UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MARCELA SARMENTO VALENCIA

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO POLIFENÓIS COM POTENCIAL APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

Recife
2020

MARCELA SARMENTO VALENCIA

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO POLIFENÓIS COM POTENCIAL APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Maria das Graças Carneiro da Cunha

Coorientadora: Prof.ª Dr.ª Marthyna Pessoa de Souza

Recife

2020

Catalogação na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Valencia, Marcela Sarmento
Obtenção e caracterização de nanopartículas contendo polifenóis com potencial aplicação na indústria de alimentos / Marcela Sarmento Valencia - 2020.
117 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Maria das Graças Carneiro da Cunha
Coorientador: Marthyna Pessoa de Souza
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Recife, 2020.

Inclui referências e anexo.

1. Compostos bioativos 2. Quercetina 3. Curcumina
I. Cunha, Maria das Graças Carneiro da (Orientador) II. Souza, Marthyna Pessoa de (Coorientador) III. Título

620.5 CDD (22.ed.) UFPE/CB-2020-053

MARCELA SARMENTO VALENCIA

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO POLIFENÓIS COM POTENCIAL APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 18/02/2020.

BANCA EXAMINADORA

_____
Prof.ª Dr.ª Maria das Graças Carneiro da Cunha (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

_____
Prof.ª Dr.ª Samara Alvachian Cardoso Andrade (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

_____
Prof.ª Dr.ª Silvana Magalhães Salgado (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

_____
Prof.ª Dr.ª Marthyna Pessoa de Souza (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Campina Grande

_____
Prof.º Dr. Francisco Humberto Xavier Júnior (Examinador Externo)
Universidade Potiguar

À Lúcia, minha mãe e luz da minha vida, responsável por todas as minhas conquistas, com todo meu amor.

Ao meu amado Renato.

Dedico esse trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Deus, sempre, pela paz, luz e amor que sempre guiaram meus caminhos, me dando força e coragem, neste presente sublime que é a vida.

À minha mãe que, com incentivo, paciência, amor e carinho, não mediu esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida. Sem você, nada seria possível. Com todo meu agradecimento e certeza posso dizer que você conseguiu!

Ao meu amor querido, Renato, por todo carinho, paciência, compreensão e paz, em todas as horas. Agradeço por você me receber com amor, alegria e conforto, todos os dias. Sem você, não teria forças para superar todas as dificuldades. Perdão pelas ausências.

À minha queria amiga Viviane Lansky. Só você sabe pelo que realmente passei durante este doutorado e sem você não teria conseguido continuar e terminar. Obrigada por todo apoio, ensinamento, força, orações e amor! Minha minha grande amiga do coração!

À minha Orientadora Prof.ª Graça, por acreditar no meu potencial. Agradeço a confiança e todo o incentivo.

À minha Coorientadora Marthyna por toda atenção e por não medir esforços para me auxiliar durante esses anos. Obrigada por ser tão dedicada e paciente, foi de extrema importância no desenvolvimento deste trabalho. Sem você, nada se concretizaria. Não poderia ter tido melhores orientações!! Agradeço profundamente seus valiosos ensinamentos.

Ao Prof.º Francisco Humberto pelas importantes sugestões na condução deste trabalho, pela atenção e preciosos ensinamentos. Sem seu vasto conhecimento não conseguiria terminar este trabalho. Queria ter conhecido o senhor antes mas tenho certeza que foi no momento certo.

À Prof.ª Samara Andrade, por ter me dado a primeira oportunidade, estando ao meu lado desde a iniciação científica. Obrigada também pela atenção e contribuição neste trabalho.

À Prof.ª Silvana Salgado por sempre acompanhar meus passos, desde a graduação e principalmente no mestrado, abrindo meus olhos para o mundo! Nunca me esquecerei de seus ensinamentos e alegria!!

Ao dedicado estagiário de iniciação científica Maurício, pela grandiosa ajuda na realização deste trabalho. Muito obrigada!

Aos Técnicos dos diversos laboratórios que passei que tanto me auxiliaram na realização das análises experimentais. Em especial Bruno, Camilo e Vivaldo, pelo companheirismo e parceria ao longo desses 4 anos.

Às minhas amigas que sempre torceram por mim, em especial Ana Karen e Larissa, pela força e compreensão em todos os momentos. Vamos comemorar muito todas nossas consquistas!

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da UFPE, docentes e funcionários.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo incentivo à pesquisa e bolsa concedida.

A todos, que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento e conclusão desse árduo trabalho.

“Quando abro a porta de uma nova descoberta, já encontro Deus lá dentro”.

Albert Einstein

RESUMO

A quercetina e a curcumina são polifenóis naturais, que apresentam atividades antioxidantes e farmacológicas com potencialidades para ampla aplicação em matrizes alimentícias. No entanto, a utilização desses flavonoides torna-se um desafio devido a sua lipofilicidade e baixa biodisponibilidade. Como forma de melhorar a dispersibilidade em meio aquoso, a proteção contra degradação e a biodisponibilidade destes polifenóis, este trabalho teve como objetivo obter e caracterizar nanopartículas contendo polifenóis assim como avaliar a sua potencialidade pela indústria alimentícia. As nanopartículas foram elaboradas através do gotejamento de uma solução de lecitina (25 mg/mL) contendo o polifenol (quercetina ou curcumina) em uma solução de quitosana (0,2%) em ácido láctico (1%) com posterior sonicação. Posteriormente, foram caracterizadas em termos de tamanho, PDI, potencial zeta, MET, eficiência de encapsulação, FT-IR, análises térmicas, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana, citotoxicidade e estabilidade ao longo da vida de prateleira à 4 e 30 °C. Após a caracterização, as nanopartículas contendo quercetina (100 µg/ml) foram adicionadas na pasta da amêndoa de castanha de caju após escalonamento com aumento de 3x, 5x e 10x mais lecitina e quitosana e aumento de 2x, 3x, 4x e 5x mais quercetina. Os produtos elaborados (pasta controle e pasta contendo nanopartículas) foram caracterizados quanto a composição centesimal e avaliadas quanto à estabilidade físico-química (pH, acidez, atividade de água, cor e índice de peróxido) e microbiológica, durante 30 dias (30 °C). A quercetina e curcumina foram encapsuladas com sucesso em nanopartículas de lecitina-quitosana com eficiência de encapsulação de 98,31% e 92,74%, respectivamente. As nanopartículas contendo quercetina (NPQ, 100 µg/mL) e curcumina (NPC, 70 µg/mL) apresentaram uma morfologia esférica, com tamanho médio de 241,27 nm e 236,27 nm, e potencial zeta de +38,9 mV e +51,3 mV, respectivamente. Com relação às atividades biológicas, as NPQ foram capazes de reduzir radicais DPPH e ABTS da mesma forma que a quercetina livre, assim como as NPC foram capazes de reduzir radicais DPPH semelhantemente à curcumina livre. A NPQ e NPC apresentaram excelente atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sem apresentar toxicidade contra células normais (PBMC e L-929) e inibindo a proliferação de células tumorais (HCT-116 e NCI-H292). Estudos de estabilidade mostraram que as nanopartículas foram

estáveis ao longo de 28 dias de armazenamento a 4 °C e 30 °C. Para aplicação da NPQ na pasta de castanha de caju, as nanopartículas com 5x mais lecitina e quitosana e 4x mais quercetina foram elaboradas com características físico-químicas similares às partículas originais. A pasta apresentou valores de 0,71% de umidade, 2,55% de cinzas, 47,80% de lipídeos, 21,09% de proteínas, 21,6% de carboidratos, 6,29% de fibra alimentar total e valor calórico de 600,96 Kcal/100g de pasta. A pasta contendo nanopartículas apresentou melhores características de pH e acidez ao longo do tempo, além de apresentar estabilidade quanto à avaliação microbiológica, atividade de água, cor e peróxidos. Estes resultados sugerem que as nanopartículas de lecitina-quitosana contendo quercetina ou curcumina podem ser utilizadas com potencial no desenvolvimento de alimentos de forma a melhorar suas propriedades físico-químicas e bioativas.

Palavras-chave: Compostos bioativos. Quercetina. Curcumina. Nanoencapsulação. Antioxidante. Alimentos funcionais.

ABSTRACT

Quercetin and curcumin are natural polyphenols, which have antioxidant and pharmacological activities with potential for wide application in food matrices. However, the use of these flavonoids becomes a challenge due to their lipophilicity and low bioavailability. As a way to improve dispersibility in aqueous media, protection against degradation and bioavailability of these polyphenols, this work aimed to obtain and characterize nanoparticles containing polyphenols as well as to evaluate their potential by the food industry. The nanoparticles were made by dripping a solution of lecithin (25 mg/mL) containing the polyphenol (quercetin or curcumin) in a solution of chitosan (0.2%) in lactic acid (1%) with subsequent sonication. Subsequently, they were characterized in terms of size, PDI, zeta potential, MET, encapsulation efficiency, FT-IR, thermal analysis, antioxidant activity, antimicrobial activity, cytotoxicity and stability over the shelf life at 4 and 30 °C. After characterization, nanoparticles containing quercetin (100 µg/ml) were added to the cashew nut paste after staggering with an increase of 3x, 5x and 10x plus lecithin and chitosan and an increase of 2x, 3x, 4x and 5x more quercetin. The elaborated products (control paste and paste containing nanoparticles) were characterized according to their chemical composition and evaluated for physical-chemical stability (pH, acidity, water activity, color and peroxide index) and microbiological, for 30 days (30 °C). Quercetin and curcumin were successfully encapsulated in lecithin-chitosan nanoparticles with encapsulation efficiency of 98.31% and 92.74%, respectively. The nanoparticles containing quercetin (NPQ, 100 µg/mL) and curcumin (NPC, 70 µg/mL) showed a spherical morphology, with an average size of 241.27 nm and 236.27 nm, and a zeta potential of +38.9 mV and +51.3 mV, respectively. Regarding biological activities, NPQs were able to reduce DPPH and ABTS radicals in the same way as free quercetin, just as NPCs were able to reduce DPPH radicals similarly to free curcumin. NPQ and NPC showed excellent antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, without toxicity against normal cells (PBMC and L-929) and inhibiting the proliferation of tumor cells (HCT-116 and NCI-H292). Stability studies have shown that the nanoparticles were stable over 28 days of storage at 4 °C and 30 °C. For application of NPQ in the cashew nut paste, the nanoparticles with 5x more lecithin and chitosan and 4x more quercetin were made with physicochemical characteristics similar to the original particles. The pulp showed

values of 0.71% moisture, 2.55% ash, 47.80% lipids, 21.09% protein, 21.6% carbohydrates, 6.29% total dietary fiber and value caloric content of 600.96 Kcal/100g of paste. The paste containing nanoparticles showed better characteristics of pH and acidity over time, in addition to presenting stability in terms of microbiological evaluation, water activity, color and peroxides. These results suggest that lecithin-chitosan nanoparticles containing quercetin or curcumin can be used with potential in the development of food in order to improve its physicochemical and bioactive properties.

Keywords: Bioactive compounds. Quercetin. Curcumin. Nanoencapsulation. Antioxidant. Functional foods.

LISTA DE FIGURAS

Revisão da Literatura

Figura 1 - Representação dos sistemas nanoestruturados: (a) lipossoma; (b) nanoemulsão; (c) nanopartícula lipídica sólida (SLN); (d) carreador lipídico nanoestruturado (NLC); (e) nanocápsula e; (f) nanoesfera (Pohlmann et al., 2016)..... 23

Figura 2 - Estrutura esquemática de nanocápsulas (a) e nanoesferas (b) (Orive et al., 2009)..... 24

Figura 3 - Obtenção de nanopartículas usando processo (A) *top-down* e (B) *bottom-up* (Li et al., 2015)..... 25

Figura 4 - Materiais carreadores simples e combinados (Canizales et al., 2018)..... 27

Figura 5 - Estrutura básica dos flavonoides (Nabavi et al., 2018)..... 32

Figura 6 - Estrutura química da quercetina (D'Andrea, 2015)..... 32

Figura 7 - Rizoma da cúrcuma (a), curcumina em pó (b) e estrutura química da curcumina (c) (Hussain et al., 2017)..... 37

Artigo 1

Figure 1 - Size of lecithin-chitosan (NP) nanoparticles obtained by ultrasonication as a function of frequency/time (40 Hz, dark column; 80 Hz, light column)…….. 49

Figure 2 - Size (nm, --▲--) and Polydispersity index (PDI, ▬●▬) of lecithin-chitosan nanoparticles obtained by ultrasonication as a function of quercetin concentration (µg/ml)……... 50

Figure 3 - FT-IR spectra of quercetin (blue line), NP (red line) and NPQ (black line)……. 53

Figure 4 - Thermogravimetric analysis (TGA) (A) and Differential Scanning Calorimetry (DSC) (B) of quercetin (blue line), NP (red line), and NPQ (black line)……. 54

Figure 5 - Electron transmission imagery of the morphology and dispersion of the lecithin-chitosan (NP) nanoparticles (A and C) and the quercetin-loaded, lecithin-chitosan nanoparticles (NPQ) (B and D)……..…… 55

Artigo 2

Figura 1 - Tamanho e índice de polidispersão (PDI) das nanopartículas de lecitina-quitosana obtidas por ultrassom em função da concentração de curcumina (µg/ml). Tamanho (—●—) e PDI (—■—)..... 76

Figura 2 - Imagens eletrônicas de transmissão da dispersividade (A) e morfologia (B) das nanopartículas de lecitina-quitosana contendo curcumina (70 µg/mL)..... 78

Figura 3 - Espectro FT-IR da curcumina (linha azul), nanopartículas contendo curcumina (linha preta) e nanopartículas vazias (linha vermelha)..... 79

Figura 4 - Análise termogravimétrica (TGA) (A) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) (B) da curcumina (linha preta), quitosana (linha vermelha), lecitina (linha rosa), nanopartículas de lecitina-quitosana (NP, linha verde) e nanopartículas de lecitina-quitosana contendo curcumina (NPC, linha azul)..... 80

Figura 5 - Figura 5. Percentual de Inibição Celular (%) em células normais, PBMC (células mononucleadas de sangue periférico humano) e L-929 (fibroblasto mutinho) e células tumorais, MCF-7 (câncer de mama humano), HCT-116 (câncer de colorretal humano) e NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano). Nanopartículas de lecitina-quitosana vazias (NP), nanopartículas contendo curcumina (NPC) e curcumina pura (C)..... 84

Figura 6 - Estabilidade quanto ao tamanho médio (nm) e potencial zeta (mV) das nanopartículas de lecitina-quitosana contendo curcumina (70 µg/ml), a 4 °C e 30 °C, durante 28 dias de armazenamento. Tamanho a 4 °C (coluna preta), tamanho a 30 °C (coluna cinza), potencial zeta a 4 °C (linha preta) e potencial zeta a 30 °C (linha cinza)..... 85

Artigo 3

Figura 1 - Média dos tamanhos (nm) (A), PDI (B) e potencial zeta (B) das nanopartículas sem quercetina (NP) com diferentes fatores de concentrações (1x, 3x, 5x e 10x maior) de quitosana e lecitina. B: PDI, linha preta e potencial zeta, coluna cinza..... 97

Figura 2 - Tamanhos (nm) (A), PDI (B) e potencial zeta (B) das nanopartículas de lecitina-quitosana escalonadas com diferentes concentrações (1x, 2x, 3x, 4 e 5x maior) de quercetina (NQ). B: PDI, linha preta e potencial zeta, coluna cinza..... 98

Figura 3 - Índice de pH (A) acidez (B) da pasta controle (PC, coluna preta) e pasta adicionada de nanopartícula contendo quercetina (PQ, coluna cinza) durante o armazenamento (30 dias)..... 100

LISTA DE TABELAS

Revisão da Literatura

Tabela 1 - Aplicação de nanopartículas em alimentos..... 28

Tabela 2 - Estudos publicados sobre síntese de nanoestruturas contendo quercetina..... 36

Tabela 3 - Propriedades terapêuticas atribuídas à curcumina..... 38

Artigo 1

Table 1 - Antioxidant activity by the elimination capacity of DPPH, ABTS and FRAP of NP, NPQ and QE……. 56

Table 2 - Antimicrobial activity expressed as minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) and minimum fungicidal concentration (MFC)…… 58

Table 3 - Percentage of Cell Inhibition (%) in normal cells (L-929 and PBMC) and neoplastic cells (MCF-7, HCT-116 and NCI-H292)…… 60

Artigo 2

Tabela 1 - Atividade antioxidante pela capacidade de eliminação do DPPH de NP, NPC e C..... 82

Tabela 2 - Atividade antimicrobiana expressa em concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM)..... 83

Artigo 3

Tabela 1 - Proporção dos componentes utilizados para escalonamento das nanopartículas de lecitina-quitosana (NP)..... 94

Tabela 2 - Composição química da pasta de amêndoa de castanha de caju (*Anacardium occidentale* L.)..... 99

Tabela 3 - Valores obtidos do parâmetro L* e das coordenadas cromáticas a* e b* da análise de cor das amostras PC e PQ durante o armazenamento (30 dias) a 30 °C..... 101

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO.....**	16
2	**REVISÃO DA LITERATURA.....**	18
2.1	Nanotecnologia em alimentos.....	18
2.2	Nanopartículas.....	23
2.3	Aspectos toxicológicos.....	28
2.4	Legislação.....	29
2.5	Polifenóis.....	30
2.5.1	**Quercetina.....**	32
2.5.2	**Curcumina.....**	37
3	**OBJETIVOS.....**	40
3.1	Objetivo geral.....	40
3.2	Objetivos específicos.....	40
4	**RESULTADOS.....**	41
4.1	ARTIGO 1 - QUERCETIN-LOADED, LECITHIN-CHITOSAN NANOPARTICLES: PHYSICAL, CHEMICAL, BIOACTIVITY AND TOXICITY CHARACTERIZATION.....	41
4.2	ARTIGO 2 - ENCAPSULAÇÃO DE CURCUMINA EM NANOPARTÍCULAS DE LECITINA-QUITOSANA: CARACTERIZAÇÃO, PROPRIEDADES CITOTÓXICAS E BIOATIVAS.....	67
4.3	ARTIGO 3 - EFEITO DA ADIÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE LECITINA-QUITOSANA CONTENDO QUERCETINA EM PASTA DA AMÊNDOA DE CASTANHA DE CAJU (*ANACARDIUM OCCIDENTALE* L.).....	90
5	**CONCLUSÃO.....**	105
	REFERÊNCIAS.....	106
	ANEXO A – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 1 NA REVISTA *COLLOIDS AND SURFACES B: BIOINTERFACES*.....	117

1 INTRODUÇÃO

Os produtos alimentícios vêm evoluindo e deixando de ser apenas fonte de energia e nutrientes, passando a contribuir ativamente com a saúde dos consumidores. Os compostos bioativos são constituintes presentes naturalmente em pequenas quantidades nos alimentos, sendo considerados componentes extra nutricionais. A cada dia aumenta o número de evidências mostrando a importância desses compostos na redução dos riscos de doenças (MARSANASCO et al., 2015; INGALE; CHAUDHARI, 2018).

Dentre os compostos bioativos, o interesse pelos polifenóis tem aumentado consideravelmente ao longo dos anos. Estes são compostos tipicamente utilizados como parte da dieta humana, sendo um dos mais numerosos grupos de metabólitos secundários de plantas que têm grande espectro de atividade biológica. Entretanto, têm baixa biodisponibilidade quando ingeridos na sua forma *in natura* (ESFANJANI; JAFARI, 2017).

Os compostos fenólicos podem ser aplicados na indústria alimentícia através de diversos setores, como a) produto alimentício, na forma de sólidos ou líquidos a serem adicionados para fortificação de alimentos, ou formulações como pós de gelatina, pós de bolos, sucos em pó, caldos; b) setor de laticínios, fortificando o leite, iogurtes, queijos, sem alterar suas características sensoriais e reológicas; c) panificação, pães, bolos, biscoitos bolachas, muffins, com fortificação antes ou após seu preparo; e d) setor de bebidas (ESFANJANI; JAFARI, 2017).

Porém, o uso de polifenóis como ingrediente bioativo é limitado, dada à perda e inativação e/ou degradação, exigindo grandes doses para alcançar efeitos benéficos (AKOLADE; OLOYEDE; ONYENEKWE, 2017). Dentre outros fatores que limitam a utilização desses compostos está seu gosto amargo e adstringente, a sua reduzida biodisponibilidade oral, devido à sua baixíssima solubilidade em água, a degradação destes compostos quando expostos a condições desfavoráveis durante o processamento (alta temperatura e pressão) e armazenamento (presença de oxigênio, instabilidade a luz UV, temperatura), além da curta meia-vida biológica, baixa absorção no trato gastrointestinal, rápida metabolização e eliminação. Isto pode restringir suas aplicações em escala industrial (HUSSAIN et al., 2018; NAYAK; ESPINOSA; NORTON, 2017).

Várias estratégias têm sido empregadas para superar as questões relacionadas à entrega efetiva e aumento da estabilidade dos polifenóis durante o desenvolvimento, armazenamento e consumo de produtos alimentícios. As abordagens baseadas em nanotecnologia ganharam notável atenção ao seu potencial em melhorar as atividades *in vitro* e *in vivo* de polifenóis, por sua alta eficiência de encapsulação, biodegradabilidade e biocompatibilidade, sendo uma das tecnologias mais promissoras para carrear esses compostos eficientemente (LI et al., 2015; HUSSAIN et al., 2018; RAMASWAMY et al., 2017; INGALE; CHAUDHARI, 2018).

Entre os diferentes tipos de sistemas nanocarreadores, as nanopartículas híbridas compostas de polissacarídeos, como a quitosana, e lipídios, como a lecitina, têm apresentado uma série de propriedades interessantes para entrega de polifenóis. Graças à interações eletrostáticas, formam um nanocarreador com estrutura estável e rígida, caracterizada por um núcleo oleoso carregado negativamente, estabilizado pela lecitina contendo o polifenol hidrofóbico, revestido pela quitosana catiônica. Esta estrutura permite maior dispersibilidade, garantindo boa biocompatibilidade, adesividade mucosa superior e citotoxicidade insignificante (CLEMENTINO; SONVICO, 2018; ALKHOLIEF, 2019).

Assim, a forte demanda por alimentos funcionais e melhorias nas técnicas de nanocarreamento de compostos bioativos torna relevante o estudo de formas para nanoencapsular compostos fenólicos, como a quercetina e curcumina, vislumbrando sua aplicação na indústria alimentícia.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 NANOTECNOLOGIA EM ALIMENTOS

A nanociência é uma área multidisciplinar com grande potencial de aplicação tecnológica, sendo a nanotecnologia considerada uma valiosa ferramenta para o aperfeiçoamento de processos e o desenvolvimento de novos produtos (MARTINS et al., 2015). A nanotecnologia refere-se a um campo da tecnologia, que integra várias áreas de conhecimento, incluindo física, química, biotecnologia e engenharia (BAJPAI et al., 2018) e é responsável pela utilização de materiais orgânicos e inorgânicos em escala nanométrica para a obtenção de processos e produtos de melhor desempenho, permitindo melhorar as abordagens já conhecidas para resolução de problemas em diferentes campos (ASSIS et al., 2012; AZEREDO, 2012; HANDFORD et al., 2015; MARTINS et al., 2015).

A natureza criou os blocos de construção da vida em nanoescala como DNA, aminoácidos e açúcares. Inspirado pela criação da natureza, o homem projetou os nanomateriais, para o progresso e prosperidade da humanidade, mostrando que as nanoestruturas possuem propriedades funcionais únicas, sendo seu estudo fundamental no desenvolvimento de diversas áreas científicas, particularmente no campo da biotecnologia (CUSHEN et al., 2011; EZHILARASI et al., 2012).

O conceito de nanoestruturas foi proposto em 1959, pelo físico norte americano Richard Phillips Feynman que, ao participar de um encontro promovido pela Sociedade Americana de Física, no Instituto de Tecnologia da Califórnia e, em uma de suas palestras, marcou a história da nanotecnologia ao afirmar que:

> *"... os princípios da física não falam contra a possibilidade de se manipular as coisas átomo por átomo..."*
>
> (MARTINS et al., 2015)

Desde então pesquisas indicam que as propriedades de muitos materiais podem ser melhoradas com a adição de nanocompósitos (ALMEIDA et al., 2015).

O termo nanotecnologia para denominar a aplicação da ciência em nanoescala só surgiu em 1974, quando Norio Taniguchi, pesquisador da Universidade de Tokio, distinguiu o novo campo da engenharia em escala sub-

micrométrica, da engenharia em escala micrométrica. O prefixo “nano”, originado do idioma grego, significa “anão” e, portanto, os materiais empregados tendem a apresentar pelo menos uma dimensão em nanoescala, entre 1 nm a 100 nm (1 nm = 10^{-9} m) (TINKLE et al., 2014).

No ano de 2011 a agência regulamentadora americana, Food and Drug Asministration (FDA), emitiu um projeto de orientação para indústria intitulado “Considering Whether an FDA Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology”. Segundo essas orientações, para saber se um produto utiliza a nanotecnologia, deve-se fazer as seguintes perguntas: (1) se o material projetado ou produto final tem pelo menos uma dimensão em nanoescala (aproximadamente 1-100 nm); ou (2) se um material projetado ou produto final exibe propriedades ou fenômenos, inclusive físicos ou propriedades químicas ou efeitos biológicos, que são atribuíveis às suas dimensões, mesmo que estas dimensões estejam fora da faixa da nanoescala, até 1 micrômetro (1000 nm). Já segundo recomendação da Comissão Europeia, a definição de nanomateriais consiste em um material natural, incidental ou manufaturado contendo partículas, em estado não ligado ou agregado ou aglomerado e onde, para 50% ou mais das partículas na distribuição de tamanho numérico, uma ou mais dimensões externas estiverem na faixa de tamanho 1-100 nm. Em casos específicos e sempre que tal se justifique por preocupações ambientais, de saúde, segurança ou de competitividade, o limiar de distribuição do tamanho dos números de 50% pode ser substituído por um limiar entre 1 e 50% (TINKLE et al., 2014).

Os produtos derivados da nanotecnologia podem exibir propriedades físico-químicas singulares (como solubilidade, toxicidade, força, magnetismo, difusividade, óptica, cor e termodinâmica) ou fenômenos (incluindo efeitos biológicos) que são atribuíveis às suas dimensões, únicas, com alta relação de volume superficial, que não estavam presentes nos materiais em macroescala na sua forma original (BAJPAI et al., 2018; PATEL et al., 2018ª).

Devido suas propriedades funcionais únicas, a nanotecnologia vem sendo empregada em diferentes formas e aplicações em diversos setores, tais como: eletrônicos, materiais, energia, cosméticos, vestuário, medicamentos, computação molecular, têxtil, medicina, agricultura e alimentos (GHANBARZADEH; OLEYAEI; ALMASI, 2014).

Dentre as inúmeras aplicações da nanotecnologia na indústria de alimentos podemos citar o desenvolvimento de sistemas para aumentar o prazo de validade dos produtos, desenvolvimento de nanossensores para rastreamento de contaminantes, detecção de patógenos ou metabólitos tóxicos (segurança alimentar) e desenvolvimento de revestimentos e embalagens inteligentes e melhoria sensorial (cor, textura, sabor e aroma). Além disso, a nanotecnologia também pode melhorar a solubilidade em água, estabilidade térmica e biodisponibilidade de diversos compostos como vitaminas lipossolúveis, ácidos graxos e óleos essenciais, aromas e componentes aromáticos, além de compostos fenólicos (EZHILARASI et al., 2012; PATEL et al., 2018).

A incorporação da nanotecnologia aumentou significativamente a vida de prateleira dos alimentos com melhor manejo do grau de deterioração dos produtos alimentícios já que métodos convencionais rotineiramente empregados para a detecção de patógenos alimentares ou seus metabólitos tóxicos são demorados, trabalhosos e caros em comparação com os dispositivos ou métodos baseados na nanotecnologia, que são rápidos, precisos e econômicos. Técnicas baseadas em nanotecnologia podem detectar patógenos nos vários estágios da produção de alimentos e fornecer resultados rápidos (HAMAD et al., 2018; PATEL et al., 2018).

A nanotecnologia pode ser aplicada também na nutrição, seja pela fortificação de alimentos, como no desenvolvimento de alimentos funcionais e nutracêuticos. A incorporação de elementos funcionais nos alimentos tem sido uma área pesquisada há muito tempo e a nanotecnologia ampliou os caminhos. Em alimentos funcionais um nanomaterial pode ser incorporado para entregar compostos bioativos, como os polifenóis, melhorando suas características. Isto pode ser possível devido à capacidade única destes componentes em escala nano de aumentar a solubilidade, biodisponibilidade e proteção dos compostos bioativos durante o processamento e armazenamento dos alimentos, bem como impedir sua degradação no ambiente gastrintestinal (HU et al., 2017; PATHKOTI; MANUBOLU; HWANG, 2017; BAJPAI et al., 2018).

Algumas aplicações da nanotecnologia na indústria alimentícia são nanocompósitos em material de embalagem de alimentos para controle de difusão e proteção microbiana, nanobiosensores para detecção de contaminação e deterioração da qualidade, e nanocarreador para controle entrega de nutracêuticos (EZHILARASI et al., 2012). Por exemplo, produtos com alto teor de gordura

(maionese, coberturas e sorvetes) foram suplementados com nanoemulsionantes permitindo uma redução da quantidade de gordura usada sem influenciar a cremosidade e, assim, levando a produtos mais saudáveis. Outro exemplo é o acréscimo ao pão de óleo de peixe, encapsulado dentro de lipossomas, para melhorar seus benefícios para a saúde. Neste caso, o principal benefício do encapsulamento é mascarar o sabor do óleo de peixe, aumentando o valor nutracêutico do pão sem alterar suas propriedades sensoriais (OJAGH; HASANI, 2018).

Um dos maiores focos da nanotecnologia em alimentos são os nanocarreadores. Estes ocorrem geralmente por transportadores nanométricos, que aumentam a absorção e a biodisponibilidade de substâncias bioativas e minerais no organismo humano. Desta forma tendem a proteger os nutrientes, aumentando a estabilidade destes frente à umidade, ao oxigênio e as condições gástricas, carregando-os através do estômago até o intestino delgado, sem perda significativa das substâncias (BOUWMEESTER et al., 2009; GREINER, 2009; ASSIS et al*.,* 2012; MARTINS et al., 2015).

Existem diferentes nanocarreadores como nanoargilas, nanolaminados, nanotubos nanofibras, nanoemulsões, lipossomas e nanopartículas (PATEL et al., 2018; REZAEI; FATHI; JAFARI, 2019). Cada tipo de sistema de entrega de bioativos é caracterizado por vantagens e desvantagens. A seleção da melhor técnica depende do objetivo para a formulação, natureza do composto bioativo (solúvel em óleo ou em água, sensibilidade ao processo), tipo de processamento do alimento (cozimento, pasteurização, esterilização, mistura com outros componentes) e o custo (ESFANJANI; JAFARI, 2017).

Segundo Assadpour e Jafari (2019), podem-se classificar os nanocarreadores adicionados em alimentos em 5 classes baseadas nos principais ingredientes/equipamentos utilizados em sua formulação:

1) Nanocarreadores à base de lipídios, são os formulados por lipídios (gorduras e óleos). Como exemplo tem-se: a) nanoemulsões: nanoemulsões simples de água em óleo ou óleo em água (A/O ou O/A); nanoemulsões duplas (O/A/O ou A/O/A); nanoemulsões de Pickering, estabilizadas por nanopartículas de biopolímero; e nanoemulsões estruturais, estabilizadas por camadas simples ou dupla de biopolímeros; b) carreadores fosfolipídicos nanoestruturados, como os lipossomas que podem ser preparado por fosfolipídios, óleos e diferentes solventes,

monocamada ou multicamada de fosfolipídios, os nanofitossomos e lipossomas/nanofitossomos estruturais; e c) os últimos grupos nesta classe são formulados por nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs) e carreadores lipídicos nanoestruturados (NLCs), uma mistura de lipídios sólidos e óleos (líquidos). Estes últimos são a mais nova geração de nanocarreadores à base de lipídios, tendo maiores vantagens do que nanoemulsões devido ao menor vazamento de ingredientes bioativos aprisionados e um melhor controle do tamanho e processo de liberação.

2) Nanocarreadores inspirados na natureza, são os nanoveículos que existem na natureza e estão sendo utilizados como sistemas de carreamento para ingredientes bioativos, incluindo diferentes formas de caseínas (alfa, beta e gama), ciclodextrinas (alfa, beta e gama) e nanoestruturas de amilose (simples hélice e dupla hélice).

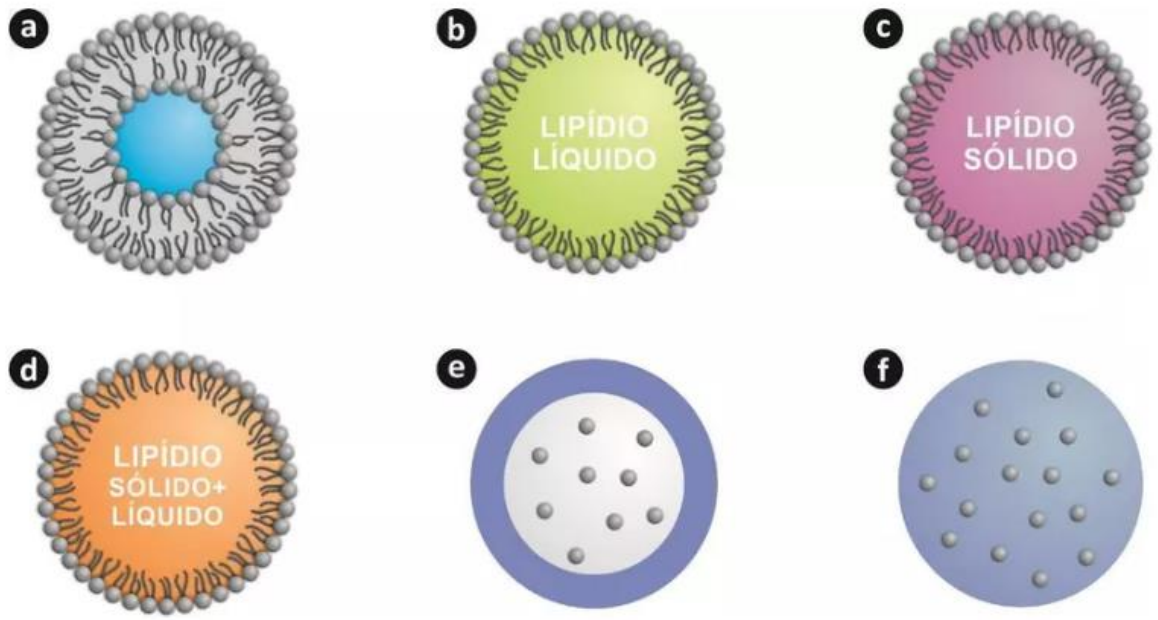
3) Nanocarreadores baseados em equipamentos especiais, a terceira classe de nanocarreadores de alimentos são aqueles que precisam ser produzidos por equipamentos especiais tais como eletrofiação, eletropulverização, nano *spray dryer* e sistemas micro/nano-fluídicos, enquanto que para as outras classes de nanocarreadores podem ser aplicados equipamentos comuns e mais disponíveis, incluindo homogeneizadores de alta pressão, dispositivos de sonicação, dispositivos rotor-estator, etc.

4) Nanopartículas de biopolímeros, podem ser formulados nanocarreadores de biopolímero único (nanopartículas de proteínas feitas por dessolvatação ou nanopartículas de polissacarídeos feitas por precipitação); nanopartículas complexadas com dois biopolímeros diferentes (proteína e proteína; polissacarídeo e polissacarídeo; proteína e polissacarídeo); nanogeis de biopolímeros (hidrogéis, organogéis/oleogéis e géis mistos), como alginatos, proteínas de soro de leite e soja, e quitosana; nanotubos (proteicos feitos com alfa-lactalbumina) e nanofibras.

5) Nanocarreadores diversos, não cobertos pelas 4 classes anteriores, incluindo nanopartículas produzidas com polímeros químicos (exemplo: dendrímeros); surfactantes nanoestruturados (exemplos: niossomas, cubossomos e microemulsões); nanocarreadores inorgânicos (exemplo: nanoargila, *quantum dots*, nanopartículas de ouro e magnéticas); e nanocristais (bioativos dentro dos cristais ou cristais bioativos dentro de outros nanocarreadores).

Dentre esses diversos nanocarreadores, os com maior potencial para distribuição de compostos bioativos são os nanocarreadores à base de lipídios (nanoemulsões, lipossomas e SLNs) assim como as nanopartículas poliméricas, à base de proteínas e polissacarídeos (Figura 1). Propriedades estruturais específicas desses nanossistemas, bem como seu baixo custo e sua natureza não tóxica, os tornam portadores adequados na entrega de compostos bioativos em alimentos, em comparação com outros sistemas (MARTINEZ-BELLESTA et al., 2018).

Figura 1. Representação dos sistemas nanoestruturados: (a) lipossoma; (b) nanoemulsão; (c) nanopartícula lipídica sólida (SLN); (d) carreador lipídico nanoestruturado (NLC); (e) nanocápsula e; (f) nanoesfera (Pohlmann et al., 2016).



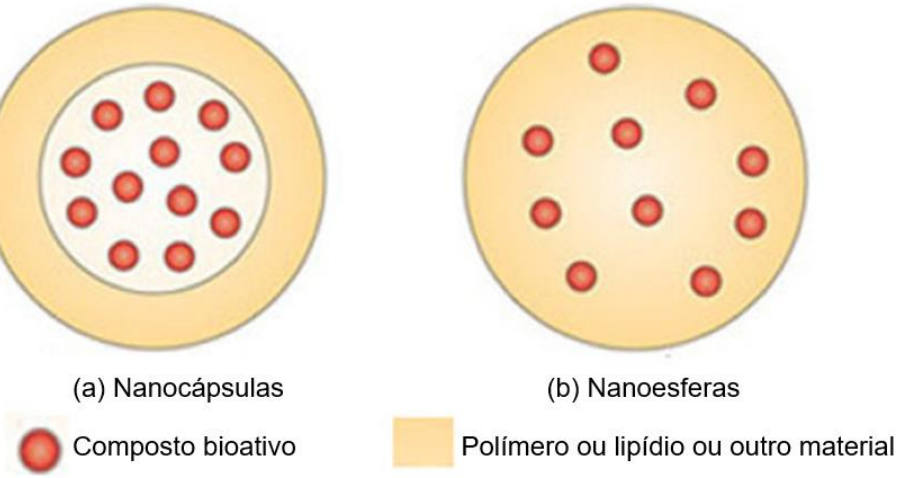
2.2 NANOPARTÍCULAS

Nanopartículas são portadores sólidos de tamanho submicrônico (diâmetros que variam de 1 a 1.000 nm), de natureza polimérica (naturais ou artificiais) ou lipídicas (PATEL, 2018), que estão na forma de nanoesferas ou nanocápsulas. As nanoesferas são estruturas matriciais que encapsulam os compostos ativos, que ficam uniformemente dispersos, dentro da matriz, formando uma estrutura homogênea. As nanocápsulas têm uma estrutura vesicular com um núcleo central envolvido por uma membrana única e as substâncias podem se dissolver no núcleo

interno ou adsorver na superfície da cápsula (Figura 2) (EZHILARASI et al., 2013; PISOSCHI et al., 2018; REZAEI; FATHI; JAFARI, 2019).

Várias técnicas foram desenvolvidas e utilizadas com o propósito de encapsulação. Emulsificação, coacervação, complexação de inclusão, emulsificação - evaporação do solvente, nanoprecipitação e técnica de fluido supercrítico são consideradas como técnicas para elaboração de nanopartículas, uma vez que podem produzir partículas na faixa nanométrica.

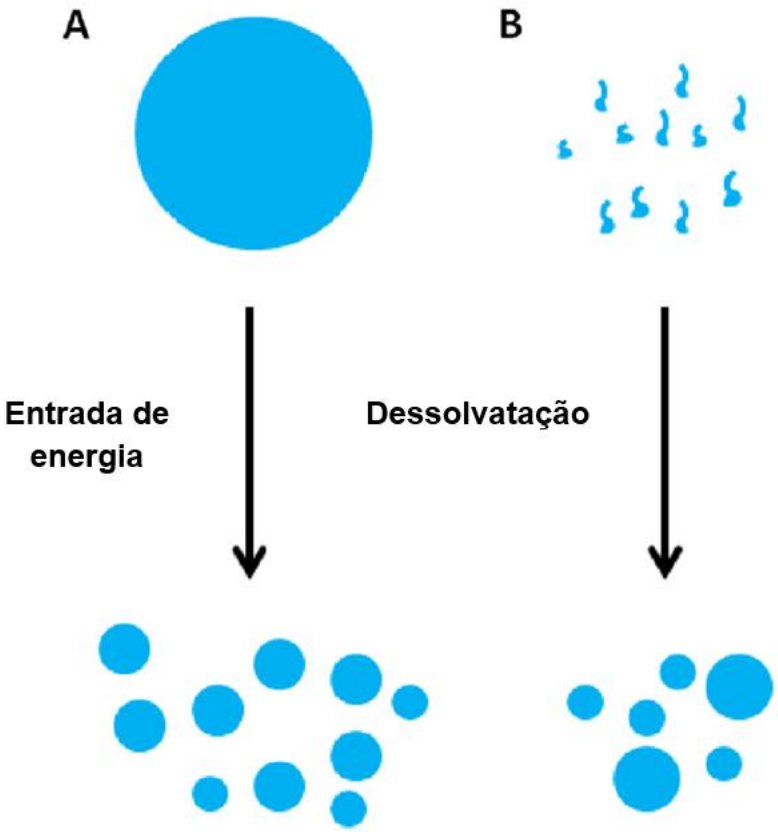
Figura 2. Estrutura esquemática de nanocápsulas (a) e nanoesferas (b) (Orive et al., 2009).



Os métodos de síntese de nanopartículas são geralmente agrupados em duas categorias: *top-down* e *bottom-up*. O primeiro consiste na divisão de grandes compostos em porções menores, de cima para baixo (abordagem descendente), ou seja, na desmontagem de produtos macro ou microscópicos (*top-down*) até o nível nanométrico. Essa abordagem pode envolver forças mecânicas, moagem ou desgaste, métodos químicos, ou a volatilização de um sólido seguido de condensação dos componentes volatilizados (emulsificação e emulsificação-evaporação do solvente). A segunda abordagem, de baixo para cima (abordagem ascendente), permite imitar a natureza e refere-se à fabricação de nanopartículas através da condensação de entidades moleculares em uma fase gasosa ou em solução, ou seja, na montagem de moléculas (*bottom-up*) para formar novos compostos químicos ou nanoestruturas (coacervação, nanoprecipitação, complexação de inclusão e técnica de fluido supercrítico) (Figura 3).

O desenvolvimento das partículas por esta categoria (*bottom-up*) depende da automontagem ou auto-organização das moléculas e o tamanho pode aumentar progressivamente (JAFARI, 2017; PISOSCHI et al., 2018; CANIZALES et al., 2019). Esta última abordagem é muito mais popular na síntese de nanopartículas, expandindo as possibilidades de aplicação, assim como também pode ser utilizada a combinação de ambas as abordagens (AZEREDO, 2012; CARRILLO-INUNGARAY, 2018).

Figura 3. Obtenção de nanopartículas usando processo (A) *top-down* e (B) *bottom-up* (Li et al., 2015).



Nanopartículas poliméricas são partículas sólidas coloidais constituídas por material polimérico. Polímeros derivados de alimentos são frequentemente usados para encapsular componentes bioativos devido à sua abundância, valor, biodisponibilidade, baixo custo, propriedades químicas versáteis e seu status GRAS (Geralmente reconhecido como seguro). Sistemas à base de carboidratos (polissacarídeos) e proteínas são os principais sistemas de nanodistribuição

utilizados para melhorar a biodisponibilidade de polifenóis (FANG; AL-SUWAYEH; FANG, 2013; AGUIRRE; BORNEO, 2019).

O uso de polissacarídeos tem sido enfatizado como uma alternativa valiosa, visto sua natureza anfifílica, que permite a auto-montagem em ambientes aquosos, ajudando a formar estruturas específicas. Polissacarídeos são amplamente utilizados devido suas enormes estruturas moleculares e, portanto, maior capacidade de aprisionamento do composto bioativo. Dentre os polissacarídeos utilizados, a quitosana, forma desacetilada da quitina, é o polissacarídeo mais amplamente utilizado e tem sido descrita como um material não tóxico, biodegradável e bioadesivo que fornece as vantagens de controle de liberação de agentes encapsulados, complexação com macromoléculas carregadas e residência por tempo prolongado no local de absorção devido à sua natureza mucoadesiva. Além disso, as nanopartículas de quitosana são adequadas para serem modificadas pela adição de ligantes específicos que contribuem para um processo mais rápido e eficiente de interação com as membranas das células e, portanto, para uma entrega aumentada de compostos bioativos (MARTINEZ-BALLESTA et al., 2018; AGUIRRE; BORNEO, 2019). Sistemas baseados em carboidratos são mais resistentes a processos de alta temperatura em comparação com sistemas lipídicos ou proteicos, o que é essencial considerar no desenvolvimento de certos produtos alimentares (CANIZALES et al., 2019).

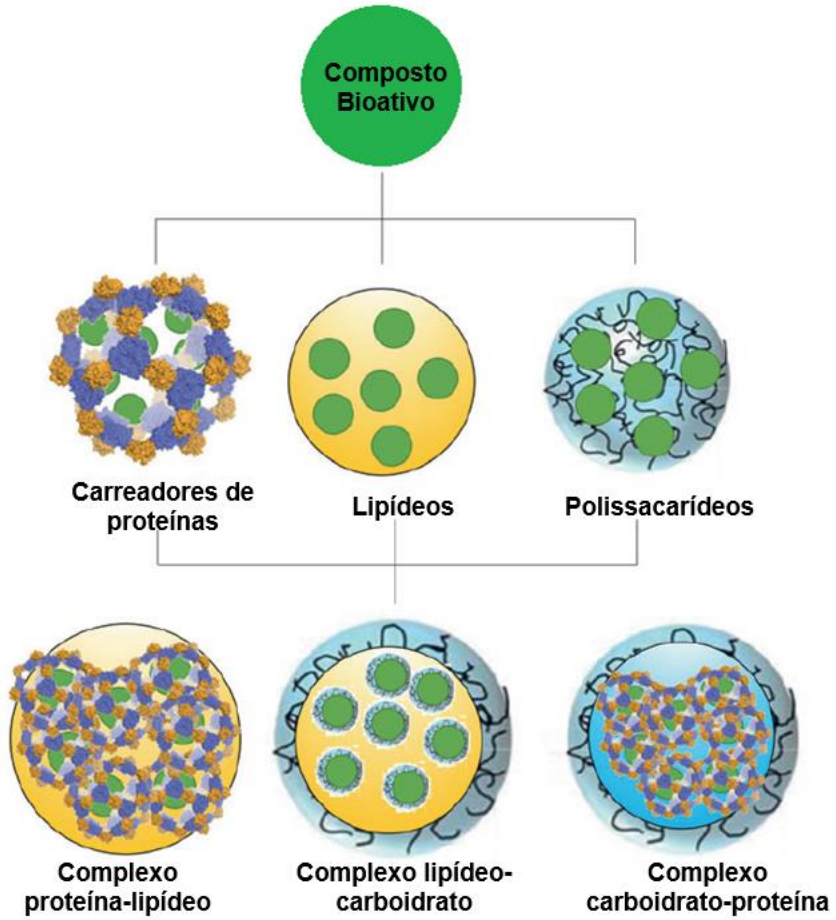
As nanopartículas de proteínas podem ser obtidas a partir de uma infinidade de abordagens de laboratório, cada uma delas com suas vantagens e restrições. Proteínas alimentares são biodegradáveis e com excelente capacidade de ligação para muitos compostos bioativos, incluindo polifenóis. Elas têm valor nutricional e, além disso, a degradação das proteínas gera biopeptídeos, que podem exercer efeitos benéficos adicionais à saúde, tendo como exemplo a proteína do soro do leite (principalmente b-lactoglobulina, b-LG) (AGUIRRE; BORNEO, 2019).

Outras vantagens no uso de proteínas são a sua abundância na natureza (bactérias, fungos, plantas e animais), sua adequação para ser transformada e a ausência de efeitos deletérios em relação a sistemas em que são aplicadas. A primeira classificação de nanopartículas baseadas em proteínas refere-se à sua origem, podendo ser animal ou vegetal. Os diversos tipos de proteínas animais estão associados a benefícios e restrições, principalmente em relação à toxicidade associada à sua aplicação, enquanto as proteínas vegetais fornecem a vantagem de

suas características hidrofóbicas, o que é associado com a menor toxicidade e um menor custo. Além disso, as características da superfície das nanopartículas de proteínas são suscetíveis a serem modificadas devido à ocorrência de grupos funcionais, que é de importância crucial para a biodistribuição desejada, biocompatibilidade, capacidade de transporte de moléculas e estabilidade (MARTINEZ-BALLESTA et al., 2018).

Também podem ser formulados nanocarreadores combinados com misturas de proteínas, carboidratos e lipídios. O uso destes sistemas combinados mescla as vantagens de cada nanocarreador. A adição de proteínas à sistemas de emulsão é a combinação mais comum desses carreadores (Figura 4) (CANIZALES et al., 2018).

Figura 4. Materiais carreadores simples e combinados (Canizales et al., 2018).



As propriedades funcionais características das nanopartículas são atribuídas à sua maior área de superfície em comparação com materiais volumosos de maior tamanho. Desta forma, a maior área superficial de nanopartículas por unidade de massa as torna agentes adequados para encapsular substâncias bioativas para uma

melhor entrega e atividade biológica através de sua adição em alimentos (KUMARI; YADAV; YADAV, 2020).

Nanopartículas podem ser utilizadas em alimentos pela sua ação antimicrobiana, contra bactérias (MOKARIZADEH et al., 2017), vírus e insetos (LAI et al., 2006), como carreadores de flavors de liberação controlada (ELTAYEB et al., 2013), sensores colorimétricos em alimentos (CHEN; ZHOU; ZHAO, 2018) e compostos bioativos (CARLI; MORAES-LOVISON; PINHO, 2018). Outros estudos estão listados na Tabela 1.

Tabela 1. Aplicação de nanopartículas em alimentos.

Alimento	Aplicação	Autor
Queijo	Nanopartículas com nisina	Cui et al., 2017
Queijo	Nanopartículas de gelatina incorporadas com óleo de moringa/quitosana	Lin; Gu; Cui, 2019
Iogurte	Nanopartículas de zeaxantina	Campo et al., 2019
Iogurte	Nanoencapsulação de prebiótico	Ismail; El-Sayed; Fayed, 2020
Iogurte	Nanopartículas de inulina	Fayed et al., 2019
Pão	Nanocápsulas de zeína carregadas com óleo de orégano e tomilho	Rosa et al., 2020

2.3 ASPECTOS TOXICOLÓGICOS

O uso crescente de nanocarreadores projetados em uma ampla gama de produtos comerciais aumentou as preocupações sobre os possíveis riscos que representam para a saúde humana. Muitos aspectos da interação entre células vivas e nanocarreadores ainda não está clara, e uma avaliação confiável da genotoxicidade seria importante para avaliar seus efeitos adversos na saúde humana. Várias organizações já estão envolvidas na pesquisa, regulamentação e gestão de diretrizes da nanotecnologia. É importante lembrar que o FDA regula os alimentos, mas não às tecnologias que se aplicam a eles (CARRILLO-INUNGARAY, 2018).

Para lançar alguma luz sobre a toxicidade real dos nanocarreadores, é necessário avaliar os ensaios separados independentemente, prestando atenção às interações entre nanocarreadores e sistemas biológicos. Nesta preocupação, atenção especial deve ser dada à ligação entre as propriedades físico-químicas e funcionais dos nanocompostos (carga superficial, tamanho, modulação de captação

e interações com células, controle sobre modificação de superfície e biodegradação) e em que medida estas características contribuem para alcançar o potencial funcional previsto e minimizar os riscos potenciais para a saúde. Assim, fatos toxicológicos associados a sistemas nanocarreadores envolvem várias considerações físico-químicas e moleculares (MARTINEZ-BALLESTA et al., 2018).

Embora possa haver riscos associados com alguns nanomateriais no suprimento de alimentos, estes riscos não são universais, já que nanomateriais naturais são consumidos desde os tempos neolíticos. Além disso, desde a Revolução Industrial, coincidindo com o advento da preservação moderna de alimentos, incidentalmente acrescentou-se nanomateriais, como subproduto destas técnicas, levando à criação de um subconjunto de colóides dentro da nanoescala (ROGERS, 2016).

Vale salientar que, naturalmente ou durante o processamento não associado à nanotecnologia moderna (exemplo: coagulação, emulsificação ou homogeneização) e/ou armazenamento de alimentos, diversos compostos como proteínas, polissacarídeos e lipídios, que são partículas globulares, podem ter tamanho variando de 10 a várias centenas de nanômetros, são consumidos diariamente há milhares de anos. Ou seja, a complexidade e limitações no campo da nanotecnologia em termos de toxicidade e acumulação (em doses) podem ser superados somente com a elucidação das propriedades físico-químicas e biológicas das nanoestruturas através de extensa pesquisa, elucidando o comportamento e migração das nanoestruturas dentro do corpo humano (BAJPAI et al., 2018).

2.4 LEGISLAÇÃO

Segundo legislação na Europa o uso de nanopartículas em alimentos ou em contato com alimentos, deve ser precedido da avaliação pela European Food Safety Agency (EFSA) e ser submetido à Diretiva 1333/2008 como novo aditivo, ainda que a mesma partícula na escala convencional já tenha sido aprovada (EU, 2008). Nos Estados Unidos o FDA ainda não estabeleceu definições sobre nanomaterial, escala nanométrica, ou outros termos relacionados (FDA, 2014). A agência mantém a posição de que os materiais quimicamente idênticos a um aditivo indireto autorizado em alimentos ou uma substância geralmente reconhecida como segura (GRAS), que respeite os limites especificados, podem ser utilizados. Como, por exemplo, o

alumínio e a argila bentonita, pela melhoria nas propriedades de barreira e o óxido de zinco pela propriedade de barreira UV e atividade antimicrobiana. Tais materiais são classificados como GRAS, portanto poderiam ser utilizados, pois, não há na legislação nenhuma menção referente ao tamanho da partícula (ALMEIDA et al., 2015).

É relevante o impacto que a nanociência trouxe em muitas áreas relacionadas com a saúde e bem-estar das pessoas. A nanotecnologia é um dos mais rápidos setores em crescimento tecnológico devido sua aplicação em uma grande gama de áreas (SOCAS-RODRÍGUEZ et al., 2017). As expectativas para a aplicação da nanotecnologia de forma a trazer benefícios no setor de alimentos e nutrição é muito grande. Estas aplicações possuem grande potencial por fornecer novas formas e ferramentas para controlar propriedades e estrutura dos alimentos, introduzindo novos recursos e acrescentando valor (CUSHEN et al., 2012).

Normas sobre nanotecnologia também poderiam ser instituídas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), órgão responsável pela regulamentação de produtos e serviços que possam afetar a saúde da população brasileira (Lei nº 9.782, de 26 janeiro de 1999 (BRASIL, 1999). A ANVISA iniciou em 31 de outubro de 2012 uma discussão sobre nanotecnologia e vigilância sanitária e, em 10 de junho de 2013, instituiu o Comitê Interno de Nanotecnologia (CIN/ANVISA), para, entre outras funções, elaborar diagnóstico relacionando a nanotecnologia à vigilância sanitária, que foi publicado em 25 de março de 2014. Contudo, até o momento, o órgão continua utilizando legislação de cunho genérico para tratar e avaliar o assunto (CALAÇA, 2015).

2.5 POLIFENÓIS

Através da história, os seres humanos estão procurando por compostos bioativos, originados da natureza, que podem estar presentes naturalmente no alimento ou podem ser incorporados em novas formulações alimentares por suas propriedades (antidiabético, anti-hiperlipidêmico, antioxidante, anti-inflamatória) assim como para melhorar as características sensoriais e de preservação dos alimentos (ESFANJANI; JAFARI, 2017).

Dentre a ampla gama de compostos bioativos existentes, destaca-se o grupo dos polifenóis. Estes compostos constituem um grande grupo de pelo menos 10.000

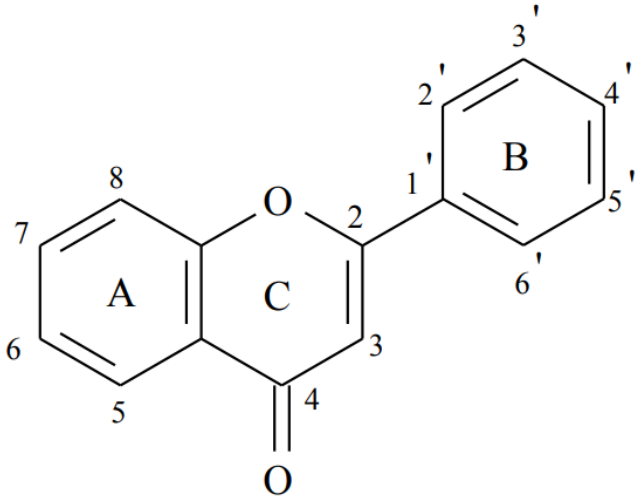
compostos únicos que contêm um ou mais anéis aromáticos com um ou mais grupos hidroxilas ligados a eles. Podem ser classificados pela sua fonte, função biológica e estrutura química. De acordo com a estrutura química, os polifenóis são classificados como flavonoides, ácidos fenólicos (ácido hidroxibenzóico e derivados e ácidos hidroxicinâmicos e derivados), estilbenos, lignanas, curcuminóides e taninos (PIMENTEL-MORAL et al., 2018).

Dentre os polifenóis, os flavonoides consistem em um grande grupo de metabólitos secundários vegetais para defesa contra infecções e condições de estresse como luz ultravioleta, patógenos e danos físicos (SIMITZIS et al., 2018). São sintetizados principalmente a partir do aminoácido aromático fenilalanina (via do ácido chiquímico) e ácido acético ou seus derivados, categorizados em chalconas, flavonóis, flavonas, flavan-3-ols, flavanonas, isoflavonas e antocianinas (KAWABATA; MUKAI; ISHISAKA, 2015).

Estruturalmente os flavonoides são constituídos de um esqueleto com 15 carbonos e composto de dois anéis de benzeno (anéis A e B). Assim eles são representados como compostos C6-C3-C6. Em muitos flavonoides, a cadeia de ligação forma ainda um anel pirano ou pirona heterocíclico (anel C) (Figura 5) (NABAVI et al., 2020). As diferenças na substituição nos três anéis (por exemplo, o tipo, número, distribuição e orientações no espaço) levam a vários derivados flavonoides com estruturas e propriedades distintas. As estruturas químicas dos flavonoides determinam seus modos de ação molecular como o deslocamento de elétrons, rearranjo de moléculas, quelação de íons metálicos, ligação com hidrogênio intramolecular e molecular, além de sequestro de espécies reativas com oxigênio, assim como seu comportamento e sua ação biológica. Portanto, os flavonoides agem como importantes antioxidantes endógenos para mediar os efeitos dos radicais livres (LI et al., 2018).

Até agora, mais de cinco mil flavonoides foram identificados, dentre os diversos compostos podemos citar a quercetina e a curcumina como importantes bioflavonoides (DAVID; ARULMOLI; PARASURAMAN, 2016; CUNHA NETO et al., 2019).

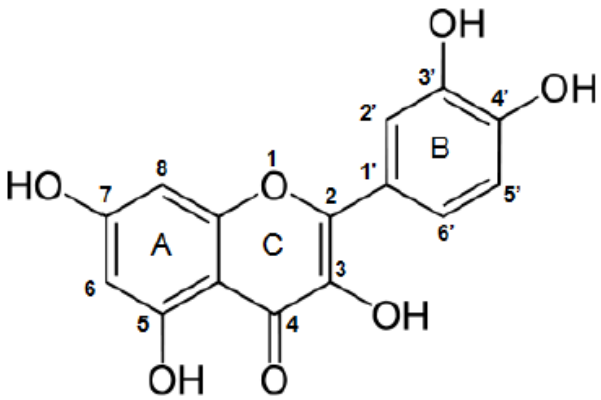
Figura 5. Estrutura básica dos flavonoides (Nabavi et al., 2020).



2.5.1 Quercetina

O nome quercetina é utilizado desde 1857 e é derivado de querceto (floresta de carvalhos). Apresenta fórmula molecular $C_{15}H_{10}O_7$ e seu nome segundo a União Internacional e Química Pura e Aplicada (IUPAC) é 3,3′, 4′, 5,7-penta-hidroxiflavona. Isto significa que a quercetina tem um grupo OH ligado nas posições 3, 5, 7, 3' e 4' (LI et al., 2016). É um flavonoide (flavus significa amarelo, sua cor comum), do tipo flavonol, e tem dois anéis aromáticos (A e B) ligados por um oxigênio heterocíclico (anel C) (LI et al., 2018). Sua estrutura química está representada na Figura 6.

Figura 6. Estrutura química da quercetina (D'Andrea, 2015).



É um polifenol bastante estudado devido seus benefícios, presente extensivamente em frutas, folhas, vagens, legumes, chá e vinho tinto (MILTONPRABU et al., 2017). Entre os vegetais, os mais altos níveis de quercetina foram encontrados em cebolas (*Allium cepa L.*), aspargos (*Asparagus officinalis L.*) e

alface vermelha (*Lactuca sativa L.*), com níveis mais baixos em brócolis, pimentão verde, ervilha e tomates. Maçãs são os frutos com a maior conteúdo, juntamente com cerejas (COSTA et al., 2016).

A quercetina nos alimentos não está presente como aglicona (ou seja, sem grupos de açúcares), mas como glicosídeos de quercetina, ou seja, geralmente encontra-se ligada com açúcares e também de éteres ou ácidos fenólicos (WANG et al., 2016). A quercetina aglicona também é vendida como suplemento dietético (KAWABATA; MUKAI; ISHISAKA, 2015).

Geralmente, o termo quercetina deve ser usado para descrever somente a aglicona, no entanto, o nome é ocasionalmente usado para se referir a moléculas com seus glicosídeos. A quercetina é um cristal de agulha, na cor amarela cítrica brilhante, com baixa solubilidade em água (60 mg/L, 16°C e 0,01 mg/mL, 25 °C), pouco solúvel em água quente, mas muito solúvel em lipídios, éter e metanol, e solúvel em etanol (4 mg/mL, 37 °C), acetona, piridina e ácido acético (D'ANDREA, 2015; LI et al., 2016; WANG et al., 2016).

É conhecida por seus efeitos antioxidantes (GRZELAK-BŁASZCZYK et al., 2018; LESJAK et al., 2018), anti-inflamatórios (BHASKAR et al., 2013; LESJAK et al., 2018), proteção hepatorenal (GHOLAMPOUR; SADIDI, 2018), cardioprotetor (PATEL et al., 2018[b]), vasodilatadores, anti-hipertensivos, antiateroscleróticos (BHASKAR et al., 2013), antivirais, antiobesidade, anti-hipercolesterolêmicos, neuroprotetor, psicoestimulante (COSTA et al.. 2016), carcinoprotetora (KAWABATA; MUKAI; ISHISAKA, 2015), aumento da atividade enzimática da microbiota intestinal (GRZELAK-BŁASZCZYK et al., 2018), potencialização *in vitro* de funções probióticas de bifidobactérias (KAWABATA et al., 2015), melhora da função endotelial (D'ANDREA, 2015). Mais empolgantes são as descobertas de que a quercetina aumenta a força física prevenindo danos musculares durante o exercício (D'ANDREA, 2015; KAWABATA et al., 2015).

Grande parte destes benefícios está associada à sua forte capacidade antioxidante. A atividade antioxidante de um composto é atribuída a um ou mais grupos hidroxila (OH) aromáticos contidos em sua molécula que, ativamente, eliminam os radicais livres (SIMITZIS et al., 2018).

A maioria das pesquisas com esses compostos visam o combate de radicais livres. Na maioria das vezes, os radicais livres produzidos fisiologicamente são essenciais para a luta contra ambientes desfavoráveis, a exemplo, a resposta imune

com sua produção pelos fagócitos para defesa contra agentes infecciosos. Estes radicais podem ser produzidos a partir de reações enzimáticas e não enzimáticas (ex. cadeia respiratória, fagocitose, síntese de prostaglandinas). Porém, o excesso de produção de radicais livres por fontes endógenas (estresse mental, exercício excessivo, inflamação, infecção) ou exógenas (poluição do ar e da água, cigarro, álcool, metais pesados, agentes farmacológicos e radiação) desempenham um papel importante no envelhecimento (HARMAN, 1956).

A produção excessiva de radicais livres e ausência de defesas antioxidantes adequadas leva a um desequilíbrio entre a carga pró-oxidante e antioxidante do corpo, causando estresse oxidativo nutricional e fisiológico. Daí a ampla investigação em relação ao dano oxidativo às membranas celulares, estrutura e biomoléculas, tais como proteínas, lipídios, carboidratos e DNA e as várias doenças resultantes como hipertensão, Alzheimer, depressão, aterosclerose, asma, falência renal, artrite, reumatismo, diabetes, câncer, inflamação e distúrbios vasculares que afetam a qualidade de vida (DAVID; ARULMOLI; PARASURAMAN, 2016; LI et al., 2018). Daí o aumento da procura por compostos com atividade antioxidante, como os a quercetina, ter aumentado significativamente na última década (DAVID; ARULMOLI; PARASURAMAN, 2016; LI et al., 2018).

Devido seu potencial para beneficiar a saúde em humanos, a quercetina entrou no foco para aplicação como ingrediente nutracêutico nas indústrias alimentícias e farmacêutica. Por isso, a estabilidade da quercetina tem sido extensivamente estudada, para investigar alterações químicas durante o processamento e armazenamento de alimentos (WANG et al., 2016).

Glicosídeos de quercetina presentes em alimentos são desglicosilados em aglicona, por enzimas do tipo beta-glucosidase, antes da absorção passiva no intestino delgado. Posteriormente a quercetina aglicona sofre significativas e extensas reações de biotransformação, formando glucuronidados, sulfatados e metabólitos metilados. Estudos mostraram que a quercetina é distribuída para vários tecidos, particularmente pulmão, rim, cólon e fígado, com níveis mais baixos no cérebro. A quercetina ingerida é rapidamente eliminada através das fezes e urina. Além disso, a quercetina e seus metabólitos têm meia-vida biológica curta, na faixa de 11-28 h (BOER et al., 2005; D'ANDREA, 2015; COSTA et al., 2016).

Quanto a toxicidade, estudos em humanos mostraram que a quercetina é bem tolerada. Doses até 1.000 mg/dia durante vários meses não produziram efeitos

adversos nos parâmetros sanguíneos, função hepática e renal, hematologia ou eletrólitos séricos. Em geral, as abundantes evidências disponíveis sustentam a segurança da quercetina para adição em alimentos (D'ANDREA, 2015).

Em alguns países, a quercetina é disponível como um suplemento dietético com doses diárias entre 200 e 1200 mg. Além disso, como um bioativo para alimentos funcionais, a quercetina pode ser usada dentro de 0,008-0,5% ou 10-125 mg/dose. Assume-se que a bioatividade da quercetina é principalmente devido à sua metabolização nos intestinos e/ou fígado partindo de várias isoformas conjugadas de ocorrência natural que são absorvidas e extensivamente distribuídas em tecidos animais (D'ANDREA, 2015).

A primeira pesquisa com quercetina em humanos sugeriu uma biodisponibilidade oral muito baixa após uma única dose (~2%) (GUGLER; LESCHIK; DENGLER, 1975). A absorção estimada do glicosídeo de quercetina, a forma natural da quercetina, varia de 3% a 17% em indivíduos saudáveis que receberam 100 mg. A baixa biodisponibilidade da quercetina pode ser atribuída à sua baixa solubilidade, instabilidade gastrintestinal, baixa absorção, metabolismo extensivo e/ou eliminação rápida, limitando seus efeitos biológicos *in vivo* (SOUZA et al., 2014; LI et al., 2016).

Além da baixa biodisponibilidade, a estabilidade da quercetina em diferentes matrizes alimentares pode ser influenciada pelo pH, temperatura, íons metálicos e outros compostos. O conteúdo de quercetina ou de seus derivados pode ser drasticamente reduzido como resultado da oxidação e degradação durante o processamento e armazenamento de alimentos, reduzindo sua aplicação (WANG et al., 2016).

De interesse a este respeito são os recentes esforços bem-sucedidos para aumentar a biodisponibilidade, solubilidade em água e estabilidade da quercetina. Em particular, a nanoencapsulação, já que a nanotecnologia tem potencial para produção de novos ingredientes alimentares e produtos inovadores, através do desenvolvimento de novas estruturas para aplicação em alimentos funcionais. Além disso, tem a capacidade de aumentar a absorção no trato gastrintestinal e melhorar a estabilidade da molécula contra possíveis condições adversas durante o processamento, distribuição, armazenamento e consumo de produtos alimentícios (SOUZA et al., 2014; COSTA et al., 2016).

A incorporação direta de compostos hidrofóbicos, como a quercetina, em alimentos líquidos também enfrenta diferentes desafios tecnológicos, por sua baixa solubilidade em água e limitada estabilidade físico-química. A nanoencapsulação pode facilitar a dissolução e proteção deste bioativo lipofílico (GHAYOUR et al., 2018).

Muitos tipos de sistemas de entrega, como nanopartículas poliméricas, nanolipossomas e nanoemulsões demonstraram aumentar significativamente a eficácia terapêutica da quercetina, aumentando sua biodisponibilidade, solubilidade em água e estabilidade química. Alguns estudos para a obtenção de nanocompostos contendo quercetina já foram publicados e estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Estudos publicados sobre síntese de nanoestruturas contendo quercetina.

Nanocompostos	Técnica de síntese	Referência
Nanopartículas de lecitina/quitosana contendo quercetina	Auto-montagem	Souza et al., (2014)
Nanopartículas de amido contendo quercetina	Nanoprecipitação	Farrag et al., (2018)
Nanocápsulas de lecitina/quitosana contendo quercetina	Deposição eletrostática	Hao et al., (2017)
Nanopartícula à base de quitosana carregada simultaneamente de catequina e quercetina	Gelificação iônica	Li et al., (2018)
Nanoemulsão óleo em água carregada com quercetina	Titulação em fase aquosa	Pangeni et al. (2017)
Nanopartículas de lecitina-quitosana carregada com quercetina	Auto-montagem	Tan et al., (2011)
Nanopartículas de quercetina encapsuladas em carboximetilquitosano	Interação eletrostática	Yan et al., (2018)
Nanopartículas de quercetina com óleo de linhaça	Homogeneização a alta pressão	Huang et al., (2017)
Nanopartículas de goma de amêndoa e goma laca carreando quercetina	Auto-montagem	Doost et al., (2018)
Nanopartículas de fitossomos carregadas de quercetina	Hidratação por filme fino	El-Fattah et al., (2017)
Quercetina conjugada com nanopartículas de sílica da casca do arroz	Impregnação úmida assistida por ultra-som	Aghapour et al., (2018)
Nanopartículas de caseína com quercetina ou curcumina	Auto-montagem	Ghayour et al., 2018
Nanopartículas de quitosana carregadas com quercetina	Gelificação iônica	Baksi et al., 2018

2.5.2 Curcumina

A curcumina (1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil) -1,6-heptadieno-3,5-dione) é um polifenol amarelo-alaranjado, geralmente purificada a partir do rizoma da *Curcuma longa* L (Figura 7a), assim como de outros gêneros (RAUF et al., 2018). A cúrcuma é uma planta herbácea da família Zingiberaceae, considerada um importante agente terapêutico na medicina tradicional indiana e chinesa (RIVERA-MANCÍA; TRUJILLO; CHAVERRI, 2018).

Seus efeitos benéficos podem ser atribuídos à presença de curcuminóides. Os principais curcuminóides (pigmentos) presentes na curcumina comercial (Figura 7b) são a curcumina I, ou curcumina, (77%) (Figura 7c), curcumina II, ou desmetoxi-curcumina (DMC), (17%), curcumina III, ou bis-desmetoxi-curcumina (BDMC), (3%) e ciclocurcumina (curcumina IV), isolado por Vogel e Pelletier (1815) e sua estrutura química e síntese confirmada por Lampe e Miłobędzka (2006). Eles compartilham a mesma estrutura com dois anéis metoxi benzeno, unidos por uma cadeia insaturada (Figura 7c). Dentre os quatro curcuminóides encontrados na cúrcuma, a curcumina é conhecida por ser o fitoquímico mais ativo (SIVIERO et al., 2015; MATHEW; HSU, 2018).

Figura 7. Rizoma da cúrcuma (a), curcumina em pó (b) e estrutura química da curcumina (c) (Hussain et al., 2018).

a) Rizoma da cúrcuma b) Curcumina em pó c) Curcumina I

Em alimentos, a curcumina é utilizada como especiaria, conservante, suplemento nutricional e fitoterápico (ABDOU; GALHOUM; MOHAMED, 2018), estabilizante e corante, substituindo corantes artificiais em queijos, picles, cereais, sopas, sorvetes e iogurtes (ALMEIDA et al., 2018). Recentemente, a curcumina tem atraído a atenção por suas propriedades terapêuticas. Várias são essas propriedades, algumas listadas na Tabela 3.

Tabela 3. Propriedades terapêuticas atribuídas à curcumina.

Propriedade	Referência
Antioxidante	Gómez-Estaca et al. (2017)
Anti-inflamatório	Gokce et al., (2016)
Antimicrobiana	Devaraj; Jagannathan; Neelakantan, (2016) Groundwater et al., (2017)
Antiviral	Mathew; Hsu, (2018)
Anticancerígena	Xu; Yu; Zhao (2017) Qiu et al., (2017) Ebrahimifar et al., (2017) Liu; Ho (2018)
Cardioprotetor	Namdari; Eatemadi, (2017) Manghani; Gupta; Tripathi; Rani, (2017)
Prevenção da depressão	Shen et al., (2017) Choi et al., (2017)
Redução da resistência à insulina	Shen et al., (2017)
Hepatoprotetora	Xie et al., (2017) Muhammad et al., (2017) Ghoreshi et al., (2017)
Antidiabética	Wang et al., (2017) Rivera-Mancía; Trujillo; Chaverri, (2018)
Antiobesidade	Ding et al., (2016)
Neuroprotetora	Reddy; Manczak; Yin, (2017)
Antialérgica/Antiasma	Subhashini et al., (2013) Shakeri; Soukhtanloo; Boskabady (2017) Chauhan; Dash; Singh (2017) Kumari; Dash; Singh, (2016)
Nefroprotetora	Hashish; Elgaml, (2016) Lu et al., (2017)
Prevenção da artrite	Shome et al., (2016) Jeengar et al., (2016) Mande; Bachhav; Devarajan, (2016)

A curcumina é um composto reconhecido como seguro (GRAS) FDA. Sabe-se que uma dose saudável de até 12 g/dia de curcumina é seguro para consumo humano sem provocar efeitos colaterais, sugerindo sua baixa toxicidade e segurança para ser utilizado como nutracêutico em alimentos e suplementos (GUPTA et al., 2013; MATHEW; HSU, 2018).

No entanto, apesar da comprovada eficácia clínica da curcumina (Tabela 3), mais estudos são necessários, já que este composto tem uma baixa absorção no intestino por apresentar uma baixa permeabilidade através da mucosa intestinal, devido à acumulação celular e degradação em trânsito, modificação química no sangue, metabolismo rápido no fígado e outros órgãos e rápida eliminação

sistêmica, contribuindo para uma baixa biodisponibilidade oral (JAMWAL, 2018). Além disso, uma das principais observações relacionadas à estudos com curcumina referem-se aos níveis séricos extremamente baixos. No geral, esses efeitos levam a uma quantidade relativamente baixa de curcumina bioativa atingindo o sítio de ação (SIVIERO et al., 2015; KHARAT; ZHANG; McCLEMENTS, 2018).

Outras causas para a baixa biodisponibilidade da curcumina é que este constituinte possui grupos aromáticos e tem fortes ligações de hidrogênio inter e intra moleculares, reduzindo extremamente sua solubilidade em meio aquoso, resultando em uma redução de suas atividades. Outros fatores que limitam sua estabilidade são a luz, oxidação, enzimas, calor e condições alcalinas (ALMEIDA et al., 2018). Daí o interesse em aumentar a solubilidade, estabilidade e a biodisponibilidade da curcumina, com sistemas de nano-entrega, de forma a melhorar também a incorporação em alguns produtos alimentícios (ABDOU; GALHOUM; MOHAMED, 2018).

Já foi avaliada a influência na vida de prateleira de filés de frango utilizando revestimento contendo nanoemulsões carregadas com curcumina. Estudos microbiológicos mostraram que os revestimentos reduziram a deterioração microbiana em comparação com o controle (ABDOU; GALHOUM; MOHAMED, 2018).

A curcumina também já foi nanoencapsulada com objetivo de melhorar sua estabilidade e permitir sua aplicação em matrizes alimentares hidrofílicas, como o iogurte, já que é um corante natural que, além de conferir cor, possui bioatividade, servindo como alternativa à alguns corantes artificiais (ALMEIDA et al., 2018).

Portanto, fica claro que nanopartículas contendo quercetina ou curcumina podem ser sintetizadas destinadas à indústria alimentar, ou como parte de alimentos funcionais, ou no controle da deterioração de alimentos, como agente antibacteriano e antioxidante, graças à suas propriedades físico-químicas com notável influência em sua interação com sistemas biológicos (LI et al. 2018; UGRU et al., 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Obter e caracterizar nanopartículas contendo polifenóis assim como avaliar a sua potencialidade pela indústria alimentícia.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir nanopartículas de lecitina e quitosana para encapsulação de quercetina e curcumina;
- Caracterizar físico-quimicamente as nanopartículas obtidas;
- Avaliar as atividades biológicas das nanopartículas quanto a capacidade antioxidante e antimicrobiana;
- Determinar a citotoxicidade *in vitro* das nanopartículas;
- Avaliar a estabilidade quanto ao tempo e temperatura de armazenamento das nanopartículas obtidas;
- Produzir e caracterizar pasta de amêndoa de castanha de caju contendo nanopartículas de lecitina-quitosana com quercetina quanto aos parâmetros de qualidade.

4 RESULTADOS

4.1 ARTIGO 1 - QUERCETIN-LOADED, LECITHIN-CHITOSAN NANOPARTICLES: PHYSICAL, CHEMICAL, BIOACTIVITY AND TOXICITY CHARACTERIZATION

Artigo submetido à revista *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*
Fator de impacto 3.971, Qualis A1.

Abstract

Quercetin is a bioactive compound with potential application as an antioxidant in food matrices. However, the use of this flavonoid becomes a challenge given its relative degree of hydrophobicity and low bioavailability. In order to improve its dispersibility in aqueous media, protection against degradation and the bioavailability of quercetin, this study aimed to develop quercetin-loaded, lecithin-chitosan nanoparticles (NPQ) and to characterize its physical, chemical and biological properties. The nanoparticles were characterized in terms of mean size, PDI, zeta potential, morphology, encapsulation efficiency, FT-IR, Transmission Electronic Microscopy (TEM) and thermal analysis (TGA and DSC). Stability over shelf life at 4 and 30°C, antioxidant activity, antimicrobial activity and cytotoxicity were also determined. Quercetin was encapsulated in lecithin-chitosan nanoparticles with an efficiency of 98.31 ± 0.01%. NPQ presented a well-defined spherical morphology with a mean size of 240.81 ± 10.82 nm and a zeta potential of +38.9 ± 1.60 mV. Stability studies showed that NPQ are relatively stable over 28 days of storage at 4°C and 30°C. Regarding biological activities, NPQs were able to eliminate DPPH and ABTS radicals in the same way as free quercetin and showed antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, without presenting cytotoxicity against normal cells (L-929 and PBMC). These results suggest that quercetin-loaded, lecithin-chitosan nanoparticles have excellent potential for application in food matrices aiming at the development of new functional foods.

Keywords: bioactive compounds, polyphenols, flavonoids, nanoencapsulation, antioxidant, functional foods.

Introduction

Quercetin ($C_{15}H_{10}O_7$, 3,3′,4′,5,7-pentahydroxy-2-phenyl-chromen-4-one) is an abundant and potent flavonoid synthesized in plants from the amino acid phenylalanine [1]. Naturally present in vegetables (onion, broccoli), fruits (apple, blueberry), grains and herbs, it has attracted more and more attention due to its strong antioxidant [2], anti-obesity [3], anti-cancer [4], antiviral [5], cardioprotective [1], hepatoprotective [6], antibacterial [7], anti-inflammatory [8] and anti-diabetic [9] properties.

Despite these beneficial health effects, the compound's low water solubility, low physical-chemical stability and short shelf life make it difficult to incorporate quercetin into hydrophilic food matrices [10]. Another factor is its low bioavailability, since most quercetin is metabolized in the intestine and liver after oral administration, with only 5.3% being unchanged and therefore bioavailable, which limits its biological effects *in vivo*. Different delivery systems are being developed to incorporate bioactive compounds and improve their characteristics. The encapsulation of quercetin can increase the physicochemical stability of this compound in food, as well as improve its final bioavailability in the human body [11, 12].

In recent years, lecithin-based and chitosan nanoparticles obtained through electrostatic interactions have been described as suitable carriers for hydrophilic [13] and hydrophobic [12, 14] molecules. Chitosan, a cationic polysaccharide generally obtained by alkaline deacetylation of chitin (N-acetylglucosamine), because it is biocompatible, biodegradable, muco-adhesive and non-toxic, presents itself as a good candidate for the development of improved biodistribution systems of bioactive molecules [13]. Lecithin, on the other hand, promotes greater stability and efficiency in encapsulating poorly soluble compounds such as quercetin, consisting of a glycerol skeleton esterified with two fatty acids and a phosphate group, endowing it with strong potential for use in the food and pharmaceutical industries as an emulsifier, nutrition intensifier and carrier [15].

The nanoencapsulation of bioactive compounds, such as quercetin, in lecithin-chitosan systems has potential application in the food industry, in the development of new functional foods, thus meeting the current needs of consumers, in addition to providing the development of safer foods with a longer shelf life. Therefore, as a way to improve the limiting characteristics of the application of quercetin in food, as well as its bioavailability, the objective of this work was to develop a new method to

develop quercetin-loaded, lecithin-chitosan nanoparticles and characterize their physical, chemical and biological properties with a view to their application in foods that provide health benefits.

Material and methods

Preparation of nanoparticles

The nanoparticles were obtained by electrostatic interactions through the method of direct injection of an ethanolic solution of lecithin under an aqueous chitosan solution as described by Souza et al. [14], with some modifications. Briefly, a standard 0.2% chitosan (w/v) solution in 1% (v/v) lactic acid was prepared under magnetic stirring (1000 rpm, Fisatom, model 752) for 16 h at room temperature. Of this solution, 1.25 mL was diluted with deionized water to a final volume of 23 mL (0.11 mg/mL). The lecithin-chitosan nanoparticles without quercetin (NP) or with incorporated quercetin (NPQ) were obtained by dripping (1 mL/min with a 0.38 mm syringe) 2 mL of 25 mg/mL lecithin ethanolic solution containing different concentrations of quercetin (0; 50; 70; 100; 200; 300 µg/mL) into 23 mL of chitosan aqueous solution (0.11 mg/mL), under continuous magnetic stirring (1000 rpm) with subsequent sonication (sonicator with probe, Q125 Sonicator, QSonica, LLC, Newtown, Connecticut, USA). During the sonication process different frequencies (40 Hz or 80 Hz) and time intervals (3 to 10 min) were used at a power of 125 W under ice bath.

Physical and chemical characterization

Determination of hydrodynamic size and zeta potential

Size distribution (mean diameter) and polydispersity index (PDI) was determined by dynamic light scattering (DLS) (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, UK). About 1 mL of sample was transferred to a polystyrene cuvette; the measurement was performed at 25°C, with a 90° detection angle and a wavelength of 633 nm. The samples were read by 1:3 dilution with deionized water to avoid multiple dispersion. The zeta potential was determined by laser Doppler microelectrophoresis in a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) using the Smoluchowsky Equation at 25°C. All measurements were performed in triplicate with three true readings for each sample. The results were presented as mean ± standard deviation of nine values obtained.

Encapsulation efficiency (EE)

The encapsulation efficiency of quercetin in NPQ was performed according to Xavier-Jr et al. [16], using the ultrafiltration-centrifugation technique with some modifications. Briefly, the NPQs were centrifuged at 8,000 rpm for 20 min at 4°C (Eppendorf centrifuge 5418, Rotor FA-45-18-11, Hamburg, Germany) and portions of the encapsulated quercetin were separated using ultrafiltration (Amicon Ultra-0.5, Millipore®). The supernatant resulting from the centrifugation had its quercetin content diluted in ethanol (1:10) and measured in a UV-Vis spectrophotometer (Jasco, Japan) at 373 nm. All analyses were performed in triplicate and the encapsulation efficiency (EE%) of quercetin encapsulated in NPQ was calculated using Equation 1 (Eq. 1):

$$EE\ (\%) = (T - F)\ x\ 100 / T \qquad \text{Eq. 1}$$

Where T is the total amount of quercetin in solution and F is the amount of quercetin in the supernatant after ultrafiltration.

Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR)

Fourier transform infrared (FT-IR) spectra of the lecithin-chitosan (NP), quercetin-containing nanoparticles (NPQ) and quercetin (QE) were obtained by FT-IR (model 4600, Jasco, Japan) with a Pro One Attenuated Reflection Accessory (FT-IR-ATR) and a ZnSe crystal, with a center incidence angle of 45° and circular contact area of 4.9 mm^2. Freeze-dried sample spectra were obtained in the range of 500 to 4000 cm^{-1}, with a resolution of 4 cm^{-1}, using 32 scans.

Thermogravimetric Analysis (TGA) and Differential Scanning Calorimetry (DSC)

The thermal stability of pure quercetin, NP and NPQ, both nanoparticles previously freeze-dried, was evaluated by thermogravimetric curves (TGA) and differential scanning calorimetry (DSC) in a Simultaneous Thermal Analyzer (TGA/DSC 2 star®, Mettler Toledo, Switzerland). The samples (5 to 9 mg, dry weight) were placed in aluminum crucibles and heated within a scanning range of 25 to 500°C with a constant heating rate of 10°C min^{-1} under constant nitrogen flow adjusted, to a flow rate of 50 mL min^{-1} using an empty crucible as a reference.

Morphological Analysis by Transmission Electronic Microscopy (TEM)

The morphology of nanoparticles was determined by Transmission Electronic Microscopy (Tecnai™ Spirit TEM; FEI Company, Hillsboro, Oregon, USA). A drop of empty (NP) or quercetin-loaded (NPQ) nanoparticle solution diluted in deionized water (1:3) was deposited onto a 200-mesh copper-coated grid with carbon film and held there for 5 min. The excess solution was removed by filter paper. Subsequently, a drop of 2% (w/v) aqueous solution of phosphotungstic acid was applied for about 30 s to stain the sample. All samples were then left to dry at room temperature (25 °C) for 12 h to enhance the contrast before the microscopic analysis, operated at 60 kV [17].

Antioxidant activity

In this study, the samples (NPQ, NP and QE) were evaluated in terms of antioxidant activity using three different methods (DPPH, ABTS and FRAP).

DPPH

The ability to eliminate free radicals from the samples was measured by DPPH [14]. Briefly, 20 µL of the samples were added to 200 µL of an ethanolic DPPH solution (200 µM), with subsequent vigorous agitation and rest for 30 min at room temperature in the dark. The negative control was obtained using ethanol and the ethanolic solution of DPPH. The absorbance of the reaction solution was measured at 515 nm (Bio-Rad model ELISA reader xMark™, USA). The percentage of elimination of DPPH radicals by the samples was calculated according to Equation 2 (Eq. 2):

$$DPPH\ radical\ elimination\ (\%) = [(1 - As) \times 100] / Ac \qquad \text{Eq. 2}$$

Where As is the absorbance of the sample; Ac is the absorbance of a control (ethanol) with the ethanolic solution of DPPH.

ABTS

The ABTS radical elimination activity was measured according to Li et al. [18], with modifications. Briefly, the ABTS reagent was prepared with 7 mM ABTS and 2.45 mM of potassium persulfate. Then, 0.1 mL of sample was added to 3.9 mL of ABTS reagent and shaken vigorously. After 6 min the reading was taken at 734 nm.

The percentage of elimination of the ABTS radical was calculated by Equation 3 (Eq. 3):

$$ABTS\ radical\ elimination\ capacity\ (\%) = 1 - [(Aa - Ab) / Ac] \times 100 \quad \text{Eq. 3}$$

Where Aa is the absorbance of the sample with the ABTS solution; Ab is the absorbance of the sample without the ABTS solution (white) and with ethanol; Ac is the absorbance of a control (water) with the ABTS solution.

FRAP

The ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay was performed according to the procedure described by Li et al. [18], with modifications. Briefly, 0.1 mL of sample (NP, NPQ and QE) was mixed with 3.9 mL of FRAP reagent prepared with 20 µM ferric chloride (FeCl3) and 10 µM of TPTZ (2.4.6-tris (1-pyridyl) -5- triazine). The mixture was subsequently incubated at 37°C for 30 min and the absorbance recorded at 593 nm. A calibration curve was prepared with ferrous sulfate ($FeSO_4$) as the standard in the range 500 to 2,000 µM. The results were expressed as µM ferrous sulfate g^{-1} of nanoparticles.

Antimicrobial activity

Strains and Inoculum Preparation

The antimicrobial activity of NP and NPQ was evaluated in *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Vibrio parahemolyticus* (ATCC 17802), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida albicans* (ATCC 5788), *Candida glabrata* (ATCC 5879) and *Candida tropicalis* (ATCC 13803). The bacteria and fungi were cultivated on Mueller Hinton Agar (MHA) and Sabouraud Dextrose Agar (SDA), respectively. After the incubation period, colonies of each lineage were aseptically transferred to sterile saline solution (0.8% NaCl). The turbidity of the solutions was standardized with 0.5 MacFarland standard (10^6 CFU / mL).

Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) for NP and NPQ samples were performed according to the standards of the Clinical and Laboratory Standards Institute [19] by the microdilution method on 96-well microplates with concentrations ranging from 400 to 0 μg mL^{-1} by serial dilutions. 100 μL of Mueller Hinton broth (Bacteria) and Sabouraud Dextrose broth (Fungi) media containing 10 μL of inoculum (10^6 CFU/mL of each strain) were added to each well. The microorganisms were incubated on a rotary shaker (150 rpm) at 37°C for 48 h. Posteriorly, 10 μl of 0.001% resazurin was added to the plate and incubated for 6 h. Growth was indicated by color changes from purple to pink (or colorless). The lowest concentration at which the color change occurred was taken as the MIC. As a positive control, tetracycline and fluconazole antibiotics were used for bacteria and fungi, respectively.

Minimum Bactericidal and Fungicidal Concentration (MBC/MFC)

Minimum Bactericidal and Fungicidal Concentration (MBC/MFC) were performed according to the standards of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018). For the determination, aliquots of the wells before MIC were transferred to Petri dishes containing Mueller Hinton Agar (MHA) or Sabouraud Dextrose Agar (SDA), incubated at 37 °C for 48 h. MBC/MFC were considered to be the lowest concentration from which no microbial growth was observed after culturing. As a positive control, tetracycline and fluconazole antibiotics were used for bacteria and fungi, respectively.

Cytotoxicity studies *in vitro*

Cytotoxic activity was performed using the MTT method [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] using non-neoplastic cells and tumor cells. The non-neoplastic cell lines used were L-929 (murine fibroblast), maintained in DMEM culture medium, and PBMC (human peripheral blood mononucleated cells) resuspended in RPMI 1640 culture medium. Also used were human tumor cell lineages NCI-H292 (human lung mucoepidermoid carcinoma) and MCF-7 (human breast cancer), maintained in DMEM culture medium, and HCT-116 (human colorectal cancer) maintained in RPMI 1640 culture medium. The medium was supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotic solution (penicillin and streptomycin). The cells were kept in a greenhouse at 37 ºC in a humid

atmosphere enriched with 5% CO_2. The L-929, NCI-H292, MCF-7, HCT-116 (10^5 cells/mL) and PBMC (10^6 cells/mL) cells were plated in 96-well plates and incubated for 24 h. Then the samples (NP, NPQ, and QE) dissolved in the corresponding culture media were added to the wells at a final concentration of 50 µg/mL. After 72 h of re-incubation, 25 µL of MTT (5 mg/mL) were added and finally, after 3 h of incubation, the culture medium with MTT was aspirated and 100 µL of DMSO was added to each well. Absorbance was measured at 560 nm wavelength (Bio-Rad model ELISA reader xMark™, USA). Doxorubicin (5 µg/mL) (DOX) was used as standard (positive control). The experiments were performed in quadruplicate.

Evaluation of the stability of the nanoparticles during storage

The NPQs were evaluated at 1, 7, 14, 21 and 28 days under storage at 4 and 30°C and protected from light. The stability of NPQs at each specific time was measured by evaluating the mean size, polydispersity index (PDI), zeta potential and capacity to eliminate DPPH radicals, as previously described.

Statistical analysis

All experiments were carried out in triplicate and the results expressed as the mean ± S.D. The means of two groups were compared using non-paired Student's t-tests. When comparing multiple groups, one-way analysis of variance (ANOVA) was applied with the Tukey multiple comparison procedure (SigmaStat, trial version, USA). The statistical data were considered significant at $p < 0.05$.

Results and discussion

Characterization of NPQ

Particle size

The size distribution and polydispersity index (PDI) of the lecithin-chitosan (NP) nanoparticles are shown in Figure 1. The 80 Hz frequency produced significantly smaller nanoparticles over time when compared to the 40 Hz frequency ($p<0.05$). This occurs because, with the increase in sonication frequency, there is an increase in the energy inserted into the system, promoting a decrease in the average particle size. The size of the particles was also influenced by the sonication time, with optimal values obtained from 7 min. Preliminary studies of preparation of NPs, under

the same conditions but without the application of sonication, resulted in particles with a mean size of 400.43 ± 4.3 nm, corroborating the relevance of sonication and choice of the ideal frequency, in the reduction of particle size. Regarding the PDI, all the particles obtained with different frequencies and sonication time presented values below 0.24 ($p>0.05$), indicating a narrow size distribution. As well as size, a low PDI is directly linked to stability, since values greater than or equal to 0.4 indicate that there is no uniformity in the particle size distribution [14]. Therefore, the small size and homogeneity of nanoparticles are important parameters in the preparation of stable colloidal dispersions [20], since particles with larger sizes favor the formation of Ostwald bridges favoring coalescence and destabilization of nanosystems [21].

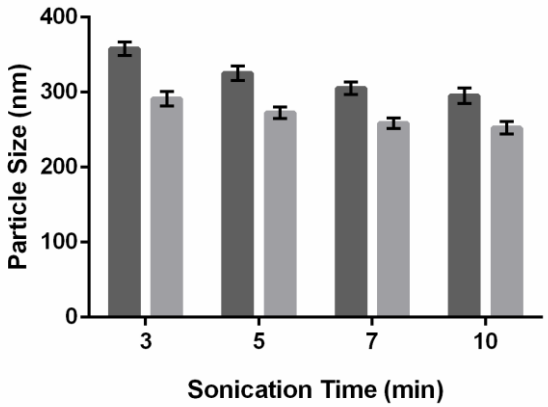


Figure 1. Size of lecithin-chitosan (NP) nanoparticles obtained by ultrasonication as a function of frequency/time (40 Hz, dark column; 80 Hz, light column).

Sonication is known as cavitation, i.e., a mechanism by which the acoustic energy generated produces bubbles, tiny vacuum cavities in the liquid medium which, rapidly collapsing, create a transient high pressure and high velocity gradient, creating a shear force [22, 23]. Generally, at lower frequencies, the bubbles generated in the sound field are relatively large in size. When the acoustic power increases, the size and number of cavitation of the bubbles increases followed by the intense collapse of these bubbles, resulting in high shear forces and stronger shock waves in liquids [21]. As quercetin nanoparticles are formed by electrostatic interactions based on opposite charges of chitosan and lecithin, sonication is responsible for improving dispersion by breaking up any nanoparticle aggregates formed [24].

Based on these results, the frequency and time of sonication selected to obtain the quercetin-loaded, lecithin-chitosan nanoparticles (NPQ) in subsequent analyses was 80 Hz for 7 min.

Quercetin is known to be soluble in organic solvents, such as ethanol, and to have very low water solubility (about 60 mg/L) [25], so its encapsulation becomes a viable alternative to improve its solubility characteristics and consequent bioavailability. Among the different concentrations of quercetin in NPQ formulations (Figure 2), no statistical difference ($p>0.05$) was observed in size for concentrations up to 100 µg/mL, whose mean value was 241.27 ± 10.10 nm. Concentrations higher than 200 µg/mL showed an increase in particle size ($p<0.05$) and it should be noted that samples with concentrations >100 µg/mL precipitated after 24 hours. Similar behavior was observed for the polydispersity index (PDI), with an increase from 0.150 ± 0.042 to 0.230 ± 0.060 in concentrations greater than 200 µg/mL. According to Souza et al. [14], high concentrations of quercetin interfere with the process of self-organization of nanoparticles, blocking repulsive forces between the nanoparticles, due to decreased spacing between adjacent nanoparticles, leading to aggregation.

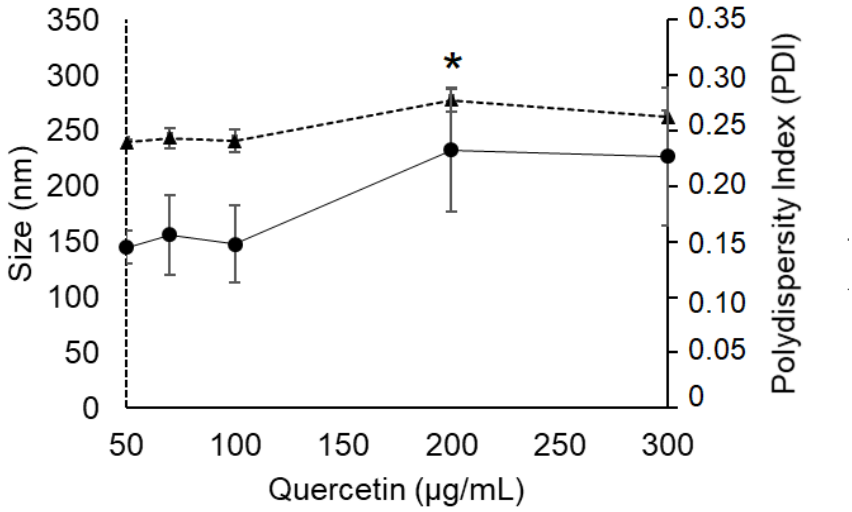


Figure 2. Size (nm, --▲--) and Polydispersity index (PDI, —●—) of lecithin-chitosan nanoparticles obtained by ultrasonication as a function of quercetin concentration (µg/ml).

Thus, the quercetin concentration of 100 µg/mL was selected for the continuation of the NPQ characterization analyses in order to load a larger quantity of

this polyphenol. This quantity of quercetin (100 µg/mL) was higher than the one encapsulated (70 µg/mL) by Souza et al. [14], when they made lecithin-chitosan nanoparticles using an Ultra-Turrax disperser, presenting particles of 168.58 ± 20.94 nm. These authors reported that when increasing quercetin concentrations were used, they observed instability in the particles, corroborating that the sonication method is more efficient in the elaboration of more uniform and stable nanoparticles. Hao et al. [26] succeeded in encapsulating about 267 µg of quercetin/mL, by developing nanoparticles from lecithin and quercetin nano-liposomes coated with chitosan, but had an average diameter of 600 nm, a value greater than that found in the present study.

Zeta potential

Zeta potential is a measure of the surface potential of suspended particles that influences the stability of a dispersion. Particles with a zeta potential higher than +30 mV or lower than -30 mV can be stably dispersed [26] and therefore less susceptible to agglomeration and destabilization forces, such as van der Waals forces, Brownian motion or particle-particle interactions [23]. The mean zeta potential of NP and NPQ was +39.4 ± 1.3 mV and +38.9 ± 1.6 mV, respectively. These values were coherent and adequate to obtain a stable nanoparticle suspension. The positive charge observed suggests that the chitosan is on the surface of the particles, since in general, the average zeta potential of nanoparticles coated with chitosan is about +30 to +50 mV due to the protonation of their amino groups (NH3+) in acid pH (Li et al., 2018). A similar result (+35.12 ± 1.38 mV) was found by Hao et al. (2017), who also used chitosan in the elaboration of lecithin-quercetin nano-liposomes.

Therefore, the results found for the nanoparticle size (240.81 nm ± 10.82), PDI (0.15 ± 0.05) and zeta potential (+38.9 ± 1.6 mV) containing 100 µg quercetin/mL, demonstrate the efficiency of the system used, in addition to being a fast method with few operating steps.

Encapsulation efficiency

The encapsulation efficiency of NPQ (100 µg quercetin/mL) was 98.31 ± 0.01%. This efficiency was higher than the values found by Souza et al. [14] and Hao et al. [26], of 95% and 71.14 ± 0.50%, respectively, for quercetin-loaded, lecithin-chitosan nanoparticles.

Encapsulation efficiency depends mainly on the solubility of the compound in the matrix or polymer material [26]. Injection of an alcoholic lecithin solution into an aqueous chitosan solution is a well-established method for the preparation of nanoparticles [27]. Lecithin is used as a surfactant, increasing the solubility of quercetin, which because it is hydrophobic, is inserted into the negatively charged nucleus of nanoparticles by the strong affinity between them. By adding polymer coatings, such as chitosan, which has a positive charge, electrostatic attraction occurs, significantly modifying the surface charge distribution and thickness of the nanoparticles, influencing properties such as solubility, colloidal stability, absorption and bioavailability [14, 28]. Thus, in this study a greater amount of quercetin was effectively inserted in the lipid nuclei of the nanoparticles, and only a small amount of quercetin was soluble in the aqueous dispersion phase, resulting in a high encapsulation efficiency.

Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR)

The nanoparticle spectra with and without quercetin (Figure 3) showed a strong absorption band in the region between 3200-3500 cm^{-1}, which can be attributed to NH elongation, while the bands at 1650, 1590 and 1380 cm^{-1} can be attributed to NH flexion of glucosamine units. The absorption band at 1150 cm^{-1} (anti-symmetric elongation of the C - O - C bond) is characteristic of saccharide structure. All these peaks are characteristic of the chitosan structure, which may be an indication that the chitosan covers the surface of the nanoparticle [27]. The quercetin spectrum (QE) shows a phenolic OH band centered around 3400 cm^{-1}, a characteristic -CO elongation at 1660 cm^{-1}, bending and aromatic elongation around 1100 and 1600 cm^{-1}, -OH bending phenolically around 1200 and 1400 cm^{-1} [29]. Quercetin is believed to be found inside nanoparticles and interactions between it and nanoparticles occur through hydrophobic interactions or hydrogen bridges, since no characteristic peak of quercetin was observed in the NPQ spectrum. Souza et al., [14] and Hao et al. [26] observed similar behavior to encapsulate quercetin in chitosan-coated lecithin nanoparticles.

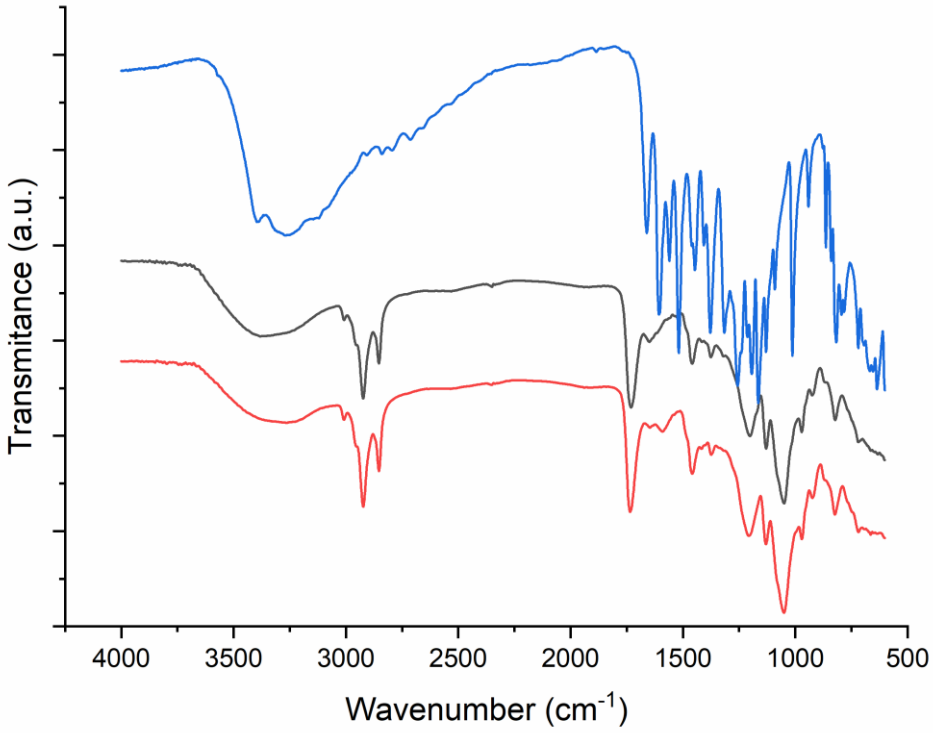


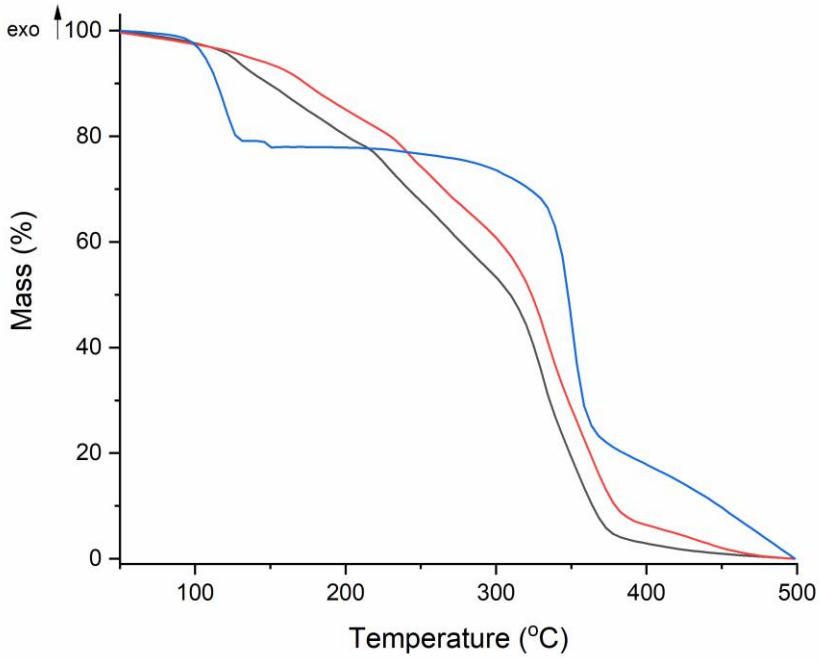
Figure 3. FT-IR spectra of quercetin (blue line), NP (red line) and NPQ (black line).

Thermal analyses

Thermogravimetric Analysis (TGA) and Differential Scanning Calorimetry (DSC)

The results of TGA and DSC are important for determining the thermal stability and interaction of compounds. These results can be seen in Figure 4. The quercetin thermogram showed endothermic peaks that were associated with dehydration (106 to 127°C) with a loss in mass of 9.64% and endothermic fusion of quercetin (339 to 359°C) with a loss in mass of 26.16%, respectively. The final stage, from 360°C, corresponded to the structural decomposition of quercetin [30, 31]. Regarding NP, a loss in mass of 76.79% was observed at 292 to 369°C. Regarding NPQ, an endothermic event was observed at 133°C and a subsequent loss of mass of 76.75% between 282 and 360°C. The peak fusion of quercetin was not observed in NPQs, which indicates that quercetin interacted with the lecithin nucleus of NPQs, resulting in greater structural and chemical stability of quercetin when encapsulated [32]. Thus, by characterizing the thermal stability of nanoparticles, possible heat treatments can be indicated for foods containing them, maintaining their integrity, such as in the commercial sterilization of food (120°C).

A



B

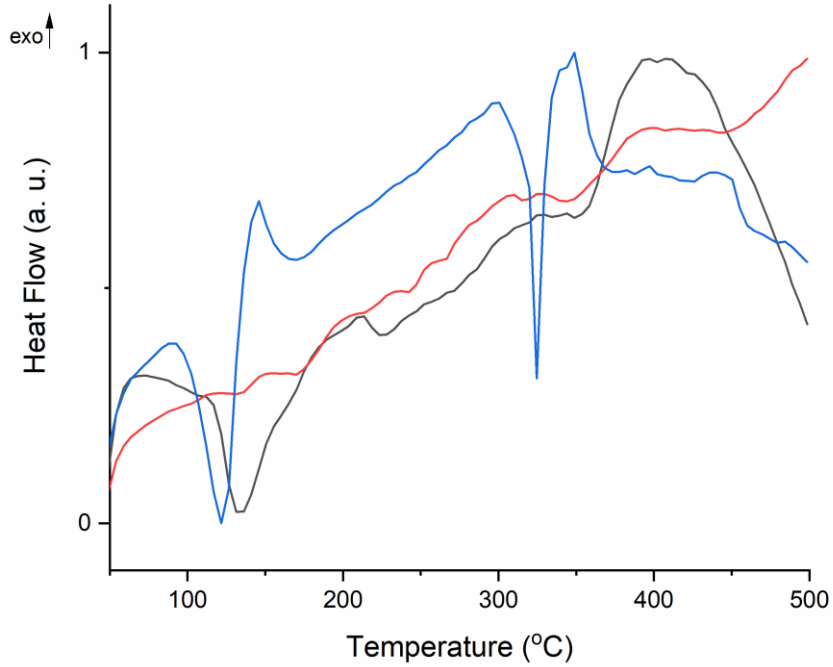


Figure 4. Thermogravimetric analysis (TGA) (A) and Differential Scanning Calorimetry (DSC) (B) of quercetin (blue line), NP (red line), and NPQ (black line).

Transmission Electron Microscopy (TEM)

The morphology of nanoparticles was observed by Transmission Electronic Microscopy (TEM). The images clearly show that NP (Figure 5, A and C) and NPQ (Figure 5, B and D) have a well-defined spherical shape, with a smooth and uniform surface. According to Shin et al. [33], the lecithin-based and chitosan nanoparticles are formed by self-assembly, due to electrostatic interaction between the positive and negative charges of the chitosan. Thus, perfectly spherical nanoparticles are formed, with the lecithin forming the nucleus and the chitosan molecules lining the outer layer protecting the inner structure [27, 34].

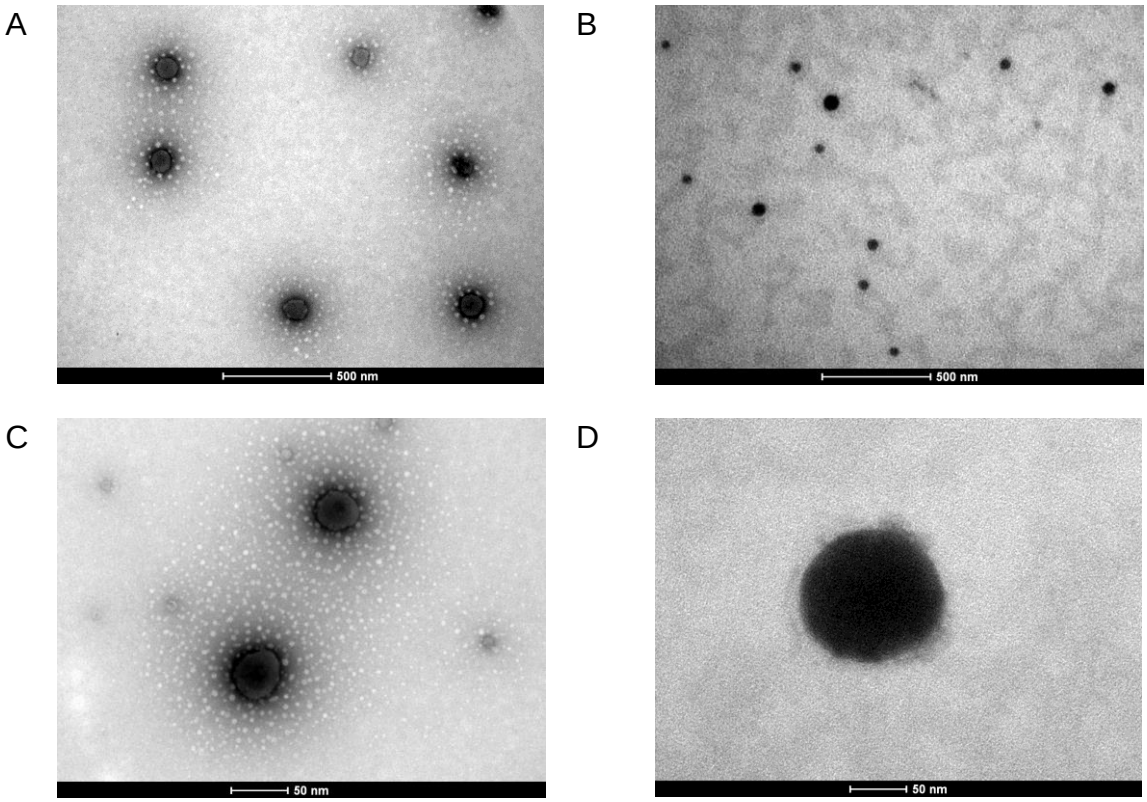


Figure 5. Electron transmission imagery of the morphology and dispersion of the lecithin-chitosan (NP) nanoparticles (A and C) and the quercetin-loaded, lecithin-chitosan nanoparticles (NPQ) (B and D).

Antioxidant analysis

It can be seen from Table 1 that encapsulated quercetin (NPQ) was able to eliminate DPPH and ABTS radicals in the same way ($p>0.05$) as free quercetin (QE). Souza et al. [14] reported similar values to this study when evaluating the ability of DPPH radical to eliminate quercetin-containing lecithin-chitosan nanoparticles.

Quercetin exhibits high efficiency for free radical elimination due to the presence of active hydroxyl (OH) groups in the aromatic rings of its structure by donating hydrogen atoms for free radical stabilization [14, 35].

Table 1. Antioxidant activity by the elimination capacity of DPPH, ABTS and FRAP of NP, NPQ and QE.

Samples	DPPH Elimination capacity (%)	ABTS Elimination capacity (%)	FRAP (μM $FeSO_4$)
NP	5.59 ± 0.44^{b}	-	10.00 ± 0.95^{c}
NPQ	32.52 ± 1.78^{a}	29.36 ± 2.05^{a}	414.92 ± 3.17^{b}
QE	35.84 ± 1.85^{a}	33.04 ± 4.49^{a}	507.30 ± 16.78^{a}

^{abc} the same letters in a column are not significantly different ($p>0.05$), according to the Tukey test;
- : No activity;
NP: Lecithin-chitosan nanoparticles;
NPQ: Quercetin-loaded, lecithin-chitosan nanoparticles;
QE: Ethanolic solution of quercetin (100 μg/ml).

Flavonoids are capable of reducing most metal ions during redox reactions. Thus, in the presence of iron ions, flavonoids can cause the reduction of the Fe^{3+} complex [35]. It can be observed in Table 1 that NPQ showed, in the FRAP test, lower reduction capacity ($p<0.05$) when compared to QE. Li et al. [18] observed similar results and reported that the methodological conditions used in the reaction may hinder the release of sufficient compounds carried by the nanoparticle matrix, such as insufficient contact time of the FRAP reagent with the sample. Furthermore, despite the higher antioxidant activity of free quercetin (QE), it is prone to degradation in the environment and when nano-encapsulated it can be more stable.

Antimicrobial activity

The results of MIC and MBC/MFC are expressed in Table 2. It is observed that NP presented antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. The antibacterial action of NP can be explained by the positive surface load of the particle, thanks to chitosan, which already presents widely known bactericidal and bacteriostatic activity against a range of deteriorating and pathogenic microorganisms [23, 36]. The positively charged amino group linked to C-2 of the

chitosan interacts with the negative charge of carboxyl groups in the bacterial cell wall, facilitating interactions of the nanoparticles with the bacterial cell membrane. In addition, the formation of an impermeable layer may occur around the bacterial cells, thus blocking the transport of materials vital to cell maintenance, resulting in cell death [37].

NPQs demonstrated antimicrobial activity against both bacterial groups, the latter being superior to NPs (Table 2), with lower values of MIC and MBC, thus indicating greater antimicrobial potential. However, none of the nanoparticles showed antifungal activity. Souza et al. [38] reported that the antimicrobial activity of quercetin is related to several factors, including inhibition of nucleic acid synthesis (inhibition of gyrase DNA), increased permeability of the internal bacterial membrane and dissipation of membrane potential. Furthermore, quercetin can alter the electrochemical proton gradient of the membrane, being one of the vital components for the bacterium to maintain its ability to synthesize ATP, as well as the membrane transport and motility functions.

Thus, the antimicrobial activity of NPQ can be enhanced by the slow and controlled release of quercetin [18]. The low values of MIC and MBC found (Table 2) can also be explained by the nanometric size of the synthesized particles, increasing their microbial activity by the larger exposed surface area [39]. A similar finding was found by Kumar et al. [7], who found that quercetin-loaded nanoparticles have antibacterial activity, acting under several mechanisms, among them: cell disintegration, cell shrinkage, exudation of cell content and loss of structural integrity.

Yang et al. [40] developed quercetin-CdSe-ZnS nanoparticles and observed that they had antimicrobial activity, being more effective against *E. coli*, presenting an MIC of 4.3 µg/mL, being superior to that found in this study (0.097 µg/mL) for the same strain. Sun et al. [41] evaluated the antimicrobial activity of quercetin-loaded polycyclic-co-acid (PLGA) nanoparticles, noting a remarkable inhibitory activity against all Gram-positive and Gram-negative bacteria, with *E. coli* being the most susceptible, with an MIC of 5.0 µg/mL. Therefore, a 44× and 51× higher concentration of quercetin-CdSe-ZnS and PLGA nanoparticles, respectively, was necessary to inhibit the growth of *E.coli* when compared to NPQ. Yuan et al. [42] made silver nanoparticles with quercetin with antimicrobial activity, being effective in the combat of *S. aureusi,* presenting an MIC of 2.0 µg/mL and MBC of 4.0 µg/mL.

It can also be seen in Table 2 that NPQs were more efficient against Gram-negative bacteria (*S. typhimurium*, *V. parahemolyticus* and *E. coli*). It is reported that Gram-negative bacteria are more susceptible to chitosan, of a polycationic nature, which can compete with the stabilization of divalent metals (e.g., Mg^{2+}, Ca^{2+}) in the cell wall of these bacteria, leading to their structural destabilization [23]. With this structural destabilization caused by chitosan associated to the already-mentioned powerful action of quercetin, the excellent antibacterial activity of quercetin-loaded, lecithin-chitosan nanoparticles against Gram-negative bacteria is explained.

It is remarkable that NPQs showed antibacterial action against pathogenic microorganisms responsible for complex infections, commonly transmitted by food, demonstrating that their incorporation into food matrices can prevent possible contamination. Therefore, the results of this work indicate a possible application of NPQs, with excellent antibacterial potential and a wide range of potential applications, in the development of a new generation of food products.

Table 2. Antimicrobial activity expressed as minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) and minimum fungicidal concentration (MFC).

Strains	NP		NPQ		Tetracycline		Fluconazole	
	MIC µg/mL	MBC/ MFC µg/mL	MIC µg/mL	MBC/ MFC µg/mL	MIC µg/mL	MBC/ MFC µg/mL	MIC µg/mL	MBC/ MFC µg/mL
S. typhimurium	3.12	6.25	1.56	3.12	15.62	15.62	-	-
L. monocytogenes	25.00	50.00	3.12	6.25	15.62	31.25	-	-
V. parahemolyticus	12.50	25.00	0.78	1.56	31.25	62.50	-	-
S. aureus	12.50	25.00	6.25	12.50	7.81	15.62	-	-
S. epidermidis	6.25	12.50	1.56	3.12	7.81	15.62	-	-
E. coli	3.12	6.25	0.09	0.19	31.25	62.50	-	-
C. albicans	-	-	-	-	-	-	62.50	125.00
C. krusei	-	-	-	-	-	-	125.00	250.00
C. glabrata	-	-	-	-	-	-	125.00	250.00
C. tropicalis	-	-	-	-	-	-	62.50	125.00

- : No activity;
NP: Lecithin-chitosan nanoparticles;
NPQ: Quercetin-loaded, lecithin-chitosan nanoparticles.

Cytotoxicity *in vitro*

The evaluation of *in vitro* cytotoxicity in direct response to cellular toxicity is an important tool for evaluating possible nanomaterial-induced toxicity. The cytotoxic effects of NPQ, NP and quercetin (QE) were analyzed by MTT to assess mitochondrial activity and thus the viability of normal cell lines (PBMC and L-929) and tumor cells (MCF-7, HCT 116 and NCI H2N2) (Table 3).

It can be seen in Table 3 that NP and NPQ did not present cytotoxicity compared to normal strains at the studied concentration of 50 µg/mL. Quercetin (QE) inhibited the proliferation of L-929 cells (68.51 ± 0.65%), unlike NPQ, which did not significantly inhibit the proliferation of these cells (9.58 ± 0.19%), indicating the efficient encapsulation of this polyphenol with consequent reduction of its toxicity. Regarding the other normal cell lineage analyzed (PBMC), it was observed (Table 3) that NP, NPQ and QE did not present cytotoxic activity (growth inhibition less than 50%).

As seen previously in this study, empty or quercetin-loaded nanoparticles are positively charged since they are coated with chitosan. Positively charged nanoparticles interact much more with cell membranes than negatively charged nanoparticles, resulting in higher cell uptake for positive nanoparticles [43]. Among the cationic polymers, chitosan is reported to be one of the least toxic polymers compared to others such as polyethyleneimine [44], thus influencing the maintenance of high cell viability of normal cells by nanoparticles (NP and NPQ).

The toxicity of NPQ against neoplastic cells was also studied, aiming at new data on their bioactive properties for possible other studies and applications, besides the food industry, such as the pharmaceutical industry. NPQs were able to inhibit the proliferation of HCT-116 and NCI-H292 neoplastic cells by 49.38 ± 4.29% and 44.39 ± 1.15%, respectively (Table 3).

These results indicate that the NPQs tested were not cytotoxic compared to normal cell lines (L-929 and PBMC), thus not affecting cell metabolism, being a safe ingredient, which is extremely important for future applications in new food products, and were also able to discretely reduce tumor cell activity (MCF-7, HCT 116 and NCI-H292), suggesting further *in vitro* and *in vivo* studies.

Table 3. Percentage of Cell Inhibition (%) in normal cells (L-929 and PBMC) and neoplastic cells (MCF-7, HCT-116 and NCI-H292).

Samples	L-929	PBMC	MCF-7	HCT-116	NCI-H292
CT	0.0 ± 0.0^{d}	0.0 ± 0.0^{c}	0.0 ± 0.0^{e}	0.0 ± 0.4^{e}	0.0 ± 0.3^{e}
NP	0.0 ± 0.04^{d}	39.2 ± 0.8^{b}	21.4 ± 0.0^{b}	42.5 ± 0.8^{d}	39.9 ± 1.8^{d}
NPQ	9.5 ± 0.1^{c}	39.5 ± 1.7^{b}	9.5 ± 0.3^{d}	49.3 ± 4.2^{c}	44.3 ± 1.1^{c}
QE	68.5 ± 0.6^{b}	39.9 ± 3.8^{b}	17.1 ± 0.9^{c}	86.2 ± 3.4^{b}	61.2 ± 0.3^{b}
PC	96.9 ± 0.1^{a}	93.4 ± 0.1^{a}	91.4 ± 0.0^{a}	100.4 ± 0.2^{a}	100.0 ± 0.4^{a}

^{abc} the same letters in a column are not significantly different ($p>0.05$), according to the Tukey test;
PBMC: human peripheral blood mononuclear cells;
L-929: murine fibroblast;
MCF-7: human breast cancer;
HCT-116: human colorectal cancer;
NCI-H292: human lung mucoepidermoid carcinoma;
CT: negative control;
NP: Lecithin-chitosan nanoparticles;
NPQ: Quercetin-loaded, lecithin-chitosan nanoparticles;
QE: Quercetin;
PC: Positive control (Doxorubicin).

Evaluation of the stability of nanoparticles during storage

Particle size distribution over time plays a critical role in colloidal stability, bioaccessibility, turbidity, rheology and sensory properties of food systems [11]. There was no change in the size and potential zeta for NPQs stored at 4°C. The discrete change in size of the NPQs at 30 °C does not interfere with the maintenance of parameters considered good for nanoparticles, already discussed in this work, such as stable PDI and <0.4, high positive potential zeta (> +30 mV) and average size in the nanometric scale.

No significant difference was observed in the antioxidant activity of NPQs when stored at temperatures of 4°C and 30°C after 28 days of storage, presenting an elimination capacity of DPPH radical of 20.86 ± 6.18% and 21.18 ± 4.99%, respectively.

These results indicate that the nanoparticles developed are stable and can be applied to foods stored both at room temperature and those requiring refrigeration without loss of biological properties.

Conclusions

Quercetin loaded lecithin-chitosan nanoparticles were effectively produced and characterized with high biological activity and low cell toxicity. A relevant amount of quercetin in the nucleus of spherical nanoparticles with chitosan coating was encapsulated using the sonication process to form uniform and stable nanoparticulate systems under different storage conditions. Thus, it was possible to increase the solubility of quercetin, without the nanoparticles presenting cytotoxic activity, being therefore safe to be added to food, with excellent antibacterial activity, mainly for Gram-negative bacteria responsible for food contamination, excellent thermal stability, ensuring the maintenance of its integrity after thermal treatments in food, with relevant antioxidant activity, with no difference with the non-encapsulated quercetin. Thus, it is concluded that the nanoparticles developed here are a powerful ingredient to be explored by food industries, which can incorporate them in the development of innovative products, significantly improving their bioactive properties, as well as increasing their conservation and safety.

Declaration of Interest Statement

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

The authors would like to thank FIOCRUZ - Aggeu Magalhães Research Center, the Northeast Strategic Technologies Center (CETENE), the Laboratory of Pharmaceutical Nanotechnology - LNFarm (UFPE), the Laboratory of Non-Conventional Polymers - LPNC (Physics Department/UFPE) and the Laboratory of Polymers and Nanostructures (Nuclear Energy Department/UFPE) for the use of their facilities, as well as thanking the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for their financial support. Maria das Graças Carneiro-da-Cunha expresses her gratitude to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for research grants and fellowship.

Formatting of funding sources

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

References

[1] R.V. Patel, B.M. Mistry, S.K. Shinde, R. Syed, V. Singh, H. Shin, Therapeutic potential of quercetin as a cardiovascular agent. European Journal of Medicinal Chemistry, 155 (2018) 889-904.

[2] C. Carli, M. Moraes-Lovison, S.C. Pinho, Production, physicochemical stability of quercetin-loaded nanoemulsions and evaluation of antioxidant activity in spreadable chicken pâtés. LWT - Food Science and Technology, (2018).

[3] R. Pangeni, S. Kang, M. Oak, E.Y. Park, J.W. Park, Oral delivery of quercetin in oil-in-water nanoemulsion: *In vitro* characterization and *in vivo* anti-obesity efficacy in mice. Journal of Functional Foods, 38 (2017) 571-581.

[4] P. Rameshthangam, J.P. Chitra, Synergistic anticancer effect of green synthesized nickel nanoparticles and quercetin extracted from *Ocimum sanctum*leaf extract. Journal of Materials Science & Technology, 34 (3) (2018) 508-522.

[5] K.H. Chiow, M.C. Phoon, T. Putti, B.K.H. Tan, V.T. Chow, Evaluation of antiviral activities of *Houttuynia cordata Thunb*. extract, quercetin, quercetrin and cinanserin on murine coronavirus and dengue virus infection. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 9 (1) (2016). 1-7.

[6] S. Miltonprabu, M. Tomczyk, K. Skalicka-Woźniak, L. Rastrelli, M. Daglia, S.F. NabavI, S.M. Alavian, S.M. Nabavi, Hepatoprotective effect of quercetin: From chemistry to medicine. Food and Chemical Toxicology, 108 (2017) 365-374.

[7] V.D. Kumar, P.R.P. Verma, S.K. Singh, Morphological and *in vitro* antibacterial efficacy of quercetin loaded nanoparticles against food-borne microorganisms. LWT - Food Science and Technology, 66 (2016) 638-650.

[8] M. Lesjak, I. Beara, N. Simin, D. Pintać, T. Majkić, K. Bekvalac, D. Orčić, N. Mimica-Dukić, Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives. Journal of Functional Foods, 40 (2018) 68-75.

[9] P. Mukhopadhyay, A.K. Prajapati, Quercetin in anti-diabetic research and strategies for improved quercetin bioavailability using polymer-based carriers–a review, RSC Advances - Royal Society of Chemistry, 5 (2015) 97547−97562.

[10] G. Sharma, J. Park, A.R. Sharma, J. S. Jung, H. Kim, Chakraborty, C., Song, D. K., Lee, S.S., Nam, J. S. Methoxy poly (ethylene glycol)-poly (lactide)

nanoparticles encapsulating quercetin act as an effective anticancer agent by inducing apoptosis in breast cancer. Pharmaceutical research, 32 (2015) 723-735.

[11] N. Ghayour, S.M.H. Hosseini, M.H. Eskandari, S. Esteghlal, A. Nekoei, H.H. Gahruie, M. Tatar, F. Naghibalhossaini, Nanoencapsulation of quercetin and curcumin in casein-based delivery systems. Food Hydrocolloids, 87 (2019) 394-403.

[12] M.P. Souza, A.F.M. Vaz, T.B. Costa, M.A. Cerqueira, C.M.M.B. De Castro, A.A. Vicente, M.G. Carneiro-da-Cunha, Construction of a Biocompatible and Antioxidant Multilayer Coating by Layer-by-Layer Assembly of κ-Carrageenan and Quercetin Nanoparticles. Food and Bioprocess Technology, 11 (2018) 1050–1060.

[13] L. Liu, C. Zhou, X. Xia, Y. Liu, Self-assembled lecithin/chitosan nanoparticles for oral insulin delivery: preparation and functional evaluation. International Journal of Nanomedicine, 11 (2016) 761–769.

[14] M.P. Souza, A.F.M. Vaz, M.T.S. Correia, M.A. Cerqueira, A.A. Vicente, M.G. Carneiro-da-Cunha, Quercetin-Loaded Lecithin/Chitosan Nanoparticles for Functional Food Applications. Food and Bioprocess Technology, 7 (2014) 1149-1159.

[15] K.V. Jardim, J.L.N. Siqueira, S.N. Báo, M.H. Sousa, A.L. Parize, The role of the lecithin addition in the properties and cytotoxic activity of chitosan and chondroitin sulfate nanoparticles containing curcumin. Carbohydrate Polymers, 227 (2020).

[16] F.H. Xavier-Jr, C. Gueutin, H. Chacun, C. Vauthier, E.S.T. Egito, Mucoadhesive paclitaxel-loaded chitosan-poly (isobutyl cyanoacrylate) core-shell nanocapsules containing copaiba oil designed for oral drug delivery. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 53 (2019).

[17] F.H. Xavier-Junior, E.S.T. Egito, A.R.V. Morais, E.N. Alencar, A. Maciuk, C. Vauthier, Experimental design approach applied to the development of chitosan coated poly(isobutylcyanoacrylate) nanocapsules encapsulating copaiba oil. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 536 (2018) 251-258.

[18] F. Li, H. Jin, J. Xiao, X. Yin, X. Liu, D. Li, Q.T. Huang, The simultaneous loading of catechin and quercetin on chitosan-based nanoparticles as effective antioxidant and antibacterial agent. Food Research International, 111 (2018) 351-360.

[19] CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28 th. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute, 2018.

[20] B.R. Shah, Y. Li, W. Jin, Y. An, L. He, Z. Li, W. Xu, B. Li, Preparation and optimization of Pickering emulsion stabilized by chitosan-tripolyphosphate nanoparticles for curcumin encapsulation. Food Hydrocolloids, 52 (2016) 369-377.

[21] A. Shanmugam, M. Ashokkumar, Ultrasonic preparation of stable flax seed oil emulsions in dairy systems – Physicochemical characterization. Food Hydrocolloids, 39 (2014) 151-162.

[22] J. Sethi, K. Oksman, M. Illikainen, J.A. Sirviö, Sonication-assisted surface modification method to expedite the water removal from cellulose nanofibers for use in nanopapers and paper making. Carbohydrate Polymers, 197 (2018) 92-99.

[23] D.J. Sullivan, M. Cruz-Romero, T. Collins, E. Cummins, J.P. Kerry, M.A. Morris, Synthesis of monodisperse chitosan nanoparticles. Food Hydrocolloids, 83 (2018) 355-364.

[24] R. Teresi, S. Marullo, C. Gambarotti, F. Parisi, B. Megna, G. Lazzara, F. D'Anna, N.T. Dintcheva, Improvement of oxidation resistance of polymer-based nanocomposites through sonication of carbonaceous nanoparticles. Ultrasonics Sonochemistry, 61 (2020).

[25] Y. Farrag, W. Ide, B. Montero, M. Rico, S. Rodríguez-Llamazares, L. Barral, R. Bouza, Preparation of starch nanoparticles loaded with quercetin using nanoprecipitation technique. International Journal of Biological Macromolecules, 114 (2018) 426-433.

[26] J. Hao, B. Guo, S. Yu, W. Zhang, D. Zhang, J. Wang, Y. Wang, Encapsulation of the flavonoid quercetin with chitosan-coated nano-liposomes. LWT - Food Science and Technology, 85 (2017) 37-44.

[27] Q. Tan, W. Liu, C. Guo, G. Zhai, Preparation and evaluation of quercetin-loaded lecithin-chitosan nanoparticles for topical delivery. International Journal of Nanomedicine, 6 (2011) 1621-1630.

[28] J. Li, I. Hhwang, X. Chen, H.J. Park, Effects of chitosan coating on curcumin loaded nano-emulsion: Study on stability and in vitro digestibility. Food Hydrocolloids, 60 (2016) 138-147.

[29] V. Natarajan, N. Krithica, B. Madhan, P. K. Sehgal, Formulation and Evaluation of Quercetin Polycaprolactone Microspheres for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. Journal of Pharmaceutical Sciences, 100 (2011).

[30] J. Liu, X. Wang, H. Yong, J. Kan, N. Zhang, C. Jin, Preparation, characterization, digestibility and antioxidant activity of quercetin grafted *Cynanchum auriculatum* starch. Biological Macromolecules, (2018).

[31] R. Bai, X. Zhang, H. Yong, X. Wang, Y. Liu, J. Liu, Development and characterization of antioxidant active packaging and intelligent Al3+-sensing films based on carboxymethyl chitosan and quercetin. Biological Macromolecules, (2019).

[32] A. Sedaghat Doost, D.R.A. Muhammad, C.V. Stevens, K. Dewettinck, P. Van Der Meeren, Fabrication and characterization of quercetin loaded almond gum-shellac nanoparticles prepared by antisolvent precipitation. Food Hydrocolloids, (2018).

[33] G.H. Shin, S.K. Chung, J.T. Kim, H.J. Joung, H.J. Park, Preparation of Chitosan-Coated Nanoliposomes for Improving the Mucoadhesive Property of Curcumin Using the Ethanol Injection Method. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61 (2013) 11119−11126.

[34] T. Şenyiğit, F. Sonvico, S. Barbieri, Ö. Özer, P. Santi, P. Colombo, Lecithin/ chitosan NPs of clobetasol-17-propionate capable of accumulation in pig skin. Journal of Controlled Release, 142 (3) (2010) 368–373.

[35] A. Masek, M. Latos, M. Piotrowska, M. Zaborski, The potential of quercetin as an effective natural antioxidant and indicator for packaging materials. Food Packaging and Shelf Life, 16 (2018) 51-58.

[36] C. Ryan, E. Alcock, F. Buttimer, M. Schmidt, D. Clarke, M. Pemble, M. Bardosova, Synthesis and characterisation of cross-linked chitosan composites functionalised with silver and gold nanoparticles for antimicrobial applications. Science and Technology of Advanced Materials, 18 (1) (2017) 528-540.

[37] T. Niaz, S. Shabbir, T. Noor, A. Rahman, H. Bokhari, M. Imran, Potential of polymer stabilized nano-liposomes to enhance antimicrobial activity of nisin Z against foodborne pathogens. LWT - Food Science and Technology, 96 (2018) 98-110.

[38] M.P. Souza, A.F.M. Vaz, H.D. Silva, M.A. Cerqueira, A. Vicente, M.G. Carneiro-da-Cunha, Development and Characterization of an Active Chitosan-Based Film Containing Quercetin. Food and Bioprocess Technology, 8 (2015) 2183–2191.

[39] K.H. Lee, J. Lee, E.S. Kim, H.G. Lee, Preparation, characterization, and food application of rosemary extract-loaded antimicrobial nanoparticle dispersions. LWT - Food Science and Technology, (2019).

[40] X. Yang, W. Zhang, Z. Zhao, N. Li, Z. Mou, D. Sun, Y. Cai, W. Wang, Y. Lin, Quercetin loading CdSe/ZnS nanoparticles as efficient antibacterial and anticancer materials. Journal of Inorganic Biochemistry, 167 (2017) 36-48.

[41] D. Sun, N. Li, W. Zhang, E. Yang, Z. Mou, Z. Zhao, H. Liu, W. Wang, Quercetin-loaded PLGA nanoparticles: a highly effective antibacterial agent in vitro and anti-infection application in vivo. Journal of Nanoparticle Research, 18 (2016).

[42] Y.G. Yuan, Q.L. Peng, S. Gurunathan, Effects of Silver Nanoparticles on Multiple Drug-Resistant Strains of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa from Mastitis-Infected Goats: An Alternative Approach for Antimicrobial Therapy. International Journal of Molecular Sciences, 18 (2017).

[43] Y. Mu, Y. Fu, J. Li, X. Yu, Y. Li, Y. Wang, X. Wu, K. Zhang, M. Kong, C. Feng, X. Chen, Multifunctional quercetin conjugated chitosan nano-micelles with P-gp inhibition and permeation enhancement of anticancer drug. Carbohydrate Polymers, 203 (2019) 10-18.

[44] A. Hafner, J. Lovrić, D. Voinovich, J. FilipoviĆ-Grcić, Melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles: physicochemical characterisation and permeability through Caco-2 cell monolayers. International Journal of Pharmaceutics, 38 (2009) 205-213.

4.2. ARTIGO 2 - ENCAPSULAÇÃO DE CURCUMINA EM NANOPARTÍCULAS DE LECITINA-QUITOSANA: CARACTERIZAÇÃO, PROPRIEDADES CITOTÓXICAS E BIOATIVAS

Artigo a ser traduzido e submetido à revista *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Fator de impacto 3.971, Qualis A1.

Resumo

Curcumina em diferentes concentrações (0, 50, 70, 100 e 150 µg/mL) foi incorporada em nanopartículas de lecitina-quitosana (NPC). A caracterização físico-química foi realizada através potencial zeta, Espectroscopia por Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR), Análise Termogravimétrica (TGA), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e avaliando-se a eficiência de encapsulação da curcumina. As propriedades bioativas foram determinadas através da atividade antioxidante (DPPH), atividade antimicrobiana (CIM, CBM/CFM) e a atividade citotóxica realizada contra células normais e neoplásicas. As nanopartículas tiveram sua estabilidade avaliada durante 28 dias à 4 °C e 30 °C. As NPC apresentaram-se de forma esférica, tamanho médio de 236,27 ± 2,29 nm, índice de polidispersão de 0,155 ± 0,01 e potencial zeta de +51,31 ± 2,41 mV. Nanopartículas contendo 70 µg de curcumina/mL apresentaram melhor taxa de encapsulação (92,74 ± 0,01%) e estabilidade durante armazenamento a diferentes temperaturas. As NPC apresentaram excelente atividade antimicrobiana para bactérias Gram-positivas (CIM de 1,56 µg/mL para *L. monocytogenes,* 1,56 µg/mL para *S. aureus* e 3,12 µg/mL para *S. epidermidis)* e Gram-negativas (CIM de 1,56 µg/mL para *S. typhimurium*, 3,12 µg/mL para *V. parahemolyticus* e 0,78 µg/mL para *E. coli*) sem apresentar citotoxicidade para células normais (PBMC e L-929) e discreta capacidade de inibir células tumorais (HCT-116 e NCI-H292). A atividade antioxidante foi preservada após a encapsulação e permaneceu estável durante 28 dias à 4 °C e 30 °C. A encapsulação melhorou a solubilidade da curcumina em meio aquoso, sua estabilidade e biodisponibilidade. Estas características ampliam a possibilidade de aplicação destas nanopartículas no campo dos nutracêuticos e em

diferentes matrizes alimentícias, seja para preservação de produtos alimentícios, assim como para o desenvolvimento de novos produtos funcionais

Palavras-chave: compostos bioativos, polifenóis, flavonoides, nanoencapsulação, antioxidante, alimentos funcionais.

Introdução

Hábitos alimentares saudáveis são uma tendência mundial e o consumo de nutracêuticos cada vez mais tem representado um papel importante na manutenção da saúde geral da população. A palavra nutracêutico deriva das palavras "nutrição" e "farmacêutico", e faz referência ao alimento ou ingrediente alimentar que possui ação farmacológica, proporcionando benefícios para a saúde (Tripathi et al., 2020). Diversas substâncias isoladas de alimentos podem ser consideradas nutracêuticas e uma das que vem sendo amplamente estudada é a curcumina (Kharat & McClements, 2019; Nijhawan & Behl, 2020).

A curcumina [(1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona)] é um pigmento sólido amarelo obtido a partir do rizoma de açafrão, erva perene *Curcuma longa* Linn, usado como tempero em muitos alimentos, assim como corante. É utilizada em terapias indígenas e na medicina tradicional no tratamento de diversas doenças. Estudos *in vitro* e *in vivo* comprovam sua capacidade anti-inflamatória, antioxidante, antibacteriana, antidiabética e anticancerígena com efeitos antiproliferativo e pró-apoptóticos contra vários tumores (melanoma, mama, gastrointestinal, sarcoma, genitouniário, dentre outros), além de atividades farmacológicas contra Alzheimer, esclerose múltipla, artrite reumatóide, aterosclerose e de proteção contra a formação de catarata, lesão hepática, toxicidade pulmonar e fibrose, inibição de trombose e supressão de agregação plaquetária, assim como melhora da cicatrização de feridas (Ma et al., 2019; Zahiri et al., 2019).

As propriedades biológicas e farmacológicas da curcumina se dão graças a sua estrutura fenólica, com grupos metoxi e fenol. É um composto formado por três curcuminóides hidrofóbicos: curcumina, bisdemetoxicurcumina e desmetoxicurcumina (77:3:17), sendo classificado de acordo com o Sistema de

Classificação Biofarmacêutica (BCS) como um medicamento de classe II pouco solúvel em água (11 ng/mL) (Park et al., 2019), com alta taxa de decomposição em pH neutro ou básico e fotossensibilidade, com baixa biodisponibilidade oral, o que reduz significativamente a sua eficácia como agente de prevenção de doenças. Deste modo, o estudo de estratégias que melhorem a solubilidade em meio aquoso e, consequentemente, a sua absorção e disponibilidade para os tecidos, é bastante promissor (Jardim et al., 2020).

Uma alternativa para superar as propriedades físico-químicas da curcumina é o desenvolvimento de nanopartículas para carrear e entregar efetivamente o composto bioativo à células-alvo, além de melhorar sua solubilidade em meio aquoso e suas propriedades biológicas, como sua atividade antioxidante. Uma variedade de ingredientes pode ser usada na elaboração das nanopartículas em sistemas de entrega coloidal de qualidade alimentar, incluindo água, lipídios, proteínas, polissacarídeos, fosfolipídios, surfactantes, minerais, antioxidantes, entre outros (Kharat & Mcclements, 2019). Nanopartículas de biopolímeros têm algumas vantagens sobre outros tipos de sistemas de entrega devido ao seu pequeno tamanho, potencial de direcionamento, baixa taxa de degradação e perfis de liberação sustentada (Chen et al., 2020), além disso, polissacarídeos, possuindo muitos grupos hidroxila, são promissores e ambientalmente candidatos amigáveis como agentes redutores leves para sintetizar e estabilizar nanopartículas em ambiente aquoso (Lyu et al., 2019).

A quitosana, polissacarídeo linear composto de unidades de glucosamina e N-acetilglucosamina, tem sido amplamente utilizada como um polímero formador de partículas e, mais inovador, como um revestimento de superfície. Nanopartículas poliméricas revestidas com quitosana são exemplos de nanocarreadores de compostos bioativos (ou outras substâncias ativas) para inúmeras aplicações, por suas vantagens como melhorar a estabilidade físico-química, controlar a liberação do composto, melhorar os antimicrobianos, assim como aumentar a biodisponibilidade e eficácia do composto, dentre outras (Frank et al., 2020).

Já a lecitina contribui para melhorar o carregamento de compostos lipofílicos, e prolongar sua liberação, sendo ideal na formação de um nanocarreador com estrutura estável e rígida, com boa biocompatibilidade, adesividade mucosa superior

e citotoxicidade insignificante. Assim sendo, nanopartículas à base de lecitina e quitosana obtidas por interações eletrostáticas, entre um polissacarídeo carregado positivamente e fosfolipídios carregados negativamente, vêm sendo utilizadas com sucesso para encapsular substâncias insolúveis ou pouco solúveis em água já que a lecitina promove melhorias nas propriedades da rede polimérica formada, bem como um aumento na taxa de incorporação do composto bioativo (Souza et al., 2014; Alkholief, 2019; Jardim et al., 2020).

Diante do exposto, a nanotecnologia representa um método promissor para criar novas formulações com o objetivo de melhorar a atividade biológica da curcumina. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi encapsular curcumina em nanopartículas de lecitina-quitosana de forma a permitir a entrega eficaz desse nutracêutico, melhorando sua eficiência.

Material e métodos

Materiais

Etanol, Mueller Hinton Agar e Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (MHA) (Merck KGaA, Alemanha), ácido láctico (85%, Dinâmica, Brasil), quitosana (grau de desacetilação 75%), *Curcuma longa* L. com pureza de 98%, ácido fosfotúngstico, DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), resazurina (7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide), MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] e Meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA), lecitina de soja (Lipoid S 45, 40% fosfatidilcolina/60% fosfatidiletanolamina, Lipoid, Ludwigshafen, Germany), Meio DMEM (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), Doxorrubicina (LIBBS Farmacêutica LTDA., Brasil), Água deionizada (Millipore Q purification system, Millipore Corp., Bedford, MA).

Obtenção das nanopartículas

As nanopartículas foram obtidas por interações eletrostáticas através do método de injeção direta de uma solução etanólica de lecitina sob uma solução aquosa de quitosana conforme descrito por Souza et al. (2014), com algumas modificações. Resumidamente, foi preparada uma solução padrão de 0,2% de quitosana (p/v) em ácido láctico a 1% (v/v) sob agitação magnética (1000 rpm,

Fisatom, modelo 752) por 16 h à temperatura ambiente. Desta solução, 1,25 mL foi diluído com água deionizada até volume final de 23 mL.

As nanopartículas (NP) foram obtidas por gotejamento (1 mL/min com uma seringa de 0,38 mm) de 2 mL de solução etanólica de lecitina a 25 mg/mL, contendo diferentes concentrações de curcumina (0; 50; 70; 100 e 150 µg/mL) em 23 mL da solução aquosa de quitosana, sob agitação magnética contínua (1000 rpm) com posterior sonicação (sonicador com sonda, Q125 Sonicator, QSonica, LLC, Newtown, Connecticut, USA). Durante o processo de sonicação foi utilizada a frequência de 80 Hz, durante 7 min, a uma potência de 125 W, sob banho de gelo.

Caracterização físico-química

Determinação do tamanho hidrodinâmico, PDI e potencial zeta

A distribuição dos tamanhos (diâmetro médio) e índice de polidispersão (PDI) foi determinada por espalhamento de luz dinâmico (DLS) (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, UK). Cerca de 1 mL da amostra foi transferida para uma cubeta de poliestireno e a medida foi realizada a 25 °C, com ângulo de detecção de 90° e comprimento de onda de 633 nm. As amostras foram submetidas à leitura seguindo a diluição de 1:3 com água deionizada para evitar a dispersão múltipla. O potencial zeta foi determinado por laser Doppler microeletroforese em Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) utilizando a Equação de Smoluchowsky à 25 °C. Todas as medições foram realizadas em triplicata com três leituras verdadeiras para cada uma das amostras. Os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão de nove valores obtidos. Após adição das diferentes concentrações de curcumina nas NP, a partícula com melhor característica de tamanho, PDI e potencial zeta foi denominada NPC e foi submetida à análises seguintes.

Eficiência de encapsulação (EE)

A eficiência de encapsulação da curcumina com concentração previamente determinada (NPC) foi realizada de acordo com Xavier-Jr et al. (2019), utilizando a técnica de ultrafiltração-centrifugação com algumas modificações. Resumidamente, as NPC foram centrifugadas a 8.000 rpm por 20 min a 4 °C (Eppendorf centrífuga 5418, Rotor FA-45-18-11, Hamburgo, Alemanha) e porções da curcumina

encapsulada foram separadas usando filtros para ultrafiltração (Amicon Ultra-0.5, Millipore®). O sobrenadante resultante da centrifugação teve seu conteúdo de curcumina diluído em etanol (1:10) e mensurado em espectrofotometro UV-Vis (Jasco, Japão) a 427 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata e a eficiência de encapsulação (EE%) da curcumina nas NPC foi calculada utilizando a Equação 1 (Eq. 1):

$$EE(\%) = \frac{T-F}{T} \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

Onde T é a quantidade total de curcumina na solução e F é a quantidade de curcumina no sobrenadante após a ultrafiltração.

Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Uma gota de solução de nanopartícula vazia (NP) ou carregada com curcumina (NPC), diluída em água deionizada (1:3), foi depositada em uma grade de cobre de 200 mesh revestida com filme de carbono e mantida por 5 min. O excesso de solução foi removido por papel de filtro. Posteriormente uma gota de solução aquosa a 2% (p/v) de ácido fosfotúngstico foi aplicada para corar a amostra por cerca de 30 s. Em seguida, todas as amostras foram deixadas para secar a temperatura ambiente (30 °C) por 12 h para realce do contraste e sua morfologia foi determinada no MET (Tecnai™ Spirit TEM; FEI Company, Hillsboro, Oregon, EUA), operado a 60 kV (Xavier-Junior et al., 2018).

Espectroscopia por Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

Espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) das nanopartículas de lecitina-quitosana (NP), nanopartículas contendo curcumina (NPC) e da curcumina pura (C) foram obtidos por um aparelho FT-IR (modelo 4600, Jasco) com Acessório Pro One de Reflexão Atenuada (FT-IR-ATR), com cristal de ZnSe, ângulo de incidência no centro de 45°, área de contato circular de 4,9 mm^2. Os espectros das amostras liofilizadas foram obtidos na faixa de 500 a 4000 cm^{-1}, com resolução de 4 cm^{-1}, usando 32 varreduras.

Análise termogravimétrica (TGA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A estabilidade térmica da curcumina, NP e NPC, ambas as nanopartículas previamente liofilizadas, foi avaliada por curvas termogravimétricas (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) em Analisador Térmico Simultâneo (TGA/DSC 2 star®, Mettler Toledo, Switzerland). As amostras (5 a 9 mg, peso seco) foram colocadas em cadinho de alumínio e aquecidas dentro de uma faixa de varredura de 25 a 500 °C, com uma taxa de aquecimento constante de 10 °C min^{-1} sob fluxo constante de nitrogênio ajustado a uma vazão de 50 $mLmin^{-1}$ usando um cadinho vazio como referência.

Capacidade antioxidante

DPPH

As amostras (NP, NPC e C) foram avaliadas quanto a capacidade antioxidante utilizando o método do 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), utilizando a metodologia descrita por Souza et al., (2014). Resumidamente, 20 µL das amostras foram adicionados em 200 µL de solução etanólica de DPPH (200 µM), com posterior agitação vigorosa e repouso por 30 min em temperatura ambiente (30 °C) no escuro. O controle negativo foi obtido utilizando etanol e a solução etanólica de DPPH. A absorbância da solução de reação foi medida a 515 nm em leitor de microplacas (ELISA Bio-Rad model xMark™, USA). A porcentagem de eliminação de radicais DPPH pelas amostras foi calculada de acordo com a Equação 2 (Eq. 2):

$$\text{Capacidade de eliminação do radical DPPH (\%)} = \frac{(1-\mathbf{As})\times 100}{\mathbf{Ac}} \quad \text{Eq. 2}$$

Onde As é a absorbância da amostra; Ac é a absorbância do controle (etanol) com a solução etanólica de DPPH.

Atividade antimicrobiana

Microrganismos e preparação de Inóculo

A atividade antimicrobiana de NP e NPC foi avaliada em S*almonella typhimurium* (ATCC 14028), L*isteria monocytogenes* (ATCC 7644), V*ibrio*

parahemolyticus (ATCC 17802), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 1222839), *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida albicans* (ATCC 5788), *Candida glabrata* (ATCC 5879) e *Candida tropicalis* (ATCC 13803). As bactérias e os fungos foram cultivados no ágar Mueller Hinton (MHA) e no ágar Sabouraud Dextrose (SDA), respectivamente. Após o período de incubação, as colônias de cada linhagem foram transferidas assepticamente para solução salina estéril (NaCl a 0,8%). A turbidez das soluções foi padronizada com o padrão 0,5 Mac Farland (10^6 UFC/mL).

Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima (CIM) para amostras de NP e NPC foi realizada de acordo com os padrões do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018) pelo método de microdiluição em microplaca de 96 poços com concentração variando de 0 a 400 $\mu g.mL^{-1}$ por diluições em série. Foram adicionados 100 µL de caldo Mueller Hinton (bactérias) e caldo Sabouraud Dextrose (fungos) contendo 10 µL de inóculo (10^6 UFC/mL de cada cepa) em cada poço. Os microrganismos foram incubados em um agitador rotativo (150 rpm) a 37 °C por 48 h. Posteriormente, 10 µL de resazurina a 0,001% foram adicionados à placa e incubados por 6 h. O crescimento foi indicado por mudanças de cor de púrpura para rosa (ou incolor). A menor concentração em que a mudança de cor ocorreu foi tomada como CIM. Como controle positivo, tetraciclina e fluconazol foram utilizados para bactérias e fungos, respectivamente.

Concentração bactericida e fungicida mínima (CBM/CFM)

As concentrações mínimas bactericida e fungicida (CBM/CFM) foram realizadas de acordo com os padrões do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018). Para a determinação, alíquotas dos poços da CIM foram transferidas para placas de Petri contendo meio Agar Mueller Hinton (MHA) ou Sabouraud Dextrose Agar (SDA), incubadas a 37 °C por 48 h. O CBM/CFM foi considerada a menor concentração a partir da qual não foi observado crescimento microbiano após a cultura. Como controle positivo, tetraciclina e fluconazol foram utilizados para bactérias e fungos, respectivamente.

Estudos de Citotoxicidade *in vitro*

A atividade citotóxica foi realizada através do método do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] utilizando células não neoplásicas e células tumorais. As linhagens de células não neoplásicas utilizadas foram L-929 (fibroblasto murinho), mantida em meio de cultura DMEM, e PBMC (células mononucleadas de sangue periférico humano) ressuspendidas em meio de cultura RPMI 1640. Também foram utilizadas linhagens de células tumorais humanas NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano) e MCF-7 (câncer de mama humano), mantidas em meio de cultura DMEM, e HCT-116 (câncer de colorretal humano) mantidas em meio de cultura RPMI 1640. Os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução de antibiótico (penicilina e estreptomicina). As células foram mantidas em estufa a 37 ºC em atmosfera úmida enriquecida com 5% de CO_2. As células L-929, NCI-H292, MCF-7, HCT-116 (10^5 células/mL) e PBMC (10^6 células/mL) foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h. Em seguida as amostras (NP, NPC e C) dispersas no meio de cultura correspondente foram adicionadas aos poços em concentração final de 50 µg/mL. Após 72 h de reincubação foram adicionados 25 µL de MTT (5 mg/mL) e depois de 3h de incubação, o meio de cultura com o MTT foi aspirado e 100 µL de DMSO foi adicionado a cada poço. A absorbância foi medida no comprimento de onda de 560 nm em leitor de microplacas (ELISA Bio-Rad model xMark™, USA). O fármaco doxorrubicina (5 µg/mL) (DOX) foi utilizado como padrão (controle positivo).

Avaliação da estabilidade das nanopartículas durante o armazenamento

As NPC foram avaliadas com 1, 7, 14 e 28 dias sob armazenamento a 4 e 30 °C por 28 dias sob proteção da luz. A estabilidade das NPC foi medida avaliando-se o tamanho médio, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta e capacidade de eliminação de radicais DPPH, conforme descrito anteriormente.

Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como a média ± DP. As médias de dois grupos foram comparadas usando testes t de Student não pareados. Na comparação de vários grupos, a

análise de variância unidirecional (ANOVA) foi aplicada com o procedimento de comparação múltipla Tukey (SigmaStat, versão de teste, EUA). Os dados estatísticos foram considerados significativos com p <0,05.

Resultados e discussão

Caracterização das NPC

O tamanho das nanopartículas de lecitina-quitosana mostrou-se dependente da concentração de curcumina (Figura 1). Com o aumento da concentração de curcumina (acima de 70 µg/mL) o tamanho médio das partículas aumentaram (p<0,05). O tamanho médio para todas as concentrações testadas foi inferior ao relatado por Zahiri et al. (2019) que, ao elaborarem nanopartículas de quitosana contendo curcumina, encontraram valores de 359 ± 65 nm. O índice de polidisperção (PDI) (Figura 1) não foi alterado (p>0,05) até a concentração de 70 µg/mL de curcumina, apresentando valores <0,25.

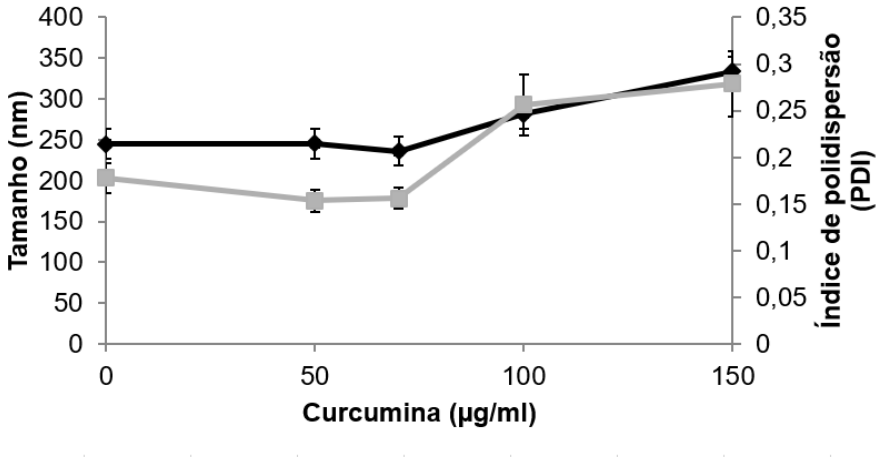


Figura 1. Tamanho e índice de polidispersão (PDI) das nanopartículas de lecitina-quitosana obtidas por ultrassom em função da concentração de curcumina (µg/ml). Tamanho (—●—) e PDI (—■—).

As suspensões de nanopartículas carregada com curcumina apresentaram um estado translúcido com opalescência visível para as concentrações de 50 a 100 µg/ml, sendo as NPC com 150 µg curcumina/mL opaca devido à dispersão da luz por partículas maiores (p<0,05) (333,98 ± 5,31 nm). Portanto, associando os valores encontrados de tamanho médio, PDI e a característica visual da solução de NPC, a

concentração de curcumina escolhida para ser adicionada nas nanopartículas e dar prosseguimento ao estudo foi a de 70 µg/ml, de forma a carrear a maior quantidade de curcumina, com melhores características de tamanho (236,27 ± 2,29 nm) e PDI (0,155 ± 0,01).

O potencial zeta médio de NP e NPC (70 µg/mL) foi de +41,88 ± 1,21 mV e +51,31 ± 2,41 mV, respectivamente. Este aumento do potencial zeta em NPC está associado com a maior protonação de grupos amina de quitosana (Jardim et al., 2020). Módulos elevados de potencial zeta indicam a maior estabilidade das NPC na dispersão, visto que, aumentam a reatividade da partícula, reduzindo sua aglomeração (Facchi et al., 2016). A carga positiva se dá pela presença da quitosana na superfície das nanopartículas. Sabe-se que para esse tipo de sistema a formação das nanopartículas se dá por auto-montagem, onde a porção polar carregada negativamente da lecitina (grupos fosfatos) interage com a carga positiva dos grupamentos amina ($NH3^{+}$) da cadeia de quitosana, deixando a porção apolar na lecitina disponível para interagir com a porção hidrofóbica da curcumina no interior da vesícula formada (Souza et al., 2014; Chhonker et al., 2015; Tai et al., 2020).

A eficiência de encapsulação de curcumina nas NPC (70 µg/mL) foi de 92,74 ± 0,01%. Valor este superior aos 88% e 87,5 ± 0,5% encontrados para as nanopartículas de lecitina e zeína (Chuacharoen & Sabliov, 2019) e nanopartículas de quitosana, condroitina e lecitina (Jardim et al., 2020), respectivamente. A maior hidrofobicidade da lecitina pode explicar a alta eficiência de encapsulamento, já que a curcumina se estabiliza no interior das NP, com a porção hidrofóbica da lecitina.

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Na micrografia eletrônica de transmissão pode-se verificar que as NPC são estruturas eletrodensas compactas, esféricas e pouco polidispersas (Figura 2A e B). O menor tamanho das partículas observado (<50 nm) em relação aos valores obtidos no DLS podem estar relacionados ao processo de secagem necessário durante a preparação da amostra para observação no MET. Comportamento semelhante foi observado por Jardim et al. (2020) para nanopartículas de quitosana e sulfato de condroitina contendo curcumina. A figura 2A também demonstra

nitidamente que as NPC não estão agrupadas, o que confirma que existe repulsão entre as partículas, graças ao já descrito elevado potencial zeta (+51,31 ± 2,41 mV), o que sugere uma maior estabilidade dessas em suspensão (Cuomo et al., 2018).

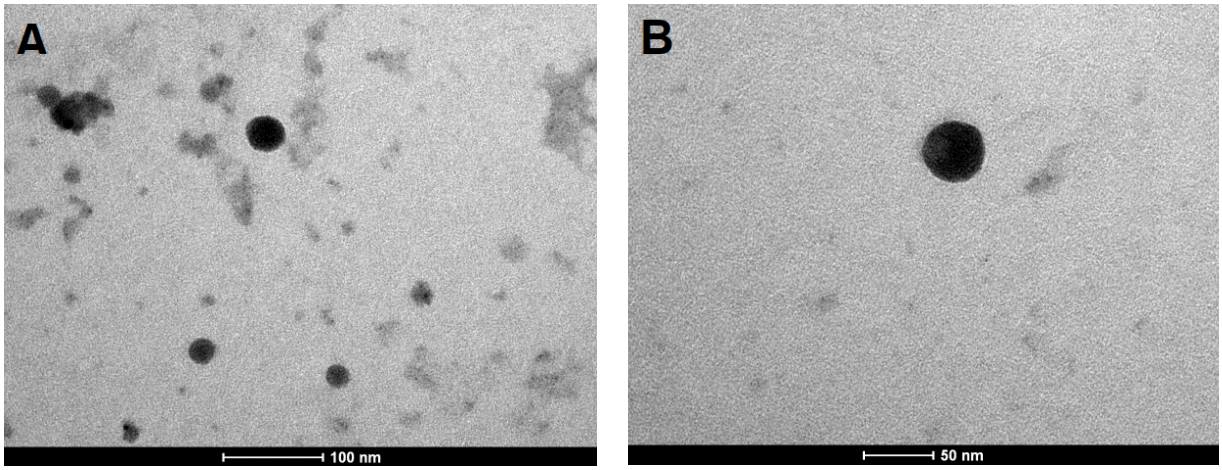


Figura 2. Imagens eletrônicas de transmissão da dispersividade (A) e morfologia (B) das nanopartículas de lecitina-quitosana contendo curcumina (70 µg/mL).

Espectroscopia por Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

A aplicação da espectroscopia FR-IR é utilizada para avaliação das mudanças estruturais e caracterização dos materiais. Através da espectroscopia FT-IR da curcumina (Figura 3) foi observado uma região de vibração em 3506 cm^{-1}, que pode ser atribuída a vibração de alongamento do grupo fenólico (OH). As fortes bandas de absorção em 1602 cm^{-1} e 1510 cm^{-1} correspondem, respectivamente, às vibrações do alongamento e as vibrações de estiramento de C-C do anel aromático da curcumina. E em 1427 cm^{-1} tem-se a flexão de vibração do grupo (CH) ligado ao anel aromático da curcumina. Na região de 1274 cm^{-1} verifica-se o modo de vibração de C – O. As bandas na região de 962, 808 e 714 cm^{-1} correspondem às vibrações de flexão da ligação CH de grupos alcenos (Silva et al., 2016). O FT-IR das NP apresentou picos característicos da estrutura da quitosana com forte banda de absorção na região entre 3200-3500 cm^{-1}, que pode ser atribuída ao alongamento de NH e a 1650 cm^{-1}, 1590 e 1380 cm^{-1} atribuídos à flexão de NH das unidades de glicosamina (Sousa, Guebitz & Kokol, 2009). Também foi observado ainda uma banda de absorção a 1150 cm^{-1} que corresponde a ligação C – O – C característica

da estrutura da β 1–4 glicose (Jardim et al., 2020). Para o FT-IR das NPC verifica-se espectro semelhante ao das NP, provavelmente devido a curcumina estar localizada no interior das nanopartículas.

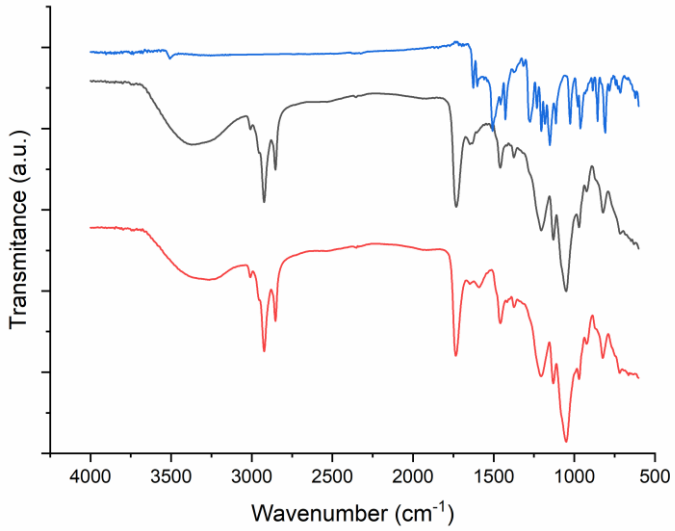
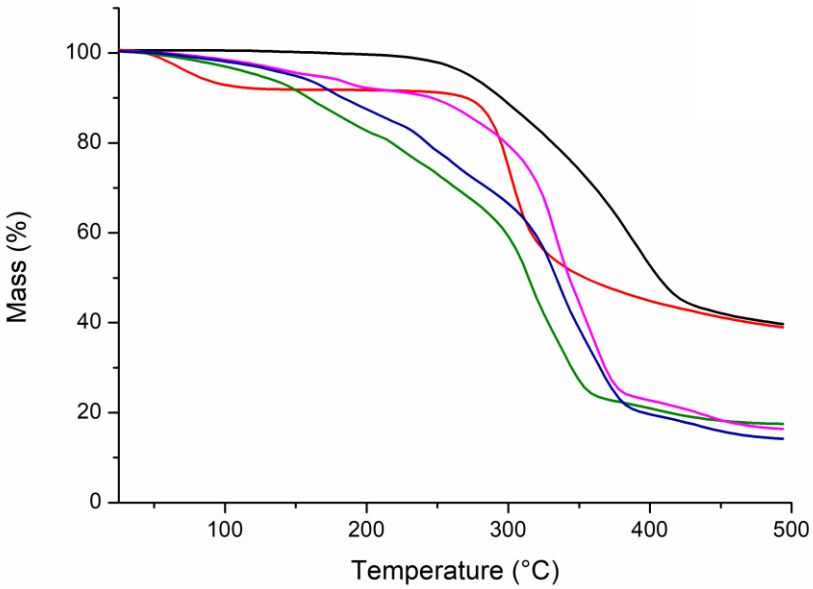


Figura 3. Espectro FT-IR da curcumina (linha azul), nanopartículas contendo curcumina (linha preta) e nanopartículas vazias (linha vermelha).

Análises térmicas

As análises térmicas são importantes para se obter informações sobre cristalinidade e interações entre os materiais utilizados. A estabilidade térmica das NPC foi avaliada e as curvas TGA e DSC são mostradas na Figura 4. Verifica-se a perda de massa da quitosana em duas faixas de temperatura, a primeira de 47 °C a 87 °C, com perda de 8% de peso, devido a perda de umidade, e outra de 286 °C a 319 °C, com perda de 46% de massa, resultado da degradação térmica do polímero. Observa-se semelhança no comportamento de perda de massa nas nanopartículas (Figura 4A), tendo NP perda de massa de 77% (292 °C a 369 °C) e NPC perda de 70% (303 °C a 367 °C), em faixas coerentes que indicam que a partícula foi degradada a partir da decomposição do revestimento formando pela quitosana (286 °C a 319 °C) (Figura 4B). A estabilidade térmica de NPC superior às NP pode se dá pelo fato de a curcumina conter compostos fenólicos termoestáveis (Ezati & Rhim, 2020).

A



B

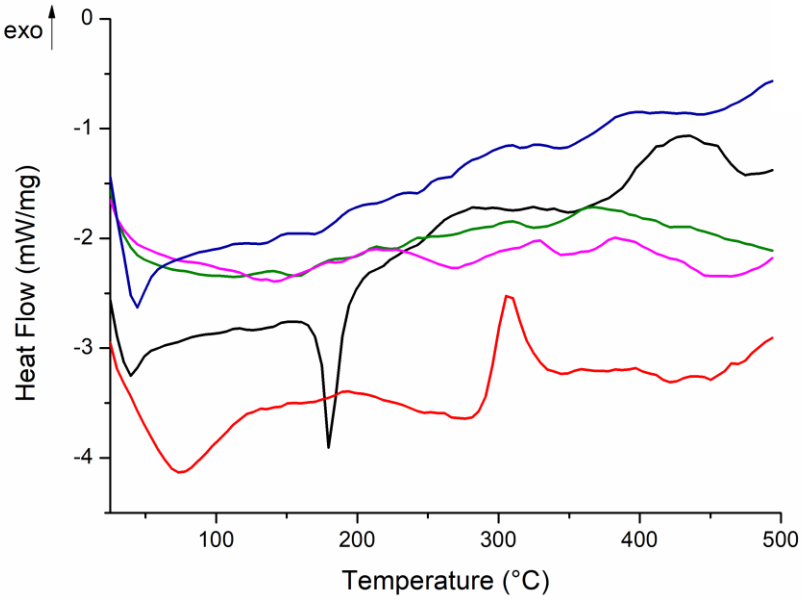


Figura 4. Análise termogravimétrica (TGA) (A) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) (B) da curcumina (linha preta), quitosana (linha vermelha), lecitina (linha rosa), nanopartículas de lecitina-quitosana (NP, linha verde) e nanopartículas de lecitina-quitosana contendo curcumina (NPC, linha azul).

Em relação a curcumina, esta perde 59% de massa na faixa de 307 °C a 418 °C (Figura 4A), havendo inicialmente a decomposição do grupo substituinte da

curcumina e depois iniciando a decomposição de seus anéis de benzeno (Mahmood et al., 2017). Observa-se desta forma o eficaz encapsulamento da curcumina pela ausência do seu pico de fusão (181 °C) (Figura 4B) em NPC. Pavan Rudhrabatla et al. (2019) relataram pico de fusão da curcumina pura a 183,62 °C, temperatura semelhante ao deste estudo, e também não observaram pico endotérmico característico da curcumina após carregamento do polifenol em hidrogel. Desta forma, esses autores sugerem distribuição molecular e forte associação de moléculas de curcumina com a cadeia de polímeros que formam o hidrogel, corroborando assim com este presente estudo.

A barreira formada pelo revestimento de quitosana demonstra conservar a integridade da estrutura de maneira eficaz e também mantém a alta estabilidade térmica da curcumina incorporada (Tai et al., 2020). Essa estabilidade às altas temperaturas é excelente, visto que, a maioria dos produtos alimentícios passa por tratamentos térmicos, como pasteurização e esterilização, durante seu processamento, indicando desta forma a manutenção das propriedades das NPC.

Capacidade antioxidante

Nutracêuticos antioxidantes como a curcumina possuem a capacidade de mitigar o estresse oxidativo no organismo, estresse esse associado ao envelhecimento e ao desenvolvimento de doenças (Abdel-Daim et al., 2018). As propriedades antioxidantes da curcumina também a torna altamente atraente para aplicação em produtos alimentares, com o intuito de evitar reações oxidativas, como formação de ranço e descoloração em alimentos. A atividade antioxidante da curcumina é conhecida e está associada à grupos hidroxila fenólicos, que formam grupos fenoxi para remover os radicais livre (Chang et al., 2019; Zhang et al., 2019; Ezati & Rhim, 2020). As nanopartículas de lecitina-quitosana (NP) apresentaram baixa atividade antioxidante (Tabela 1) mas, como esperado, a adição de curcumina nas NP (NPC) aumentou a capacidade antioxidante das nanopartículas. Foi possível observar ainda, que não houve diferença ($p>0,05$) entre a capacidade antioxidante das NPC e da curcumina livre, demonstrando assim a eficiência da sua encapsulação, sem ocorrer prejuízo em sua bioatividade.

Tabela 1. Atividade antioxidante pela capacidade de eliminação do DPPH de NP, NPC e C.

Amostras	DPPH Capacidade de eliminação (%)
NP	6,32 ± 0,07[b]
NPC	20,02 ± 0,02[a]
C	20,94 ± 0,05[a]

[abc] letras iguais na vertical não diferem significativamente (p>0,05) pelo teste de Tukey.
NP: Nanopartículas de lecitina-quitosana.
NPC: Nanopartículas de lecitina-quitosana contendo curcumina (70 µg/mL).
C: Solução etanólica de curcumina (70 µg/mL).

Atividade antimicrobiana

Na Tabela 2 observa-se que tanto as NP quanto as NPC apresentam atividade antibacteriana, mas não têm ação antifúngica. A curcumina e a quitosana apresentam capacidade antimicrobiana comprovada (Li et al., 2016). Contudo, o uso clínico da curcumina é severamente limitado devido à sua baixa solubilidade aquosa e baixa biodisponibilidade, limitando muito a sua atividade antibacteriana. Estudos relatam que a curcumina tem a capacidade de inibir o crescimento bacteriano, particularmente em bactérias Gram-positivas e podem exercer efeito sinérgico contra várias bactérias quando combinado com outros agentes formando nanopartículas (Lyu et al., 2020).

Um dos mecanismos antimicrobianos sugeridos da curcumina está associado à modificação na permeabilidade da parede celular. A parede celular de bactérias Gram-negativas é mais fina, aumentando a vulnerabilidade à entrada da curcumina. Já as bactérias gram-positivas possuem parede celular espessa devido à presença de multicamadas de peptidoglicanos, que agem como uma barreira à entrada da curcumina (Ezati & Rhim, 2020). Apesar destas características das bactérias foi possível observar (Tabela 2) superior atividade antimicrobiana das NPC se comparada à tetraciclina, antibiótico eficaz e amplamente utilizado, tanto para as bactérias Gram-positivas quanto para as Gram-negativas. Estes resultados foram satisfatórios graças à liberação da curcumina das nanopartículas, visto que, as nanopartículas vazias (NP), apresentaram menor atividade antimicrobiana, se comparada às NPC.

Tabela 2. Atividade antimicrobiana expressa em concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM).

Cepas	NP		NPC		Tetraciclina		Fluconazol	
	CIM µg/mL	CBM/ CFM µg/mL	CIM µg/mL	CBM/ CFM µg/mL	CIM µg/mL	CBM/ CFM µg/mL	CIM µg/mL	CBM/ CFM µg/mL
S. typhimurium	3,12	6,25	1,56	3,12	15,62	15,62	-	-
L. monocytogenes	25,00	50,00	1,56	3,12	15,62	31,25	-	-
V. parahemolyticus	12,50	25,00	3,12	6,25	31,25	62,5	-	-
S. aureus	12,50	25,00	1,56	3,12	7,812	15,62	-	-
S. epidermidis	6,25	12,50	3,12	6,25	7,812	15,62	-	-
E. coli	3,12	6,25	0,78	1,56	31,25	62,50	-	-
C. albicans	-	-	-	-	-	-	62,50	125,00
C. krusei	-	-	-	-	-	-	125,00	250,00
C. glabrata	-	-	-	-	-	-	125,00	250,00
C. tropicalis	-	-	-	-	-	-	62,50	125,00

- : Sem atividade;
NP: Nanopartículas de lecitina-quitosana;
NPC: Nanopartículas de lecitina-quitosana contendo curcumina (70 µg/mL).

Estudos de Citotoxicidade in vitro

A citotoxidade das nanopartículas elaboradas foi investigada, visando futuras aplicações em produtos alimentícios e como nutracêuticos. Os resultados (Figura 5) mostram que NPC não apresentaram toxicidade em células normais (PBMC e L-929), diferentemente ($p<0,05$) da curcumina livre que apresentou atividade citotóxica para ambas as células normais testadas, indicando que a formulação internalizou eficazmente a curcumina dentro das nanopartículas. Jardim et al. (2020) relatam que a curcumina livre tem efeito direto em contato com a célula, facilitando sua difusão na membrana, enquanto as nanopartículas contendo curcumina penetram na célula por endocitose, e então a substância é liberada gradualmente para o meio, levando a uma redução do efeito citotóxico. Facchi et al. (2016) observaram maior toxicidade em nanopartículas de TMC/TPP com 98,8 nm e potencial zeta positivo, relatando que o tamanho médio das nanopartículas bem como a superfície com carga catiônica aumenta o risco de toxicidade. Ao adicionarem curcumina na partícula o

tamanho aumentou para 316,4 nm e, mesmo com carga positiva, teve sua citotoxicidade reduzida, como neste trabalho.

A curcumina apresenta citotoxicidade para várias células cancerígenas, induzindo a apoptose e reduzindo a invasão celular dentro da área do tumor (Chen et al., 2019). No presente trabalho (Figura 5) a curcumina livre inibiu todas as células tumorais testadas, significativamente ($p<0,05$), exceto para câncer de pulmão (NCI-H292) que foi semelhante à NPC. Porém, observa-se também que a curcumina livre apresentou também alta toxicidade para células normais (PBMC e L-929). Enquanto que as NPC apresentaram inibição de células tumorais de câncer colorretal humano (HCT-116) e de pulmão (NCI-H292), com a vantagem de não apresentar toxicidade às células normais, diferentemente do que foi visto para a curcumina livre.

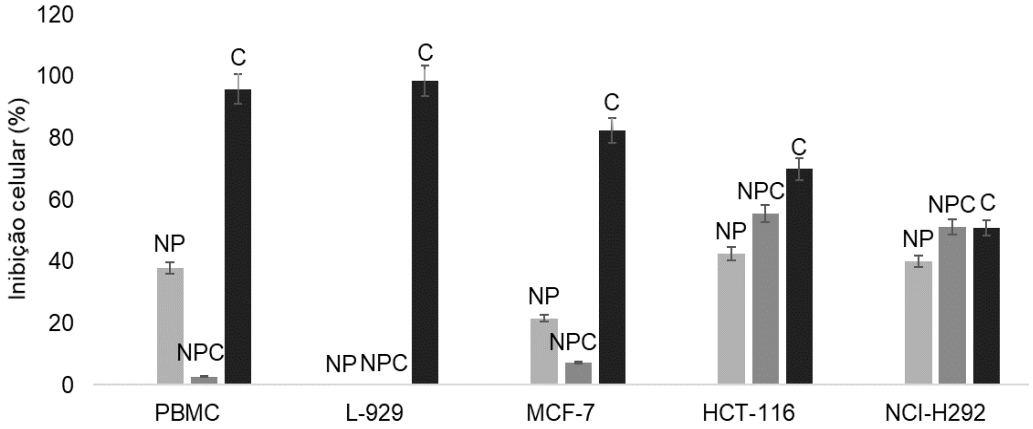


Figura 5. Percentual de Inibição Celular (%) em células normais, PBMC (células mononucleadas de sangue periférico humano) e L-929 (fibroblasto murinho) e células tumorais, MCF-7 (câncer de mama humano), HCT-116 (câncer de colorretal humano) e NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano). Nanopartículas de lecitina-quitosana vazias (NP), nanopartículas contendo curcumina (NPC) e curcumina pura (C).

Avaliação da estabilidade das NPC

Em períodos prolongados de armazenamento as nanopartículas com os materiais utilizados tendem a aglomerar, sendo um desafio produzir sistemas estáveis por longo tempo (Jardim et al., 2020). Observa-se na Figura 6 que houve aumento ($p<0,05$) no tamanho das NPC armazenadas sob ambas as temperaturas

(4 °C e 30 °C), com médias de tamanhos mais elevadas a 30 °C. Comportamento semelhante foi relatado por Chuacharoen e Sabliov (2019) após 15 dias de armazenamento de nanopartículas de lecitina e zeína contendo curcumina. Durante todo o armazenamento, a NPC armazenada à 4°C apresentou menores tamanhos ($p<0,05$) se comparada à 30 °C.

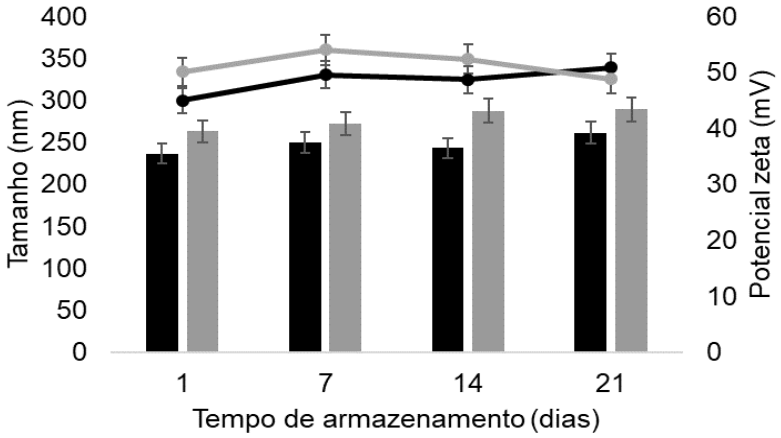


Figura 6. Estabilidade quanto ao tamanho médio (nm) e potencial zeta (mV) das nanopartículas de lecitina-quitosana contendo curcumina (70 µg/ml), a 4 °C e 30 °C, durante 21 dias de armazenamento. Tamanho a 4 °C (coluna preta), tamanho a 30 °C (coluna cinza), potencial zeta a 4 °C (linha preta) e potencial zeta a 30 °C (linha cinza).

O potencial zeta (Figura 6) permaneceu positivo, alto e estável ($p>0,05$) para ambas as temperaturas durante os 21 dias, reduzindo a agregação, corroborando Jardim et al. (2020). O PDI apresentou-se baixo (<0,16) e constante ($p>0,05$) durante todo o armazenamento das NPC sob refrigeração 4 °C. Para as nanopartículas armazenadas a 30 ºC o PDI manteve-se baixo (<0,27) e constante ($p>0,05$) até o 14º dia de armazenamento, no entanto no 21º dia observou-se um aumento significativo do PDI (0,512 ± 0,05) indicando o início da instabilidade do sistema.

Foi possível observar ainda que, não houve diferença ($p>0,05$) entre a atividade antioxidante das NPC armazenadas a 4 °C e a 30 °C. A estabilidade antioxidante manteve-se durante todo o armazenamento, podendo-se observar no

21° dia valores de 18,37 ± 7,76% e 17,55 ± 3,05%, para 4 °C e 30 °C, respectivamente. O efeito barreira promovido pelo revestimento de quitosana provavelmente inibiu os ataques de radicais contra a curcumina dentro da nanopartícula, aumentando sua estabilidade. O revestimento de quitosana também confere natureza catiônica que pode repelir radicais reativos como prótons e íons metálicos, protegendo a curcumina da oxidação (Li et al., 2016).

Conclusão

A curcumina foi devidamente encapsulada em nanopartículas de lecitina-quitosana com alta eficiência de encapsulação, apresentando-se esféricas e com estabilidade coloidal confirmada pelo alto módulo do potencial zeta atrabuido ao revestimento de quitosana na superfície. As nanopartículas preservaram a elevada capacidade antioxidante da curcumina assim como apresentaram atividade antimicrobiana significativa para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sem apresentar toxicidade para células normais, apenas sendo citotóxicas para células cancerígenas (HCT-116 e NCI-H292). Finalmente, as análises físico-químicas demonstraram que as nanopartículas contendo curcumina são estáveis, preservando a atividade antioxidante durante armazenamento por 21 dias (4 °C e 30 °C). Portanto, as nanopartículas de lecitina-quitosana contendo curcumina são bastante promissoras, uma vez que melhoram a solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade da curcumina, o que amplia as possibilidades de aplicação desse flavonoide pela indústria farmacêutica como nutracêutico e na indústria de alimentos na aplicação em diferentes matrizes alimentícias.

Agradecimento

Os autores gostariam de agradecer a FIOCRUZ - Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), ao Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica - LNFarm (UFPE), ao Laboratório de Polímeros Não Convencionais – LPNC (Departamento de Física/UFPE) e ao Laboratório de Polímeros e Nanoestruturas (Departamento de Energia nuclear/UFPE) pelo uso de suas instalações. Assim como agradecer à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Maria das Graças Carneiro-da-Cunha expressa sua gratidão ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de pesquisa.

Referências

M. Abdel-Daim, A. I. Abushouk, R. Reggi, N. S. Yarla, M. Palmery, I. Peluso, Association of antioxidant nutraceuticals and acetaminophen (paracetamol): Friend or foe? Journal of Food and Drug Analysis, 26 (2018) 578-587.

M. Alkholief, Optimization of Lecithin-Chitosan nanoparticles for simultaneous encapsulation of doxorubicin and piperine. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 52 (2019) 204-214.

C. Chang, T. G. Meikle, Y. Su, X. Wang, C. Dekiwadia, C. J. Drummond, C. E. Conn, Y. Yang, Encapsulation in egg white protein nanoparticles protects anti-oxidant activity of curcumin. Food Chemistry, 280, (2019) 65–72.

S. Chen, Q. Li, D. J. McClements, Y. Han, L. Dai, L. Mao, Y. Gao, Co-delivery of curcumin and piperine in zein-carrageenan core-shell nanoparticles: Formation, structure, stability and in vitro gastrointestinal digestion. Food Hydrocolloids, 99 (2019).

T. Chuacharoen, C. M. Sabliov, Comparative effects of curcumin when delivered in a nanoemulsion or nanoparticle form for food applications: Study on stability and lipid oxidation inhibition. LWT - Food Science and Technology, 113 (2019).

Y. S. Chhonker, Y. D. Prasad, H. Chandasana, A. Vishvkarma, K. Mitra, P. K. Shukla, R. S. Bhatta, Amphotericin-B entrapped lecithin/chitosan nanoparticles for prolonged ocular application. International Journal of Biological Macromolecules, 72 (2015) 1451-1458.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28 th. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute, (2018).

F. Cuomo, M. Cofelice, F. Venditti, A. Ceglie, M. Miguel, B. Lindman, F. Lopez, In-vitro digestion of curcumin loaded chitosan-coated liposomes. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 168 (2018) 29–34.

P. Ezati, J. W. Rhim, pH-responsive pectin-based multifunctional films incorporated with curcumin and sulfur nanoparticles. Carbohydrate Polymers, 230 (2019).

S. P. Facchi, D. B. Scariot, P. V. A. Bueno, P. R. Souza, L. C. Figueiredo, H. D. M. Follmann, C. S. Nunes, J. P. Monteiro, E. G. Bonafé, C. V. Nakamura, E. C. Muniz, A. F. Martins, Preparation and cytotoxicity of N-modified chitosan nanoparticles applied in curcumin delivery. International Journal of Biological Macromolecules, 87 (2016) 237–245.

L. A. Frank, G. R. Onzi, A. S. Morawski, A. R. Pohlmann, S. S. Guterres, R. V. Contri, Chitosan as a coating material for nanoparticles intended for biomedical applications. Reactive and Functional Polymers, 147 (2020).

K. V. Jardim, J. L. N. Siqueira, S. N. Báo, M. H. Sousa, A. L. Parize, The role of the lecithin addition in the properties and cytotoxic activity of chitosan and chondroitin sulfate nanoparticles containing curcumin. Carbohydrate Polymers, 227 (2020).

M. Kharat, D. J. McClements, Recent Advances in Colloidal Delivery Systems for Nutraceuticals: A Case Study - Delivery by Design of Curcumin. Journal of Colloid and Interface Science, 557 (2019) 506-518.

J. Li, I. C. Hwang, X. Chen, H. J. Park, Effects of chitosan coating on curcumin loaded nano-emulsion: Study on stability and in vitro digestibility. Food Hydrocolloids, 60 (2016) 138–147.

Y. Lyu, M. Yu, Q. Liu, Q. Zhang, Z. Liu, Y. Tian, D. Li, C. Mu, Synthesis of silver nanoparticles using oxidized amylose and combination with curcumin for enhanced antibacterial activity. Carbohydrate Polymers, 230 (2020).

Z. Ma, N. Wang, H. He, X. Tang, Pharmaceutical strategies of improving oral systemic bioavailability of curcumin for clinical application. Journal of Controlled Release, 316 (2019) 359-380.

K. Mahmood, K. M. Zia, M. Zuber, S. Tabasum, S. Rehman, F. Zia, A. Noreen, Morphological and thermal studies of chitin-curcumin blends derived polyurethanes. International Journal of Biological Macromolecules, 105 (2017) 1180–1191.

P. Nijhawan, T. Behl, Nutraceuticals in the management of obesity. Obesity Medicine, 17 (2020).

H. R. Park, S. Rho, Y. Kim, Solubility, stability, and bioaccessibility improvement of curcumin encapsulated using 4-α-glucanotransferase-modified rice starch with reversible pH-induced aggregation property. Food Hydrocolloids, 95 (2019)19-32.

V. S. A. Pavan Rudhrabatla, R. Jalababu, K. S. V. Krishna Rao, K. V. N. Suresh Reddy, Fabrication and characterization of curcumin loaded pH dependent sodium alginate-g-poly(acryloyl phenylalanine)-cl-ethylene glycol vinyl ether-co- hydroxyethyl acrylate hydrogels and their in-vitro, in-vivo and toxicological evaluation studies. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 51 (2019) 438-453.

M. C. Silva, I. Nascimento, V. S. Ribeiro, M. V. L. Fook, Evaluation of the obtaining method of chitosan/curcumin scaffolds on the structure, morphology and thermal properties. Revista Matéria, 21 (2016) 560-568.

F. Sousa, G. M. Guebitz, V. Kokol, Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan enzymatically functionalized with flavonoids. Process Biochemistry, 44 (2009) 749-756.

M. P. Souza, A. F. M. Vaz, M. T. S. Correia, M. A. Cerqueira, A. A. Vicente, M. G. Carneiro-da-Cunha, Quercetin-Loaded Lecithin/Chitosan Nanoparticles for Functional Food Applications. Food and Bioprocess Technology, 7 (2014) 1149-1159.

K. Tai, M. Rappolt, L. Mao, Y. Gao, Y. Li, F. Yuan, The stabilization and release performances of curcumin-loaded liposomes coated by high and low molecular weight chitosan. Food Hydrocolloids, 99 (2020).

C. Tripathi, A. Girme, S. Champaneri, R. Patel, L. Hingorani, Nutraceutical Regulations: An Opportunities in ASEAN Countries. Nutrition, (2020).

F. H. Xavier-Jr, C. Gueutin, H. Chacun, C. Vauthier, E. S. T. Egito, Mucoadhesive paclitaxel-loaded chitosan-poly (isobutyl cyanoacrylate) core-shell nanocapsules containing copaiba oil designed for oral drug delivery. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 53 (2019).

F. H. Xavier-Junior, E. S. T. Egito, A. R. V. Morais, E. N. Alencar, A. Maciuk, C. Vauthier, Experimental design approach applied to the development of chitosan coated poly(isobutylcyanoacrylate) nanocapsules encapsulating copaiba oil. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 536 (2018) 251-258.

M. Zahiri, M. KhanmohammadI, A. Goodarzi, S. Ababzadeh, M. S. Farahani, S. Mohandesnezhad, N. Bahrami, I. Nabipour, J. AI, Encapsulation of curcumin loaded chitosan nanoparticle within poly (ε-caprolactone) and gelatin fiber mat for wound healing and layered dermal reconstitution. International Journal of Biological Macromolecules, (2019).

J. Zhang, X. Zou, X. ZhaI, X. W. Huang, C. Jiang, M. Holmes, Preparation of an intelligent pH film based on biodegradable polymers and roselle anthocyanins for monitoring pork freshness. Food Chemistry, 272 (2019) 306-312.

4.3 ARTIGO 3 – EFEITO DA ADIÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE LECITINA-QUITOSANA CONTENDO QUERCETINA EM PASTA DA AMÊNDOA DE CASTANHA DE CAJU (*ANACARDIUM OCCIDENTALE* L.)

Artigo a ser traduzido e submetido à revista *LWT - Food Science and Technology*.
Fator de impacto 3,714, Qualis A1.

Resumo

A quercetina é um bioativo com alta atividade antioxidante e sua incorporação em matrizes alimentícias é bastante promissora. O desenvolvimento de técnicas de encapsulação baseadas na nanotecnologia, pode tornar viável a sua aplicação em matrizes alimentícias inovadoras. Portanto, objetivo deste trabalho foi desenvolver e avaliar a estabilidade físico-química e microbiológica de pasta de amêndoa de castanha de caju adicionada de nanopartículas de lecitina-quitosana contendo quercetina. Inicialmente foi realizado o escalonamento das nanopartículas de forma a aumentar a quantidade do polifenol presente na formulação. Posteriormente foram produzidas duas pastas de castanha: uma adicionada com as nanopartículas contendo quercetina, denominada PQ, e outra controle, denominada PC. As pastas produzidas foram armazenadas por 30 dias (30 °C) para análise da avaliação da estabilidade físico-química, com as análises de pH, acidez, atividade de água, cor e índice de peróxidos, assim como foi analisada a estabilidade microbiológica ao longo do tempo de prateleira. Também foram realizadas análises para determinação da composição química na PC. Observou-se que as nanopartículas com melhores características foram as adicionadas com 5x mais lecitina e quitosana e 4x maior teor de quercetina, com tamanho médio de 388,02 nm, PDI de 0,40 e potencial zeta de +65,8 mV. A pasta controle apresentou composição química com teores de 0,71% de umidade, 2,55% de cinzas, 47,80% de lipídeos, 21,09% de proteínas, 21,60% de carboidratos, 6,29% de fibra total e 600,96 Kcal/100g de produto. Com relação aos valores de pH e acidez, observou-se que a adição das nanopartículas contendo quercetina melhoraram as características da PQ. Os teores de atividade de água mantiveram-se menores que 0,60, não houve alterações nas características colorimétricas de ambas as pastas assim como não foi detectada a formação de peróxido ao longo do armazenamento. Ambas as pastas se mantiveram estáveis

microbiologicamente durante toda a estocagem. A adição de nanopartículas com quercetina em pasta de castanha promoveu melhora na estabilidade físico-química, favorecendo sua aplicação.

Palavras-chave: nanotecnologia, polifenóis, flavonoides, oleaginosas, vida de prateleira, produto alimentício.

Introdução

É notória a crescente procura por alimentos que contenham compostos que promovam benefícios à saúde, sendo a quercetina um destes compostos bioativos, pertence à classe dos flavonoides, com uma extensa e comprovada lista de propriedades benéficas atribuídas ao seu consumo, como ações anti-inflamatória, antiagregante plaquetária, anti-aterogênica, anti-mutagênica, anti-angiogênica, dilatadora de vasos sanguíneos, anti-hiperglicêmica além da capacidade bem estabelecida de eliminar os radicais livres (Fuentes et al., 2020).

Estas propriedades fazem da quercetina um importante componente para a dieta humana, que pode ser alcançado se adicionado em maiores quantidades na produção de alimentos funcionais na indústria de alimentos. No entanto, limitações para uma maior incorporação da quercetina em alimentos estão atreladas, principalmente, à suas propriedades físico-químicas, como sua baixa solubilidade, instabilidade gastrintestinal, baixa absorção, metabolismo extensivo e/ou eliminação rápida, limitando seus efeitos biológicos *in vivo*, sendo um desafio seu uso (Li et al., 2016).

Portanto, o uso de técnicas para um maior aproveitamento deste rico composto é imprescindível, daí a aplicação da nanotecnologia (Yan et al., 2018). Isto pode ser possível devido à capacidade única destes componentes em escala nano de aumentar a solubilidade, biodisponibilidade e proteção dos compostos bioativos durante o processamento e armazenamento dos alimentos, bem como impedir sua degradação no ambiente gastrintestinal, protegendo estes compostos de agressões químicas e enzimáticas no lúmen intestinal, (Bajpai et al., 2018).

Dentre os diversos alimentos, o consumo de produtos à base de oleaginosas é vital na nutrição de diferentes civilizações e sociedades por eras, por ser uma

excelente fonte de energia, nutrientes e sabor único mas é inicial o entendimento de como os componentes das oleaginosas influenciam a saúde. Os benefícios estão associados aos níveis apreciáveis de compostos bioativos como fitoesteróis, carotenóides, tocoferóis e compostos fenólicos (Mattison et al., 2018; Yilmaz et al., 2019).

A amêndoa da castanha de caju é a parte comestível, que teve sua casca e película retirada, sem adição de ingredientes, obtida a partir do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) que pertence à família Anacardiaceae e é uma árvore perene nativa do Nordeste do Brasil que se expandiu em países na América do Sul (Colômbia, Costa Rica, Honduras e El Salvador), sendo também cultivada em países africanos (Costa do Marfim, Nigéria, Tanzânia, Moçambique, Gana, Senegal e Madagascar), asiáticos (Índia, Vietnã, Indonésia, Filipinas, Malásia, Tailândia e Sri Lanka) e em outros países do mundo. A sua noz, a castanha do caju, é botanicamente definida como seu real fruto. (Tufail et al., 2019; Zhao et al., 2019).

A produção anual de castanha de caju (com casca) é a mais alta de todas as nozes, com um valor de mais de 3,5 milhões de toneladas, com tendência de aumento contínuo. Geralmente é consumida *in natura*, por suas propriedades sensoriais agradáveis, pode ser incorporada em outros produtos, como exemplo chocolate ao leite, iogurte, produtos de confeitaria e panificação, além de seu consumo como extrato hidrossolúvel (bebida) e na forma de pastas. No mercado internacional já é bem conhecida a pasta de amendoim (*peanut butter*), que é consumida pura, no pão, como ingrediente em bolos, biscoitos, tortas, etc. A pasta de amêndoa de castanha de caju é empregada de forma similar (Lima et al., 2012; Kluczkovski & Martins, 2016; Mgaya et al., 2019).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da adição de nanopartículas de lecitina-quitosana contendo quercetina em pasta de amêndoa de castanha de caju.

Material e métodos

Materiais

Etanol (Merck KGaA, Alemanha), quitosana (grau de desacetilação 75%) e quercetina (Sigma-Aldrich, EUA), lecitina de soja (Lipoid S 45, 40%

fosfatidilcolina/60% fosfatidiletanolamina, Lipoid, Ludwigshafen, Germany), castanha de caju (CEASA, PE, Brasil), ácido láctico (85%), triclorometano, ácido acético, iodeto de potássio, tiossulfato de sódio, amido solúvel, NaOH e éter etílico (Dinâmica, SP, Brasil) e água deionizada (Millipore Q purification system, Millipore Corp., Bedford, MA).

Elaboração das nanopartículas de lecitina-quitosana contendo quercetina

As nanopartículas de lecitina-quitosana contendo quercetina foram preparadas a partir de uma solução padrão de 0,2% de quitosana (p/v) em ácido láctico a 1% (v/v) sob agitação magnética (1000 rpm, Fisatom, modelo 752) por 16 h à temperatura ambiente. Desta solução, 1,25 mL foi diluído com água deionizada até volume final de 23 mL.

As nanopartículas (NP) foram obtidas por gotejamento (1 mL/min com uma seringa de 0,38 mm) de 2 ml de solução etanólica de lecitina a 25 mg/mL, contendo quercetina (100 µg/mL) em 23 mL da solução aquosa de quitosana, sob agitação magnética contínua (1000 rpm) com posterior sonicação (sonicador com sonda, Q125 Sonicator, QSonica, LLC, Newtown, Connecticut, USA). Durante o processo de sonicação foi utilizada a frequência de 80 Hz, durante 7 min, a uma potência de 125 W, sob banho de gelo, e por fim rotaevaporada (35 °C) até volume final de aproximadamente 5 mL.

Escalonamento e caracterização das nanopartículas

Foi realizado o estudo do escalonamento de produção das nanopartículas objetivando viabilizar a aplicação na pasta de amêndoa de castanha de caju. Para este escalonamento, inicialmente, foram preparadas apenas nanopartículas sem quercetina (NP) aumentando-se proporcionalmente a quantidade de quitosana e lecitina em 3, 5 e 10 vezes (Tabela 1). A otimização foi realizada através da avaliação de tamanho médio, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta das nanopartículas. Após escalonamento e escolha das NP com melhores condições, efetuou-se o escalonamento da concentração de quercetina adicionada, obtendo-se amostras com 2x, 3x, 4x e 5x mais quercetina que as partículas originais (1x) de 100 µg de quercetina/ml. As nanopartículas com melhores características de tamanho

médio, PDI e potencial zeta, chamadas de NQ, foram adicionadas à pasta de amêndoa de castanha de caju.

O tamanho médio e o PDI das nanopartículas foram medidos por espalhamento de luz dinâmico (DLS) (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, UK). Para isto, cerca de 1 mL de amostra foi transferida para uma cubeta de poliestireno e a medida foi realizada a 25 °C, com ângulo de detecção de 90° e comprimento de onda de 633 nm. As amostras foram submetidas à leitura seguindo a diluição de 1:10 com água deionizada para evitar a dispersão múltipla. O potencial zeta foi determinado por laser Doppler microeletroforese em Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) utilizando a Equação de Smoluchowsky à 25 °C. Todas as medições foram realizadas em triplicata com três leituras verdadeiras para cada uma das amostras. Os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão de nove valores obtidos.

Tabela 1. Proporção dos componentes utilizados para escalonamento das nanopartículas de lecitina-quitosana (NP).

Fator de concentração	Quitosana (mg)	Lecitina (mg)
1x	2,5	50
3x	7,5	150
5x	12,5	250
10x	25	500

Elaboração da pasta de amêndoa de castanha de caju

Duas pastas de amêndoas de castanha de caju foram elaboradas: uma pasta sem adição de nanopartículas, chamada de pasta controle (PC) e uma pasta adicionada de nanopartículas carregadas com quercetina (PQ), elaboradas previamente. A moagem das castanhas para obtenção da pasta foi realizada em processador doméstico, com lâminas metálicas do tipo faca, por 10 min. Para a PQ, após a elaboração da pasta, foram adicionadas as NQ de forma a ter 6 mg de quercetina/100g de pasta (Carli et al., 2018). Posteriormente, as pastas (PC e PQ) foram armazenadas em potes plásticos (polipropileno, volume 150 mL, dimensões Ø7,5cm x 5,0, Prafesta®, Mairiporã, SP), sob temperatura ambiente (30 °C), e protegidas da luz, durante 30 dias para análises.

Composição química

A composição química da pasta controle (PC) foi determinada em triplicata, de acordo com a Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2005). A umidade foi determinada por secagem em estufa a 105°C (método 935.29), o resíduo mineral fixo foi determinado por incineração em mufla a 550°C (método 930.22-32.3.08), o teor de proteínas foi calculado pela determinação de nitrogênio através do método de Kjeldahl, multiplicando-se por 5,75 para conversão em proteínas (método 991.20-33.2.11), a determinação do teor de gordura foi realizada pelo método de Soxhlet (método 963.15-31.4.02), fibra alimentar total determinada pelo método enzimático gravimétrico (método 991.43) e o teor de carboidratos total foi calculado por diferença. O valor energético foi calculado pelo conteúdo de lipídios, proteínas e carboidratos multiplicados pelos fatores de Atwater, 9 $kcal.g^{-1}$, 4 $kcal.g^{-1}$ e 4 $kcal.g^{-1}$, respectivamente.

Estabilidade microbiológica e físico-química ao longo do tempo

As pastas elaboradas (PC e PQ) foram submetidas às análises microbiológicas e físico-químicas após 1, 10, 20 e 30 dias de armazenamento.

Análises microbiológicas

As pastas foram submetidas a testes de qualidade sanitária, segundo a AOAC (2005), por análise de coliformes termotolerantes/g (45ºC) (método 991.14), coliformes totais/g (35ºC) (método 991.14), *Salmonella* sp/25g (método 967.26), *Escherichia coli* (método 991.14) e contagem de bolores e leveduras (método 997.02).

Determinação da oxidação lipídica (Índice de Peróxido)

O índice de peróxido foi determinado segundo Pateiro et al. (2014), com modificações. Inicialmente 5 ± 0,05 g de amostra foi dissolvida em 30 mL de uma solução ácido acético-triclorometano (3:2). Então, 0,5 mL de solução aquosa saturada de iodeto de potássio (KI) foi adicionada. As amostras foram agitadas suavemente durante 1 min e mantidas por 5 min ao abrigo da luz. Uma vez terminada a incubação, adicionou-se 30 mL de água destilada e as amostras foram

vigorosamente agitadas. Finalmente, o iodo liberado foi titulado com solução de tiossulfato de sódio 0,01 N, utilizando uma solução indicadora de amido 1%.

Determinação da atividade de água (Aw)

A atividade da água (Aw) foi medida por leitura direta das amostras, utilizando um analisador de atividade de água (Labtouch-aw, Novasina, Suíça) a 25 ± 3 °C.

Determinação do pH e acidez

O valor do pH foi determinado com potenciômetro (Micronal, B474), por meio de leitura direta no produto. A acidez foi determinada por titulação da amostra (2 g) diluída em 25 mL de solução de éter-etanol (2:1) com solução de NaOH 0,1 N, utilizando como indicador a fenolftaleína.

Determinação da cor

A cor instrumental foi determinada utilizando colorímetro (Minolta, CR-400, Osaka, Japão) a partir dos parâmetros CIE L*, a* e b*; em que L* é a luminosidade, a* define a transição da cor verde (-a) para a cor vermelha (+a), e b* representa a transição da cor azul (-b) para cor amarela (+b). As leituras foram registradas em cinco repetições para cada formulação em posições aleatórias.

Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como a média ± DP. As médias de dois grupos foram comparadas usando testes t de Student não pareados. Na comparação de vários grupos, a análise de variância unidirecional (ANOVA) foi aplicada com o procedimento de comparação múltipla Tukey (SigmaStat, versão de teste, EUA). Os dados estatísticos foram considerados significativos com $p < 0,05$.

Resultados e discussão

Escalonamento das nanopartículas

Não houve diferença ($p > 0,05$) de tamanho entre as NP padrão (1x) se comparada às NP com aumento de 3 e 5 vezes de quitosana e lecitina, com

respectivas médias de tamanho de 235,3 ± 12,47 nm, 226,1 ± 3,29 nm e 256,3 ± 1,25 nm (Figura 1A). Apenas a partícula elaborada com aumento de 10 vezes teve seu tamanho (429,2 ± 20,07 nm) diferenciado significativamente ($p<0,05$) das demais. Além disso, pôde-se observar visualmente logo após seu preparo que, ao aumentar em 10 vezes a concentração de quitosana e lecitina, a solução se apresentou turva e com formação de precipitado. Com relação às médias de PDI (Figura 1B) não houve diferença ($p>0,05$) entre as NPs com 1x, 3x e 5x. O potencial zeta da NP padrão (1x) diferenciou significativamente de todas as outras NPs (Figura 1B).

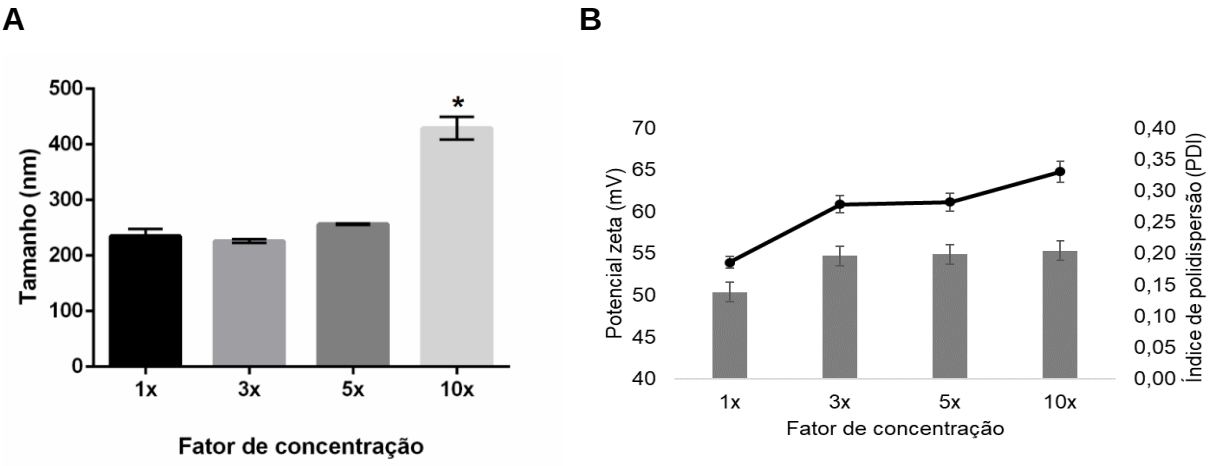


Figura 1. Média dos tamanhos (nm) (A), PDI (B) e potencial zeta (B) das nanopartículas sem quercetina (NP) com diferentes fatores de concentrações (1x, 3x, 5x e 10x maior) de quitosana e lecitina. B: PDI, linha preta e potencial zeta, coluna cinza.

Sullivan et al. (2018), cujas nanopartículas tiveram a concentração de quitosana aumentada em 5x (0,1% para 0,5%), observaram aumento significativo de tamanho médio de 90,5 nm para 1687,167 nm, respectivamente. Isto ocorre, pois, maiores concentrações de quitosana induzem à formação de uma camada de revestimento mais espessa, resultando em maiores tamanhos das nanopartículas (Tai et al., 2020).

O aumento da concentração de quitosana, sugere que haja um intumescimento, pela natureza higroscópica das nanopartículas de quitosana, significando uma boa capacidade de absorção da partícula, o que pode melhorar a capacidade de incorporar e carrear uma maior quantidade de compostos bioativos (Sullivan et al., 2018). Desta forma, foram escolhidas as NPs 5x, por serem as partículas com maiores concentrações de quitosana e lecitina e com menores alterações de tamanho (256,3 ± 1,3 nm), PDI (0,28 ± 0,01) e potencial zeta (+54,9 ± 1,2 mV), se comparada às NPs padrão (1x), para testes seguintes com adição de quercetina.

Observa-se na Figura 2 que as nanopartículas com 4x e 5x mais quercetina diferiram significativamente ($p<0,05$) com relação ao tamanho sem apresentar diferenças ($p>0,05$) de PDI e potencial zeta. Por apresentar menores alterações, foram escolhidas as NQs, com aumento de 5 vezes a concentração de quitosana (12,5 mg) e lecitina (250 mg) e aumento de 4x a concentração de quercetina (400 µg/mL) para aplicação em novos produtos alimentícios, pois, permitirá a adição de um menor volume de solução, com menores alterações das propriedades físico-químicas e organolépticas dos produtos a serem desenvolvidos.

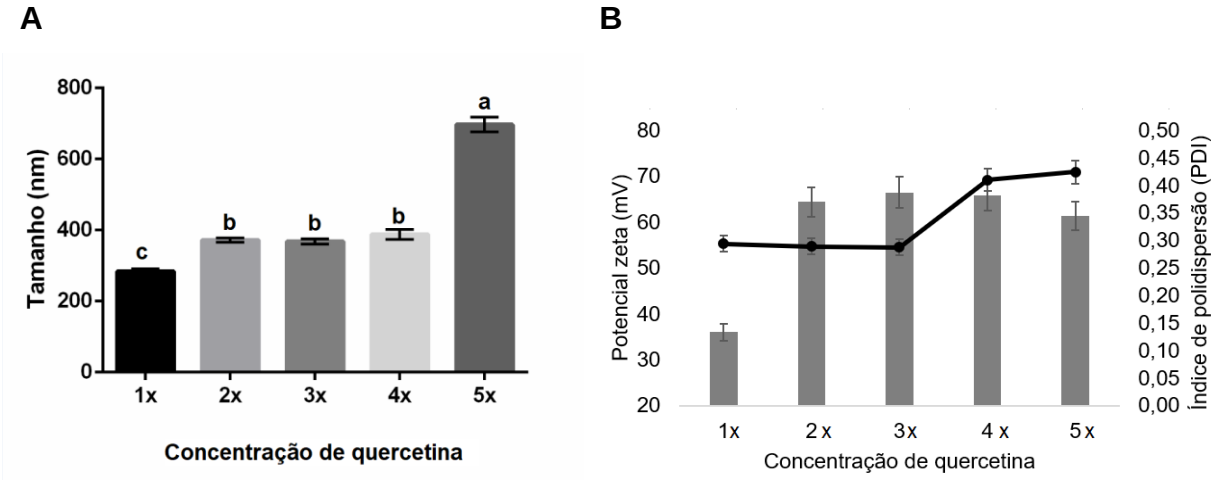


Figura 2. Tamanhos (nm) (A), PDI (B) e potencial zeta (B) das nanopartículas de lecitina-quitosana escalonadas com diferentes concentrações (1x, 2x, 3x, 4 e 5x maior) de quercetina (NQ). B: PDI, linha preta e potencial zeta, coluna cinza.

Elaboração da pasta de castanha de caju

Composição química

A composição físico-química da pasta de castanha (PC) está descrita na Tabela 2. O conteúdo de proteínas e lipídeos apresentaram valores de 21,09 ± 0,02% e 47,80 ± 0,06%, respectivamente. Estes valores são semelhantes aos de proteínas, 18,3 a 22,0% (Lima et al., 2012) e gordura, 40 a 52% (Mattison et al., 2018) encontrados na literatura para pasta de castanha. Estes resultados são importantes no ponto de vista nutricional visto que a castanha de caju contém proteína de excelente qualidade e lipídeos formados por ácidos graxos que influenciam diretamente em benefícios ao consumidor (mono e poli-insaturados). O teor de cinzas encontrado neste estudo também é coerente com os da literatura, sendo a castanha de caju um produto naturalmente rico em minerais (Kluczkovski & Martins, 2016).

Tabela 2. Composição química da pasta de amêndoa de castanha de caju (*Anacardium occidentale* L.).

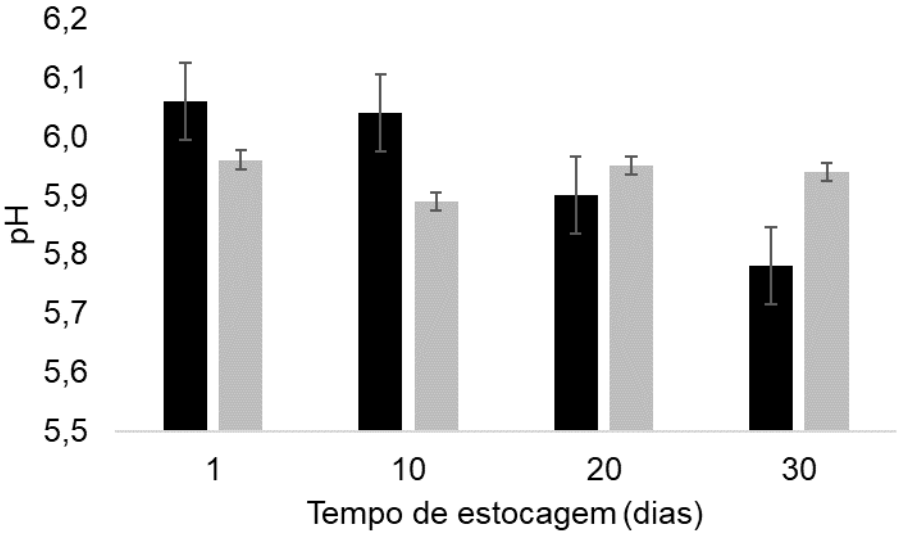
Componentes	Valores
Umidade (%)	0,71 ± 0,02
Cinzas (%)	2,55 ± 0,05
Lipídeos (%)	47,80 ± 0,06
Proteínas (%)	21,09 ± 0,02
Carboidratos (%)*	21,60 ± 0,32
Fibra alimentar total (%)	6,29 ± 0,51
Energia (Kcal/100g)	600,96 ± 0,38

Os dados representam a média das determinações em triplicata ± desvio padrão.
* Calculado pela diferença.

Estabilidade físico-química

Os valores de pH e acidez das amostras PC e PQ, durante o armazenamento (30 dias, 30 °C), estão representados na Figura 3. Pode-se observar que ocorreram alterações ($p<0,05$) de pH e acidez para a pasta PC em dias diferentes, podendo ser indicativo que a pasta de castanha controle sofreu reações de degradação, como ranço hidrolítico. A adição das nanopartículas contendo quercetina preservaram as características da PQ, mantendo suas propriedades durante o armazenamento.

A



B

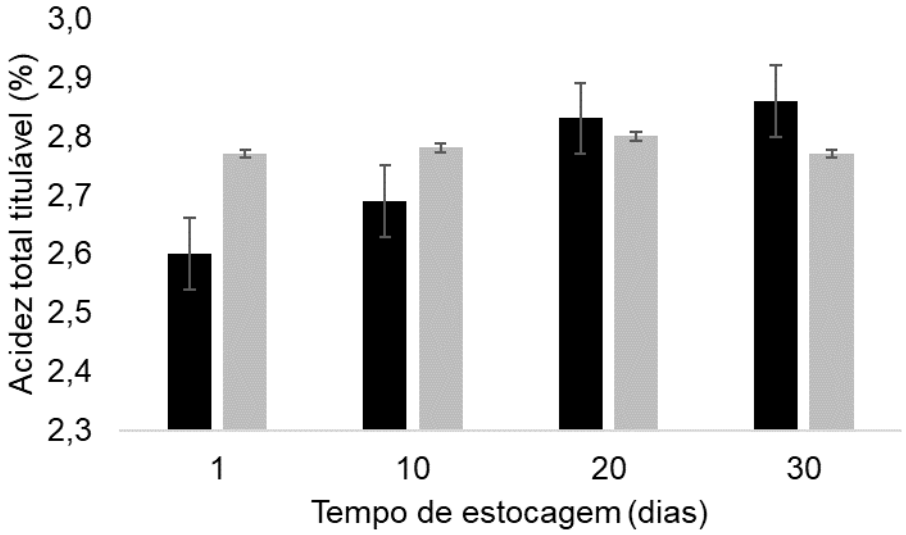


Figura 3. Índice de pH (A) acidez (B) da pasta controle (PC, coluna preta) e pasta adicionada de nanopartícula contendo quercetina (PQ, coluna cinza) durante o armazenamento (30 dias).

Pouca foi a variação da atividade de água das pastas durante o armazenamento, não havendo diferença significativa na PC, diferente de PQ, que sofreu um decréscimo do teor de Aw ao longo do tempo. PQ manteve maiores

(p<0,05) teores de Aw se comparada à PC, em todos os dias analisados, provavelmente por ter sido realizada a adição das NQs, que são dispersas em água. Ambas as pastas mantiveram teores de atividade de água <0,60, praticamente não permitindo crescimento microbiano (Lima et al., 2012).

Os parâmetros colorimétricos de PC e PQ estão descritos na Tabela 3. Em relação aos parâmetros de cromaticidade (a* e b*) é possível afirmar que ambas as amostras apresentaram regiões do vermelho e do amarelo, pelos valores positivos para estas coordenadas. Abd-Elsattar e Abdel-Haleem (2016) relatam que durante o processo de torrefação das castanhas ocorrem reações de caramelização e escurecimento resultando na formação de pigmentos marrons. O parâmetro b* não sofreu alteração (p>0,05) ao longo do tempo para PC e PQ, sendo a PC mais amarelada que a PQ.

Com relação ao parâmetro de luminosidade (L*) (Tabela 3) todas as amostras foram consideradas claras, já que na escala de 0 à 100 apresentaram valores maiores que 50. A pasta controle (PC) apresentou valores superiores (p<0,05) que PQ, indicando que a amostra era mais clara.

As alterações colorimétricas causadas pela adição das nanopartículas contendo quercetina (NQ) foram mínimas, se comparadas à pasta controle (PC), favorecendo sua aplicação sem afetar as características próprias do produto alimentício.

Tabela 3. Valores obtidos do parâmetro L* e das coordenadas cromáticas a* e b* da análise de cor das amostras PC e PQ durante o armazenamento (30 dias) a 30 °C.

Tempo (dias)	PC			PQ		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*
1	$68,5\pm2,3^{aA}$	$4,2\pm0,3^{bA}$	$22,9\pm1,5^{aA}$	$64,6\pm1,8^{aB}$	$4,0\pm0,3^{aA}$	$18,0\pm2,3^{aB}$
10	$67,7\pm2,6^{aA}$	$4,6\pm0,4^{abA}$	$23,1\pm1,1^{aA}$	$61,6\pm0,9^{bB}$	$4,4\pm0,7^{aA}$	$21,2\pm2,9^{aA}$
20	$68,9\pm2,4^{aA}$	$4,6\pm0,2^{abA}$	$22,8\pm0,6^{aA}$	$64,3\pm1,6^{abB}$	$4,2\pm0,5^{aB}$	$20,7\pm3,1^{aB}$
30	$68,6\pm1,0^{aA}$	$4,7\pm0,0^{aA}$	$23,0\pm0,2^{aA}$	$60,1\pm2,3^{bcB}$	$3,8\pm0,3^{aB}$	$18,3\pm1,8^{aB}$

^{abc} letras iguais na vertical no mesmo parâmetro não diferem significativamente (p>0,05) pelo teste de Tukey.
^{ABC} letras iguais na horizontal no mesmo parâmetro não diferem significativamente (p>0,05) pelo teste t de Student.
PC: Pasta de amêndoa de castanha controle.
PQ: Pasta de amêndoa de castanha adicionada de nanopartícula de lecitina-quitosana contendo quercetina (6 mg/100g).

Durante o armazenamento (30 dias, 30 °C) não foi identificada a formação de peróxido, tanto para a pasta controle (PC) quanto para a pasta adicionada de nanopartícula contendo quercetina (PQ). Isto indica que as reações de degradação lipídicas (hidrolíticas e/ou oxidativas) ainda estavam em estágios iniciais, perceptíveis pela alteração de pH e acidez (Figura 3) porém ainda indetectáveis quanto ao teor de peróxidos, até o 30° dia de análise.

Estabilidade microbiológica

As pastas PC e PQ apresentaram estabilidade microbiológica ao longo de todo o armazenamento (30 dias) com valores <3,0 $NMP.g^{-1}$ de coliformes a 35 °C, coliformes a 45 °C e *E. coli*, ausência de Salmonella sp/25 g e <10 $UFC.g^{-1}$ bolores e leveduras. A baixa atividade de água (<0,60) de PC e PQ, durante todo o armazenamento, favoreceram essa estabilidade. O mesmo foi observado na pasta de castanha de caju desenvolvia por Lima et al. (2012).

Desta forma as pastas estariam apropriadas para consumo, segundo legislação brasileira (contagem de coliformes a 45 °C <10 $NMP.g^{-1}$ e ausência de *Salmonella* sp em 25 g) indicando a boa qualidade microbiológica das pastas. Estes dados também confirmam as boas etapas de produção, tanto das pastas, como das nanopartículas (NQ), não promovendo também, além de alterações físico-químicas, alterações microbiológicas entre elas.

Conclusão

Foi viável o desenvolvimento da pasta de amêndoa de castanha de caju adicionada de nanopartículas contendo quercetina, com vida útil até 30 dias. A pasta de castanha de caju já é um alimento rico nutricionalmente e a adição das nanopartículas contendo quercetina aumentou o potencial bioativo deste produto. Até o momento não foi encontrado na literatura adição de nanopartículas em pasta de castanha, sendo este estudo pioneiro. Estes dados abrem margem para mais estudos de nanopartículas contendo polifenóis em alimentos, de forma a não modificar suas características, melhorando suas características bioativas e as opções de consumo destes compostos para o consumidor, que visa a cada dia a ingestão de produtos selecionados e que promovam benefícios à saúde e longevidade.

Referências

Abd-Elsattar, H. H., Abdel-Haleem, A. M. H. (2016). Production of soybean butter using different technological treatments. LWT - Food Science and Technology, 69, 40-46.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. (2005). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists International. 18th ed. Washington: AOAC International.

Bajpai, V. K., Kamle, M., Shukla, S., Mahato, D. K., Chandra, P., Hwang, S. K., Kumar, P., Huh, Y. S. & Han, Y. (2018). Prospects of using nanotechnology for food preservation, safety, and security. Journal of Food and Drug Analysis, 26(4) 1201-1214.

Carli, C., Moraes-Lovison, M. & Pinho, S.C. (2018). Production, physicochemical stability of quercetin-loaded nanoemulsions and evaluation of antioxidant activity in spreadable chicken pâtés. LWT - Food Science and Technology, 98, 154-161.

Fuentes, J., Arias-Santé, M. F., Atala, E., Pastene, E., Kogan, M. J. & Speisky, H. (2020). Low nanomolar concentrations of a quercetin oxidation product, which naturally occurs in onion peel, protect cells against oxidative damage. Food Chemistry, 314.

Kluczkovski, A. M. & Martins, M. (2016). Cashew Nuts. Encyclopedia of Food and Health, 683-686.

Li, J.; Hwang, I.; Chen, X.; Park, H. J. (2016). Effects of chitosan coating on curcumin loaded nano-emulsion: Study on stability and in vitro digestibility. Food Hydrocolloids, 60, 138-147.

Lima, J. R., Garruti, D. S. & Bruno, L. M. (2012). Physicochemical, microbiological and sensory characteristics of cashew nut butter made from different kernel grades-quality. LWT – Food Science and Technology, 45, 180-185.

Mattison, C. P., Cavalcante, J. M., Gallão, M. I. & Brito, E. S. (2018). Effects of industrial cashew nut processing on anacardic acid content and allergen recognition by IgE. Food Chemistry, 240, 370-376.

Mgaya, J., Shombe, G. B., Masikane, S. C., Mlowe, S., Mubofu, E. B. & Revaprasadu, N. (2019). Cashew nut shell: a potential bio-resource for the production of bio-sourced chemicals, materials and fuels. Green Chemistry, 21(6), 1186-1201.

Pateiro, M., Lorenzo, J. M., Amado, I. R. & Franco, D. (2014). Effect of addition of green tea, chestnut and grape extract on the shelf-life of pig liver pâté. Food Chemistry, 147, 386-394.

Sullivan, D. J., Cruz-Romero, M., Collins, T., Cummins, E., Kerry, J. P. & Morris, M. A. (2018). Synthesis of monodisperse chitosan nanoparticles. Food Hydrocolloids, 83, 355-364.

Tai, K., Rappolt, M., Mao, L., Gao, Y., Li, X. & Yuan, F. (2020). The stabilization and release performances of curcumin-loaded liposomes coated by high and low molecular weight chitosan. Food Hydrocolloids, 99.

Tufail, T., Saeed, F., Ain, H. B. U., Niaz, B., Afzaal, M., Din, A. & Suleria, H. A. R. (2019). Cashew nut allergy; immune health challenge. Trends in Food Science & Technology, 86, 209-216.

Yan, L., Wang, R., Wang, H., Sheng, K., Liu, C., Qu, H., Ma, A. & Zheng, L. (2018). Formulation and characterization of chitosan hydrochloride and carboxymethyl chitosan encapsulated quercetin nanoparticles for controlled applications in foods system and simulated gastrointestinal condition. Food Hydrocolloids, 84, 450-457.

Yilmaz, C., Taş, N. G., Kocadağlı, T. & Gökmen, V. (2019). Determination of serotonin in nuts and nut containing products by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Food Chemistry, 272, 347-353.

Zhao Y., Sun, X., Marquis, C. P. & Lee, N.A. (2019). Development of a sensitive sandwich ELISA specific to 2S albumin (Ana o 3), as a stable protein marker for cashew nut residue detection in pre-packaged food products, Food Control, 96, 432-440.

5 Conclusão

Os polifenóis quercetina e curcumina têm sido associados a muitas propriedades de promoção da saúde, contudo diversos fatores limitantes representam um desafio para a entrega destes compostos bioativos. A nanoencapsulação destes polifenóis surgiu como uma solução inovadora, prometendo tornar estes compostos mais biodisponíveis nos alimentos.

Os resultados obtidos permitem concluir que foi possível o desenvolvimento das nanopartículas de lecitina-quitosana contendo quercetina ou curcumina, preservando a capacidade antioxidante da mesma forma que o polifenol puro, não encapsulado. Pôde-se observar também que as partículas apresentaram atividade antimicrobiana superior à de antibiótico amplamente utilizado (tetraciclina), sem citotoxicidade para células normais. As partículas também se apresentaram estáveis ao longo do tempo de armazenamento sob diferentes temperaturas (4 °C e 30 °C), garantindo deste forma sua aplicação em alimentos refrigerados ou não, sem alterações em suas propriedades. As análises térmicas também demonstraram que as nanopartículas podem ser aplicadas em produtos alimentícios pasteurizados ou esterilizados sem danos em sua estrutura.

A adição de nanopartículas de lecitina-quitosana contendo quercetina em pasta de amêndoa de castanha de caju foi pioneira, e proporcionou o aumento do potencial bioativo, garantindo melhora das suas características físico-químicas.

Foi possível desta forma preservar o potencial biológico dos polifenóis em sistemas estáveis e seguros para aplicação em alimentos inovadores e melhorando suas propriedades. Estas são informações importantes para ampliar o conhecimento da nanotecnologia em alimentos de forma a fornecer subsídio para produção de diversas outras nanopartículas de lecitina-quitosana, encapsulando outros compostos, podendo ser exploradas pela indústria de alimentos, por potencializar as propriedades bioativas dos alimentos, assim como ampliar sua conservação e segurança.

Referências

ABDOU, E. S.; GALHOUM, G. F.; MOHAMED, E. N. Curcumin loaded nanoemulsions/pectin coatings for refrigerated chicken fillets. **Food Hydrocolloids,** v. 83, p. 445-453, 2018.

AGHAPOUR, F.; MOGHADAMNIA, A. A.; NICOLINI, A.; KANI, S. N. M.; BARARI, L.; MORAKABATI, P.; REZAZADEH, L.; KAZEMI, S. Quercetin conjugated with silica nanoparticles inhibits tumor growth in MCF-7 breast cancer cell lines. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 500, n. 4, p. 860-865, 2018.

AGUIRRE, A.; BORNEO, R. Improving Bioavailability of Polyphenols Using Nanodelivery Systems Based on Food Polymers. **Polyphenols in Plants,** p. 59-65, 2019.

AKOLADE, J. O.; OLOYEDE, H.; ONYENEKWE, P. C. Encapsulation in chitosan-based polyelectrolyte complexes enhances antidiabetic activity of curcumin. **Journal of Functional Foods,** v. 35, p. 584-594, 2017.

ALKHOLIEF, M. Optimization of Lecithin-Chitosan nanoparticles for simultaneous encapsulation of doxorubicin and piperine. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 52, p. 204-214, 2019.

ASSADPOUR, E.; JAFARI, S. M. A systematic review on nanoencapsulation of food bioactive ingredients and nutraceuticals by various nanocarriers. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition,** v. 59, n. 19, p. 3129-3151, 2019.

ASSIS, L. M.; ZAVAREZE, E. R.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; SOUZA-SOARES, L. A. Características de Nanopartículas e Potenciais Aplicações em Alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.15, n.2, p.99-109, 2012.

AZEREDO, H. M. C. **Fundamentos de Estabilidade de Alimentos**. 2 ed. rev. e ampl. Brasília: Embrapa. 2012. 326 p.

BAJPAI, V. K.; KAMLE, M.; SHUKLA, S.; MAHATO, D. K.; CHANDRA, P.; HWANG, S. K.; KUMAR, P.; HUH, Y. S.; HAN, Y. Prospects of using nanotechnology for food preservation, safety, and security. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 4, p. 1201-1214, 2018.

BAKSI, R.; SINGH, D. P.; BORSE, S. P.; RANA, R.; SHARMA, V.; NIVSARKAR, M. *In vitro* and *in vivo* anticancer efficacy potential of Quercetin loaded polymeric nanoparticles. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 106, p. 1513-1526, 2018.

BARANWAL A, SRIVASTAVA A, KUMAR P, BAJPAI VK, MAURYA PK, CHANDRA P. Prospects of nanostructure materials and their composites as antimicrobial agents. **Frontiers in Microbiology,** v. 9, p. 422, 2018.

BHASKAR, S.; KUMAR, K. S.; KRISHNAN, K.; ANTONY, H. Quercetin alleviates hypercholesterolemic diet induced inflammation during progression and regression of atherosclerosis in rabbits. **Nutrition**, v. 29, n. 1, p. 219-229, 2013.

BOER, V. C.; DIHAL, A. A.; VAN DER WOUDE H.; ARTS, I. C.; WOLFFRAM, S.; ALINK, G. M.; RIETJENS, I. M.; KEIJER, J.; HOLLMAN, P. C. Tissue distribution of quercetin in rats and pigs. **The Journal of Nutrition**, v. 135, n. 7, p. 1718–1725, 2005.

CANIZALES, J. R.; RODRÍGUEZ, G. R. V.; AVILA, J. A. D.; SALDAÑA, A. M. P.; PARRILLA, E. A.; OCHOA, M. A. V.; AGUILAR, G. A. G. Encapsulation to Protect Different Bioactives to Be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients. **Bioactive Molecules in Food,** p. 2163-2182, 2019.

CARLI, C.; MORAES-LOVISON, M.; PINHO, S. C. Production, physicochemical stability of quercetin-loaded nanoemulsions and evaluation of antioxidant activity in spreadable chicken pâtés. **LWT - Food Science and Technology,** v. 98, p. 154-161, 2018.

CARRILLO-INUNGARAY, M. L.; TREJO-RAMIREZ, J. A.; REYES-MUNGUIA, A.; CARRANZA-ALVAREZ, C. Use of Nanoparticles in the Food Industry: Advances and Perspectives. **Impact of Nanoscience in the Food Industry**, p. 419-444, 2018.

CHAUHAN, P. S.; DASH, D.; SINGH, R. Intranasal curcumin inhibits pulmonary fibrosis by modulating matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in ovalbumin-induced chronic asthma. **Inflammation**, v. 40, n. 1, p. 248–258, 2017.

CHEN, H.; ZHOU, K.; ZHAO, G. Gold nanoparticles: From synthesis, properties to their potential application as colorimetric sensors in food safety screening. **Trends in Food Science & Technology,** v. 78, p. 83-94, 2018.

CHOI, G. Y.; KIM, H. B.; HWANG, E. S.; LEE, S.; KIM, M. J.; CHOI, J. Y.; LEE, S.O.; KIM, S. S.; PARK, J. H. Curcumin alters neural plasticity and viability of intact hippocampal circuits and attenuates behavioral despair and COX-2 expression in chronically-stressed rats. **Mediators of Inflammation**, 2017.

CLEMENTINO, A.; SONVICO, F. Development and validation of a RP-HPLC method for the simultaneous detection and quantification of simvastatin's isoforms and coenzyme Q10 in lecithin/chitosan nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical**

and Biomedical Analysis, v. 155, p. 33-41, 2018.

COSTA, L. G.; GARRICK, J. M.; ROQUÈ, P. J.; PELLACANI, C. Mechanisms of Neuroprotection by Quercetin: Counteracting Oxidative Stress and More. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1-10, 2016.

CUI, H.; WU, J.; LI, C.; LIN, L. Improving anti-listeria activity of cheese packaging via nanofiber containing nisin-loaded nanoparticles. **LWT - Food Science and Technology,** V. 81, P. 233-242, 2017.

CUNHA NETO, F.; MARTON, L. T.; MARQUI, S. V.; LIMA, T. A.; BARBALHO, S. M. Curcuminoids from Curcuma Longa: New adjuvants for the treatment of crohn's disease and ulcerative colitis? **Critical Reviews in Food Science and Nutrition,** v. 59, p. 2136-2143, 2019.

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

D'ANDREA, G. Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications?. **Fitoterapia**, v. 106, 2015.

DAVID, A. V. A.; ARULMOLI, R.; PARASURAMAN, S. Overviews of Biological Importance of Quercetin: A Bioactive Flavonoid. **Pharmacognosy Review**, v. 10, n. 20, 2016.

DING, L.; LI, J.; SONG, B.; XIAO, X.; ZHANG, B.; QI, M.; HUANG, W.; YANG, L.; WANG, Z. Curcumin rescues high fat diet-induced obesity and insulin sensitivity in mice through regulating SREBP pathway. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 304, p. 99–109, 2016.

DOOST, A. S.; MUHAMMAD, D. R. A.; STEVENS, C. V.; DEWETTINCK, K.; MEEREN, P. V. D. Fabrication and characterization of quercetin loaded almond gum-shellac nanoparticles prepared by antisolvent precipitation. **Food Hydrocolloids,** v. 83, p. 190-201, 2018.

EBRAHIMIFAR, M.; HASANZADEGAN ROUDSARI, M.; KAZEMI, S. M.; EBRAHIMI SHAHMABADI, H.; KANAANI, L.; ALAVI, S.; IZADI, V. M. Enhancing effects of curcumin on cytotoxicity of paclitaxel, methotrexate and vincristine in gastric cancer cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 18, n. 1, p. 65–68. 2017.

EL-FATTAH, A. I. A.; FATHY, M. M.; ALI, Z. Y.; EL-GARAWANY, A. E. A.; MOHAMED, E. K. Enhanced therapeutic benefit of quercetin-loaded phytosome nanoparticles in ovariectomized rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 271, p. 30-38, 2017.

ELTAYEB, M.; BAKHSHI, P. K.; STRIDE, E.; EDIRISINGHE, M. Preparation of solid lipid nanoparticles containing active compound by electrohydrodynamic spraying. **Food Research International,** v. 53, p. 88–95, 2013.

ESFANJANI, A. F.; JAFARI, S. M. Nanoencapsulation of Phenolic Compounds and Antioxidants. **Nanoencapsulation of Food Bioactive Ingredients,** p. 63-101, 2017.

European Commission – EU. **Regulation (EC) no 1333/2008 of the european parliament and of the council of 16 December 2008 on food additives,** 2008.

EZHILARASI, P. N.; KARTHIK, P.; CHHANWAL, N.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Nanoencapsulation Techniques for Food Bioactive Components: A Review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n.3, 628–647, 2012.

FANG, C. L.; AL-SUWAYEH, S. A.; FANG, J.Y. Nanostructured Lipid Carriers (NLCs) for Drug Delivery and Targeting. **Recent Patents on Nanotechnology,** v. 7, n. 1, p. 41–55, 2013.

FARRAG, Y.; IDE, W.; MONTERO, B.; RICO, M.; RODRÍGUEZ-LLAMAZARES, S.; BARRAL, L.; BOUZA, R. Preparation of starch nanoparticles loaded with quercetin using nanoprecipitation technique. **International Journal of Biological Macromolecules,** v. 114, p. 426-433, 2018.

FAYED, B.; EL-SAYED, H. S.; ABOOD, A.; HASHEM, A. M.; MEHANNA, N. S. H. The application of multi-particulate microcapsule containing probiotic bacteria and inulin nanoparticles in enhancing the probiotic survivability in yoghurt. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology,** v. 22, 2019.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. **Guidance for industry considering whether an FDA-regulated product involves the application of nanotechnology.** Contains Nonbinding Recommendations, 2014.

GHANBARZADEH, B.; OLEYAEI, S. A.; ALMASI, H. Nano-structured materials utilized in biopolymer based plastics for food packaging applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition,** v. 7, p. 37-41, 2014.

GHAYOUR, N.; HOSSEINI, S. M. H.; ESKANDARI, M. H.; ESTEGHLAL, S.; NEKOEI, A.R.; GAHRUIE, H. H.; TATAR, M.; NAGHIBALHOSSAINI, F. Nanoencapsulation of quercetin and curcumin in casein-based delivery systems. **Food Hydrocolloids,** v. 87, p. 394-403, 2019.

GHOLAMPOUR, F.; SADIDI, Z. Hepatorenal protection during renal ischemia by quercetin and remote ischemic preconditioning. **Journal of Surgical Research**, v. 231, p. 224-233, 2018.

GHORESHI, Z. A.; KABIRIFAR, R.; SAFARI, F.; KARIMOLLAH, A.; MORADI, A.; ESKANDARI-NASAB, E. Hepatoprotective effects of curcumin in rats after bile duct ligation via downregulation of Rac1 and NOX1. **Nutrition,** v. 36, p. 72–78, 2017.

GOKCE, E. C.; KAHVECI, R.; GOKCE, A.; SARGON, M. F.; KISA, U.; AKSOY, N.; CEMIL, B. ERDOGAN, B.. Curcumin attenuates inflammation, oxidative stress, and ultrastructural damage induced by spinal cord ischemia-reperfusion injury in rats. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases,** v. 25, p. 1196–1207, 2016.

GÓMEZ-ESTACA, J.; BALANGUER, M. P.; LÓPEZ-CARBALLO, G.; GAVARA, R.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P. Improving antioxidant and antimicrobial properties of curcumin by means of encapsulation in gelatin through electrohydrodynamic atomization. **Food Hydrocolloids**, v. 70, p. 33-320, 2017.

GREINER, R. Current and Projected Applications of Nanotechnology in the Food Sector. **Nutrire,** v.34, n.1, p.243-260, 2009.

GROUNDWATER, P. W.; NARLAWAR, R.; LIAO, V. W.; BHATTACHARYA, A.; SRIVASTAVA, S.; KUNAL, K.; DODDAREDDY, M.; OZA, P. M.; MAMIDI, R.; MARS, E. C.; PERRY, J. D.; HIBBS, D. E. PANDA, D. A carbocyclic curcumin inhibits proliferation of gram-positive bacteria by targeting FtsZ. **Biochemistry,** v. 56, n.3, p. 514–524, 2017.

GRZELAK-BŁASZCZYK, K.; MILALA, J.; KOSMALA, M.; KOŁODZIEJCZYK, K. SÓJKA, M.; CZARNECKI, A.; KLEWICKI, R.; JUŚKIEWICZ, J.; FOTSCHKI, B.; JURGOŃSKI, A. Onion quercetin monoglycosides alter microbial activity and increase antioxidant capacity. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 56, p. 81-88, 2018.

GUGLER, R.; LESCHIK, M.; DENGLER, H. J. Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 9, p. 229-234, 1975.

GUPTA, S. C.; PATCHVA, S.; AGGARWAL, B. B. Therapeutic roles of curcumin: Lessons learned from clinical trials. **AAPS Journal,** v. 15, n.1, 195–218, 2013.

HAMAD, A. F.; HAN, J.-H.; KIM, B.-C.; RATHER, I. A. The intertwine of nanotechnology with the food industry. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 1, 27–30, 2018.

HANDFORD, C. E.; DEAN, M.; SPENCE, M.; HENCHION, M.; ELLIOTT, C. T.; CAMPBELL, K. Awareness and Attitudes Towards the Emerging Use of Nanotechnology in the Agri-Food Sector. **Food Control,** v.57, p.24-34, 2015.
HAO, J.; GUO, B.; YU, S.; ZHANG, W.; ZHANG, D.; WANG, J.;WANG, Y. Encapsulation of the flavonoid quercetin with chitosan-coated nano-liposomes. **LWT - Food Science and Technology,** v. 85, p. 37-44, 2017.

HARMAN, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **Journal of Gerontology,** v. 11, p. 298–300, 1956.

HASHISH, E. A.; ELGAML, S. A. Hepatoprotective and nephroprotective effect of curcumin against copper toxicity in rats. **Indian Journal of Clinical Biochemistry,** v. 31, n. 3, p. 270–277, 2016.

HU, B.; LIU, X.; ZHANG, C.; ZENG, X. Food macromolecule based nanodelivery systems for enhancing the bioavailability of polyphenols. **Journal of Food and Drug Analysis,** v. 25, n. 1, p. 3–15, 2017.

HUANG, J.; WANG, Q.; LI, T.; XIA, N.; XIA, Q. Nanostructured lipid carrier (NLC) as a strategy for encapsulation of quercetin and linseed oil: Preparation and in vitro characterization studies. **Journal of Food Engineering,** v. 215, p. 1-12, 2017.

HUSSAIN, Z.; THU, H. E.; AMJAD, M. W.; HUSSAIN, F.; AHMED, T. A.; KHAN, S. Exploring recent developments to improve antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial efficacy of curcumin: A review of new trends and future perspectives. **Materials Science and Engineering: C**, v. 77, p. 1316-1326, 2018.

INGALE, A.; CHAUDHARI, A. N. Nanotechnology in the Food Industry. **Nanotechnology, Food Security and Water Treatment,** p. 87-128, 2018.

INGALE, A.; CHAUDHARI, A. N. Nanotechnology in the Food Industry. **Nanotechnology, Food Security and Water Treatment,** p. 87-128, 2018.

ISMAIL, S. A.; EL-SAYED, H. S.; FAYED, B. Production of prebiotic chitooligosaccharide and its nano/microencapsulation for the production of functional yoghurt. **Carbohydrate Polymers,** v. 234, 2020.

JAFARI, S. M. An Introduction to Nanoencapsulation Techniques for the Food Bioactive Ingredients. **Nanoencapsulation of Food Bioactive Ingredients,** p. 1-62, 2017.

JAMWAL, R. Bioavailable curcumin formulations: A review of pharmacokinetic studies in healthy volunteers. **Journal of Integrative Medicine,** 2018.

JEENGAR, M. K.; SHRIVASTAVA, S.; MOULI VEERAVALLI, S. C.; NAIDU, V. G.; SISTLA, R. Amelioration of FCA induced arthritis on topical application of curcumin in combination with emu oil. **Nutrition,** v. 32, n. 9, p. 955–964, 2016.

KAWABATA, K.; KATO, Y.; SAKANO, T.; BABA, N.; HAGIWARA, K.; TAMURA, A.; BABA, S.; NATSUME, M.; OHIGASHI, H. Effects of phytochemicals on *in vitro* anti-inflammatory activity of *Bifidobacterium adolescentis.* **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 79, n. 5, 2015.

KAWABATA, K.; MUKAI, R.; ISHISAKA, A. Quercetin and related polyphenols: new insights and implications for their bioactivity and bioavailability. **Food & Function**, v. 6, n. 5, p. 1-57, 2015.

KHARAT, M.; ZHANG, G.; McCLEMENTS, D. J. Stability of curcumin in oil-in-water emulsions: Impact of emulsifier type and concentration on chemical degradation. **Food Research International**, v. 111, p. 178-186, 2018.

KUMARI, A.; DASH, D.; SINGH, R. Lipopolysaccharide (LPS) exposure differently affects allergic asthma exacerbations and its amelioration by intranasal curcumin in mice. **Cytokine**, v. 76, n. 2, p. 334–342, 2016.

LI, D.; SUN-WATERHOUSE, D.; WANG, Y.; QIAO, X.; CHEN, Y.; LI, F. Interactions of Some Common Flavonoid Antioxidants. **Reference Module in Food Science**, p. 1-6, 2018.

[a]LI, Y.; YAO, J.; HAN, C.; YANG, J.; CHAUDHRY, M. T.; WANG, S.; LIU, H.; YIN, Y. Quercetin, Inflammation and Immunity. **Nutrients**, v. 8, n. 3, p. 1-14, 2016.

[b]LI, J.; HWANG, I.; CHEN, X.; PARK, H. J. Effects of chitosan coating on curcumin loaded nano-emulsion: Study on stability and in vitro digestibility. **Food Hydrocolloids**, v. 60, p. 138-147, 2016.

LIU, H.; HO, Y. Anticancer effect of curcumin on breast cancer and stem cells. Food **Science and Human Wellness**, v. 7, n. 2, p. 134-137, 2018.

LU, M.; YIN, N.; LIU, W.; CUI, X.; CHEN, S.; WANG, E. Curcumin ameliorates diabetic nephropathy by suppressing NLRP3 inflammasome signaling. **BioMed Research International,** 2017.

MANDE, P. P.; BACHHAV, S. S.; DEVARAJAN, P. V. Solid dispersion of curcumin as polymeric films for bioenhancement and improved therapy of rheumatoid arthritis. **Pharmaceutical Research**, v. 33, n. 8, p. 1972–1987, 2016.

MARSANASCO, M.; PIOTRKOWSKI, B.; CALABRÓ, V.; ALONSO, S. V.; CHIARAMONI, N. S. Bioactive constituents in liposomes incorporated in orange juice as new functional food: thermal stability, rheological and organoleptic properties. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 7828-7838, 2015.

MARTÍNEZ-BALLESTA, M.; GIL-IZQUIERDO, Á.; GARCÍA-VIGUERA, C.; DOMÍNGUEZ-PERLES, R. Nanoparticles and Controlled Delivery for Bioactive Compounds: Outlining Challenges for New "Smart-Foods" for Health. **Foods,** v. 7, p. 1-29, 2018.

MARTINS, V. C.; BRAGA, E. C. O.; GODOY, R. L. O.; BORGUINI, R. G.; PACHECO, S.; SANTIAGO, M. C. P. A.; NASCIMENTO, L. S. M. Nanotecnologia em alimentos: uma breve revisão. **Perspectivas da Ciência e Tecnologia,** v. 7, n. 2, p. 25-42, 2015.

MATHEW, D.; HSU, W. Antiviral potential of curcumin. **Journal of Functional Foods**, v. 40, p. 692-699, 2018.

MILTONPRABU, S.; TOMCZYK, M. Skalicka-Woźniak, K.; RASTRELLI, L.; DAGLIA, M.; NABAVI, S. F.; ALAVIAN, S. M.; NABAVI, S. M. Hepatoprotective effect of quercetin: From chemistry to medicine. **Food and Chemical Toxicology**, v. 108, p. 365-374, 2017.

MOKARIZADEH, M.; KAFIL, H. S.; GHANBARZADEH, S.; ALIZADEH, A.; HAMISHEHKAR, H. Improvement of citral antimicrobial activity by incorporation into nanostructured lipid carriers: a potential application in food stuffs as a natural preservative. **Research in Pharmaceutical Sciences,** v. 12, p. 409–15, 2017.

MUHAMMAD, I.; SUN, X.; WANG, H.; LI, W.; WANG, X.; CHENG, P.; LI, S.; ZHANG, X.; HAMID, S. Curcumin successfully inhibited the computationally identified CYP2A6 enzyme-mediated bioactivation of aflatoxin B1 in arbor acres broiler. **Frontiers in Pharmacology**, v. 21, n. 8, p. 143, 2017.

NAYAK, A. P.; ESPINOSA, Y. G.; NORTON, I. T. Encapsulation systems for the delivery of hydrophilic nutraceuticals: Food application. **Biotechnology advances**, v. 35, p. 450-457, 2017.

ORIVE, G.; ANITUA, E.; PEDRAZ, J. L.; EMERICH, D. F. Biomaterials for promoting brain protection, repair and regeneration. **Nature Reviews Neuroscience,** v. 10, p. 682-692, 2009.

PANGENI, R.; KANG, S. W.; OAK, M.; PARK, E. Y. Oral delivery of quercetin in oil-in-water nanoemulsion: In vitro characterization and in vivo anti-obesity efficacy in mice. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 571-581, 2017.

[a]PATEL, A.; PATRA, F.; SHAH, N.; KHEDKAR, C. Application of nanotechnology in the food industry: Present status and future prospects, Chapter 1, p. 1-27, In GRUMEZESCU, A.; HOLBAN, A. M. **Impact of Nanoscience in the Food Industry.** 1st Edition, Academic Press, 484p., 2018

[b]PATEL, R. V.; MISTRY, B. M.; SHINDE, S. K.; SYED, R.; SINGH, V.; SHIN, H. Therapeutic potential of quercetin as a cardiovascular agent. **European Journal of Medicinal Chemistry,** v. 155, p. 889-904, 2018.

PATHKOTI, K.; MANUBOLU, M.; HWANG, H. M. Nanostructures: current uses and future applications in food science. **Journal of Food and Drug Anallysis,** v. 25, n. 2, p. 245-53, 2017.

PIMENTEL-MORAL, S.; TEIXEIRA, M. C.; FERNANDES, A. R.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; MARTÍNEZ-FÉREZ, A.; SEGURA-CARRETERO, A.; SOUTO, E. B. Lipid nanocarriers for the loading of polyphenols – A comprehensive review. **Advances in Colloid and Interface Science,** v. 260, p. 85-94, 2018.

PISOSCHI, A. M.; POP, A.; CIMPEANU, C.; TURCUŞC, V.; PREDOI, G.; IORDACHE, F. Nanoencapsulation techniques for compounds and products with antioxidant and antimicrobial activity - A critical view. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 157, p. 1326-1345, 2018.

POHLMANN, M.; ROSSI, W. S.; BRENDLER, C. F.; TEIXEIRA, F. G.; JÚNIOR, W. K. Fabricação digital para auxiliar no ensino-aprendizado de alunos com deficiência visual: estudo de caso dos sistemas nanoestruturados. **12º Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Design**, v. 2, n. 9, 2016.

QIU, P.; SUN, J.; MAN, S.; YANG, H.; MA, L.; YU, P.; GAO, W. Curcumin attenuates N-Nitrosodiethylamine-Induced liver injury in mice by utilizing the method of metabonomics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 9, p. 2000–2007, 2017.

REDDY, P. H., MANCZAK, M., & YIN, X. Mitochondria-division inhibitor 1 protects against amyloid-β induced mitochondrial fragmentation and synaptic damage in Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 58, n. 1, 147–162, 2017.

ROGERS, M. A. Naturally occurring nanoparticles in food. **Current Opinion in Food Science,** v. 7, p. 14-19, 2016.

ROSA, C. G.; MELO, A. P. Z.; SGANZERLA, W. G.; MACHADO, M. H.; NUNES, M. R.; MACIEL, M. V. O. B.; BERTOLDI, F. C.; BARRETO, P. L. M. Application in situ of zein nanocapsules loaded with Origanum vulgare Linneus and Thymus vulgaris as a preservative in bread. **Food Hydrocolloids,** v. 99, 2020.

SHAKERI, F.; SOUKHTANLOO, M.; BOSKABADY, M. H. The effect of hydro-ethanolic extract of Curcuma longa rhizome and curcumin on total and differential WBC and serum oxidant, antioxidant biomarkers in rat model of asthma. Iranian **Journal of Basic Medical Sciences**, v. 20, n. 2, p. 155–165, 2017.

SHEN, J. D.; WEI, Y.; LI, Y. J.; QIAO, J. Y.; LI, Y. C. Curcumin reverses the depressive-like behavior and insulin resistance induced by chronic mild stress. **Metabolic Brain Disease,** v. 32, n. 4, p. 1163–1172, 2017.

SHOME, S.; TALUKDAR, A. D.; CHOUDHURY, M. D.; BHATTACHARYA, M. K.; UPADHYAYA, H. Curcumin as potential therapeutic natural product: A nanobiotechnological perspective. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 2016.

SIMITZIS, P.; SPANOU, D.; GLASTRA, N.; GOLIOMYTIS, M. Impact of dietary quercetin on laying hen performance, egg quality and yolk oxidative stability. **Animal Feed Science and Technology**, v. 239, p. 27-32, 2018.

SIVIERO, A.; GALLO, E.; MAGGINI, V.; GORI, L.; MUGELLI, A.; FIRENZUOLI, F.; VANNACCI, A. Curcumin, a golden spice with a low bioavailability. **Journal of Herbal Medicine**, v. 5, n. 2, p. 57-70, 2015.

SIVIERO, A.; GALLO, E.; MAGGINI, V.; GORI, L.; MUGELLI, A.; FIRENZUOLI, F.; VANNACCI, A. Curcumin, a golden spice with a low bioavailability. **Journal of Herbal Medicine,** v. 5, n. 2, p. 57-70, 2015.

SOCAS-RODRÍGUEZ, B.; GONZÁLEZ-SÁLAMO, J.; HERNÁNDEZ-BORGES, J.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. A. Recent applications of nanomaterials in food safety, **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 96, p. 172-200, 2017.

SOUZA, M. P.; VAZ, A. F. M.; CORREIA, M. T. S.; CERQUEIRA, M. A.; VICENTE, A. A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. Quercetin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles for functional food applications. **Food and Bioprocess Technology,** v. 7, p. 1149-1159, 2014.

SUBHASHINI; CHAUHAN, P. S.; KUMARI, S.; KUMAR, J. P.; CHAWLA, R.; DASH, D.; SINGH, M.; SINGH, R. Intranasal curcumin and its evaluation in murine model of asthma. **International Immunopharmacology**, v. 17, n. 3, 733–743, 2013.

UGRU, M. M.; SHESHADRI, S.; JAIN, D.; MADHYASTHA, H. MADHYASTHA, R.; MARUYAMA, M.; NAVYA, P. N.; DAIMA, H. K. Insight into the composition and surface corona reliant biological behaviour of quercetin engineered nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 548, p. 1-9, 2018.

WANG, P.; SU, C.; FENG, H.; CHEN, X.; DONG, Y.; RAO, Y.; REN, Y.; YANG, J.; SHI, J.; TIAN, J.; JIANG, S. Curcumin regulates insulin pathways and glucose metabolism in the brains of APPswe/PS1dE9 mice. **International Journal of Immunopathology & Pharmacology,** v. 30, n.1, p. 25–43, 2017.

YAN, L.; WANG, R.; WANG, H.; SHENG, K.; LIU, C.; QU, H.; MA, A.; ZHENG, L. Formulation and characterization of chitosan hydrochloride and carboxymethyl chitosan encapsulated quercetin nanoparticles for controlled applications in foods system and simulated gastrointestinal condition. **Food Hydrocolloids**, v. 84, p. 450-457, 2018.

ANEXO A

Track your recent Co-Authored submission to COLSUB

C

Colloids and Surfaces B <eesserver@eesmail.elsevier.com>
Sáb, 01/02/2020 17:48
Você

*** Automated email sent by the system ***

Dear Dr. Marcela Valencia,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Colloids and Surfaces B: Biointerfaces
Title: Quercetin-loaded, lecithin-chitosan nanoparticles: Physical, chemical, bioactivity and toxicity characterization
Corresponding Author: Maria das Graças Carneiro-da-Cunha
Co-Authors: Marcela Valencia; Maurício Júnior; Francisco Júnior; Bruno Veras; Elizabeth Borba; Teresinha Silva; Viviane Xavier; Marthyna Souza;

To be kept informed of the status of your submission, register or log in (if you already have an Elsevier profile).