



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E
NANOBIOTECNOLOGIA
MODALIDADE: MESTRADO**

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE NANOFORMULAÇÕES
CONTENDO ÓLEO DO FRUTO *Orbignya phalerata* Martius**

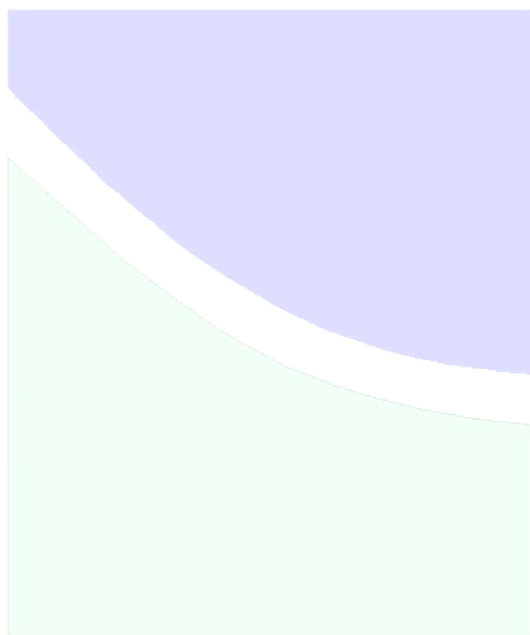
DÉBORA SILVA SANTOS

Brasília - DF

2015

DÉBORA SILVA SANTOS

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE NANOFORMULAÇÕES
CONTENDO ÓLEO DO FRUTO *Orbignya phalerata* Martius**



Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia como requisito para obtenção do Título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia pela Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Figueiró Longo

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Célia Pires Costa.

Brasília - DF

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

BIBLIOTECA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UNB

Sd Silva Santos, Débora
Desenvolvimento e avaliação do potencial antioxidante in vitro de nanoformulações contendo óleo do fruto *Orbignya phalerata* Martius / Débora Silva Santos; orientador João Paulo Figueiró Longo; co orientador Maria Célia Pires Costa . -- Brasília, 2015.
114 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia) -- Universidade de Brasília, 2015.

1. Nanotecnologia. 2. nanoemulsões. 3. óleo de babaçu. 4. estabilidade. 5. potencial antioxidante. I. Figueiró Longo, João Paulo , orient. II. Pires Costa , Maria Célia , co-orient. III. Título.

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE NANOFORMULAÇÕES
CONTENDO ÓLEO DO FRUTO *Orbignya phalerata* Martius**

BANCA EXAMINADORA:

A presente dissertação, submetida à Comissão Examinadora abaixo, foi aprovada para obtenção do grau de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Brasília- (DF), 01 de setembro 2015.

Prof. Dr. João Paulo Figueiró Longo - **Orientador**
Universidade de Brasília - UnB

Prof. Dra. Graziela Anselmo Joanitti - FCE/UnB
Membro Titular (Interno)

Prof. Dra. Livia de Lacerda de Oliveira Pineli - FS/UnB
Membro Titular (Externo)

Prof. Dr. Luís Alexandre Muehlmann - FCE/UnB
Membro Suplente (Interno)



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E NANOBIOTECNOLOGIA

Dissertação de Mestrado

Débora Silva Santos

Título:

“Desenvolvimento e Avaliação do Potencial Antioxidante In Vitro de Nanoformulações contendo óleo de fruto *Orbignya phalerata* Martius”

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. João Paulo Figueiró Longo
Presidente
UnB

Prof. Dra. Graziella Anselmo Joanitti
Membro Titular Interno vinculado ao Programa
UnB

Prof. Dra. Livia de Lacerda de Oliveira Pineli
Membro Titular Interno não vinculado ao programa
UnB

Brasília, 01 de setembro de 2015.

Dedicatória

Dedico todo este esforço a Deus por me guiar e proporcionar força, sabedoria, coragem, saúde, energia e determinação para concluir este trabalho.

Agradecimentos Especiais...

Ao meu Pai Supremo Deus por me guiar, por ser meu porto seguro, por me dá amor, força, sabedoria, energia, coragem e fé para enfrentar os desafios da vida;

Aos professores; Prof. Dr. João Paulo Figueiró Longo pela orientação, atenção, confiança e apoio científico nesta pesquisa. Ao Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo pelo carinho, simpatia, atenção, exemplo e apoio científico. A Profa. Maria Célia Pires Costa pela co-orientação, confiança, carinho, exemplo, amizade e apoio científico. Ao Prof. Dr. Paulo Eduardo N. de Souza do Instituto de Física (UnB) pela imensa contribuição e colaboração neste trabalho.

Aos meus familiares, meus pais; o Sr. Manoel S. Neto e a Sra. Deuzimar R. Silva, por estarem sempre ao meu lado ajudando-me em todos os momentos, dando-me amor, apoio e carinho. Aos meus queridos irmãos Denílson Santos, David Santos e a minha cunhada Raquel Marques pelos momentos de alegria, afeto, respeito e carinho. A minha amada filhinha e sobrinha Ingrid Emanuelle que me proporcionou muita felicidade e a todos os queridos primos, primas, tios e tias que sempre me receberam com alegria, festa e entusiasmo quando retornava e pelas palavras de incentivo e motivação que sempre ouvia.

Aos Pós-docs, técnicos e bolsistas de iniciação científica do Laboratório de Nanobiotecnologia; a Profa. Pós-doc Jaqueline Rodrigues pela atenção e contribuição, a Sra. Zélia Ramos pelo empenho, atenção e dedicação e a aluna de IC Marina Radicchi pela ajuda inicial na realização dos primeiros experimentos.

Aos meus companheiros de laboratório e bons amigos do mestrado; Rayane Ganassin, Mateus Gianizeli, Janaína Penteado, Sebastian Biswaro, Djalma Santos, Ana Lygia Câmara, Elis Regina, Fabiana Porto e Luiza Lima, que estiveram ao meu lado, me proporcionando momentos alegres e descontraídos durante o curso.

Às instituições, laboratórios e agências de fomento; Universidade de Brasília (UnB), Programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia (UnB), Laboratório de Nanobiotecnologia (UnB), Laboratório de Microscopia Eletrônica de Transmissão (UnB), Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), Laboratório de Macromoléculas e Produtos Naturais (UEMA), INCT em Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília (UnB) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de estudos.

A todos meus sinceros agradecimentos!!!!

Débora S. Santos

“Meu trabalho científico é motivado por um desejo irresistível de entender os segredos da natureza – por nada mais”.
(Albert Einstein 1879-1955).

RESUMO

Atualmente a utilização de sistemas nanoestruturados, tais como, nanoemulsões têm mostrado eficiência quanto ao transporte de substâncias lipofílicas. Sabe-se que o óleo de babaçu (*Orbignya phalerata* Martius) é referenciado na literatura, devido aos benefícios e propriedades nutricionais (fonte de ácidos graxos da família ω -6 linoleico e ω -9 oléico, potencial antioxidante e outros). No entanto, os efeitos destas propriedades podem ser comprometidos em razão do mesmo ser consumido no seu estado bruto. Dessa forma, faz-se necessário buscar por alternativas ou mecanismos que possibilitem aumentar a funcionalidade destas propriedades quanto à administração via oral deste óleo como suplemento alimentar. Logo, no presente trabalho objetivou-se desenvolver e caracterizar nanoemulsões a base de óleo babaçu avaliando sua estabilidade (macroscópica e nanoscópica) e seu potencial antioxidante. O óleo vegetal de babaçu (BBS) utilizado nesta pesquisa consiste em um produto extraído artesanalmente a partir das amêndoas contidas no interior do fruto. É oriundo de três localidades distintas do estado do Maranhão: Caxias (CAX), Fortuna (FOR) e Santa Quitéria (SQT). As nanoemulsões de babaçu (NEBBS) foram produzidas a partir de diferentes proporções em massa p/p (óleo/tensoativo) e submetidas aos testes de estabilidade em períodos distintos. Os resultados obtidos demonstraram nanoemulsões com diâmetro hidrodinâmico (DH) inferior a 100 nm e índice de polidispersão (PDI) com médias abaixo de 0,4 indicando sistemas com baixa polidispersividade. O potencial hidrogeniônico (pH) das NEBBS mostrou características levemente ácidas a neutra, ou seja, com valores de pH compreendidos na faixa de 5,0 – 7,7. O potencial zeta ζ (PZ) indicou a natureza da carga das gotículas predominantemente positiva. Os resultados referentes ao ponto isoelétrico (PI) mostraram que em pH = 3,0 os valores dos potenciais ζ aproximavam para carga nula (0). Os testes de estabilidade acelerada, centrifugação, ciclo de resfriamento e aquecimento, mostraram diferenças entre os grupos, houve influência da temperatura na distribuição do diâmetro hidrodinâmico. As imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) mostraram gotículas no formato esféricas e uma frequência de tamanho de 27 nm. A análise do potencial antioxidante demonstrou efeito maior para o óleo nanoestruturado. Em conclusão, os resultados demonstraram que a composição e a proporção da fase dispersa foram decisivas para obtenção de uma nanoemulsão contendo óleo de babaçu macroscopicamente e nanoscopicamente estável. A avaliação do potencial antioxidante por Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica - EPR indicou maior efeito para o óleo nanoestruturado em comparação ao óleo no estado livre ou bruto. Uma vez que o óleo de babaçu é um produto consumido na alimentação, as nanoformulações produzidas podem ser promissoras para aplicação na indústria de alimentos antioxidantes.

Palavras-chave: Nanotecnologia, nanoemulsões, óleo de babaçu, estabilidade, potencial antioxidante.

ABSTRACT

Currently the use of nanostructured systems, such as nanoemulsions have shown effectiveness for transport of lipophilic substances. It is known that the oil babassu (*Orbignya phalerata* Martius) is referenced in the literature, due to the benefits and nutritional properties (source of fatty acids of the ω -6 linoleic family and ω -9 oleic, antioxidant potential and others). However, the effects of these properties can be compromised due to it being consumed in their raw state. Thus, it is necessary to look for alternatives or mechanisms that enable increased functionality of these properties on the oral administration of this oil as a dietary supplement. Thus, the present study aimed to develop and characterize nanoemulsions oil-based babassu evaluating its stability (macroscopic and nanoscopic) and its antioxidant potential. Vegetable oil from babassu (BBS) used in this study consists of a handmade product extracted from almonds contained within the fruit. It is coming from three different locations in the state of Maranhão: Caxias (CAX), Fortuna (FOR) and Santa Quitéria (SQT). The nanoemulsions babassu (Nebbs) were produced from different mass ratios w / w (oil / surfactant) and subjected to stability tests at different times. The results showed nanoemulsions with hydrodynamic diameter (DH) of less than 100 nm and polydispersity index (PDI) with average below 0.4 indicating systems with low polydispersity. The hydrogenic potential (pH) of Nebbs showed slightly acid to neutral, that is, at pH values comprised in the range from 5.0 to 7.7. The zeta potential ζ (PZ) indicated the nature of the burden of predominantly positive droplets. The results of the isoelectric point (PI) showed that at pH = 3.0 the values of ζ potential approaching to zero load (0). Accelerated stability tests, centrifugation, cooling and heating cycle showed differences between groups no influence on the temperature distribution of the hydrodynamic diameter. The images obtained by Transmission Electron Microscopy (TEM) showed spherical droplets in shape and 27 nm in size frequency. The analysis demonstrated greater antioxidant potential effect on the nanostructured oil. In conclusion, the results showed that the composition and the proportion of dispersed phase are decisive for obtaining a nanoemulsion containing oil and babassu nanoscopically macroscopically stable. The evaluation of the antioxidant potential by Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy - EPR indicated a greater effect on the nanoestrurado oil compared to the free oil or raw. Once babassu oil is a product consumed in the diet, produced nanoformulations may be promising for application in the food industry antioxidants.

KEYWORDS: Nanotechnology, nanoemulsions, babassu oil, stability, antioxidant potential.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
LISTA DE TABELAS.....	iv
SÍMBOLOS, UNIDADES E FÓRMULAS.....	v
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. JUSTIFICATIVA.....	04
3. OBJETIVOS	
3.1. Geral.....	05
3.2. Específicos.....	05
4. REVISÃO DA LITERATURA	
Capítulo I. Nanotecnologia - Aspectos Gerais e Regulamentação.....	06
Capítulo II. Nanotecnologia de Alimentos.....	11
Capítulo III. Nanoemulsões - Conceitos, Formação e Aplicações.....	18
Capítulo IV. Métodos de Caracterização de Nanoemulsões.....	28
Capítulo V. Óleo de Babaçu (<i>Orbignya phalerata</i> Martius) generalidades, importância e aplicações.....	41
Capítulo VI. Potencial antioxidante em matrizes alimentares (óleos vegetais comestíveis) e método de avaliação por EPR.....	48
5. MATERIAL E MÉTODOS	
5.1. Desenho Experimental.....	58
5.2. Amostras e materiais utilizados.....	58
5.3. Formulação das nanoemulsões (NEBBS).....	59
5.4. Ensaio de Caracterização e Estabilidade.....	60
5.4.1. Avaliação do diâmetro hidrodinâmico (DH nm) das gotículas e índice de polidispersão - PDI.....	60
5.4.2. Potencial zeta (ζ) mV.....	61
5.4.3. Potencial Hidrogeniônico (pH).....	61
5.4.4. Ponto Isoelétrico – PI.....	62
5.4.5. Teste de centrifugação.....	62
5.4.6. Ciclo resfriamento e aquecimento.....	62
5.4.7. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	63
5.5. Ensaio <i>in vitro</i> das NEBBS estáveis	
5.5.1. Atividade antioxidante <i>in vitro</i> do óleo livre e das NEBBS.....	63
5.6. Análise estatística.....	64

6. RESULTADOS

6.1. Avaliação do Diâmetro Hidrodinâmico (DH nm) das gotículas e índice de polidispersão-PDI.....	65
6.2. Potencial Zeta (ζ) mV e Potencial Hidrogeniônico (pH).....	71
6.3. Ponto isoelétrico – PI.....	75
6.4. Teste de centrifugação.....	79
6.5. Ciclos de resfriamento e aquecimento.....	79
6.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	81
6.7. Ensaio <i>in vitro</i> do Potencial Antioxidante.....	83

7. DISCUSSÃO

7.1. Avaliação do Diâmetro Hidrodinâmico (DH nm) das gotículas e índice de polidispersão - PDI.....	89
7.2. Potencial Zeta (ζ) mV e Potencial Hidrogeniônico (pH).....	91
7.3. Ponto isoelétrico – PI.....	93
7.4. Teste de centrifugação.....	94
7.5. Ciclos de resfriamento e aquecimento.....	94
7.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	96
7.7. Ensaio <i>in vitro</i> do Potencial Antioxidante.....	97

8. CONCLUSÃO.....	100
--------------------------	------------

REFERÊNCIAS.....	101
-------------------------	------------

LISTA DE ABREVIATURAS

A/O/A: Água/Óleo/Água	PZ: Potencial Zeta
A/O: Água/Óleo	RH: Raio Hidrodinâmico
AA: Atividade Antioxidante	SDBS: Dodecil benzeno sulfonato de sódio
AH: Antioxidante	SDS: Dodecil Sulfato de sódio
ATP: Adenosina Trifosfato	SQT: Santa Quitéria
ANOVA: Análise de Variância	TAG: Triacilgliceróis
BBS: Babaçu	TCC: Triglicerídeos de Cadeia Curta
BHA: <i>Hidroxianisol butilado</i>	TCL: Triglicerídeos de Cadeia Longa
BHT: Hidroxitolueno butilado	TCM: Triglicerídeos de Cadeia Média
CAX: Caxias	TE: Tensoativo
CE: Concentração eficiente	TE1: Tensoativo Span 80
CE: Conselho da União Europeia	TE2: Tensoativo Tween 80
CI: Concentração inibitória	TE3: Tensoativo Cremophor
CO: Castor Oil (Óleo de Rícino)	TEAC: Capacidade antioxidante equivalente
CTAB: Brometo de cetil trimetil amônio	TGI: Trato Gastrointestinal
DH: Diâmetro Hidrodinâmico	TIF: Temperatura de Inversão de Fase
DLS: <i>Dynamic Light Scattering</i>	TRAP: Radical total – parâmetro de interceptação antioxidante
DMPD: N,N-dimetil-p-fenilenodiamina	UV-Vis: Ultravioleta Visível
DPPH•: 2,2-difenil-1-picril-hidrazil	
DTAB: Brometo de dodecil trimetil amônio	
EHL: Equilíbrio Hidrofílico Lipofílico	
EIP: Emulsion Inversion Point	
EPR: Ressonância Paramagnética Eletrônica	
ERN: Espécies Reativas de Nitrogênio	
ERO: Espécies Reativas de Oxigênio	
FDA: Food and Drug Administration	
FFDCA: Lei Federal de Alimentos, Medicamentos e Cosméticos	
FOR: Fortuna	
FRAP: <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> (Poder Antioxidante de Redução do Ferro)	
IBM: International Business Machines	
LDL: Lipoproteína de baixa densidade	
MDA: Malonil-dialdeído	
MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão	
MFA: Microscopia de Força Atômica	
NE: Nanoemulsão	
NEBBS: Nanoemulsão de Babaçu	
NP: Nanopartículas	
O/A: Óleo em Água	
O:TE: Razão entre Óleo: Tensoativo	
ORAC: Capacidade de absorção do radical oxigênio	
PCL: Quimioluminescência	
PDI: Índice de Polidispersão	
PEG: Polietileno glicol	
PI: Ponto Isoelétrico	
PIE: Ponto de Inversão da Emulsão	
PIT: <i>Phase Inversion Temperature</i>	
POE: <i>Polyoxyethylene</i>	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estatísticas sobre o número de publicações por ano publicadas usando o banco de dados da literatura Scopus, com os descritores "nanotecnologia" e "alimento" no título, resumo e palavras-chave.....	12
Figura 2. Classificação de nanosistemas de entregas.....	13
Figura 3. Métodos utilizados na produção de nanoemulsões de baixa demanda energética.....	19
Figura 4. Representação esquemática termodinâmica da energia livre de ativação (ΔG^*) de um sistema nanoemulsionado.....	22
Figura 5. Mensuração da distribuição do tamanho (nm) das partículas em DLS.....	30
Figura 6. Representação esquemática do Potencial Zeta de um coloide.....	33
Figura 7. Microscópio Eletrônico de Transmissão – MET.....	37
Figura 8. Palmeira de babaçu <i>Orbignya phalerata</i> Martius.....	42
Figura 9. Fórmula estrutural do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH').....	53
Figura 10. Mecanismos de estabilização do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH') pelo deslocamento do elétron desemparelhado.....	54
Figura 11. Mecanismos da reação entre o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH') e um antioxidante (AH) através da transferência de um átomo de hidrogênio.....	55
Figura 12. Sinal EPR do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH').....	56
Figura 13. Desenho Experimental da Pesquisa.....	58
Figura 14. Nanoemulsão a base de óleo de babaçu NEBBS01.....	65
Figura 15. Nanoemulsão a base de óleo de babaçu NEBBS02.....	66
Figura 16. Nanoemulsão a base de óleo de babaçu NEBBS03.....	67
Figura 17. Nanoemulsão a base de óleo de babaçu NEBBS04.....	68
Figura 18. Nanoemulsão a base de óleo de babaçu NEBBS05.....	68
Figura 19. Nanoemulsão a base de óleo de babaçu NEBBS06	69
Figura 20. Valor total do Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico (EHL) entre os componentes presentes nas nanoformulações.....	70
Figura 21. Potencial Zeta ζ (mV) e pH em função do tempo para a nanoemulsão NEBBS01.....	71
Figura 22. Potencial Zeta ζ (mV) e pH em função do tempo para a nanoemulsão NEBBS02.	72
Figura 23. Potencial Zeta ζ (mV) e pH em função do tempo para a nanoemulsão NEBBS03	72
Figura 24. Potencial Zeta ζ (mV) e pH em função do tempo para a nanoemulsão NEBBS04.....	73

Figura 25. Potencial Zeta ζ (mV) e pH em função do tempo para a nanoemulsão NEBBS05.....	74
Figura 26. Potencial Zeta ζ (mV) e pH em função do tempo para a nanoemulsão NEBBS06.....	74
Figura 27. Investigação do pH sobre o Potencial ζ nas nanoemulsões a base de óleo de babaçu.....	76
Figura 28. Diâmetro Hidrodinâmico – DH (nm) das nanoemulsões a base de óleo de babaçu dependente do pH.....	77
Figura 29. Valores do PDI em função do pH para as nanoemulsões a base de óleo de babaçu.....	78
Figura 30. Dados relacionados ao processo de centrifugação para as nanoemulsões a base de óleo de babaçu.....	79
Figura 31. Dados relacionados aos Índices de Polidispersão – PDI das NEBBS submetidas ao processo de resfriamento (4°C) e aquecimento (37,5°C).....	80
Figura 32. Fotomicrografias (MET) nanoemulsão NEBBS03 (1:4:2) p/p razão de óleo e surfactante.....	81
Figura 33. Curva de distribuição do tamanho (nm) das partículas presentes na nanoformulação NEBBS03.....	82
Figura 34. Espectro experimental EPR obtido do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH').....	83
Figura 35. Espectros experimentais EPR obtidos para as nanoformulações NEBBS02 e NEBBS03.....	85
Figura 36. Espectro experimental EPR obtido para óleo de babaçu livre na presença de radical DPPH'.....	86
Figura 37. Dados integrados do potencial antioxidante obtidos por EPR das amostras de ácido ascórbico, óleo de babaçu e nanoemulsões de babaçu na presença de DPPH'.....	87
Figura 38. Curva dose resposta CE50% da atividade antioxidante dos compostos ácido ascórbico, óleo de babaçu e nanoemulsões de babaçu.....	88
Figura 39. Dispersão das gotículas do óleo de babaçu livre.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características de alguns principais agentes tensoativos utilizados para produção de nanoemulsões.....	26
Tabela 2. Informações peculiares dos principais agentes de constrate usados em microscopia eletrônica de transmissão.....	39
Tabela 3. Tipos de ensaios para medição da atividade antioxidante.....	52
Tabela 4. Especificações dos materiais utilizados para produção das NEBBS.....	59
Tabela 5. Concentração dos óleos BBS/H ₂ O e proporções das formulações.....	60
Tabela 6. Dados do Diâmetro Hidrodinâmico (DH) das NEBBS submetidas aos ciclos de resfriamento e aquecimento.....	80

SÍMBOLOS, UNIDADES E FÓRMULAS

Σ : Somatório	mg/Kg : Miligrama por quilograma
μm : Micrómetro	mT : Militesla
Å : Ångström	mV : milivolts
AE : Diferença de energia	mW : Megawatt
Au : Ouro	n : Viscosidade
B : Campo magnético	N₂O : Óxido nitroso
C : Carbono	NaCl : Cloreto de Sódio
C₁₂:0 : Ácido graxo Dodecanóico	NaOH : Hidróxido de Sódio
C₁₂H₁₀O₁₄Pb₃ : Citrato de chumbo	Ni : Níquel
C₁₄:0 : Ácido graxo Tetradecanóico	nm : nanômetros
C₁₈:1 : Ácido graxo cis-octadec-9-enoico	NO : Óxido nítrico
C₁₈:2 : Ácido graxo cis,cis-9,12-octadecadienoico	NO₂ : Grupo nitro
C₁₈H₁₂N₅O₆ : Fórmula condensada do DPPH	NO₂⁻ : Nitritos
C₄H₆O₆U : Acetato de uranila	NO₃⁻ : Nitratos
C₅H₈O₂ : pentan-1,5-dial	O₂ : Oxigênio
Cu : Cobre	O₂⁻ : Superóxido
Cu²⁺ : Íon Cobre estado de oxidação 2+	ONOO⁻ : Peroxinitritos
D : Constante de difusão	Os : Ósmio
dB : Decibel	OsO₄ : óxido de ósmio (VIII)
EtOH : Etanol	P = 2γ/r : Forma simplificada da equação de Young-Laplace
Fe³⁺ : Íon Ferro estado de oxidação 3+	P : Pressão interna
g.mol⁻¹ : gramas x mol a -1	Pb : Chumbo
g/L : Unidade de concentração gramas por litro	r : Raio partícula esférica
g : Fator de proporcionalidade	RO : Alcoxila
G : Gauss	ROO : Peroxila
g : Unidade de massa gramas	rpm : Rotação por minuto
GHz : gigahertz	s : Segundo
h : Constante de Planck	t : Tempo
H₂O₂ : Peróxido de hidrogênio	T : Temperatura (°C)
HCl : Ácido Clorídrico	U : Urânio
HClO : Ácido hipocloroso	v : Frequência
HNO₂ : Ácido nitroso	W : Tungstênio
HO : Radical Hidroxila	β : constante de Bohr magneton
I : spin	γ : Energia livre interfacial
J/K : Unidade de energia joule por temperatura Kelvin	ΔG* : Energia livre Gibbs de ativação
k_b : Constante de Boltzmann	ΔG : Variação da energia de Gibbs
KHz : Quilohertz	ζ : Zeta
kt : Unidade de velocidade nó	λ : Comprimento de onda da radiação incidente
kV : Quilovolts	μ : Mobilidade eletroforética
m²/V.s. : Unidade de aceleração	π : Pi
MeOH : Metanol	πD_p : Circunferência de uma partícula
	ω : Ômega
	β : Beta

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, está cada vez mais eminente o uso da nanotecnologia para produção de nanoformulações e/ou nanomateriais, os quais podem ter diversas aplicações, tais como; detectar doenças com alta sensibilidade, melhorar a eficiência de atuais sistemas de entrega de princípios ativos, dispersar substâncias hidrofóbicas em fases aquosas e aumentar a absorção pelo sistema gastrointestinal (GHOSH *et al.*, 2013a).

Existem diversos tipos de nanoestruturas, uma delas são as nanoemulsões, estas possuem ampla aplicabilidade, pois podem ser usadas como nanocarreadores de compostos bioativos lipofílicos, fármacos ou nutrientes. Entre as principais vantagens, tem-se a alta estabilidade cinética, melhora a biodisponibilidade de compostos ativos, aumenta a permeabilidade de substâncias com baixa solubilidade e apresenta baixa turbidez quando comparadas aos sistemas de emulsões convencionais (GHOSH *et al.*, 2013a).

Segundo Anton & Vandamme *et al.*, (2011), nanoemulsões consistem em uma dispersão composta por uma fase oleosa (triglicerídeos ou hidrocarbonetos), tensoativo e uma fase aquosa (água ou água com adição de algum eletrólito) que apresenta gotas resistentes com diâmetro menor que 300 nm.

O pequeno tamanho de suas gotículas torna-se resistente a desestabilização física, devido ao movimento browniano existente entre as partículas, que contribui para superar forças de separação gravitacional, evitando assim a floculação e a coalescência. São resistentes também devido à estabilização estérica que é eficiente, em virtude dos tensoativos incorporados, os quais tendem a ter longas caudas hidrofóbicas na ordem de 2-10 nm (WOOSTER *et al.*, 2008). Estes são incorporados para reduzir a tensão interfacial e com isso, assumem um papel importante na estabilização das nanoemulsões (ANTON & VANDAMME, 2009).

À medida que as nanoemulsões tornam-se instáveis (do ponto de vista termodinâmico) algumas propriedades tais como; Diâmetro Hidrodinâmico (DH), Índice de Polidispersão (PDI), Potencial Hidrogênionico (pH) podem sofrer variações em função da temperatura ou outros elementos termodinâmicos, portanto, a avaliação da estabilidade destes parâmetros tem sua importância, uma vez que sinaliza para o conhecimento de formulações estáveis e monodispersas (MCCLEMENTS, 2012a).

Do ponto de vista cinético, as nanoemulsões são particularmente propensas a um crescimento no tamanho das partículas ao longo do tempo, decorrente da coalescência das gotículas de óleo dispersas, fenômeno este conhecido como amadurecimento de Ostwald (WOOSTER *et al.*, 2008). Logo, a avaliação da estabilidade em função do tempo é importante para indicar em qual momento este fenômeno ocorre.

Segundo Tamjidi *et al.*, (2013) a absorção de extratos e moléculas de caráter lipofílico ou lipídios, como os óleos vegetais, podem ser otimizados quando associadas a nanocarreadores como as nanoemulsões. Atualmente, óleos oriundos da flora brasileira possibilitam a obtenção de variados produtos, os quais podem ser empregados desde a escala macro até a nanométrica. Alguns óleos vegetais *in natura* extraídos de sementes contêm quantidades de compostos bioativos (ácidos fenólicos, flavonóides, flavonóis e antocianinas) que apresentam atividade antioxidante (Apak *et al.*, 2013), no presente estudo investigou-se o óleo de babaçu (*Orbignya phalerata* Martius).

Na literatura, há descrições que o óleo extraído da espécie *Orbignya phalerata* Martius, constitui uma fonte natural de ácidos graxos de importância nutricional, como o ácido graxo linoleico (ω -6) (SANTOS *et al.*, 2013; FERREIRA *et al.*, 2012; D'ANTON REIPERT *et al.*, 2011; ANVISA, 1999; VIANNI & BRAZ-FILHO, 1996). Possui ação antioxidante (Ferreira *et al.*, 2011) e é bastante utilizado para fins alimentícios em muitas comunidades rurais do estado do Maranhão (Almeida, 2001) entre outras finalidades.

O óleo de babaçu é rico em triacilgliceróis e possui quantidades também de fosfolipídios, vitaminas, pigmentos, fitoesteróis e tocoferóis. Os fitoesteróis são componentes naturais fundamentais para as membranas celulares, ajudam a diminuir os níveis de colesterol LDL (Lipoproteínas de Baixa Densidade em inglês *Low Density Lipoproteins*) no sangue (considerado o "colesterol ruim"). E os tocoferóis são considerados a fase lipídica mais eficaz de antioxidantes naturais que desempenham um papel importante na sinalização celular, especialmente em relação à proteína quinase C e apresentam propriedades anti-inflamatórias (BARBOSA *et al.*, 2012; WASULE *et al.*, 2014).

Entre os ácidos graxos majoritários presentes nas estruturas dos triacilgliceróis do óleo de babaçu destacam-se os ácidos graxos: Dodecanóico C12:0 (ácido láurico), tetradecanoico C14:0 (ácido mirístico), cis-octadec-9-enoico C18:1 (ácido oléico) e o cis,cis-9,12-octadecadienoico C18:2 (ácido linoleico) (SANTOS *et al.*, 2013; MACHADO *et al.*, 2006; D'ANTON REIPERT *et al.*, 2011).

Considerando-se a carência de estudos sobre a utilização do óleo de babaçu quanto a sua aplicação para a nanotecnologia de alimentos, faz-se necessário o desenvolvimento de pesquisas que demonstrem a possibilidade de produzir nanossistemas com ação antioxidante a partir da nanoestruturação do óleo de babaçu, uma vez que o mesmo constitui como fonte alimentar em muitas comunidades tradicionais do nordeste, especificamente situadas no estado do Maranhão. Dessa forma, investigar a nanoestruturação do óleo de babaçu e sua ação antioxidante propicia a obtenção de novos nanomateriais que podem ser empregados como suplementos na dieta e/ou alimentação humana.

2. JUSTIFICATIVA

Atualmente, são poucos os estudos disponíveis nas plataformas nanotecnológicas que demonstrem os efeitos e/ou benefícios do óleo de babaçu (*Orbignya phalerata* Martius). Tendo em vista que este óleo concentra teores de ácidos graxos de importância nutricional e possui ação antioxidante, essas informações dão subsídios quanto sua aplicação na nanotecnologia de alimentos, pois o mesmo pode ser explorado quanto ao seu uso em suplementos nutricionais ou repositores energéticos.

Um dos grandes desafios para a indústria de alimentos é o desenvolvimento de produtos estáveis que possa aumentar a capacidade de absorção e a eficácia de moléculas de baixa hidrossolubilidade, tais como, antioxidantes e/ou vitaminas lipossolúveis quando administradas pela via oral. Diante dessa realidade, torna-se imprescindível o desenvolvimento de pesquisas que visam buscar soluções para que alimentos e/ou moléculas lipossolúveis possam ser totalmente aproveitados pelo organismo humano.

A nanoestruturação do óleo de babaçu pode favorecer para que este alimento possa ser facilmente absorvido, mais biodisponível, melhorar sua ação antioxidante e por fim ser totalmente aproveitado. Dessa forma, este estudo busca a obtenção de novas nanoformulações mais eficientes, seguras e estáveis que demonstrem melhorar a ação antioxidante do óleo de babaçu, contribuindo assim para um melhor consumo deste produto, portanto, justifica-se a apresentação desta proposta de estudo.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

- Formular e caracterizar nanoemulsões, contendo extrato oleoso vegetal de babaçu *Orbignya phalerata* Martius.

3.2. Específicos

- Formular diferentes nanoemulsões (NE), contendo em sua composição óleo extraído do fruto *Orbignya phalerata* Martius, com adição de diferentes proporções de tensoativos;
- Avaliar a estabilidade das propriedades coloidais das nanoemulsões de babaçu (NEBBS);
- Determinar o Ponto Isoelétrico (PI) das NEBBS e submeter a ciclos de duas diferentes condições de temperatura;
- Caracterizar a morfologia das NEBBS estáveis;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do óleo livre e da NEBBS estável;

4. REVISÃO DA LITERATURA

CAPÍTULO I

- **Nanotecnologia - Aspectos Gerais e Regulamentação**

Durante a última década, o rápido progresso na área de nanociência despertou a comunidade científica na busca de novas aplicações tecnológicas correspondentes às nanotecnologias. O rápido crescimento nesta área estimulou a criação de redes de pesquisa a fim de permitir e reunir diferentes pesquisadores no campo da nanotecnologia (BELLUCCI, 2008).

Os nanomateriais podem ser preparados segundo uma abordagem *bottom-up* (“de baixo para cima”), construídos a partir de átomos ou moléculas individuais ou através do procedimento *top-down* (“de cima para baixo”), por meio da ruptura de uma porção maior do material em nanopartículas (NPs), com o uso de técnicas específicas para este procedimento (FERREIRA & RANGEL, 2009).

A expressão "nanopartículas (NPs)" é comumente usada para descrever partículas que não apresentam dimensão preponderante, as quais são criadas a partir de processos físicos e/ou químicos com propriedades e características que normalmente não estão presentes na macro-escala (FERREIRA *et al.*, 2013).

Partículas com dimensões na escala nanométrica (exemplo 100 nm ou menor), podem apresentar uma área de superfície maior em relação ao volume, do que em microescalas mais convencionais. Isto permite que estas partículas se dissolvam mais rapidamente, o que é importante para certas moléculas que não são muito solúveis em água (EDWARDS, 2006).

Conforme Ferreira & Rangel (2009), o termo nanotecnologia foi inicialmente introduzido pelo engenheiro japonês Norio Taniguchi, no qual ressaltava que a nanotecnologia consistia numa nova tecnologia que vai além do controle de materiais e da engenharia em microescala.

CAPÍTULO I. Nanotecnologia - Aspectos Gerais e Regulamentação

A nanotecnologia representa uma combinação única das áreas; matemática, física, química, biologia, informática e ciências dos materiais, que visam investigar e manipular a matéria na escala de nanômetros. Estruturas sub-micron modificadas são comparadas em tamanho a moléculas biológicas, isso tem sido reconhecido desde 1950 (BARKALINA *et al.*, 2014).

Foi na década de 50, com o físico americano Richard Feynman, numa conferência na Reunião da Sociedade Americana de Física, onde foi sugerido um conceito de nanotecnologia que atualmente é bastante utilizado, no qual diz que a nanotecnologia consiste na construção e na manipulação, átomo a átomo de objetos em escala nanométrica. A conferência de Feynman representou uma nova concepção em nanociência e nanotecnologia. Somente mais tarde, na década de 80, com a descoberta dos fulerenos, pelos químicos Harold Walter Kroto e Richard Errett Smalley e, posteriormente, a síntese dos nanotubos de carbono pelo físico japonês Sumio Iijima, os temas e/ou assuntos em nanociência e nanotecnologia, antes vistos como ficção, passaram a ser tratados com maior seriedade (FERREIRA & RANGEL, 2009).

O rápido desenvolvimento da nanotecnologia aplicada só começou a partir de 1981 com a descoberta da técnica de Microscopia de Varredura por Tunelamento, pela empresa International Business Machines Corporation - IBM de Zurich, e alguns anos mais tarde, com a Microscopia de Força Atômica. Ambos os métodos permitem a visualização e manipulação da matéria em pequena escala com excepcional exatidão, onde desencadeou um crescimento exponencial na área de nanociência (BARKALINA *et al.*, 2014).

Até o ano 2000, a nanotecnologia foi universalmente reconhecida como um marco de inovação. Em resposta às aplicações práticas da nanotecnologia, muitos países introduziram cursos especializados em nanociência, como parte do ensino médio, graduação e pós-graduação. A nanotecnologia tem sido extensivamente introduzida também em aplicações biomédicas, incluindo detecção biológica, entrega de drogas e diagnóstico (BARKALINA *et al.*, 2014).

CAPÍTULO I. Nanotecnologia - Aspectos Gerais e Regulamentação

Essa ação resultou na melhoria de métodos relacionados ao diagnóstico e fins terapêuticos (BARKALINA *et al.*, 2014).

Com a crescente complexidade tecnológica da nanotecnologia, são relatadas na literatura quatro gerações de nanotecnologia, segundo o tipo de produto gerado (FERREIRA *et al.*, 2013):

- ✓ Primeira geração ~ 2000: Nanoestruturas passivas (revestimentos nanoestruturados, nanopartículas, nanoemulsões, metais nanoestruturados, polímeros, cerâmicos, catalisadores, compósitos, displays).
- ✓ Segunda geração ~ 2007: Nanoestruturas ativas (transistores, amplificadores, medicamentos direcionados e produtos químicos, atuadores, estruturas adaptativas, sensores, ensaios de diagnóstico, células de combustível, células solares, nanocompósitos de alto desempenho, cerâmica, metais, fabricação de elementos nanoeletrônicos e de sistemas de distribuição de medicamentos *drug delivery* e estruturas adaptativas).
- ✓ Terceira geração ~ 2010: Nanosistemas e sistemas 3-D (várias técnicas de montagem, trabalho em rede e arquiteturas em nanoescala e novos materiais biomiméticos, novas terapias / entrega de drogas específicas).
- ✓ Quarta geração ~ 2015: Nanosistemas moleculares (dispositivos moleculares, projetos atômicos).

A porção reativa da partícula está na superfície, aumentando a área de superfície, aumenta a reatividade do material. Além disso, em nanoescala, tanto a física clássica como a física quântica podem dirigir o comportamento de uma partícula. A influência dos efeitos quânticos podem mudar propriedades

CAPÍTULO I. Nanotecnologia - Aspectos Gerais e Regulamentação

importantes do material, tais como; propriedades ópticas, magnéticas e elétricas (FERREIRA *et al.*, 2013).

Pela definição ISO TC 229 (2005), os materiais nanoestruturados apresentam uma ou mais de suas dimensões em nanoescala (tamanho nanométrico), ou seja, um bilionésimo do metro ($1 \text{ nm} = 1 \times 10^{-9} \text{ m}$), com bordas e/ou interfaces definidas. Nessa escala de tamanho, os materiais apresentam novas propriedades, as quais não são observadas quando em tamanho micro ou macroscópico, por exemplo, a tolerância à temperatura, a variedade de cores, as alterações da reatividade química e a condutividade elétrica (FERREIRA & RANGEL, 2009).

No entanto, não existe uma definição padrão para o termo "nanomaterial". A Food and Drug Administration (FDA) ainda não adotou uma regulamentação padrão para estes novos produtos, mas destaca dois pontos importantes os quais se devem considerar na hora de decidir se um produto contém nanomateriais ou não, ou se envolve a aplicação da nanotecnologia (DUVALL, 2012):

1. Se o material ou produto final tem pelo menos uma dimensão na escala nanométrica;
2. Se o material ou produto final apresenta propriedades ou fenômenos, incluindo as propriedades físicas, químicas ou efeitos biológicos, que são atribuíveis ao sua dimensão na escala nanométrica, considerando até um micrômetro.

Muitos produtos baseados em nanotecnologia estão sob a autoridade da FDA, a qual desempenha um papel fundamental na garantia de que estes produtos são seguros. A FDA é responsável em proteger a saúde pública; conferindo-lhe segurança, eficácia de medicamentos, dispositivos médicos, produtos radioativos, cosméticos, alimentos e produtos relacionados. Também promove inovações médicas e tem como objetivo garantir que o público receba

CAPÍTULO I. Nanotecnologia - Aspectos Gerais e Regulamentação

informações precisas sobre medicamentos, alimentos e suplementos (DUVALL, 2012).

Em 2011, o escritório executivo do presidente Barack Obama reuniu um conjunto de princípios relacionados com a regulação e supervisão das tecnologias emergentes (nanotecnologia em particular) nos quais exigem a integridade científica, a participação do público, comunicação, consciência dos benefícios e custos, flexibilidade, avaliação de riscos, gestão e coordenação entre as agências, e à cooperação internacional, bem como detalhada orientação sobre a regulamentação das tecnologias emergentes (DUVALL, 2012).

No Brasil, as pesquisas relacionadas à nanotecnologia vêm sendo incentivadas pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) desde 2001, quando foram criadas 04 redes de pesquisa em nanociência e nanotecnologia, nas seguintes áreas: Materiais nanoestruturados, interfaces e nanotecnologia molecular, nanobiotecnologia e nanodispositivos semicondutores. E conta ainda com a Lei de Inovação, Lei nº 10.973 de 2004, que “estabelece medidas de incentivo à inovação e à pesquisa científica e tecnológica no ambiente produtivo, com vistas à capacitação, ao alcance da autonomia tecnológica e ao desenvolvimento industrial do País” (SANT’ANNA *et al.*, 2013).

CAPÍTULO II

• Nanotecnologia de Alimentos

A tecnologia de alimentos tem a sua história a partir da técnica de pasteurização introduzida pelo químico francês Louis Pasteur em 1864. Esta técnica consistia no aquecimento e resfriamento simultâneo de certos alimentos e bebidas a uma temperatura acima de 60°C por um determinado tempo, depois a temperatura do alimento era bruscamente diminuída (CHELLARAM *et al.*, 2014).

Com isto, evitava-se a deterioração do alimento, conseqüentemente eliminava bactérias (1000 nm) presentes naquele meio. Esta técnica foi a primeira utilizada no processamento e melhoria da qualidade de alimentos. Mais tarde, com a descoberta do modelo da estrutura do DNA (cerca de 2,5 nm) pelo biólogo James Dewey Watson, pelo físico Francis Harry Compton Crick e pelo fisiologista Maurice Wilkins, consolidou as aplicações da nanotecnologia em processos de biotecnologia, biomedicina, agrícola (alimentos) e de produção (CHELLARAM *et al.*, 2014).

O crescente interesse em nanotecnologia aplicada ao setor de alimentos é demonstrado por um número crescente de publicações científicas nesta área, conforme demonstrado na **Figura 1** (ROSSI *et al.*, 2014). As investigações na área de nanociência de alimentos resultam também em prospecção tecnológica o qual é verificado pelos depósitos de patentes, alguns dos exemplos incluem: desenvolvimento de nanocápsulas para a entrega de biocompostos, nanotubos de carbono para aumentar a germinação de sementes e crescimento de plantas; desenvolvimento de nanoemulsões contendo vitaminas e outros ingredientes a fim de aumentar a estabilidade do ingrediente ativo etc.

A patente US n° 20130064954 A1 (2013) descreve a produção de um aromatizante com composições naturais, obtido a partir da formulação de nanoemulsões e microemulsões, para ser utilizado em alimentos, bebidas, formulações farmacêuticas e cosméticos. Já a patente AU n°2011213719 A1

CAPÍTULO II. Nanotecnologia de Alimentos

(2011) descreve composições de nanoemulsões, com a utilização de um óleo comestível para ser utilizada como conservante alimentar e permitir o carregamento de compostos bioativos.

Os suplementos nutricionais com a combinação de nanotecnologia podem contribuir de forma eficiente para que certos componentes em nanoescala possam interagir facilmente em nível celular. Além disso, muitos 'nanoalimentos' comerciais já estão disponíveis no mercado (CHELLARAM *et al.*, 2014).

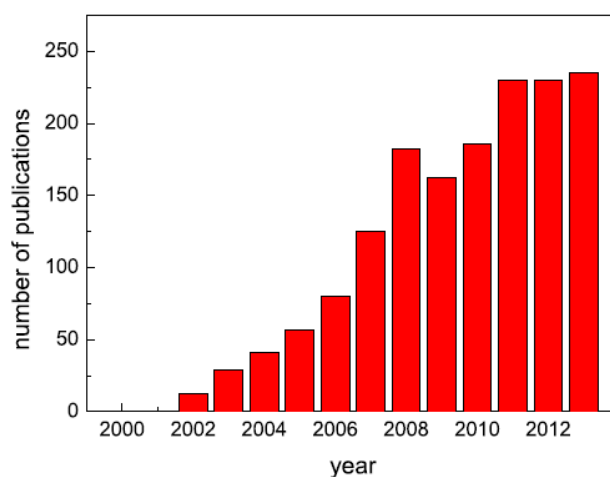


Figura 1. Estatísticas sobre o número de publicações por ano publicadas usando o banco de dados da literatura Scopus, com os descritores “*nanotechnology*” “*nanotecnologia*” e “*food*” “*alimento*” no título, resumo e palavras-chave. **Fonte:** ROSSI *et al.*, (2014).

O termo 'nanoalimentos' descreve produtos que foram produzidos, processados ou embalados usando técnicas ou instrumentos envolvendo nanotecnologia ou produtos nos quais foram adicionados nanomateriais. Atualmente, a comunidade científica busca formas de desenvolver sistemas capazes de produzir alimentos seguros e produtos de alta qualidade, bem como garantir a produção destes produtos de forma eficiente e sustentável para o meio ambiente. A nanotecnologia pode possivelmente melhorar os

CAPÍTULO II. Nanotecnologia de Alimentos

processos de produção e fornecer produtos com melhores características e novas funcionalidades (NEETHIRAJAN & JAYAS, 2011; GREINER, 2009; DUVALL, 2012; CUSHEN *et al.*, 2012; HANDFORD *et al.*, 2015; DURÁN & MARCATO, 2013).

A nanotecnologia tem potenciais aplicações (em todos os aspectos da cadeia alimentar) e ultimamente vem sendo explorada principalmente quanto à investigação de novos sistemas de entrega, conforme esquema disponível na **Figura 2**. As indústrias de alimentos estão sempre em busca de novos métodos para produzir e conservar alimentos e manter a qualidade nutricional, conforme as exigências dos consumidores (DASGUPTA *et al.*, 2015; CUSHEN *et al.*, 2012; NEETHIRAJAN & JAYAS, 2011).

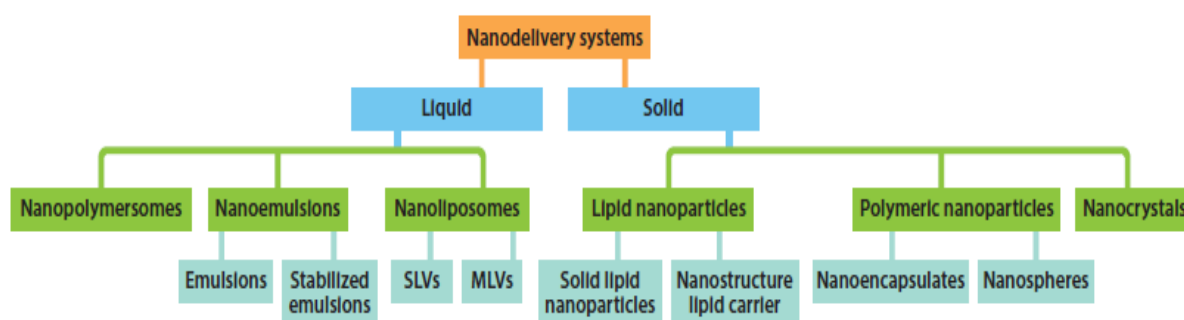


Figura 2. Classificação de nanosistemas de entregas. **Nanodelivery systems:** Nanosistemas de entrega; **Liquid:** Líquido; **Nanopolymersomes:** Nanopolímeros; **Nanoemulsions:** Nanoemulsões; **Emulsions:** Emulsões; **Stabilized emulsions:** Emulsões estabilizadas; **Nanoliposomes:** Nanolipossomas; **SLVs:** Vesículas lamelares únicas, **MLVs:** Vesículas grandes multilamelares; **Lipid nanoparticles:** Nanopartículas lipídicas; **Solid lipid nanoparticles:** Nanopartículas lipídicas sólidas; **Nanostructure lipid carrier:** Transportador lipídico nanoestruturado; **Polymeric nanoparticles:** Nanopartículas poliméricas; **Nanoencapsulates:** Nanoencapsulados; **Nanospheres:** Nanoesferas; **Nanocrystals:** Nanocristais. **Fonte:** BOREL & SABLIOV (2014).

Algumas substâncias como as vitaminas, antioxidantes, probióticos, prebióticos, péptidos, proteínas, carotenóides, ácidos graxos e outros (os quais podem ser consumidos individualmente) são incorporados em sistemas convencionais de entrega (**Quadro 1**). No entanto, dependendo do sistema que é utilizado, estas moléculas podem sofrer degradação e apresentar baixa

CAPÍTULO II. Nanotecnologia de Alimentos

disponibilidade (DASGUPTA *et al.*, 2015; CUSHEN *et al.*, 2012; HANDFORD *et al.*, 2015; DURÁN & MARCATO, 2013).

Quadro 1. Substâncias e formas convencionais utilizadas de entrega. (Mudar no sumario

Substâncias	Formas de entrega
Ácidos graxos ω -3 e estruturados lipídicos; Probióticos; Prebióticos; Fitoquímicos e extratos vegetais; Fibras e carboidratos; Carotenóides e antioxidantes; Aminoácidos, peptídeos e proteínas; Vitaminas; Minerais.	Alimentos (sólido, semi-sólido); Bebidas (reconstituíveis em pó e líquido); Suplementos alimentar dietéticos (pó, comprimido, cápsula).

Fonte: AUGUSTIN & SANGUANSRI (2015).

Diante deste contexto, a nanociência de alimentos investiga novas formas de entrega capazes de incorporar estes ingredientes oriundos de matrizes alimentares os quais possam ser completamente absorvidos, sem que haja degradação dos mesmos (DASGUPTA *et al.*, 2015; NEETHIRAJAN & JAYAS, 2011).

Com isso, a nanotecnologia de alimentos é focada no desenvolvimento de nanosistemas de entrega de nutrientes ou outros ingredientes alimentares, nanoencapsulação de compostos bioativos, formulação de nanoemulsões para solubilizar ingredientes lipofílicos (exemplo os carotenóides, fitoesteróis e antioxidantes em água), embalagens inovadoras de alimentos, liberação controlada de nutrientes e outros (DASGUPTA *et al.*, 2015; NEETHIRAJAN & JAYAS, 2011; DURÁN & MARCATO, 2013; CHELLARAM *et al.*, 2014).

As vantagens da nanotecnologia para produção de novos produtos alimentares são para diferentes fins;

- ✓ Proteger contra a degradação de compostos bioativos durante a fabricação, distribuição e armazenamento, melhorando a sua estabilidade;

CAPÍTULO II. Nanotecnologia de Alimentos

- ✓ Aumentar a biodisponibilidade de ingredientes fracamente solúveis em água (por exemplo, as vitaminas hidrofóbicas), melhorando assim seu valor nutricional;
- ✓ Melhorar a atividade biológica de nutrientes e sua capacidade de ser transferidos através das membranas intestinais e no sangue;
- ✓ Aumentar a vida de prateleira de alimentos, protegendo-o de oxidação;
- ✓ Controlar a entrega de nutrientes contribuindo assim para a saúde humana, entre outros (DASGUPTA *et al.*, 2015; NEETHIRAJAN & JAYAS, 2011; CUSHEN *et al.*, 2012; BIGLIARDI & GALATI, 2013; MIHINDUKULASURIYA & LIM, 2014).

O uso de nanoemulsões é um exemplo de como a nanotecnologia pode ser aplicada a um processo já existente dentro da indústria de alimentos (CUSHEN *et al.*, 2012). As empresas Nestlé, Unilever e outras, já estão desenvolvendo produtos alimentícios com nanotecnologia, estas já vêm utilizando nanoemulsões e nanopartículas para o desenvolvimento de produtos alimentares. Um exemplo são os sorvetes produzidos a partir de nanoemulsões (NEETHIRAJAN & JAYAS, 2011).

À medida que o tamanho das gotículas de óleo numa emulsão é reduzido, mais difícil é a separação do óleo da emulsão. Logo, a nanotecnologia pode também desempenhar um papel fundamental no controle do tamanho de certas estruturas presente nos alimentos, uma vez que o tamanho pode interferir na funcionalidade destes (NEETHIRAJAN & JAYAS, 2011; CUSHEN *et al.*, 2012).

O controle do tamanho das estruturas presentes nos alimentos para nanoescala originam partículas com uma área de superfície maior. Estas partículas menores melhoram a dispersão, distribuição e a estabilidade. Emulsões múltiplas (A/O/A) Água/Óleo/Água conseguem distribuir uniformemente moléculas lipídicas para obtenção de textura, sabor e proprie-

CAPÍTULO II. Nanotecnologia de Alimentos

dades sensoriais desejáveis ao consumidor (NEETHIRAJAN & JAYAS, 2011).

Em termos gerais, as atividades de investigação sobre as aplicações da nanotecnologia no setor de alimentos incluem; melhoria do sabor, cor, textura, consistência, aumento da absorção e biodisponibilidade de nutrientes e compostos bioativos, melhoria da qualidade, prazo de validade, segurança dos produtos alimentares, propriedades antimicrobianas, monitoramento da condição dos alimentos durante o transporte e armazenamento, líquidos em nanoescala com estruturas auto-organizadas que permitem a penetração de componentes saudáveis (tais como; vitaminas, minerais e fitoquímicos) que são insolúveis em água ou em gorduras, antioxidantes, espessantes e outros aditivos alimentares (GREINER, 2009; DUVALL, 2012; CHAUDHRY & CASTLE, 2011).

O Projeto de inventário de Nanotecnologias Emergentes 'Nanotecnologia baseada em Produtos de Consumo', atualmente no mercado, identifica vários produtos que afirmam utilizar aditivos alimentares em nanoescala ou componentes em nanoescala. A Food and Drug Administration (FDA) vem analisando como se devem regular esses nanomateriais (DUVALL, 2012).

A FDA tem significativa autoridade legal para regulamentar e controlar aditivos alimentares na escala nanométrica no ambiente norte americano. De acordo com a Lei Federal Norte Americana de Alimentos, Medicamentos e Cosméticos (FFDCA), os fabricantes de novos aditivos alimentares devem obter a aprovação da FDA para a comercialização. Os nanomateriais artificiais com múltiplas funções devem passar por processos de caracterização a partir de orientações previamente estabelecidas pela FDA, haja vista que muitos nanoalimentos são claramente definidos como "aditivo alimentar" (DUVALL, 2012).

CAPÍTULO II. Nanotecnologia de Alimentos

No regulamento de novos alimentos do Parlamento Europeu e do Conselho da União Europeia CE n.º 258/97, alimentos considerados novos devem ser submetidos a uma avaliação de segurança antes de serem colocados no mercado (CUSHEN *et al.*, 2012; FREWER *et al.*, 2014). Os atuais marcos regulatórios já estão sendo aplicados na União Europeia, Estados Unidos e Austrália (CHAUDHRY & CASTLE, 2011).

Na Alemanha a nanotecnologia já é usada em alimentos e suplementos alimentares para produzir nano chá verde, melhorar a biodisponibilidade do selênio a partir das folhas de "canola", óleo de cozinha com fitoesteróis nanoencapsulados, nanovitaminas e coenzimas (COLES & FREWER, 2013).

CAPÍTULO III

• Nanoemulsões - Conceitos, Formação e Aplicações

Para Anton & Vandamme (2009) nanoemulsões consistem numa dispersão de líquidos imiscíveis, em que um dos líquidos é disperso no outro sob a forma nanométrica dimensionado em gotículas compreendidas de 20 a 300 nm, os mesmos autores em uma publicação mais recente descrevem estes sistemas como pequenas gotículas de emulsão, comumente gotículas de óleo em água (O/A), apresentando tamanhos inferiores ~ 300 nm (ANTON & VANDAMME, 2011).

McClements (2012a) descreve o conceito de nanoemulsão (O/A) como uma dispersão termodinamicamente instável consistindo de dois líquidos imiscíveis, com um dos líquidos sendo disperso em pequenas gotas esféricas ($r < 100$ nm) em outro líquido. Já para os pesquisadores Solans *et al.*, (2005) nanoemulsões são emulsões as quais apresentam o tamanho das gotículas de óleo numa escala nanométrica compreendida de 20 a 200 nm e tipicamente são referidas na literatura como miniemulsões.

Em relação às propriedades sensoriais, as nanoemulsões geralmente apresentam aspecto transparente variando para um tom azulado, permitem o espalhamento ou dispersão da luz (efeito Tyndall) e podem ser diluídas com água sem alterar a distribuição de tamanho das gotas. Por meio do movimento Browniano evita a sedimentação ou formação de creme (cremeação) proporcionando assim um aumento da estabilidade física (FERNANDEZ *et al.*, 2004).

Dependendo do método de produção de uma nanoemulsão, diferentes distribuições de tamanho de gotículas podem ser alcançadas (FERNANDEZ *et al.*, 2004). As nanoemulsões podem ser formadas a partir de baixa ou alta demanda energética (SOLANS & SOLÉ, 2012). Na literatura científica é possível encontrar diferentes métodos os quais são utilizados atualmente no desenvolvimento de uma nanoemulsão, entre os métodos classificados de baixa energia destacam-se: Emulsificação Espontânea (*Spontaneous*

CAPÍTULO III. Nanoemulsões - Conceitos, Formação e Aplicações

Emulsification), Temperatura de Inversão de Fase – TIF (*Phase Inversion Temperature – PIT*) e Ponto de Inversão da Emulsão (*Emulsion Inversion Point - EIP*) (**Figura 3**) (FERNANDEZ *et al.*, 2004; SHAFIQ-UN-NABI *et al.*, 2007; ANTON & VANDAMME, 2009; MCCLEMENTS, 2012a).

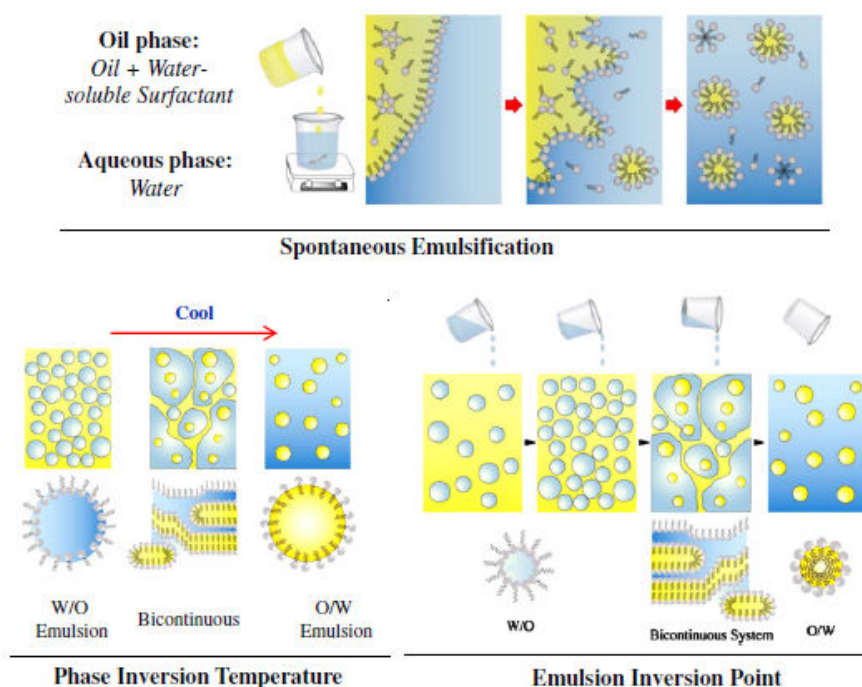


Figura 3. Métodos utilizados na produção de nanoemulsões de baixa demanda energética. **Oil phase:** Fase oleosa; **Oil:** Óleo; **Water:** Água; **Soluble Surfactant:** Surfactante solúvel; **Aqueous phase:** Fase aquosa; **Spontaneous Emulsification:** Emulsificação Espontânea; **Cool:** Frio; **Emulsion W/O:** Emulsão água em óleo; **Bicontinuous:** Bicontínua; **Emulsion O/W:** Emulsão óleo em água; **Phase Inversion Temperatura:** Temperatura de Inversão de Fase; **Emulsion Inversion Point:** Ponto de Inversão da Emulsão. **Fonte:** Adaptado de McClements, (2012a).

A *Emulsificação Espontânea* consiste no resultado de uma mistura de dois ou mais líquido-componentes (fase aquosa pura e uma fase oleosa composta por uma mistura de óleo e agente tensoativo) à temperatura ambiente com agitação leve (SHAFIQ-UN-NABI *et al.*, 2007). Os líquidos inicialmente são termodinamicamente estáveis, no entanto, quando são misturados passam a um estado de não equilíbrio, resultando em um aumento

CAPÍTULO III. Nanoemulsões - Conceitos, Formação e Aplicações

da área interfacial, favorecendo assim a um estado metaestável. Para obtenção das gotículas nanométricas por meio deste método é importante levar em consideração as condições experimentais no que diz respeito à proporção de óleo e inclusão de componentes adicionais (como exemplo, surfactantes, polímeros, macromoléculas e fármacos) (ANTON & VANDAMME, 2009; SHAFIQ-UN-NABI *et al.*, 2007).

O método conhecido como *Temperatura de Inversão de Fase* foi elaborado e descrito pelos pesquisadores Shinoda & Saito em 1969, onde os mesmos em uma publicação no periódico Journal of Colloid and Interface Science, descrevem o método pela primeira vez. Neste método é possível forçar uma transição a partir de uma emulsão água/óleo (A/O) a baixas temperaturas para óleo/água (O/A) a temperaturas mais elevadas.

O sistema atravessa um ponto zero e tensão superficial mínima, promovendo a formação de gotículas de óleo finamente dispersas. Em vez da temperatura, outros parâmetros podem ser considerados também, tais como; concentração do sal (eletrólito) e pH (FERNANDEZ *et al.*, 2004). Acima da temperatura de inversão de fase, o surfactante é totalmente solubilizado no óleo e, assim, a mistura sofre uma inversão de fase (ANTON & VANDAMME, 2009).

Ponto de Inversão da Emulsão – EIP, neste método é adicionado sucessivamente água em óleo, permitindo que uma transição no raio de curvatura do surfactante seja obtida, as gotas de água ficam distribuídas numa fase de óleo contínua. O aumento da fração/volume de água muda espontaneamente à curvatura do tensioativo e estabiliza inicialmente uma emulsão A/O e no *locus* da inversão para uma emulsão O/A. Este processo é bem comum quando se trabalha com surfactantes de cadeia curta que formam flexíveis monocamadas na interface óleo/água, o que resulta em uma microemulsão bicontínua no ponto de inversão (FERNANDEZ *et al.*, 2004).

CAPÍTULO III. Nanoemulsões - Conceitos, Formação e Aplicações

Já os métodos classificados de alta energia baseiam-se na utilização de dispositivos ou equipamentos mecânicos, capazes de fornecer energia suficiente para reduzir a tensão interfacial entre o óleo e água, possibilitando assim a geração de gotículas de óleo submicrônicas ou nanométricas. Atualmente, os equipamentos disponíveis os quais são utilizados para estes processos destacam-se os homogeneizadores de alta pressão, dispositivos ultra-sônicos, etc. (GHOSH *et al.*, 2013a; ANTON & VANDAMME, 2011).

A entrada de alta energia favorece a quebra das gotas em tamanhos menores, desde que a pressão de Laplace ($P = 2\gamma/r$) seja superada. Além disso, um aumento no teor de tensoativo (surfactante) na interface reduz a pressão de Laplace, assim, quanto menor for o tamanho da gota, mais energia e/ou surfactante será necessário (GHOSH *et al.*, 2013a).

Conforme McClements (2012a), a contribuição da energia livre interfacial (tensão interfacial - γ) tem uma dependência mais complexa no tamanho das gotículas. À medida que o raio das gotículas diminui (a partir de 1000 nm), há inicialmente um aumento na energia livre interfacial (γ). Para uma nanoemulsão, a energia de ativação (ΔG^*) da dispersão coloidal (em gotículas de água) é mais elevada do que a energia livre de fases separadas (óleo e água), o que significa que uma nanoemulsão é termodinamicamente instável

Figura 4.

A altura da barreira de energia determina a estabilidade cinética de uma nanoemulsão, visto que quanto maior a barreira de energia, mais tempo a nanoemulsão persistirá estável. Tipicamente, a barreira de energia deve ser $>20kT$ para produzir nanoemulsões com boa estabilidade cinética em longo prazo. Esta altura pode ser influenciada principalmente por fenômenos físicos que impedem as gotículas de entrar em estreita proximidade, tais como; forças hidrodinâmicas, estérica, eletrostática e outras interações que operam entre as gotas (MCCLEMENTS, 2012a).

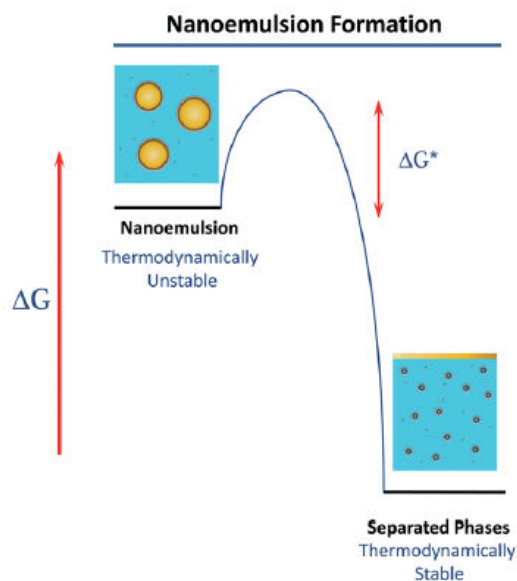


Figura 4. Representação esquemática termodinâmica da energia livre de ativação (ΔG^*) de um sistema nanoemulsionado. **Nanoemulsion Formation:** Formação nanoemulsão; **Thermodynamically unstable:** Termodinamicamente instável; **Separated Phases:** Fases separadas; **Thermodynamically Stable:** Termodinamicamente estável **Fonte:** Adaptado de McClements, (2012a).

Há três tipos de nanoemulsões que podem ser formadas de acordo com a composição:

- ✓ *Nanoemulsões óleo em água (O/A):* As gotículas de óleo ficam dispersas na solução aquosa (fase contínua);
- ✓ *Nanoemulsões água em óleo (A/O):* As gotículas de água estão dispersas no óleo (neste caso, o óleo passa a ser a fase contínua);
- ✓ *Nanoemulsões Bi-contínua:* Microdomínios de óleo e água são interdispersos dentro do sistema (MISHRA *et al.*, 2014).

A fase aquosa utilizada durante o preparo de uma nanoemulsão, consiste tipicamente em água ultra-pura ou destilada, contudo outras fases

CAPÍTULO III. Nanoemulsões - Conceitos, Formação e Aplicações

aquosas podem ser utilizadas, tais como; um tampão ou uma solução eletrolítica. Alguns requisitos devem ser levados em consideração quanto à escolha da fase aquosa, tais como: Polaridade, tensão interfacial, índice de refração, reologia, densidade, comportamento de fase, pH e força iônica, uma vez que, a mesma pode influenciar quanto a qualidade, estabilidade e propriedades físico-químicas da nanoemulsão (MCCLEMENTS & RAO, 2011).

A fase oleosa é composta por algum óleo (vegetal ou mineral), com adição de um tensoativo (agente emulsificante ou surfactante) ou ainda com a adição de um co-tensoativo (OLIVEIRA *et al.*, 2004). Segundo a legislação vigente de aditivos alimentares, portaria de nº 540 de 1997 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (Brasil, 2015), tensoativo, surfactante ou emulsificante é uma substância que torna possível a formação ou a manutenção de uma mistura uniforme de duas ou mais fases imiscíveis.

Os tensoativos são utilizados para manter uma dispersão uniforme de um líquido em outro, pois contribui para diminuir a tensão interfacial entre a fase aquosa e a oleosa. Após a homogeneização, a presença de uma camada de moléculas de tensoativos melhora a estabilidade em longo prazo das gotas de óleo através das interações repulsivas entre elas (repulsão estérica e/ou eletrostática). As moléculas de tensoativos não adsorvidas podem permanecer como monômeros ou micelas na fase aquosa, porém isso depende da concentração total do tensoativo utilizado (RAO & MCCLEMENTS, 2012; DEVARAJAN & RAVICHANDRAN, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2004).

É conveniente classificar as moléculas de tensoativos de acordo com as suas características elétricas em: iônico, não iônico e zwitteriônico ou anfótero (DEVARAJAN & RAVICHANDRAN, 2011; RAO & MCCLEMENTS, 2012; MCCLEMENTS & RAO, 2011).

CAPÍTULO III. Nanoemulsões - Conceitos, Formação e Aplicações

- ✓ *Tensoativos Iônicos*: Por apresentar carga na molécula são classificados em tensoativos catiônicos e tensoativos aniônicos. Os grupos não carregados interagem com as gotículas de óleo, enquanto que os grupos finais carregados interagem com a fase aquosa. Exemplos: brometo de cetil trimetil amônio (catiônico), dodecil sulfato de sódio (aniônico).

- ✓ *Tensoativos Não iônicos*: São amplamente utilizados para formação de nanoemulsões devido à sua baixa toxicidade e capacidade de formar facilmente nanoemulsões. Tensoativos não iônicos não possuem carga na molécula. A maioria dos tensoativos de grau alimentício são não iônicos. O grupo lipofílico é composto geralmente pelos ácidos graxos esteárico, palmítico, oléico ou linoléico, ou pela combinação destes ácidos graxos. Já o grupo final hidrofílico é geralmente composto por grupos hidroxil ou carboxil, ou ainda por uma substância hidrossolúvel, por exemplo, cadeia polimérica hidrossolúvel.

- ✓ *Tensoativos Zwitteriônicos ou Anfóteros*: Apresentam dois ou mais grupos ionizáveis de carga oposta na mesma molécula. Dependendo do pH da solução, eles podem apresentar carga negativa, positiva ou neutra (MCCLEMENTS & RAO, 2011).

O cremophor EL (polietileno glicol [PEG] óleo de rícino-35) é um exemplo de tensoativo não iônico que tem a capacidade de aumentar a permeabilidade e absorção de medicamentos (Date *et al.*, 2010) outros exemplos de tensoativos não iônicos incluem os polioxietileno ou ésteres, tais como; mono-oleato de sorbitano - Span 80 e Mono-oleato de polioxietileno sorbitano – Tween 80 (DEVARAJAN & RAVICHANDRAN, 2011; RAO & MCCLEMENTS, 2012). Os fosfolipídios é um exemplo notável de tensoativos zwitteriônicos e apresenta excelente biocompatibilidade (RAO & MCCLEMENTS, 2012).

CAPÍTULO III. Nanoemulsões - Conceitos, Formação e Aplicações

A combinação destes, particularmente iônicos e não iônicos, pode ser eficaz para a formação de nanoemulsão (DEVARAJAN & RAVICHANDRAN, 2011; RAO & MCCLEMENTS, 2012). Os tensoativos podem ser classificados ainda conforme seu EHL (Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico) numa escala de 0 (maior caráter lipofílico) a 20 (maior caráter hidrofílico) (DEVARAJAN & RAVICHANDRAN, 2011; RAO & MCCLEMENTS, 2012; MCCLEMENTS & RAO, 2011).

O EHL leva em conta a contribuição relativa dos fragmentos hidrofílicos e hidrofóbicos presentes na molécula do surfactante ($EHL = 7 + \Sigma \text{hidrofílicos} - \Sigma \text{hidrofóbicos}$). Tensoativos que apresentam valores baixos de EHL de 3 a 7 favorece para a formação de nanoemulsões do tipo A/O, ao passo que tensoativos com elevado valor de EHL, entre 8 a 20 são indicados para formação de nanoemulsões do tipo O/A (DEVARAJAN & RAVICHANDRAN, 2011; RAO & MCCLEMENTS, 2012). Na **Tabela 1** constam as principais características de alguns principais tensoativos utilizados para a produção de nanoemulsões.

Quanto à instabilidade de uma nanoemulsão pode ocorrer devido a alguns fatores principais, incluindo; floculação, coalescência e maturação de Ostwald. Entre estes, o amadurecimento de Ostwald é o principal mecanismo de instabilidade, pois é o resultado do surgimento do fenômeno no qual gotas maiores tendem a crescer a partir de gotas menores (MISHRA *et al.*, 2014).

Em relação às aplicações, as nanoemulsões podem ser utilizadas como veículo de entrega por meio de várias rotas sistêmicas parenterais (ou injetável), entrega de agentes antimicrobianos, solubilização de pesticidas insolúveis em água, pode ser utilizada também como veículo em produtos cosméticos para a pele (GHOSH *et al.*, 2013a; SOLANS *et al.*, 2005). Substituir lipossomas ou vesículas carreadoras de compostos lipofílicos (BARRY, 2001; TADROS *et al.*, 2004) administração de gorduras, hidratos de carbono, vitaminas, entrega de vacinas ou como transportadores de genes (SOLANS *et al.*, 2005).

CAPÍTULO III. Nanoemulsões - Conceitos, Formação e Aplicações

Tabela 1. Características de alguns principais agentes tensoativos utilizados para produção de nanoemulsões.

Nome Químico	Nome Comercial	EHL*	Classificação	Fórmula Molecular
Monolaurato de sorbitano	Span 20®	8,6	Não iônico	C ₁₈ H ₃₄ O ₆
Monopalmitato de sorbitano	Span 40®	6,7	Não iônico	C ₂₂ H ₄₂ O ₆
Monoestearato de sorbitano	Span 60®	4,7	Não iônico	C ₂₄ H ₄₆ O ₆
Triestearato de sorbitano	Span 65®	2,1	Não iônico	C ₆₀ H ₁₁₄ O ₈
Mono-oleato de sorbitano etoxilado	Span 80®	4,3	Não iônico	C ₂₄ H ₄₄ O ₆
Sesquioleato de sorbitano	Span 83®	3,7	Não iônico	C ₆₆ H ₁₂₆ O ₁₆
Trioleato de sorbitano	Span 85®	1,8	Não iônico	C ₆₀ H ₁₀₈ O ₈
Sorbitano isoestearato	Span 120®	4,7	Não iônico	C ₂₄ H ₄₆ O ₆
Polissorbato 20	Tween 20®	16,7	Não iônico	C ₁₈ H ₃₄ O ₆
Monolaurato de polioxietileno sorbitano	Tween 21®	13,3	Não iônico	C ₂₆ H ₅₀ O ₁₀
Polissorbato 40	Tween 40®	15,6	Não iônico	C ₂₂ H ₄₂ O ₆ ·(C ₂ H ₄ O) _n
Polissorbato 60	Tween 60®	14,9	Não iônico	C ₆₄ H ₁₂₆ O ₂₆
Polissorbato 61	Tween 61®	9,6	Não iônico	C ₂₄ H ₄₆ O ₆ ·(C ₂ H ₄ O) _n
Polioxietileno sorbitano triestearato	Tween 65®	10,5	Não iônico	C ₁₀₀ H ₁₉₄ O ₂₈
Mono-oleato de polioxietileno sorbitano	Tween 80®	15,0	Não iônico	C ₂₄ H ₄₄ O ₆
Mono-oleato de polioxietileno sorbitano	Tween 81®	10,0	Não iônico	C ₂₄ H ₄₄ O ₆
Trioleato de polioxietileno sorbitano	Tween® 85	11,0	Não iônico	C ₆₀ H ₁₀₈ O ₈ ·(C ₂ H ₄ O) _n
Polietilenoglicol (35) de óleo de rícino	Cremophor® EL ou Kolliphor® ELP	14,0	Não iônico	C ₄₇ H ₉₄ O ₁₉
Polietileno glicol 400 monoestearato	DHAYTAN S400	11,6	Não iônico	C ₂₆ H ₅₂ O ₆
Monoestearato de polioxietileno	Myrj 45 ®	11,1	Não iônico	C ₃₄ H ₇₀ O ₉
Diestearato de etilenoglicol	DHAYKOL EGDS	1,0	Não iônico	C ₃₈ H ₇₄ O ₄
Sesquioleato de sorbitano	Arlacel®	3,7	Não iônico	C ₆₆ H ₁₂₆ O ₁₆
Trilaureth-4-fosfato	Hostaphat®	14,0	Aniônico	C ₅₄ H ₁₀₅ O ₄ P
Éter láurico de polioxietileno	Bryj30®	9,7	Aniônico	C ₅₈ H ₁₁₈ O ₂₄
Dodecil sulfato de sódio (SDS)	Crodalan AWS	40,0	Aniônico	C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S
Dodecil benzeno sulfonato de sódio (SDBS)	Maranil®	10,6	Aniônico	C ₁₈ H ₂₉ NaO ₃ S
Brometo de cetil trimetil amônio (CTAB)	Cetrimida®	10,0	Catiônico	C ₁₉ H ₄₂ BrN
Brometo de dodecil trimetil amônio (DTAB)	--	--	Catiônico	C ₁₅ H ₃₄ BrN
Hidrogenado Lecitina	Lipoid S75-3®	--	Anfótero	C ₅ H ₅ CIN ₂

* **EHL:** Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico; -- não encontrado.

CAPÍTULO III. Nanoemulsões - Conceitos, Formação e Aplicações

As nanoemulsões tem uma parte interior lipófilica que é eficaz no transporte de substâncias hidrofóbicas no ambiente aquoso. Elas podem permitir a penetração profunda de ingredientes ativos imiscíveis em água, tais como; antioxidantes, retinol e lipídios; e aumentar a sua concentração efetiva nos tecidos alvo (NASIR, 2010).

A indústria de alimentos estuda diferentes formas de incorporar nutrientes em nanoemulsões para criar novos produtos ou alimentos nutritivos. Os fabricantes estão usando nanoemulsões para produzir alimentos mais saborosos, com baixa caloria, baixo teor de gordura e ainda tentando melhorar a vida de prateleira de certos alimentos (NASIR, 2010).

Na indústria de alimentos, geralmente é desejável preparar nanoemulsões utilizando óleos comestíveis na forma de triacilgliceróis (TAG) devido ao seu baixo custo, abundância e atributos funcionais e/ou nutricionais, por exemplo, são utilizados os óleos de: milho, soja, girassol, cártamo, oliva, linhaça, algas ou óleo de peixe. A maioria destes óleos apresentam principalmente triacilgliceróis de cadeia longa (TCL), no entanto, os triacilgliceróis de cadeia média (TCM) como óleo de babaçu também estão sendo utilizados em algumas aplicações alimentares (MCCLEMENTS & RAO, 2011).

Conforme Chiu *et al.*, (2008) os ácidos graxos de cadeia longa são os mais encontrados na alimentação normal, enquanto que os de cadeia média, apesar de suas vantagens clínicas, compõem cerca de 3% da constituição lipídica de uma refeição. Os ácidos graxos dos triacilgliceróis de cadeia média (TCM) são absorvidos através da parede intestinal sem ressíntese dos triacilgliceróis nas células intestinais. Sofrem, predominantemente, β -oxidação e não são estocados nas células adiposas. Dessa forma, constituem uma boa fonte de energia para pacientes com insuficiência pancreática e má absorção lipídica.

CAPÍTULO IV

• Métodos de Caracterização de Nanoemulsões

A caracterização de nanoemulsões deve ser realizada por meio de técnicas macroscópicas e microscópicas (técnicas de caracterização física, química e técnicas de imagens) nos quais as mesmas são avaliadas do ponto de vista da estabilidade termodinâmica e cinética (KLANG *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2012).

As técnicas analíticas as quais podem ser utilizadas para a caracterização de nanoemulsões fornecem informações qualitativas e quantitativas, incluindo: tamanho, morfologia, carga de superfície, informações pertinentes às mudanças dependentes do tempo da amostra e etc. (HANKIN *et al.*, 2011).

Para a escolha adequada destas técnicas, o analista deve levar em conta a precisão e exatidão do método, tipo de informação e a correlação e/ou complementariedade entre elas. Entre os principais métodos utilizados para a caracterização e ensaios de estabilidade de nanoemulsões destacam-se:

1. Dispersão Dinâmica da Luz (DLS - Dynamic Light Scattering);
2. Potencial Zeta ζ (PZ);
3. Potencial Hidrogeniônico – pH;
4. Centrifugação;
5. Ensaios de estabilidade acelerada: Ciclos de aquecimento em estufa e resfriamento em refrigerador, estresse térmico;
6. Microscopia Eletrônica de Transmissão – MET;
7. E entre outros métodos, caso haja necessidade.

A distribuição do tamanho das gotículas de óleo numa nanoemulsão pode ser determinada por qualquer técnica de espalhamento de luz ou de microscopia eletrônica (Brar & Verma, 2011), no entanto, conforme a norma internacional ISO 22412 (2008), o DLS tem sido defendido como um dos melhores métodos para prever uma estimativa do tamanho médio e amplitude da distribuição do tamanho das partículas, incluindo a estabilidade em função

CAPÍTULO IV. Métodos de Caracterização de Nanoemulsões

do tempo de armazenamento. E é especialmente empregado para caracterizar em longo prazo a estabilidade de novas formulações (KLANG *et al.*, 2012; FRYD & MASON, 2012).

O DLS (Dynamic Light Scattering) ou espalhamento dinâmico da luz também conhecido como espectroscopia de correlação de fótons ou dispersão de luz quasi-elástica é uma técnica utilizada para a determinação do perfil de distribuição do tamanho (nm) que pode ser correlacionado em termos de número, volume e intensidade (**Figura 5**), além de fornecer ainda o índice de polidispersidade (PDI) (SILVA *et al.*, 2012).

O DLS mede o movimento Browniano das partículas permitindo o cálculo da média ponderada do raio hidrodinâmico (RH) ou do diâmetro hidrodinâmico (DH) das partículas (com base na teoria do Movimento Browniano de Stokes-Einstein), proporcionando uma rápida e adequada avaliação do RH ou DH de gotículas de nanoemulsões, e é muitas vezes utilizado para avaliar a estabilidade de dispersões coloidais, proteínas e polímeros (SILVA *et al.*, 2012; KLANG *et al.*, 2012).

As partículas em suspensão estão em constante movimento aleatório (Movimento Browniano) devido à interação com as moléculas do fluido e/ou suspensão. De acordo com a teoria do Movimento Browniano de Stokes-Einstein, é possível determinar o tamanho do raio hidrodinâmico de uma partícula em movimento por meio da equação abaixo (BRAR & VERMA, 2011):

$$D = k_b T / 6 \pi n r$$

Onde:

D = Constante de difusão;

k_b = Constante de Boltzmann (1,3806503x 10⁻²³ J/K);

T = Temperatura absoluta em Kelvin (K)

π = 3,1415

n = Viscosidade

r = Raio da partícula esférica

CAPÍTULO IV. Métodos de Caracterização de Nanoemulsões

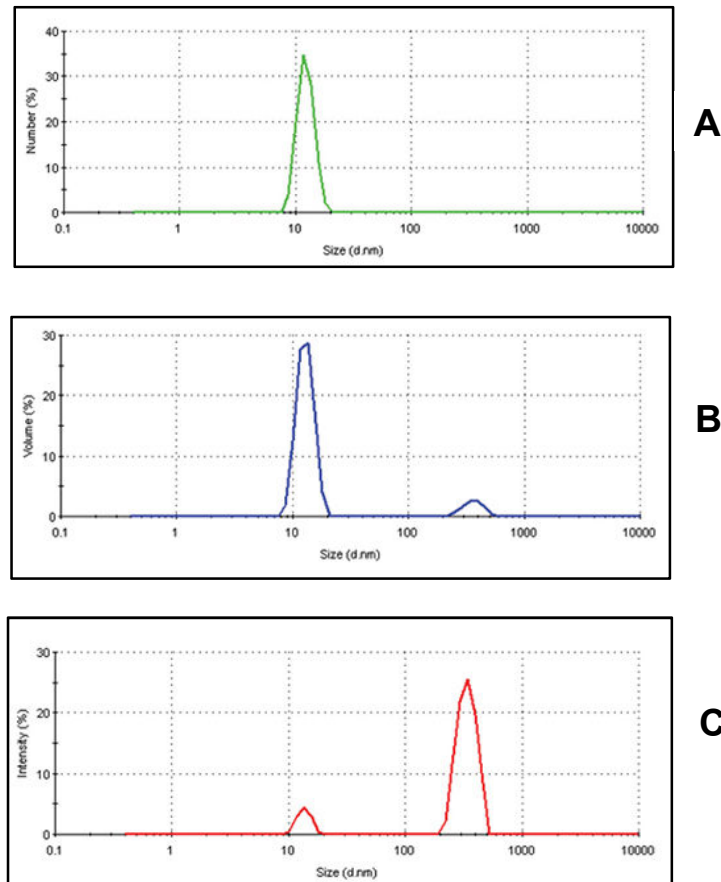


Figura 5. Mensuração da distribuição do tamanho (nm) das partículas em DLS: **(A)** número, distribuição monomodal; **(B)** volume, partículas bimodais e **(C)** intensidade, distribuição bimodal. **Fonte:** Adaptação de BALL, (2015).

O princípio da técnica de dispersão de luz pode ser dividido ainda em três domínios baseados em um parâmetro adimensional do tamanho, definido conforme equação:

$$\alpha = \pi D_p / \lambda$$

Onde:

πD_p = Circunferência de uma partícula;

λ = Comprimento de onda da radiação incidente.

Com base no valor de α , estes domínios são os seguintes:

$\alpha \ll 1$: Espalhamento Rayleigh (partículas pequenas em comparação com comprimento de onda da luz);

CAPÍTULO IV. Métodos de Caracterização de Nanoemulsões

$\alpha \approx 1$: Espalhamento Rayleigh (partículas do mesmo tamanho em comparação com comprimento de onda da luz);

$\alpha \gg 1$: Dispersão geométrica (partículas maiores em comparação com comprimento de onda da luz).

Nesse contexto, o DLS é uma técnica não invasiva utilizada rotineiramente para a análise de partículas dispersas em soluções coloidais (BRAR & VERMA, 2011). As medições são realizadas em um espectrofotômetro de dispersão de luz dinâmica (conhecido no mercado como Zetasizer), que utiliza um laser de hélio ou néon com comprimento de onda de 632 nm, ângulo de 90°, comumente as medições são realizadas a 25 °C. O processamento de dados é realizado em um computador acoplado ao instrumento (DEVARAJAN & RAVICHANDRAN, 2011; BHOSALE *et al.*, 2014; MISHRA *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2012).

As amostras devem ser diluídas antes da medição em DLS, isso se faz necessário para garantir a transparência suficiente da amostra, para assim, facilitar uma determinação mais precisa do tamanho das gotículas (KLANG *et al.*, 2012; ANTON & VANDAMME, 2011). No caso de nanoemulsões, tal diluição não exerce influência sobre a distribuição de tamanho das gotículas (ANTON & VANDAMME, 2011).

O DLS apresenta certas limitações, é restrito a baixas concentrações de partículas; é sensível à presença de agregados (geralmente oriundos de agentes tensoativos, vesículas lipossômicas ou estruturas lamelares); a forma das nanopartículas é analisada do ponto de vista como uma esfera para o cálculo do raio hidrodinâmico o que nem sempre é o caso, dessa forma, os resultados podem não ser totalmente representativos (KLANG *et al.*, 2012; BRAR & VERMA, 2011).

CAPÍTULO IV. Métodos de Caracterização de Nanoemulsões

O potencial zeta ζ (PZ) é um termo científico para o potencial eletrocinético de sistemas coloidais que tem um efeito importante sobre várias propriedades em nanosistemas de entrega. Este termo, expressa a diferença de potencial entre o meio de dispersão e a fase estacionária do fluido ligado à partícula dispersa. Assim, o potencial zeta pode ser definido como um valor eletrocinético ou potencial elétrico no plano hidrodinâmico *de cisalhamento* associado à magnitude da carga superficial, sua unidade é o milivolt (mV) **Figura 6** (HONARY & ZAHIR, 2013; SILVA *et al.*, 2012; KASZUBA *et al.*, 2010).

As técnicas convencionais para medição do potencial zeta em uma dispersão é realizada por meio da aplicação de um campo elétrico em toda a dispersão. As partículas carregadas (+) e (-) dentro da dispersão, migram para o eletrodo de carga oposta com uma velocidade proporcional à magnitude do potencial zeta. Sua velocidade é medida pela técnica *Laser Doppler* e é expressa como mobilidade eletroforética (μ) em $m^2/V.s.$ (HONARY & ZAHIR, 2013; KASZUBA *et al.*, 2010).

Existem algumas técnicas experimentais, as quais são usadas: A *microeletroforese* adequada para caracterizar amostras com boa mobilidade eletroforética (μ), e o *espalhamento de luz eletroforética*, indicado para medir a mobilidade eletroforética (μ) de partículas numa dispersão e/ou solução, esta mobilidade é convertida em PZ usando a teoria de Smoluchowski ou Huckel. É indicado ainda para amostras que apresentam baixa mobilidade (μ) e para amostras que são difíceis a mensuração do PZ por meio das técnicas convencionais. Ambos os métodos, em alguns casos, requerem a diluição da amostra. A última técnica pode ser usada também para caracterizar partículas muito pequenas (geralmente entre 0,3 nm a 10 μm) (HONARY & ZAHIR, 2013; KASZUBA *et al.*, 2010).

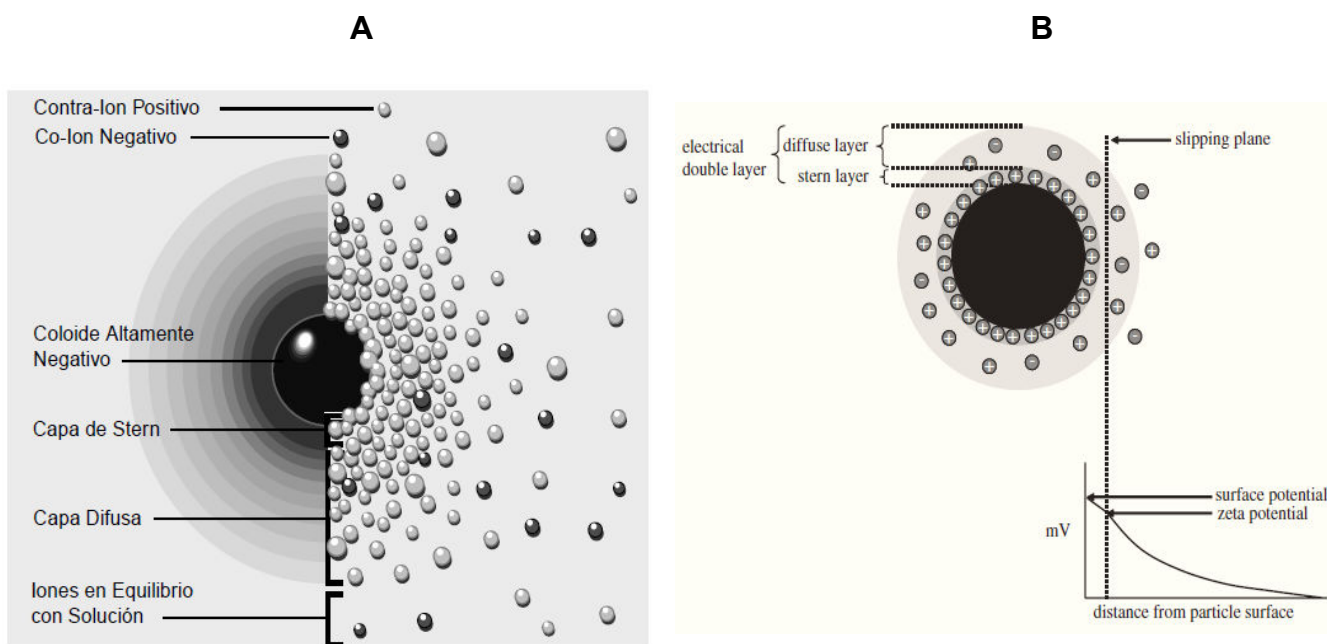


Figura 6. Representação esquemática do Potencial Zeta de um colóide. **(A)** Colóide negativo e sua atmosfera carregada positivamente **(B)** Medição do potencial zeta no plano hidrodinâmico de cisalhamento. A camada difusa pode ser vista como uma atmosfera carregada em torno do colóide ou partícula. **Fonte:** Adaptação de Kaszuba *et al.*, (2010); Zeta-Meter Inc (2015).

O valor do potencial zeta pode ser relacionado com a estabilidade de dispersões coloidais, indicando o grau de repulsão entre partículas adjacentes. Para moléculas e partículas, um elevado potencial zeta no sentido positivo (superior a +30 mV) e potenciais inferiores a -30 mV conferirá estabilidade, ou seja, a solução ou a dispersão irá resistir à agregação. Já quando o potencial zeta é inferior a +30 mV e superior a -30 mV, a atração excede a repulsão e a dispersão tem mais chances de flocular (SILVA *et al.*, 2012).

Praticamente, o potencial zeta ζ é a melhor representação das características elétricas de uma gota, porque inerentemente contribui para a adsorção de contra-íons. Instrumentos analíticos baseados em eletroforese de partículas e eletroacústica são amplamente utilizados para medir o potencial ζ de gotículas em nanoemulsões (HONARY & ZAHIR, 2013). O potencial zeta também pode ser influenciado por alguns fatores, tais como; agentes tensoativos, concentração eletrolítica (força iônica), morfologia da partícula, tamanho, pH da solução e estado de hidratação (SILVA *et al.*, 2012).

CAPÍTULO IV. Métodos de Caracterização de Nanoemulsões

O potencial hidrogeniônico (pH) de uma nanoemulsão pode ser medido diretamente por meio de um pHmetro (JAISWAL *et al.*, 2014). A caracterização deste parâmetro é importante, uma vez que, pode ter relação sobre o potencial zeta a partir de dados relacionados ao ponto isoelétrico (HONARY & ZAHIR, 2013).

Para He *et al.*, (2011) a medição do pH de uma nanoemulsão também exerce influência em relação ao índice de polidispersividade (PDI), em seu estudo eles observaram que quando as nanoemulsões apresentavam valores de pH de 07 a 10, o PDI foi inferior a 0,3, indicando assim uma boa monodispersividade das nanoemulsões. Os autores ressaltam ainda que o pH exerce uma grande influência para a estabilidade de nanoemulsões.

Para verificar possíveis sinais de coalescência e/ou separações de fases em nanoemulsões, é comum a utilização de técnicas envolvendo a centrifugação com velocidades de rotação conforme a necessidade (MCCLEMENTS & RAO, 2011). A coalescência das gotículas de óleos ocorre devido à tensão superficial e as atrações intermoleculares, isso pode ser reduzido com a adição adequada de tensoativos (MISHRA *et al.*, 2014).

Já de acordo com Jaiswal *et al.*, (2014) uma separação de fase ocorre devido alguns fatores: Adição de um tensoativo de natureza oposta, decomposição ou precipitação do tensoativo, adição de algum solvente na fase oleosa ou aquosa, o qual em uma destas fases não é miscível, temperatura elevada, presença de micro-organismos, entre outros.

Nos estudos de estabilidade termodinâmica para nanoemulsões, as mesmas, devem ser centrifugadas, a priore a baixas rotações, geralmente a 3500 rpm e observadas se apresentam algum sinal de separação de fase. As que não apresentam qualquer separação de fase devem ser submetidas para outros testes de estabilidade, tais como; estresse térmico ou ciclo de congelamento e descongelamento (MISHRA *et al.*, 2014).

CAPÍTULO IV. Métodos de Caracterização de Nanoemulsões

A estabilidade física de nanoemulsões deve ser avaliada em condições de armazenamento diferentes (geralmente a 4°, 25° e 40 °C) durante 03, 06, 09 ou 12 meses. Nanoemulsões recém-formuladas devem ser submetidas a várias condições de estresse por um determinado período e a distribuição de tamanho das gotículas durante esse tempo deve ser avaliada. Estas condições incluem no submetimento das nanoemulsões a ciclos de: Congelamento (-21°C) e descongelamento (25 °C), resfriamento (4°C) e aquecimento (45°C) mantidas nas mesmas condições de trabalho no laboratório (DEVARAJAN & RAVICHANDRAN, 2011; MISHRA *et al.*, 2014).

O Microscópio Eletrônico de Transmissão - MET é uma ferramenta essencial para a caracterização de sistemas de distribuição de drogas e/ou fármaco de natureza cada vez mais complexa. É possível obter informações sobre a morfologia dos seguintes sistemas; Nanoemulsões, lipossomas, nanopartículas lípidicas, microemulsões, cristais líquidos e outros (KLANG *et al.*, 2013).

No contexto com nanoemulsões, as aplicações do MET além da observação da morfologia e tamanho das gotículas, a técnica permite ainda uma observação mais minuciosa de possíveis fenômenos de desestabilização, tais como; coalescência, amadurecimento de Ostwald, monitorização de transições de fase, presença de agregados, gotículas maiores ou cristais de fármacos não dissolvidos. O MET constitui um método útil para examinar a estrutura de nanoemulsões, pois é possível observar a morfologia de partículas, indicando a presença de gotículas em tamanho na escala nanométrica (KLANG *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2012).

As observações são realizadas a partir de uma gota da nanoemulsão que é depositada diretamente sobre uma tela revestida de um filme orgânico (polímero), geralmente Formvar (polivinil formol) e contrastada com acetato de uranila (C₄H₆O₆U) ou outro agente de contraste (BHOSALE *et al.*, 2014).

CAPÍTULO IV. Métodos de Caracterização de Nanoemulsões

As informações que são transmitidas são frequentemente limitadas a uma área muito restrita da nanoemulsão, onde na área investigada as gotículas de óleo podem aparecer intactas. Neste caso, nenhuma informação é obtida quanto à polidispersividade ou a presença de adicionais estruturas dentro da amostra (KLANG *et al.*, 2012).

A natureza do óleo não é decisiva para a qualidade das imagens MET de nanoemulsões, porém é importante a eficácia do tensoativo utilizado para estabilizar as gotículas de óleo e uma coloração adequada para obtenção de um contraste favorável, logo, o tipo e quantidade de solução de coloração entre outros parâmetros, devem ser otimizados antes da respectiva análise (KLANG *et al.*, 2012).

O MET pode ser utilizado para comparar o diâmetro hidrodinâmico (DH) determinado pela técnica DLS e a obtenção de uma imagem geral da estrutura das gotículas presentes numa nanoemulsão (Silva *et al.*, 2012), pois é frequentemente usado para obtenção de imagens referente à morfologia e estrutura de superfície de um dado material, nanomaterial ou um fármaco e pode ser combinado com sistemas eletrônicos de varredura e microscopia de força atômica – MFA (KUNTSCHEA *et al.*, 2011; FRYD & MASON, 2012).

Microscópios eletrônicos de transmissão são instrumentos análogos aos convencionais microscópios ópticos. No MET, a amostra é iluminada por um feixe de elétrons. Os elétrons são liberados a partir do aquecimento de um cátodo, neste caso de Tungstênio (W) e são acelerados devido a uma diferença de potencial com um ânodo, possuem um comprimento de onda (λ) controlado através da variação dos campos magnéticos de fluxo variáveis, produzidos por lentes eletromagnéticas (KLANG *et al.*, 2012; KUNTSCHEA *et al.*, 2011; KLANG *et al.*, 2013).

CAPÍTULO IV. Métodos de Caracterização de Nanoemulsões

Na parte superior do microscópio **Figura 7**, há uma coluna ou canhão de elétrons, comumente equipado com um filamento de Tungstênio (W) e um sistema de lentes eletromagnéticas ou bobinas que disparam uniformemente feixe de elétrons sobre a amostra contida numa tela fluorescente, o feixe de elétrons carrega informações sobre a estrutura, com essas informações, são geradas as "imagens" (KLANG *et al.*, 2012; KUNTSCHER *et al.*, 2011; KLANG *et al.*, 2013).

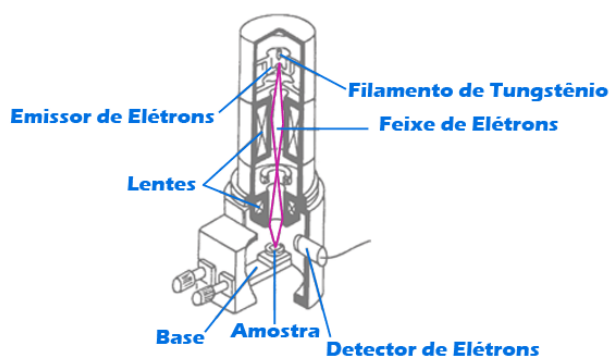
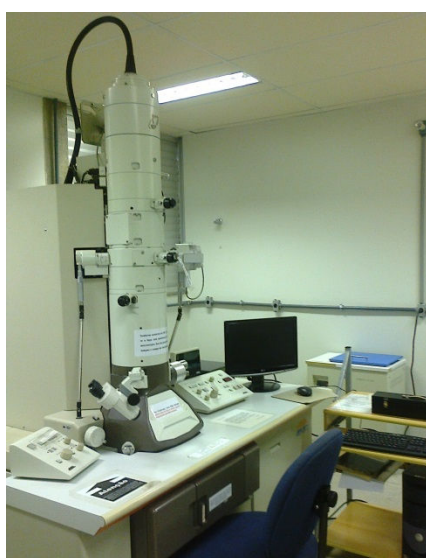


Figura 7. Microscópio Eletrônico de Transmissão – MET **Fonte:** Laboratório de Microscopia do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília – UnB.

Em MET a resolução (\AA) consiste em 3\AA e é diretamente proporcional à voltagem de aceleração dos elétrons, a faixa de tensão de aceleração (kV) é de 50 a 1000 kV e a faixa útil de aumento é compreendida de 1000 a 30000. Investigações MET de sistemas coloidais e sistemas veiculares de fármacos, voltagens entre 80 e 200 kV são geralmente empregadas. Com um aumento da voltagem, o feixe de elétrons possui maior poder de penetração e forma imagens com maior profundidade de campo (Profundidade de foco com 1000 X) (KLANG *et al.*, 2012; KUNTSCHER *et al.*, 2011; KLANG *et al.*, 2013).

CAPÍTULO IV. Métodos de Caracterização de Nanoemulsões

A alta resolução é obtida devido ao comprimento de onda dos elétrons, cerca de 100.000 vezes menor do que os fótons de luz visível gerando assim uma melhor resolução e obtenção de imagens abaixo de 10 μm , com isso pequenas estruturas e detalhes podem ser visualizados (KLANG *et al.*, 2012; KUNTSCHEA *et al.*, 2011; KLANG *et al.*, 2013).

A preparação da amostra para o MET deve ser feita cuidadosamente para assim facilitar a obtenção da imagem real da morfologia, dessa forma, dependendo do tipo de material os procedimentos iniciais geralmente consistem em diluição da amostra, adição de um agente de contraste e secagem (KUNTSCHEA *et al.*, 2011).

Após a diluição, uma quantidade da amostra é colocada numa tela apropriada para o MET, estas telas são de tamanho definido, formato arredondado e podem ser de Níquel (Ni), Cobre (Cu) e Ouro (Au), essas são fixadas com glutaraldeído (pentan-1,5-dial $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$) ou óxido de ósmio (VIII) OsO_4 , e coradas com um agente de contraste a base de Urânio (U), Chumbo (Pb) ou Ósmio (Os). Esses agentes de contraste consistem numa solução contendo sais dos respectivos metais mencionados anteriormente, os quais interagem fortemente com os elétrons e são frequentemente usados para melhorar a contrastação (KUNTSCHEA *et al.*, 2011).

Como exemplos desses agentes de contraste têm-se o acetato de uranila ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6\text{U}$), citrato de chumbo ($\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_{14}\text{Pb}_3$) e tetróxido de ósmio (VIII). No entanto, na escolha e ao manusear estes agentes, algumas informações a respeito destes devem ser levadas em consideração (**Tabela 2**) (KUNTSCHEA *et al.*, 2011).

A etapa de processamento ou contrastação consiste em aumentar as diferenças entre estruturas elétron-lúcidas e elétron-densas, fazendo com que a imagem ganhe contraste, dessa forma o contraste da imagem em MET é obtido pela interação dos elétrons com o material. Os agentes de contraste

CAPÍTULO IV. Métodos de Caracterização de Nanoemulsões

além de fixadores atuam como “corantes eletrônicos”, pois os mesmos são capazes de absorver elétrons ou dispersar parte do feixe de elétrons (KUNTSCHEA *et al.*, 2011; KLANG *et al.*, 2012).

Tabela 2. Informações peculiares dos principais agentes de contraste usados em microscopia eletrônica de transmissão.

Agente de contraste:	Acetato de uranila
Grupo:	Orgânico
Solubilidade em H ₂ O:	92 g/L
Dose Letal Oral/Ratos:	400 mg/Kg
Coloração:	Componentes celulares, especialmente ácidos nucleicos e outros materiais.
Tipo de coloração:	Negativa ^a e Positiva ^b
Incompatibilidade:	Materiais fortemente oxidantes.
Riscos Específicos:	Tóxico, Substância Radioativa
Agente de contraste:	Citrato de chumbo
Grupo:	Orgânico
Solubilidade em H ₂ O:	Solúvel em água g/L
Dose Letal Oral/Ratos:	---
Coloração:	Componentes celulares
Tipo de coloração:	Negativa ^a e Positiva ^b
Incompatibilidade:	Ácidos e materiais oxidantes
Riscos Específicos:	Substância carcinogênica, mutagênica, teratogênica.
Agente de contraste:	Tetróxido de ósmio (VIII)
Grupo:	Inorgânico
Solubilidade em H ₂ O:	5,7g /100g g/L
Dose Letal Oral/Ratos:	162 mg/Kg
Coloração:	Lipídios especificamente ácidos graxos insaturados, fosfolipídios constituintes da membrana citoplasmáticas, córnea humana, copolímeros, materiais inorgânicos.
Incompatibilidade:	Ácido clorídrico e materiais orgânicos que se oxidam facilmente.
Riscos Específicos:	Tóxico

^a Coloração negativa ocorre quando os metais utilizados presentes nos corantes são depositados em volta da espécimen ou nanopartícula. ^bNa coloração positiva o metal deposita-se diretamente sobre a espécimen ou nanopartículas (BALDANI *et al.*, 1998). --- não encontrado. **Fonte:** INTRALAB, (2015).

As imagens são formadas pelo feixe de elétrons que é projetado na amostra e conforme a capacidade que este tem para atravessar a amostra, assim são obtidas imagens elétron-lúcidas e elétron-densas, quando o feixe de elétrons atravessa facilmente na amostra, a imagem torna-se *cinza claro* e são denominadas imagens elétron-lúcidas, já amostras que oferecem maior resistência à passagem do feixe de elétrons a imagem torna-se *cinza escuro* e são denominadas imagens elétron-densas (KUNTSCHEA *et al.*, 2011; KLANG *et al.*, 2012).

CAPÍTULO IV. Métodos de Caracterização de Nanoemulsões

A espessura da amostra em MET é geralmente limitada a nanômetros para permitir a formação adequada da imagem (KLANG *et al.*, 2013). Depois da etapa de contrastação, as amostras passam por um processo de secagem e após a secagem, a amostra é visualizada no microscópio eletrônico onde as gotículas parecem mais claras contra o fundo mais escuro da tela. Tanto a coloração quanto a secagem podem resultar em alterações estruturais das gotículas, essas informações devem ser levadas em consideração na hora da interpretação das imagens (KUNTSCHEA *et al.*, 2011).

A principal limitação da microscopia eletrônica de transmissão é o risco de danos causados pelos feixes de elétrons, ou seja, pela interação dos elétrons com a amostra. Os elétrons podem ionizar a amostra, o que resulta na quebra de ligações atômicas, geração de radicais livres e degradação de estruturas cristalinas. A geração de radicais livres e a perda de massa podem causar danos físicos à amostra. No entanto, a extensão destes danos depende da dose de elétrons e o tipo de amostra que está sendo analisada (KLANG *et al.*, 2013).

CAPÍTULO V

- **Babaçu (*Orbignya phalerata* Martius) generalidades, importância e aplicações**

O babaçu (*Orbignya phalerata* Martius) é uma palmeira oleaginosa que foi descrita pela primeira vez em 1823 pelo botânico naturalista Martius. O gênero *Orbignya* conta com as espécies *Orbignya oleífera*, *Orbignya speciosa*, *Orbignya martiana*, *Orbignya phalerata*, *Orbignya eichleri*, *Orbignya teixeirana*, *Orbignya microcarpa*, *Orbignya agrestis*, pertencentes à família Arecaceae (Palmae). Além da *Orbignya* têm-se ainda a *Scheelea* e a *Attalea*. A classificação geral é dada pelo reino Plantae, divisão Magnoliophyta, classe Liliopsida, ordem Arecales, família Arecaceae, gênero *Orbignya* e espécie *phalerata* (TEIXEIRA, 2008; REIPERT *et al.*, 2011; LÓPEZ *et al.*, 2013; VINHAL *et al.*, 2014).

É uma palmeira nativa da América Central e América do Sul, encontrada especificamente no Brasil, Bolívia, Colômbia, México, Peru e Suriname. No Brasil são encontradas em florestas caducifólias da Amazônia oriental, entre o Cerrado e a Floresta Amazônica e no ecossistema da Mata dos Cocais. Com uma área total de ocorrência estimada em 18,5 milhões de hectares no país, distribuídas nas regiões Nordeste, Norte e Centro - Oeste, entre os estados do Maranhão, Piauí, Ceará, Bahia, Amazônia, Pará, Tocantins, Goiás e Minas Gerais (TEIXEIRA, 2008; SANTOS *et al.*, 2013; ALMEIDA *et al.*, 2011; PINHEIRO *et al.*, 2012; LÓPEZ *et al.*, 2013; LEITE *et al.*, 2014; VIEIRA *et al.*, 2011; REIPERT *et al.*, 2011; VINHAL *et al.*, 2014).

Entre os estados brasileiros citados, apenas o Maranhão detém a maior ocorrência de babaçuais (como são chamadas as florestas desta espécie) ocupando cerca de 90 % da área das florestas secundárias com 10,3 milhões de hectares (**Figura 8**) (GERMER, 2013). A espécie predominante no estado é a *Orbignya phalerata* Martius (Arecaceae) a qual tem sido amplamente estudada. A concentração desta espécie é mais alta na região dos Cocais do estado do Maranhão (BARBOSA *et al.*, 2012).



Figura 8. Palmeira de babaçu *Orbignya phalerata* Martius. **Fonte:** Autoria própria.

O Maranhão é o maior exportador de babaçu para outras regiões do país com 92,4 % e detém a maior produção de biomassa. A exploração sustentável do babaçu traz benefícios sociais, econômicos e ambientais para a região (TEIXEIRA, 2008). A exploração de palmeiras de babaçu é uma atividade bem estabelecida e antiga no Brasil. Após a primeira crise do petróleo em 1973, o Governo Federal Brasileiro considerou esta palmeira, juntamente com a cana de açúcar e a mandioca, como possíveis fontes de energia para substituir o petróleo importado (TEIXEIRA, 2008).

Um aspecto chave na exploração do babaçu é o sistema de recolha e coleta dos frutos. Os frutos são recolhidos manualmente nos babaçuais pela população indígena, rural e quilombola. As mulheres são as principais responsáveis pela recolha dos frutos e elas quebram o endocarpo usando um machado e um forte pedaço de madeira, dessa forma fixam o fruto sobre uma lâmina para abri-lo e recuperar as sementes ou amêndoas. Estas são vendidas para pequenos comerciantes, os quais vendem para as indústrias de extração de óleo (TEIXEIRA, 2008).

CAPÍTULO V. Babaçu (*Orbignya phalerata* Martius) generalidades, importância e aplicações

Esta atividade é uma parte significativa do rendimento financeiro para mais de 450 mil famílias camponesas, e também uma fonte econômica no Brasil. Estes números variam de acordo com a região e nível de organização entre as mulheres. Como exemplo, no Médio Mearim localizado no estado do Maranhão, existem os movimentos sociais organizados ou lideranças sindicais da agricultura e extrativismo que lutam para garantir os direitos destas mulheres para ter acesso às palmeiras em áreas privadas e continuar com o extrativismo do babaçu (TEIXEIRA, 2008).

Atualmente existem leis municipais aprovadas (Lei do Babaçu Livre, aprovada em 1997) que dão garantia ao livre acesso aos babaçuais que se encontram em terras privadas e públicas. Essas leis proíbem as derrubadas dos babaçuais, os cortes dos cachos e o uso de agrotóxicos e/ou herbicidas nestas áreas (MARIUZZO, 2013).

Em relação às características agrícolas e morfológicas das palmeiras de babaçu, os solos adequados para o seu crescimento são; o latossolo vermelho-amarelo, argiloso com textura média e de baixa inclinação para áreas planas, também solos vermelho-amarelo podzólicos e solos argilosos com textura média em paisagem de baixo-declive (TEIXEIRA, 2008).

A palmeira de babaçu é uma palmeira robusta que pode crescer até 20 m de altura, com estipe isolado cilíndrico de 25 a 44 cm de diâmetro, possui 7 a 22 folhas medindo de 4 a 8 m de comprimento (ALMEIDA *et al.*, 2011; VIEIRA *et al.*, 2011). O meristema apical é até 70 cm abaixo do nível do solo, tornando-o mais resistente ao corte (SOLER *et al.*, 2013).

Produz tipicamente de 15 a 25 frutos (cocos) dispostos em cachos, produzindo até seis cachos por palmeira (ALMEIDA *et al.*, 2011; REIPERT *et al.*, 2011; SOLER *et al.*, 2013). A época e a intensidade da produção dos frutos variam com a safra, região e condições meteorológicas vigentes, no entanto, a palmeira atinge a maturidade para a produção dos frutos depois de 10 a 12

CAPÍTULO V. Babaçu (*Orbignya phalerata* Martius) generalidades, importância e aplicações

anos, frutificando todo o ano, com pico de produção de Agosto a Janeiro. Com uma estimativa de até 10,6 bilhões de toneladas de frutos por ano (VIEIRA *et al.*, 2011; ALMEIDA *et al.*, 2011; SOLER *et al.*, 2013).

No Maranhão as épocas de coleta dos frutos compreendem entre os meses de Julho a Dezembro e ponto máximo da safra entre os meses de Setembro a Novembro. A produção anual de cocos de uma área com 141 a 160 palmeiras de babaçu por hectare é cerca de 2,5 ton/ano (ALMEIDA *et al.*, 2011).

Os frutos de babaçu são ovais, elipsoidal e alongado com 11, 3 × 6, 3 mm de diâmetro, coloração castanha e marrom (quando maduro), pesando entre 98 a 280 g, contendo em seu interior 4 a 6 sementes (ou denominadas também amêndoas) (REIPERT *et al.*, 2011; SOLER *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2013; ALMEIDA *et al.*, 2011; TEIXEIRA, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Cada fruto é constituído por quatro componentes: epicarpo (11 % p/p), mesocarpo (23 % p/p), endocarpo (59 % p/p) e amêndoa (7 % p/p). O epicarpo é formado por fibras resistentes o qual pode ser usado principalmente para a fabricação de escovas, papel reciclado. O mesocarpo é muito usado na fabricação de alimentos (devido à presença de 20 a 25 % de amido, vitaminas e sais minerais), como farinhas ou pó de babaçu e também para a produção de álcool metílico e ácido acético. O endocarpo pode ser usado na fabricação de isolantes térmicos, bio-joias, alcatrão e carvão. As amêndoas são transformadas em óleo bruto e vendidas para indústria de alimentos, cosméticos, biocombustíveis e outras, tanto no mercado nacional como internacional (VIEIRA *et al.*, 2011; ALMEIDA *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2013; VINHAL *et al.*, 2014; MARIUZZO, 2013).

Entre os subprodutos citados, merece a atenção à exploração de amêndoas para a extração e produção de óleo (VIEIRA *et al.*, 2011). As amêndoas são brancas, recobertas por uma película de coloração castanha, pesando em média de 3 a 4 g, contém elevado teor de óleo entre 60 a 68 % p/p, podendo alcançar até 72 % p/p em condições mais favoráveis da palmeira,

CAPÍTULO V. Babaçu (*Orbignya phalerata* Martius) generalidades, importância e aplicações

óleo este rico em triacilgliceróis (> 60 % p/p). A partir de 140 kg de amêndoas é possível extrair aproximadamente 91 litros de óleo, as amêndoas são constituídas também por sais minerais (Al, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Sr e Zn), fibras, proteínas e carboidratos (OLIVEIRA *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2013).

As exportações brasileiras de amêndoa e de óleo de babaçu têm aumentado nos últimos anos, devido às suas aplicações industriais, tais como em alimentos, detergentes, biocosméticos e também para a produção de biodiesel (SOLER *et al.*, 2013; CINELLI *et al.*, 2014; FERREIRA & COSTA, 2014).

O óleo de babaçu (*O. phalerata* Martius) bruto possui coloração amarela, quando refinado passa ser visualmente mais claro. Contém um nível elevado de ácidos graxos saturados de cadeia média, como exemplo o ácido láurico, sendo o mais abundante (40 a 55 % p/p). Este óleo contém uma maior concentração de graxos insaturados (10 a 26 % p/p) quando comparado com o óleo de coco (*Cocos nucifera* L.) (6 a 12 % p/p) (REIPERT *et al.*, 2011).

Em relação às propriedades físico-químicas do óleo de babaçu (*O. phalerata* Martius) o mesmo possui umidade < 1,0 %, índice de refração $1,4488 \pm 0,0005 n_D^{40}$, índice de ácidos graxos livres de $0,0449 \pm 0,0038$ %, índice de saponificação entre 200,949 a 235,2 mg KOH/óleo(g) (SANTOS, 2009; WASULE *et al.*, 2014). Segundo os padrões da ANVISA (1999) o índice de iodo (Wijs) deve está compreendido entre 10 – 18, matéria insaponificável (g/100g) no máximo 1,2 %, índice de peróxido no máximo 10 (meq/kg) e densidade relativa 25°C / 20°C entre 0,914 - 0,917, a mesma ainda define este óleo como óleo ou gordura de aplicação comestível.

A composição de ácidos graxos inclui: ácido láurico C12:0 (46,53 % p/p), ácido oleico C18:1 (16,51 % p/p), ácido mirístico C14:0 (16,91 % p/p), ácido palmítico C16:0 (9,3 % p/p), ácido cáprico C10:0 (3,35 % p/p), ácido

CAPÍTULO V. Babaçu (*Orbignya phalerata* Martius) generalidades, importância e aplicações

caprílico C8:0 (2,65 % p/p), ácido esteárico C18:0 (3,20 % p/p) e ácido linoleico C18:2 (1,72 % p/p) (SANTOS *et al.*, 2013).

Conforme estudo realizado por Santos *et al.*, (2013) a composição química relacionada ao perfil de ácidos graxos do óleo de babaçu (*O. phalerata* Martius) oriundo de diversas localidades do estado do Maranhão revelou que não houve diferença quanto aos tipos de ácidos graxos encontrados entre as cidades do estudo. No entanto, dependendo da região ecológica o teor de ácidos graxos (% p/p) pode variar. No presente trabalho, os óleos investigados são oriundos das regiões ecológicas Cocais e Cerrado Maranhense.

Estudos etnofarmacológicos têm revelado que a administração oral do óleo de babaçu é indicada para o tratamento de desordens inflamatórias, dores menstruais, obesidade, reumatismo e doenças urinárias. Quanto à administração tópica é indicada para o tratamento de feridas cutâneas e outros tipos de ulcerações (SOUZA *et al.*, 2011).

Recentemente, o efeito do óleo de babaçu no sistema imunitário foi confirmado no trabalho de Pessoa *et al.*, (2015). Microemulsões de óleo de babaçu conseguiram ativar os mecanismos funcionais de fagócitos mononucleares, ativando o sistema imunitário.

Alguns compostos bioativos podem modular e melhorar a função imunológica, o óleo de babaçu microemulsionado apresentou uma ação imunoestimulante, os autores relatam que sistemas microemulsionados de óleo de babaçu pode ser uma alternativa para futuras aplicações de imunoterapia, em especial para doenças infecciosas. A mesma ação imunoestimulante foi confirmada pelos pesquisadores Cantarini *et al.*, (2015) quando utilizaram-se extratos das folhas de babaçu.

CAPÍTULO V. Babaçu (*Orbignya phalerata* Martius) generalidades, importância e aplicações

Nanocompósitos de óleo de babaçu conseguiram reduzir sintomas do trato urinário causados por hiperplasia prostática benigna, conforme estudo realizado por Sousa *et al.*, (2013). Tanto o óleo quanto resíduos oriundos do babaçu, tem potencial para ser usado em tratamento de cicatrização de feridas e fins terapêuticos (Martins *et al.*, 2006), atividade antinociceptiva, propriedades analgésicas e anti-inflamatórias (PINHEIRO *et al.*, 2012).

Segundo Barbosa *et al.*, (2012) o óleo de babaçu (*O. phalerata* Martius) produz efeitos sobre a permeabilidade microvascular na interação leucócito-endotélio. Possui componentes bioativos antioxidantes (Ferreira *et al.*, 2011), permitindo assim quanto ao seu uso para fins alimentícios e entre outras finalidades (ALMEIDA, 2001).

Sistemas nanoestruturados para aplicação farmacêutica utilizando óleo de babaçu (*Orbignya speciosa*) foram formulados pelos pesquisadores Rodrigues *et al.*, (2015). Apesar do fato do óleo de babaçu, ser um dos óleos naturais consumido na alimentação e usado na medicina popular, ele permanece quase inexplorado como matéria-prima em nanoformulações com potencial antioxidante.

CAPÍTULO VI

- **Potencial antioxidante em matrizes alimentares (óleos vegetais comestíveis) e método de avaliação por EPR**

Antioxidantes são substâncias que funcionam a baixas concentrações para evitar a oxidação de um produto altamente reativo (oxidável). Eles podem ser naturalmente, tais como; os tocoferóis e o ácido ascórbico (vitamina C) ou podem ser antioxidantes sintéticos, tais como, o hidroxianisol butilado (BHA) e hidroxitolueno butilado (BHT). Com aumento de relatos sobre os possíveis efeitos tóxicos dos antioxidantes sintéticos, há um consciente esforço para substituí-los pelos naturais (NAIK *et al.*, 2014; APAK *et al.*, 2013).

Componentes derivados de extratos naturais têm recebido grande atenção nas últimas décadas, e mostrando-se promissores devido a várias atividades biológicas como; anti-inflamatória, antioxidante, anti-apoptótica e entre outras. Sabe-se que a alimentação exerce uma influência considerável sobre a condição fisiológica do corpo humano e é de suma importância observar o tipo e a qualidade da nutrição, proporção dos nutrientes, equilíbrio alimentar em matéria de proteínas, carboidratos, gorduras, macro e oligoelementos e assim por diante (RAHAL *et al.*, 2014; OMENA *et al.*, 2012).

A proteção fornecida por alguns alimentos contra doenças, incluindo câncer e doenças cardiovasculares, tem sido atribuída aos diversos antioxidantes naturais, contidos nesses alimentos (RAHAL *et al.*, 2014). Há provas contundentes para sugerir que as fontes nutricionais antioxidantes, como frutas, vegetais, óleos, extratos e vinhos ajudariam a atenuar os danos aos tecidos causados por compostos oxidativos (PANDEY & RIZVI, 2010).

Atualmente, existe uma crescente atenção aos antioxidantes naturais presentes nas plantas. Muitos compostos antioxidantes são isolados a partir de extratos naturais e usados como potenciais antioxidantes em vários segmentos da indústria. Devido aos benefícios e propriedades terapêuticas, os extratos naturais de algumas plantas e seus derivados (como exemplo, os óleos) têm

CAPÍTULO VI. Potencial antioxidante em matrizes alimentares (óleos vegetais comestíveis) e método de avaliação por EPR

sido frequentemente incluídos na composição de emulsões e formulações farmacêuticas (RAUDONIS *et al.*, 2014).

Produtos naturais *in natura* contêm maiores quantidades de compostos bioativos que apresentam maior atividade antioxidante do que produtos minimamente processados, ainda que se trate do mesmo produto alimentar. Essas diferenças são decorrentes das condições de tratamento que estes alimentos são sujeitos (APAK *et al.*, 2013; GUTTERIDGE & HALLIWELL, 2010; RAUDONIS *et al.*, 2014).

Muitos trabalhos científicos recomendam o consumo de vegetais, frutas, óleos e cereais que apresentam atividade antioxidante. Encontrar produtos naturais com elevada atividade antioxidante é um desafio para muitos pesquisadores (APAK *et al.*, 2013).

O uso de óleos e gorduras vegetais está em expansão para aplicações alimentares. Devido à crescente demanda, tornou-se necessário explorar mais estes recursos quanto suas propriedades nutricionais (ANWAR *et al.*, 2014). O óleo vegetal é um macronutriente que fornece energia para o metabolismo e atua como uma fonte de ácidos graxos. Nutricionalmente, os ácidos graxos desempenham um papel fisiológico significativo e são, assim, reconhecidos na prevenção de uma série de doenças metabólicas. No entanto, devido à sua natureza química, eles são altamente propensos à degradação oxidativa (NAIK *et al.*, 2014).

Os antioxidantes são amplamente utilizados para prevenir a oxidação de óleos e gorduras e para prolongar a vida de prateleira destes produtos (KOZŁOWSKA *et al.*, 2012). Embora os antioxidantes sejam úteis para impedir a oxidação de lipídios, a sua atividade pode variar amplamente dependendo da composição do sistema. Ligações de hidrogênio, acessibilidade à camada interfacial e interação do surfactante com antioxidantes são considerados

CAPÍTULO VI. Potencial antioxidante em matrizes alimentares (óleos vegetais comestíveis) e método de avaliação por EPR

parâmetros importantes que determinam a atividade antioxidante em sistemas contendo lipídios. O tipo de emulsionante (surfactante) pode influenciar a distribuição de moléculas antioxidantes numa emulsão e, assim, contribuir também para diminuir a oxidação lipídica das gotículas de óleo (REGE *et al.*, 2015).

Biomoléculas como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos podem ser atacadas por radicais livres, entre eles os lipídios são, provavelmente, a classe mais suscetível. A degradação oxidativa dos lipídios (peroxidação lipídica) é uma reação em cadeia, liberando malonil-dialdeído (MDA) como o produto final (KHALIL *et al.*, 2014).

Os radicais livres possuem um elétron desemparelhado que se encontra centrado nos átomos de oxigênio (O) ou nitrogênio (N) e são denominadas espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), respectivamente. As ERO são produtos instáveis e distribuem-se em 02 grupos (RAHAL *et al.*, 2014):

1. Radicalares: Radical Hidroxila (HO^\bullet), Superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), Peroxila (ROO^\bullet) e alcoxila (RO^\bullet);
2. Não-radicalares: Oxigênio (O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HClO).

Dentre as ERN incluem-se o óxido nítrico (NO^\bullet), óxido nitroso (N_2O), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-). Enquanto alguns deles podem ser altamente reativos atacando apenas lipídios, outros são reativos comprometendo outras moléculas tais como, proteínas e DNA (RAHAL *et al.*, 2014; APAK *et al.*, 2013).

CAPÍTULO VI. Potencial antioxidante em matrizes alimentares (óleos vegetais comestíveis) e método de avaliação por EPR

Cada célula do corpo humano mantém um estado de equilíbrio entre as espécies oxidantes e antioxidantes. Apenas 1 a 3% do consumo de oxigênio pelos seres humanos é convertido em espécies reativas de oxigênio (ERO). Sob condições normais de metabolismo, a formação contínua de ERO e outros radicais livres é importante para as funções fisiológicas normais, como geração de Adenosina Trifosfato (ATP), processos catabólicos e os ciclos redox celulares. No entanto, quando a produção de radicais livres supera os níveis de antioxidantes, pode causar consideráveis danos e/ou morte celular, favorecendo ao surgimento de problemas de saúde (RAHAL *et al.*, 2014; KHALIL *et al.*, 2014).

Muitos componentes da dieta são capazes de anular os danos causados pelas ERO, tais como: vitamina C, tocoferóis (vitamina E), carotenóides, polifenóis, etc. Dessa forma, tem sido sugerida a inclusão de compostos antioxidantes na dieta. Em 2007, ingredientes e suplementos antioxidantes representaram um mercado de 3,7 bilhões de dólares por ano nos Estados Unidos (FINLEY *et al.*, 2011).

Devido à diversidade química dos antioxidantes naturais presentes em certos alimentos ou matrizes biológicas, na maioria das vezes torna-se difícil separar e quantificar estes compostos. Dessa forma, vários protocolos são propostos na expectativa de mensurar a atividade e/ou capacidade antioxidante (APAK *et al.*, 2013).

Os termos "atividade antioxidante" e "capacidade antioxidante" têm significados diferentes: Atividade antioxidante trata-se da cinética de uma reação entre um antioxidante e um oxidante, o qual a molécula antioxidante consegue reduzir ou eliminar a concentração de um oxidante. Já a capacidade antioxidante refere-se à eficiência de conversão termodinâmica de um oxidante por reação com um antioxidante (APAK *et al.*, 2013; GUTTERIDGE & HALLIWELL, 2010).

CAPÍTULO VI. Potencial antioxidante em matrizes alimentares (óleos vegetais comestíveis) e método de avaliação por EPR

Atualmente, muitos métodos analíticos são capazes de determinar a atividade e capacidade antioxidante *in vitro*. Quando se trata de investigar a atividade antioxidante de amostras lipofílicas, geralmente as soluções dos analitos são preparadas com metanol (MeOH) ou etanol (EtOH) (APAK *et al.*, 2013). Os procedimentos de ensaios amplamente utilizados para medir a atividade antioxidante *in vitro*, são apresentados na **Tabela 3**, muitas vezes dependem na geração ou captura de radicais livres não biológicos (radicais livres sintéticos). Tais ensaios são úteis quando se quer comparar a atividade antioxidante *in vitro* de certas amostras (exemplo, alimentos), contudo biologicamente estes resultados não podem ser inteiramente interpretados (GUTTERIDGE & HALLIWELL, 2010; APAK *et al.*, 2013).

Tabela 3. Tipos de ensaios para medição da atividade antioxidante.

Ensaio	Radical ou oxidante	Princípio de medição
DMPD	DMPD ⁺⁺	Absorbância (505 nm)
DPPH	DPPH [•]	Absorbância (515 nm)
FRAP	Fe ³⁺	Absorbância (595 nm)
LDL oxidação	Cu ²⁺	Absorbância (234 nm)
ORAC	AAPH [•]	Fluorescência
PCL	O ₂ ⁻	Quimioluminescência
TEAC	ABTS ⁺⁺	Absorbância (734 nm)
TRAP	AAPH [•] 9 e 13 -	Fluorescência
β-Caroteno/ ácido linoléico	Hidroperóxidos de ácido linoléico	Absorbância (470 nm)

DMPD: N,N-dimetil-p-fenilenodiamina; **DPPH:** 2,2-difenil-1-picril-hidrazil; **FRAP:** Poder Antioxidante de Redução do Ferro; **LDL:** Lipoproteína de baixa densidade; **ORAC:** Capacidade de absorção do radical oxigênio; **PCL:** Quimioluminescência; **TEAC:** Capacidade antioxidante equivalente; **TRAP:** Radical total – parâmetro de interceptação antioxidante; **AAPH:** 2,2- azobis amidinopropano; **ABTS:** 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico. **Fonte:** Adaptada de APAK *et al.*, (2013).

Entre os ensaios citados na **Tabela 3**, no presente trabalho será dada ênfase ao ensaio do DPPH. Muitos compostos e extratos de plantas possuem atividade antioxidante considerável *in vitro* em ensaios utilizando o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH[•]) (HALLIWELL, 2012). Segundo Sanna *et al.*, (2011) o ensaio com o radical DPPH[•] consiste em um método confiável

CAPÍTULO VI. Potencial antioxidante em matrizes alimentares (óleos vegetais comestíveis) e método de avaliação por EPR

amplamente aplicado para avaliar a atividade antioxidante especialmente de frutas, produtos hortícolas e extratos de plantas.

O radical DPPH[•] foi descoberto por Goldschmidt e Renn em 1922, e consiste numa molécula que apresenta três grupos NO₂ ligados no anel aromático denominado picril-hidrazila, contendo um elétron desemparelhado situado em um átomo de Nitrogênio (N) (**Figura 9**). Sua fórmula condensada é C₁₈H₁₂N₅O₆ com peso molecular de 394 g.mol⁻¹, em condição ambiente apresenta-se fisicamente no estado sólido de coloração púrpura intensa e absorve a 515 nm. Sua principal aplicação é como reagente colorimétrico em testes para verificar a ação antioxidante de certos compostos (SOUSA *et al.*, 2007; TEIXEIRA, 2015; APAK *et al.*, 2013; OLIVEIRA, 2015).

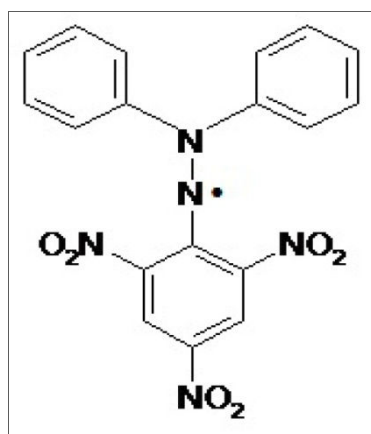


Figura 9. Fórmula estrutural do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH[•]). **Fonte:** Oliveira, (2015).

Os radicais livres, por apresentarem um elétron desemparelhado, são instáveis e muito reativos, o que resulta em tempo de vida muito pequeno. No caso do DPPH[•], observa-se certa estabilidade, que pode ser explicada pelo fato de sua estrutura possuir ligações duplas alternadas nos anéis benzênicos, favorecendo assim a um efeito de ressonância, muito eficaz para estabilizar a carga eletrônica dispersando-a por toda a molécula (**Figura 10**). Dessa forma,

CAPÍTULO VI. Potencial antioxidante em matrizes alimentares (óleos vegetais comestíveis) e método de avaliação por EPR

a espécie radicalar DPPH[•] torna-se mais estável. Além disso, os grupos NO₂ ligados no anel picril-hidrazila auxiliam também na estabilização do elétron desemparelhado, descentralizando-o, pois são grupos retiradores de elétrons. Esses efeitos eletrônicos associados explicam o fato do DPPH[•] ser um radical livre relativamente estável (TEIXEIRA, 2015; OLIVEIRA, 2015).

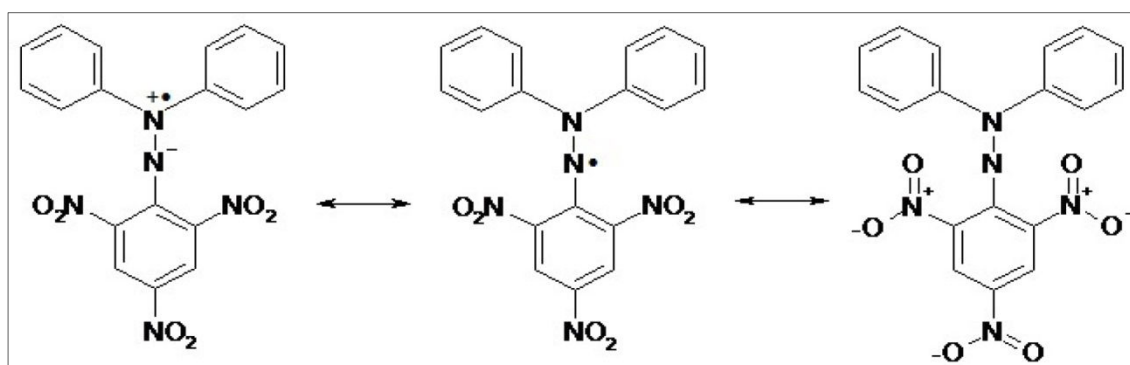


Figura 10. Mecanismos de estabilização do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH[•]) pelo deslocamento do elétron desemparelhado. **Fonte:** Adaptada de Oliveira, (2015).

O DPPH[•] pode agir como um capturador de outros radicais livres ou de substâncias neutras capazes de estabilizá-lo. As substâncias com propriedades antioxidantes possuem essa capacidade. No teste de captura com DPPH[•] ocorre uma reação de oxi-redução. Por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar, este radical é reduzido formando o difenil-picril-hidrazina DPPH₂ (**Figura 11**) de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo o mesmo ser monitorado pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante e/ou a porcentagem de DPPH[•] remanescente no meio reacional (SOUSA *et al.*, 2007).

CAPÍTULO VI. Potencial antioxidante em matrizes alimentares (óleos vegetais comestíveis) e método de avaliação por EPR

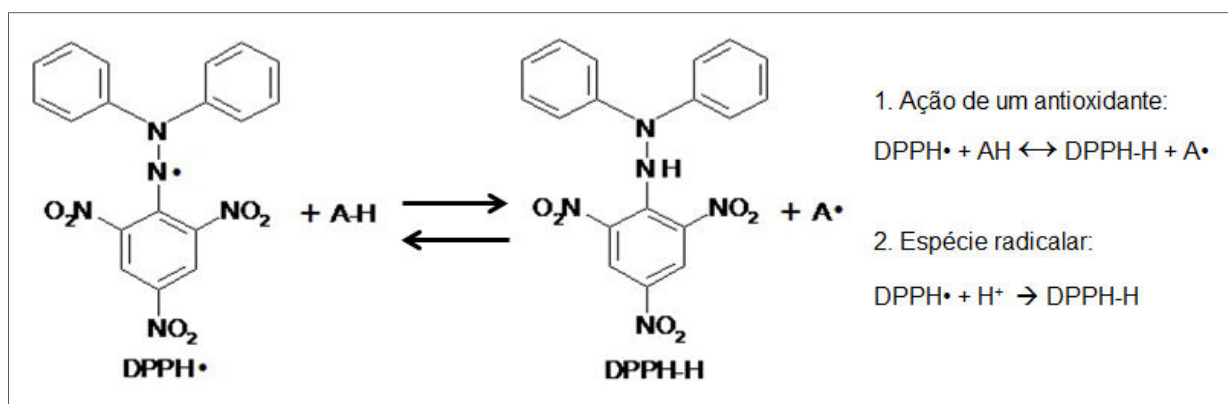


Figura 11. Mecanismos da reação entre o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH[•]) e um antioxidante (AH) através da transferência de um átomo de hidrogênio. **Fonte:** Adaptada de Oliveira, (2015).

A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) corresponde à quantidade de DPPH[•] consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH[•] em 50% é denominada concentração eficiente (CE50), também chamada de concentração inibitória (CI50). Quanto maior o consumo de DPPH[•] por uma amostra, menor será a sua CE50 e maior a sua atividade antioxidante (SOUSA *et al.*, 2007).

Algumas técnicas usadas para mensurar o DPPH[•] envolve a espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) e a Ultravioleta Visível (UV-Vis). O Radical DPPH[•] é paramagnético e é conhecido por gerar um espectro EPR complexo (devido à superposição de nove linhas), gerando um sinal de cinco linhas com intensidades diferentes conforme demonstrado na **Figura 12** (SANTOS, 2006).

CAPÍTULO VI. Potencial antioxidante em matrizes alimentares (óleos vegetais comestíveis) e método de avaliação por EPR

Por possuir dois núcleos de nitrogênio de spin $I = 1$, a interação do elétron com o primeiro núcleo gera três linhas com constante de 0,82 mT. Cada uma das três linhas se desdobra em outras três linhas devido a interação com o segundo núcleo com constante de 0,97 mT, como a largura da linha é cerca de 6,7 G há uma superposição destas nove linhas resultando em um espectro complexo de cinco linhas (SANTOS, 2006). Ele pode aceitar um elétron ou um átomo de hidrogênio para formar uma molécula estável diamagnético (NAIK *et al.*, 2014).

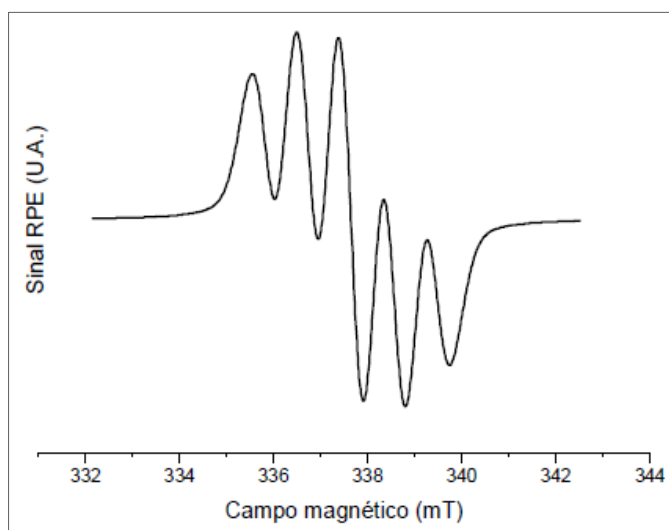


Figura 12. Sinal EPR do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH'). **Fonte:** Santos, (2006).

O princípio básico da espectroscopia EPR é investigar espécies químicas com elétrons desemparelhados, submetidas à presença de um forte campo magnético. As medições resultam na absorção de radiação eletromagnética (micro-ondas) que é então detectado por um espectroscópio EPR que converte o sinal de absorção. Assim, as moléculas (radicais livres orgânicos ou inorgânicos) que apresentam um comportamento paramagnético podem ser identificadas (NAIK *et al.*, 2014).

CAPÍTULO VI. Potencial antioxidante em matrizes alimentares (óleos vegetais comestíveis) e método de avaliação por EPR

O fator de proporcionalidade (fator-***g***) é uma constante de proporcionalidade, cujo valor é de propriedade do elétron em um determinado ambiente. A diferença de energia de um estado de um elétron com $s = 1/2$ em um campo magnético é: **(1) $\Delta E = g\beta B$** . Onde **β** é a constante de Bohr magneton, **B** o campo magnético. Uma vez que a energia absorvida pelo elétron deve ser exatamente a mesma da diferença de energia **ΔE** , e sabendo-se que **$\Delta E = h\nu$** (**h** é a constante de Planck) e **ν** a frequência, a equação **(1)** pode ser expressa como: **(2) $h\nu = g\beta B$** (ZHAO, 2015).

O analista pode controlar a frequência (**ν**) de micro-ondas e o campo magnético (**B**) que será aplicado e assim espectros podem ser adquiridos em diferentes frequências de micro-ondas. Dessa forma, o valor de ***g*** da absorção no espectro pode ser obtido pela equação: **(3) $g = 71.4484 \cdot \nu$ (em GHz) / B (em mT)** (ZHAO, 2015). Este valor contém a informação química que se encontra a interação do elétron na estrutura eletrônica da molécula, pode-se simplesmente tomar o valor de ***g*** como uma impressão digital da molécula. Para radicais orgânicos, o valor ***g*** varia de 1,99 a 2,01. O valor do fator-***g*** não está apenas relacionado com o ambiente eletrônico, mas também relacionado com a anisotropia. Assim um sinal EPR pode ser utilizado para a identificação e quantificação de radicais (NAIK *et al.*, 2014).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Desenho Experimental

Na Figura 13 é demonstrado o delineamento experimental da pesquisa.

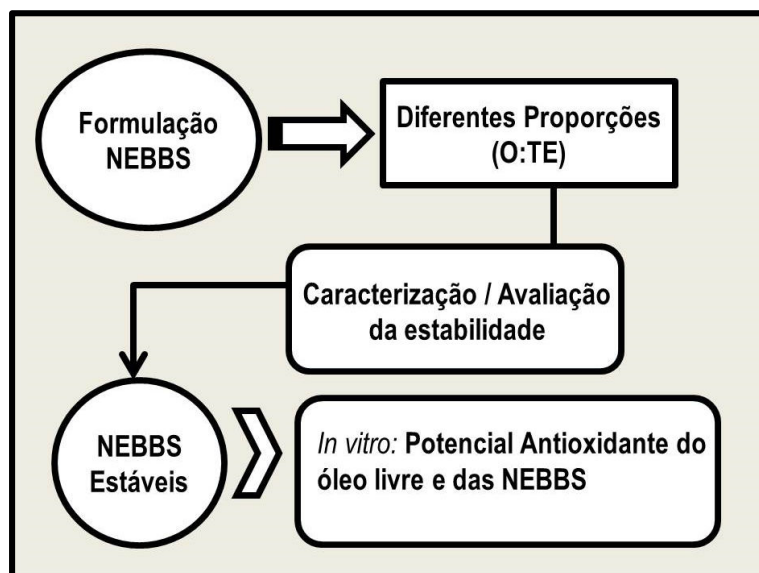


Figura 13. Desenho Experimental da Pesquisa. O:TE (óleo:tensoativo)

5.2. Amostras e materiais utilizados

No presente trabalho foram utilizadas amostras de óleos vegetais extraídos artesanalmente a partir das sementes do fruto babaçu (*O. phalerata* Martius), oriundos da região nordeste do Brasil das áreas ecológicas Cocais e Cerrado do estado do Maranhão. Os óleos foram provenientes dos seguintes municípios: Fortuna (FOR) (Latitude S: 05°44'00" e Longitude W: 44°09'30", área de 694,997 km², clima tropical com estação seca); Caxias (CAX) (Latitude S: 04°51'32" e Longitude W: 43°21'22", área de 5.150,667 km², clima tropical com estação seca) e Santa Quitéria (SQT) (Latitude S: 03°29'59" e Longitude W: 42° 33' 54", área de 1.917,589 km², clima tropical com estação seca).

Na **Tabela 4** encontram-se as especificações dos materiais utilizados para a fase dispersa, estes materiais foram escolhidos conforme o valor de EHL. Utilizou-se água Milli-Q ultrapura para a fase dispersante.

Tabela 4. Especificações dos materiais utilizados para produção das NEBBS.

Tensoativos	Marca	CAS	Fórmula Molecular	Densidade g/cm ³	EHL
Castor Oil (Óleo de rícino)	Sigma	8001-79-4	C ₅₇ H ₁₀₄ O ₉	0,961	14 - hidrofílico
Span 80®	FlukaAnalytical	1338-43-8	C ₂₄ H ₄₄ O ₆	1,068	4,3 - lipofílico
Tween 80 POE (20) Sorbitanmonooleate	Sigma Aldrich	9005-65-6	C ₃₂ H ₆₀ O ₁₀	1,060	15- hidrofílico
Kolliphor®Cremophor®	Sigma	61791-12-6	C ₅₇ H ₁₀₄ O ₉ (CH ₂ CH ₂ O) _n	1,050	13 - hidrofílico

CAS:Chemical Abstracts Service; **EHL:** Equilíbrio Hidrofílico Lipofílico; **POE:**Polioxiétileno

5.3. Formulação das nanoemulsões (NEBBS)

As nanoemulsões de babaçu NEBBS foram produzidas utilizando-se a técnica de emulsificação espontânea com adaptações (SOLANS & SOLÉ, 2012). O protocolo foi ajustado para os parâmetros físicos relacionados à temperatura, tempo de homogeneização, velocidade de rotação, meio dispersante. As condições operacionais foram: Temperatura de homogeneização (60°C), tempo de homogeneização (10 minutos), velocidade de rotação (300 rpm), meio dispersante (Água Ultrapura), sendo que após formuladas as mesmas foram armazenadas a temperatura ambiente.

Foram formuladas 06 NEBBS com diferentes concentrações, proporções e associações (óleo/tensoativo), conforme dados disponíveis da **Tabela 5**. Calculou-se o valor crítico total do EHL (Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico) das nanoformulações referente à mistura dos componentes com EHL conhecidos, a partir da fórmula proposta por Leal *et al.*, (2013). Para a obtenção dessas concentrações foi realizado todo um escalonamento a partir de diferentes proporções dos constituintes.

Tabela 5. Concentração dos óleos BBS/H₂O e proporções das formulações.

NANOEMULSÃO	[BBS] (mg/mL)	PROPORÇÕES (m/m)
NEBBS01	3	4:1:1,66 (BBS ^a :TE1:TE2)
NEBBS02	10	1:4:2 (BBS ^b :CO:TE3)
NEBBS03	10	1:4:2 (BBS ^a :CO:TE3)
NEBBS04	10	1:4:2 (BBS ^b :CO:TE2)
NEBBS05	250	4:1:1 (BBS ^c :TE1:TE3)
NEBBS06	125	1:1:1 (BBS ^c :TE3:CO)

[BBS]: Concentração do óleo de babaçu; ^aÓleo 1 (**FOR**); ^bÓleo 2 (**CAX**); ^cÓleo 3 (**SQT**); **TE1:** Tensoativo Span 80; **TE2:** Tensoativo Tween 80; **TE3:** Tensoativo Cremophor; **CO:** Castor Oil.

5.4. Ensaios de Caracterização e Estabilidade

Os ensaios de caracterização e estabilidade descritos a seguir foram realizados nos seguintes locais: Laboratório de Nanobiotecnologia - Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, Núcleo de Física Aplicada - Instituto de Física da Universidade de Brasília e Laboratório de Microscopia do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília.

5.4.1. Avaliação do Diâmetro Hidrodinâmico (DH nm) das gotículas e Índice de Polidispersão-PDI

A determinação do DH das gotículas foi por meio da técnica Espalhamento Dinâmico da Luz (Dynamic Light Scattering – DLS) (LIANG *et al.*, 2012). Para isso foi utilizado o equipamento Zetasizer Nano Series (modelo ZEN3690, Malvern Instruments®, Reino Unido). As nanoemulsões (NEBBS) foram diluídas na proporção de 1:20 em água ultrapura Milli-Q e transferidas para suas respectivas cubetas. As condições operacionais foram:

- ✓ Meio Dispersante: Água Ultrapura
- ✓ Temperatura: 25°C
- ✓ Ângulo fixo: 90°
- ✓ Tempo de Equilíbrio: 60 s

As leituras do DH (nm) e PDI das NEBBS foram realizadas após 01, 07, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 dias para compreender o estudo de estabilidade acelerada.

5.4.2. Potencial Zeta (ζ) mV

As determinações dos Potenciais Zeta (ζ) das NEBBS foram realizadas por meio da técnica espalhamento de luz eletroforético (Kaszuba *et al.*, 2010) utilizando o equipamento Zetasizer Nano Series, (modelo ZEN3690, Malvern Instruments®, Reino Unido). Um laser foi incidido nas amostras e assim foi medido o deslocamento doppler na luz espalhada pelas partículas. As nanoemulsões (NEBBS) foram diluídas na proporção de 1:20 em água ultrapura Milli-Q e transferidas para cubetas específicas com dois eletrodos. As condições operacionais foram:

- ✓ Meio Dispersante: Água Ultrapura
- ✓ Temperatura: 25°C
- ✓ Modelo: Smoluchowski
- ✓ Célula Zeta (cubeta): DTS1060C

As leituras dos potenciais ζ (mV) das NEBBS foram realizadas após 01, 07, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 dias para compreender o estudo de estabilidade acelerada.

5.4.3. Potencial Hidrogeniônico (pH)

O Potencial Hidrogeniônico – pH das NEBBS foi determinado utilizando pHmetro de bancada microprocessado, precisão $\pm 0,01$, sensibilidade 99 % (modelo NTPHM, Nova Técnica, Brasil) (DORDEVIC *et al.*, 2013). Previamente calibrado com as soluções padrões pH 4,0 e pH 7,0. Para isto foram realizadas diluições de 1:10 com três determinações de leitura a 25°C. O eletrodo foi lavado inicialmente com álcool a 70% e água ultrapura Milli-Q e após o término das leituras para cada amostra. As leituras correspondentes ao pH das NEBBS foram realizadas nos períodos 01, 07, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 dias para compreender o estudo de estabilidade acelerada.

5.4.4. Ponto Isoelétrico – PI

Para determinação do PI, o protocolo foi ajustado de Tang *et al.*, (2012). As NEBBS foram submetidas aos meios: ácido, básico e neutro. Para isto foram preparadas soluções de HCl 0,1M e NaOH 0,1M, estas foram utilizadas para adição de íons H⁺ e OH⁻ na água ultrapura respectivamente, até a obtenção dos seguintes meios com pHs: 3, 5, 7, 9 e 11. Para verificação do pH utilizou-se um pHmetro de bancada microprocessado, resolução ± 0,01 (modelo NT PHM, Nova Técnica, Brasil). Foram aliqüotados 50 µL da nanoemulsão em 950 µL do meio, as amostras foram homogeneizadas utilizando-se um Vortex e levadas para leitura do Potencial ζ e DH.

5.4.5. Teste de Centrifugação

Para o teste de centrifugação, foi utilizado uma Ultra centrífuga (modelo Mikro 220R, Hettich Zentrifugen, Alemanha), conforme o seguinte protocolo; as NEBBS foram distribuídas em três microtubos de capacidade 2 mL e as condições operacionais foram:

- ✓ Velocidades de Rotação: 1000, 2500 e 3500 rpm (94, 587, 1150g)
- ✓ Tempo: 15 minutos
- ✓ Temperatura: 25°C

O teste de centrifugação foi realizado após 01, 07, 15, 30, 45 e 60 dias.

5.4.6. Ciclo resfriamento e aquecimento

O protocolo experimental foi adaptado a partir de Bali *et al.*, (2010). Para o teste de resfriamento e aquecimento utilizaram-se os seguintes equipamentos: Geladeira (modelo RFCT 451, frostfree, BSH Continental ©, Brasil) e Estufa (modelo DL-SE, De Leo Equipamentos, Brasil), temperaturas: 4° e 37,5°C, respectivamente. Foram transferidos 2 mL de nanoemulsão (NEBBS) para um tubo de eppendorf e estas foram inicialmente resfriadas por 24 horas e em seguida aquecidas por 24 horas, perfazendo assim um ciclo.

Após o término de cada ciclo foi realizada a leitura do Diâmetro Hidrodinâmico (item 5.4.1). Cada amostra foi submetida a 05 ciclos.

5.4.7. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

O processo de preparação da amostra para visualização dos glóbulos presentes na nanoemulsão seguiu conforme protocolo padrão preconizado pelo Laboratório de Microscopia da Universidade de Brasília. Foi utilizado um Microscópio Eletrônico de Transmissão (modelo JEM-1011 Electron Microscope, JEOL Ltda, Japão).

A nanoemulsão foi diluída na proporção de 1:10 (nano:H₂O ultrapura) homogeneizada e em seguida foi pipetado 3 µL da amostra numa tela de cobre de 3 mm de diâmetro recoberta por um filme de Formvar, foi realizada contração negativa com o reagente tetróxido de ósmio. A amostra foi deixada para secagem durante 24 h em temperatura ambiente. A captura da imagem foi obtida no aumento de 100x com 80 kv. A análise quantitativa do tamanho modal das nanoemulsões foi realizada com a utilização do software Image-Pro Plus 5.1 (Media Cybernetics, USA).

5.5. Ensaio *in vitro* das NEBBS estáveis

5.5.1. Atividade antioxidante *in vitro* do óleo livre e das NEBBS

O ensaio para a atividade antioxidante *in vitro* das NEBBS e do óleo BBS foi por meio da utilização da Técnica de Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica – RPE ou EPR, técnica esta muito sensível e seletiva para detecção de radicais livres. Utilizou-se o reagente 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•) C₁₈H₁₂N₅O₆ como radical livre, segundo método adaptado de Rufino *et al.*, (2007).

Para isto, foi preparado solução de DPPH• a 250 µM em etanol P.A, solução tampão de acetato de sódio a 100 mM pH 5,5, solução de etanol a 95%, soluções de óleo de babaçu em etanol P. A nas concentrações 1,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 mg/mL. O branco consistiu nas amostras sem a presença de DPPH•. Como referência de um sinal resposta de um antioxidante padrão,

foram utilizadas diferentes proporções de DPPH^{*} na presença de ácido ascórbico comercial.

A coleta de dados por espectrometria de ressonância paramagnética eletrônica foi executada em um equipamento da Bruker Bio Spin, modelo EMX Plus, com campo de modulação de 1 G e 100 kHz, a potência das micro-ondas foi de 20 mW e frequência de 9,517604 GHz, com ganho no receptor de 30 dB, com espectros de 1200 pontos e tempo de coleta de 0,05 s por ponto com o valor final da intensidade obtido pela média de 4 varreduras entre 3331 G e 3410.9 G. A análise dos dados foi realizada no OriginPro 8.5.1 (OriginLab Corporation, USA). No presente projeto os elementos paramagnéticos são as moléculas de DPPH^{*}, cuja quantidade é proporcional à amplitude do sinal EPR coletado em função do campo magnético.

5.6. Análise estatística

Os dados obtidos foram processados e apresentados por meio de gráficos e tabelas. A relação entre as amostras e as variáveis analisadas associadas ao estudo da estabilidade são apresentadas por meio de suas respectivas médias (\bar{x}) e desvio padrão (σ), com aplicação da análise de variância (ANOVA) para comparação entre grupos e entre tempos, o nível de significância adotado foi $p < 0,001$ 99,9%. Todo o tratamento estatístico foi conduzido por meio do software Graphpad Prism 6 (GraphPad Software, California).

6. RESULTADOS

6.1. Avaliação do Diâmetro Hidrodinâmico (nm) das gotículas e Índice de Polidispersão – PDI

Conforme os resultados encontrados, para a nanoformulação NEBBS01 o Diâmetro Hidrodinâmico - DH das gotículas ficou compreendido entre $81,2266 \pm 0,9058$ a $388,3000 \pm 40,4458$ nm, reduzindo consideravelmente conforme o tempo. O PDI ficou compreendido entre $0,2813 \pm 0,0020$ a $0,6083 \pm 0,0601$. A comparação estatística ANOVA da NEBBS01 referente ao DH em função do tempo indicou diferença significativa ($p < 0,001$), quando comparados o valores de DH do dia 01 aos dias 15, 45, 90 e 120 dias. No entanto, não foi observada diferença significativa entre os valores encontrados para o Índice de Polidispersão – PDI (Figura 14).

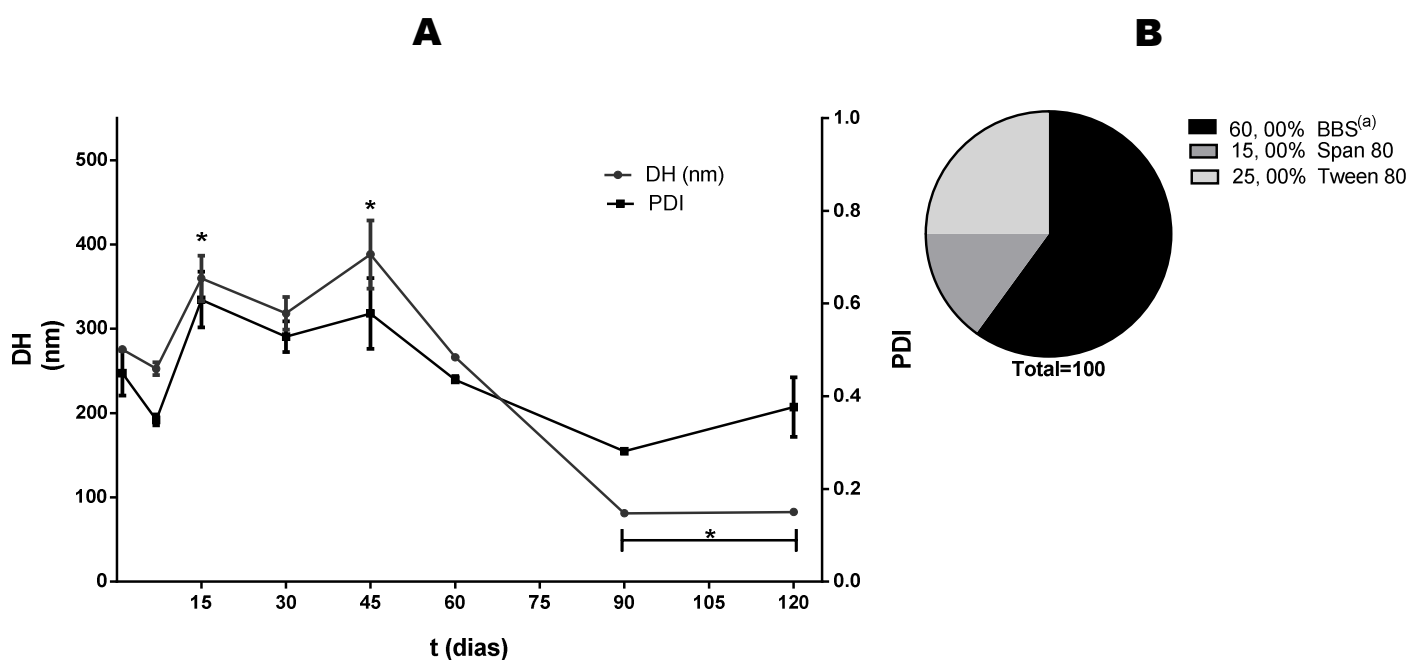


Figura 14. Nanoemulsão a base de óleo de babaçu NEBBS01 (A) Diâmetro Hidrodinâmico (DH) e Índice de Polidispersão (PDI) em função do tempo (B) Composição percentual dos componentes m/m. ^(a)BBS-FOR; t: Tempo.

Para a nanoformulação NEBBS02 em todos os estágios de tempo, o tamanho DH manteve-se < 100 nm, com média máxima obtida em $69,3266 \pm 0,8224$ nm e PDI máximo de $0,2836 \pm 0,0023$. A comparação estatística ANOVA da NEBBS02 entre os valores de DH em cada intervalo de tempo indicou variação significativa ($p < 0,001$) entres os dias 15, 30, 90 e 120 dias. Não foi observada diferença significativa entre os valores encontrados para o Índice de Polidispersão – PDI (**Figura 15**).

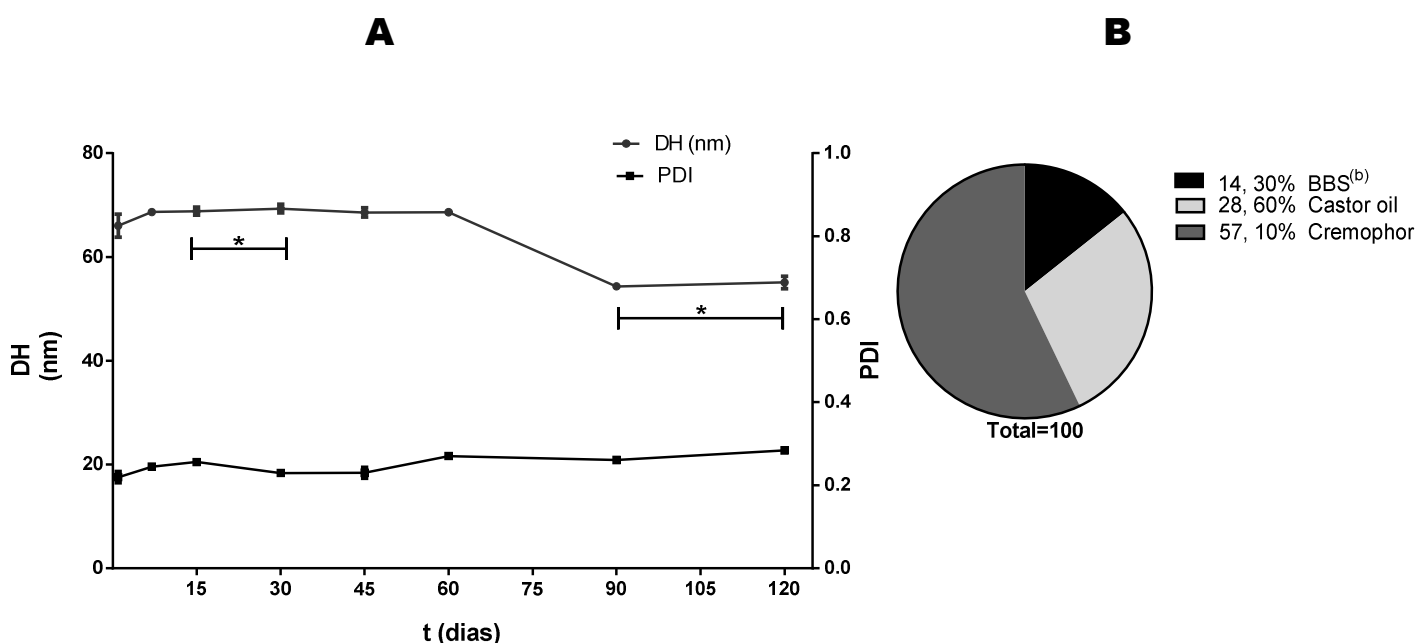


Figura 15. Nanoemulsão a base de óleo de babaçu NEBBS02 **(A)** Diâmetro Hidrodinâmico (DH) e Índice de Polidispersão (PDI) em função do tempo **(B)** Composição percentual dos componentes m/m. ^(b)BBS-CAX; t: Tempo.

Os valores de DH encontrados para a nanoformulação NEBBS03 em todos os estágios de tempo também se manteve inferior a 100 nm com média máxima equivalente a $61,2733 \pm 0,6388$ nm e PDI máximo de $0,2573 \pm 0,0066$. A comparação estatística ANOVA da NEBBS03 do DH em função do tempo de armazenamento indicou variação significativa ($p < 0,001$) somente para o dia 30. Não foi observada diferença significativa entre os valores encontrados para o Índice de Polidispersão – PDI (**Figura 16**). A ANOVA mostrou ainda que a nanoformulação NEBBS03 foi a que menos sofreu variação de tamanho em função do tempo de armazenamento, mantendo-se consideravelmente estável.

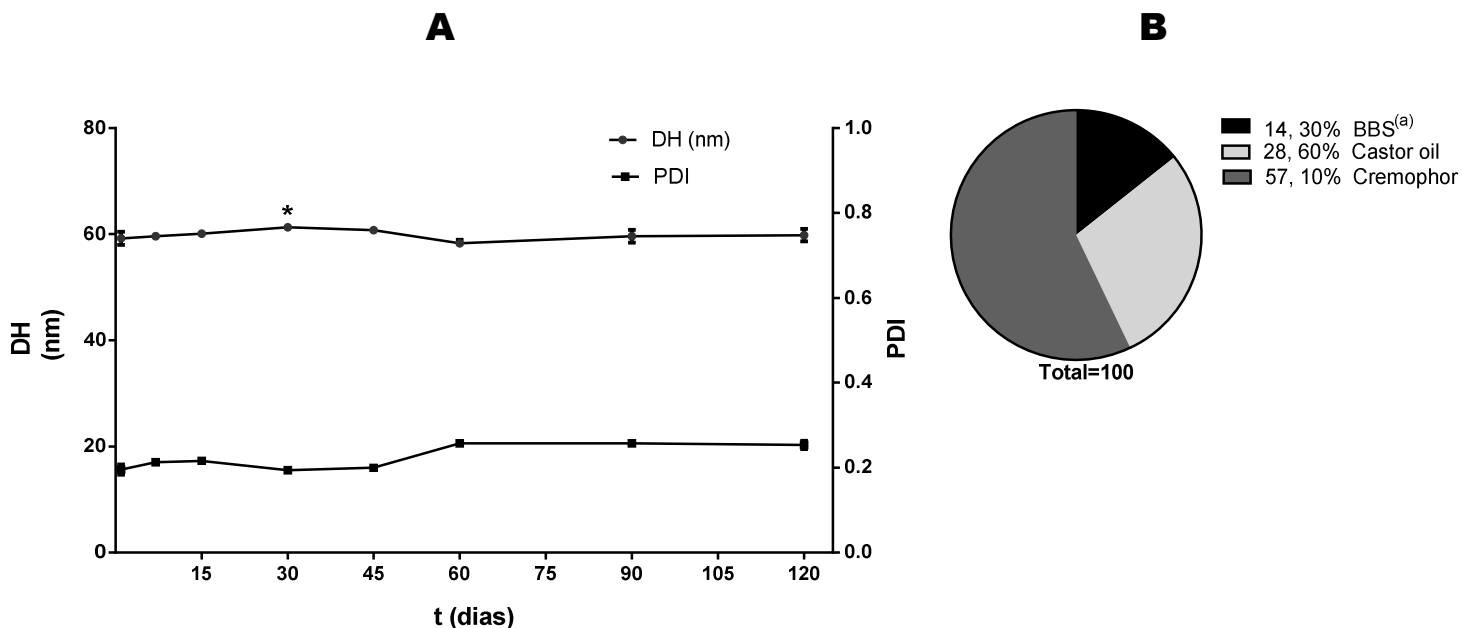


Figura 16. Nanoemulsão a base de óleo de babaçu NEBBS03 **(A)** Diâmetro Hidrodinâmico (DH) e Índice de Polidispersão (PDI) em função do tempo **(B)** Composição percentual dos componentes m/m. ^(a)BBS-FOR; t: Tempo.

A nanoformulação NEBBS04 apresentou variações bruscas de tamanho em função do tempo, sendo as médias máximas obtidas para o DH de $211,5000 \pm 1,6462$ nm e PDI de $0,5123 \pm 0,0102$. A comparação estatística ANOVA entre os valores de DH em função do tempo de armazenamento acusou variação significativa ($p < 0,001$) para a maioria dos intervalos de tempo estudados. No entanto, não foi observada diferença significativa entre os valores encontrados para o Índice de Polidispersão – PDI (**Figura 17**).

Para a nanoformulação NEBBS05 observaram-se oscilações no aumento do DH em função do tempo de armazenamento, semelhantemente quando comparada estatisticamente com a nanoformulação NEBBS04, contudo, os valores de DH encontrados foram inferiores a 100 nm, com médias máximas encontradas de $67,5100 \pm 0,5031$ nm e PDI $0,5400 \pm 0,0115$. Entre os resultados encontrados para o Índice de Polidispersão – PDI, a análise estatística não acusou diferença significativa para a nanoformulação NEBBS05 (**Figura 18**).

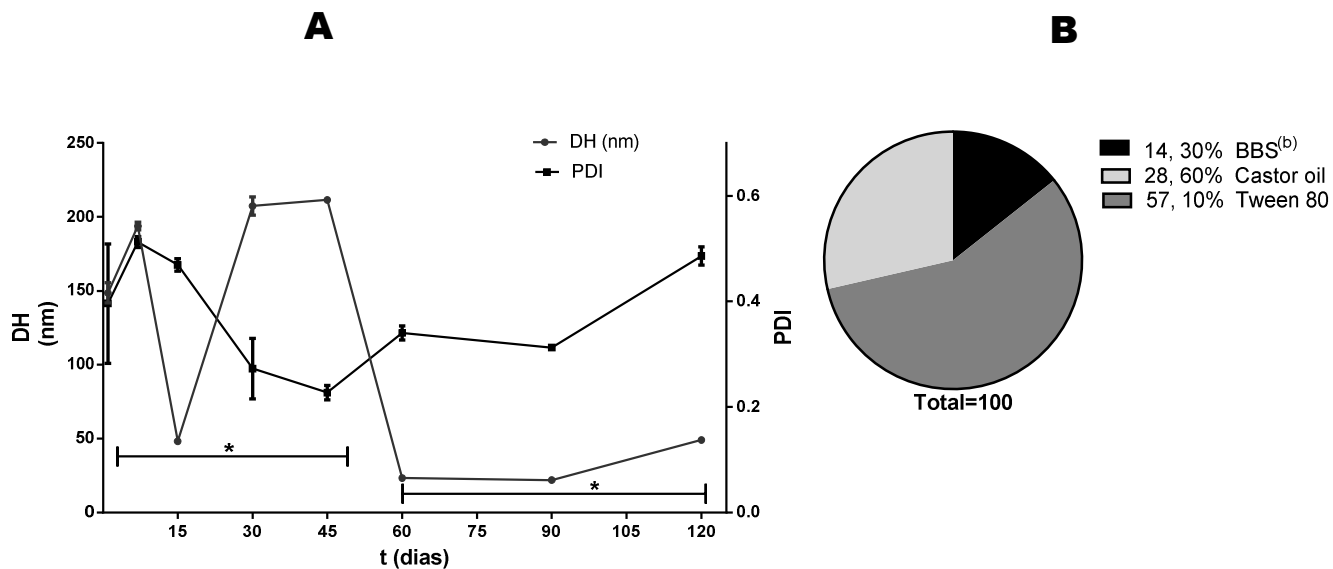


Figura 17. Nanoemulsão a base de óleo de babaçu NEBBS04 **(A)** Diâmetro Hidrodinâmico (DH) e Índice de Polidispersão (PDI) em função do tempo **(B)** Composição percentual dos componentes m/m. ^(b)BBS-CAX; t: Tempo.

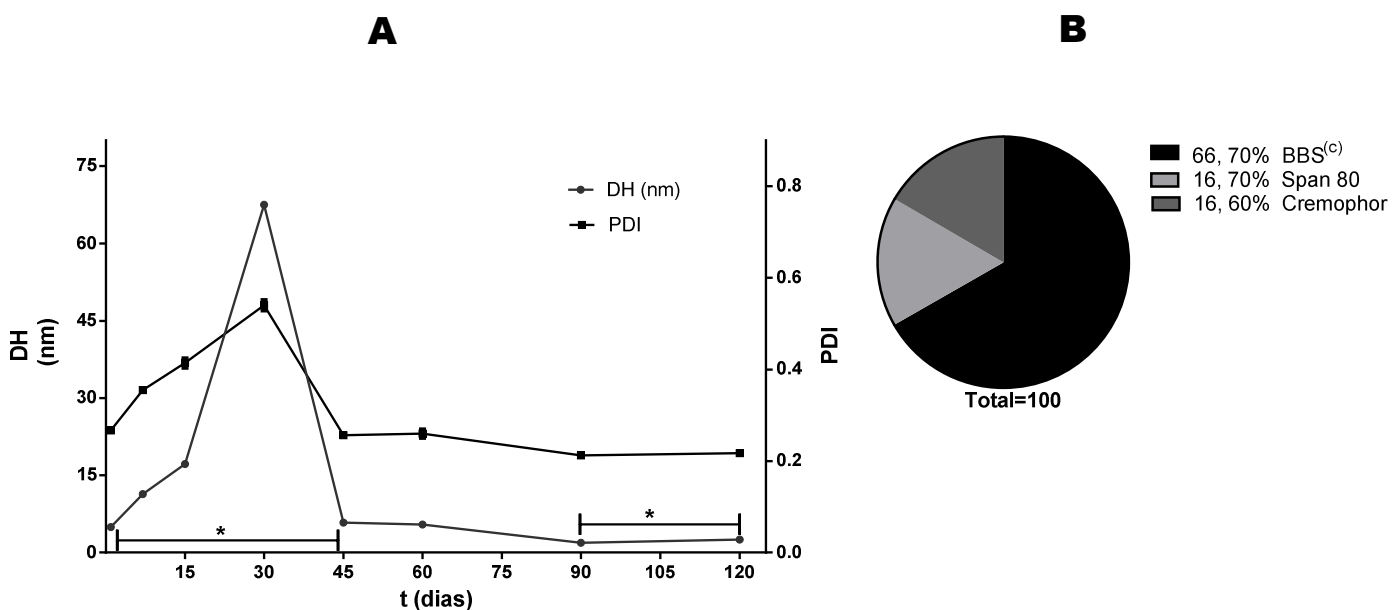


Figura 18. Nanoemulsão a base de óleo de babaçu NEBBS05 **(A)** Diâmetro Hidrodinâmico (DH) e Índice de Polidispersão (PDI) em função do tempo **(B)** Composição percentual dos componentes m/m. ^(c)BBS-SQT; t: Tempo.

Na **Figura 19** são apresentados os valores de DH e PDI encontrados para a nanoformulação NEBBS06, as médias máximas encontradas para o DH e PDI foram; $83,9433 \pm 4,8325$ nm e $0,6526 \pm 0,1677$, respectivamente. A comparação estatística ANOVA entre os valores de DH em função do tempo de armazenamento acusou variação significativa ($p < 0,001$) até 45 dias, no entanto o tamanho das gotículas manteve-se estável após este período até ao fechamento do intervalo de 120 dias. Não foi observada diferença significativa entre os valores encontrados de PDI para a nanoformulação NEBBS06.

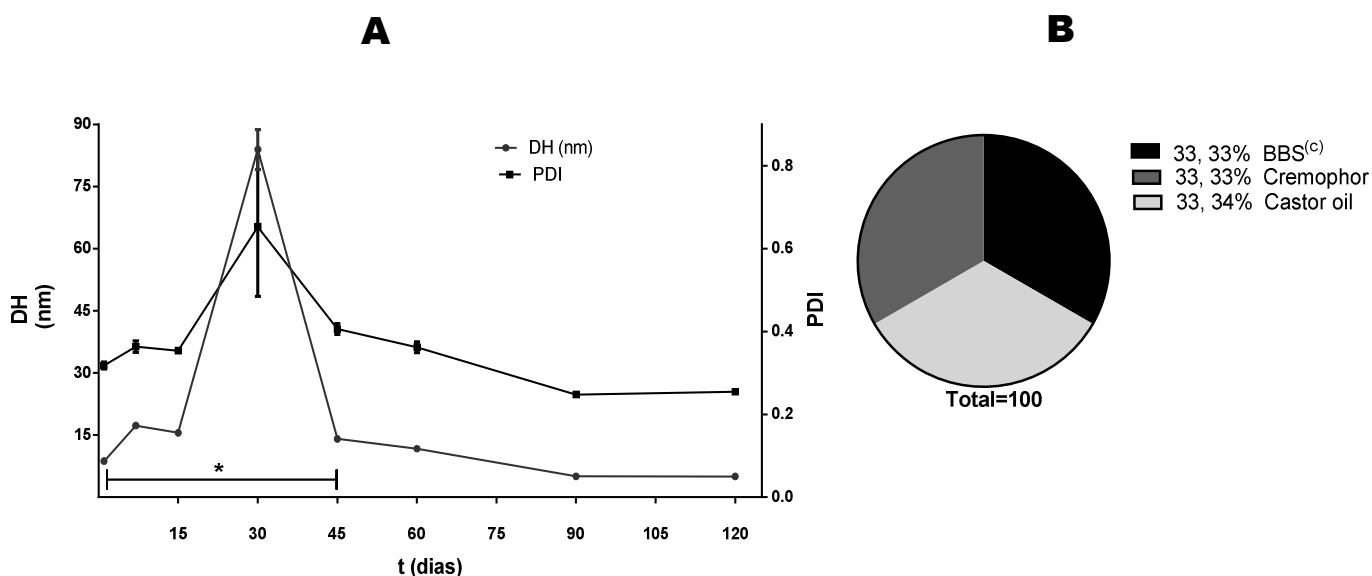


Figura 19. Nanoemulsão a base de óleo de babaçu NEBBS06 **(A)** Diâmetro Hidrodinâmico (DH) e Índice de Polidispersão (PDI) em função do tempo **(B)** Composição percentual das fases m/m. ^(C)BBS-SQT; t: Tempo.

A comparação entre as nanoformulações mostram que as nanoemulsões NEBBS01 e NEBBS04 apresentaram DH (nm) superiores quando comparadas com as demais e considerando-se o limite superior de tamanho para o Diâmetro Hidrodinâmico (< 100 nm), as mesmas ultrapassam esta faixa. As demais nanoemulsões NEBBS02, NEBBS03, NEBBS05 e NEBBS06 conseguiram permanecer com um DH inferior a 100 nm ao decorrer do tempo de armazenamento de 120 dias.

No entanto, somente a nanoemulsão NEBBS03 apresentou estatisticamente menores variações de tamanho DH (nm), conferindo a ela estabilidade em função do tempo. A comparação dos resultados encontrados para o PDI, entre as nanoformulações estudadas não mostrou diferença significativa em relação ao tempo de armazenamento.

O valor crítico total do EHL (Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico) das nanoformulações referente à mistura dos componentes com EHL conhecidos, foram calculados utilizando a **equação 1**, deduzida a partir da fórmula proposta por Leal *et al.*, (2013). A **equação 1** utilizada no presente estudo trata-se: $EHL_T = 1/100 (EHL_a \times a\%) + (EHL_b \times b\%) \dots (EHL_n \times n\%)$. Onde os elementos algébricos (**a**, **b**... **n**) representam os componentes com EHL conhecidos presentes na formulação.

Os resultados teóricos encontrados referentes ao valor crítico total do Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico dos componentes presentes nas nanoformulações estão disponíveis na **Figura 20**. Nota-se que o maior e o menor valor de EHL correspondem às nanoemulsões NEBBS04 e NEBBS05, respectivamente.

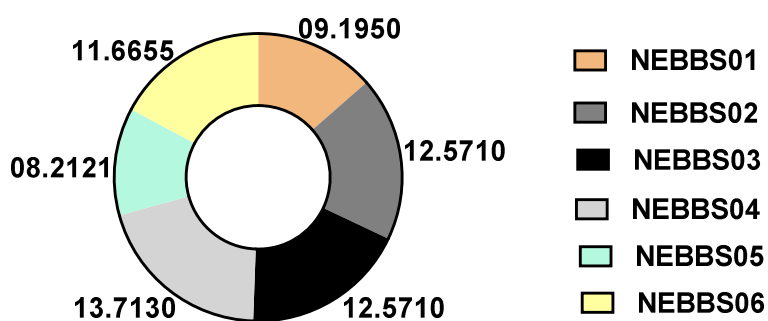


Figura 20. Valor total do Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico (EHL) entre os componentes presentes nas nanoformulações.

Estes resultados são importantes, pois permitem estimar o tipo de comportamento esperado entre os grupamentos hidrófilos e lipofílicos das moléculas anfifílicas presentes nas nanoformulações, as quais se posicionam entre as fases aquosa e oleosa. Estes grupamentos são responsáveis pela

formação da película interfacial que diminui a tensão interfacial (λ) entre as duas fases, contribuindo assim para estabilizar o sistema.

6.2. Potencial Zeta (ζ) mV e Potencial Hidrogeniônico (pH)

Os resultados do Potencial ζ (mV) encontrados para a nanoformulação NEBBS01 encontram-se disponíveis na **Figura 21**. A maior média encontrada foi de $-34,9667 \pm 0,4496$ mV após analisada no tempo de 60 dias. A comparação estatística ANOVA, considerando $p < 0,001$, acusou diferenças significativas entre os valores de Potencial Zeta (PZ) ao decorrer do tempo.

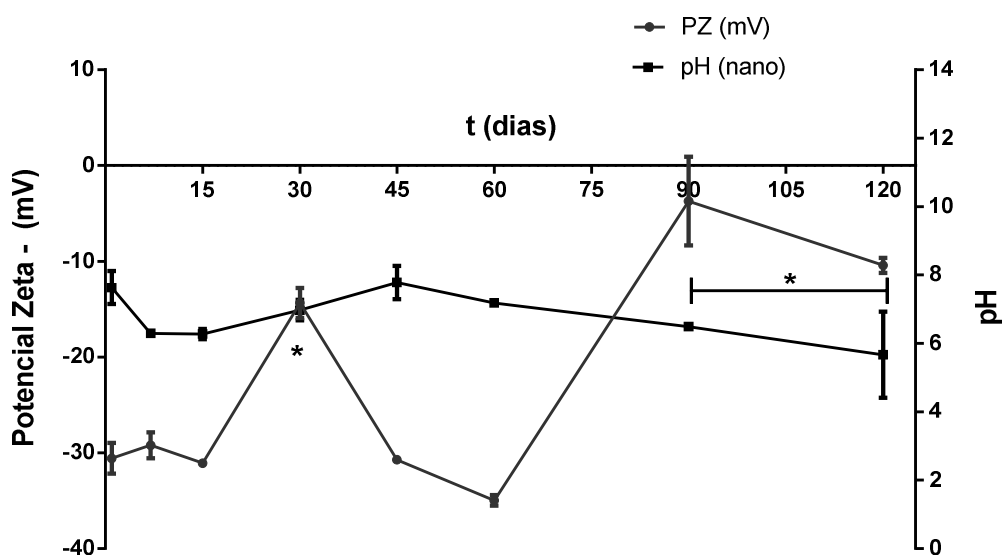


Figura 21. Potencial Zeta ζ (mV) e pH em função do tempo para a nanoemulsão NEBBS01. PZ: Potencial Zeta; t: Tempo.

Para a nanoformulação NEBBS02 a maior média encontrada de Potencial ζ foi de $-11,5667 \pm 1,8517$ mV oscilando após 15, 30 e 45 dias (**Figura 22**). As nanoemulsões NEBBS03 e NEBBS04 apresentaram médias máximas de Potencial ζ $-8,0566 \pm 0,0543$ mV e $-15,5667 \pm 0,7408$ mV, respectivamente. Não foi possível observar variações bruscas de Potencial ζ para a nanoformulação NEBBS03 (**Figura 23**), no entanto, para a nanoformulação NEBBS04 (**Figura 24**) houve variação significativa de Potencial ζ ($p < 0,001$) em função do tempo.

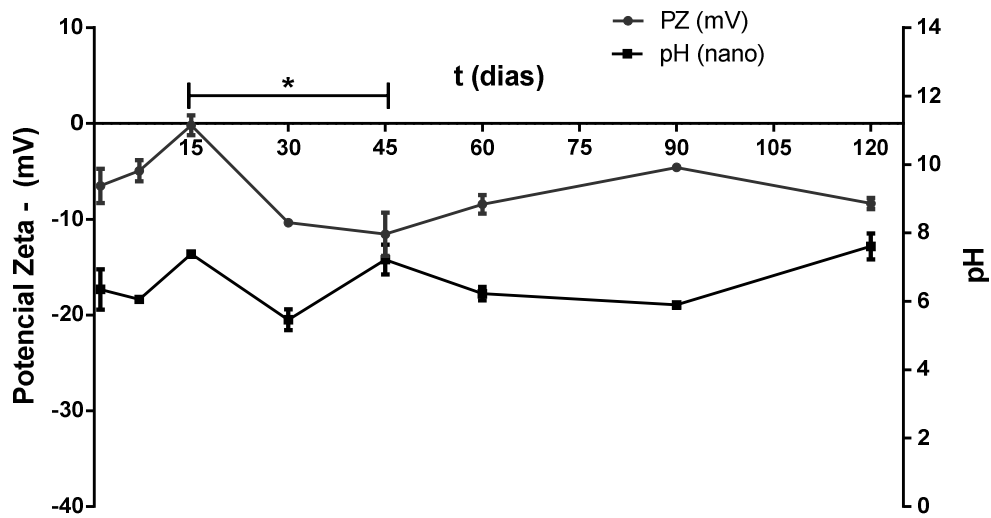


Figura 22. Potencial Zeta ζ (mV) e pH em função do tempo para a nanoemulsão NEBBS02. **PZ:** Potencial Zeta; **t:** Tempo.

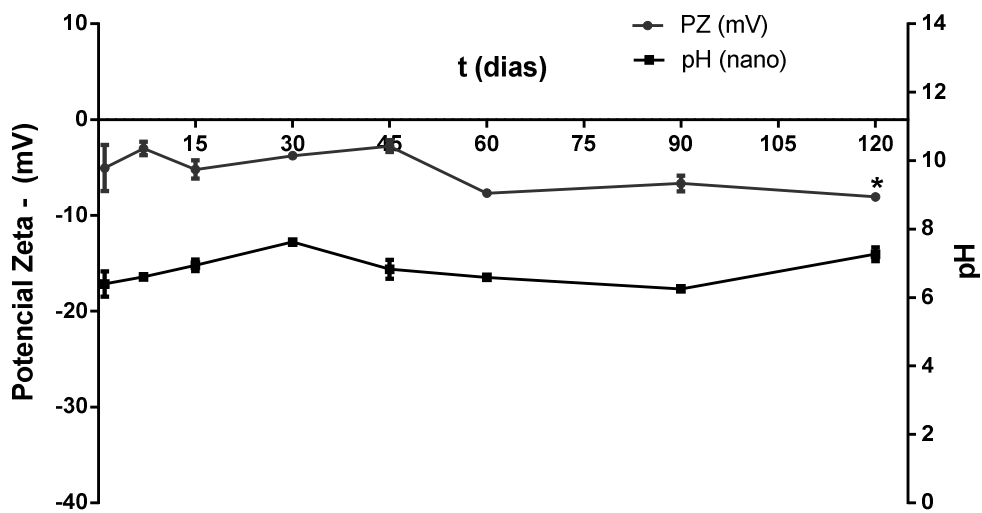


Figura 23. Potencial Zeta ζ (mV) e pH em função do tempo para a nanoemulsão NEBBS03. **PZ:** Potencial Zeta; **t:** Tempo.

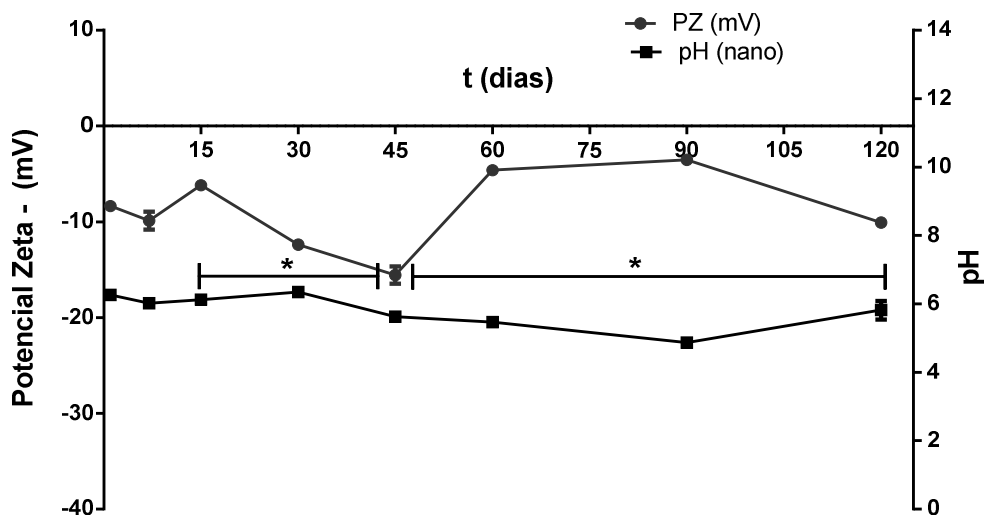


Figura 24. Potencial Zeta ζ (mV) e pH em função do tempo para a nanoemulsão NEBBS04. **PZ**: Potencial Zeta; **t**: Tempo.

A **Figura 25** apresenta os valores encontrados de Potencial ζ para a nanoemulsão NEBBS05. A média máxima encontrada de Potencial ζ foi $-30,9667 \pm 0,6018$ mV. Foi possível observar oscilações nos valores referentes ao Potencial ζ ao longo do tempo. Já na **Figura 26** são apresentados os valores de Potencial ζ para a nanoemulsão NEBBS06, com média máxima encontrada de $-9,8566 \pm 0,1497$ mV.

Dos resultados encontrados para o Potencial ζ (mV) foi possível observar que para todas as nanoemulsões analisadas as mesmas apresentaram valores negativos de ζ (Zeta). Estes dados eletrocinéticos apontam a magnitude da carga da camada elétrica (predominantemente negativa) e confirmam a natureza coloidal das nanoemulsões de babaçu, como um coloide positivo e sua atmosfera carregada negativamente.

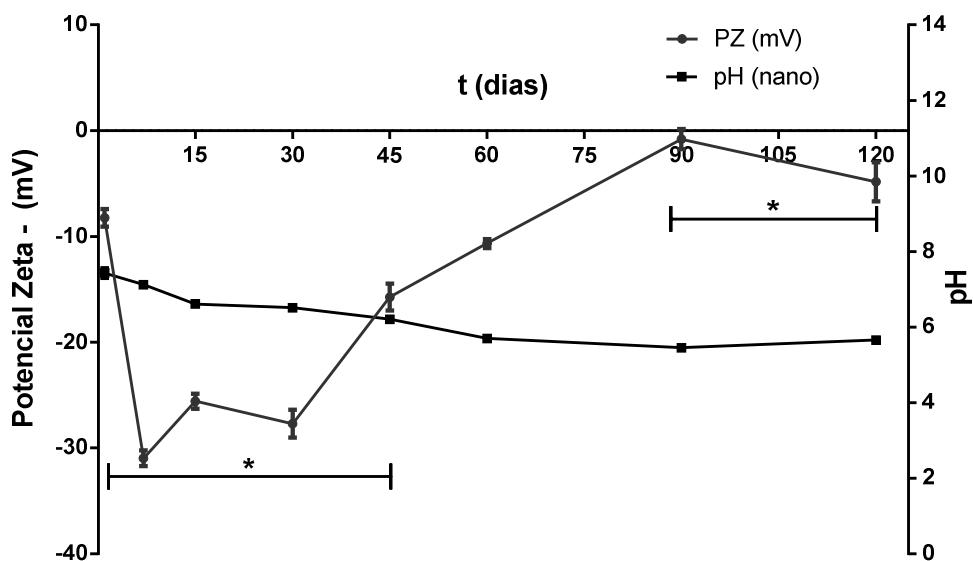


Figura 25. Potencial Zeta ζ (mV) e pH em função do tempo para a nanoemulsão NEBBS05. **PZ:** Potencial Zeta; **t:** Tempo.

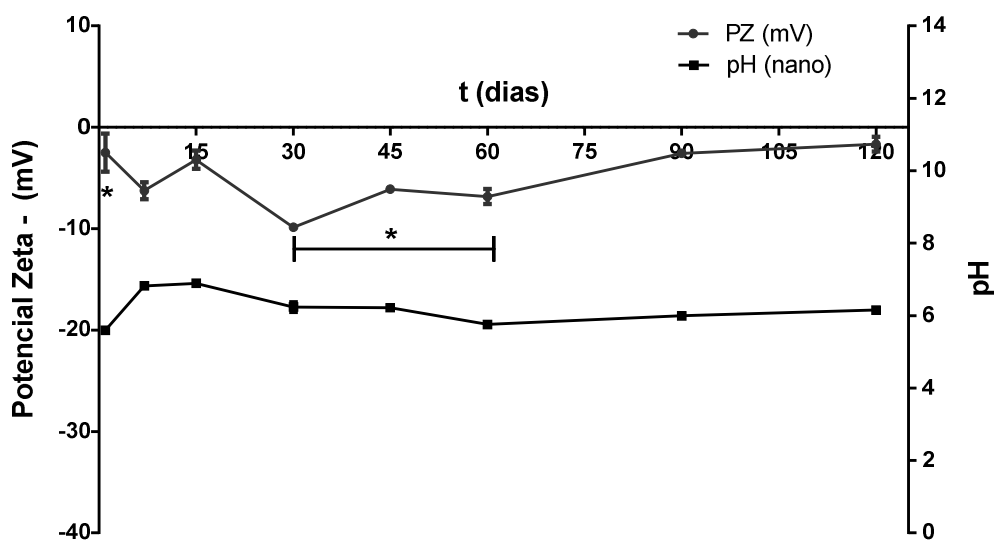


Figura 26. Potencial Zeta ζ (mV) e pH em função do tempo para a nanoemulsão NEBBS06. **PZ:** Potencial Zeta; **t:** Tempo.

Quanto à faixa geral de pH das nanoemulsões de babaçu em função do tempo, ficou compreendida entre 5,0 a 7,78. Foi possível obter nanoemulsões de babaçu de natureza levemente ácida e neutra. A nanoemulsão NEBBS03 foi a que apresentou valores de pH estáveis até 120 dias (**Figura 23**). A Análise de Variância – ANOVA acusou que não houve diferenças significativas entre os valores de pH das nanoemulsões de babaçu em função do tempo.

6.3. Ponto Isoelétrico – PI

A direta influência do pH sobre o potencial ζ das partículas em um sistema coloidal pode ser verificado a partir de dados do Ponto Isoelétrico - PI. Dos resultados encontrados neste trabalho para o Ponto Isoelétrico foi observado que, quando as nanoemulsões de babaçu estão em meio ácido (pH=3,0) as mesmas tendem a apresentar um valor nulo de potencial ζ (0 mV) (**Figura 27**). À medida que o pH do meio aumentava, notou-se que os valores de potenciais ζ aumentavam também no sentido negativo.

No presente trabalho, também foi verificada a influência do pH do meio sobre o tamanho (Diâmetro Hidrodinâmico) e PDI. Entre as nanoemulsões estudadas, as nanoemulsões NEBBS01 e NEBBS04 apresentaram médias de DH > 100 nm, as demais apresentaram médias de DH inferior 100 nm, após analisadas no período de 48h e 30 dias (**Figura 28**).

Já para os resultados encontrados em relação ao PDI, a nanoemulsão NEBBS06 apresentou médias de PDI acima de 0,40 apresentando oscilações, conforme variação de pH. As demais apresentaram médias inferiores a 0,40 após analisadas no período de 48h e 30 dias (**Figura 29**). Foi observado que as nanoemulsões NEBBS02 e NEBBS03 não apresentaram oscilações nas médias encontradas para o DH (nm) e PDI, conforme mudança de pH do meio quando analisadas no período de 48h e 30 dias.

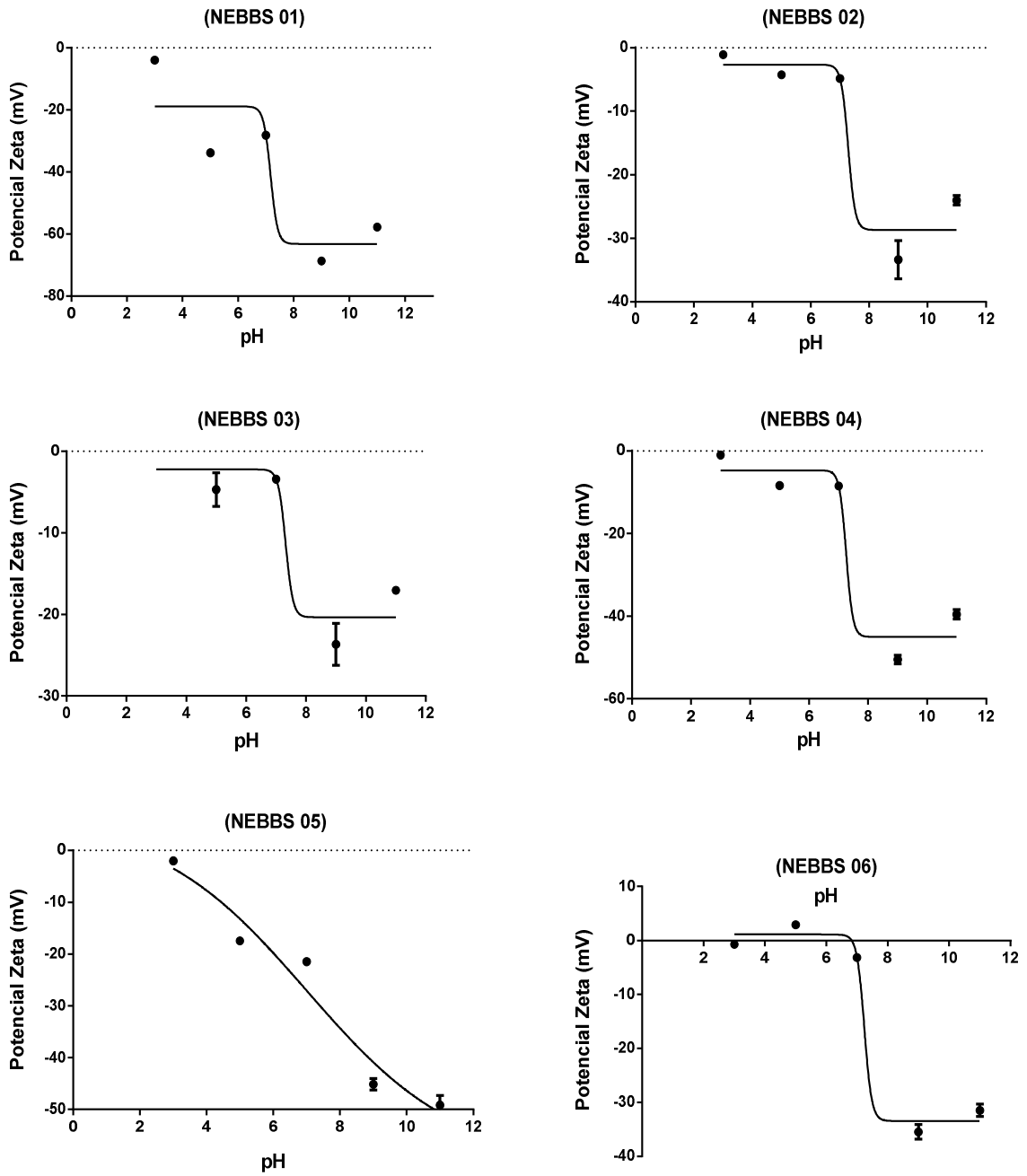


Figura 27. Investigação do pH sobre o Potencial ζ nas nanoemulsões a base de óleo de babaçu analisadas. **PI:** Ponto Isoelétrico.

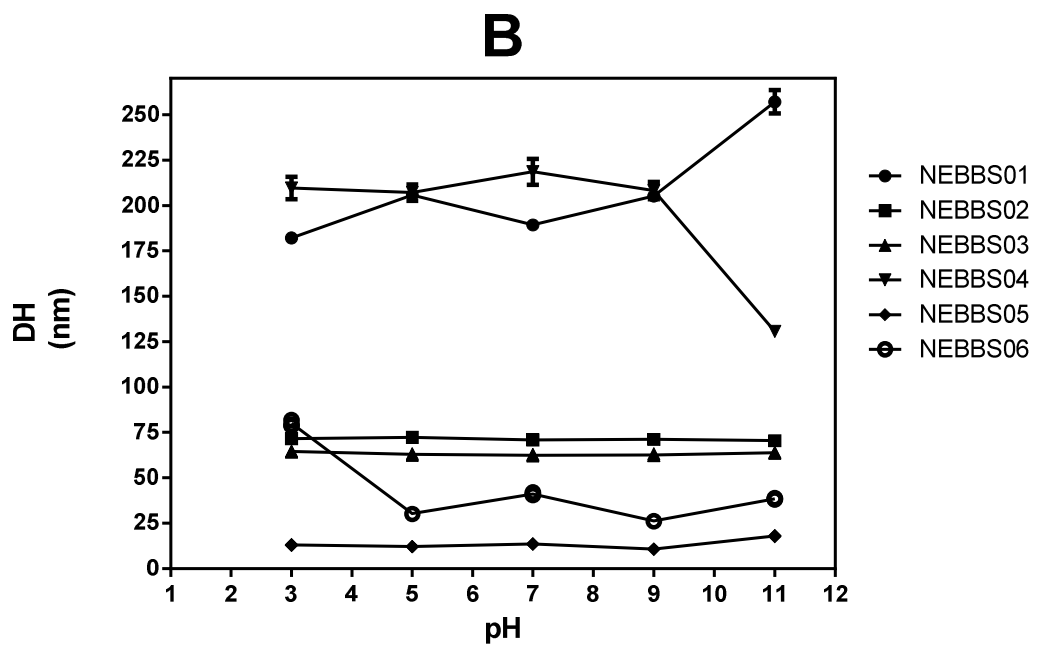
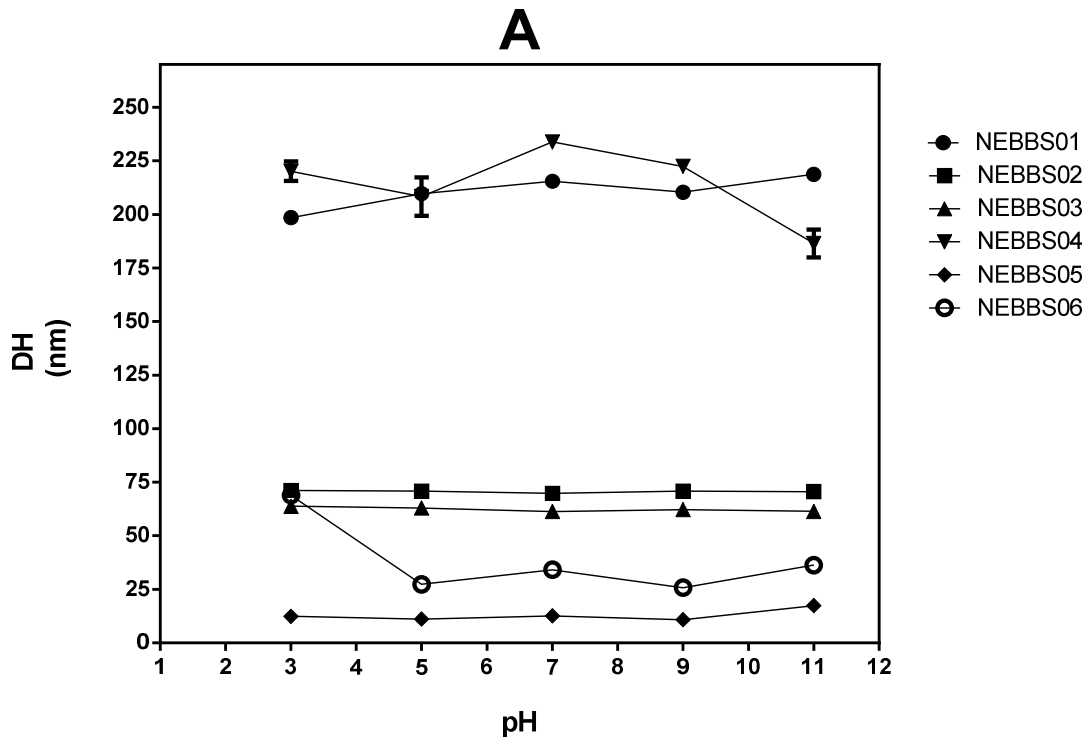


Figura 28. Diâmetro Hidrodinâmico – DH (nm) das nanoemulsões a base de óleo de babaçu dependente do pH. **(A)** após 48 horas **(B)** após 30 dias.

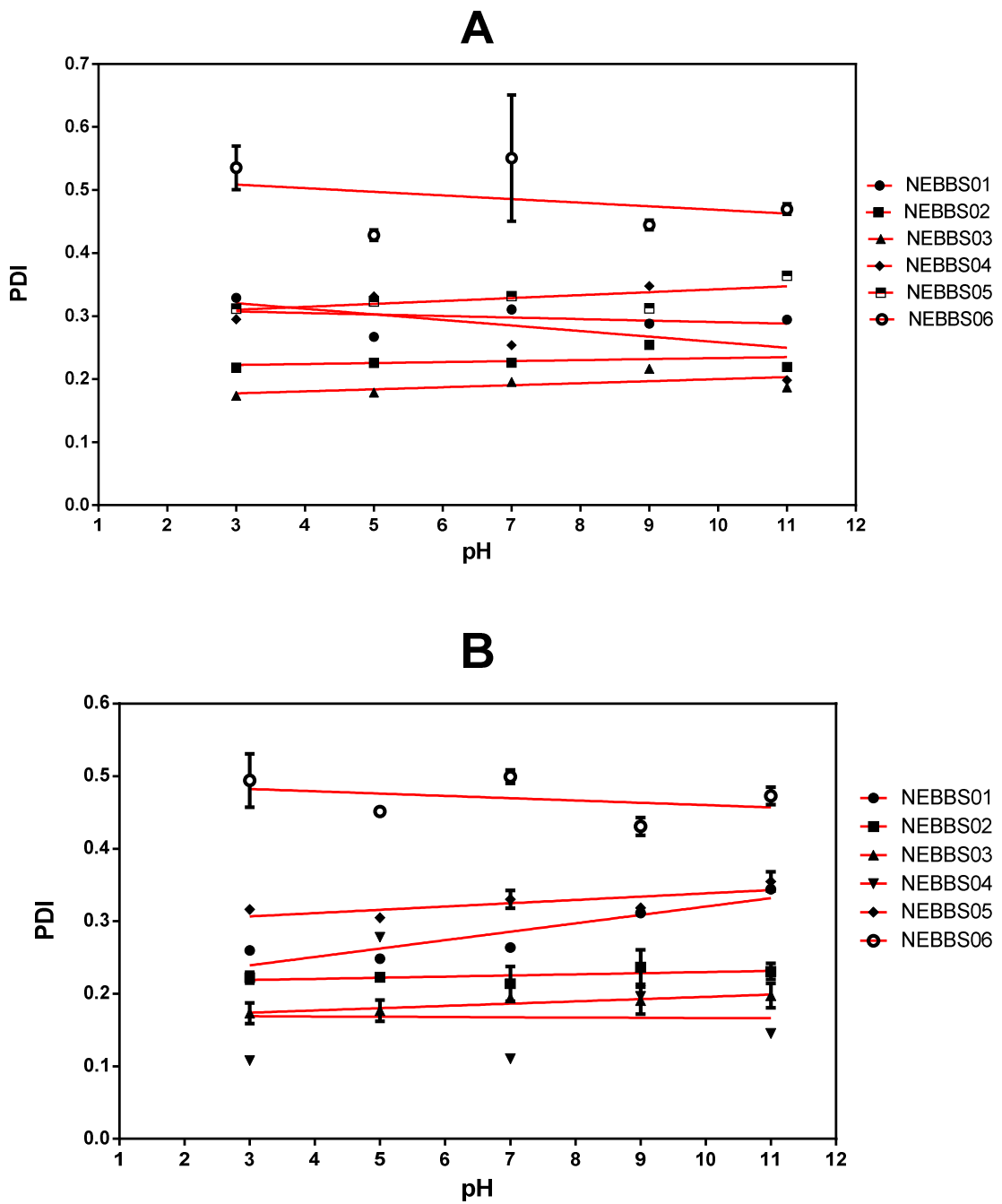


Figura 29. Valores do PDI em função do pH para as nanoemulsões a base de óleo de babaçu. **(A)** após 48 horas **(B)** após 30 dias.

6.4. Teste de Centrifugação

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que as nanoemulsões NEBBS01 e NEBBS04 apresentaram sinais levemente de separação de fases, quando submetidas a um campo centrífugo (94, 587, 1150 g) o que não foi observado para as demais nanoemulsões NEBBS02, NEBBS03, NEBBS05 e NEBBS06, que continuaram estáveis, sem sinais de separação de fases, após analisadas no período de 60 dias (**Figura 30**).

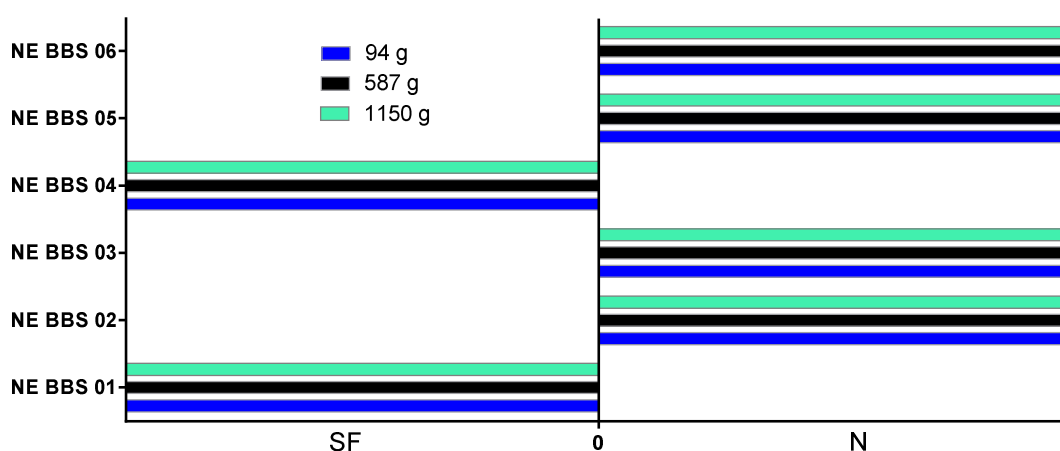


Figura 30. Dados relacionados ao processo de centrifugação para as nanoemulsões a base de óleo de babaçu. **(SF)** Separação de Fases; **(N)** Normal.

6.5. Ciclos de resfriamento e aquecimento

Em relação aos ensaios de resfriamento e aquecimento foi verificado o Diâmetro Hidrodinâmico e PDI das nanoemulsões NEBBS02 e NEBBS03 quando submetidas a 05 ciclos de resfriamento (4°C) e aquecimento (37,5°C). Os resultados obtidos apontam variação em relação ao DH (nm) e PDI para nanoemulsão NEBBS02, quando comparada a nanoformulação NEBBS03 (**Tabela 06**). Para os valores encontrados de PDI, foram observadas diferenças significativas ($p < 0,001$) entre as médias encontradas (**Figura 31**).

Tabela 06. Dados do Diâmetro Hidrodinâmico (DH) das NEBBS submetidas aos ciclos de resfriamento e aquecimento.

Ciclos 4°C – 37,5°C	NEBBS02	NEBBS03
	DH ± SD	DH ± SD
01	151,120 ± 2,038	127,546 ± 0,877
02	69,840 ± 0,104	63,534 ± 0,273
03	52,694 ± 0,531	62,680 ± 0,334
04	419,934 ± 78,422*	61,734 ± 0,850
05	45,694 ± 0,559	61,280 ± 0,600

SD: Desvio Padrão

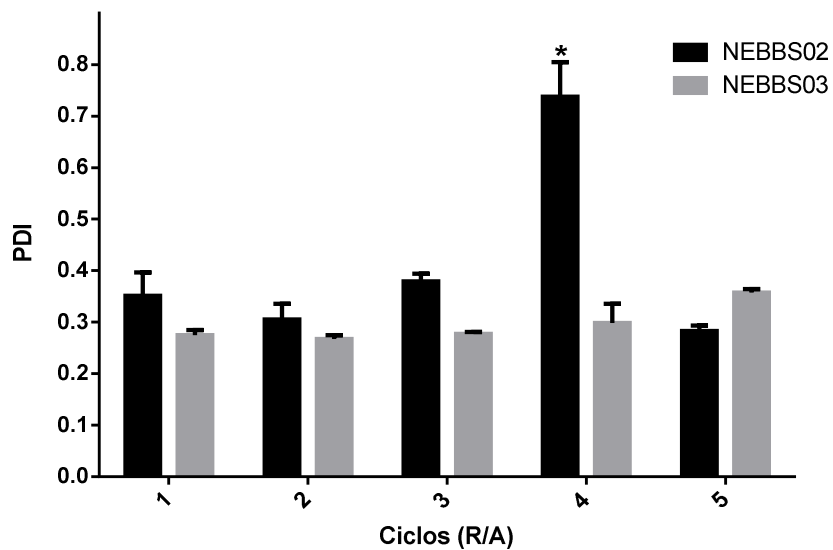


Figura 31. Dados relacionados aos Índices de Polidispersão – PDI das NEBBS submetidas ao processo de resfriamento (4°C) e aquecimento (37,5°C). (R) Resfriamento (A) Aquecimento.

6.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para a caracterização qualitativa nanoscópica da morfologia das gotículas presente nas nanoemulsões por meio de Microscopia Eletrônica de Transmissão, foi eleita a nanoemulsão NEBBS03 em razão de sua estabilidade cinética em comparação com as demais. As imagens MET para a nanoformulação NEBBS03 são apresentadas na **Figura 32**.

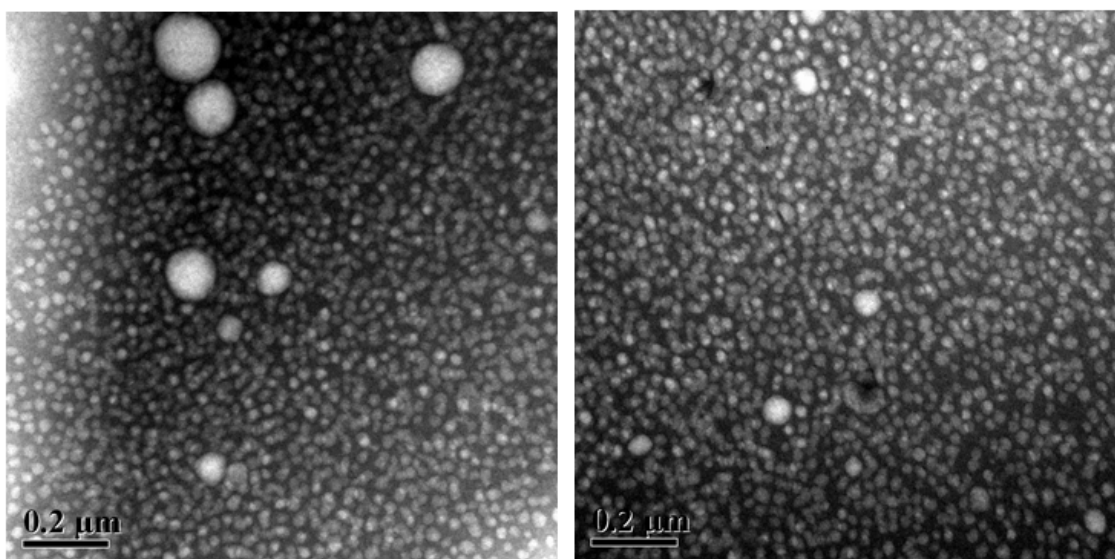


Figura 32. Fotomicrografias (MET) nanoemulsão NEBBS03 BBS [10 mg/mL]. Imagens obtidas no Laboratório de Microscopia do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília, Brasil.

Com base na **Figura 32** morfologicamente as gotículas presentes na nanoformulação NEBBS03 mostraram-se esféricas, superfície elétron-densas, algumas apresentando núcleos oleosos maiores, distribuição e interface definida, sem a presença de protuberâncias na superfície. A análise quantitativa do diâmetro de 522 partículas acusou tamanho médio de $23,7121 \pm 8,6733$ nm. Com uma maior frequência de partículas no tamanho de 27 nm, conforme demonstrado na curva de distribuição de frequência do diâmetro das partículas (**Figura 33**). Em comparação com a média obtida dos tamanhos em DLS.

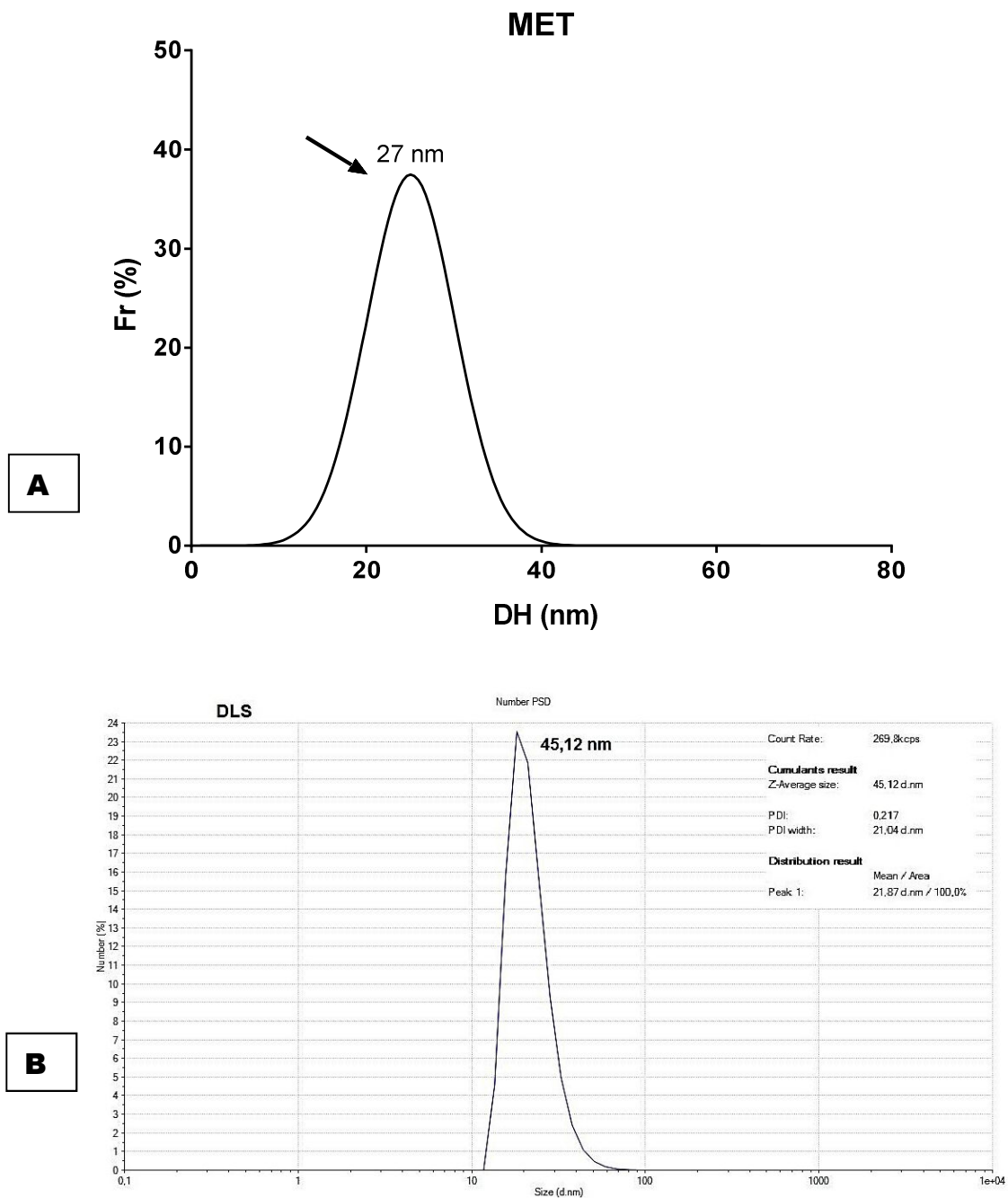


Figura 33. Curva de distribuição do tamanho (nm) das partículas presentes na nanoformulação NEBBS03. **(A)** Dados obtidos por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). **(B)** Dados obtidos por Difração Dinâmica da Luz (DLS). **Fr (%)**: Frequência Relativa em percentual; **DH**: Diâmetro Hidrodinâmico.

6.7. Atividade antioxidante *in vitro* do óleo livre e das NEBBS

Os resultados obtidos para avaliar o efeito antioxidante do óleo de babaçu nanoestruturado e do óleo livre foram avaliados quanto a sua ação antioxidante para reduzir radicais livres de DPPH[•], utilizando-se a Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR). Para o teste EPR foram selecionadas as nanoemulsões NEBBS02 e NEBBS03 previamente caracterizadas. A **Figura 34** apresenta o espectro experimental obtido do radical DPPH[•] na concentração de 0,25 mM/EtOH. Observam-se 05 linhas EPR que podem ser explicadas devido à interação do elétron desemparelhado com dois núcleos de nitrogênio (N).

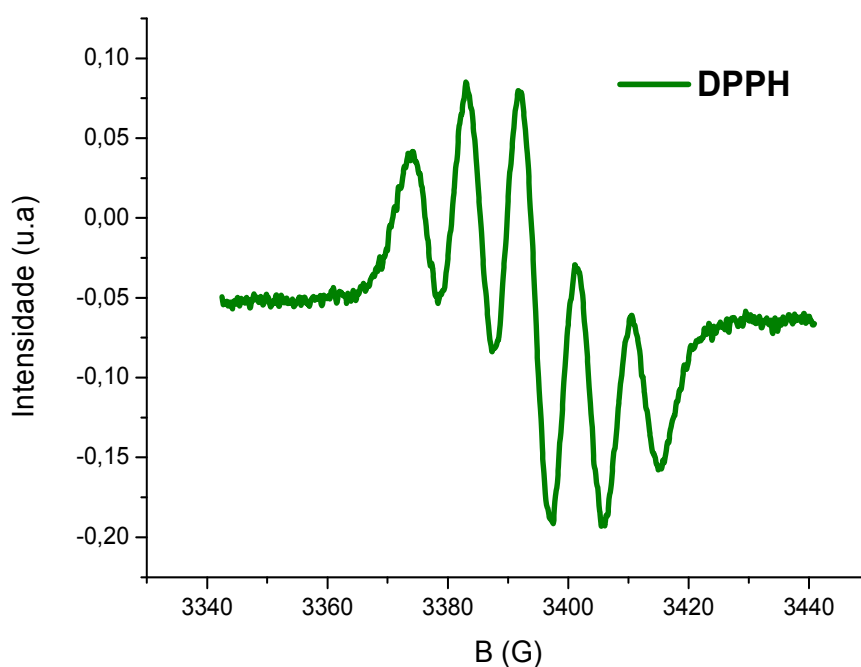


Figura 34. Espectro experimental EPR obtido do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH[•]) concentração 0,25 mM.

Quando um elétron desemparelhado interage com um núcleo, o número de linhas EPR é $2I+1$. No caso de DPPH[•] o elétron desemparelhado interage com dois núcleos de nitrogênio (N) e o número de linhas EPR é obtida

pela equação: $2N_i|l+1$. Sabendo-se que $l=1$ e N_i a quantidade de núcleos equivalentes, matematicamente chega-se ao resultado cinco.

A **Figura 35 (A)** apresenta os espectros obtidos das nanoformulações NEBBS02 e NEBBS03 na presença de DPPH \cdot e a **Figura 35 (B)** o sinal obtido para as nanoformulações NEBBS02 e NEBBS03 sem a presença de radicais de DPPH \cdot . Comparando-se as interposições dos picos é possível perceber na **Figura 35 (A)** que as formulações apresentaram um efeito antioxidante quando submetidas à presença de um radical livre, verificado pela diminuição da amplitude e da intensidade do sinal do DPPH \cdot .

Já a **Figura 35 (B)** representa uma particularidade de um sinal EPR não detectado. Dessa forma, estes resultados indicam uma ação antioxidante das nanoformulações NEBBS02 e NEBBS03 quando submetidas à presença de um radical livre.

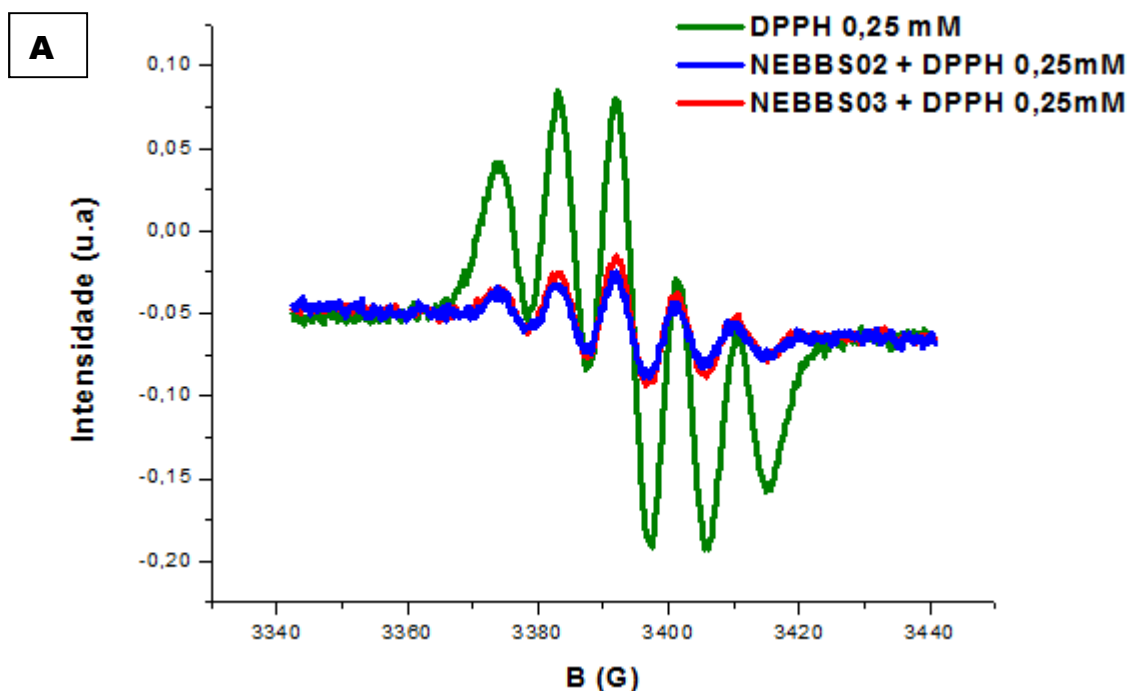


Figura 35 (A)

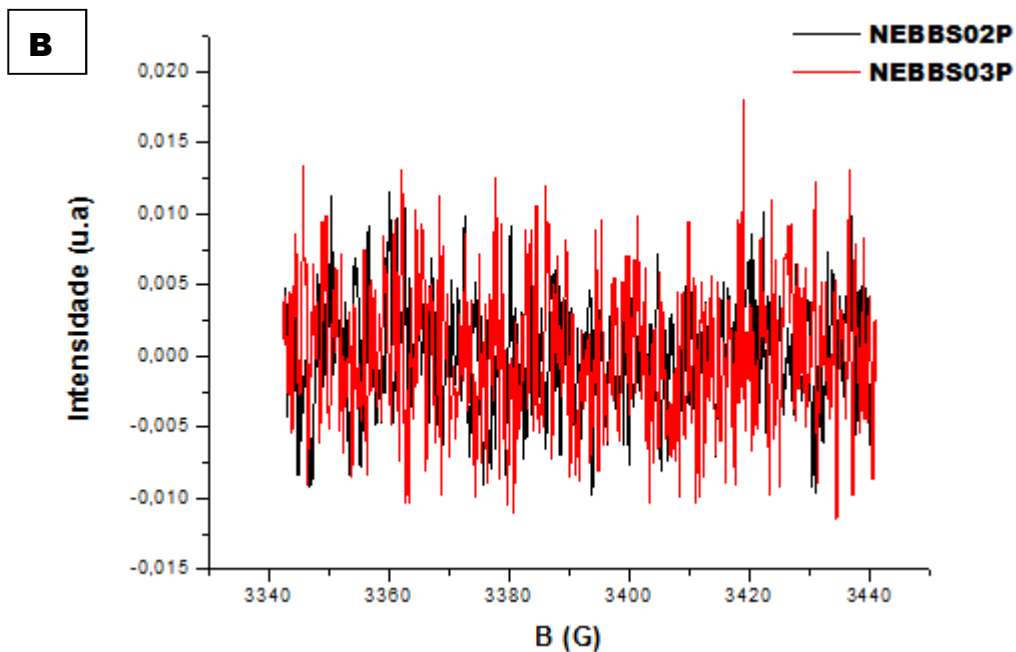


Figura 35. Espectros experimentais EPR obtidos para as nanoformulações NEBBS02 e NEBBS03 contendo 10 mg/mL de óleo de babaçu, respectivamente. **(A)** Na presença de DPPH[•] 0,25 mM; **(B)** Sem a presença de DPPH[•].

Simulou-se também o espectro EPR para óleo de babaçu livre com concentração de 10 mg/mL na presença de 0,25 mM de DPPH[•] conforme demonstrado na **Figura 36**. Essa concentração de óleo é a mesma contida nas composições das nanoformulações NEBBS02 e NEBBS03 anteriormente avaliadas. Observa-se notoriamente que óleo livre de babaçu apresentou uma ação antioxidante na presença do radical DPPH[•], ação está verificada novamente pela diminuição da amplitude e intensidade do sinal do DPPH[•].

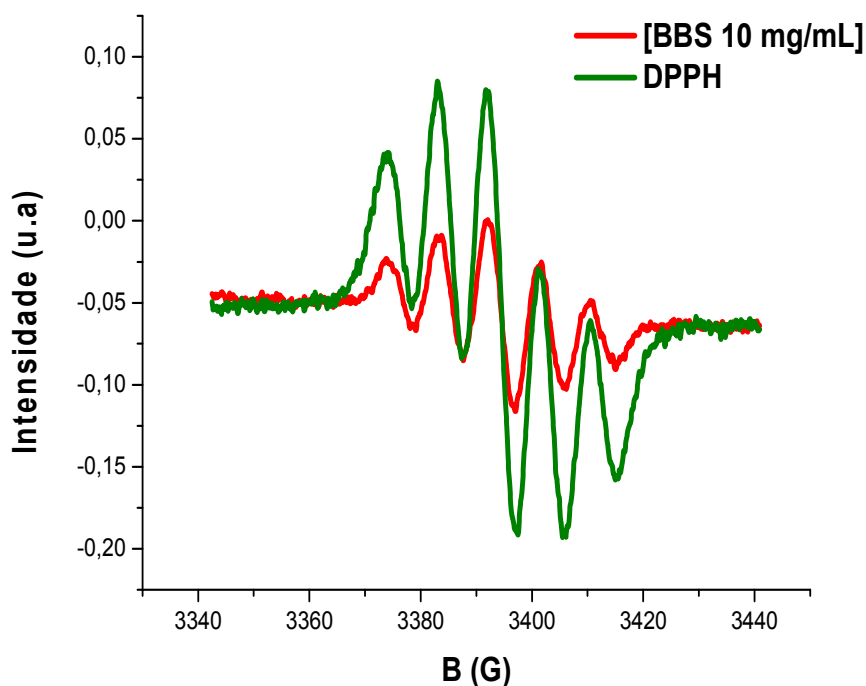


Figura 36. Espectro experimental EPR obtido para óleo de babaçu livre na presença do radical DPPH[•] concentração 0,25mM.

Comparou-se também a ação antioxidante das amostras; óleo de babaçu livre em diferentes concentrações e as nanoemulsões com um controle antioxidante padrão (ácido ascórbico comercial), na presença do radical livre DPPH[•] estes resultados estão apresentados na **Figura 37**. As concentrações utilizadas para o óleo de babaçu foram: 1,0 mg/mL; 5,0 mg/mL; 10,0 mg/mL; 15,0 mg/mL e 20,0 mg/mL.

Observa-se que para as maiores concentrações de ácido ascórbico: 0,125 mM e 0,062 mM foram suficientes para diminuir significativamente a intensidade do DPPH[•], dessa forma inativando-o. Similarmente este fato é observado para as concentrações do óleo livre de babaçu, onde a menor concentração 1,0 mg/mL de óleo registrou-se uma menor diminuição da intensidade do sinal de DPPH[•] em comparação com as demais concentrações. A **Figura 37** revela ainda que a condição do óleo no estado nanoestruturado apresentou melhor ação antioxidante quando comparada ao estado livre.

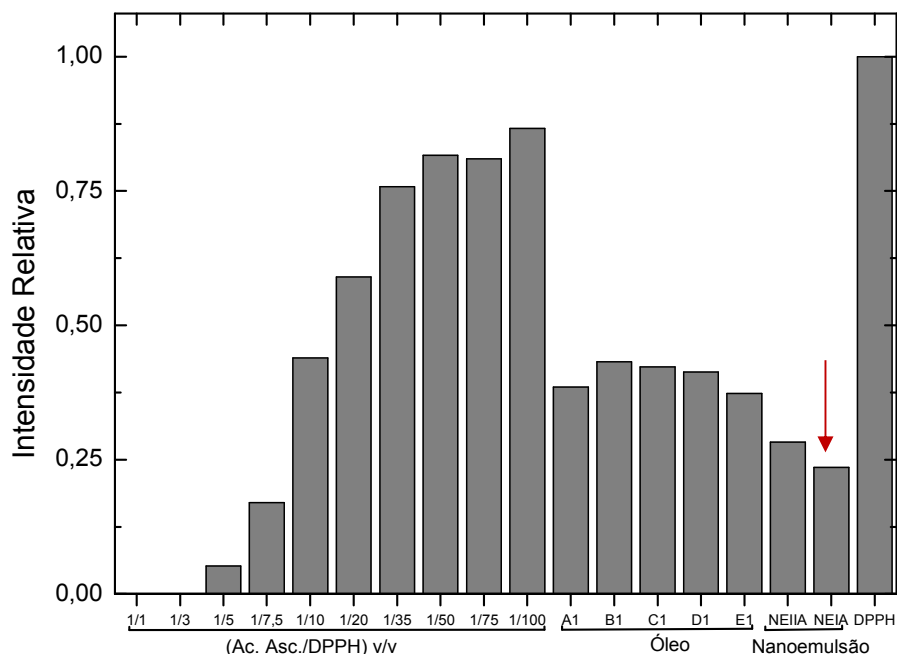


Figura 37. Dados integrados do potencial antioxidante obtidos por EPR das amostras de ácido ascórbico, óleo de babaçu e nanoemulsões de babaçu na presença de DPPH'. **Legenda:** **Ac. Asc.:** Ácido ascórbico, concentrações: (Ac.Asc./DPPH), **1:1** (0,1250mM:0,1250mM); **1:3** (0,0625mM:0,1875mM); **1:5** (0,0416mM:0,2083mM); **1:7,5** (0,0294mM:0,2205mM); **1:10** (0,0227mM:0,2272mM); **1:20** (0,0119mM:0,2380mM); **1:35** (0,0069mM:0,2430mM); **1:50** (0,0049mM:0,2450mM); **1:75** (0,0032mM: 0,2467mM); **1:100** (0,0024mM:0,2475mM). **A1:** 1,0 mg/mL; **B1:** 5,0 mg/mL; **C1:** 10,0 mg/mL; **D1:** 15,0 mg/mL e **E1:** 20,0 mg/mL. **NEIIA:** NEBBS03; **NEIA:** NEBBS02.

Com base nos resultados acima, determinou-se a concentração efetiva (CE50%) correspondente à quantidade de antioxidante necessária para diminuir ou reduzir a concentração inicial do radical DPPH' em 50 %, conforme demonstrado na **Figura 38**, considerando o ácido ascórbico como controle. Os resultados obtidos demonstram que a CE50% Ácido Ascórbico=0,1956 mg/mL. Com base nesse valor foi possível estabelecer uma concentração correspondente da atividade antioxidante para a seguinte nanoemulsão NEBBS02, cujo valor encontrado foi de 0,4329 mg/mL. Esta concentração tem mesmo efeito que uma concentração de 0,1956 mg/mL de vitamina C.

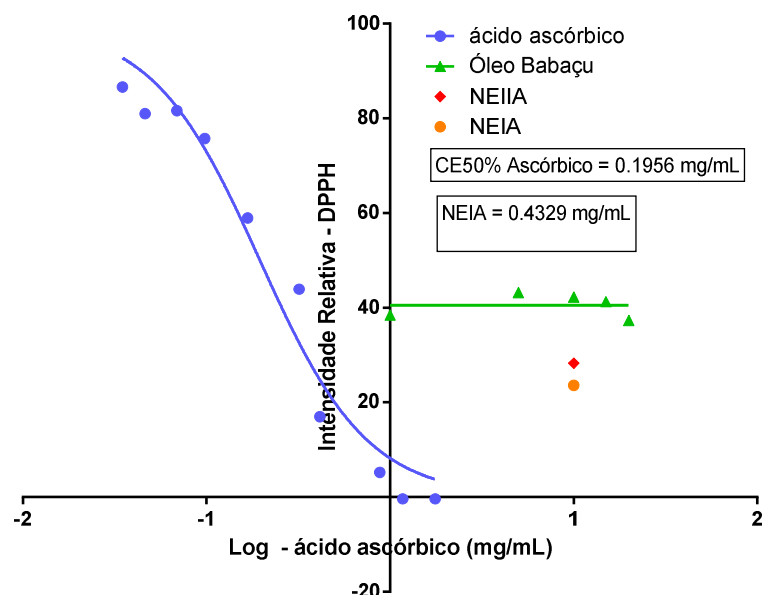


Figura 38. Curva dose resposta CE50% da atividade antioxidante dos compostos ácido ascórbico, óleo de babaçu e nanoemulsões de babaçu. **Legenda:** NEIA: NEBBS02.

Com a finalidade de determinar a área da superfície esférica das gotículas de óleo de babaçu *in natura* livre, foi obtida a curva de distribuição das partículas (gotículas) do óleo de babaçu *in natura* disperso em EtOH, conforme demonstrado na **Figura 39**. Os resultados obtidos demonstram gotículas de óleo no formato esférico, com ampla faixa de tamanho. Sabendo que geometricamente a área da superfície esférica é representada pela equação: $S_e=4\pi R^2$, calculou-se a área da superfície esférica para o óleo livre cujo resultado foi $S_e= 218.928.650 \text{ nm}^2$. Esse valor aumenta 10^2 X quando a partícula é reduzida de $1\mu\text{m}$ para 10 nm e o número de partículas por peso aumenta 10^6 X .

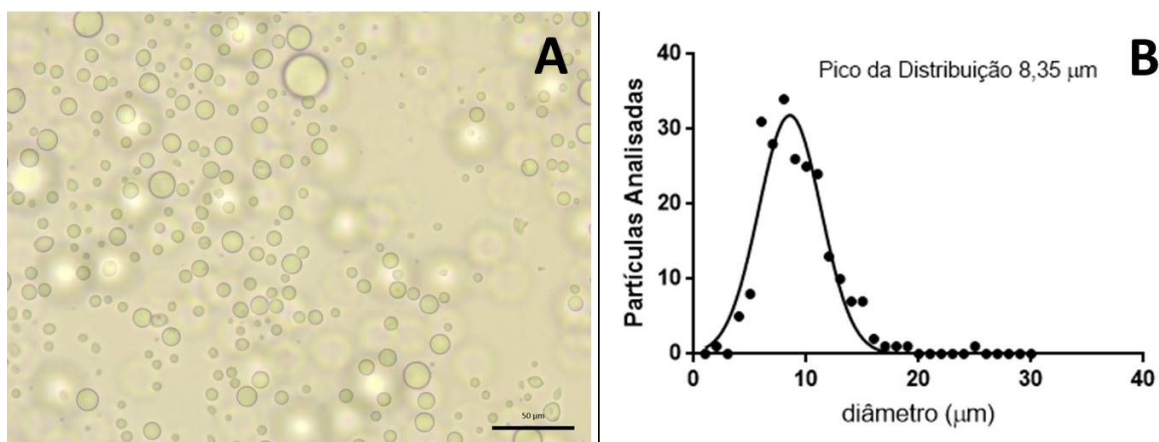


Figura 39. Dispersão das gotículas do óleo de babaçu livre. (A) em EtOH; (B) Curva de distribuição das gotículas.

7. DISCUSSÃO

7.1. Avaliação do Diâmetro Hidrodinâmico (nm) das gotículas e Índice de Polidispersão – PDI

Conforme a classificação proposta por Anton & Vandamme (2011), nanoemulsões consistem em gotículas muito pequenas de emulsão, comumente gotículas de óleo disperso em água apresentando diâmetros hidrodinâmicos menores ~ 300 nm. Para McClements (2012b), uma nanoemulsão óleo em água (O/A) apresenta um dos líquidos dispersos em pequenas gotas esféricas cujo tamanho é < 100 nm. Já em relação ao Índice de Polidispersão – PDI, para os autores Izquierdo *et al.*, (2005) valores de PDI próximos a 0,2 indicam uma distribuição monomodal.

No presente trabalho, levando em consideração os conceitos descritos no parágrafo anterior, com exceção da nanoemulsão NEBBS01, as demais nanoemulsões (NEBBS02, NEBBS03, NEBBS04, NEBBS05 e NEBBS06) encontram-se dentro da classificação proposta por Anton & Vandamme (2011). Destas somente as nanoemulsões NEBBS02, NEBBS03, NEBBS05 e NEBBS06 estão de acordo com a classificação proposta por McClements (2012a), as quais apresentaram valores de DH < 100 nm.

Visto que diferentes concentrações de óleo e surfactantes foram combinadas para cada nanoemulsão, este estudo mostra que é possível haver diferenças de DH (nm) em função do tempo de armazenamento. Esta variação pode estar relacionada ao efeito da concentração dos surfactantes, pois as nanoemulsões que apresentaram pequenas variações de DH (nm) foram aquelas, cuja composição de surfactante foi em torno de 57,00 % (m/m) na composição total da nanoformulação, ou seja, nanoformulações contendo óleo de babaçu apresentam melhor estabilidade de DH (nm) considerando-se um percentual de surfactante acima de 57,00 % (m/m).

Para Raio & McClements (2012), as moléculas de surfactantes são comumente usadas para facilitar a formação e melhorar a estabilidade das dispersões coloidais. Os mesmos autores estudaram as características de dispersões coloidais a base de óleo de limão e utilizaram surfactantes não iônicos hidrófilicos, isto é, aqueles que apresentam um elevado EHL. Além disso, investigaram também o efeito da solubilização do óleo de limão em soluções mistas de surfactantes para a formação de nanoemulsão e microemulsão. Os resultados dos autores supracitados apontaram que as nanoemulsões e microemulsões mantiveram-se estáveis quando formuladas utilizando-se concentrações de surfactante (Tween 80) ≥ 75 e ≥ 50 % p/p, respectivamente.

Estes resultados mostram a utilização de quantidades relativamente altas de surfactantes para formação de nanoemulsões. No presente trabalho, as concentrações de surfactantes (especificamente Tween 80) utilizadas para formular nanoemulsões de óleo de babaçu foram inferiores em comparação às dos referidos autores.

Os pesquisadores Shafiq-un-Nabi *et al.*, (2007), observaram em seu estudo que o tamanho das gotas de nanoemulsões contendo óleo de rícino sofre influência de tamanho quando se trabalha com uma proporção consideravelmente maior de óleo presente nas formulações. Desta forma, os autores destacam que o surfactante escolhido deve ser capaz de reduzir a tensão interfacial e auxiliar o processo de dispersão do óleo durante a preparação da nanoemulsão e apresentar caráter lipofílico adequado para prever a curvatura correta na região interfacial entre a fase oleosa e aquosa, seja a nanoemulsão tipo óleo (O)/água (A), água(A) /óleo (O) ou bicontínua.

No presente trabalho, o aumento da concentração de óleo de babaçu presente nas nanoformulações NEBBS05 e NEBBS06 favoreceu para uma redução do DH das gotículas de óleo de babaçu dispersas na nanoemulsão. Esse fenômeno deve estar associado à mistura do óleo BBS com tensoativos

que apresentavam distintos valores de EHL, o qual contribuiu para a obtenção de valores de DH (nm) menores.

Sistemas nanoestruturados contendo óleo comercial de babaçu (*Orbignya speciosa*) foram formulados pelos pesquisadores Rodrigues *et al.*, (2015). A análise do DH (nm) revelou gotículas com médias de DH de $107,4 \pm 1,2$ nm e médias de índice de polidispersão de $0,255 \pm 0,008$. Entre as quinze nanoemulsões de babaçu formuladas pelos pesquisadores, treze apresentaram médias de DH (nm) das gotículas abaixo de 200 nm, após 07 dias de manipulação.

Estes resultados não estão distantes dos encontrados no presente trabalho, a nanoestruturação do óleo artesanal de babaçu (*Orbignya phalerata* Martius) apresentou médias estáveis de DH (nm) inferior a 100 nm. A estabilização das NEBBS se dá principalmente pela estabilização estérica promovida pelas moléculas de surfactantes. Em relação aos valores de PDI foi possível observar estatisticamente que o tempo de armazenamento não exerce influência na modificação do PDI ao longo de 120 dias de armazenamento a temperatura ambiente. Os dados apontam nanoemulsões contendo óleo de babaçu (*Orbignya phalerata* Martius) como sistemas de baixa polidispersividade.

7.2. Potencial Zeta (ζ) mV e Potencial Hidrognônico (pH)

Conforme Bali *et al.*, (2010), o Potencial ζ está relacionado com a estabilidade das dispersões coloidais, indicando repulsão entre partículas adjacentes carregadas igualmente numa dispersão. Para moléculas pequenas, um Potencial ζ alto pode conferir estabilidade quanto à resistência da dispersão à agregação.

Tang *et al.*, (2012) perceberam em seu estudo que gotículas oleosas (estabilizadas com Cremophor EL) apresentavam uma carga positiva de zeta ζ ($\sim 0,8$ mV), observaram também que o potencial zeta aumentava gradualmente no sentido negativo à medida que o pH subia (para aproximadamente 9), os

mesmos autores do trabalho verificaram que emulsificantes não iônicos conseguiam reduzir a magnitude do Potencial ζ da suspensão em uma determinada faixa de pH.

O estudo desenvolvido pelos pesquisadores Salvia-Trujillo *et al.*, (2015) mostrou que nanoemulsões contendo óleos essenciais estabilizadas com Tween 80 na concentração de 1% p/p apresentavam valores negativos de PZ na faixa de - 30 mV. Para os autores, valores negativos altos de Potencial ζ (acima de - 30 mV) indicam uma forte repulsão eletrostática das gotículas de óleo dispersas na fase aquosa. Ressaltam ainda que, tratando-se de nanoemulsões os valores de PZ podem sofrer influência em relação ao tipo de óleo utilizado e o mecanismo utilizado de formação das nanoemulsões.

Considerando os resultados dos referidos autores reportados nos parágrafos anteriores, os resultados dos Potenciais ζ não estão muito distantes dos encontrados no presente trabalho. No entanto, as nanoemulsões de babaçu estabilizadas com Tween 80 e Span 80 foram as que mais sofreram variações ao decorrer do tempo, em comparação às nanoemulsões estabilizadas com cremophor.

Comparando os resultados encontrados de pH das nanoemulsões de babaçu (NEBBS) 5 a 7,7 com dados recentes disponíveis na literatura, os mesmos não estão distantes dos resultados reportados pelos pesquisadores Azeem *et al.*, (2009); Almeida *et al.*, (2010); Ghosh *et al.*, (2013b); Dordevic *et al.*, (2013); Junior *et al.*, (2013); Khurana *et al.*, (2013) e Sugumar *et al.*, (2014).

O valor do pH constitui um parâmetro importante para a estabilidade do sistema, pois um decréscimo significativo do pH (abaixo de 4,0) indica a ocorrência de hidrólise de lipídeos (especificamente os triglicerídeos) em ácidos graxos livres (R-COOH) no núcleo oleoso da nanoemulsão. Este parâmetro constitui ainda um indicativo de controle de qualidade que reflete quanto às condições de armazenamento e processamento das formulações (MASMOUDI *et al.*, 2005; JUNIOR *et al.*, 2013; BRUXEL *et al.*, 2012). No presente trabalho, a análise estatística dos valores encontrados de pH mostrou

que as nanoemulsões de babaçu não sofreram variações de pH em relação ao tempo de armazenamento.

7.3. Ponto Isoelétrico – PI

Para Honary & Zahir (2013) um valor isoelétrico de pH = 5,0 ou pHs ácidos, significa que dentro do ambiente aquoso os íons (H^+) tentam neutralizar as cargas negativas dominantes presentes na superfície da nanopartícula, fazendo assim com que se atinja um estado de equilíbrio entre as cargas positivas e negativas, resultando em potencial ζ nulo.

No trabalho dos pesquisadores Tang *et al.*, (2012) o PI em que a nanoemulsão apresentou carga nula, foi com valor de pH = 2,54 a mudança do pH do meio não alterou o DH (nm) das gotas de óleo dispersas na nanoemulsão. Estes resultados não estão distantes dos encontrados no presente trabalho, onde se observaram que o PZ aproximava-se de zero quando as nanoemulsões de babaçu eram expostas ao meio com pH = 3,0.

Os resultados reportados por He *et al.*, (2011) também confirmaram que os Potenciais ζ variam conforme o pH do meio, seus resultados mostraram que houve variação do Potencial ζ de - 33 mV para - 43 mV; -39 mV para - 50 mV e -52 mV para -73 mV, quando houve um aumento do pH do meio de 7 para 10. Observaram também que não houve influência do pH sobre o tamanho das partículas bem como para o PDI nas nanoemulsões. Os pesquisadores ressaltam que o aumento do pH do meio conduziu para uma melhor estabilidade do Potencial ζ das nanoemulsões.

Uma importante função do ponto isoelétrico é avaliar se a estabilidade é dada pela repulsão eletrostática ou pela repulsão estérica. Pode-se observar que a partir do teste de PI as nanoemulsões quando expostas em pHs extremos, elas se mantiveram estáveis, o que indica que a estabilização das gotículas de óleo de babaçu não é por repulsão eletrostática. Isso constitui um ponto positivo, pois favorece esse veículo (NEBBS) para uma aplicação

gastrointestinal, que inclui pHs ácidos no estômago, porém básicos no intestino.

7.4. Teste de Centrifugação

Os ensaios de estabilidade termodinâmica, tais como o teste de centrifugação, permite verificar sinais de coalescência e/ou separação de fases, indicando assim possíveis sinais de instabilidade do sistema. Conforme Mishra *et al.*, (2014) a coalescência das gotículas de óleos ocorre devido à tensão superficial e as atrações intermoleculares. Para Jaiswal *et al.*, (2014) a separação de fase é favorecida quando há adição de algum surfactante na fase oleosa ou aquosa, o qual em uma destas fases não é miscível, temperatura elevada, presença de micro-organismos entre outros.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que as nanoemulsões NEBBS01 e NEBBS04 não passaram no teste de centrifugação, sendo assim as mesmas não prosseguiram para as próximas etapas de caracterização. Considerando os resultados obtidos em relação às etapas anteriores de caracterização as nanoemulsões de babaçu NEBBS05 e NEBBS06, não foram submetidas aos demais testes de estabilidade. Dessa forma, a nanoformulação NEBBS02 prosseguiu para o teste de resfriamento e aquecimento e avaliação do potencial antioxidante e a nanoformulação NEBBS03 para o teste o teste de resfriamento e aquecimento, Microscopia Eletrônica de Transmissão - MET e avaliação do potencial antioxidante.

7.5. Ciclos de resfriamento e aquecimento

Para Bali *et al.*, (2010) o teste de resfriamento e aquecimento ou gela-degela consiste em um estudo termodinâmico de estabilidade. Em seu trabalho este teste foi usado para verificar qualitativamente o efeito das variações de temperaturas sobre a estabilidade de nanoemulsões. Eles realizaram 06 ciclos, armazenando as nanoemulsões as temperaturas de 4°C e 40°C durante um período de 48h. Seus resultados indicaram a estabilidade das formulações e não houve alterações significativas nos parâmetros físicos DH (nm) e PDI.

Ghosh *et al.*, (2013b) caracterizaram nanoemulsões a base de óleo essencial extraído da planta *Ocimum basilicum* (manjeriçã). Eles verificaram que o armazenamento das nanoformulações nas temperaturas de 4°C e 25 °C não revelou sinais de instabilidade.

Os pesquisadores Saranya *et al.*, (2012) avaliaram nanoemulsões contendo óleo de eucalipto e verificaram que nanoemulsões contendo 25 % v/v de óleo de eucalipto, apresenta boa estabilidade física, quando submetidas a 06 ciclos nas temperaturas de 4°C e 45°C.

Os resultados dos referidos autores descritos anteriormente, não estão distantes dos resultados encontrados no presente trabalho. A avaliação macroscópica qualitativa das nanoemulsões de babaçu (*Orbignya phalerata* Martius) NEBBS02 e NEBBS03 não sofreram alterações quanto aos aspectos físicos (cor, fluidez, ausência de precipitados, separação de fases) quando submetidas a 05 ciclos nas temperaturas de 4°C e 37,5°C por 24h, avaliadas em cinco dias consecutivos.

Contudo, os resultados obtidos apontaram variações em relação ao DH (nm) e PDI para nanoemulsão NEBBS02, quando submetida às condições de armazenamento, nas temperaturas 4°C e 37,5°C, diferentemente do PDI quando comparadas as condições de armazenamento a temperatura ambiente (**item 6.1. pág. 66**). Isso sugere que para esta formulação, a preservação da estabilidade do PDI é garantida quando armazenada a temperatura ambiente, pois não foram observadas alterações do PDI quando submetida a esta condição.

Para a nanoformulação NEBBS03 não foi verificado sinais bruscos de instabilidade quando submetidas às temperaturas 4°C e 37,5°C e concomitantemente a temperatura ambiente (**item 6.1. pág. 67**), o que sugere que a mesma pode ser armazenada a longos períodos a temperatura ambiente e submetidas ao resfriamento e aquecimento por cinco dias consecutivos, sem comprometer sua estabilidade física.

7.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Trabalhos disponíveis na literatura ressaltam a natureza morfológica de nanoemulsões contendo óleos vegetais para o formato esférico, como pode ser verificado no trabalho publicado pelos pesquisadores Ghosh *et al.*, (2013b). Seus resultados MET demonstraram gotículas esféricas na faixa de 20-50 nm. Outro estudo realizado foi o trabalho desenvolvido pelos pesquisadores Liang *et al.*, (2012), os quais formularam nanoemulsões contendo óleo de hortelã-pimenta e triacilglicerol de cadeia média. Os resultados de microscopia óptica acusaram gotículas esféricas bem distribuídas.

No presente trabalho, as fotomicrografias obtidas quanto ao aspecto morfológico das gotículas confirmam com os dados da literatura (Ghosh *et al.*, 2013b; Liang *et al.*, 2012) que ressaltam a natureza esférica das gotículas. Os resultados apontam ainda que as nanogotículas presentes na nanorformulação de babaçu (NEBBS03) mantiveram-se bem distribuídas não sofrendo influência dos solventes utilizados quanto à preparação da amostra e fornece uma informação importante quanto à eficácia do tensoativo utilizado para estabilizar as gotículas de óleo.

Os dados quantitativos obtidos do tamanho das partículas em MET apontaram partículas menores em comparação com os dados obtidos pela técnica DLS, isso foi possível observar pela curva de distribuição do tamanho representada na **Figura 33**. Conforme Silva *et al.*, (2012) o MET pode ser utilizado para confirmar o diâmetro das gotículas de óleo. Dessa forma, a nanoformulação NEBBS03 contendo óleo de babaçu (*Orbignya phalerata* Martius) foi morfológicamente caracterizada.

7.7. Atividade antioxidante *in vitro* do óleo livre e das NEBBS

A espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica EPR, consiste numa técnica de alta sensibilidade na detecção de radicais livres, por essa razão vem sendo aplicada em estudos de estabilidade oxidativa e atividade antioxidante. Dessa forma, moléculas classificadas paramagnéticas são identificadas gerando um sinal EPR padrão. O grande diferencial desta técnica de avaliação é a sua alta sensibilidade, fator que fica prejudicado nas avaliações antioxidantes colorimétricas tradicionais. Mais especificamente na avaliação de potencial oxidante de óleos vegetais, que possuem algum tipo de sinal de absorvância, os ensaios colorimétricos podem ficar comprometidos, produzindo erros de análise.

O radical livre DPPH[•] é um composto paramagnético e bastante utilizado em ensaios para avaliar atividade antioxidante. Conforme Naik *et al.* (2014) a detecção do radical livre DPPH[•] por EPR em extratos oleosos antioxidantes resulta na obtenção de um espectro complexo que reduz a intensidade do sinal padrão. Para Pereira (2008) o radical DPPH[•] consiste em um radical estável e pode ser reduzido em meio alcoólico, quando em contato com uma substância antioxidante doadora de hidrogênio.

No presente trabalho, o sinal experimental EPR obtido para o radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH[•]) apresentado na **Figura 34 (pág. 83)**, está de acordo quando comparados com outros espectros disponíveis na literatura, como pode ser verificado na **Figura 12 (pág. 56)**, dados de Santos (2006). E corrobora com as afirmações de Naik *et al.*, (2014) e Pereira (2008). Com base na hipótese que a ação antioxidante do óleo de babaçu pode ser melhorada a partir da nanoestruturação do óleo, os resultados encontrados no presente trabalho demonstraram que para o óleo de babaçu *in natura* na forma nanoestrurado a ação antioxidante foi maior quando comparado ao óleo de babaçu no seu estado bruto, conforme demonstrado na **Figura 35 (A) (pág. 84)** e **Figura 36 (pág. 86)**, respectivamente.

Segundo Budilarto & Kamal-Eldin, (2015) os componentes menores (tais como; fosfolipídios, tocoferóis, trocotrienois e outros) presentes nos óleos vegetais, extraídos principalmente das palmáceas são anfifílicos e permanecem ativos na superfície de uma emulsão. O aumento do efeito antioxidante do óleo de babaçu presente nas nanoemulsões investigadas no presente estudo pode estar relacionado com o aumento da área de superfície.

Com a diminuição do tamanho das gotículas de óleo de babaçu para escala nanométrica, aumentam-se a área de superfície, e conseqüentemente o número de partículas por unidade de peso, com isso algumas propriedades originais do óleo no estado bruto podem sofrer modificações. Dessa forma, acredita-se que as moléculas antioxidantes presentes no óleo de babaçu melhoram sua solubilidade, visto que esta é uma propriedade que se modifica na escala nanométrica.

Foi constatado ainda quanto a preservação lipídica do óleo de babaçu contida nas nanoformulações NEBBS02 e NEBBS03, uma vez que não foi gerado sinal EPR para estas formulações quando analisadas no seu estado puro, o que demonstra a inexistência de moléculas que apresentam e⁻ desemparelhado em sua composição ou degradação oxidativa.

Conforme Santos *et al.*, (2013) o óleo de babaçu (*Orbignya phalerata* Martius) é um produto constituído por mais de 60% de triacilgliceróis, com uma alta concentração de ácidos graxos saturados. Estes ácidos graxos contêm somente ligações do tipo sp³ carbono-carbono e são os menos reativos quimicamente, o que faz com que óleos ou gorduras que contêm quantidades apreciáveis de unidades de ácidos graxos saturados sejam mais estáveis diante de um processo degradativo ou rancidez autoxidativa (JORGE, 2009).

Alguns óleos vegetais comestíveis são descritos na literatura quanto suas propriedades antioxidantes, como demonstrado nas referências Kozłowska *et al.*, (2012) (óleo de milho e óleo de soja); Naik *et al.*, (2014) (óleo de agrião) os pesquisadores avaliaram os efeitos antioxidantes de extratos etanólicos destes óleos, medindo sua capacidade de eliminar radicais livres

DPPH' usando espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR). Seus resultados demonstraram um aumento significativo da estabilidade oxidativa e potencial antioxidante para os óleos de milho e soja quando comparados ao antioxidante sintético BHA (amplamente utilizado na indústria de alimentos). Para o óleo de agrião a concentração de óleo foi decisiva para prever a estabilidade oxidativa e a eficiência antioxidante.

No presente trabalho também foi utilizado um antioxidante padrão amplamente conhecido com a finalidade de comparar a atividade antioxidante com as amostras analisadas. Os resultados indicaram que a nanoemulsão de babaçu NEBBS02 apresentou uma concentração efetiva de 0,4329 mg/mL correspondente a uma concentração igual de vitamina C.

Foi verificado que concentrações baixas de óleo de babaçu *in natura* nanoestruturado possuem uma maior ação antioxidante. De acordo com os autores Naik *et al.*, (2014) e Apak *et al.*, (2013) os antioxidantes são substâncias que funcionam a baixas concentrações para retardar ou inibir significativamente a oxidação do substrato. Para Jorge (2009) na seleção de antioxidantes, são desejáveis as seguintes concentrações (0,001 a 0,01%).

8. CONCLUSÃO

- ✓ Conforme os resultados obtidos, foi possível produzir nanoemulsões a base de óleo de babaçu (*Orbignya phalerata* Martius) macroscopicamente e nanoscopicamente estáveis com diâmetro hidrodinâmico (DH) entre 50 a 100 nm e com baixa polidispersividade apresentando característica química levemente ácida a neutra, com carga das gotículas predominantemente positiva e formato esférico.
- ✓ A análise do potencial antioxidante *in vitro* por EPR confirmou a hipótese do efeito maior para o óleo de babaçu *in natura* no estado nanoestruturado. A partir destas afirmações, a nanoestruturação do óleo de babaçu (*Orbignya phalerata* Martius), oriundo das cidades de Fortuna e Caxias do estado do Maranhão apresentam ação antioxidante, sendo assim um produto promissor quanto sua aplicação na nanotecnologia de alimentos, contribuindo assim para um melhor consumo deste produto.
- ✓ Foi produzido um nanosistema de entrega com potencial antioxidante, contendo óleo de babaçu (*Orbignya phalerata* Martius).

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A.W.B. Economia do babaçu: levantamento preliminar de dados. São Luís/MA: Ed. MIQCB/**Balaio Thiphografia**, 2001.

ALMEIDA, C. P.; VITAL, C. G.; CONTENTE, T. C.; MARIA, D. A.; MARANHÃO, R. C. Modification of composition of a nanoemulsion with different cholesteryl ester molecular species: Effects on stability, peroxidation, and cell uptake. **International Journal of Nanomedicine**, 5, 679–686, 2010.

ALMEIDA, R. R. de.; LACERDA, L. G.; MURAKAMI, F. S.; BANNACH, G.; DEMIATE, I. M.; SOCCOL, C. R.; FILHO, M. A. da S. C.; SCHNITZLER, E. Thermal analysis as a screening technique for the characterization of babassu flour and its solid fractions after acid and enzymatic hydrolysis. **Thermochimica Acta**, 519, 50–54, 2011.

ANTON, N.; VANDAMME, T. F. Nano-emulsions and Micro-emulsions: Clarifications of the Critical Differences. **Pharm Res**, 28, 978–985, 2011.

ANTON, N.; VANDAMME, T. F. The universality of low-energy nano-emulsification. **International Journal of Pharmaceutics**, 377, 142–147, 2009.

ANVISA - **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução nº 482, de 23 de setembro de 1999.

ANWAR, F.; RASHID, U.; SHAHID, S. A.; NADEEM, M. Physicochemical and Antioxidant Characteristics of Kapok (*Ceiba pentandra* Gaertn.) Seed Oil. **J Am Oil Chem Soc.**, 9, 1047–1054, 2014.

APAK, R.; GORINSTEIN, S.; BÖHM, V.; SCHAICH, K. M.; ÖZYÜREK, M.; GÜÇLÜ, K. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). **Pure Appl. Chem.**, 85, 5, 957–998, 2013.

AUGUSTIN, M. A.; SANGUANSRI, L. Challenges and Solutions to Incorporation of Nutraceuticals in Foods. **Annu. Rev. Food Sci. Technol.**, 6, 463–77, 2015.

AZEEM, A.; RIZWAN, M.; AHMAD, F. J.; IQBAL, Z.; KHAR, R. K.; AQIL, M.; TALEGAONKAR, S. Nanoemulsion Components Screening and Selection: a Technical Note. **AAPS PharmSci Tech**, 10, 1, march, 2009.

BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; GOI, S.R.; SILVA, R.A. da; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Técnicas microscópicas aplicadas na identificação e localização de bactérias fixadoras de nitrogênio e biomacromoléculas em tecidos vegetais. **Seropédica: Embrapa Agrobiologia**, jul. 1998. 27p. Embrapa-CNPAB, Documentos, 50.

BALI, V.; ALI, M.; ALI, J. Study of surfactant combinations and development of a novel nanoemulsion for minimising variations in bioavailability of ezetimibe. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 76, 410–420, 2010.

BALL, S. DYNAMIC LIGHT SCATTERING - Colloidal Gold: The Gold Standard for Drug Delivery? Disponível em: <<http://www.drug-dev.com/Main/Back-Issues/DYNAMIC-LIGHT-SCATTERING-Colloidal-Gold-The-Gold-S-872.aspx>>. Acesso: 02 de abril de 2015.

BARBOSA, M. do C. L.; BOUSKELA, E.; CYRINO, F. Z. G. A.; AZEVEDO, A. P. S.; COSTA, M. C. P.; SOUZA, M. das. G. C. de.; SANTOS, D. S.; BARBOSA, F. L.; GUERRA, L. F. A.; NASCIMENTO, M. do D. S. B. Effects of babassu nut oil on ischemia/reperfusion-induced leukocyte adhesion and macromolecular leakage in the microcirculation: Observation in the hamster cheek pouch. **Lipids in Health and Disease**, 11, 158, 2012.

BARKALINA, N. M. D., CHARALAMBOUS, C.; JONES, C.; COWARD, K. Nanotechnology in reproductive medicine: Emerging applications of nanomaterials. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, 10, 921–938, 2014.

BARRY, B.W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 14, 101 -114, 2001.

BELLUCCI, S. Nanoscale science and technology. **Journal of Physics: Condensed Matter**, 20, 470301, 11, 2008.

BHOSALE, R. R.; OSMANI, R. A.; GHODAKE, P. P.; SHAIKH, S. M.; CHAVAN, S. R. Nanoemulsion: A Review on Novel Profusion in Advanced Drug Delivery. **Indian J. Pharm. Biol. Res.**, 2, 1, 122-127, 2014.

BIGLIARDI, B.; GALATI, F. Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. **Trends in Food Science & Technology**, 31, 118-129, 2013.

BOREL, T.; SABLIOV, C.M. Components for Food Applications: Types of Delivery Systems, Properties, and Their Effect on ADME Profiles and Toxicity of Nanoparticles. **Annu. Rev. Food Sci. Technol.**, 5, 197–213, 2014.

BRAR, S. K. & VERMA, M. Measurement of nanoparticles by light-scattering techniques. **Trends in Analytical Chemistry**, 30, 1, 2011.

BRASIL. Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997. Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego. **Ministério da Saúde**. Secretaria de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d1b6da0047457b4d880fdc3fbc4c6735/PORTARIA_540_1997.pdf?MOD=AJPERES> Acesso em: 01-03-2015.

BRASIL, Lei nº 10.973 de 02 de Dezembro de 2004. Conselho da União Europeia CE nº 258/97 incentivos à inovação e à pesquisa científica e tecnológica no ambiente produtivo.

BRUXEL, F.; LAUX, M.; WILD, L. B.; FRAGA, M.; KOESTER, L. S.; TEIXEIRA, H. F. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, 35, 9, 1827-1840, 2012.

BUDILARTO, E. S.; KAMAL-ELDIN, A. The supramolecular chemistry of lipid oxidation and antioxidation in bulk oils. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, 117, 0000–0000, 2015.

CANTARINI, D. G.; ROSA, J. C. D.; VENTURINI, L. G. R.; SILVA, J. P. M. O.; HONORIO-FRANÇA, A. C.; FRANÇA, E. L. Immunomodulation of Human Blood Phagocytes by *Orbignya phalerata* Mart. Plus IFN- γ and TGF- β Cytokines. **European Journal of Medicinal Plants**, 6, 3, 167-174, 2015.

CHAUDHRY, Q.; CASTLE, L. Food applications of nanotechnologies: An overview of opportunities and challenges for developing countries. **Trends in Food Science & Technology**, 22, 595-603, 2011.

CHELLARAM, C.; MURUGABOOPATHI, G.; JOHN, A. A.; SIVAKUMAR, R.; GANESAN, S.; KRITHIKA, S.; PRIYA, G. Significance of Nanotechnology in Food Industry. **APCBEE Procedia**, 8, 109 – 113, 2014.

CHIU, M. C.; GIOIELLI, L. A.; GRIMALDI, R. Lipídios estruturados obtidos a partir da mistura de gordura de frango, sua estearina e triacilgliceróis de cadeia média. I-composição em ácidos graxos e em triacilgliceróis. **Química Nova**, 31, 2, 232-237, 2008

CINELLI, B. A.; LOPEZ, J. A.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G.; CASTRO, A. M. Granular starch hydrolysis of babassu agroindustrial residue: A bioprocess within the context of biorefinery. **Fuel**, 124, 41–48, 2014.

COLES, D.; FREWER, L.J. Nanotechnology applied to European food production – A review of ethical and regulatory issues. **Trends in Food Science & Technology**, 34, 32-43, 2013.

CUSHEN, M.; KERRY, J.; MORRIS, M.; CRUZ-ROMERO, M.; CUMMINS, E. Nanotechnologies in the food industry e recent developments, risks and regulation. **Trends in Food Science & Technology**, 24, 30-46, 2012.

D'ANTON REIPERT, E. C.; RODRIGUES, C. E.C.; MEIRELLES, A. J. A. Phase equilibria study of systems composed of refined babassu oil, lauric acid, ethanol, and water at 303.2 K. **J. Chem. Thermodynamics**, 43, 1784–1790, 2011.

DASGUPTA, N.; RANJAN, S.; MUNDEKKAD, D.; RAMALINGAM, C.; SHANKER, R.; KUMAR, A. Nanotechnology in agro-food: From field to plate. **Food Research International**, 69, 381–400, 2015.

DATE, A. A.; DESAI, N.; DIXIT, R.; NAGARSENKER, M. Self-nanoemulsifying Drug Delivery Systems: Formulation Insights, Applications and Advances. **Nanomedicine**, 5, 10, 2010.

DEVARAJAN, V.; RAVICHANDRAN, V. Nanoemulsions: As modified drug delivery tool. **Pharmacie Globale (IJCP)**, 4, 01, 2011.

DORDEVIC, S. M.;RADULOVIC, T. S.;CEKIC, N.A D.;RANDELOVIC, D. V.;SAVIC, M. M.;KRAJISNIK, D. R.; MILIC, J. R.; SAVIC, S. D.Experimental Design in Formulation of Diazepam Nanoemulsions: Physicochemical and Pharmacokinetic Performances. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, doi 10.1002/jps.23734, 2013.

DURÁN, N.; MARCATO, P. D. Nanobiotechnology perspectives. Role of nanotechnology in the food industry: A review. **International Journal of Food Science and Technology**, 48, 1127–1134, 2013.

DUVALL, M. N. FDA Regulation of Nanotechnology. **Part II of the American Bar Association's Nanotechnology Project**, February, 2012.

EDWARDS, S. A. The Nanotech Pioneers. **WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim**, ISBN: 3-527-31290-0, 2006.

FERNANDEZ, P.; ANDRÉ, V.; RIEGER, J.; KUHNLE, A. Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, 251, 53–58, 2004.

FERREIRA, A. J.; CEMLYN-JONES, J.; ROBALO CORDEIRO, C. Nanoparticles, nanotechnology and pulmonary nanotoxicology. **Rev Port Pneumol.**, 19, 1, 28–37, 2013.

FERREIRA, B. S.; ALMEIDA, C. G. de; FAZA, L. P.; ALMEIDA, A. de; DINIZ, C. G.; SILVA, V. L. da; GRAZUL, R. M.; HYARIC, M. L. Comparative Properties of Amazonian Oils Obtained by Different Extraction Methods. **Molecules**, 16, 5875-5885, 2011.

FERREIRA, B. S.; FAZA, L. P.; HYARIC, M. L. A Comparison of the Physicochemical Properties and Fatty Acid Composition of Indaiá (*Attalea dubia*) and Babassu (*Orbignya phalerata*) Oils. **The Scientific World Journal**, 4, 2012.

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

FERREIRA, M. E. M.; COSTA, P. A. B. The Babassu as an Alternative Technology for Housing Construction. A Sustainable Development Approach. **Journal of Multidisciplinary Engineering Science and Technology**, 1, 5, 2014.

FINLEY, J. W.; KONG, A-N.; HINTZE, K. J.; JEFFERY, E. H.; JI, L. L.; LEI, X. G. Antioxidants in Foods: State of the Science Important to the Food Industry. **J Agric Food Chem.**, 13, 59(13), 6837-46, 2011.

FREWER, L.J.; GUPTA, N.; GEORGE, S.; FISCHER, A.R.H.; GILES, E.L.; COLES, D. Consumer attitudes towards Nanotechnologies applied to food production. **Trends in Food Science & Technology**, 40, 211-225, 2014.

FRYD, M. M. & MASON, T. G. Advanced Nanoemulsions. **Annu. Rev. Phys. Chem.**, 63, 493–518, 2012.

GERMER, S. Development of near-surface perched water tables during natural and artificial stemflow generation by babassu palms. **Journal of Hydrology**, 507, 262–272, 2013.

GHOSH, V.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity. **Ultrasonics Sonochemistry**, 20, 338–344, 2013a.

GHOSH, V.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Formulation and Characterization of Plant Essential Oil Based Nanoemulsion: Evaluation of its Larvicidal Activity Against *Aedes aegypti*. **Asian Journal of Chemistry**; 25, Supplementary Issue, S321-S323, 2013b.

GREINER, R. Current and projected applications of nanotechnology in the food sector. **J. Brazilian Soc. Food Nutr.**, 34, 1, 243-260, 2009.

GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 393, 561–564, 2010.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutrition Reviews**, 70, 5, 257–265, 2012.

HANDFORD, C. E.; DEAN, M.; SPENCE, M.; HENCHION, M.; ELLIOTT, C. T.; CAMPBELL, K. Awareness and attitudes towards the emerging use of nanotechnology in the agri-food sector. **Food Control**, 57, 24-34, 2015.

HANKIN, S.; BORASCHI, D.; DUSCHL, A.; LEHR, C.M.; LICHTENBELD, H. Towards nanotechnology regulation — Publish the Unpublishable. **Nano Today**, 6, 228-231, 2011.

HE, W.; TAN, Y.; TIAN, Z.; CHEN, L.; HU, F. WU, W. Food protein-stabilized nanoemulsions as potential delivery systems for poorly water-soluble drugs: preparation, in vitro characterization, and pharmacokinetics in rats. **International Journal of Nanomedicine**, 6, 521–533, 2011.

HONARY, S. & ZAHIR, F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, 12, 2, 255-264, 2013.

INTRALAB, Universidade Estadual Paulista. Disponível em: <http://www6.fcav.unesp.br/intralab/substancias_id.php?recordID=176#> acesso em: 04 de maio de 2015.

ISO - **International Organization for Standardization**. Norma Internacional ISO 22412 (2008). Particle size analysis - Dynamic light scattering (DLS). Disponível em: <<https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:22412:ed-1:v1:en.>>. Acesso: 01 de maio de 2015.

ISO - **International Organization for Standardization**. Norma Internacional ISO TC 229 (2005). Nanotechnologies. Disponível em: <http://www.iso.org/iso/iso_technical_committee?commid=381983>. Acesso: 01 de maio de 2015.

IZQUIERDO, P.; FENG, J.; ESQUENA, J.; TADROS, T. F.; DEDEREN, J. C.; GARCIA, M. J.; AZEMAR, N.; SOLANS, C. The influence of surfactant mixing ratio on nano-emulsion formation by the pit method. **Journal of Colloid and Interface Science**, 285, 388-394, 2005.

JAISWAL, M.; DUDHE, R.; SHARMA, P. K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. **Biotech**. Publicação online no site Springerlink.com em 08. 04. 2014. DOI 10.1007/s13205-014-0214-0.

JORGE, N. Química e tecnologia de óleos vegetais / Neuza Jorge.– São Paulo: **Cultura Acadêmica**: Universidade Estadual Paulista, 165p., 2009.

JUNIOR, E. da S.; JUNIOR, G. B. Z.; ZANELLA, I.; RAFFIN, R.; CIELO, V.; ROSSATO, J.; BULHÕES, L. O. S. Formação de nanoemulsões do tipo óleo em água contendo óleo de semente de romã. **Disciplinarum Scientia. Série: Ciências Naturais e Tecnológicas**, Santa Maria, 14, 1, 115-122, 2013.

KASZUBA, M.; CORBETT, J.; WATSON, F. M.; JONES, A. High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques. **Phil. Trans. R. Soc. A**, 368, 4439–4451, 2010.

KHALIL, S. M.; TAHA, K. M.; FARID, H. E-S.; ATIA, A. F. Antioxidant role of olive "*Olea europeavar picual*" leaves extract on profenofos induced oxidative stress in male rats. **International Journal of Advanced Research**, 2, 7, 635-650, 2014.

KHURANA, S.; JAIN, N. K.; BEDI, P. M. S. Nanoemulsionbased gel for transdermal delivery of meloxicam: Physico-chemical, mechanistic investigation. **Life Sciences**, 92, 383–392, 2013.

KLANG, V.; MATSKO, N. B.; VALENTA, C.; HOFER, F. Electron microscopy of nanoemulsions: An essential tool for characterization and stability assessment. **Micron**, 43, 85–103, 2012.

KLANG, V.; VALENTA, C.; MATSKO, N. B. Electron microscopy of pharmaceutical systems. **Micron**, 44, 45–74, 2013.

KOZŁOWSKA, M.; SZTERK, A.; ZAWADA, K.; ZABKOWSKI, T. New Opportunities of the Application of Natural Herb and Spice Extracts in Plant Oils: Application of Electron Paramagnetic Resonance in Examining the Oxidative Stability. **Journal of Food Science**, 77, 9, 2012.

KUNTSCHER, J.; HORSTB, J. C.; BUNJESB, H. Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) for studying the morphology of colloidal drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, 417, 120–137, 2011.

LEAL, L. B.; SOUSA, G. D.; SEIXAS, K. B.; SOUZA, P. H. N. de; SANTANA, D. P. de. Determination of the critical hydrophile-lipophile balance of licuri oil from *Syagrus coronata*: application for topical emulsions and evaluation of its hydrating function. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 49, 1, 2013.

LEITE, M. S.; ALBERTO, P. S.; DIONYSUS, F. P.; GUIMARÃES, F. S. *In vitro* cultivation of babassu embryos with different concentrations of sucrose and activated carbon. **Journal of Agricultural Technology**, 10, 3, 705-716, 2014.

LIANG, R.; XU, S.; SHOEMAKER, C. F.; LI, Y.; ZHONG, F.; HUANG, Q. Physical and Antimicrobial Properties of Peppermint Oil Nanoemulsions. **J. Agric. Food Chem.**, 60, 7548–7555, 2012.

LÓPEZ, J. A.; LÁZARO, C. da C.; CASTILHO, L. dos R.; FREIRE, D. M. G.; CASTRO, A. M. de. Characterization of multienzyme solutions produced by solid-state fermentation of babassu cake, for use in cold hydrolysis of raw biomass. **Biochemical Engineering Journal**, 77, 231– 239, 2013.

MACHADO, G. C.; CHAVES, J. B. P.; ANTONIASSI, R. Composição em ácidos graxos e caracterização física e química de óleos hidrogenados de coco babaçu. **Revista Ceres**, 53, 308, 463-470, 2006.

MARIUZZO, P. Nanotecnologias. Quebrando coco, rompendo paradigmas. **Revista Ciência & Cultura**, p. 60-62, julho de 2013.

MARTINS, N. L. P.; MALAFAIA, O.; RIBAS-FILHO, J. M.; HEIBEL, M.; BALDEZ, R. N.; VASCONCELOS, P. R. L. de.; MOREIRA, H.; MAZZA, M.; NASSIF, P. A. N.; WALLBACH, T. Z. Análise comparativa da cicatrização da pele com o uso intraperitoneal de extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (babaçu). Estudo controlado em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, 21, Suplemento 3, 2006.

MASMOUDI, H.; LE DRÉAU, Y.; PICCERELLE, P.; KISTER, J. The evaluation of cosmetic and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method: FTIR. **Int. J. of Pharm.**, 289, 1-2, 117-131, 2005.

MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: Terminology, difference, and similarities. **Soft Matter**, 8, 1719–1729, 2012a.

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

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

MIHINDUKULASURIYA, S.D.F.; LIM, L.T. Nanotechnology development in food packaging: A review. **Trends in Food Science & Technology**, 40, 149-167, 2014.

MISHRA, R. K.; SONI, G.C.; MISHRA, R. P. A review article: On nanoemulsion. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, 3, 9, 258-274, 2014.

NAIK, A.; MEDA, V.; LELE, S. S. Application of EPR Spectroscopy and DSC for Oxidative Stability Studies of *Nigella sativa* and *Lepidium sativum* Seed Oil. **J Am Oil Chem Soc.**, 91, 935–941, 2014.

NASIR, M. D. A. Nanotechnology and dermatology: Part I—potential of nanotechnology. **Clinics in Dermatology**, 28, 458–466, 2010.

NEETHIRAJAN, S.; JAYAS, D. S. Nanotechnology for the Food and Bioprocessing Industries. **Food Bioprocess Technol**, 4, 39–47, 2011.

OLIVEIRA, A. G de.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**, 27, 1, 131-138, 2004.

OLIVEIRA, G.L.S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH[•]: estudo de revisão. **Rev. Bras. Pl. Med.**, 17, 1, 36-44, 2015.

OLIVEIRA, L. R. de.; NEVES, J. A.; SILVA, M. de J. M. da. Avaliação da qualidade físico-química do óleo bruto da amêndoa de babaçu (*Orbignya spp*). **Comunicata Scientiae**, 4, 2, 161-167, 2013.

OMENA, C. M. B.; VALENTIM, I. B.; GUEDES, G. da S.; RABELO, L. A.; MANO, C. M.; BECHARA, E. J. H.; SAWAYA, A. C. H. F.; TREVISAN, M. T. S.; COSTA, J. G. da; FERREIRA, R. C. S.; SANT'ANA, A. E. G.; GOULART, M. O. F. Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities of ethanol extracts of peel, pulp and seeds of exotic Brazilian fruits Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities in fruits. **Food Research International**, 49, 334–344, 2012.

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Resveratrol May Protect Plasma Proteins from Oxidation under Conditions of Oxidative Stress In Vitro. **J. Braz. Chem. Soc.**, 21, 5, 909-913, 2010.

PATENTE DE INOVAÇÃO: MARIA OCHOMOGO; RITU GARG; EDITH RAMOS DA CONCEICAO NETA; YUMING YANG; LACHELLE ARNT; ADELMO MONSALVE-GONZALEZ, LAKEVILLE. Microemulsion concentrates and nanoemulsion flavorant compositions for food applications. **United States Patent Application Publication**. US 20130064954 A1, 2013.

PATENTE DE INOVAÇÃO: STANLEY, ROGER ANTHONY, MEHMOOD, ZAFFAR. Nanoemulsion compositions. **Standard Patent Application Australian Patent Office**. AU 2011213719 A1, 2011.

PEREIRA, G. G. Obtenção de nanoemulsões O/A à base de óleo de semente de uva e oliva aditivada de metoxicinamato de octila e estudo do potencial antioxidante e fotoprotetor das emulsões. Universidade de São Paulo. **Dissertação de mestrado**, 2008.

PESSOA, R. S.; FRANÇA, E. L.; RIBEIRO, E. B.; LANES, P. K. D.; CHAUD, N. G. A.; MORAES, L. C. A.; FRANÇA, A. C. H. Microemulsion of babassu oil as a natural product to improve human immune system function. **Drug Design Development and Therapy**, 9, 21-31, 2015.

PINHEIRO, M. M. G.; BOYLAN, F.; FERNANDES, P. D. Antinociceptive effect of the *Orbignya speciosa* Mart. (Babassu) leaves: Evidence for the involvement of apigenin. **Life Sciences**, 91, 293–300, 2012.

RAHAL, A.; KUMAR, A.; SINGH, V.; YADAV, B.; TIWARI, R.; CHAKRABORTY, S.; DHAMA, K. Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. **BioMed Research International**, 19, 2014.

RAO, J.; MCCLEMENTS, D. J. Lemon oil solubilization in mixed surfactant solutions: Rationalizing microemulsion & nanoemulsion formation. **Food Hydrocolloids**, 26, 268-276, 2012.

RAUDONIS, R.; RAUDONĖ, L.; GAIVELYTĖ, K.; VIŠKELIS, P.; JANULISA, V. Phenolic and antioxidant profiles of rowan (*Sorbus* L.) fruits. **Natural Product Research**, 1-12, 2014.

REGE, S.; MOMIN, S.; BHOWMICK, D. Effect of Ascorbic Acid on the Oxidative Stability of Water-In-Oil Emulsion in the Presence of Lipophilic Antioxidants. **International Journal of Food Properties**, 18, 259–265, 2015.

REGULAMENTO (CE) nº 258/97 do **Parlamento Europeu e do Conselho da União Europeia** de 27 de Janeiro de 1997, relativo a novos alimentos e ingredientes alimentares.

REIPERT, É. C. D.; RODRIGUES, C. E. C.; MEIRELLES, A. J. A. Phase equilibria study of systems composed of refined babassu oil, lauric acid, ethanol and water at 303.2 K, **J. Chem. Thermodynamics**, 43, 1784–1790, 2011.

RODRIGUES, E. da C. R.; FERREIRA, A. M.; VILHENA, J. C. E.; ALMEIDA, F. B. de.; CRUZ, R. A. S.; AMADO, J. R. R.; FLORENTINO, A. C.; CARVALHO, J. C. T.; FERNANDES, C. P. Development of Babassu Oil Based Nanoemulsions. **Latin American Journal of Pharmacy**, 34, 2, 338-343, 2015.

ROSSI, M.; CUBADDA, F.; DINI, L.; TERRANOVA, M.L.; AURELI, F.; SORBO, A.; PASSERI, D. Scientific basis of nanotechnology, implications for the food sector and future trends. **Trends in Food Science & Technology**, 40, 127-148, 2014.

RUFINO, M. do S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. de.; MORAIS, S. M. de.; SAMPAIO, C. de G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Comunicado Técnico 127, **EMBRAPA**, Fortaleza, CE, Julho, 2007.

SALVIA-TRUJILLO, L.; ROJAS-GRAÜ, A.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. Physicochemical characterization and antimicrobial activity of foodgrade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils. **Food Hydrocolloids**, 43, 547-556, 2015.

SANNA, D.; DELOGU, G.; MULAS, M.; SCHIRRA, M.; FADDA, A. Determination of Free Radical Scavenging Activity of Plant Extracts Through DPPH Assay: An EPR and UV–Vis Study. **Food Anal. Methods**, 1-8, October, 2011.

SANT'ANNA, L. da S.; ALENCAR, M. S. de M.; FERREIRA, A. P. Patenteamento em Nanotecnologia no Brasil: Desenvolvimento, potencialidades e reflexões para o meio ambiente e a saúde humana. **Química Nova**, 36, 2, 348-353, 2013.

SANTOS, A. B. dos S. Atividade antioxidante de extratos vegetais da flora brasileira: Estudo com Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) e Teoria do Funcional da Densidade (TFD). **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo – USP, 2006.

SANTOS, D. S. Extração e caracterização dos lipídeos da amêndoa do fruto da palmeira *Orbignya phalerata* (babaçu) das regiões: Litoral, Cocais, Baixada, Cerrado e Pré-Amazônia do Estado do Maranhão – Brasil. **Monografia (Graduação)**, Universidade Estadual do Maranhão, 2009.

SANTOS, D. S.; SILVA, I. G. da.; ARAÚJO, B. Q.; JÚNIOR, C. A. L.; MONÇÃO, N. B. N.; CITÓ, A. M. das G.L.; SOUZA, M. H. S. L. de.; NASCIMENTO, M. do D. S. B.; COSTA, M. C. P. Extraction and Evaluation of Fatty Acid Composition of *Orbignya phalerata* Martius Oils (Arecaceae) from Maranhão State, Brazil. **J. Braz. Chem. Soc.**, 24, 2, 355-362, 2013.

SARANYA, S.; CHANDRASEKARAN, N.; MUKHERJEE, A. Antibacterial activity of eucalyptus oil nanoemulsion against *Proteus mirabilis*. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, 4, 3, 2012.

SHAFIQ-UN-NABI, S.; SHAKEEL, F.; TALEGAONKAR, S.; ALI, J.; BABOOTA, S.; AHUJA, A.; KHAR, R. K.; ALI, M. Formulation Development and Optimization Using Nanoemulsion Technique: A Technical Note. **AAPS PharmSci Tech.**, 8, 2, 2007.

SHINODA, K.; SAITO, H. The Stability of O/W Type Emulsions as Functions of Temperature and the HLB of Emulsifiers: The Emulsification by PIT- method. **Journal of Colloid and Interface Science**, 30, 2, 258-263, 1969.

SILVA, H. D.; CERQUEIRA, M. Â.; VICENTE, A. A. Nanoemulsions for Food Applications: Development and Characterization. **Food Bioprocess Technol**, 5, 854–867, 2012.

SOLANS, C. ; IZQUIERDO, P.; NOLLA, J. ; AZEMAR, N.; GARCIA-CELMA, M. J. Nano-emulsions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, 10, 102-110, 2005.

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

SOLER, M. P.; MUTO, E. F.; ARMILIATO, L.; FUKUZAWA, R. M. Optimization of Shelling Technology for Babassu (*Orbignya speciosa*) Nuts. **Journal of Food Science and Engineering**, 3, 149-155, 2013.

SOUSA, C. M. de M.; SILVA, H. R. e; VIEIRA-JR., G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S. da; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. de M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, 30, 2, 351-355, 2007.

SOUSA, V. P. de; CREAN, J.; BORGES, V. R. de A.; RODRIGUES, C. R.; TAJBER, L.; BOYLAN, F.; CABRAL, L. M. Nanostructured systems containing babassu (*Orbignya speciosa*) oil as a potential alternative therapy for benign prostatic hyperplasia. **International Journal of Nanomedicine**, 8, 3129–3139, 2013.

SOUZA, M. H.S.L.; MONTEIRO, C. A.; FIGUEREDO, P. M. S.; NASCIMENTO, F. R. F.; GUERRA, R. N. M. Ethnopharmacological use of babassu (*Orbignya phalerata* Mart.) in communities of babassu nut breakers in Maranhão, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, 133, 1–5, 2011.

SUGUMAR, S.; GHOSH, V.; NIRMALA, M. J.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Ultrasonic emulsification of eucalyptus oil nanoemulsion: Antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and wound healing activity in Wistar rats. **Ultrasonics Sonochemistry**, 21, 1044–1049, 2014.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, n.108-109, p.303 -318, 2004.

TAMJIDI, F.; SHAHEDI, M.; VARSHOSAZ, J.; NASIRPOUR, A. Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 19, 29–43, 2013.

TANG, S. Y.; MANICKAM, S.; WEI, T. K.; NASHIRU, B. Formulation development and optimization of a novel Cremophore EL-based nanoemulsion using ultrasound cavitation. **Ultrasonics Sonochemistry**, 19, 330–345, 2012.

TEIXEIRA, F. de A. DPPH $C_{18}H_{12}N_5O_6$. Química Nova Interativa. Sociedade Brasileira de Química. On-line. Disponível em: http://qnint.sbq.org.br/qni/popup_visualizarMolecula.php?id=UFnlqMiUTFCLSVoSdU9qTQ4Ucmq1ngPI6HYOVVGRjmWVQSezXek-5CMtO2QrxstKaRdjzpBtG2tMMoYJJ3FwA. Acesso em 10 de maio de 2015.

TEIXEIRA, M. A. Babassu - A new approach for an ancient Brazilian biomass. **Biomass and Bioenergy**, 32, 857 – 864, 2008.

VIANNI, R.; BRAZ-FILHO, R. Ácidos graxos naturais: Importância e ocorrência em alimentos. **Química Nova**, 19, 4, 1996.

VIEIRA, A. P.; SANTANA, S. A. A.; BEZERRA, C. W. B.; SILVA, H. A. S.; CHAVES, J. A. P.; MELO, J. C. P.; FILHO, E. C. S.; AIROLDI, C. Removal of textile dyes from aqueous solution by babassu coconut epicarp (*Orbignya speciosa*). **Chemical Engineering Journal**, 173, 334-340, 2011.

VINHAL, J. O.; LIMA, C. F.; BARBOSA, L. C. A. Analytical pyrolysis of the kernel and oil of babassu palm (*Orbignya phalerata*). **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, 107, 73–81, 2014.

WASULE, D. D.; NAWANDAR, S. Y.; KAUR, H. Evaluation of Babassu oil as skin moisturizer. **World J Pharm Sci.**, 2, 6, 539-544, 2014.

WOOSTER, T.J.; GOLDING, M.; SANGUANSRI, P. Impact of Oil Type on Nanoemulsion Formation and Ostwald Ripening Stability. **Langmuir**, 24, 12758-12765, 2008.

ZETA-METER INC. Potencial Zeta: Un Curso Completo en 5 Minutos. La Interacción de los Coloides. Disponível em: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/PotencialZeta_1246.pdf acesso em: 03 de março de 2015.

ZHAO, P. EPR: Interpretation. Disponível em: http://chemwiki.ucdavis.edu/Physical_Chemistry/Spectroscopy/Magnetic_Resonance_Spectroscopies/Electron_Paramagnetic_Resonance/EPR%3A_Interpretation . Acesso em: 09 – 08- 2015.