



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Projeto de mestrado em Ciência dos Alimentos:

**Avaliação da citotoxicidade de nanopartículas de óleo de palma bruto com farinha
do albedo do maracujá como encapsulante**

Florianópolis, 2018

Título do projeto de mestrado: Avaliação da citotoxicidade de nanopartículas de óleo de palma bruto com farinha do albedo do maracujá como encapsulante.

1 Contextualização do problema a ser abordado

O óleo de palma bruto é o óleo mais produzido no mundo (FAOSTAT, 2016) e possui aplicabilidade comercial em diversas áreas (industrial, óleoquímica, medicinal, entre outras). 80% da sua produção é destinada ao setor de alimentos, onde é utilizado para frituras, produção de margarinas e gorduras (MPOB, 2007).

É composto majoritariamente por triacilglicerois (95%) e apresenta teores aproximadamente iguais de ácidos graxos saturados e insaturados. Além disso, possui altos teores de compostos bioativos, como os antioxidantes. Há destaque para os carotenoides (550 – 2500 mg/kg), especialmente o β – caroteno, e os tocoferóis e tocotrienóis (150 – 1500 mg/kg), sendo os γ – tocoferóis e γ – tocotrienóis os de maior quantidade (CODEX, 2013). Os carotenoides, além da ação antioxidante, são precursores de vitamina A (RODRIGUEZ-AMAYA e KIMURA, 2004).

Apesar do valor nutricional e funcional, os carotenoides são instáveis quando se trata de aplicação industrial, porque são muito propensos à isomerização e oxidação, que acarretam em diminuição da atividade precursora de vitamina A, possível perda da pigmentação e degradação (RODRIGUEZ-AMAYA et al, 2008).

Graças à instabilidade dos antioxidantes naturais, a indústria muitas vezes opta pela utilização de antioxidantes sintéticos, como o BHA, BHT e TBHQ. Contudo, existem estudos que relacionam efeito carcinogênico em experimentos com animais com a utilização destes compostos (BOTTERWECK et al., 2000). Uma das alternativas para diminuir a aplicação de antioxidantes sintéticos é a nanotecnologia.

A nanotecnologia estuda materiais na escala nanométrica ($< 1 \mu\text{m}$) (SCOTT & CHEN, 2012). Estes materiais nanométricos apresentam propriedades (químicas, comportamentais, físico-químicas) diferentes do que os mesmos materiais em maiores escalas. Isto ocorre porque à medida que se diminui um material até a escala nanométrica, ocorre um aumento da superfície em relação ao volume, aumentando a reatividade e modificando suas propriedades (NEETHIRAJAN; JAYAS, 2011).

Uma das aplicações da nanotecnologia é através da nanoencapsulação, como por exemplo o nanoencapsulamento de óleos. Este tem apresentado bons resultados relacionados à proteção contra degradação de compostos e substituição de compostos artificiais por naturais (MADENE et al., 2006). Uma das formas de nanoencapsulamento é através da formação de nanoemulsões. Para que estas sejam

estáveis, deve-se levar em conta o agente encapsulante (pertencente à fase externa da emulsão), o solvente orgânico, o material a ser encapsulado e um possível emulsificante para auxiliar na formação da nanoemulsão (LEGRAND et al., 2007).

Para o agente encapsulante, o material deve ter boa propriedade emulsificante, baixa higroscopicidade, baixo custo, alta disponibilidade e ser capaz de oferecer proteção ao material encapsulado. Os materiais de origem natural mais comumente utilizados são os polissacarídeos, gelatina, colágeno e albumina. A pectina também vem sendo bastante estudada (WAGONER; FOEGEDING, 2017).

Um material que possui potencial de uso como material de parede e que caracteriza uma prática sustentável é a farinha do albedo do maracujá. A industrialização do maracujá gera aproximadamente 58 mil toneladas de resíduo por ano (CTA 2008). Estes resíduos apresentam boas características para serem usados como material de parede, especialmente devido ao teor de pectina (10 – 20 %).

A produção de nanopartículas de óleo de palma bruto com farinha do albedo do maracujá como encapsulante já foi estudada por Barbosa (2018) obtendo boa preservação dos compostos desejados. Entretanto, não foi realizado estudo da toxicidade destas nanopartículas produzidas. Para evidenciar a problemática acerca da toxicidade das nanopartículas, apresentam-se possíveis efeitos na tabela 1.

Tabela 1 – Possíveis efeitos relacionados às nanopartículas

Efeito da nanopartícula	Possíveis consequências nocivas
Geração de espécies reativas de oxigênio	Danos em proteínas, DNA e membranas
Estresse oxidativo	Inflamação e distúrbio mitocondrial
Desnaturação e degradação de proteínas	Perda de atividade enzimática e auto-antigenicidade
Captura pelo tecido neuronal	Danos cerebrais e do sistema nervoso periférico
Danos ao DNA	Mutagênese, metaplasia, carcinogênese

Fonte: SILVA, A. 2011

A citotoxicidade é um estudo com culturas de células (humanas ou animais). Caracteriza um estudo rápido, reprodutível e sensível. Este teste consiste em colocar o possível agente tóxico em contato com uma cultura de células e verificar alterações celulares por diferentes mecanismos (ROGERO et al., 2003).

Não há muitos trabalhos direcionados à avaliação do risco da utilização de nanomateriais e seus possíveis efeitos na saúde, assim como ainda não se sabe como o corpo humano pode reagir a estes produtos (SILVA, A., 2011).

Sabe-se que a indústria de alimentos atualmente lida com o desafio de produzir, de maneira sustentável, alimentos que sejam práticos e saudáveis. Isto porque o

consumidor está cada vez mais preocupado com a saúde, meio ambiente e praticidade. A produção destas nanopartículas vai de acordo com os pilares de praticidade e sustentabilidade. Porém, para garantir a saudabilidade, é necessário o estudo nanotoxicológico a fim de viabilizar sua aplicação em matrizes alimentícias.

Dessa forma, o objetivo do estudo é produzir, caracterizar e avaliar a citotoxicidade de nanopartículas de óleo de palma bruto com farinha do albedo do maracujá como encapsulante, sendo este um estudo inédito e de grande importância para Ciência e Tecnologia de Alimentos.

2 Metodologia

2.1. Preparo e caracterização das nanopartículas

2.1.2. Preparo das nanopartículas

Será preparado uma fase orgânica (1) com etanol, emulsificante e óleo e uma fase aquosa (2) com o polímero e água destilada. A (1) é preparada e submetida à agitação magnética (vel. 3) por 15 minutos; Após, é gotejada sob a (2) com auxílio de agitador magnético. Em seguida, o solvente é removido através do equipamento rotaevaporador (CAMPO et al., 2017).

2.1.3. Diâmetro de partícula, índice de polidispersibilidade e potencial zeta

As amostras serão diluídas em água ultra pura (1/10 v/v) e os parâmetros serão obtidos através do equipamento ZetaSizer® Nano ZS (Malvern).

2.1.4. Cor, viscosidade e potencial zeta.

A determinação da cor será realizada em colorímetro com iluminante D65, ângulo de observação de 2° utilizando a escala CIELab, obtendo os valores de L*, a* e b*. A viscosidade será determinada em reômetro com velocidade de cisalhamento variando de 150 – 250 rpm. O pH será mensurado em pHmetro a 25°C.

2.1.5. Eficiência de encapsulamento

As nanoemulsões serão submetidas à centrifugação e o sobrenadante será retirado. É extraído o óleo por extração líquido-líquido com hexano. O óleo será analisado por espectrofotometria UV/VIS. A eficiência de encapsulação (EE%) será determinada pela diferença entre a quantidade total de óleo utilizada para o preparo da amostra e a quantidade total de óleo presente no sobrenadante (KHAYATA et al., 2012).

2.1.6. Carotenoides totais e atividade antioxidante (DPPH).

A quantificação de carotenoides será realizada através da extração do óleo das nanoemulsões com hexano e metanol, submissão à secagem em estufa a 35°C e leitura

em espectrofotômetro com a diluição dos extratos em éter de petróleo (YI et al., 2014). Para atividade antioxidante, as amostras serão dissolvidas em solução metanólica de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e após 30 minutos de incubação será realizada leitura da absorbância em 517 nm. A amostra controle contém apenas o DPPH e o resultado é expresso em percentual de inibição do radical (BRAND-WILLIAMS et al., 1995).

2.2. Avaliação da toxicidade das nanopartículas

2.2.1. Cultura e manutenção celular

As linhagens de células serão mantidas em frascos contendo Meio Mínimo Essencial (MEM) suplementado com soro fetal bovino (SFB) 10 % (v/v) e penicilina/estreptomicina 1% (v/v). As células serão incubadas a 37 °C, em atmosfera com umidade relativa de 95% e 5% de CO₂.

2.2.2. Ensaio de redução do sal de tetrazólio – MTT

A suspensão celular contendo a concentração de células será transferida para placa (150 µL) e pré-incubada durante 24h a 37 °C e 5% CO₂. As amostras, previamente solubilizadas serão diluídas em meio MEM e 50 µL desta solução será adicionado aos 150 µL do meio de cultura contendo as células na placa. Para o controle positivo será utilizada actinomicina D (0,4 µg/mL) e o diluente das amostras será o controle branco. Ao final da incubação, será adicionado em cada cavidade 50 µL de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5difeniltetrazólio] a 0.5mg/mL em PBS estéril. Após um período de incubação adicional de 2 h (37 °C, 5% CO₂) o volume de cada cavidade será aspirado. Serão adicionados 100 µL de DMSO e determinada a absorbância da solução a 595 nm. O percentual de inibição de crescimento celular será calculado a partir da comparação com o branco (MOSMANN, 1983).

2.2.3. Teste do corante vital azul de tripan

As amostras diluídas serão adicionadas em placas que serão incubadas por 24 h, a 37 °C, 5% CO₂ e, posteriormente, lavadas com PBS estéril. Será adicionado a elas solução azul de tripan, que após 5 minutos será removida e as células serão lavadas com PBS estéril e removidas por raspagem. Uma alíquota de 10µL da suspensão resultante será imediatamente transferida para câmara de Neubauer (L-OPTK) e as células serão contadas por meio de microscópio invertido. Os dados obtidos serão expressos como porcentagens do total de células viáveis para cada poço, calculadas em relação aos grupos controle não tratados (BARILE, 1994).

2.3. Análise estatística

Avaliadas por teste de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) através do Software STATISTICA 13.3 (StatSoft Inc., Tulsa, EUA).

3 Viabilidade econômica e cronograma de execução

O preparo e parte da caracterização das nanopartículas serão realizados no Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFSC nos Laboratórios de Óleos de Gorduras (preparo, pH, carotenoides totais, atividade antioxidante e eficiência de encapsulamento), Laboratório de Frutas e Hortaliças (cor), Laboratório de Reologia e Polímeros Naturais (viscosidade).

O diâmetro de partícula, potencial zeta e índice de polidispersibilidade serão realizados no Laboratório Interdisciplinar para o Desenvolvimento de Nanoestruturas do Departamento de Engenharia Química e de Alimentos da UFSC.

As análises de citotoxicidade serão realizadas no Laboratório de Virologia Aplicada do departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UFSC.

O óleo de palma será doação da AGROPALMA. O projeto contará com apoio financeiro da CNPQ através do processo já aprovado de nº 423478/2016-8.

Mês 01 a 03	Revisão de literatura.
Mês 03 a 09	Testes preliminares e aperfeiçoamento das metodologias.
Mês 06 a 12	Preparação da qualificação.
Mês 13 a 15	Preparação e caracterização das amostras.
Mês 16 a 18	Análise da citotoxicidade das amostras.
Mês 18 a 24	Preparação da dissertação.
Mês 18 a 24	Preparação de artigos.
Mês 01 a 24	Reuniões de grupo de pesquisa.
Mês 06 a 24	Participação em eventos científicos.

4 Referências

BARBOSA, Flávia de Oliveira. **Nanopartículas de óleo de palma bruto com farinha do albedo do maracujá como encapsulante**: Preparo, caracterização e influência de emulsificantes.. 2018. 73 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.

BARILE, F. A. Introduction to in Vitro Cytotoxicity, Mechanisms and Methods, **CBC Press**, Boca Raton, FL, 1994.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity., **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BOTTERWECK, A.A.M. et al. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands cohort study. **Food Chemistry and Toxicology**, v.38, n.7, p.599-605, 2000.

CAMPO, C; SANTOS, P.P; COSTA, H.M.T; PAESE, K; GUTERRES, S.S; RIOS, O.A; FLÔRES, H.S. Nanoencapsulation of chia seed oil with chia mucilage (*Salvia hispanica* L.) as wall material: Characterization and stability evaluation. **Food Chemistry**, v. 234, p.1-9, 2017.

CODEX STAN 210.CODEX ALIMENTARIUS (FAO/WHO) (2013).**Codex Standard for named vegetable oils**.Roma, 2013. Disponível: < <http://www.codexalimentarius.org/standards/>> Acesso em: 19 de Março de 2018.

CTA, Technical Centre for Agricultural and Rural Cooperation. **Opportunities in food processing: Setting up and running a small fruit or vegetable processing enterprise**. 2008. 212p.

FAOSTAT.Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistical Databases.Agricultural Data. 2014. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> >. Acesso em: 03 de Fevereiro de 2018.

KHAYATA, N.; ABDELWAHED, W.; CHEHNA, M. F.; CHAECOSSET, C.; FESSI, H. Preparation of vitamin E loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method: from laboratory scale to large scale using a membrane contactor. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 423, p. 419-427, 2012.

LEROUÉIL, P.R. et al. Nanoparticle interaction with biological membranes: does nanotechnology presente a Janus face? **AccountsofChemicalResearch**, v. 40, n.5, p. 335-342, 2007.

MADENE, A.; JACQUOT, M.; SCHER, J.; DESOBRY, S. Flavor encapsulation and controlled release – a review.**InternationalJournalofFood Science andTecnology**, v. 41, p. 1-21, 2006.

MALAYSIAN PALM OIL BOARD (MPOB)(2007). **Malaysian Palm Oil Statistic 2007 – World Oil & Fats**.Economics & Industry Development Division.Disponívelem: <http://econ.mpob.gov.my/economy/annual/stat2007/EID_statistics07.htm>. Acesso em 20 de Outubro de 2017.

MOSMANN, T. Rapidcolorimetricassay for cellulargrowthandsurvival. Applicationtoproliferationandcitotoxicityassays. *JournalofImmunologicalMethods*, v. 65, n. 1-2, p. 55 – 63, 1983.

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

OLIVEIRA, C.F., et al. Combined Effect of High-Pressure and Conventional Heating on Pectin Extraction from Passion Fruit Peel. *Food and Bioprocess Technology*, 9, 1021–1030.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; KIMURA, M. **HarvestPlushandbook for carotenoidanalysis**.Washington, DC e Cali: IFPRI e CIAT. HarvestPlus Technical Monograph, 2, 2004, 58p.

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

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

SCOTT, N. e CHEN, H. Nanoscale Science and engineering for agriculture and food systems.**Industrial Biotechnology**, 8: 340-343, 2012.

SILVA, A. H. **Estratégiasparaavaliação de sistemasnanoestruturados**. 2011. 138 p. Dissertação (MestradoemFarmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

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

Yi, J. et al. Cellular Uptake of β -carotene from protein stabilized solid lipid nanoparticles prepared by homogenization–evaporation method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p.1096-1104, 2014.