



ISSN 2317-3122



GRUPO VERDE DE AGROECOLOGIA E SEGURANÇA ALIMENTAR

A utilização dos nanocarreadores de princípios ativos para alimentos

THE USE OF NANOCARRIERS OF FOOD ACTIVE PRINCIPLES

João Paulo Natalino de Sá¹

Camila Lais Alves dos Santos²

Odilon Lucio de Sousa Neto³

Carla Heloisa Alencar de Figueiredo⁴

Hugo Sarmiento Gadelha⁵

Maria Carmem Batista de Alencar⁶

RESUMO

A nanociência e a nanotecnologia são áreas do conhecimento e inovação que vêm despertando interesse cada vez maior da comunidade científica, dos profissionais do setor industrial e da mídia. Diferentes nanocarreadores estão sendo desenvolvidos com diferentes composições, morfologias e propriedades de superfície, sendo reportado para a utilização na indústria de alimentos principalmente os lipossomas, as nanopartículas lipídica sólida, nanopartículas poliméricas e as nanoemulsões. Muitos compostos de grande impacto mercadológico na indústria de alimentos, como os aromas, corantes naturais e bioativos (carotenoides, flavonoides, curcumina, dentre outros), apresentam limitações para serem utilizados diretamente na área de alimentos. A utilização de nanocarreadores para vincular estes princípios, pode favorecer a proteção destas substâncias.

Palavras chaves: nanociencia, bioativos, nanopartículas

ABSTRACT

Nanoscience and nanotechnology are the areas of knowledge and innovation that open the interest of the scientific community, professionals in the industrial sector and the media. Different nanocarriers have been generated with different compositions, morphologies and surface properties and are reported for the use of a wide variety of liposomes, such as solid lipid nanoparticles, polymer nanoparticles and as nanoemulsions. Compounds of great market impact in the food industry, such as aromas, natural and bioactive dyes (carotenoids, flavonoids, curcumin, among others), which are activated to be used directly in the food area. The use of nanocarreadores to bind these principles, can favor the protection of the substances.

Keywords: nanoscience, bioactives, nanoparticles

* Autor para correspondência

Recebido para publicação em 10/11/2017; aprovado em 04/04/2018

¹ D. Sc. pela Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. E-mail: jpnadesa@gmail.com

² M. Sc. PPGSA/UFMG/CCTA/POMBAL – PB E-mail: camilalais_alves@hotmail.com

³ M. Sc. PPGSA/UFMG/CCTA/POMBAL – PB E-mail: odilon.lucio@hotmail.com

⁴ M. Sc. PPGSA/UFMG/CCTA/POMBAL – PB E-mail: carlaheloisaf@gmail.com

⁵ M. Sc. PPGSA/UFMG/CCTA/POMBAL – PB E-mail: hugoscurso@uol.com.br

⁶ M. Sc. PPGSA/UFMG/CCTA/POMBAL – PB E-mail: carmemsjp@hotmail.com

INTRODUÇÃO

A nanociência e a nanotecnologia são áreas do conhecimento e inovação que vêm despertando interesse cada vez maior da comunidade científica, dos profissionais do setor industrial e da mídia. Pode ser conceituada como um conjunto de técnicas utilizadas para manipulação de átomos e moléculas para a criação de novos materiais em escala nanométrica (10-9 m) (BRASIL, 2011).

Os nanocarreadores vem despertando o interesse nos últimos anos para a utilização na área de alimentos, como forma alternativa de nanocarrear principalmente compostos ativos de elevada hidrofobicidade, tais como, óleos essenciais, vitaminas, corantes, dentre outros, visando desta forma, potencializar a ação e disponibilidade destes compostos em diferentes matrizes alimentícias, principalmente, nas que apresentam elevada hidrofiliabilidade, além de possibilitar uma melhor proteção destes compostos ativos a reações indesejáveis no alimento, tal como o processo de oxidação.

Neste contexto, diferentes nanocarreadores estão sendo desenvolvidos com diferentes composições, morfologias e propriedades de superfície, sendo reportado para a utilização na indústria de alimentos principalmente os lipossomas, as nanopartículas lipídica sólida, nanopartículas poliméricas e as nanoemulsões, que serão descritas a seguir.

1) Lipossomas

Os lipossomas, também denominados de vesículas lipídicas, são nanoestruturas formadas por uma ou mais camadas concêntricas de lipídios. Essas estruturas destacam-se por sua capacidade em encapsular substâncias hidrofóbicas, hidrofílicas e anfifílicas (REINECCIUS, 1995; MOZAFARI et al., 2008).

Várias moléculas com características anfifílicas, incluindo, fosfolipídios naturais até compostos totalmente sintéticos, podem ser utilizados como elementos estruturais de base para os lipossomas (LASIC et al., 1991; CHORILLI et al., 2004; BRANDELLI, 2012).

Convencionalmente, os lipossomas são definidos de acordo com o seu tamanho e o fato da sua estrutura ser formada por uma única lamela ou por mais de uma. Lipossomas multilamelares (MLV - multilamelar vesicles), também chamados de oligolamelares (OLV - oligolamelar vesicles), possuem um diâmetro médio que varia geralmente de 400 nm a alguns micrômetros. Lipossomas unilamelares são definidos em dois grupos: lipossomas unilamelares grandes (LUV - large unilamelar vesicles) com diâmetros entre 80 nm e 1 µm e lipossomas unilamelares pequenos (SUV - small unilamelar vesicles) com diâmetros variando entre 20 e 80 nm. Também existem os lipossomas gigantes unilamelares (GUV - giant unilamelar vesicles) ou oligolamelares (GOV - giant oligolamelar vesicles) com diâmetros superiores a 1 µm, podendo chegar a dezenas de micrômetros (SANTOS; CASTANHO, 2002; MERTINS, 2004; BRANDELLI, 2012).

Dentre os diferentes métodos para síntese de lipossomas pesquisados para área de alimentos a homogeneização por alta pressão e o método por dispersão do

princípio ativo em um filme anfifílico com agitação mecânica, são os mais reportados na literatura.

Neste contexto, Gibis et al. (2016), sintetizaram pelo método de homogeneização por alta pressão, lipossomas com e sem revestimento de quitosana para nonacarrear polifenóis presente em extrato de semente de uva (GIBIS, et al., 2016). Para a obtenção de lipossomas na concentração de 1% (v/v), os autores utilizaram lecitina de soja, dissolvidos em solução tampão de acetato, sendo agitados overnight à temperatura ambiente.

Dentre os diferentes tipos de fosfolipídios os mais utilizados na área de alimentos para síntese de lipossomas é a lecitina (de origem animal ou vegetal). Esta molécula, como todo fosfolipídio, são estruturas anfifílicas, ou seja, formadas por uma ou duas longas cadeias apolares ligadas a uma extremidade polar (TAYLOR et al., 2005; GALLI, 2011).

O efeito hidrofóbico exercido nas cadeias apolares, quando estas entram em contato com água ou outro meio polar, é a força que direciona a estruturação das bicamadas de lipídios. As cadeias apolares interagem entre elas, enquanto que as extremidades polares fazem a interface com o meio polar. Esta agregação em bicamadas, portanto, constitui a configuração de menor energia livre. Apesar disso, lipossomas não estão em equilíbrio termodinâmico, devido à curvatura inerente à forma esférica, sendo os lipossomas caracterizados como estruturas “fechadas”, vesículas contínuas, composta principalmente de bicamada de fosfolipídio em um meio aquoso. Esta conformação de lipossomas, lhe confere uma estabilidade relativa, que irá depender da sua composição e do meio em que se encontram (LASIC et al., 1991; MERTINS, 2004).

Após completa dispersão da lecitina, Gibis et al. (2016), realizaram a encapsulação do extrato de semente de uva, que foi previamente dispersa em solução tampão de acetato e filtrada em filtros de celulose de 0,45 µ para remoção de possíveis partículas indesejáveis. Em seguida, a solução obtida foi submetida a homogeneizador de alta pressão de 22.500 PSI em 5 ciclos.

A homogeneização à alta pressão foi utilizada para promover a síntese de lipossomas, visto que sua formação não é um fenômeno espontâneo, necessitando de uma fonte de energia para promover a sua formação.

Na homogeneização à alta pressão uma dispersão de partículas é impulsionada com alta pressão (100-2000 bar) através de uma cavidade estreita (poucos micrômetros), e acelerada em uma curta distância, com alta velocidade (cerca de 100 km/h) ao encontro de uma barreira. A colisão com a barreira possibilita a formação de nanopartículas com reduzido diâmetro (BRANDI; BACHMAN; DRECHSLER, 1990; BARNADAS-RODRÍGUEZ; SABÉS, 2001; TAYLOR et al., 2005).

Durante o fornecimento de energia ao sistema ocorre formação de fragmentos de membranas, os quais apresentam uma parte hidrofóbica que fica exposta ao meio aquoso polar. Quando há transferência de um meio apolar para um meio aquoso, a entropia é desfavorável. Para “vencê-la”, fragmentos hidrofóbicos interagem a outros fragmentos hidrofóbicos. A entropia desfavorável da interação da parte hidrofóbica dos fragmentos é equivalente à energia desfavorável do empacotamento. Em virtude disso, os lipossomas apresentam uma superfície de pequeno raio de

curvatura. Quando a energia é equilibrada, há formação de lipossomas de menor tamanho possível (LASIC et al., 1991; CHORILLI et al., 2004; GALLI, 2011).

A utilização de lipossomas em alimentos possui alguns entraves, principalmente pela possibilidade de ocorrer a liberação indesejável do princípio ativo, principalmente, por ação de forças mecânicas que ocorrem durante o processamento de alimentos, que podem favorecer a ruptura da membrana lipossomal, resultando na perda de componente ativo (TAYLOR et al., 2005).

Visando minimizar este problema, Gibis et al. 2016, avaliaram o revestimento de lipossoma com quitosana para melhorar a estabilidade cinética do sistema, principalmente, pelo fato da quitosana ser um polissacarídeo catiônico, que pode favorecer a repulsão eletrostática, diminuído desta forma a agregação entre os lipossomas e consequentemente a perda da estabilidade.

Para o revestimento de lipossomas, Gibis et al., 2016, utilizaram uma solução de quitosana (1% v/v), que foi preparada em tampão de acetato, e após agitação magnética por um período overnight, 1 mL desta solução foi pipetada para um tubo de ensaio contendo 9 mL de solução lipossomal (preparada como descrito anteriormente), sendo posteriormente submetida a agitação por vórtex. Ambos os sistemas, lipossomas com extrato de uva sem e com revestimento de quitosana, foram armazenados à temperatura de 25 °C e na ausência de luz para caracterização físico-química, dentre estas, tamanho, potencial zeta e polidispersão do sistema (GIBIS et al., 2016).

De acordo com os dados obtidos, os autores reportaram que os lipossomas revestidos com quitosana apresentaram maior tamanho e potencial zeta em relação aos lipossomas sem revestimento. A eficácia de aprisionamento para o sistema sem e com revestimento foi de $88,2 \pm 4,7\%$ e $99,5 \pm 2,3\%$, respectivamente. A taxa de liberação de polifenóis após 24 h em lipossomas não revestidos foi de 0,55 e de lipossomas revestidos foi de 0,24 (GIBIS; RUEDT; WEISS, 2016).

Este estudo indica que a liberação de compostos bioativos a partir de lipossomas revestidos com quitosana pode favorecer a liberação mais controlada de polifenóis em alimentos à base de água, que poderá ser benéfico para a indústria de alimentos, uma vez que a difusão de componentes bioativo pode ser melhor controlada, possibilitando a minimização da deterioração do produto por agentes oxidantes.

De forma geral, a encapsulação e a retenção de substâncias ativas incorporadas em lipossomas dependem essencialmente da natureza e da concentração do fosfolípido e da substância ativa, da carga elétrica dos lipídios, força iônica do meio, presença e concentração de colesterol, tamanho da estrutura e condições de obtenção dos lipossomas (BRANDI; BACHMAN; DRECHSLER, 1990; GRIGORIEV; MILLER, 2009; LU; LI; JIANG, 2011).

Dentre os diferentes métodos supracitados para síntese de lipossomas, o mais utilizado na encapsulação de peptídeos antimicrobianos é o de hidratação do filme fosfolipídico (WERE et al., 2003; TAYLOR et al., 2005; BRANDELLI, 2012).

Silva (2013) avaliou o desenvolvimento de lipossomas para carrear nisina, visando maximizar sua ação

antimicrobiana sob *Listeria monocytogenes*. Foram testados lipossomas de nisina com e sem a incorporação de quitosana e de sulfato de condroitina.

Para síntese do lipossomo, foi utilizado o método de hidratação do filme fosfolipídico, onde a fosfatidilcolina (substância base para a formação de lipossomas) foi solubilizada em clorofórmio. A evaporação para obtenção do filme de lipídio (fosfatidilcolina) foi realizada com a utilização de rotaevaporador, e o balão contendo o filme foi armazenado overnight em um dessecador (SILVA, 2013).

Para a diluição do filme e formação dos lipossomas, primeiramente a solução do peptídeo antimicrobiano (nisina) foi aquecida a 60°C por 1 min. sendo em seguida adicionada ao balão, o qual foi tampado e agitado vigorosamente, sendo posteriormente aquecido por 2 min, seguido por repouso (SILVA, 2013).

O aquecimento do sistema a 60 °C, ocorre para favorecer a temperatura de transição de fase (T_c), na qual a membrana da fosfatidilcolina passa de uma fase gel ou rígida (onde a cadeia hidrocarbonada do lipídio está em estado ordenado com movimentos restritos e com conformação trans), para uma fase de cristal-líquido ou —fluidal, onde as moléculas ficam com grande liberdade de movimento e os radicais hidrofílicos agrupados tornam-se completamente hidratados (FRÉZARD et al., 2005; LAPENDA, 2010). A agitação foi realizada para favorecer a hidratação do filme e proporcionar a formação de lipossomas.

Em seguida, a solução lipossomal obtida por Silva (2013) foi incorporação da quitosana ou de sulfato de condroitina, onde adicionou-se 400 µL de cada polissacarídeo, ambos numa concentração de 1 mg. mL⁻¹, deixando em agitação por 30 min.

Do ponto de vista químico, os fosfolípidos estruturais dos lipossomas podem sofrer degradação através de hidrólise enzimática ou de oxidação.

A oxidação dos fosfolípidos acontece preferencialmente com os fosfolípidos poliinsaturados, como é o caso da fosfatidilcolina. Essa oxidação ocorre principalmente pela formação de radicais livres, iniciada pela incidência de luz na presença de oxigênio (LASIC et al., 1991; GALLI, 2011). Assim, a presença de oxigênio, luz ou temperatura elevada são fatores que podem intensificar o processo de decomposição. Para minimizar este inconveniente na fosfatidilcolina, Silva (2013), utilizou para esta finalidade, a adsorção de quitosana ou de sulfato de condroitina para recobrir os lipossomas

A quitosana é obtida pela desacetilação, parcial ou total, da quitina, originando um polímero aminosubstituído solúvel em soluções aquosas ácidas. Como a quitosana forma um sal nessas soluções, produzindo cadeias de polieletrólitos com cargas positivas nos átomos de nitrogênio dos grupos amino, suas interações com as regiões polares dos lipossomas são favorecidas, levando à sua deposição sobre os mesmos (DUTTA; DUTA; TRIPATHI, 2004; SILVA, 2013).

O sulfato de condroitina é um polieletrólito aniônico composto por unidades alternadas de ácido glucorônico e N-acetil-galactosamina e é sulfatado na posição 4 - ou 6- do resíduo N-acetil-galactosamina, desta forma, sua utilização visou avaliar a ação de um ânion adsorvidos ao lipossoma e sua estabilidade para a nanoestrutura. A presença de carga no lipossoma pode influenciar a taxa de incorporação de

Os principais microorganismos causadores da mastite bovina e suas consequências na cadeia produtiva do leite

substâncias, impedir a agregação/fusão das vesículas lipídicas por repulsão eletrostática (SILVA, 2013).

Visando minimizar a heterogeneidade dos lipossomas provenientes pela técnica de homogeneização por alta pressão, foi realizada, após a obtenção da solução lipossomal, a utilização de um sonificador de ponta, com 5 repetições de um 1 minuto a uma potência de 50% (SILVA, 2013).

Na pesquisa realizada por Silva 2013, as análises físico-químicas, tais como distribuição de tamanho e potencial zeta indicaram que os lipossomas de com nisina sem revestimento obtiveram 172,4 nm de tamanho, com polidispersão e potencial zeta de 0,201 e - 19, 98 mV, respectivamente. Os lipossomas com incorporação de quitosana apresentaram tamanho, polidispersão e potencial zeta de 257 nm, 0,403 e - 17, 60 mV, respectivamente. Os lipossomas revestidos com sulfato de condroitina, apresentara 345 nm; 0,589 e - 26, 98 mV, referentes a tamanho, polidispersão e potencial zeta, respectivamente. Todas as formulações lipossomal apresentaram a mesma eficiência que a nisina livre na inibição da *L. monocytogenes* 4b e da *Listeria* sp. e uma maior eficiência na inibição da *L. monocytogenes* 4b ATCC 6477, porém os mesmos não foram capazes de inibir a multiplicação da *Listeria* sp. e *L. innocua* (SILVA, 2013).

Silva (2013) relata, que apesar dos lipossomas de nisina com incorporação de quitosana apresentarem uma eficiência de encapsulações mais baixa, em torno de 10%, estes tiveram maior estabilidade e eficiência na inibição da *L. monocytogenes* ATCC 7644, quando comparados aos lipossomas de nisina com e sem incorporação de sulfato de condroitina, sendo que no tempo final (24h) a redução obtida foi de 2 log UFC/ g, comparando-se com os demais tratamentos e de 7 log comparando-se ao controle sem nisina.

Pelos resultados reportados, é possível inferir que a incorporação de peptídeos antimicrobianos em nanoestruturas de lipossomas mostra-se uma opção viável para a liberação controlada de bacteriocina, possibilitando o aumento da vida útil de produtos alimentícios, necessitando, porém, maior aprofundamento do método e formulação utilizada para possibilitar uma nanoestrutura com menor polidispersão e melhor eficiência do nanocarreador na ação antimicrobiana. Importante ressaltar, que os lipossomas como nanoestruturas utilizadas para o carregamento de diferentes princípios ativos em alimentos, possui como diferencial em relação a outros nanocarreadores, a possibilidade de carrear tanto ativos hidrofóbicos como hidrofílicos (presentes nos meios de hidratação), peculiaridade atribuída, principalmente, a sua estrutura formada por bicamadas concêntricas, separadas por fases aquosas e englobando um compartimento aquoso interno.

2) Nanopartículas lipídicas solidas

Entre os diferentes nanosistema utilizados para alimentos, destaca-se as Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS), visando encapsular, proteger e distribuir componentes lipofílicos funcionais, tais como lipídios bioativos e drogas de caráter hidrofóbicos.(BEY-OULD SI SAID et al., 2016). As NLS têm a estrutura que se assemelha as emulsões. A diferença está no núcleo, pois é formado por lipídeos sólidos à temperatura ambiente e não por fase oleosa líquida como nas emulsões (MÜLLER et al, 2002 SANTOS, 2010).

Diferentes métodos foram desenvolvidos para preparação das NLS, principalmente para fins farmacêuticos, dentre estes destacam-se: (i) homogeneização por alta pressão; (ii) emulsificação- evaporação do solvente, (iii) microemulsões e (iv) microfluidização (MÄDER, MEHNERT, 2001; JAFARI et al, 2006; SOUTO et al., 2007; PARHI, SURESH, 2010) .

A vantagem da primeira técnica é que ela não se utiliza de solventes orgânicos, o que a torna especialmente atraente para a indústria de alimentos, além do fato de o principal equipamento que ela requer – homogeneizador a alta pressão - ser de uso corrente neste segmento industrial (MÄDER, MEHNERT, 2001; PARHI, SURESH, 2010).

Ramalingam et al., 2016 sintetizaram NLS para nanocarrear curcumina visando maximizar a aplicação deste bioativo em alimentos, sendo as NLS armazenadas em duas temperaturas ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) e ($4 \pm 2^\circ\text{C}$), e analisadas após um período de 0, 1 e 3 meses em relação aos parâmetros de tamanho partículas e potencial zeta das partículas. Nesta pesquisa, os lipossomas foram sintetizados pelos métodos de homogeneizador de alta pressão e ultrassonicação.

Para a fase lipídica, foi utilizado Smoothex DST (polifosfato de amônio, para minimizar a oxidação de lipídios), Rikemal PS-100 (monoestearato de propilenoglicol) e ácido palmítico (RAMALINGAM et al., 2016).

O monoestearato de propilenoglicol usado como surfactante não-iônico, favorece a estabilidade da emulsão lipídica. O ácido palmítico, base lipídica para NLS, é um lipídio que encontra-se sólido a 25°C , sendo sua utilização em substituição a lipídios líquidos, uma alternativa para aumentar o controle sobre a cinética de liberação de compostos encapsulados, além de melhorar a estabilidade de ingredientes lipofílicos “sensíveis” quimicamente (HELGASON et al., 2009; LET, ZAVAREZE, 2012).

Estes componentes foram homogeneizados entre $5-10^\circ\text{C}$ acima do ponto de fusão da fase lipídica (RAMALINGAM et al., 2016). A homogeneização em uma temperatura acima da temperatura de fusão dos lipídios, tem como finalidade produzir uma fina dispersão de uma emulsão de óleo em água (HELGASON et al., 2009).

Posteriormente, Ramalingam et al. (2016), realizaram a dispersão da curcumina (bioativo) na fase lipídica a quente. Em seguida uma solução aquosa pré-aquecida contendo Tween 80 (surfactante não iônico) foi adicionada à solução lipídica para formação de um pré emulsão, e posteriormente, a formulação foi submetida a homogeneização por alta pressão (11000 rpm) durante 5 minutos, e submetida a ultrassonificação por 5 min.

Quando um líquido é submetido ao processo de ultrassonicação com alta intensidade, as ondas se propagam no meio líquido, ocorrendo uma alternância de ondas de alta e baixa pressão geradas pelo ultrassom. Na fase de baixa pressão e alta intensidade, as onda criam bolhas de vácuo, aumentando de diâmetro até que não conseguem mais absorver energia, e ao atingir a fase de alta pressão, elas são comprimidas até implodirem (HIELSHER, 2005; LET; ZAVAREZE, 2012).

Após a ultrassonificação, a solução lipídica foi submetida a refrigeração por 4°C (RAMALINGAM et al., 2016). O resfriamento a uma temperatura abaixo da temperatura ambiente é utilizado para ocasionar a cristalização do lipídio e formação das NLS. Este método é utilizado principalmente para o encapsulamento de ativos

lipofílicos, isto porque, no caso de ativos hidrofílicos, este migra para a fase aquosa durante a homogeneização resultando em uma baixa eficiência de encapsulamento (TEERANACHAIDEEKUL et al., 2008; ATTAMA, MÜLLER-GOYMANN, 2008).

Para o revestimento com quitosana, as NLS carreando curcumina (NLS -c), Ramalingam et al., 2016, realizaram o processo de adsorção física, onde volumes iguais de NLS-c carregadas negativamente e quitosana (dissolvido em 0,01% de ácido acético) (50: 1 w/w) foram dispersas e a solução resultante agitada durante 15 min. O NLS-C revestidas com quitosana, foram armazenadas em temperatura de refrigeração para caracterização.

Os resultados obtidos demonstraram que o tamanho médio das partículas e os valores de potencial zeta de NLS-c revestidas com quitosana, obtiveram maior tamanho de partícula ($739,26 \pm 53,12$ nm) e potencial zeta positivo $18,33 \pm 1,03$ mV, em comparação com NLS-c sem revestimento, ($451,80 \pm 19,62$ nm e $-26,33 \pm 1,92$ mV). Esta modificação de superfície demonstra que o revestimento com quitosana foi capaz de modificar a superfície da NLS-c, a mudança do valor do potencial zeta do nanocarreador sem revestimento de $-26,33 \pm 1,92$ mV para $18,33 \pm 1,03$ indicada a adsorção da quitosana na NLP-c (RAMALINGAM et al., 2016).

Apesar de não fazer parte central da questão deste exame de qualificação, é interessante ressaltar, que os autores também avaliaram a biodisponibilidade de NLS-c com e sem revestimento, além de curcumina no estado livre (dispersa em surfactante), em ratos, verificando que que NLS-c revestidas com quitosana apresentaram maior disponibilidade, demonstrando desta forma, que o revestimento com quitosana em NLS-c além de favorecer a melhor estabilidade cinética do sistema (repulsão eletrostática), favorecem a biodisponibilidade, por resistirem a “possíveis” obstáculos quando ingeridas via oral, demonstrando que NLS-c revestida, podem contribuir para maximizar sua aplicação em alimentos.

Em comparação com nanoemulsões e aos lipossomas, NLS tem algumas vantagens distintas, que incluem: alta eficiência de encapsulamento, não utilizam solventes orgânicos; possibilidade de produção em larga escala, flexibilidade em controlar e na liberação de compostos encapsulados devido à matriz sólida; taxa de degradação mais lenta e de liberação prolongada do composto bioativo, (MÄDER, MEHNERT, 2001; HELGASON et al., 2009; MARIA et al., 2015).

3) Nanopartículas poliméricas

O termo nanopartícula inclui as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural. As nanocápsulas são constituídas por um envoltório polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, ou seja, há diferenciação de núcleo. Por outro lado, as nanoesferas, que não apresentam óleo em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica, onde a diferenciação de núcleo não é observada, constituída por uma matriz mais homogênea (SCHAFFAZICK et al., 2003; FARIDI ESFANJANI, JAFARI, 2016).

As nanopartículas poliméricas podem ser sintetizadas a partir de polímeros sintéticos como poliácridatos e policaprolactona (PCL) ou polímero naturais como gelatina e quitosana (PANYAM, LABHASETWAR, 2003). Vários métodos de preparação são encontrados na literatura. Esses métodos podem ser classificados em duas principais categorias: (1) as que requerem uma reação de polimerização ou (2) as que utilizam diretamente uma macromolécula, ou um polímero pré-formado (FESSI et al., 1989; MOSQUEIRA et al., 2000; FARIDI ESFANJANI; JAFARI, 2016; PANYAM; LABHASETWAR, 2003).

A dispersão de polímero pré-formado é mais facilmente controlável, de maior rendimento quando comparado com outros métodos de produção de nanopartículas poliméricas a partir da polimerização de monômeros. É um método particularmente adaptados para incorporar princípios ativos lipofílicos (SEVERINO et al., 2011).

O método de polímero pré-formado pode ser preparado por quatro métodos: emulsificação-evaporação do solvente (KREUTER, 2012; WANG et al., 2010), por deslocamento do solvente ou nanoprecipitação (TAHARA et al., 2010), por saltingout (WHEATLEY et al., 2010) ou por emulsificação-difusão do solvente (OZTURK et al., 2010; SOUTO; SEVERINO, SANTANA, 2012). Os métodos de nanoprecipitação tem sido mais reportado na literatura para área de alimentos. Yegin et al., 2015 sintetizaram e caracterizaram nanopartículas poliméricas para nanocarrear óleo essencial de geraniol, visando avaliar sua ação antimicrobiana sob a superfície de folhas de espinafres, em bactérias patogênicas que podem ser veiculadas por alimentos (*Escherichia coli* O157: H7 e *Salmonella enterica* Typhimurium) (YEGIN et al., 2015).

Para síntese das nanopartículas poliméricas carregadas com geraniol (NP-g), os autores utilizaram o método de nanoprecipitação, onde o geraniol foi disperso em copolímero tribloco PF127 (molécula anfifílica), sendo solubilizados em tetrahidrofurano (solvente miscível em água). Esta etapa visou a dissolução do copolímero, que foi utilizado como revestimento da nanoestrutura com o composto bioativo, sendo a solução obtida mantida sob agitação magnética para promover a homogeneidade do sistema (YEGIN et al., 2015).

O copolímero tribloco são moléculas obtidas pela junção de três segmentos poliméricos, sendo a parte central diferente dos dois segmentos externos, estes últimos iguais entre si. Comumente são utilizados óxido de etileno nas pontas (EO) e óxido de polipropileno nas extremidades (PO). (FESSI et al., 1989; SOUTO et al., 2012) O copolímero tribloco PF127 é uma estrutura que possui óxido de polipropileno nas extremidades, que em solução aquosa, forma micelas, “aprisionando” em seu interior o composto lipídico, neste caso, o óleo essencial de geraniol. Importante ressaltar, que a utilização de copolímeros anfifílicos podem substituir os tensoativos, pois já tendem a formar espontaneamente estruturas micelares (FESSI et al., 1989; SOUTO et al., 2012).

Posteriormente, Yegin et al., 2016, submetem a solução orgânica obtida sob uma solução aquosa (água-Miliq) em agitação magnética à temperatura ambiente por cerca de 10 min. As nanopartículas foram formadas pela difusão espontânea do solvente na fase aquosa do polímero, insolúvel

Os principais microorganismos causadores da mastite bovina e suas consequências na cadeia produtiva do leite

na mistura de água e solvente, precipitando para formar nanopartículas, enquanto ocorre o encapsulamento do composto ativo. Em seguida, os autores realizaram a remoção do solvente por evaporação por 7 h. As NP-g foram caracterizadas, dentre outras análises, por tamanho de partícula (DLS - Zetasizer ZS90), polidispersão e microscopia eletrônica de transmissão (YEGIN et al., 2015).

De acordo com os resultados relatados por Yegin et al., 2016, o diâmetro médio das partículas foram de 412 nm (para a proporção de polímero e ativo de 1:1). As estruturas da NP-g apresentaram-se esféricas pela técnica de microscopia eletrônica de transmissão (resultante principalmente da presença de copolímero tribloco que em solução aquosa, origina uma estrutura micelar).

Além disso, de acordo com a técnica utilizada pelos autores, pode-se inferir, que as NP-g originaram estruturas de nanocápsulas, pois foram formadas quando o princípio ativo foi previamente dissolvido na fase lipídica, o qual é emulsificado na solução orgânica polimérica antes de ser veiculado à fase externa (MARTINS et al., 2010).

A polidispersão da NP-g foi de aproximadamente 0,19, demonstrando uma dispersão homogênea no sistema pesquisado, que tende a favorecer a estabilidade cinética (YEGIN et al., 2015).

As análises microbiológicas (não relatadas nesta avaliação de qualificação), demonstraram que a utilização de NP-g por imersão nas superfícies de folhas de espinafre, foi capaz de reduzir a população de *E. coli* O157: H7 e *S. enterica* Typhimurium em $3,2 \pm 1,7$ e $4,2 \pm 1,2$ log UFC / cm², respectivamente. Em pré- teste, pela análise da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB), foi evidenciado que o geraniol nanocarreado em nanopartículas poliméricas, obtiveram melhores resultados em concentrações menores em relação a geraniol na forma livre, demonstrando que este óleo essencial nanocarreado por nanopartículas poliméricas, pode ser uma alternativa viável para a descontaminação pós-colheita de produtos in natura de origem vegetal (YEGIN et al., 2015).

Apesar de nanopartículas poliméricas já serem utilizadas a décadas para carreamento de fármacos, e serem obtidas por diferentes métodos, sua utilização na área de alimentos é considerada recente, sendo obtidas, principalmente, pelo método supracitado, que tem demonstrado menores interação com macromoléculas dos diferentes componentes da matriz alimentícia.

4) Nanoemulsão

Nanoemulsões são dispersões de dois líquidos imiscíveis estabilizados por meio de um sistema de surfactante ou de surfactante. A sua estabilidade física pode ser substancialmente melhorada por seleção de emulsionantes adequados que são capazes de "rodear" as gotículas dispersas de forma a reduzir a tensão interfacial ou aumentar a repulsão gota-gota (TADROS et al., 2004; SOLANS et al., 2005).

Dentre as diferentes nanoestruturas, as nanoemulsões, tem demonstrando um elevado potencial para serem utilizados na área de alimentos, em relação as emulsões convencionais, por apresentarem maior estabilidade frente a separação gravitacional e agregação das gotículas, além de maior biodisponibilidade dos compostos encapsulados (PINHEIRO et al., 2016).

De forma geral, as nanoemulsões apresentam aspecto macroscópico leitoso a translúcido, baixa viscosidade, e com moléculas do princípio ativo preferencialmente dissolvidas no núcleo oleoso da nanoestrutura (DONSÍ et al., 2012; DIAS et al., 2014).

A síntese de nanoemulsões pode ser dividido em métodos de alta e de baixa energia. Os métodos que empregam alta energia incluem a homogeneização por alta pressão, sonicação e microfluidização, os quais requerem equipamentos específicos. Os métodos que empregam baixa energia, utilizando a energia química armazenada nos componentes são, por exemplo, a emulsificação espontânea e o método da temperatura de inversão de fases (PIT, do inglês phase inversion temperature)(SOLANS et al., 2005; MCCLEMENTS; XIAO, 2014).

Os métodos que utilizam alta energia muitas vezes são extremamente dispendiosos para aplicações industriais, especialmente quando se deseja um tamanho médio de gota muito pequeno (20 - 100nm). Por sua vez, os métodos de baixa energia requerem baixo consumo de energia para a produção das nanoemulsões e dependem principalmente das propriedades físico-químicas intrínsecas do tensoativo e da fase oleosa (TADROS et al., 2004; MCCLEMENTS, RAO, 2011).

A partir do método de baixa energia, Bovi (2015), sintetizou nanoemulsão para carrear óleo de buriti (*Mauritia flexuosa* L.), substância de origem vegetal rica em tocoferóis, carotenoides e em ácidos graxos (cerca de 73% a 78% do óleo de buriti é composto de ácido oleico, conhecido pela sua propriedade de redução do nível de colesterol no sangue), visando sua incorporação em bebida isotônica, favorecendo desta forma sua biodisponibilidade, além de agregar valor nutricional para a bebida (BOVI, 2015).

A síntese de nanoemulsões pelo método de inversão de fase (phase inversion temperature, ou método PIT), por se tratar de um método de baixa energia, permite que o princípio ativo (óleo de buriti) seja utilizado também, como corante natural em produtos alimentícios de base aquosa. O método PIT, favorece a produção de nanoemulsões com aspecto translúcido. Tal transparência óptica se mostra extremamente vantajosa quando se deseja aplicar em produtos translúcidos, como é o caso de bebidas isotônicas, além de minimizar possíveis perdas do composto ativo termolábeis, caso fosse utilizado um método de alta energia. (BOVI, 2015).

Antes de realizar a formulação final, foi determinado a temperatura de inversão de fases, para definir a temperatura em que o polisorbato 80 (surfactante não iônico) utilizado na formulação, alteraria sua afinidade dominante da fase aquosa para a fase oleosa, produzindo uma mudança no tipo de emulsão. A princípio, a inversão de fase foi observada visivelmente, através da mudança na viscosidade e transparência do sistema. Em seguida, através da utilização de um condutivímetro, foi utilizado para constatar esta alteração, sendo construídas curvas de condutividade vs. temperatura em diferentes concentrações de NaCl (2,5 M, 3 M, 3,5 M e 4 M). A temperatura de inversão de fases (TPIT) foi determinada pela média entre a temperatura de início do decaimento da condutividade e a temperatura mínima atingida pelo sistema após a inversão de fases (BOVI, 2015).

Para a fase oleosa do nanossistema, Bovi (2015), utilizou o próprio princípio ativo (óleo de buriti), além de polisorbato 80 como agente surfactante e cloreto de sódio. Para a avaliação da estabilidade físico-química das

nanoemulsões foram realizadas análises de determinação do diâmetro médio hidrodinâmico, distribuição de tamanho de gota, quantificação de carotenoides totais e avaliação da oxidação lipídica, por um período de armazenamento de 60 dias (BOVI, 2015).

Para produção das nanoemulsões, foi realizado primeiramente o aquecimento dos componentes da formulação (água, tensoativos, sal e óleo de buriti) em banho-maria até 80 °C, sendo misturados sob agitação mecânica a 300 rpm (BOVI, 2015).

Como resultado do aquecimento, a solubilidade do polisorbato 80 (tensoativos não-iônicos polietoxilados) se altera progressivamente, pois os grupos etoxilados gradualmente se desidratam com o aquecimento, tornando o tensoativo gradualmente mais hidrofóbico. Acima da temperatura de inversão de fase (TPIT) o tensoativo é inteiramente solubilizado em óleo e, assim, a mistura sofre uma inversão de fase, de uma emulsão óleo em água (O/A) para uma emulsão de água em óleo (A/O) (ANTON et al., 2007).

Importante ressaltar, que o uso de NaCl na formulação, teve como objetivo melhorar a estabilidade da nanoemulsão. O aumento desta estabilidade, pode ser devido a capacidade do sal de auxiliar no processo de desidratação do polisorbato 80 (ANTON et al., 2007). Conforme já foi mencionado, para produção de nanoemulsões pelo método PIT ocorre uma etapa de aquecimento, resultando na solubilidade do tensoativo, que se altera progressivamente, uma vez que os grupos etoxilados gradualmente se desidratam tornando o tensoativo gradualmente mais hidrofóbico. Acredita-se que a adição de sal atue justamente nesta etapa da produção das nanoemulsões (BOVI 2015).

A seguir, Bovi (2015), submeteu a amostra a um rápido resfriamento por agitação magnética, utilizando-se uma camisa de resfriamento alimentada com água a 0 °C, até que a temperatura da solução obtida alcançasse a temperatura de 20 °C. Durante o resfriamento, o tensoativo se reidrata e se torna novamente hidrofílico induzindo uma migração rápida e espontânea para fase aquosa, originando as nanoemulsões (ANTON et al., 2007).

Após obtenção da nanoemulsão, o sistema foi armazenado em temperatura de 4 °C, para avaliação da estabilidade físico-química das nanoemulsões por análises de determinação do diâmetro médio hidrodinâmico e distribuição de tamanho de gota (Zeta Plus) (BOVI, 2015).

De acordo com os resultados reportados, as nanoemulsões apresentaram estabilidade durante 60 dias em refrigeração. As nanoemulsões produzidas, tanto com 2,5 M de NaCl quanto com 3 M de NaCl, apresentaram distribuições bimodais. Para as nanoemulsões contendo 2,5 M de NaCl a primeira população concentrou-se por volta de 30 a 40 nm e a segunda, em torno de 160 nm. Já para as nanoemulsões contendo 3 M de NaCl a primeira população oscilou entre 20 a 50 nm e a segunda, em torno de 80 nm (BOVI, 2015).

Apesar de não descrito nesta avaliação de qualificação, a metodologia e as análises da incorporação da nanoemulsão veiculando o princípio ativo na bebida isotônica, por não ser a parte central da questão de qualificação, Bovi (2015), verificou que é possível a incorporação das nanoemulsões sem que haja separação de fases neste sistema. Por meio da realização de análise

sensorial, observou-se que para uma primeira tentativa de incorporação de nanoemulsões em bebida isotônica os resultados se mostraram relativamente satisfatórios.

Os resultados desta pesquisa predizem, que a substituição de compostos sintéticos (corantes e aromatizantes), por compostos naturais nanocarreados por nanoemulsões, pode ser uma alternativa viável, minimizando o uso de corantes artificiais e agregando valor nutricional à bebida, o que poderá, com devidas modificações da formulação, ser utilizado em outras matrizes alimentícias.

Dentre os métodos de síntese de nanoemulsões de alta energia, a ultrasonificação, vem sendo bastante utilizada em estudos na área de alimentos. Neste contexto, Ghosh et al., 2014 sintetizaram uma nanoemulsão pelo método de ultrasonificação para nanocarrear eugenol visando sua ação antimicrobiana em sumo de frutas.

Os autores utilizaram para a formulação da nanoemulsão o surfactante Tween 80, para a base lipídica o óleo de gergelim, o eugenol como princípio ativo e água Milli-Q.

Ghosh et al., 2014 obtiveram a nanoemulsão carreando eugenol em duas etapas: i) a fase oleosa composta de 3% de eugenol foi acrescentada no óleo de gergelim na concentração de 6% (v/v), sendo posteriormente, a solução dispersa com o agente Tween 80 na concentração de 18% (a proporção de óleo e eugenol foi de 1:2; e de Tween 80 e água de 18:74, após a realização de pré-testes). Em seguida, foi adicionada água, e a formulação resultante foi submetida a agitação magnética à temperatura ambiente por 15 min até a formação de uma emulsão de aspecto grosseira (altamente viscosa e leitosa).

O surfactante Tween 80, é um monoleato de sorbitano polioxietilenopolisorbato não-iônico, geralmente solúveis ou dispersíveis em água e empregados para obter emulsões do tipo óleo em água (O/A), como dispersantes ou solubilizantes de óleos com propriedade bem reportada na literatura pela eficácia na redução da tensão interfacial. (GHOSH et al., 2014).

Os surfactantes não iônico, como o Tween 80, quando utilizado em emulsões para alimentos, além de favorecer a estabilidade do sistema, também auxilia a minimizar a degradação induzida por componentes iônicos, pela sua capacidade em neutralizá-los, além de favorecer ao aumento da espessura em torno da área interfacial da gotícula presente na emulsão (HSU; NACU, 2003). Como estabilizadores eficazes de emulsões, tais surfactantes não iônicos, são utilizados em concentrações muito acima da CMC, de modo a atingir a cobertura da superfície de gotículas de óleo tão completa quanto possível e assegurar a estabilização esférica (GRIGORIEV, MILLER, 2009).

Após a primeira etapa Ghosh et al.(2014), realizaram a segunda etapa: ii) após a obtenção de uma emulsão grosseira, a formulação foi submetida a sonicação a 20 kHz e 750 W de potência, com o diâmetro de ponta do sonicador de 13 mm, por 30 min. Por se trata de um método de alta energia, pode ocorrer a liberação de energia na forma de calor proveniente da cavitação das gotículas, que pode desfavorecer a estabilidade e ou perda do princípio ativo da nanoemulsão, para evitar tal possibilidade durante a sonicação, os autores imergiram o recipiente contendo a emulsão grosseira, no

Os principais microorganismos causadores da mastite bovina e suas consequências na cadeia produtiva do leite

interior de um frasco contendo banho de gelo (GHOSH et al., 2014).

Pelo método de sonicação, o fluido é primeiramente conduzido através de um orifício de diâmetro reduzido com pressão moderada e orientado em direção a uma lâmina vibratória onde sofre impacto. Quando o sistema atinge uma fase estacionária entra em cavitação, próximo da extremidade da lâmina e a vibração desta produz ondas ultrassônicas, que são capazes de exercer um efeito cortante, produzindo gotículas de diâmetro reduzido (MAA, HSU, 1999; SOLANS et al., 2005; DONSI et al., 2012).

A partir dos resultados obtidos, os autores observaram que as nanoemulsões obtidas pelo método descrito, obtiveram tamanho da partícula e polidispersão pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS), valores de $13 \text{ nm} \pm 3,1$ e $0,079 \pm 0,09$ respectivamente, demonstrando boa estabilidade do sistema. As nanoemulsões com eugenol demonstram redução de 10% na população nativa de bactérias heterotróficas em suco laranja armazenado a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, inferindo-se que este nanocarreador, pode ser utilizado como um potencial agente de conservação no controle microbiológico (GHOSH et al., 2014).

Além dos nanocarreadores supracitados, outras nanoestruturas vêm sendo pesquisadas na área de alimentos, como por exemplo, nanoestruturas de origem natural, como as obtidas por algumas proteínas do leite, tais como caseína, β -caseína e Albumina Sérica Bovina (BSA).

Neste contexto, Nunes (2016), avaliou a interação entre ácido cinâmico e cinamato de metila com a BSA. O preparo da dispersão utilizando a BSA como nanocarreadora, foi obtida pela diluição da proteína diretamente em solução tampão em três diferentes valores de pH (3,5; 5,0 e 7,4). A dispersão da BSA em diferentes pH, teve como objetivo, avaliar a interação do nanocarreador com os princípios ativos em intervalos abaixo, próximo e acima do potencial isoelétrico da proteína, que é reportada próximo ao valor de pH de 4,6. Após a solubilização de BSA em diferentes pH, o ácido cinâmico foi disperso diretamente em cada uma das dispersões (BSA com pH 3,5; 5,0 e 7,4). Porém, para o cinamato de metila foi utilizado uma solução estoque na concentração de $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol. L}^{-1}$ em etanol, devido à sua insolubilidade em água.

O pH é um fator que pode promover mudanças na densidade de cargas da BSA devido a protonação/desprotonação de grupos ionizáveis, bem como em sua carga líquida. Estas mudanças podem influenciar tanto as interações entre os segmentos da cadeia polipeptídica da BSA quanto as interações que esta proteína realiza com outras moléculas. Próximo ao ponto isoelétrico (pH \sim 4,8), por exemplo, a BSA exibe um estrutura molecular de coração (KUN et al., 2009), por esta razão, Nunes (2016), avaliou em três diferentes valores de pH, verificando desta forma, analisar como a provável mudança da conformação da proteína BSA pode ser alterada pelo pH do meio.

Nunes (2016), evidenciou que a interação entre os compostos estudados com a BSA foi energeticamente menos favorável quando BSA estava em pH 3,5, demonstrando que a desnaturação promovida pelo baixo valor de pH, pode influenciar nas características de superfície da nanoestrutura, podendo resultar em menor estabilidade cinética do sistema (BSA-ligante). Neste contexto, a importância da conformação da proteína e sua interação com moléculas de pequena massa

molar, pode fornecer informações importantes para a sua aplicação futura na área de alimentos.

De acordo com diferentes estudos supracitados nesta questão de qualificação, pode-se inferir, que dentre os diferentes nanocarreadores que vem sendo pesquisado na área de alimentos nos últimos anos, estes nanosistemas tem demonstrado grande viabilidade de uso para a área de alimentos, sendo necessário, estudos mais aprofundados e in situ, para serem de fatos utilizados com mais eficiência em escala industrial.

Importante ressaltar, que apesar da grande variedade de nanocarreadores disponíveis no mercado para a área farmacêutica, esta nanotecnologia ainda tem encontrado, relativamente, pouco espaço na indústria de alimentos. Uma das razões disso é o fator custo – enquanto os setores farmacêuticos geralmente suportam a utilização de técnicas de alto custo, a indústria de alimentos tipicamente trabalha com margens de lucro relativamente baixas, sendo imperativa a necessidade de redução dos custos de produção. Além disso, as indústrias apresentam muitas vezes forte resistência à adoção de novas tecnologias (AZEREDO et al., 2005).

CONCLUSÃO

No entanto, deve-se considerar que muitos compostos de grande impacto mercadológico na indústria de alimentos, como os aromas, corantes naturais e bioativos (carotenoides, flavonoides, curcumina, dentre outros), apresentam algumas limitações para serem utilizados diretamente na área de alimentos, tais como, elevada hidrofobicidade, propensão a degradação físico-química, odores e sabores pronunciados, que pode desfavorecer sua utilização em matrizes alimentícias.

Neste contexto, a utilização de nanocarreadores para vincular estes princípios, pode favorecer a proteção destas substâncias e aumentar sua biodisponibilidade e estabilidade físico-química em diferentes matrizes alimentícias, além de disponibilizar ao consumidor, a possibilidade da obtenção de um produto com melhor qualidade nutricional.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ANTON, N. et al. Nano-emulsions and nanocapsules by the PIT method: An investigation on the role of the temperature cycling on the emulsion phase inversion. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 344, n. 1–2, p. 44–52, 2007.

ATTAMA, A. A.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. Effect of beeswax modification on the lipid matrix and solid lipid nanoparticle crystallinity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 315, n. 1–3, p. 189–195, 2008.

AZEREDO, H. M. C. et al. Drying Technology : An *International Journal*. Alimentação e Nutrição, Araraquara, v. 16, n. 1, p. 89–97, 2005.

BARNADAS-RODRÍGUEZ, R.; SABÉS, M. Factors involved in the production of liposomes with a high-pressure homogenizer. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 213, n. 1–2, p. 175–186, 2001.

- BEY-OULD SI SAID, Z. et al. Essential oils composition, antibacterial and antioxidant activities of hydrodistilled extract of *Eucalyptus globulus* fruits. *Industrial Crops and Products*, v. 89, p. 167–175, 2016.
- BOVI, G. G. Óleo de buriti (*Mauritia flexuosa* L.) nanoemulsionado: produção por método de baixa energia, caracterização físico-química das dispersões e incorporação em bebida isotônica. 2015. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia de Alimentos)- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, 2015.
- BRANDELLI, A. Nanostructures as Promising Tools for Delivery of Antimicrobial Peptides. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 12, n. 8, p. 731–741, 2012.
- BRANDI; BACHMAN; DRECHSLER. Liposome preparation. v. 16, n. 14, p. 2167–2191, 1990.
- CHORILLI, M. et al. Lipossomas em formulações dermatocósméticas. *Infarma*, v. 16, n. 7–8, p. 75–79, 2004.
- DIAS, D. DE O. et al. Optimization of Copaiba oil-based nanoemulsions obtained by different preparation methods. *Industrial Crops and Products*, v. 59, p. 154–162, 2014.
- DONSÌ, F. et al. Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: Effect of the emulsifier. *Journal of Biotechnology*, v. 159, n. 4, p. 342–350, 2012.
- DUTTA, P. K.; DUTA, J.; TRIPATHI, V. S. Chitin and Chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific and Industrial Research*, v. 63, n. 1, p. 20–31, 2004.
- FARIDI ESFANJANI, A.; JAFARI, S. M. Biopolymer nanoparticles and natural nano-carriers for nano-encapsulation of phenolic compounds. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 146, p. 532–543, 2016.
- FESSI, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 55, n. 1, p. 1–4, 1989.
- FRÉZARD, F. et al. Lipossomas: Propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. *Química Nova*, v. 28, n. 3, p. 511–518, 2005.
- GALLI, J. A. Obtenção de lipossomas de fosfatidilcolina de soja hidrogenada contendo cetorolaco de trometamina. 2011. 84 f. Trabalho de Conclusão de curso (Bacharel Farmácia) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, 2011.
- GHOSH, V.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Eugenol-loaded antimicrobial nanoemulsion preserves fruit juice against microbial spoilage. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 114, p. 392–397, 2014.
- GIBIS, M.; RUEDT, C.; WEISS, J. In vitro release of grape-seed polyphenols encapsulated from uncoated and chitosan-coated liposomes. *Food Research International*, 2015.
- GRIGORIEV, D. O.; MILLER, R. Mono- and multilayer covered drops as carriers. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, v. 14, n. 1, p. 48–59, 2009.
- HELGASON, T. et al. Effect of surfactant surface coverage on formation of solid lipid nanoparticles (SLN). *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 334, n. 1, p. 75–81, 2009.
- HSU, J. P.; NACU, A. Behavior of soybean oil-in-water emulsion stabilized by nonionic surfactant. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 259, n. 2, p. 374–381, 2003.
- JIMÉNEZ, M. C. et al. Triplet excited states as chiral reporters for the binding of drugs to transport proteins. *Journal of the American Chemical Society*, v. 127, n. 29, p. 10134–10135, 2005.
- KREUTER, J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 64, n. SUPPL., p. 213–222, 2012.
- KUN, R. et al. Isothermal titration calorimetric studies of the pH induced conformational changes of bovine serum albumin. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 96, n. 3, p. 1009–1017, 2009.
- LASIC, D. D. et al. Sterically stabilized liposomes: a hypothesis on the molecular origin of the extended circulation times. *BBA - Biomembranes*, v. 1070, n. 1, p. 187–192, 1991.
- LAPENDA, T.L.S. Desenvolvimento e caracterização de lipossomas e avaliação da atividade antitumoral. 2010. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2010.
- LET, A.; ZAVAREZE, R. Revisão : Características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos Review : Characteristics of nanoparticles and their potential applications in foods. p. 99–109, 2012.
- LU, et al . Preparation of a tea polyphenol nanoliposome system and its physicochemical properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, n. 24, p. 13004–13011, 2011.
- MAA, Y. F.; HSU, C. C. Performance of sonication and microfluidization for liquid-liquid emulsification. *Pharmaceutical development and technology*, v. 4, n. 2, p. 233–240, 1999.
- MÄDER, K.; MEHNERT, W. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Advanced drug delivery reviews*, v. 47, n. 2–3, p. 165–96, 2001.
- MARIA, S. et al. Nanoestruturas contendo compostos bioativos extraídos de plantas. p. 142–151, 2015.

Os principais microorganismos causadores da mastite bovina e suas consequências na cadeia produtiva do leite

- MARTINS, D. et al. Antitumoral activity of L-ascorbic acid-poly- D,L-(lactide-co-glycolide) nanoparticles containing violacein. *International journal of nanomedicine*, v. 5, p. 77–85, 2010.
- MCCLEMENTS, D. J.; RAO, J. Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 51, n. 4, p. 285–330, 2011.
- MCCLEMENTS, D. J.; XIAO, H. Excipient foods: designing food matrices that improve the oral bioavailability of pharmaceuticals and nutraceuticals. *Food Funct*, v. 5, n. 7, p. 1320–1333, 2014.
- MERTINS, O. Desenvolvimento e Caracterização de Nanovesículas Lipossômicas Compósitas de Fosfatidilcolina da Lecitina de Soja e Quitosana. 2004. 68 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, SC, 2014.
- MOSQUEIRA, V. C. F. et al. Poly(D,L-Lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: Influence of the composition on physicochemical and structural properties. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 89, n. 5, p. 614–626, 2000.
- MOZAFARI, M. R. et al. Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. *Journal of liposome research*, v. 18, p. 309–327, 2008.
- No Title. p. 0–115, 2010.
- MÜLLER, R.H. et al. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 242, p. 121–128, 2002.
- NUNES, N. M. Termodinâmica de interação entre ácido cinâmico e cinamato de metila e albumina do soro bovino. 2016. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)- Universidade Federal de Viçosa, MG, 2016.
- OZTURK, K. et al. The influence of technological parameters on the physicochemical properties of blank PLGA nanoparticles. *Pharmazie*, v. 65, n. 9, p. 665–669, 2010.
- PANYAM, J.; LABHASETWAR, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 55, n. 3, p. 329–347, 2003.
- PARHI, R.; SURESH, P. Production of Solid Lipid Nanoparticles-Drug Loading and Release Mechanism. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, v. 2, n. 1, p. 211–227, 2010.
- PINHEIRO, et al. In vitro behaviour of curcumin nanoemulsions stabilized by biopolymer emulsifiers - Effect of interfacial composition. *Food Hydrocolloids*, v. 52, p. 460–467, 2016.
- REINECCIUS, G. A. Liposomes for controlled release in the food industry. [s.l: s.n.]. v. 590
- RAMALINGAM, P. et al. Nanodelivery systems based on mucoadhesive polymer coated solid lipid nanoparticles to improve the oral intake of food curcumin. *Food Research International*,(manuscrito aceito - doi: 10.1016/j.foodres.2016.03.031), 2016.
- SANTOS, N. C.; CASTANHO, M. A. R. B. Divulgação. v. 25, n. 6, p. 1181–1185, 2002.
- SANTOS, J. S. Nanopartículas - Aplicações cosméticas e farmacêuticas. Pharmabooks editora, 139 p., 2010
- SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.
- SEVERINO, P. et al. Polímeros usados como sistemas de transporte de princípios ativos. *Polímeros*, v. 21, n. 5, p. 361–368, 2011.
- SHEN, G. F. et al. Spectroscopic and molecular docking studies of binding interaction of gefitinib, lapatinib and sunitinib with bovine serum albumin (BSA). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 153, p. 380–390, 2015.
- SILVA, I.M. Desenvolvimento de nanovesículas fosfolipídicas com incorporação de polissacarídeos para encapsulação de peptídeos antimicrobianos. 2013. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)- Universidade Federal do Sul, Porto Alegre, SC, 2013.
- SOLANS, C. et al. Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, v. 10, n. 3–4, p. 102–110, 2005.
- SOUTO, E. B. et al. Lipid nanoparticles (SLN??, NLC??) for cutaneous drug delivery: Structure, protection and skin effects. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 3, n. 4, p. 317–331, 2007.
- SOUTO, E. B. et al. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados: parte II. *Polímeros*, v. 22, n. 1, p. 101–106, 2012.
- TADROS, T. et al. Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 108–109, p. 303–318, 2004.
- TAHARA, K. et al. Hybrid-modified poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanospheres for a novel cellular drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 392, n. 1–2, p. 311–313, 2010.
- TAYEH, N. t al. Fluorescence spectral resolution of tryptophan residues in bovine and human serum albumins. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Journal of Pharmaceutical and Biomedical*, v. 50, p. 107–116, 2009.

TAYLOR, T. M. et al. Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. *Critical reviews in food science and nutrition*, v. 45, n. 7–8, p. 587–605, 2005.

TEERANACHAIDEEKUL, V. et al. Physicochemical characterization and in vitro release studies of ascorbyl palmitate-loaded semi-solid nanostructured lipid carriers (NLC gels). *J Microencapsul*, v. 25, n. 2, p. 111–120, 2008.

WERE, L. M. et al. Size, Stability, and Entrapment Efficiency of Phospholipid Nanocapsules Containing Polypeptide Antimicrobials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, n. 27, p. 8073–8079, 2003.

YEGIN, Y. et al. Development and characterization of geraniol-loaded polymeric nanoparticles with antimicrobial activity against foodborne bacterial pathogens. *Journal of Food Engineering*, v. 170, p. 64–71, 2015