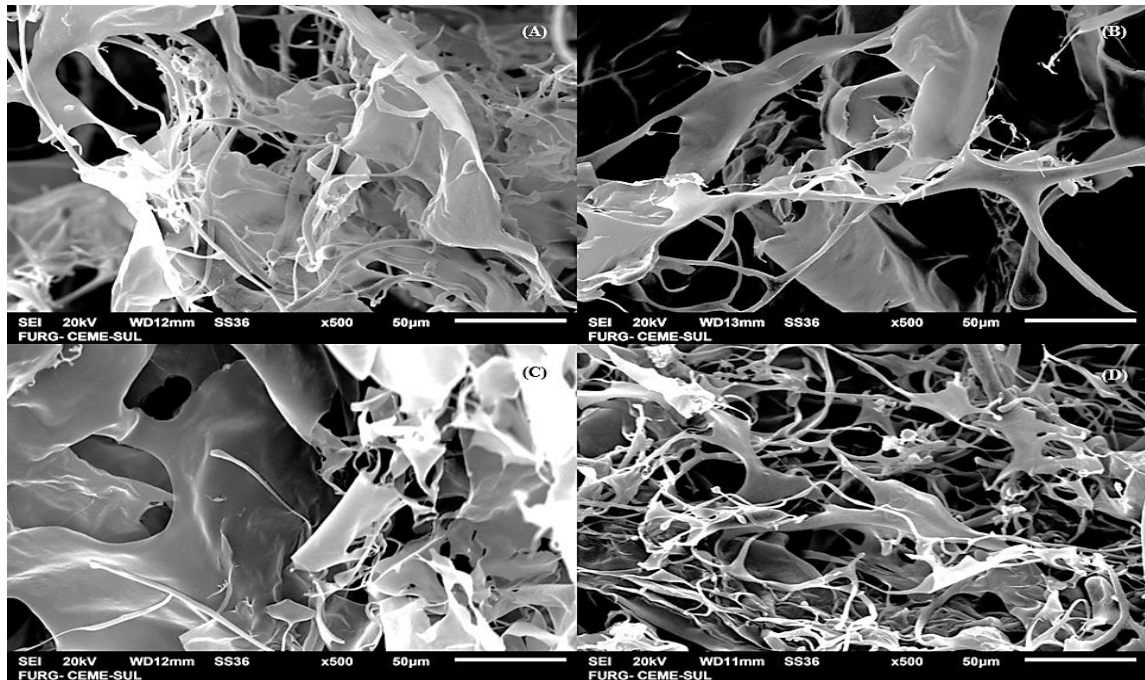
Para que uma suspensão coloidal de nanopartículas seja considerada estável do ponto de vista eletrostático, o potencial zeta deve possuir um valor, em módulo, maior que 30 mV (MALVERN, 2014), o que foi encontrado somente na Formulação 4.

5.1.1.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Com as formulações liofilizadas, as amostras foram submetidas à microscopia eletrônica de varredura, com o intuito de analisar a morfologia das partículas formadas, bem como fazer um comparativo entre as formulações realizadas.

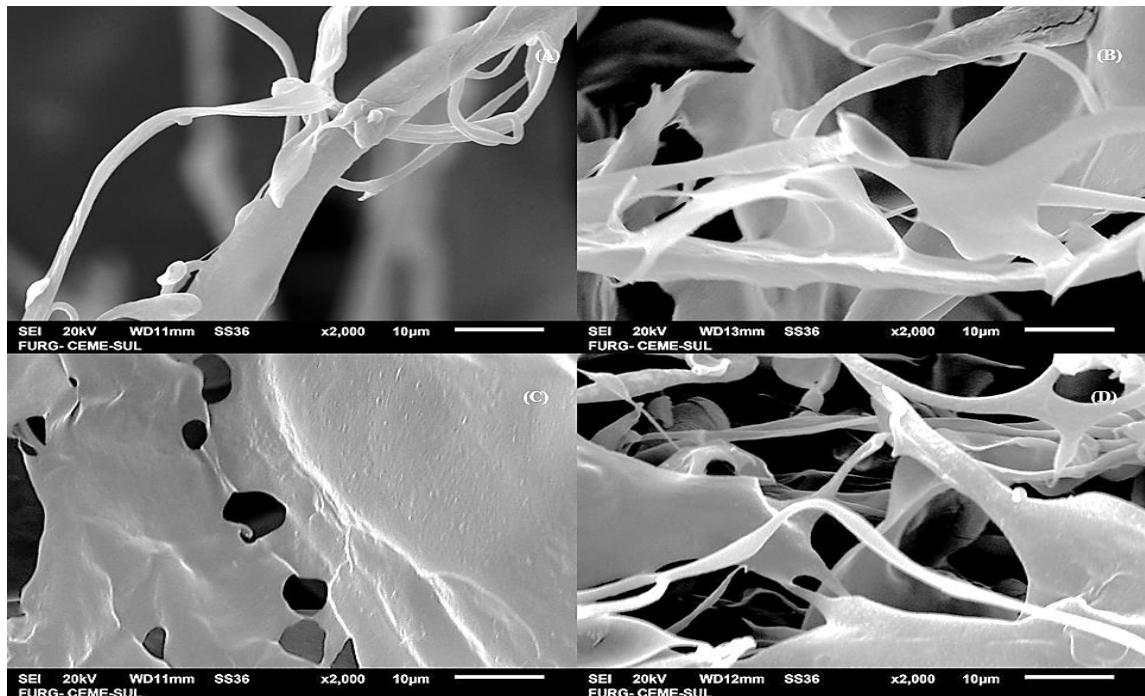
As micrografias da Figura 11, com um aumento de 500 vezes, revelaram que liofilizados destes coloides formaram estruturas folhosas, formadores de poros, sem aparente diferença nos formatos das quatro formulações estudadas.

Figura 11 – Morfologia de liofilizados das formulações de nanopartículas de quitosana.
Aumento de 500X



Na parte superior da figura, as micrografias ilustram os liofilizados da formulação F1 (A, à esquerda) e F2 (B, à direita). Na parte inferior são visualizadas as micrografias das formulações F3 (C, à esquerda) e F4 (D, à direita).

Figura 12 – Morfologia de liofilizados das formulações de nanopartículas de quitosana.
Aumento de 2000X



Na parte superior da figura, as micrografias ilustram os liofilizados da formulação F1 (A, à esquerda) e F2 (B, à direita). Na parte inferior são visualizadas as micrografias das formulações F3 (C, à esquerda) e F4 (D, à direita).

Observando as micrografias da Figura 12, em um aumento maior que as anteriores, 2000 vezes, foi possível verificar que as superfícies destas estruturas folhosas são lisas, com pouca ou nenhuma rugosidade.

Uma das vantagens do uso da quitosana é que esta pode ser moldada em várias formas (membranas, blocos, tubos e microesferas) de acordo com o método de secagem. A forma em folha para liofilizados de nanopartículas de quitosana já foi relatado por alguns autores na literatura (SU e MATTHEW, 2000; QI et al., 2004; BLANCO, 2011) e este formato resulta em uma estrutura porosa, que possui aplicações vantajosas na área médica como regeneração tecidual (LARANJEIRA e FÁVERE, 2009).

Blanco (2011) comparou métodos de secagem de nanopartículas de quitosana e tripolifosfato de sódio. De acordo com o autor, o método utilizando *spray-drying* produziu formatos esféricos destas nanopartículas, também encontrados por VITALI et al, 2008, já o método de liofilização promoveu o formato folhoso, semelhante à estes estudos. Blanco (2011) sugeriu que o processo de liofilização promovia o estiramento das nanoesferas. A hipótese já havia sido relatada por Suh e Matthew (2000) que elucidaram o mecanismo do processo de liofilização destas nanopartículas. Segundo estes autores, quando a suspensão coloidal é submetida ao processo de congelamento ocorre a separação do acetato de quitosana pela fase do cristal de gelo e após a sublimação, o produto formado é um material folhoso e formadores de poros.

Com estas micrografias de liofilizados de nanopartículas fica evidente a necessidade da adição de crioprotetores em soluções coloidais que serão submetidas ao processo de liofilização. Os crioprotetores conferem proteção para as nanopartículas durante o congelamento e são adicionados às suspensões coloidais antes da liofilização para amenizar o estresse do processo, evitando que as baixas temperaturas possam danificar e/ou alterar as propriedades físico-químicas das partículas. De acordo com estudos de Araújo, R. (2009), a agregação das nanopartículas após a liofilização se deve ao maior contato destas partículas durante o congelamento (estado sólido), e em alguns casos elas podem se agregar. A quebra e modificações na morfologia das partículas podem ocorrer devido a baixas temperaturas empregadas para o congelamento das mesmas e também pela formação de cristais de gelo que podem provocar um estresse mecânico na partícula.

5.2. Desenvolvimento de encapsulados de óleo essencial de laranja

5.2.1. Caracterização físico-química de encapsulados de óleo essencial de laranja

5.2.1.1. Tamanho médio de partícula e Índice de polidispersão

Para o preparo dos nanoencapsulados foi utilizada a formulação F1 de nanopartículas de quitosana, com base em dados da literatura. A partir desta formulação, foram feitas três formulações de encapsulados de óleo essencial de laranja, variando-se somente a quantidade de óleo essencial adicionada. Os resultados destas medições são mostrados na Tabela 5:

Tabela 5 - Tamanho médio e índice de polidispersão de nanopartículas brancas (F1) e contendo óleo essencial em diferentes quantidades

Ensaio	QS (mg/mL)	TPP (mg/mL)	LEC (mg/mL)	OE (mg/mL)	Proporção em massa QS:OE	Tamanho médio (nm)	PDI
F1	1,2	0,20	0,12	----	----	668,93 ± 03,2 a	0,394
F5	1,2	0,2	0,12	1,2	1:1	1069,4 ± 30,2 a	0,108
F6	1,2	0,2	0,12	0,4	3:1	885,1 ± 22,4 b	0,08
F7	1,2	0,2	0,12	0,24	5:1	801,9 ± 43,2 b	0,325

*Médias na mesma coluna com letras iguais não diferem significativamente pelo Teste de Tukey HSD ($p \geq 0,05$)

** QS = Quitosana; TPP = Tripolifosfato de sódio; LEC = Lecitina de soja; PDI = Índice de polidispersão.

Analisando os dados da Tabela 5 é possível constatar que todas as formulações de encapsulados de óleo essencial de laranja possuem tamanho médio maior em relação à formulação F1 de nanopartículas de quitosana vazias (668,93 ± 3,2 nm). Este fato indica que o núcleo foi incorporado às nanopartículas. O resultado da ANOVA mostra que a formulação F5 possui um valor significativamente maior que as outras duas formulações, as quais não diferem entre si. As proporções de massa entre material de parede (quitosana) e núcleo (óleo essencial de laranja) também afetaram esta característica: Em uma relação 1:1 entre os materiais estudados (formulação F5), o tamanho médio dos encapsulados obtidos ultrapassou o limite considerado nanométrico, ficando em aproximadamente 1 micrón (1069,4 nm). Menores tamanhos médios de encapsulados foram obtidos com menores quantidades de óleo essencial adicionado (formulações F6 e F7), tendo estas formulações valores em torno de 800 nm. Esta constatação atenta para o fato de que o núcleo influencia no tamanho médio dos encapsulados estudados.

Com relação ao índice de polidispersão das formulações de encapsulados, as formulações apresentam um valor ótimo, bem próximo da nulidade. Este fato se traduz em

uma uniformidade no tamanho médio dos encapsulados. Do ponto de vista de condições ideais de tamanho médio e índice de polidispersão, podemos constatar que existe uma proporção exata de cada componente da formulação, incluindo o núcleo, que poderá nos fornecer encapsulados de tamanho nanométrico e com uma grande uniformidade no tamanho destes, o que foi conseguido pela formulação F6. Este fato já havia sido relatado por Aburto et al. (1998), na microencapsulação deste mesmo óleo em paredes poliméricas. Este fato foi também observado por Britto et al (2013) na encapsulação de vitaminas hidrossolúveis em nanopartículas de quitosana e tripolifosfato de sódio.

5.2.1.2. Potencial Zeta

Como realizado anteriormente nos estudos de nanopartículas de quitosana vazias, o potencial zeta das três formulações de encapsulados também foi determinado. A Tabela 6, a seguir, mostra os resultados do potencial zeta para as formulações de encapsulados realizadas.

Tabela 6 – Potencial zeta de nanopartículas brancas (F1) e contendo óleo essencial em diferentes quantidades

Ensaio	QS (mg)	TPP (mg)	LEC (mg)	OE (mg)	Proporção em massa QS:OE	Potencial Zeta (mV)
F1	1,2	0,20	0,12	----	----	15,6 ± 3,50 b
F5	240	40	24	240	1:1	24,3 ± 3,32 b
F6	240	40	24	80	3:1	47,1 ± 4,20 a
F7	240	40	24	48	5:1	29,9 ± 3,51 b

*Médias na mesma coluna com letras iguais não diferem significativamente pelo Teste de Tukey HSD ($p \geq 0,05$)

** QS = Quitosana; TPP = Tripolifosfato de sódio; LEC = Lecitina de soja; OE = Óleo essencial de laranja

O potencial zeta das três formulações de encapsulados foi superior aos potenciais zeta das nanopartículas de quitosana brancas. Do ponto de vista estatístico, a formulação F6 difere significativamente das outras duas formulações, bem como o resultado de tamanho médio. Os três valores de potencial zeta são positivos, assim como o resultado de potencial zeta para as nanopartículas vazias utilizadas para a encapsulação. Ainda no comparativo com a formulação de nanopartículas brancas, é possível constatar que a incorporação do óleo essencial de laranja, em todas suas formulações, contribuiu no aumento do potencial zeta, em diferentes níveis, fazendo com que o sistema alcançasse a estabilidade eletrostática.

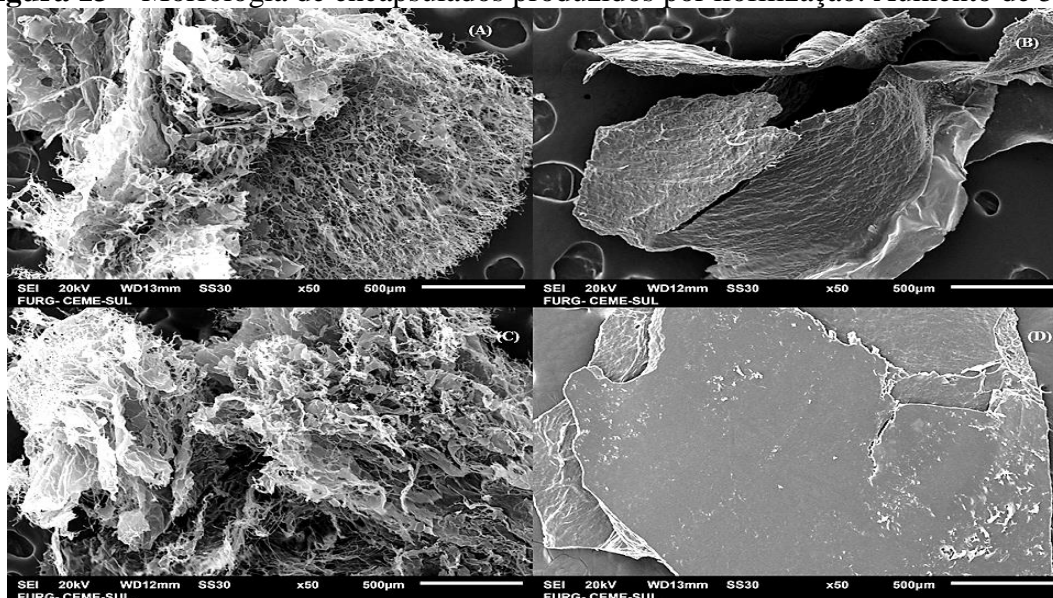
Os estudos de potencial zeta de encapsulados presentes neste trabalho reafirmam a hipótese de que nanopartículas de quitosana são eficientes carreadoras de substâncias ativas e que o potencial zeta destas pode ser modificado de acordo com o objetivo desejado. Foi

encontrado na literatura vários autores relatando esta observação: Silva e Guilherme (2014) relataram mudanças no potencial zeta destas nanopartículas quando estas foram preparadas juntamente com óxido de ferro, dando-lhes a característica de nanopartículas magnéticas, melhorando assim a entrega do núcleo em sítios específicos no organismo. Britto e colaboradores (2014) relataram também a mudança de potencial zeta em nanopartículas de quitosana quando a vitamina B9 era incorporada à estas, aumentando sua estabilidade coloidal. Resultados coerentes com estes estudos também foram relatados por Souza (2014) que promoveu a encapsulação de óleo essencial de canela em nanopartículas de quitosana.

5.2.1.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Posterior à liofilização das três formulações, o processo de encapsulação do óleo essencial de laranja foi efetivado. Após esta etapa, as formulações foram submetidas à microscopia eletrônica de varredura com o intuito de fazer um estudo comparativo da morfologia das nanopartículas vazias e aquelas contendo diferentes quantidades de óleo essencial de laranja. A Figura 13, a seguir, ilustra as nanopartículas vazias e contendo óleo essencial de laranja em um aumento de 50 vezes.

Figura 13 – Morfologia de encapsulados produzidos por liofilização. Aumento de 50X



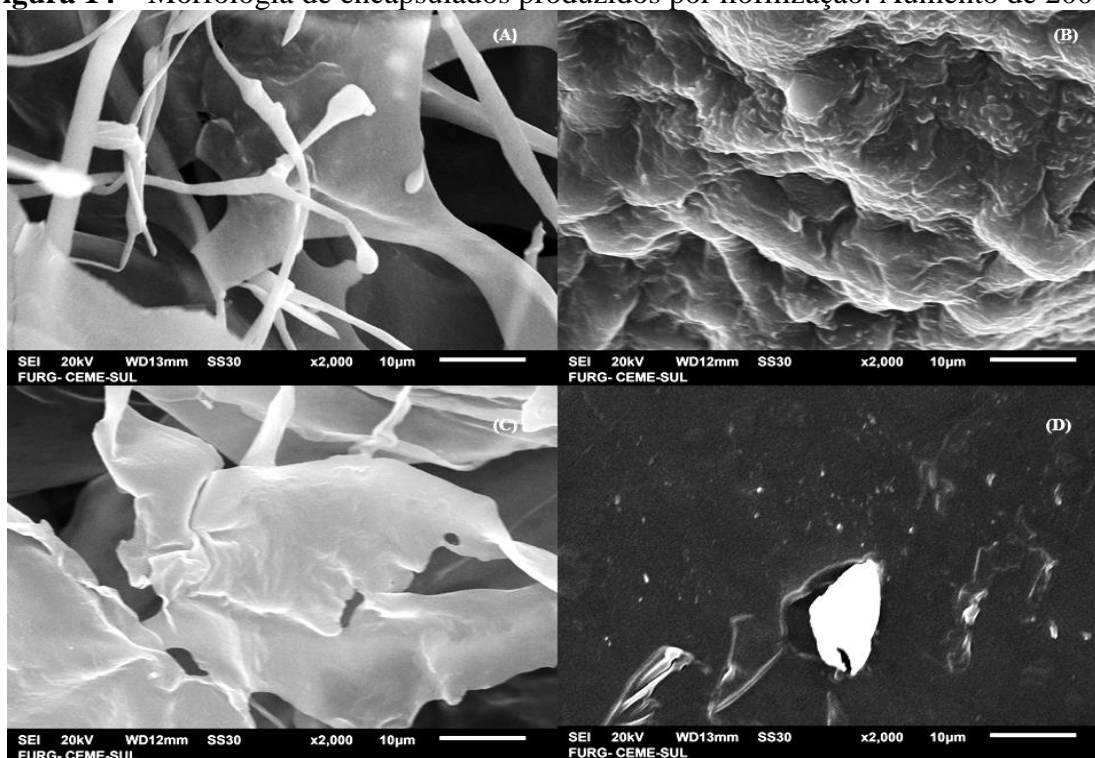
Em (A), no canto superior esquerdo da figura, a micrografia mostra a formulação F1, com liofilizado de nanopartículas de quitosana vazias; Em (B), no canto superior direito da figura, liofilizado da formulação F5 de encapsulados; Em (C), no canto inferior esquerdo da figura, liofilizado da formulação de encapsulados F6; Em (D), no canto inferior direito da figura, liofilizado da formulação de encapsulados F7.

É possível observar pelas micrografias, que após a encapsulação do óleo essencial de laranja, as formas se mostraram mais compactas, e os poros, antes vazios, das

nanopartículas de quitosana, agora estão preenchidos com o óleo essencial de laranja. O processo de liofilização destes encapsulados garante um produto de excelente qualidade uma vez que minimiza as alterações associadas à altas temperaturas (AZEREDO, 2005).

As micrografias de MEV da Figura 14, a seguir, ilustram os encapsulados em um aumento maior, de 2000 vezes, evidenciando suas estruturas. Nas análises de MEV com um aumento de 2000 vezes, é evidenciado que a estrutura dos liofilizados tem o aspecto saturado e inchado com a incorporação do óleo essencial de laranja, mesmo em uma quantidade pequena como na formulação F7.

Figura 14 – Morfologia de encapsulados produzidos por liofilização. Aumento de 2000X



Em (A), no canto superior esquerdo da figura, a micrografia mostra a formulação F1, com liofilizado de nanopartículas de quitosana vazias; Em (B), no canto superior direito da figura, liofilizado da formulação F5 de encapsulados; Em (C), no canto inferior esquerdo da figura, liofilizado da formulação de encapsulados F6; Em (D), no canto inferior direito da figura, liofilizado da formulação de encapsulados F7

5.2.2. Eficiência de Encapsulação

A eficiência de encapsulação das três formulações foi determinada por gravimetria. O método baseou-se na retirada dos encapsulados por sucessivas centrifugações e a separação da lecitina excedente por extração líquido-líquido com solvente clorofórmio em funis de separação. Após estas etapas, a fração contendo óleo essencial de laranja livre (não encapsulado) foi evaporada em evaporador rotativo, e posterior ao resfriamento dos balões, foi realizada a medição de massa. A Tabela 7, a seguir, mostra os resultados desta etapa. Os

experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.

Tabela 7 – Eficiência das formulações de encapsulados de óleo essencial de laranja

Formulação	Proporção parede: núcleo	Eficiência de encapsulação (%)
F5	1:1	61,05 \pm 9,55 b
F6	3:1	97,79 \pm 1,29 a
F7	5:1	99,32 \pm 0,23 a

*Médias na mesma coluna com letras iguais não diferem significativamente pelo Teste de Tukey HSD ($p \geq 0,05$)

Analisando os dados da Tabela 7 é possível verificar que nanopartículas de quitosana são eficazes na encapsulação do óleo essencial de laranja, tendo os valores de eficiência de encapsulação ficado acima de 60%. A maior eficiência foi obtida pela formulação F7 onde mais de 99% do óleo essencial adicionado ficou retido nas nanopartículas. Outro fator verificado por este estudo foi que ocorre um ponto de saturação de encapsulação. Isto pôde ser observado pela formulação F5, onde óleo essencial de laranja foi adicionado na mesma quantidade em massa de material de parede (quitosana). A eficiência de encapsulação desta formulação ficou abaixo das outras duas formulações, tendo seu valor diferido significativamente das demais, e indicando assim, que há um ponto de saturação deste composto ativo pelas nanopartículas.

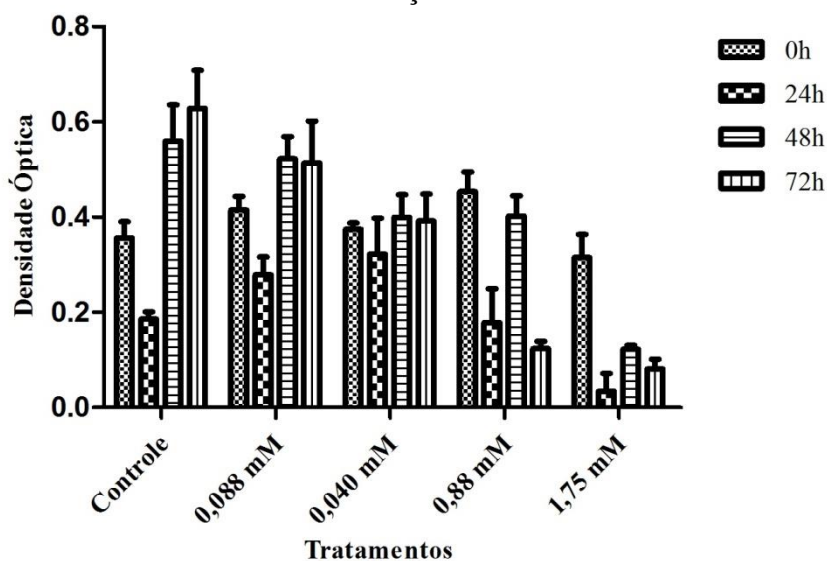
5.3. Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

5.3.1. Avaliação da citotoxicidade *in vitro* do solvente ácido acético

O intuito com os ensaios com soluções de ácido acético foi determinar qual a concentração deste ácido que não tivesse efeito tóxico para as células e assim, utilizar-se desta concentração para a ressuspensão das nanopartículas brancas e contendo óleo essencial de laranja.

O gráfico da Figura 15, a seguir, ilustra os resultados do teste MTT para as soluções de ácido acético. Este ilustra a densidade óptica (viabilidade celular) em função dos tratamentos. Analisando os dados pode-se perceber como o cultivo celular se comportou em cada tratamento. O grupo controle, que recebeu somente água, cresceu ao longo das 72h de incubação. Isto também ocorreu, porém, moderadamente em menor escala, com o grupo que recebeu como tratamento solução de ácido acético de concentração 0,08 mM. Nos outros três tratamentos é possível verificar o dano celular resultando em morte e, conseqüentemente, menores taxas de atividade mitocondrial na redução do agente colorimétrico MTT.

Figura 15 – Resultados de viabilidade celular em função dos tratamentos realizados com diferentes concentrações de ácido acético.



Os dados de citotoxicidade do ácido acético contidos neste trabalho são semelhantes a outros dados citotóxicos deste ácido encontrados na literatura, porém, em linhagens celulares distintas: Dought (1994) promoveu estudos sobre este ácido em cultura de fibroblastos humanos. Os resultados deste autor mostraram que uma solução de concentração 0,25% v/v deste ácido se mostrava tóxica e uma diminuição na citotoxicidade foi conseguida com a diminuição da concentração (soluções de 0,125% e 0,025%), porém, somente na concentração de 0,0025% este ácido não promoveu a morte celular na linhagem de fibroblastos.

Para a linhagem de células ZFL, utilizadas neste trabalho, a concentração de 0,0025% (0,04 mM) foi tóxica, promovendo a morte celular e evidenciando a diferença na sensibilidade entre culturas celulares distintas. Em estudos com micro-organismos, esta mesma concentração de ácido acético (0,0025%) promoveu fraca inibição de microrganismos como *Staphylococcus aureus*, moderada inibição para *Pseudomonas aeruginosa* e sem efeito para *Escherichia coli* conforme estudos realizados por McKenna (1991).

Estes estudos de citotoxicidade e inibição de micro-organismos patógenos por soluções de ácido acético são de grande valia para a área de alimentos, no que tange à segurança alimentar. De acordo com a ANVISA (2010), o ácido acético pode ser utilizado nestas indústrias como regulador de acidez, conservador e acidulante, porém, não foram encontrados na legislação consultada, limites máximos deste composto químico. Para correção de pH em conservas de hortaliças não há um limite estabelecido (BRASIL, 1977) e o padrão de identidade e qualidade do vinagre (BRASIL, 2012) não dispõe sobre o limite deste

composto químico nestes produtos. Estudos como este, sobre os efeitos tóxicos deste ácido, mesmo que em ensaios *in vitro* são relevantes para o desenvolvimento da utilização segura deste composto.

5.3.2. Avaliação da citotoxicidade *in vitro* de nanopartículas de quitosana

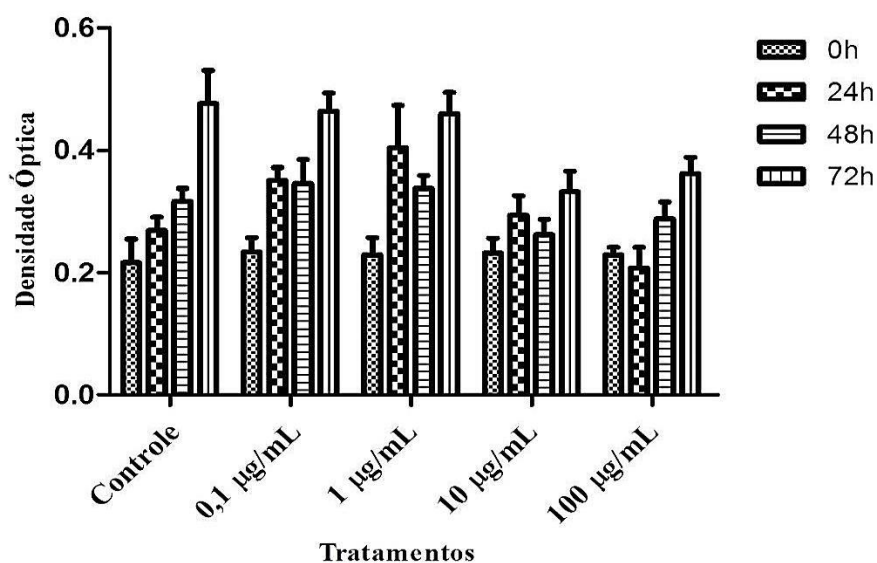
Com os dados de citotoxicidade do solvente ácido acético, foi dado seguimento nas etapas do projeto de pesquisa. Nanopartículas de quitosana foram liofilizadas e sua massa determinada para o início dos testes de citotoxicidade. Como não foram encontrados na literatura estudos destes materiais em células da linhagem ZFL, optou-se por uma triagem inicial de concentrações que variaram entre 0,1 µg/mL e 100 µg/mL. Esta faixa de concentrações foi determinada em função da solubilização adequada das nanopartículas de quitosana, pois se fazia necessário uma solução homogênea e com concentrações mais elevadas de nanopartículas, isto não era possível.

Os resultados referentes ao teste de citotoxicidade de nanopartículas de quitosana vazias estão ilustrados nos gráficos da Figura 16. Semelhantemente como ilustrado para os testes de MTT para soluções de ácido acético, o gráfico mostra a densidade óptica (viabilidade celular) em função dos tratamentos. O grupo controle foi tratado com a mesma quantidade da solução de ácido acético, porém, sem nanopartículas de quitosana.

Analisando os dados, fica evidente a não toxicidade das soluções de nanopartículas de quitosana no cultivo de células da linhagem ZFL: Os tratamentos contendo soluções de 0,1 µg/mL e 1 µg/mL mostraram crescimento bem semelhantes ao controle. Os tratamentos contendo as concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL apesar de menor proporção em relação ao controle, também apresentaram crescimento celular. A diferença entre os cultivos contendo 10 µg/mL e 100 µg/mL e o controle não diferem significativamente.

Testes de citotoxicidade de nanopartículas vêm sendo largamente realizados por pesquisadores ao redor do mundo. Este fato se deve às crescentes descobertas sobre o potencial promissor destas nas diversas áreas do conhecimento, com ênfase nas áreas de medicina e alimentos. Apesar das inúmeras vantagens, os efeitos de nanopartículas em sistemas biológicos ainda são imprevisíveis (NAFEE et al., 2009).

Figura 16 – Resultados de viabilidade celular em função dos tratamentos realizados com diferentes concentrações de nanopartículas de quitosana brancas



Devido a esta situação de desenvolvimento do tema, a pesquisa tem direcionado seus esforços em nanopartículas constituídas de materiais considerados biocompatíveis. A quitosana é considerada segura, regulamentada em muitos países como Japão, Itália e Estados Unidos e é utilizada na liberação controlada de medicamentos por ter propriedades como mucoadesividade e permeabilidade (DODDANE et al., 1999; LEE et al., 2001). Apesar da segurança da quitosana, outros vários autores atentam para o fato de que polímeros catiônicos, como a quitosana, poderiam levar a dano celular por possíveis interações entre este polímero e a membrana plasmática e interações de sua carga positiva com proteínas e outros componentes celulares (FISCHER et al, 2003; LV et al, 2006).

Tendo como base estes estudos, as investigações sobre citotoxicidade de nanopartículas compostas deste material ainda se fazem essenciais para a compreensão e desenvolvimento da chamada nanotoxicologia. O presente trabalho colaborou com o tema ao investigar a citotoxicidade de nanopartículas de quitosana formuladas com lecitina, um componente presente em membranas celulares, o que poderia diminuir a possibilidade de eventuais danos. A escolha por cultivo de células de hepatócitos de *zebrafish* (*Danio rerio*) também foi de grande valia. Cultura de células de fígado (hepatócitos) é um valioso modelo em estudos de toxicologia *in vitro*. Estas células podem ser utilizadas para estudar fatores que influenciam a expressão e regulação do sistema de oxidação do citocromo P450, bem como verificar a produção de metabólitos bioativos por compostos xenobióticos (COLLODI et al., 1992) e hepatócitos de *zebrafish* apresentam propriedades em cultura que são associadas com diferentes células de fígado, *in vivo* (GOSH et al., 1994).

Os resultados deste trabalho são semelhantes aos estudos de Loh e colaboradores (2010), que investigaram a citotoxicidade de nanopartículas de quitosana e tripolifosfato de sódio (porém, sem lecitina de soja em sua formulação) em cultivo de hepatócitos humanos (linhagem BHAL). Em uma concentração superior, de 5 mg/mL, em relação a utilizada neste trabalho (na ordem de microgramas), hepatócitos humanos toleraram estas nanopartículas por um período de 4 horas, utilizando-se do teste colorimétrico MTT. Estes mesmos autores, em 2012, estudaram a citotoxicidade de nanopartículas de quitosana em cultivo de células da linhagem Caco-2. Estas células são extraídas de adenocarcinoma de cólon humano. Foi verificado pelos autores que estas nanopartículas são citotóxicas e que seu tamanho nanométrico influencia bem mais severamente na citotoxicidade do que a carga superficial destas partículas.

As nanopartículas utilizadas nos ensaios de citotoxicidade deste trabalho tinham como características físico-químicas o tamanho médio de $668,93 \pm 3,2$ nm e carga superficial positiva de $15,6 \pm 3,5$ mV. A não toxicidade em hepatócitos de *zebrafish*, evidenciada pelo teste de viabilidade celular MTT, pode ser atribuída possivelmente à baixa concentração estudada.

5.3.3. Avaliação da citotoxicidade *in vitro* de nanopartículas de quitosana contendo óleo essencial de laranja.

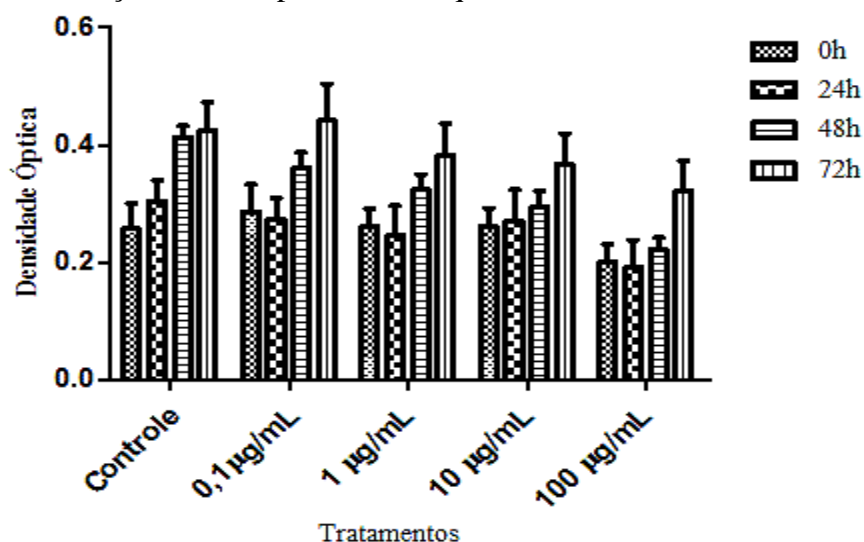
Após os resultados de citotoxicidade do ácido acético e de nanopartículas de quitosana vazias em hepatócitos da linhagem ZFL, nanopartículas de quitosana contendo óleo essencial de laranja foram submetidos à avaliação da citotoxicidade. Como não foram encontrados na literatura dados referentes a estes materiais nesta linhagem celular, optou-se por uma triagem inicial variando as concentrações entre 0,1 µg/mL e 100 µg/mL. A formulação F7 foi a escolhida para esta etapa. Os nanoencapsulados produzidos por esta formulação possuem como características físico-químicas o tamanho médio de $801,95 \pm 43,2$ nm e potencial zeta de $29,9 \pm 3,51$ mV.

Os resultados referentes ao teste de citotoxicidade de nanoencapsulados de óleo essencial de laranja estão ilustrados no gráfico da Figura 17. Semelhantemente como ilustrado para os testes de MTT para nanopartículas de quitosana vazias, o gráfico da Figura 17 ilustra os resultados plotando-se os dados em função dos tratamentos. O grupo controle foi tratado com a mesma quantidade da solução de ácido acético, porém, sem nanoencapsulados.

Analisando os dados, não houve diferença significativa entre os tratamentos e o grupo controle, evidenciando assim a não toxicidade dos nanoencapsulados. É possível

verificar também flutuações de resultados dentro dos tratamentos, porém, esta diferença na variância não promove resultados errôneos. Não foram encontrados na literatura trabalhos semelhantes que fossem passíveis de comparação com os dados de citotoxicidade deste trabalho.

Figura 17 – Resultados de viabilidade celular em função dos tratamentos realizados com diferentes concentrações de nanopartículas de quitosana contendo óleo essencial de laranja



6. CONCLUSÕES

Foi possível o preparo de nanopartículas de quitosana pelo método de geleificação iônica, utilizando-se como poliânions, o tripolifosfato de sódio e lecitina de soja. Pode-se concluir que os parâmetros físico-químicos destas nanopartículas, com exceção da morfologia analisada por MEV, são regidos pela proporção dos componentes quitosana e tripolifosfato de sódio.

Ficou demonstrado que nanopartículas de quitosana são eficientes na encapsulação do óleo essencial de laranja, e que, a incorporação deste composto bioativo por estas nanopartículas alteram suas características físico-químicas, contribuindo no aumento do tamanho médio, na estabilização das suspensões coloidais e na mudança da morfologia.

Através dos testes de citotoxicidade *in vitro*, com cultivo de células da linhagem ZFL, foi verificado o efeito citotóxico do solvente ácido acético nas concentrações a partir de 0,04 mM.

Soluções de nanopartículas de quitosana vazias, com concentrações variando entre 0,1 µg/mL a 100 µg/mL e soluções de nanoencapsulados de óleo essencial de laranja de mesmas concentrações, não se mostraram citotóxicas ao longo de 72 horas de exposição em cultivo de hepatócitos de zebrafish.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABURTO, L.C.; TAVARES, D.Q.; MARTUCCI, E.T. Microencapsulação de óleo essencial de laranja. **Food Science and Technology**, v. 18, n.1, 1998.

ADORNE, M.; BUTTENBENDER, S.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. **Avaliação físico-química de nanocápsulas poliméricas multiparedes estabilizadas por polissorbato 80/lecitina revestidas com diferentes concentrações de quitosana para futura funcionalização com espécies moleculares**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS, 12., 2013, Florianópolis. Anais...: Florianópolis, Associação Brasileira de Polímeros, 2013.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**. 5th edition. New York, USA: Garland Science, 2007, 1392 p.

ANVISA, (2009) – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde**. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br/> > Acesso em: fevereiro de 2014.

ANVISA (2010) – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Regulamento Técnico sobre aditivos alimentares autorizados segundo as Boas Práticas de Fabricação (BPF)**. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br/>>. Acesso em: 10 dez, 2014.

ARAÚJO, F.G. **Ácidos graxos dietéticos em parâmetros reprodutivos de fêmeas de Zebrafish (*Danio rerio*)**. 2012. 105 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos Teoria e Prática**. 2 ed. Viçosa:UFV, 1999. 601 p.

ARAÚJO, R.S. **Desenvolvimento, caracterização e liofilização de nanopartículas e encapsulamento de antibiótico de uso veterinário**. 2009. 110f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2009.

ASCHERI, D. P. R.; MARQUEZ, M. O. M.; MARTUCCI, E. T. Microencapsulação de óleo essencial de laranja: Seleção de material de parede. **Food Science and Technology**, v. 26, p. 1 – 6, 2003.

ASSIS, L.M.; ZAVAREZE, E.R.; PRENTICE-HERNANDEZ, C.; SOUZA-SOARES, L.A. Características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.15, n.2, p. 99-109, 2012

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

BARROS, C. B. **Óleos essenciais cítricos do Brasil**. 2 ed. Campinas: Fundação Cargill, 1986. 45p.

BATTISTI, M. V.; CAMPANA-FILHO, S.P. Obtenção e caracterização de α – quitina e quitosanas de cascas de *Macrobrachium rosembergii*. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2014 – 2019, 2008.

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.

BLANCO, M.A. **Avaliação da incorporação de nanopartículas de quitosana ao cimento endodôntico AH PLUSTM**. 2011. 66f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

BOUWMEESTER, H.; DEKKERS, S.; NOORDAM, M. Y.; HAGENS, W. I.; BULDER, A. S.; HEER, C.; VOORDE, S. E. C. G.; WIJNHOFEN, S. W. P.; MARVIN, H. J. P.; SIPS, A. J. A. M. Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.53, n. 1, p. 52 – 62, 2009.

BRAGA, H. C. **Os óleos essenciais do Brasil: Estudo econômico**. Rio de Janeiro: Instituto de óleos do Ministério da Agricultura, 1971. 86p.

BRASIL, (2010). **Tecnologia de ponta: Nanotecnologia**. Disponível em: < <http://www.brasil.gov.br/ciencia-e-tecnologia/2010/08/nanotecnologia> > Acesso em: setembro de 2013.

BRASIL. **Resolução - CNNPA nº 13, de 15 de julho de 1977**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/resol/13_77.htm>. Acesso em: 10 dez, 2014.

BRASIL. **Instrução Normativa nº6, de 3 de abril de 2012**. Disponível em: <<http://www.ivegetal.com.br/>>. Acesso em 10 dez, 2014.

BRITTO, D.; MOURA, M.R.; AOUADA, F.A.; PINOLA, F.G.; LUNDSTEDT, L.M.; ASSIS, O.B.G.; MATTOSO, L.H.C. Nanopartículas de trimetil quitosana. I - Caracterização e eficácia de encapsulamento de vitaminas hidrossolúveis. In: WORKSHOP DA REDE DE NANOTECNOLOGIA APLICADA AO AGRONEGÓCIO, 8., 2013, Juiz de Fora. **Anais...** São Carlos, SP: Embrapa Instrumentação;

BRUST, M.; KIELY, C.J. Some recent advances in nanostructure preparation from gold and silver particles: a short topical review. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 202, p. 175 – 186, 2002.

BUZANELLO, R.A.S. **Nanoencapsulação de curcumina em polímeros biodegradáveis/biocompatíveis**. 2013. 96f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2013.

CALVO, P.; REMUNÁN-LÓPEZ, C.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Development of positively charged colloidal drug carriers: Chitosan coated polyester nanocapsules and submicron-emulsions. **Colloid and Polymer Science**, v. 275, n. 1, p. 46 – 53, 1997.

CASTEJON, L.V. **Estudo da clarificação da lecitina de soja**. 2010. 133f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

CAZARIN, K. C. C.; CORRÊA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: Uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 3, p. 289 – 299, 2004.

CHAU, C. F.; WU, S. H.; YEN, G. C.; The development of regulations for food nanotechnology. **Trends in Food Science & Technology**, n.18, p. 269 – 280, 2007.

CHAUDHRY, Q.; SCOOTER, M.; BLACKBURN, J.; ROSS, B.; BOXALL, A.; CASTLE, L.; WATKINS, R.; AITKEN, R. Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. **Food Additives & Contaminants**, v. 25, n. 3, p. 241 – 258, 2008.

COLLODI, P.; KAMEI, Y.; ERNST, T.; MIRANDA, C.; BUHLER, D. R.; BARNES, D. W. Culture of cells from zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryo and adult tissues. **Cell Biology and Toxicology**, v. 8, n. 1, p. 43 – 61, 1992.

COSTA, A.C.F.M.; VILAR, M.A.; LIRA, L.H.; KIMINAMI, R.H.G.A.; GAMA, L.; Síntese e caracterização de nanopartículas de TiO₂. **Cerâmica**, v. 52, p. 255-259, 2006.

DALAGNOL, M. **Desenvolvimento de sistemas de liberação nano e microestruturados constituídos de complexos de lecitina e quitosana para a liberação colônica de naringenina**. 2011. 156f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

DEDAVID, B.A.; GOMES, C.I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura: Aplicações e preparo de amostras – Materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. Porto Alegre : EDIPUCRS, 2007.

DEPYPERE, F.; DEWETTINCK, K.; RONSSE, F.; PIETERS, J. Food powder microencapsulation: principles, problems and opportunities. **Applied Biotechnology, Food Science and Policy**, v.1, n.2, p. 75-94, 2003.

DODANE, V.; AMIN-KHAN, M.; MERWIN, J.R. Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. **International Journal of Pharmaceutics**, v.182, p. 21-32, 1999.

DOUGHTY, D.A. A rational approach to the use of topical antiseptics. **Journal of Wound, Ostomy and Continence Nursing**, v.21, n.6, p. 224-231, 1994

FAI, A. E. C.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M. Potencial biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 9, n. 5, p. 435 – 451, 2008.

FARIA-TISCHER, P. C. S.; TISCHER, C. A. Nanobiotechnology: platform technology for biomaterials and biological applications the nanostructures. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, n.1, p. 32 - 53, 2012.

FERNANDES, I. J.; KIELING, A. M.; BREHM, F. A.; AGOSTI, A.; MORAES, C. A. M. Avaliação da extração de óleo essencial do resíduo de casca de laranja. In: **4º Fórum Internacional de Resíduos Sólidos**. Porto Alegre, Brasil. 2013

FERNANDÉZ-URRUSUNO, R. CALVO, P.; REMUNAN-LOPÉZ, C.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO, M.J. Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 16, n.10, p. 1576-1581, 1999.

FERREIRA, H. S.; RANGEL, M. C. Nanotecnologia: Aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1860 – 1870, 2009.

FIGUEIREDO, E. R. **Estudo fitoquímico e avaliação biológica dos extratos de *Trichilia casaretti* e *Trichilia silvatica* (Meliaceae)**. 2010. 150 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Federal do Norte Fluminense, Campo dos Goytacazes, 2010.

FISCHER, D.; LI, Y.; AHLEMEYER, B.; KRIEGLSTEIN, T. In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. **Biomaterials**, v. 24, p. 1121-1131, 2003.

FOLADORI, G.; INVERNIZZI, N. **Nanotecnologías en la Alimentación y Agricultura**. Montevideo: Universidad de la República, 2008. 116 p.

FREITAS, A.G.O. **Síntese, nanoencapsulamento e atividade biológica de compostos triazenos**. 2012. 156f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria 2012.

FRESHNEY, R.I.; **Culture of Animal Cells: A manual of basic technique**. 5ª edição. Hoboken, New Jersey: Ed. John Wiley and Sons Inc., 2005. 642 p.

GARCIA, M.; FORBE, T.; GONZALEZ, E. Potential applications of nanotechnology in the agro-food sector. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, n.3, p. 573-581, 2010.

GIBBS, B.F.; KERMASHA, S.; ALLI, I.; MULLIGAN, C.N. Encapsulation in the food industry: a review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.50, n.3, p. 213-224, 1999.

GOMES, G.V.L. **Produção e caracterização microestrutural de sistemas lipídicos sólidos micro e nanoparticulados utilizados na encapsulação do beta-caroteno**. 2011. 100f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2011.

GOMES, M. S.; CARDOSO, M. G.; MACHADO, S. M. F.; MALLETT, A. C. T.; MIRANDA, C. A. S. F.; ANDRADE, J.; SILVA, L. F.; TEIXEIRA, M. L. Caracterização química do óleo essencial extraído das cascas de laranja e atividade antioxidante utilizando dois métodos de análise. **50º Congresso Brasileiro de Química**. Cuiabá, MT. 2010.

GONSALVES, J.K.M.C.; COSTA, A.M.B.; SOUZA, D.P.; CAVALCANTI, S.C.H.; NUNES, R.S. Microencapsulação do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L) Osbeck pelo método da coacervação simples. **Scientia Plena**, v. 5, n.11, 2009.

GOSH, C.; ZHOU, Y. L.; COLLODI, P. Derivation and characterization of a zebrafish liver cell line. **Cell Biology and Toxicology**, v. 10, p. 167 – 176, 1994.

GUYON, J. R.; STEFFEN, L. S.; HOWELL, M. H.; PUSACK, T. J.; LAWRENCE, C.; KUNKEL, L. M. Modeling human muscle disease in zebrafish. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease**, v. 1772, n. 2, p. 205 – 215, 2007.

HAYES, L. A. W. **Principles and methods of toxicology**. 2001. 2296 p. 4^a ed. London: Taylor & Francis, 2001. cap. 18, p. 853-916.

JARDIM, K. V. **Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana/sulfato de condroitina para nanoencapsulação da curcumina visando sua liberação controlada e avaliação de sua atividade antitumoral**. 2013. 115 p. Dissertação (Mestrado em Ciências de Materiais) – Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

JAWAHAR, P.; BALASUBRAMANIAN, M. Preparation e properties of polyester-based nanocomposite gel coat system. **Journal of Nanomaterials**, v. 206, 2006.

JOHNSON, C.S.; GABRIEL D.A.; Laser Light Scattering - A book review. **Biophysical Journal**, v.69, p. 287, 1995.

LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T. Quitosana: Biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 672 – 678, 2009.

LARINI, L.; **Toxicologia**. 3^a edição. Araraquara, SP: Editora Manole Ltda, 1987. 301 p.

LEE, M.; NAH, J.W.; KWON, Y.; KOH, J.J.; KO, K.S.; KIM, S.W. Water-soluble and low molecular weight chitosan-based plasmid DNA delivery. **Pharmaceutical Research**, v.18, p. 427-431, 2001.

LIMA, I. O.; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n.2, p. 197 – 201, 2006.

LOH, J.W.; YEOH, G.; SAUNDERS, M.; LIM, L.Y. Uptake and cytotoxicity of chitosan nanoparticles in human liver cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 249, p. 148-157, 2010.

LOH, J.W.; SAUNDERS, M.; LIM, L.Y. Cytotoxicity of monodispersed chitosan nanoparticles against the Caco-2 cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.262, n.3, p. 273-282, 2012.

LV, H.; ZHANG, S.; WANG, B.; CUI, S.; YAN, J. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 114, p. 100-109, 2006.

MACHADO, A.R. **Avaliação biológica da *Spirulina* em tamanho micro e nanométrico e estudo da sua encapsulação em lipossomas**. 2012. 135f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2012.

MACHADO, A.R.; ASSIS, L.M.; MACHADO, M.I.R.; SOUZA-SOARES, L.A. Importance of lecithin for encapsulation processes. **African Journal of Food Science**, v. 8, n.4, p. 176-183, 2014.

MALVERN. **Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes**. Version 4, Technical Note, 2014a. Disponível em: < <http://www.malvern.com/br/support/resource-center/technical-notes/TN101104DynamicLightScatteringIntroduction.aspx> >. Acesso em: 10 jan, 2015.

MALVERN. **Dynamic light scattering - common terms defined**. Version 1, Whitepaper, 2014b. Disponível em: < <http://www.malvern.com/br/support/resource-center/Whitepapers/WP111214DLSTermsDefined.aspx> >. Acesso em: 10 jan, 2015.

MALVERN. **Zeta potential - An introduction in 30 minutes**. Version 3, Technical Note, 2014c. Disponível em: < <http://www.malvern.com/br/support/resource-center/technical-notes/TN101104ZetaPotentialIntroduction.aspx> >. Acesso em: 10 jan, 2015.

MERTINS, O. **Desenvolvimento e caracterização de vesículas lipossômicas compostas de fosfatidilcolina da lecitina de soja e quitosana**. 2004. 63f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

MCKENNA, P.J.; LEHR, G.S.; LEIST, P.; WELLING, R.E. Antiseptic effectiveness with fibroblast preservation. **Annals of Plastic Surgery**, v.27, n.3, p. 265-268, 1991.

MCTI, (2013) – MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO. **Iniciativa Brasileira de Nanotecnologia**. Disponível em: < <http://nano.mct.gov.br/noticias/iniciativa-brasileira-de-nanotecnologia-2013-08-20/> > Acesso em: set. 2013

MDIC, (2006) - MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR. Estratégia nacional de biotecnologia: Política de desenvolvimento da bioindústria. **Fórum de Competitividade de Biotecnologia**. Brasília, DF, Jul de 2006.

MELO, C. P.; PIMENTA, M. Nanociências e Nanotecnologias. **Parcerias Estratégicas**, n. 18, p. 9 – 22, 2004.

MERCKMILLIPORE. **Estrutura molecular do D- Limoneno**. Disponível em:
< http://www.merckmillipore.com/brazil/chemicals/dl-limoneno/MDA_CHEM-814546/p_YrGb.s1LaPkAAAEWeOefVhTI > Acesso em: 12 de março de 2014.

MORARU, C. I.; PANCHAPAKESAN, C.; HUANG, Q.; TAKHISTOV, P.; LIU, S.; KOKINI, J. Nanotechnology: A new frontier in food science. **Food Technology**, v. 57, n. 12, p. 24 – 29, 2003.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55 – 63, 1983.

MOURA, C.; MUSZINSKI, P.; SCHMIDT, C.; ALMEIDA, J.; PINTO, L. Quitina e quitosana produzidas a partir de resíduos de camarão e siri: Avaliação do processo em escala piloto. **Vetor**, v. 16, p. 37 – 45, 2006.

MOZAFARI, M. R.; JOHNSON, C.; HATZIANTONIOU, S.; DEMETZOS, C. Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. **Journal of Liposome Research**, n. 4, v. 18, p. 309 – 327, 2008.

NAFEE, N.; SCHNEIDER, M.; SCHAEFER, U.F.; LEHR, C.M. Relevance of the colloidal stability of chitosan/PLGA nanoparticles on their cytotoxicity profile. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 381, p. 130-139, 2009.

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.

NAGAVARMA, B. V. N.; HEMANT, K. S. Y.; AYAZ, A.; VASUDHA, L. S.; SHIVAKUMAR, H. G. Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles – A review. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 5, n. 3, p. 16 – 23, 2012.

NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 29, n. 4, p. 273 – 300, 1990.

OPENWETWARE. **Redução do MTT pelas enzimas mitocondriais à formazan – ilustração.** Disponível em: < http://openwetware.org/images/3/35/Tetrazolium_to_formazan.jpg > Acesso em: fevereiro de 2014.

PEDROSO, G. L. **Influência do acesso aos próprios ovos no índice de massa corporal, no perfil lipídico sérico e na presença de gordura nos hepatócitos de *Danio rerio*.** 2011. 90 p. Dissertação (Mestrado em Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

PIMENTEL, L.F.; JUNIOR, A.T.G.; MOSQUEIRA, V.C.F.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 4, 2007.

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*.** 2012. 112 p. Dissertação (Mestrado em Neurociências) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

QI, L. XU, Z., JIANG, X.; HU, C.; ZOU, X.; Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Research**, v. 339, n.16, p. 2693-2700, 2004.

RAMARATHNAM, N.; OSAWA, T.; OCHI, H.; KAWAKISHI, S. The contribution of plant food antioxidants to humans health. **Trends in Food Science & Technology**, n. 3, v. 6, p. 75 – 82, 1995.

RAMPINO, A.; BORGOGNA, M.; BLASI, P.; BELLICH, B.; CÉSARO, A. Chitosan nanoparticles: preparation, size evolution and stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 455, n. 1-2, p. 219-228, 2013.

REBELLO, F. F. P.; Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Revista Agroambiental**, v.1, n.1, p. 134 – 144, 2009.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317 – 320, 2003.

ROSEMBERG, D. B.; RICO, E. P.; SENGER, M. R.; DIAS, R. D.; BOGO, M. R.; BONAN, C. D.; SOUZA, D. O. Kinect characterization of adenosine deaminase activity in zebrafish. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 151, p. 96 – 101, 2008.

ROY, N.; GAUR, A.; JAIN, A. BHATTACHARYA, S. RANI, V. Green synthesis of silver nanoparticles: An approach to overcome toxicity. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.36, p. 807 – 812, 2013.

SAHOO, S. K.; PARVEEN, S.; PANDA, J. J.; The present and the future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v.3, p. 20 – 31, 2007

SANTOS-MAGALHÃES, N.S.; PONTES, A.C.O.; PEREIRA, V.M.W.; CAETANO, M.N.P. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 208, p. 71 - 80, 2000.

SARGENTELLI, V.; Nanociência: Aplicações tecnológicas em química, saúde, agricultura e meio ambiente: uma sinopse. **Revista Eletrônica Ambiente Gestão & Desenvolvimento**, v.4, n.1, 2012.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726 – 737, 2003.

SCIENCE DIRECT. Pesquisa sobre a quantidade de trabalhos publicados relacionados ao tema. Disponível em: < [http:// www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com) > Acesso em: fev. de 2014.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D.; Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, n. 1, v. 32, p. 67 – 103, 1992.

SIGNINI, R.; CAMPANA-FILHO, S. P. Purificação e caracterização de quitosana comercial. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 4, p. 63 – 68, 1998.

SILVA, A. H. **Estratégias para a avaliação de sistemas nanoestruturados**. 2011. 138 p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

SILVA, H. S. R. C.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 776 – 785, 2006.

SILVA, S.C.; GUILHERME, L.R. Síntese e caracterização de partículas poliméricas para encapsulamento de óxido de ferro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 54, 2014, Natal. Anais...Natal: 2014.

SILVA-SANTOS, A.; BIZZO, H. R.; ANTUNES, A. M. R.; D'ÁVILA, I. A. A participação da indústria óleo-citrícola na balança comercial brasileira. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, n.4, p. 8 - 13, 2006.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1 – 20, 2001.

SOUZA, J.R. Obtenção e caracterização de nanocápsulas poliméricas ativas contendo óleo essencial de canela. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS, 21, 2014, Cuiabá. Anais eletrônicos.Cuiabá: 2014

STERN, S. T.; McNEIL, S. E. Nanotechnology safety concerns revisited. **Toxicological Sciences**, n. 101, v.1, p. 4 – 21, 2008.

SUH, J.K.; MATTHEW, H.W. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. **Biomaterials**, v. 21, n.24, p.2589 -2598, 2000.

TAVARES, I. S. **Obtenção e caracterização de nanopartículas de quitosana**. 2011. 54 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2011.

TIYABOONCHAI, W. Chitosan nanoparticles: A promising system for drug delivery. **Naresuan University Journal**, v. 11, n. 3, p. 51 – 66, 2003.

TODD, R. D. Microencapsulation and flavour industry. **Flavour Industry**, London, v.1, n.11, p. 768-771, 1970.

VITALE, A.; MANCIOCCO, A.; ALLEVA, E. The 3R principle and the use of non- humane primates in the study of neurodegenerative diseases: The case of Parkinson´s disease. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 33, p. 33 – 47, 2009.

VITALI, L.; LARANJEIRA, M.C.M.; GONÇALVES, N.S.; FÁVERE, V.T. Spray-dried chitosan microspheres containing 8-hydroxyquinoline -5 sulphonic acid as a new adsorbent for Cd(II) and Zn(II) ions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, n.2, p. 152-157, 2008.