



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial



(21) BR 102022025477-0 A2

(22) Data do Depósito: 13/12/2022

(43) Data da Publicação Nacional:
25/06/2024

(54) Título: DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS ANTIMICROBIANOS À BASE DE NANOPARTÍCULAS DE GOMA ARÁBICA-QUITOSANA/CLORIDRATO DE QUITOSANA CONTENDO ÓLEO DA SEMENTE DE MARACUJÁ

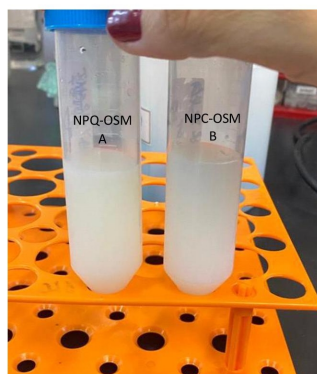
(51) Int. Cl.: A61K 9/51; B01J 13/10.

(52) CPC: A61K 9/51; A61K 9/5123; A61K 9/5107; A61K 9/5176; B01J 13/10.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO; UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO (UFRPE).

(72) Inventor(es): ALESSANDRA SILVA ARAÚJO; RAFAELA DE SIQUEIRA FERRAZ CARVALHO; GERLANE SOUZA DE LIMA; THAYZA CHRISTINA MONTENEGRO STAMFORD; IHASMYN DOS SANTOS NUNES; MARCOS ANTONIO BARBOSA DE LIMA.

(57) Resumo: DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS ANTIMICROBIANOS À BASE DE NANOPARTÍCULAS DE GOMA ARÁBICA-QUITOSANA/CLORIDRATO DE QUITOSANA CONTENDO ÓLEO DA SEMENTE DE MARACUJÁ. A invenção compreende o desenvolvimento de produtos nanotecnológicos com propriedade antimicrobiana à base de nanopartículas de goma arábicaquitosana/cloridrato de quitosana contendo óleo da semente de maracujá. As partículas desenvolvidas apresentaram tamanho nanométrico, baixa polidispersão, carga positiva e mostraram-se estáveis, conservando seus aspectos macroscópicos e suas características acima citadas ao longo de 30 dias de armazenamento, além da ausência de formação de grumos ou separação de fases. A análise da estrutura química confirmou a nanoencapsulação do óleo e a ausência de interação química entre os materiais de parede e os compostos do mesmo. A microscopia eletrônica de varredura evidenciou a estrutura esférica uniforme, sem a presença de fissuras e ondulações em sua superfície e as análises de concentração inibitória mínima frente a bactérias e fungos atestaram a capacidade antimicrobiana das nanopartículas elaboradas com o óleo de semente de maracujá. Diante dos resultados de caracterização química, morfológica e análises antimicrobianas, infere-se que essas partículas podem ser direcionadas para o nanocarreamento de compostos funcionais em diversas áreas como alimentos e farmacêutica, além de serem uma alternativa como antimicrobiano natural.



DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS ANTIMICROBIANOS À BASE DE
NANOPARTÍCULAS DE GOMA ARÁBICA-QUITOSANA/CLORIDRATO DE
QUITOSANA CONTENDO ÓLEO DA SEMENTE DE MARACUJÁ

Campo da invenção

[001] A presente invenção compreende o desenvolvimento de produtos nanotecnológicos com propriedade antimicrobiana à base de nanopartículas de goma arábica-quitosana (NPQ-OSM)/cloridrato de quitosana (NPC-OSM) contendo óleo da semente de maracujá (OSM) para aplicação em alimentos e fármacos.

Fundamentos da invenção

[002] Nanopartículas de quitosana e cloridrato de quitosana apresentam um potencial inovador para aplicação em matrizes alimentares e farmacêuticas. Também podem ser usadas como carreadores de produtos bioativos, tais como os ácidos graxos polinsaturados, fitosteróis, tocoferóis, compostos fenólicos e carotenóides, proporcionando maior estabilidade oxidativa a esses compostos, manutenção das atividades biológicas, e também a liberação controlada dos bioativos.

[003] As tecnologias de conservação que vem sendo comumente aplicadas, a fim de preservar a qualidade de alimentos, como por exemplo, métodos físicos e químicos podem apresentar desvantagens no que se refere à qualidade sensorial, nutricional e problemas relativos à saúde do consumidor, especialmente em se tratando dos métodos químicos. Diante disso tem-se buscado alternativas naturais que sejam seguras, eficazes e que possam preservar a qualidade dos alimentos, prolongando seu tempo de vida útil.

[004] Uma estratégia promissora para conservação de alimentos é a aplicação da nanotecnologia associada à utilização de compostos bioativos naturais como o óleo de semente de maracujá. A aplicação deste óleo, obtido a partir das sementes, favorece a minimização do impacto ambiental gerado pelo descarte desse subproduto agregando valor à cadeia produtiva desse fruto.

[005] Esse tipo de método de conservação pode gerar interesse comercial para indústrias de alimentos, uma vez que a metodologia de elaboração não envolve tempo

elevado, maquinário sofisticado, tampouco dificuldade ou risco de manuseio dos produtos químicos. Assim, diante desses aspectos, esses revestimentos poderiam ser elaborados nas próprias plantas industriais e aplicados diretamente nos alimentos.

[006] Tem-se na nanomedicina umas das principais vertentes da nanotecnologia, tendo como exemplo a sua aplicação na administração de fármacos (SAHU et al., 2021). Através de nanocarreadores, esses medicamentos têm seu transporte potencializado para seus órgãos e tecidos-alvo. Através do emprego da nanotecnologia em fármacos, compostos de baixa solubilidade e absorção reduzida podem ter sua biodisponibilidade ampliada (BAJRACHARYA et al., 2019).

[007] Em tratamentos específicos, como a quimioterapia, os nanomedicamentos favorecem a redução da toxicidade das substâncias no organismo e, conseqüentemente, seus efeitos colaterais, uma vez que o fármaco será levado diretamente ao seu local de ação, ao contrário de terapias convencionais (BAJRACHARYA et al., 2019; SAHU et al., 2021).

[008] As nanopartículas de goma arábica-quitosana/cloridrato de quitosana-óleo da semente de maracujá podem ser utilizadas na encapsulação de compostos bioativos, óleos e fármacos e serem aplicadas na conservação de alimentos em geral, seja incorporadas às formulações alimentícias ou na forma de coberturas comestíveis que promoverão a conservação de alimentos de origem animal ou vegetal em decorrência da capacidade antimicrobiana intrínseca da quitosana/cloridrato de quitosana e dos compostos ativos presentes no óleo de semente de maracujá.

Breve descrição dos desenhos

A Figura 1 apresenta o aspecto visual das formulações após 30 dias.

A Figura 2 apresenta a avaliação da estabilidade das dispersões de nanopartículas durante 30 dias de armazenamento sob refrigeração.

A Figura 3 apresenta morfologia das nanopartículas elaboradas NPQ-OSM (a e b) e NPC-OSM (c e d).

A Figura 4 apresenta os espectros de infravermelho do OSM (a), nanopartículas brancas de goma arábica-quitosana/cloridrato de quitosana (b e c), NPQ-OSM e NPC-OSM (d e e).

A Figura 5 apresenta a concentração inibitória mínima (CIM) (mg/mL) das nanopartículas elaboradas.

A Figura 6 apresenta o esquema de obtenção das nanopartículas de goma arábica-quitosana/cloridrato de quitosana contendo o OSM (NPQ-OSM e NPC-OSM).

Descrição da invenção

[009] O cultivo de maracujá constitui uma importante atividade geradora de renda e desenvolvimento do agronegócio nacional (ARAÚJO et al., 2020; LUCARINI et al., 2019). No entanto, a utilização industrial do maracujá gera uma elevada produção de resíduos como as sementes, culminando em entraves significativos para a sustentabilidade da cadeia produtiva e seu reaproveitamento favorece a minimização do impacto ambiental gerado pelo manejo inadequado de subprodutos, assim como a agregação de valor à cadeia produtiva do maracujá (ARAÚJO et al., 2020; LIMA; XAVIER JÚNIOR; STAMFORD, 2020). Sabe-se que suas sementes são ricas em ácidos graxos, fitosteróis, tocoferóis, compostos fenólicos, carotenóides e representam uma fonte alternativa de óleos com propriedades funcionais (antioxidante e antimicrobiana). (ARAÚJO et al., 2020; LIMA; XAVIER JÚNIOR; STAMFORD, 2020). Apesar dos benefícios, ácidos graxos essenciais presentes nos óleos, são susceptíveis a reações de oxidação e degradação, principalmente na presença de luz, oxigênio e umidade (SOARES et al., 2019; JURIC et al., 2020).

[0010] Uma alternativa promissora para a proteção da bioatividade de óleos vegetais é a nanoencapsulação, que se refere ao encapsulamento em cápsulas ou vesículas em escala nanométrica, como estratégia para minimizar sua degradação durante o processamento, distribuição e armazenamento (TIMILSENA et al., 2017; CARRILLO-INUNGARAY, et al., 2018). Um dos principais objetivos da incorporação de compostos bioativos em nanopartículas é a proteção destes contra fatores intrínsecos e extrínsecos (umidade, temperatura, luz, oxigênio, degradação enzimática, pH). No entanto, os benefícios da escala nanométrica também se refletem no aumento da solubilidade, ação antimicrobiana, estabilidade, biodisponibilidade e liberação controlada de compostos encapsulados (JAFARI, 2017; PRAKASH et al., 2018).

[0011] A escolha do material de parede em sistemas de encapsulação é fundamental, não apenas para a proteção dos compostos encapsulados, mas também para a estabilidade e as características dos nanossistemas resultantes (DELSHADI et al., 2020; KEDIA; DUBEY, 2018). A encapsulação de compostos bioativos, em especial de óleos vegetais e essenciais, em matrizes biopoliméricas têm apresentado resultados promissores quanto a eficácia de encapsulação, a estabilidade e a funcionalidade das nanopartículas e do óleo encapsulado (ATTALLAH, 2020; CAMPO et al., 2017; SUN et al., 2021).

[0012] Dentre esses materiais de parede está a quitosana, um polissacarídeo semicristalino linear, derivado da desacetilação parcial da quitina, encontrada no exoesqueleto de crustáceos, moluscos, anelídeos e insetos, e nas paredes celulares de fungos e leveduras (KUMAR; SHAHID, 2020). A quitosana se destaca por ser um dos biopolímeros mais empregados na nanotecnologia, sendo formada por duas unidades de repetição: β -(1 $\rightarrow$ 4)-N-acetil-D-glucosamina e β -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucosamina (EL KNIDRI et al., 2018; MALERBA & CERANA, 2019; VERLEE; MINCKE; STEVENS, 2017). Destaca-se por suas propriedades físico-químicas e funcionais, como a capacidade de formação de filmes, de adsorção e de quelação de metais, atividade antimicrobiana, antitumoral e antioxidante, biodegradabilidade, biocompatibilidade e baixa toxicidade. Sua aplicação é bastante ampla em áreas de ciência e tecnologia, com destaque na área de ciência e tecnologia dos alimentos, farmacêutica e cosmética, visto que é um material considerado

GRAS (Geralmente reconhecido como seguro, do inglês Generally Recognized as Safe) pela Food and Drugs Administration (FDA) (EHF, 2012; KUMAR et al., 2019).

[0013] Devido à atividade antimicrobiana, a quitosana e seus derivados vêm sendo amplamente aplicados em alimentos, como bebidas, produtos cárneos, frutas, hortaliças (TIAN; LIU, 2020). Particularmente em frutas, pode-se observar outros benefícios, pois a quitosana, sob a forma de revestimento comestível, além de conferir proteção microbiana, funciona como barreira semipermeável, prolongando a vida de prateleira do alimento por retardar sua maturação, regulando as trocas gasosas com desaceleração da respiração do vegetal (NAIR et al., 2020; OLIVEIRA; OLIVEIRA JUNIOR, 2020).

[0014] As propriedades da quitosana podem ser potencializadas mediante modificação química, para melhora de sua solubilidade e estabilidade. Dentre as modificações estruturais estão os sais de quitosana, com destaque para o cloridrato de quitosana, composto mais hidrofílico que o acetato e a forma neutra da quitosana, contribuindo para uma atividade antimicrobiana mais efetiva, sendo utilizada nos setores farmacêutico e de cosméticos (VIŠNJAR et al., 2017; LI et al., 2019).

[0015] O cloridrato de quitosana é um sal de cloreto positivamente carregado, obtido por meio da degradação enzimática da quitosana por quitosanases na presença de ácido clorídrico, ou por diálise da solução de quitosana em ácido acético contra cloreto de sódio e contra água deionizada (KUROZUMI et al., 2019; LI et al., 2019). Por suas propriedades não tóxicas, biocompatíveis, biodegradáveis e antibacterianas, apresenta uso comum e regular como ingrediente alimentar em países como o Japão. Esse composto mantém e potencializa os benefícios biológicos da quitosana tendo a vantagem de ser solúvel em água e estável em pH neutro e básico (até pH 8,0) não necessitando de soluções ácidas para ser dissolvido (FORTUNATI et al., 2017; KUROZUMI et al., 2019; WU et al., 2015).

[0016] Como mencionado anteriormente, as propriedades apresentadas pela quitosana e seus sais derivados são atrativos que favorecem o interesse da indústria de alimentos além do fato de poderem ser preparados de diferentes formas. Destacam-se os tipos de preparo desse biopolímero sob a forma de géis, filmes, membranas, microesferas e

nanopartículas que criam, dessa forma, diversas possibilidades de aplicações e em áreas distintas (NAIR et al., 2020; ZHONG et al., 2020).

[0017] De acordo com explicitado acima, o uso de nanopartículas de quitosana e cloridrato de quitosana apresenta um potencial inovador para aplicação em matrizes alimentares e farmacêuticas. Também podem ser usadas como carreadores de produtos bioativos, tais como os ácidos graxos polinsaturados, fitoesteróis, tocoferóis, compostos fenólicos e carotenoides presentes no óleo de semente de maracujá, proporcionando maior estabilidade oxidativa a esses compostos, manutenção das atividades biológicas, e também a liberação controlada dos bioativos (MATSHETSHE et al., 2018; LIMA; XAVIER JÚNIOR; STAMFORD, 2020).

[0018] A elaboração de produtos à base de quitosana, com e sem bioativos incorporados, vem sendo abordada não apenas em trabalhos científicos, mas também em patentes. A exemplo disso, tem-se as patentes intituladas de “COMPOSIÇÃO DE UM REVESTIMENTO COMESTÍVEL PARA A PRESERVAÇÃO DE FRUTAS E VEGETAIS, SEU PROCESSO DE PREPARAÇÃO E FORMA DE APLICAÇÃO EM FRUTAS E VEGETAIS” (ES201531340A), publicada em 2015; “FORMULAÇÕES DE COBERTURAS COMESTÍVEIS ANTIMICROBIANAS” (BR102015030762-4A), publicada em 2018; “MÉTODO DE REVESTIMENTO DE FILME DE CAMADA DUPLA PARA INIBIR DOENÇAS PÓS-COLHEITA DE MAÇÃ E SUA FÓRMULA (CN201911238717.9A), publicada em 2019; “NANOPARTÍCULA COMPOSTA DE CLORIDRATO DE QUITOSANA CMC/FA, MÉTODO DE PREPARAÇÃO E APLICAÇÃO DA MESMA” (CN110511444B), publicada em 2019; “FRUIT AND VEGETABLE FRESH-KEEPING AGENT, AND PREPARATION METHOD AND APPLICATION THEREOF” (CN113207956A), publicada em 2021. Além destas, pode-se citar aquelas que propõem o desenvolvimento e aplicação desses produtos como sistemas de entrega direcionada de moléculas biologicamente ativas para o controle de doenças e infecções, tal como as patentes “ESSENTIAL OIL LOADED MUCOADHESIVE NANOCOMPOSITE DELIVERY SYSTEM FOR GASTROINTESTINAL SYSTEM” (WO2016108774A1) e “CHITOSAN-BASED SKIN-TARGETED NANOPARTICLE DRUG DELIVERY SYSTEM AND METHOD” (WO2015072846A1), publicadas em 2014.

[0019] As nanopartículas de goma arábica-quitosana/cloridrato de quitosana-óleo de semente de maracujá foram preparadas por meio da técnica de coacervação complexa e caracterizadas quanto à sua morfologia, composição química, estabilidade sob armazenamento e atividade antimicrobiana (Figura 6).

[0020] Utilizou-se solução de quitosana (0,5%-2,0% (m/v), pH~4,0-5,0), preparada em solução aquosa de ácido acético (1,0% v/v) sob agitação magnética (800-950 rpm), a 25°C por 8-12h. As soluções de cloridrato de quitosana (0,5%-2,0% (m/v), pH~4,0-6,0) e goma arábica (1,5-2,5% (m/v), pH~4,0-5,0) foram preparadas com solubilização em água ultrapura, em condições semelhantes às da solução de quitosana.

[0021] O preparo das nanopartículas de goma arábica-quitosana/cloridrato de quitosana contendo o óleo da semente de maracujá (OSM) basearam-se em Rutz et al. (2017), utilizando a técnica da coacervação complexa, com algumas modificações. Alíquotas de 215-235 mg de OSM e 110-150 mg de Tween 80 (HBL 15,0) foram emulsificadas em 15 mL de solução de quitosana/cloridrato de quitosana 0,5%-2,0% (m/v) em homogeneizador ultra-turrax (8000-9500 rpm) durante 5 minutos. Em seguida, a emulsão foi mantida em agitação magnética (400-600 rpm) por 30 minutos, adicionando-se posteriormente 15 mL da solução de goma arábica por gotejamento. Os sistemas resultantes seguiram em agitação magnética (400-600 rpm) por mais 30 minutos, sendo submetidas à centrifugação (2.000 rpm) por 10 minutos.

[0022] A caracterização das partículas baseou-se em tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, pH, morfologia e estrutura química. As formulações foram armazenadas sob refrigeração (4°C) e avaliadas durante um período de 30 dias, quanto aos seus aspectos macroscópicos, tamanho, índice de polidispersão, carga superficial e pH. Durante a análise de tamanho de partícula e de potencial zeta, as amostras foram diluídas em água ultrapura filtrada (Millex® 0,22 µm) (TAN et al., 2016). Todas as leituras foram realizadas em triplicata.

[0023] A morfologia das nanopartículas foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Uma alíquota de 5 µL da dispersão fresca de nanopartículas foi depositada diretamente em um “stub” e, após secagem a 25 °C durante 24 horas, foi recoberta com uma camada de 10 nm de Au-Pd e visualizada em microscópio eletrônico

de varredura sob tensão de aceleração de 10 kV e magnificação entre 5.000 e 20.000x (HASHEMINEJAD; KHODAIYAN; SAFARI, 2019).

[0024] A estrutura química das nanopartículas elaboradas foi analisada através da técnica de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Os espectros dessas amostras foram elaborados por um aparelho espectrofotômetro acoplado a acessório de reflectância total atenuada ou ATR (Attenuated Total Reflectance). As amostras foram depositadas em cristal de seleneto de zinco e diamante, e avaliadas em modo ATR. Foram executadas leituras na região entre 4.000 cm^{-1} e 600 cm^{-1} , com 16 varreduras para cada medida e resolução de 4 cm^{-1} .

[0025] A técnica de microdiluição em caldo em microplacas de 96 poços foi utilizada para determinar as concentrações mínimas inibitórias (CIM) das nanopartículas de goma arábica-quitosana contendo o óleo de semente de maracujá (NPQ-OSM) e das nanopartículas de goma arábica-cloridrato de quitosana contendo o óleo de semente de maracujá (NPC-OSM) frente à bactérias patogênicas (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Listeria monocytogenes* ATCC 7664, *Salmonella sp.* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 e *Bacillus cereus* ATCC 14579) e fungos fitopatogênicos (*Aspergillus niger* URM 7282 e *Colletotrichum siamense* CMM 4077) seguindo metodologia citada por Balour, Sadiki & Ibnsouda (2016), com adaptações.

[0026] Inicialmente, as bactérias testadas foram cultivadas em meio BHI por 24h, a 37°C e tiveram a concentração inicial de seus inóculos ajustada para $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (escala 0,5 McFarland), enquanto os fungos foram cultivados em meio BDA (batata dextrose) durante 7 dias, a $25\text{--}28^{\circ}\text{C}$ para suficiente esporulação e a suspensão de seus esporos foram padronizadas para 10^6 esporos/mL utilizando um hematocitômetro. Em cada poço da microplaca foram adicionadas diferentes concentrações das amostras (0,75 a 4,5 mg/mL), seguidos do caldo (BHI ou Sabouraud) e do inóculo, totalizando um volume de 100 μL por poço. Foram utilizados como controles de esterilidade 100 μL do meio e 100 μL da substância teste; como controle de crescimento 80 μL do meio adicionados de 20 μL do inóculo. Nas microplacas incorporadas com bactérias, após incubação a 37°C por

24 horas, foram adicionados 30 µL de resazurina em cada poço, sendo a placa novamente incubada a 37°C por 1 hora. Após esse período, foi avaliada a alteração de cor e considerada CIM a menor concentração sem crescimento bacteriano visível. No caso dos fungos, as microplacas foram incubadas entre 25 e 28°C, durante 4 dias (KIM et al., 2020), e a CIM foi considerada a menor concentração da substância teste que não apresentou turvação no poço. As análises foram realizadas em triplicata.

Exemplos de concretizações da invenção

[0027] As nanopartículas de goma arábica-quitosana/cloridrato de quitosana com o óleo de semente de maracujá (OSM) incorporado (NPQ-OSM e NPC-OSM) apresentaram tamanho nanométrico (NPQ-OSM: $185,7 \pm 47,51$ nm; NPC-OSM: $163,77 \text{ nm} \pm 3,2$) , baixa polidispersão (NPQ-OSM: 0,436; NPC-OSM: 0,421) e carga positiva (NPQ-OSM: $18,5 \pm 5,65$; NPC-OSM: $6,67 \pm 0,47$) (Reivindicação 3).

[0028] As formulações elaboradas mantiveram o aspecto visual homogêneo (Figura 1A e 1B) sem formação de grumos ou cremagem, ao longo do armazenamento. Em relação às características físico-químicas, ambas as formulações (NPQ-OSM e NPC-OSM) permaneceram com tamanho de partícula inferior a 200 nm, PDI abaixo de 0,5 e potencial zeta positivo durante o período avaliado, evidenciando sua estabilidade (Figura 2) (Reivindicação 4).

[0029] Quanto à morfologia, conforme observado nas imagens obtidas pela técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (Figura 3), as nanopartículas apresentaram distribuição uniforme, sem aglomerados, e exibiram forma esférica com superfície lisa, sem a presença de fissuras, porosidades e rachaduras. Essas são características essenciais para retenção do óleo encapsulado em seu interior. De acordo com Mehran et al. (2020), a inexistência de fraturas na superfície das nanopartículas confirma o sucesso do processo de encapsulação e capacidade de nanocarreamento de compostos (Reivindicação 1,5, 6)

[0030] Avaliando a estrutura química, os espectros das NPQ-OSM e NPC-OSM (Figura 4) apresentaram perfil de bandas semelhante às de suas respectivas nanopartículas brancas (NPQ e NPC) e ao do OSM, reforçando a efetividade do processo de encapsulação do óleo. Uma vez que os picos característicos do OSM e das NPQs e

NPCs apareceram nos espectros das NPQ-OSM e NPC-OSM em números de onda semelhantes ou muito próximos e pela ausência de novos picos, pode-se inferir que não houve reação química entre os grupos funcionais do óleo e dos materiais de parede, configurando como um processo físico de interação e aprisionamento do óleo ou de qualquer outro composto (HOSSEINI et al., 2013; TAVARES et al., 2019) (Reinvidicação 1, 6, 9)

[0031] Em relação à atividade antimicrobiana, as concentrações mínimas inibitórias (CIM) obtidas para as nanopartículas contendo o óleo nanoencapsulado (NPQ-OSM e NPC-OSM) estão relacionadas na Figura 5. Os resultados demonstram que as CIM de NPQ-OSM e NPC-OSM foram iguais perante as bactérias estudadas, apresentando melhores resultados para *S. aureus* e *E. coli*. Já com respeito aos fungos *Aspergillus niger* e *Colletotrichum siamense* pode-se notar que diferente do observado para as bactérias patogênicas, as nanopartículas à base de quitosana e cloridrato de quitosana com o óleo nanoencapsulado apresentaram resultados diferentes de CIM. Os valores de CIM das NPC-OSM foram inferiores aos valores de CIM das NPQ-OSM frente a ambos os fungos, o que demonstra a atividade antifúngica superior das nanopartículas de cloridrato de quitosana em comparação às de quitosana (Reinvidicação 7, e 8).

REFERÊNCIAS

[0032] ARAUJO, M. E. V. et al. Physical properties of yellow passion fruit seeds (*Passiflora edulis*) during the drying process. **Scientia Horticulturae**, v. 261, n. November, p. 109032, 2020.

[0033] ATTALLAH, Olivia A. et al. Essential oil loaded pectin/chitosan nanoparticles preparation and optimization via Box–Behnken design against MCF-7 breast cancer cell lines. **RSC Advances**, v. 10, n. 15, p. 8703-8708, 2020.

[0034] BAJRACHARYA, Rajiv et al. Recent advancements in non-invasive formulations for protein drug delivery. **Computational and structural biotechnology journal**, v. 17, p. 1290-1308, 2019.

[0035] BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 2, p. 71–

79, 2016.

[0036] CAMPO, C. DE et al. Nanoencapsulation of chia seed oil with chia mucilage (*Salvia hispanica* L.) as wall material : Characterization and stability evaluation. **Food Chemistry**, v. 234, p. 1–9, 2017.

[0037] CARRILLO-INUNGARAY, Maria L. et al. Use of nanoparticles in the food industry: advances and perspectives. **Impact of nanoscience in the food industry**, p. 419-444, 2018.

[0038] DELSHADI, R. et al. Micro and nano-encapsulation of vegetable and essential oils to develop functional food products with improved nutritional profiles. **Trends in Food Science and Technology**, v. 104, n. June, p. 72–83, 2020.

[0039] EHF, P. **GRAS Notice 000443: Shrimp-derived chitosan**. n. 443, p. 1–150, 2012.

[0040] EL KNIDRI, H. et al. Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 1181–1189, 2018.

[0041] FORTUNATI, E. et al. Effective Postharvest Preservation of Kiwifruit and Romaine Lettuce with a Chitosan Hydrochloride Coating. **Coatings**, v. 7, n. 11, p. 196, 2017.

[0042] HAIDER, J. et al. Formation of chitosan nanoparticles to encapsulate krill oil (*Euphausia superba*) for application as a dietary supplement. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 27–34, 2017.

[0043] HASHEMINEJAD, N.; KHODAIYAN, F.; SAFARI, M. Improving the antifungal activity of clove essential oil encapsulated by chitosan nanoparticles. **Food Chemistry**, v. 275, n. August 2018, p. 113–122, 2019.

[0044] HOSSEINI, S. F. et al. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles : Preparation , characterization and in vitro release study. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n. 1, p. 50–56, 2013.

[0045] JAFARI, Seid Mahdi. An overview of nanoencapsulation techniques and their

classification. **Nanoencapsulation technologies for the food and nutraceutical industries**, p. 1-34, 2017.

[0046] JURIC, S. et al. Vegetable Oils Rich in Polyunsaturated Fatty Acids: Nanoencapsulation Methods and Stability Enhancement. **Food Reviews International**, v. 00, n. 00, p. 1–38, 2020.

[0047] KEDIA, A.; DUBEY, N. K. Nanoencapsulation of Essential Oils: A Possible Way for an Eco-Friendly Strategy to Control Postharvest Spoilage of Food Commodities From Pests. **Nanomaterials in Plants, Algae, and Microorganisms**, v. 1, p. 501–522, 2018.

[0048] KIM, Y. H. et al. Comparative antibacterial and antifungal activities of sulfur nanoparticles capped with chitosan. **Microbial Pathogenesis**, v. 144, n. February, p. 104178, 2020.

[0049] KUMAR, Dhiraj; SHAHID, Mohammad (Ed.). **Natural Materials and Products from Insects: Chemistry and Applications**. Springer Nature, 2020.

[0050] KUMAR, S. et al. Chitosan nanocomposite coatings for food, paints, and water treatment applications. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 9, n. 12, 2019.

[0051] KUROZUMI, S. et al. A novel hydrochloride-free chitosan oligosaccharide production method to improve taste. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 140, p. 109–118, 2019.

[0052] LI, X. M. et al. Fabrication of chitosan hydrochloride and carboxymethyl starch complex nanogels as potential delivery vehicles for curcumin. **Food Chemistry**, v. 293, n. March, p. 197–203, 2019.

[0053] LIMA, G. S. DE; XAVIER JÚNIOR, F. H.; STAMFORD, T. C. M. Óleo de semente de maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*): Composição química e funcionalidade em alimentos. **Equidade e Sustentabilidade no Campo da Segurança Alimentar Global**, p. 63–75, 2020.

[0054] LIN, L.; GU, Y.; CUI, H. Moringa oil/chitosan nanoparticles embedded gelatin nanofibers for food packaging against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus*

aureus on cheese. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 19, p. 86–93, 2019.

[0055] LUCARINI, Massimo et al. Passion fruit (*Passiflora* spp.) seed oil. In: **Fruit oils: Chemistry and functionality**. Springer, Cham, 2019. p. 577-603.

[0056] MALERBA, M.; CERANA, R. Recent applications of chitin- and chitosan-based polymers in plants. **Polymers**, v. 11, n. 5, p. 1–9, 2019.

[0057] MATSHETSHE, K. I. et al. Preparation, characterization and in vitro release study of β -cyclodextrin/chitosan nanoparticles loaded *Cinnamomum zeylanicum* essential oil. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 676–682, 2018.

[0058] MEHRAN, M.; MASOUM, S.; MEMARZADEH, M. Industrial Crops & Products Microencapsulation of *Mentha spicata* essential oil by spray drying : Optimization , characterization , release kinetics of essential oil from microcapsules in food models. **Industrial Crops & Products**, v. 154, n. June, p. 112694, 2020.

[0059] NAIR, M. S. et al. Enhancing the functionality of chitosan- and alginate-based active edible coatings/films for the preservation of fruits and vegetables: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 304–320, 2020.

[0060] NUNES, I. S. et al. Nanopartículas de quitosana: técnicas de obtenção e aplicações na indústria de alimentos. in: **Avanços em Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 1ed.: Editora Científica Digital, v. 4, p. 345-369, 2021.

[0061] OLIVEIRA, A. M. DE; OLIVEIRA JUNIOR, E. N. DE. Antifungal and filmogenic properties of micro- and nanostructures of chitosan and its derivatives. In: **Nanomycotoxicology**. Cambridge: Elsevier, 2020. p. 397–421.

[0062] PRAKASH, B. et al. Nanoencapsulation: An efficient technology to boost the antimicrobial potential of plant essential oils in food system. **Food Control**, v. 89, p. 1–11, 2018.

[0063] RUTZ, J. K. et al. Microencapsulation of palm oil by complex coacervation for application in food systems. **Food Chemistry**, v. 220, p. 59–66, 2017.

[0064] SAHU, Tarun et al. Nanotechnology based drug delivery system: Current

strategies and emerging therapeutic potential for medical science. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 63, p. 102487, 2021.

[0065] SOARES, B. S. et al. Microencapsulation of sachu inchi oil (*Plukenetia volubilis* L.) using complex coacervation: Formation and structural characterization. **Food Chemistry**, v. 298, n. February, p. 125045, 2019.

[0066] SUN, Y. et al. Fennel essential oil loaded porous starch-based microencapsulation as an efficient delivery system for the quality improvement of ground pork. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 172, p. 464–474, mar. 2021.

[0067] TAN, C. et al. Polysaccharide-based nanoparticles by chitosan and gum arabic polyelectrolyte complexation as carriers for curcumin. **Food Hydrocolloids**, v. 57, p. 236–245, 2016.

[0068] TAVARES, Loleny et al. Microencapsulation of garlic extract by complex coacervation using whey protein isolate/chitosan and gum arabic/chitosan as wall materials: influence of anionic biopolymers on the physicochemical and structural properties of microparticles. **Food and Bioprocess Technology**, v. 12, n. 12, p. 2093–2106, 2019.

[0069] TIAN, B.; LIU, Y. Chitosan-based biomaterials: From discovery to food application. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 31, n. 11, p. 2408–2421, 2020.

[0070] TIMILSENA, Y. P. et al. Advances in microencapsulation of polyunsaturated fatty acids (PUFAs)-rich plant oils using complex coacervation: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 69, p. 369–381, 2017.

[0071] VERLEE, A.; MINCKE, S.; STEVENS, C. V. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 164, p. 268–283, 2017.

[0072] VIŠNJAR, T. et al. Chitosan hydrochloride has no detrimental effect on bladder urothelial cancer cells. **Toxicology in Vitro**, v. 44, n. December 2016, p. 403–413, 2017.

[0073] WU, H. T. et al. Precipitation parameters and the cytotoxicity of chitosan

hydrochloride microparticles production by supercritical assisted atomization. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 102, p. 123–132, 2015.

[0074] ZHONG, Y. et al. Fabrication and characterization of oil-in-water emulsions stabilized by macadamia protein isolate/chitosan hydrochloride composite polymers. **Food Hydrocolloids**, v. 103, p. 1–11, 2020.

REIVINDICAÇÕES

1- Nanopartícula de goma arábica-quitosana contendo óleo de semente de maracujá (NPQ-OSM) e nanopartícula de goma arábica-cloridrato de quitosana contendo óleo de semente de maracujá (NPC-OSM) **caracterizados por** serem potenciais nanocarreadores de compostos bioativos.

2- Nanopartículas de goma arábica-quitosana/cloridrato de quitosana contendo óleo da semente de maracujá, citada na Reivindicação 1, **caracterizadas por** nanoencapsular o referido óleo vegetal por meio da técnica de coacervação complexa.

3- Nanopartículas de goma arábica-quitosana/cloridrato de quitosana contendo óleo da semente de maracujá, citada na Reivindicação 1, **caracterizadas por** apresentarem tamanho nanométrico (NPQ-OSM: $185,7 \pm 47,51$ nm; NPC-OSM: $163,77 \text{ nm} \pm 3,2$) , baixa polidispersão (NPQ-OSM: 0,436; NPC-OSM: 0,421) e carga positiva (NPQ-OSM: $18,5 \pm 5,65$; NPC-OSM: $6,67 \pm 0,47$).

4- Nanopartículas de goma arábica-quitosana/cloridrato de quitosana contendo óleo da semente de maracujá, citada na Reivindicação 1, **caracterizadas por** sua capacidades de manterem-se estáveis ao longo de 30 dias de armazenamento, sem formação de grumos ou cremagem e permanecerem com tamanho de partícula inferior a 200 nm, PDI abaixo de 0,5 e potencial zeta positivo durante o período avaliado.

5- Nanopartículas de goma arábica-quitosana/cloridrato de quitosana contendo óleo da semente de maracujá, citada na Reivindicação 1, **caracterizadas por** apresentarem distribuição uniforme, sem aglomerados, e exibiram forma esférica com superfície lisa, sem a presença de fissuras, porosidades e rachaduras, de acordo com a microscopia eletrônica de varredura (MEV).

6- Nanopartículas de goma arábica-quitosana/cloridrato de quitosana contendo óleo da semente de maracujá, citada na Reivindicação 1, **caracterizadas por** serem efetivos sistemas de encapsulação do óleo de semente de maracujá por não apresentarem espectros de infravermelho indicativos de reação química entre os grupos funcionais do

óleo e dos materiais de parede, configurando como um processo físico de interação e aprisionamento do óleo ou de qualquer outro composto nanoencapsulado.

7- Nanopartículas de goma arábica-quitosana/cloridrato de quitosana contendo óleo da semente de maracujá, citada na Reivindicação 1, **caracterizadas por** exercerem atividade antimicrobiana perante as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Listeria monocytogenes* ATCC 7664, *Salmonella* sp ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 e *Bacillus cereus* ATCC 14579) e os fungos fitopatogênicos *Aspergillus niger* URM 7282 e *Colletotrichum siamense* CMM 4077.

8- Nanopartículas de goma arábica-quitosana/cloridrato de quitosana contendo óleo da semente de maracujá, citada na Reivindicação 1, **caracterizadas por** seu potencial antimicrobiano, podendo atuar como uma alternativa de antimicrobiano natural em alimentos.

9- Nanopartículas de goma arábica-quitosana/cloridrato de quitosana contendo óleo da semente de maracujá, citada na Reivindicação 1, **caracterizadas por** seu potencial **encapsulante**, podem ser excelentes nanocarreadores para compostos bioativos com aplicação tanto na área de conservação de alimentos, farmacêutica ou afins.

DESENHOS

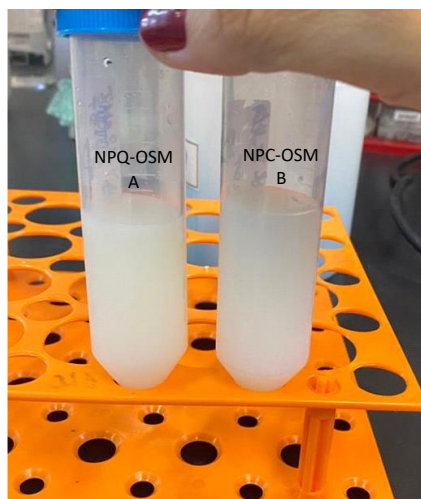


Figura 1

Tempo	NPQ-OSM				NPC-OSM			
Dias	ϕ (nm)	PDI	ζ (mV)	pH	ϕ (nm)	PDI	ζ (mV)	pH
0	185,7 $\pm$ 47,51	0,436	18,50 $\pm$ 5,65	4,46 $\pm$ 0,20	163,77 $\pm$ 3,2	0,421	6,67 $\pm$ 0,47	4,16 $\pm$ 0,22
7	161,1 $\pm$ 20,60	0,322	7,78 $\pm$ 2,81	4,23 $\pm$ 0,13	140,6 $\pm$ 8,4	0,415	15,50 $\pm$ 0,80	4,13 $\pm$ 0,08
21	161,2 $\pm$ 16,47	0,324	8,15 $\pm$ 2,14	3,97 $\pm$ 0,04	139,0 $\pm$ 6,5	0,323	8,60 $\pm$ 0,92	4,06 $\pm$ 0,06
30	161,3 $\pm$ 19,57	0,302	5,652 $\pm$ 1,46	3,98 $\pm$ 0,02	138,1 $\pm$ 9,5	0,318	11,42 $\pm$ 3,22	4,08 $\pm$ 0,02

NPQ-OSM: nanopartículas de goma arábica-quitosana contendo o óleo da semente de maracujá; NPC-OSM: nanopartículas de goma arábica-cloridrato de quitosana contendo o óleo da semente de maracujá; ϕ : tamanho de partícula; PDI: índice de polidispersão; Potencial ζ : potencial zeta. Resultados representados como valor médio $\pm$ desvio-padrão.

Figura 2

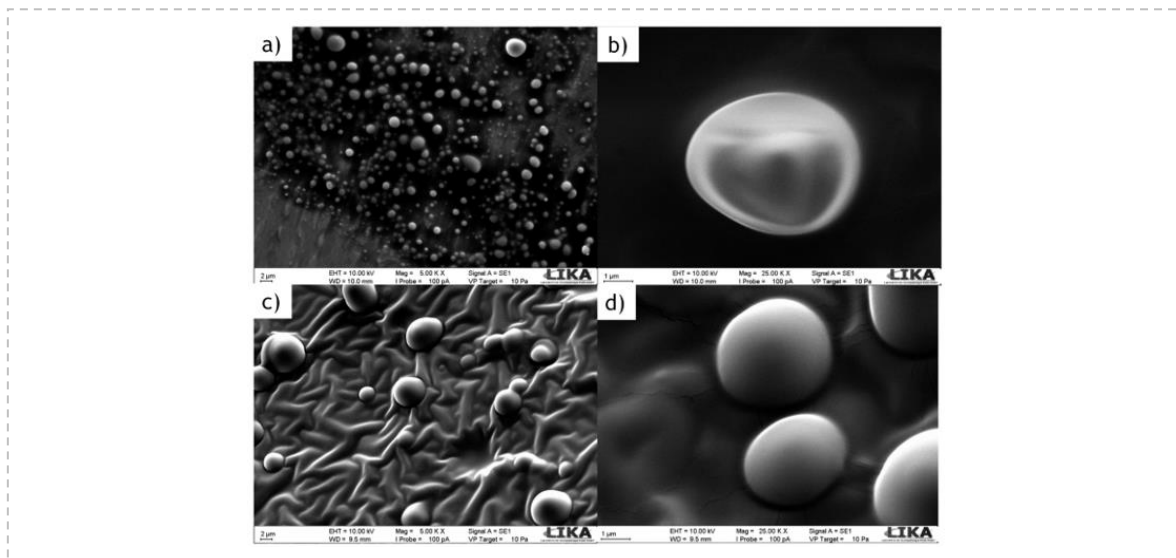


Figura 3

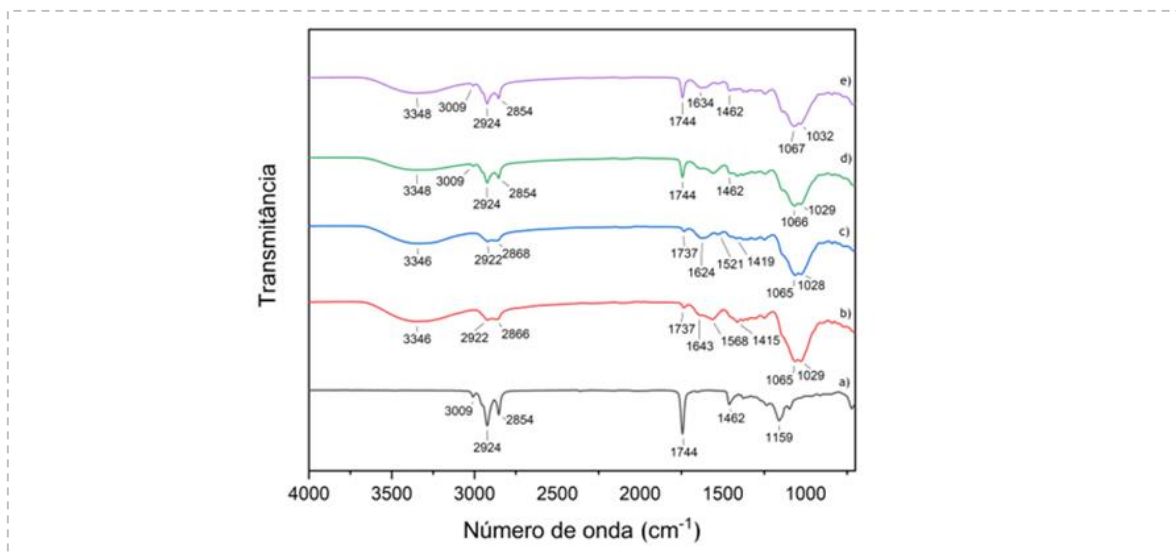


Figura 4

Microrganismos	NPQ-OSM*	NPC-OSM*
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	2,25	2,25
<i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 7664)	3,00	3,00
<i>Salmonella sp.</i> (ATCC 14028)	3,00	3,00
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	2,25	2,25
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 19433)	3,00	3,00
<i>Bacillus Cereus</i> (ATCC 14579)	3,00	3,00
<i>Colletotrichum siamense</i> (CMM 4077)	3,00	0,75
<i>Aspergillus niger</i> (URM 7282)	4,50	1,50

NPQ-OSM: nanopartículas de goma arábica-quitosana contendo o óleo da semente de maracujá; NPC-OSM: nanopartículas de goma arábica-cloridrato de quitosana contendo o óleo da semente de maracujá.

* A concentração inibitória mínima foi expressa em termos de concentração de óleo da semente de maracujá nas nanopartículas.

Figura 5

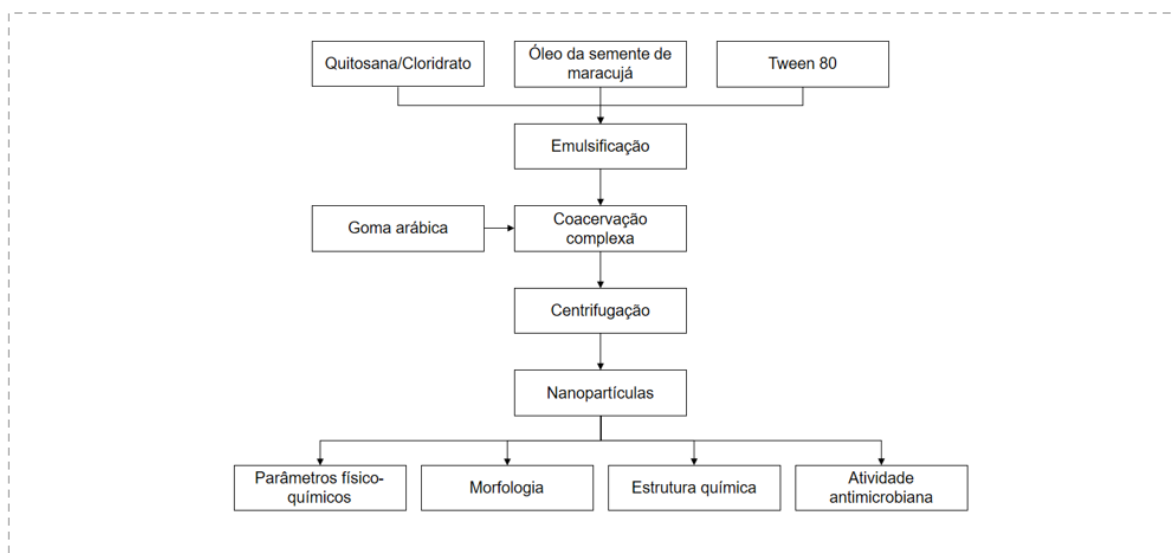


Figura 6

DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS ANTIMICROBIANOS À BASE DE
NANOPARTÍCULAS DE GOMA ARÁBICA-QUITOSANA/CLORIDRATO DE
QUITOSANA CONTENDO ÓLEO DA SEMENTE DE MARACUJÁ

RESUMO

A invenção compreende o desenvolvimento de produtos nanotecnológicos com propriedade antimicrobiana à base de nanopartículas de goma arábica-quitosana/cloridrato de quitosana contendo óleo da semente de maracujá. As partículas desenvolvidas apresentaram tamanho nanométrico, baixa polidispersão, carga positiva e mostraram-se estáveis, conservando seus aspectos macroscópicos e suas características acima citadas ao longo de 30 dias de armazenamento, além da ausência de formação de grumos ou separação de fases. A análise da estrutura química confirmou a nanoencapsulação do óleo e a ausência de interação química entre os materiais de parede e os compostos do mesmo. A microscopia eletrônica de varredura evidenciou a estrutura esférica uniforme, sem a presença de fissuras e ondulações em sua superfície e as análises de concentração inibitória mínima frente a bactérias e fungos atestaram a capacidade antimicrobiana das nanopartículas elaboradas com o óleo de semente de maracujá. Diante dos resultados de caracterização química, morfológica e análises antimicrobianas, infere-se que essas partículas podem ser direcionadas para o nanocarreamento de compostos funcionais em diversas áreas como alimentos e farmacêutica, além de serem uma alternativa como antimicrobiano natural.