



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS EM SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E NANOBIOTECNOLOGIA

MARJORIE DE CARVALHO VIEIRA QUEIROZ

**Nanoencapsulação de Licopeno Extraído de Subprodutos do Tomate (*Solanum lycopersicum*
L.) em Carreadores Lipídicos Obtidos por Inversão de Fases por Temperatura**

BRASÍLIA - DF

2026

MARJORIE DE CARVALHO VIEIRA QUEIROZ

Nanoencapsulação de Licopeno Extraído de Subprodutos do Tomate (*Solanum lycopersicum* L.) em Carreadores Lipídicos Obtidos por Inversão de Fases por Temperatura

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Luís Alexandre Muehlmann

BRASÍLIA - DF

2026

MARJORIE DE CARVALHO VIEIRA QUEIROZ

Nanoencapsulação de Licopeno Extraído de Subprodutos do Tomate (*Solanum lycopersicum* L.) em Carreadores Lipídicos Obtidos por Inversão de Fases por Temperatura

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Luís Alexandre Muehlmann

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luis Alexandre Muehlmann

Universidade de Brasília - UnB

Prof. Dra. Sonia Nair Bão

Departamento de Biologia Celular - UnB

Dra. Rayane Ganassin

Secretária de Saúde do Distrito Federal - SES/DF

Prof. Dr. Alan Kelbis Oliveira Lima

Laboratório de Química de Biomassa e Biocombustíveis
– Embrapa Agroenergia

AGRADECIMENTOS

Ao concluir mais uma etapa importante da minha vida, não poderia deixar de agradecer a todos que caminharam ao meu lado, oferecendo apoio, conforto e força nos momentos em que eu mais precisei.

Agradeço primeiramente a Deus, por iluminar meu caminho, fortalecer meu espírito nos dias difíceis e me permitir chegar até aqui com coragem e fé. Sou profundamente grata por tudo o que vivi, aprendi e superei ao longo dessa jornada.

À minha família, agradeço por cada gesto de apoio e por acreditarem em mim mesmo quando não entendiam totalmente minhas escolhas ou a complexidade da minha área. Obrigada por permanecerem ao meu lado em todas as fases, celebrando cada conquista e me levantando quando eu achei que não daria conta.

Ao meu querido orientador, expresso minha gratidão mais sincera. Não existem palavras suficientes para agradecer tudo o que fez e continua fazendo para me ajudar. Obrigada por ter acreditado em mim, por ter aceitado (ou melhor, por eu ter insistido para que aceitasse!) me orientar, e por ser um exemplo de dedicação, paciência e humanidade. Não existe *Queiroz, M.C.V.* sem *Muehlmann, L.A.*, e levo isso comigo com muito orgulho.

Aos meus amigos, obrigada por todo apoio, carinho e compreensão frente à minha rotina totalmente caótica. Obrigada por entenderem minha vida sem tempo, minhas ausências e ainda assim permanecerem comigo. Amo muito vocês.

Aos professores Elton, Juliano e Marcelo, registro minha gratidão pela disponibilidade, pelo conhecimento compartilhado e pelas contribuições que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Leonardo, Daniel, Vitória, Atailson, Gabi, Ellen e Andreanne, meus agradecimentos especiais por todo suporte, pela ajuda direta com o projeto e por cada detalhe que tornou essa dissertação possível. E a todos que, de alguma forma, contribuíram para este percurso, deixo aqui meu muito obrigada. Precisei da ajuda de muitas pessoas para conseguir fazer tudo isso acontecer, e sou grata a cada uma delas.

Agradeço, também, às agências de fomento - FINEP, FAP-DF, CNPQ e CAPES - pelo apoio financeiro concedido ao longo do desenvolvimento desta pesquisa. O suporte institucional foi fundamental para a realização das atividades experimentais, aquisição de materiais e para a consolidação da formação científica proporcionada por este trabalho.

RESUMO

O licopeno é um carotenoide bioativo abundante em resíduos agroindustriais do tomate (*Solanum lycopersicum* L.) apresentando reconhecidas propriedades antioxidantes e potenciais aplicações nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica. Entretanto, sua elevada hidrofobicidade, instabilidade frente à luz, oxigênio e temperatura, além de baixa biodisponibilidade limitam sua aplicação direta. Nesse contexto, os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs), obtidos por métodos de emulsificação de baixa energia, representam uma alternativa promissora para proteger, estabilizar e veicular compostos lipofílicos. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver, caracterizar e avaliar a estabilidade de CLNs contendo licopeno extraído de resíduos de tomate, utilizando o método de inversão de fases por temperatura (PIT) associado ao uso de lipídeos de origem vegetal, com ênfase na sustentabilidade do processo. Primeiro foi preparado o extrato oleoso com licopeno e em seguida foram produzidas 52 nanoformulações, contendo ou não licopeno, utilizando óleo de canola, manteiga de murumuru e o tensoativo Brij O10. A caracterização físico-química foi conduzida por análises de tamanho médio de partícula (*Z-average*), índice de polidispersividade (PDI) e potencial Zeta realizadas por espalhamento dinâmico de luz (DLS). A quantificação do licopeno nas nanoformulações foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), permitindo o cálculo da eficiência de encapsulamento. A estabilidade das nanoformulações foi avaliada por 90 dias sob temperatura ambiente e a 4 °C. A atividade antioxidante das amostras foi determinada pelo método de sequestro do radical DPPH, enquanto o perfil de citotoxicidade foi avaliado por meio do ensaio de viabilidade celular. O extrato apresentou concentração de 4,25 µg/mL de licopeno. A análise conjunta dos parâmetros físico-químicos revelou que as formulações apresentaram diâmetro hidrodinâmico médio de $49,32 \pm 12,31$ nm, com distribuição relativamente homogênea (PDI de $0,193 \pm 0,032$). O potencial Zeta permaneceu negativo ($-13,91 \pm 3,43$ mV), indicando estabilidade coloidal moderada e repulsão eletrostática suficiente para evitar agregação pronunciada. A maioria dos carreadores lipídicos nanoestruturados contendo licopeno (CLN-L) mantiveram estabilidade durante 90 dias, com melhor desempenho observado sob refrigeração. A eficiência de encapsulamento variou de 21,72 a 49,75%, indicando um limite de solubilidade do licopeno na matriz lipídica estudada, independentemente da concentração inicial do

extrato. Todas as amostras analisadas apresentaram atividade antioxidante, com maior teor de redução do radical DPPH em 87,71%. Os testes de viabilidade celular demonstraram perfil dose-dependente, com menor citotoxicidade em concentrações reduzidas e efeitos acentuados em doses mais altas. A CLN-L apresentou IC_{50} de 180 mg/mL e 0,44 mg/mL, para HaCaT e B16-F10, respectivamente, enquanto o carreador lipídico sem licopeno (CLN-B) apresentou IC_{50} de 140 mg/mL e 0,092 mg/mL. Os resultados obtidos demonstram o potencial dos carreadores produzidos pelo método PIT como sistemas promissores para estabilização e veiculação de licopeno, valorizando resíduos agroindustriais e contribuindo para a nanotecnologia verde. As propriedades físico-químicas, a estabilidade prolongada e a atividade funcional observadas reforçam a aplicabilidade desses sistemas em formulações cosméticas, nutracêuticas e farmacêuticas, abrindo caminho para novos estudos de liberação controlada, padronização de extratos e avaliação biológica ampliada.

Palavras-chave: carreadores lipídicos nanoestruturados; licopeno; nanotecnologia verde; temperatura de inversão de fase (PIT); resíduo de tomate.

ABSTRACT

Lycopene is a bioactive carotenoid abundantly found in agro-industrial tomato residues (*Solanum lycopersicum* L.), exhibiting well-recognized antioxidant properties and potential applications in the food, cosmetic, and pharmaceutical industries. However, its high hydrophobicity, instability toward light, oxygen, and temperature, as well as its low bioavailability, limit its direct application. In this context, nanostructured lipid carriers (NLCs), obtained by low-energy emulsification methods, represent a promising alternative for the protection, stabilization, and delivery of lipophilic compounds. Thus, the aim of this study was to develop, characterize, and evaluate the stability of NLCs containing lycopene extracted from tomato residues, using the phase inversion temperature (PIT) method combined with vegetable-derived lipids, with an emphasis on process sustainability. First, an oily lycopene extract was prepared, followed by the production of 52 nanoformulations, with or without lycopene, using canola oil, murumuru butter, and the surfactant Brij O10. Physicochemical characterization was carried out by measuring mean particle size (Z-average), polydispersity index (PDI), and Zeta potential using dynamic light scattering (DLS). Lycopene quantification in the nanoformulations was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC), allowing the calculation of encapsulation efficiency. The stability of the nanoformulations was evaluated for 90 days under room temperature and at 4 °C. Antioxidant activity was determined using the DPPH radical scavenging assay, while the cytotoxicity profile was assessed through a cell viability assay. The extract presented a lycopene concentration of 4,25 µg/mL. The combined analysis of physicochemical parameters revealed that the formulations exhibited an average hydrodynamic diameter of 49.32 ± 12.31 nm, with a relatively homogeneous size distribution (PDI of 0.193 ± 0.032). The Zeta potential remained negative (-13.91 ± 3.43 mV), indicating moderate colloidal stability and sufficient electrostatic repulsion to prevent pronounced aggregation. Most lycopene-loaded nanostructured lipid carriers (NLC-L) remained stable over 90 days, with better performance observed under refrigeration. Encapsulation efficiency ranged from 21,72 to 49,75%, indicating a solubility limit of lycopene within the lipid matrix studied, regardless of the initial extract concentration. All analyzed samples exhibited antioxidant activity, with a maximum DPPH radical reduction of 87.71%. Cell viability assays demonstrated a dose-dependent profile, with lower cytotoxicity at reduced concentrations and more pronounced effects at higher doses. NLC-L showed IC₅₀ values of 180 mg/mL and 0.44 mg/mL for HaCaT and B16-F10 cell lines,

respectively, whereas the lipid carrier without lycopene (NLC-B) presented IC₅₀ values of 140 mg/mL and 0.092 mg/mL. Overall, the results demonstrate the potential of carriers produced by the PIT method as promising systems for the stabilization and delivery of lycopene, adding value to agro-industrial residues and contributing to green nanotechnology. The physicochemical properties, prolonged stability, and functional activity observed reinforce the applicability of these systems in cosmetic, nutraceutical, and pharmaceutical formulations, paving the way for further studies on controlled release, extract standardization, and expanded biological evaluation.

Keywords: nanostructured lipid carriers; lycopene; green nanotechnology; Phase Inversion Temperature (PIT); tomato residues.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema ilustrativo mostrando o aumento na produção de tomate e as elevadas perdas pós-colheita, que resultam em resíduos ricos em bioativos, como carotenóides e compostos fenólicos. 24
- Figura 2.** Principais propriedades do Licopeno. 25
- Figura 3.** Representação dos isômeros geométricos *trans*-licopeno e *cis*-licopeno. Fonte: Ghatak *et al*, (2017), com adaptações 26
- Figura 4.** Esquema representando a formação de um Carreador Lipídico Nanoestruturado (CLN), composto por fase lipídica sólida (manteiga vegetal), fase lipídica líquida (óleo vegetal), surfactante e ativo incorporado após emulsificação. 34
- Figura 5.** Representação esquemática do processo de obtenção de nanopartículas lipídicas pelo método PIT (Inversão de fase por temperatura). A formulação inicial contendo lipídeos é preparada antes da adição do surfactante. Após o aquecimento, ocorre a inversão de fases da emulsão óleo/água para água/óleo. O resfriamento rápido estabiliza o sistema, resultando na formação das nanopartículas 35
- Figura 6.** Fluxograma da extração de licopeno a partir de cascas de tomate: liofilização das cascas (24 h); trituração do material seco; extração em óleo de canola (razão 2,5% casca seca/óleo; 80 °C, 400 rpm, 1 h); filtração; obtenção do extrato oleoso rico em licopeno. 41
- Figura 7.** Preparo dos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados com licopeno (CLN-L) pelo método PIT (inversão de fase por temperatura): preparo da fase oleosa (extrato com licopeno + manteiga de murumuru + Brij O10) e da fase aquosa (água destilada, 30 mL); aquecimento da fase oleosa sob agitação até fusão e homogeneização; adição da fase aquosa sob agitação, com passagem pelo ponto de nuvem e resfriamento controlado em banho-maria frio; coleta/armazenamento da nanoformulação obtida. 43
- Figura 8.** Cromatograma representativo do padrão de licopeno obtido por HPLC com detecção a 472 nm, com absorbância expressa em mili-unidades de absorbância (mAU). Pico principal com tempo de retenção em 8,20 minutos. Imagem obtida pelo

Figura 9. Curva de calibração para a quantificação do licopeno presente no extrato da casca de tomate obtida por HPLC-UV, utilizando concentrações entre 0 e 10 µg/mL. As análises foram realizadas com detecção de 472 nm. Imagem feita no software GraphPad Prism 8.0.1. 52

Figura 10. Cromatograma do extrato contendo licopeno da casca de tomate em óleo de canola. O pico principal, com tempo de retenção de aproximadamente 8,08 min, corresponde ao licopeno, identificado por comparação com o padrão analítico e com base no espectro de absorção característico ($\lambda_{\text{máx}} \approx 472$ nm). Imagem obtida pelo OriginPro 7 54

Figura 11. Aspecto visual dos CLNs após a obtenção do extrato inicial e após armazenamento por 7 e 30 dias em diferentes condições: congelado (C), refrigerado (G) e temperatura ambiente (TA). Da esquerda para direita: Extrato inicial, Extrato congelador 7 dias, Extrato congelador 30 dias, Extrato geladeira 7 dias, Extrato geladeira 30 dias, Extrato temperatura ambiente 7 dias e Extrato temperatura ambiente 30 dias. 56

Figura 12. Cromatograma representativo do padrão de licopeno e do extrato contendo licopeno do tomate em óleo de canola, na concentração de 4,25 µg/mL, obtido por HPLC com detecção a 472 nm, com pico de retenção do extrato em 7,27 minutos e do padrão em 8,2 minutos. Imagem obtida pelo OriginPro 7. 58

Figura 13. Espectros de absorção na região do UV obtidos para o licopeno. (A) Espectro do padrão de licopeno dissolvido em hexano:clorofórmio (1:1), evidenciando os picos característicos em 295, 447, 472 e 503 nm. (B) Espectro do extrato lipídico com licopeno da casca de tomate em óleo de canola, apresentando máximos em 448, 472 e 504 nm. Imagem obtida pelo software Lab Solutions. 58

Figura 14. Efeito da concentração de Brij O10 e da proporção de óleo de canola no índice de polidispersão (PDI) das nanoformulações obtidas pelo método PIT. 61

Figura 15. Efeito da concentração de Brij O10 e da proporção de óleo de canola no diâmetro

hidrodinâmico (d.nm) das nanoformulações obtidas pelo método PIT 61

Figura 16. Efeito da concentração de Brij O10 e da proporção de óleo de canola no potencial Zeta das nanoformulações obtidas pelo método PIT. 62

Figura 17. Comparação dos dois procedimentos de resfriamento após o PIT na preparação das nanoformulações CLN-B no dia 1, variando a % de óleo de canola na matriz lipídica (20–80%), com 3 g de Brij O10: (A) resfriamento em bancada sob agitação magnética; (B) resfriamento em banho-maria frio (~10 °C) sob agitação. 63

Figura 18. Comparação dos procedimentos de resfriamento após o PIT na preparação das nanoformulações CLN-L no dia 1, variando a % de extrato incorporado na matriz lipídica (20–80%), com 3 g de Brij O10: (A) resfriamento em bancada sob agitação magnética; (B) resfriamento em banho-maria frio (~10 °C) sob agitação. 63

Figura 19. Aspecto visual das nanoformulações lipídicas com diferentes proporções de extrato contendo licopeno (20–80%) obtidas pelo método PIT com 3 g de Brij O10. (A–B) Formulações preparadas com resfriamento apenas por agitação ambiente. (C–D) Formulações preparadas pelo método com resfriamento por agitação em banho-maria a 10 °C 64

Figura 20. Distribuição de tamanho dos CLNs contendo licopeno obtidas pelo método PIT, comparando os modos de resfriamento. (A) 65% de extrato contendo licopeno, (B) 70%, (C) 75% e (D) 80% com 3 g de Brij O10. Linha laranja: método com resfriamento por agitação em banho-maria a 10 °C. Linha azul: método com resfriamento por agitação. 66

Figura 21. Variação do diâmetro hidrodinâmico (d.nm) e do índice de polidispersividade (PDI) das nanoformulações contendo diferentes porcentagens de óleo de canola (20–80%) ao longo de 90 dias de armazenamento. Os gráficos da coluna esquerda representam as amostras mantidas em temperatura de refrigeração (4 °C), enquanto os gráficos da coluna direita correspondem às amostras mantidas em temperatura ambiente (25 °C). 68

Figura 22. Efeito da composição de extrato contendo licopeno sobre o diâmetro hidrodinâmico (d.nm) e o índice de polidispersidade (PDI) dos CLN-L ao longo do armazenamento. Os gráficos da esquerda representam as amostras mantidas em geladeira (4 °C), enquanto os gráficos da direita correspondem às amostras armazenadas em temperatura ambiente (25 °C). 74

Figura 23. Comparação visual dos CLN-L antes (A) e após centrifugação (B) a 10.000 rpm por 60 minutos a 25 °C (coluna direita), nas diferentes proporções de extrato. Setas brancas indicam as alterações observadas. 84

Figura 24. Micrografias MET dos CLN-L 70 em diferentes aumentos: (A1–A2) 40.000×; (B1–B2) 15.000×; (C1–C2) 10.000×. Setas pretas regiões com maior eletrodensidade no interior das nanopartículas, sugerindo a presença de núcleos lipídicos mais densos em relação à superfície. Escala inserida nas imagens 86

Figura 25. Cromatograma representativo do extrato contendo licopeno e das nanoformulações CLN-L contendo diferentes proporções de extrato (20–70%), obtido por HPLC com detecção a 472 nm. Imagem gerada pelo OriginPro 7. 88

Figura 26. Cromatograma representativo das nanoformulações CLN-L 20, CLN-L 60 e CLN-L 70, obtido por HPLC com detecção a 472 nm. Imagem gerada pelo OriginPro 7.. 89

Figura 27. Curva de calibração do ácido ascórbico (AA) obtida no ensaio de DPPH. A relação entre a concentração de ácido ascórbico (0–10 µg/mL) e a absorbância remanescente do radical DPPH a 517 nm. $R^2 = 0,9797$. Imagem obtida pelo GraphPad Prism 8.0.1. 94

Figura 28. Porcentagem de redução do radical DPPH para as nanoformulações contendo licopeno (CLN-L 70% e CLN-L 20%), suas respectivas formulações brancas (CLN-B 70% e CLN-B 20%) e para o extrato contendo licopeno livre. Os valores estão expressos como média ± desvio-padrão das triplicatas. 95

Figura 29. Porcentagem de redução do radical DPPH em função da concentração de licopeno das amostras para o extrato contendo licopeno livre e para as nanoformulações contendo 20% (CLN-L 20%) e 70% (CLN-L 70%) de extrato. 98

Figura 30. Viabilidade celular (%) da linhagem HaCaT após exposição às nanoformulações CLN-L e CLN-B, em diferentes concentrações (mg/mL) obtida pelo ensaio de MTT após 24 h de incubação. 100

Figura 31. Viabilidade celular (%) da linhagem B16-F10 após exposição às nanoformulações CLN-B e CLN-L em diferentes concentrações (mg/mL) obtida pelo ensaio de MTT após 24 h de incubação. 103

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Diferenças entre óleos e manteigas vegetais quanto à composição lipídica, grau de saturação e comportamento físico-químico 29
- Tabela 2.** Lista dos reagentes, insumos químicos, linhagens celulares e meios utilizados nos experimentos, acompanhados de seus respectivos fabricantes. 40
- Tabela 3.** Composição da matriz lipídica das formulações testadas. Cada formulação foi composta por 2,5g de matriz lipídica, 3 g do tensoativo Brij O10 e 30 mL de água destilada 42
- Tabela 4.** Quantificação do Licopeno de acordo com área do pico observado na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) do padrão e do extrato em óleo de canola nas diferentes condições de armazenamento. Concentração expressa por grama de casca de tomate liofilizada e in natura. Extrato C (armazenado em congelador, -18°C). Extrato G (armazenado em geladeira, 4°C). Extrato TA (armazenado em temperatura ambiente, 25°C). 53
- Tabela 5.** Potencial zeta (ZP, mV) das nanoformulações sem licopeno (CLN-B) em diferentes concentrações, determinados após armazenamento a 4 °C e 25 °C, ao longo de 90 dias. Resultados expressos como média $\pm$ DP 72
- Tabela 6.** Caracterização por DLS das nanoformulações com licopeno em diferentes concentrações, apresentando o diâmetro médio (d.nm), o índice de polidispersividade (PDI) e o potencial zeta (ZP, mV), determinados após armazenamento a 4 °C e 25 °C, ao longo de 90 dias. Resultados expressos como média $\pm$ DP. 81
- Tabela 7.** Quantificação do teor de Licopeno de acordo com área do pico observado na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) das nanoformulações e eficiência de encapsulamento (EE%) 87
- Tabela 8.** Curva padrão de ácido ascórbico utilizada no ensaio de sequestro do radical DPPH. Concentrações crescentes de ácido ascórbico (0–10 μ g/mL) foram incubadas com a solução de DPPH e avaliadas a 517 nm. Os valores de atividade antioxidante (%) foram calculados com base na redução da absorbância do radical em relação ao

controle (solução com DPPH + água destilada).

93

Tabela 9. Valores médios de absorvância (517 nm) e atividade antioxidante (%) obtidos no ensaio de sequestro do radical DPPH para o extrato contendo licopeno e para as diferentes nanoformulações lipídicas (CLN-L e CLN-B) contendo 20% ou 70% de extrato, e suas respectivas equivalências em ácido ascórbico (Ceq-AA). Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão (n = 3)

96

LISTA DAS SIGLAS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem
±	Símbolo estatístico para desvio padrão, significa mais ou menos
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
µmol	Micromol
A/O	Água em óleo
ATCC	American Type Culture Collection
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLN	Carreador lipídico nanoestruturado
CLN-B	Carreador lipídico nanoestruturado branco
CLN-L	Carreador lipídico nanoestruturado com licopeno
d.nm	Diâmetro hidrodinâmico
DLS	Espalhamento dinâmico da luz
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EE	Eficiência de encapsulamento
EROs	Espécies reativas de oxigênio
<i>et al.</i>	E colaboradores
h	hora
HLB	Equilíbrio hidrófilo-lipófilo
min	Minutos
mL	Mililitros
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
mV	Milivolts
NLS	Nanopartículas lipídicas sólidas
nm	Nanômetros
O/A	Óleo em água
°C	Graus célsius

PDI	Índice de polidispersividade
pH	Potencial hidrogeniônico
PIT	Temperatura de inversão de fase
rpm	Rotações por minuto
SFB	Soro fetal bovino

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 TOMATE (<i>Solanum lycopersicum</i> L.)	23
2.2 LICOPENO	24
2.3 ÓLEOS E MANTEIGAS VEGETAIS	28
2.3.1 ÓLEO DE CANOLA	30
2.3.2 MANTEIGA DE MURUMURU	31
2.4 CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS (CLNs)	33
2.5 MÉTODO PIT (TEMPERATURA DE INVERSÃO DE FASE)	34
2.6 NANOTECNOLOGIA VERDE	36
3 OBJETIVOS	39
3.1 OBJETIVO GERAL	39
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
4 METODOLOGIA	40
4.1 MATERIAIS	40
4.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO OLEOSO CONTENDO LICOPENO A PARTIR DAS CASCAS DE TOMATE	40
4.3 DESENVOLVIMENTO DOS CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS COM LICOPENO	41
4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS	43
4.4.1 ESTUDOS DE ESTABILIDADE	44
4.4.2 MORFOLOGIA DO CARREADOR LIPÍDICO COM LICOPENO	44
4.5 QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE LICOPENO NO EXTRATO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)	45
4.6 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO (EE%)	45
4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	46
4.8 VIABILIDADE CELULAR	48
4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1 TEOR DE LICOPENO PRESENTE NO EXTRATO	51
5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS (CLNs) E ESTABILIDADE	59
5.2.1 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE BRIJ O10 NAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	59
5.2.2 EFEITO DO RESFRIAMENTO CONTROLADO NA ESTABILIDADE DAS NANOFORMULAÇÕES	62
5.2.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS CLN-B	67
5.2.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS CLN-L	73
5.2.5 ESTABILIDADE ACELERADA DOS CLN-L	83
5.2.6 MORFOLOGIA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	84
5.3 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO (EE%)	86
5.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	93
5.5 VIABILIDADE CELULAR	99

6 CONCLUSÃO	105
7 LIMITAÇÕES DO ESTUDO	107
8 PERSPECTIVAS FUTURAS	107
REFERÊNCIAS	108

1 INTRODUÇÃO

O avanço da nanotecnologia tem sido capaz de promover transformações significativas em diversos setores industriais, especialmente nas áreas farmacêuticas, cosméticas e alimentícias ao possibilitar o desenvolvimento de sistemas capazes de modificar propriedades físico-químicas, cinéticas e biológicas de compostos bioativos. Entre os diferentes tipos de nanossistemas, os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) têm se destacado pela capacidade de encapsular substâncias lipofílicas instáveis, como carotenóides, vitaminas e compostos fenólicos, permitindo dispersá-las em meios aquosos e conferindo-lhes maior proteção contra a oxidação, estabilidade térmica e biodisponibilidade (Müller & Wissing, 2002; Jaiswal *et al*, 2014; Queiroz & Muehlmann, 2024).

Os CLNs representam uma evolução dos sistemas lipídicos anteriores, como as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), permitindo a incorporação de uma fase líquida na matriz lipídica sólida, o que aumenta a capacidade de carga e reduz a expulsão do ativo durante o armazenamento (Queiroz & Muehlmann, 2024). Essa característica é particularmente relevante para compostos altamente hidrofóbicos e sensíveis, como o licopeno. O licopeno tem despertado crescente interesse científico devido à sua potente atividade antioxidante, que promove a neutralização de espécies reativas de oxigênio (EROs), e a sua atuação na prevenção de doenças crônicas, incluindo câncer, doenças cardiovasculares e distúrbios neurodegenerativos (Palozza *et al*, 2012; Zhou *et al*, 2024). Contudo, a baixa solubilidade em água, susceptibilidade à oxidação, e isomerização térmica e fotoquímica dificultam sua incorporação em formulações aquosas e limitam sua biodisponibilidade oral e tópica (Kaur & Sogi, 2021). Assim, estratégias baseadas na nanoencapsulação lipídica surgem como uma solução tecnológica promissora para superar tais limitações, permitindo liberação controlada e maior estabilidade do ativo.

Além das aplicações farmacológicas, o interesse por nanossistemas contendo licopeno tem se expandido para os setores de alimentos funcionais e cosméticos, onde há demanda crescente por ingredientes naturais, sustentáveis e com benefícios fisiológicos comprovados (Carvalho *et al*, 2021; Liu & Liu, 2024). No campo alimentício, o licopeno nanoencapsulado pode ser utilizado como agente antioxidante natural e corante bioativo, enquanto em cosméticos atua como fotoprotetor, anti-inflamatório e regenerador celular, retardando processos de envelhecimento cutâneo induzidos por radiação UV (Zhou *et al*, 2024). Dentro

desse contexto, as nanopartículas lipídicas com licopeno constituem uma plataforma para aplicações multifuncionais, oferecendo proteção, liberação controlada e aumento da eficácia biológica. As propriedades reológicas e físico-químicas ajustáveis desses sistemas possibilitam sua incorporação em géis, cremes, bebidas e suplementos, ampliando sua versatilidade industrial (Jain *et al*, 2018; Kyriakoudi *et al*, 2021; Pateiro *et al*, 2021; Tang & Dong, 2023). Essa multifuncionalidade confere ao licopeno um papel central na pesquisa de sistemas nanotecnológicos voltados à saúde e bem-estar.

Da mesma maneira, a sustentabilidade na produção de compostos bioativos tem se tornado um tema explorado na biotecnologia moderna. A indústria de processamento de tomate gera anualmente grandes quantidades de resíduos agroindustriais como cascas, sementes e polpas, que, embora descartados, ainda contêm elevadas concentrações de licopeno e compostos fenólicos (Eslami *et al*, 2022; Ahmad *et al*, 2024). A valorização desses subprodutos por meio de técnicas de extração verde e incorporação em nanossistemas lipídicos representa uma abordagem circular, reduzindo o impacto ambiental e agregando valor econômico à cadeia produtiva (Masiero *et al*, 2021; Carvalho *et al*, 2021). Dessa forma, o uso de licopeno extraído da casca de tomate como ativo natural em formulações nanoestruturadas se alinha aos princípios da economia circular, química verde e inovação sustentável.

Dentro desse contexto, as nanopartículas lipídicas com licopeno constituem uma plataforma para aplicações multifuncionais, oferecendo proteção, liberação controlada e aumento da eficácia biológica. As propriedades reológicas e físico-químicas ajustáveis desses sistemas possibilitam sua incorporação em géis, cremes, bebidas e suplementos, ampliando sua versatilidade industrial (Jain *et al*, 2018; Kyriakoudi *et al*, 2021; Pateiro *et al*, 2021; Tang & Dong, 2023).

Portanto, a presente dissertação propõe o desenvolvimento e a caracterização de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo licopeno extraído da casca de tomate, com o objetivo de avaliar parâmetros físico-químicos, estabilidade e potencial antioxidante da formulação. Essa proposta busca integrar inovação tecnológica e sustentabilidade, explorando o potencial de resíduos vegetais como fontes de compostos bioativos de alto valor agregado e contribuindo para a expansão do uso de nanotecnologias verdes nas áreas cosmética, alimentar e farmacêutica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.)

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) ocupa posição de destaque entre as hortaliças cultivadas no Brasil, tanto pelo valor econômico quanto pelo consumo da população. A produção nacional está dividida entre o tomate de mesa, destinado ao consumo *in natura*, e o tomate industrial, voltado à fabricação de molhos, extratos e outros derivados. Dados recentes do IBGE indicam que, em 2024, o volume produzido foi estimado em aproximadamente 4,7 milhões de toneladas, demonstrando expansão consistente, com maior concentração nos estados de Goiás e São Paulo. No segmento industrial, a associação Tomate BR (2024) reportou cerca de 1,7 milhão de toneladas processadas em 2024, confirmando a relevância do cultivo em áreas específicas, sobretudo no Centro-Oeste.

Apesar da expressiva produção, o tomate está entre os alimentos com maiores índices de perdas e desperdício no país, apresentando danos ao longo de toda a cadeia de abastecimento (Henz *et al*, 2017; Instituto Escolhas, 2022). A cadeia é composta por múltiplos elos, que vão desde o produtor até o varejo e em cada etapa, diferentes fatores contribuem para a redução da quantidade e da qualidade do produto (Embrapa, 2020; CEAGESP, 2021). Danos mecânicos, resultantes do manuseio e do transporte, são apontados como os principais responsáveis pelas perdas em hortaliças sensíveis, como o tomate, devido à sua baixa resistência a impactos (FAO, 2019). Temperaturas inadequadas durante transporte e armazenamento podem também acelerar a sua decomposição. Essas condições contribuem para o descarte do produto antes de chegar ao consumidor final (CEAGESP, 2021). Como consequência, um grande volume de tomates é perdido ao longo da cadeia produtiva, reduzindo a oferta efetiva para consumo e impactando diretamente a sustentabilidade econômica e ambiental da produção (FAO, 2019; Instituto Escolhas, 2022). Segundo a FAO (2011), há uma perda entre 30 à 45% da produção ao longo da cadeia produtiva. No trabalho de Dos Santos (2020), foram estimados 1,3 bilhão de toneladas de alimentos perdidos anualmente, com o tomate sendo um dos mais afetados pelas perdas durante o processamento e danos microbiológicos.

O tomate é amplamente reconhecido como uma das principais fontes de compostos bioativos na dieta humana, sendo considerado um alimento funcional de grande relevância nutricional e tecnológica. Entre os fitoquímicos presentes destacam-se os carotenoides, com

ênfase para o licopeno, pigmento natural responsável pela coloração vermelha característica dos frutos maduros e sendo o carotenoide majoritário encontrado no tomate (Ali *et al*, 2021; Victoria-Campos *et al*, 2023). O licopeno apresenta elevada capacidade antioxidante, atuando como sequestrador de EROs e protegendo as células contra o estresse oxidativo associado ao envelhecimento e a diversas doenças crônicas (Vasconcelos, 2021; Zhou *et al*, 2024).

Nos últimos anos, a valorização dos resíduos agroindustriais do tomate, como cascas, sementes e polpa, tem recebido atenção crescente, tanto por motivos ambientais quanto econômicos (Figura 1). Tais resíduos, frequentemente descartados durante o processamento industrial de molhos, sucos e extratos, ainda retêm altas concentrações de licopeno e outros compostos fenólicos (Kumar *et al*, 2022; Silva *et al*, 2023; Ahmad *et al*, 2024).



Figura 1: Esquema ilustrativo mostrando o aumento na produção de tomate e as elevadas perdas pós-colheita, que resultam em resíduos ricos em bioativos, como carotenóides e compostos fenólicos.

2.2 LICOPENO

O licopeno é um carotenoide acíclico ($C_{40}H_{56}$), altamente insaturado, responsável pela coloração vermelha de tomates e derivados, além de estar presente em melancia, goiaba e outros frutos (Wei *et al*, 2023). Sua principal relevância biológica está associada ao forte potencial antioxidante, neutralizando EROs e Espécies Reativas de Nitrogênio (ERNs) (Vasconcelos, 2021). Estudos apontam que o licopeno é um dos carotenóides mais eficientes na desativação do oxigênio *singlete*, superando β -caroteno e α -tocoferol em atividade

antioxidante (Canene-Adams *et al*, 2005). Também possui propriedades anti-inflamatórias (Biswas *et al*, 2013), hipoglicêmicas (Park *et al*, 2016), fotoprotetoras (Offord *et al*, 2002), antiangiogênicas (Chen *et al*, 2012), antiparasitárias (Varela *et al*, 2022), antivirais (Khalil *et al*, 2021), além de promover melhora em doenças cutâneas (Zh *et al*, 2024) (Figura 2). Tais efeitos repercutem indiretamente na integridade da barreira cutânea e na tolerância imunológica (Sarker *et al*, 2021; Rajput *et al*, 2021; Zago *et al*, 2021).

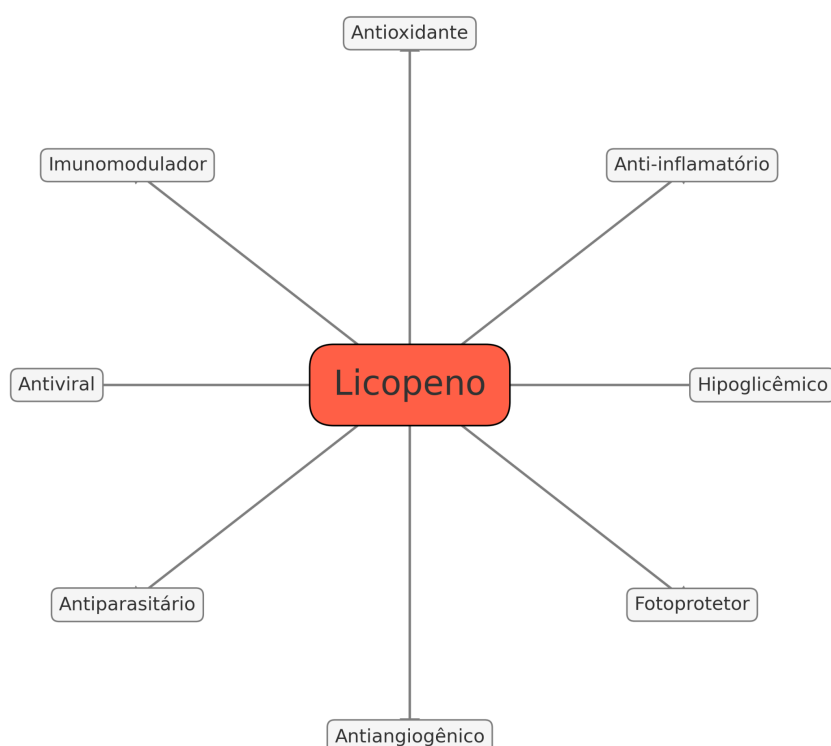


Figura 2: Principais propriedades do Licopeno.

O licopeno tem uma alta capacidade de neutralizar radicais livres e de proteger biomoléculas como lipídeos, proteínas e DNA contra danos oxidativos (Guerra *et al*, 2021). Essa estrutura conjugada é responsável não apenas pela coloração vermelha do pigmento, mas também por sua instabilidade frente à luz, ao calor e ao oxigênio (Li *et al*, 2023). Durante o processamento térmico e o armazenamento, o licopeno pode sofrer isomerização da forma *trans* para *cis*, fenômeno que, embora reduza parcialmente sua estabilidade química, aumenta a biodisponibilidade devido à maior solubilidade em lipídeos e facilidade de incorporação em micelas intestinais (Liang *et al*, 2019). O licopeno na configuração *trans* representa a forma termodinamicamente mais estável e é a mais abundante nos tomates, entretanto, suas numerosas duplas ligações conjugadas podem sofrer isomerização para formas *cis*, tanto

mono- quanto poli-*cis*, em resposta à exposição à luz e/ou ao calor (Honda *et al*, 2019; Guerra *et al*, 2021) (Figura 3). Assim como outros carotenoides, como o β -caroteno, o licopeno apresenta elevada sensibilidade à radiação luminosa, à temperatura e ao oxigênio, fatores que favorecem a conversão de isômeros *trans* em *cis*. Estudos relatam que tratamentos térmicos prolongados (superiores a uma hora) aumentam a proporção de isômeros *cis*, enquanto a incidência de luz promove a degradação progressiva dessas formas durante o armazenamento de derivados de tomate (Honda *et al*, 2018; Liang *et al*, 2019; Guerra *et al*, 2021).

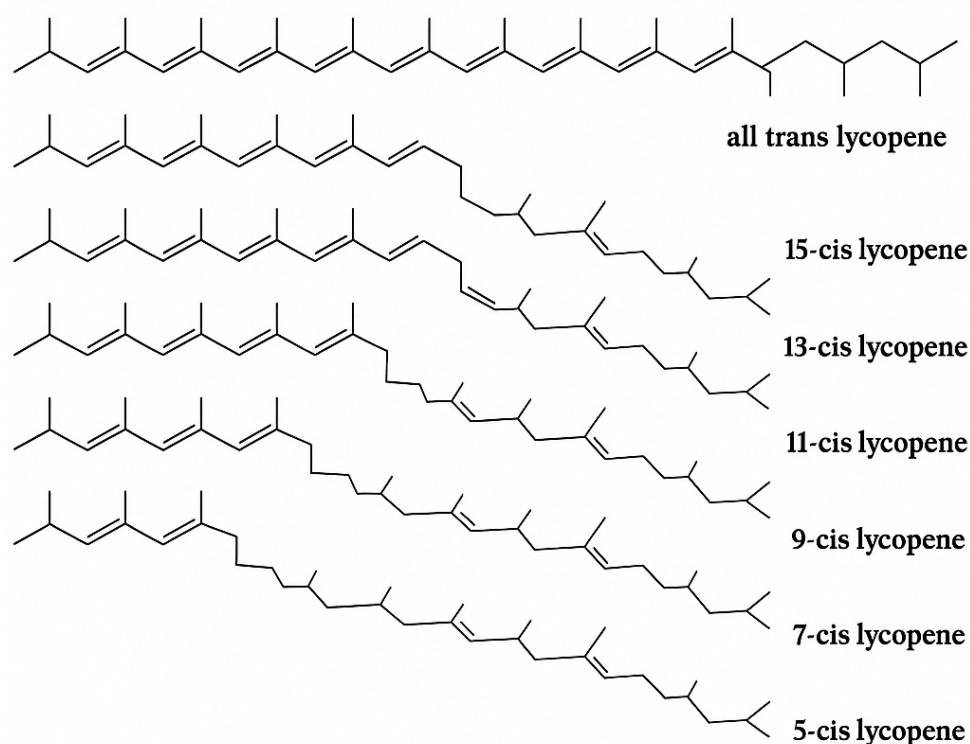


Figura 3: Representação dos isômeros geométricos *trans*-licopeno e *cis*-licopeno. Fonte: Ghatak *et al*, (2017), com adaptações.

O efeito antioxidante do licopeno pode ocorrer por diferentes mecanismos. Ele pode absorver a energia do oxigênio *singlete* e liberá-la sob forma de calor, sem degradação da molécula; pode reagir diretamente com radicais livres, levando à oxidação do licopeno; e pode regenerar outros antioxidantes, atuando em conjunto com compostos fenólicos, promovendo um efeito sinérgico, aumentando a proteção celular (Di Mascio *et al*, 1989; Shi *et al*, 2007). Os carotenóides participam ativamente do equilíbrio redox celular, neutralizando EROs, reduzindo a peroxidação lipídica e potencializando a atividade de enzimas endógenas, como superóxido dismutase e glutathione peroxidase. Essa função é especialmente relevante para as

camadas epidérmica e dérmica, que estão constantemente sujeitas a fatores ambientais oxidativos (Stahl & Sies, 2003; Chen *et al*, 2013). Ao doar elétrons para neutralizar os radicais livres, os carotenoides diminuem a lesão oxidativa celular e previnem quebras na fita de DNA, disfunção mitocondrial e consequentemente a mutagênese (Palozza *et al*, 2010). Dessa forma, o licopeno age neutralizando radicais livres de forma direta e, indiretamente, potencializando o metabolismo celular às agressões oxidativas. A presença de isômeros *cis*, mais biodisponíveis, também favorece maior eficiência antioxidante, uma vez que alcançam concentrações mais elevadas no plasma e tecidos (Palozza *et al*, 2012).

É importante ressaltar que os alimentos ricos em licopeno constituem sistemas dinâmicos, nos quais a quantidade relativa de isômeros *cis* cresce durante o processamento, mas pode diminuir posteriormente, devido à retroisomerização durante a estocagem (Guerra *et al*, 2021). Embora na natureza o licopeno esteja presente majoritariamente no estado totalmente *trans*, evidências sugerem que a biodisponibilidade das formas *cis* é superior, graças à sua maior solubilidade em micelas mistas (Shafe *et al*, 2024).

Diversos estudos relatam que o teor e o perfil isomérico do licopeno variam conforme a variedade do tomate, estágio de maturação, condições climáticas e métodos de cultivo/processamento (Cooperstone *et al*, 2015; Sinkora *et al*, 2024). Tomates maduros e de coloração mais intensa apresentam maior concentração de licopeno, especialmente nas cascas e polpas externas, onde o pigmento se encontra fortemente associado às membranas cromoplásticas (Liang *et al*, 2019; Honda *et al*, 2019). Assim, o aproveitamento da casca de tomate, frequentemente descartada pela indústria, representa uma alternativa estratégica e sustentável para a extração e recuperação de licopeno de alta pureza (Ahmad *et al*, 2024).

Fatores que podem influenciar a propriedade antioxidante do licopeno incluem a matriz alimentar, pois produtos processados de tomate apresentam maior biodisponibilidade e efeito antioxidante do que o fruto cru; lipídeos associados, já que a presença de gorduras facilita a micelização e absorção do licopeno; e a encapsulação deste carotenoide, pois promove o aumento da estabilidade contra oxidação e maior eficiência antioxidante em sistemas biológicos (Zhao *et al*, 2018; Liang *et al*, 2019; Honda *et al*, 2019; Guerra *et al*, 2021). A incorporação do licopeno em nanomateriais altera suas propriedades físico-químicas e funcionais, especialmente devido ao reduzido tamanho das gotículas, o que favorece maior dispersão em meios aquosos, além de aprimorar sua estabilidade e biodisponibilidade (Guerra

et al, 2021).

2.3 ÓLEOS E MANTEIGAS VEGETAIS

Os óleos vegetais são misturas complexas de lipídeos extraídos de sementes, frutos ou outras partes de plantas oleaginosas, constituídos majoritariamente por triacilglicerídeos, isto é, ésteres formados pela ligação de glicerol a ácidos graxos de diferentes tamanhos e graus de insaturação (Gharby, 2022). Sua composição pode incluir ainda fosfolipídeos, tocoferóis, carotenóides, fitoesteróis e outros compostos bioativos que lhes conferem uma composição química única, com propriedades biológicas, nutricionais e físico-químicas de interesse para aplicação em diversos setores industriais, (Tian *et al*, 2023). Dependendo da origem botânica, o perfil de ácidos graxos varia consideravelmente, o que impacta diretamente em suas propriedades físico-químicas, estabilidade oxidativa e aplicações industriais (Correa *et al*, 2024).

Os óleos vegetais são geralmente classificados segundo o grau de insaturação de seus ácidos graxos, sendo que quanto maior o número de duplas ligações, menor é o ponto de fusão e maior a suscetibilidade à oxidação lipídica (Fadda *et al*, 2022). Assim, óleos ricos em ácidos graxos poli-insaturados (como linoleico e linolênico) apresentam boa fluidez e leveza, mas menor estabilidade térmica; enquanto aqueles ricos em saturados (como ácido palmítico ou esteárico) são mais estáveis e tendem a solidificar em temperaturas mais baixas (Fasina *et al*, 2008; Shahidi & Zhong, 2010).

As manteigas vegetais são lipídeos semi sólidos obtidos a partir das sementes, amêndoas ou frutos de diversas espécies oleaginosas, especialmente de regiões tropicais. Diferentemente dos óleos vegetais, que permanecem líquidos em temperatura ambiente devido ao elevado grau de insaturação, as manteigas vegetais apresentam estrutura sólida ou pastosa, resultado de um alto conteúdo de ácidos graxos saturados e monoinsaturados, que promovem maior ponto de fusão e comportamento mais cristalino (Lozano-Garzón *et al*, 2023). Quimicamente, as manteigas vegetais são formadas predominantemente por triacilgliceróis, com perfis lipídicos que variam de acordo com a espécie. Em geral, apresentam elevados teores de ácidos láurico, mirístico, palmítico e esteárico, responsáveis pela consistência sólida característica. Essa composição contrasta com a dos óleos ricos em poli-insaturados e favorece propriedades como estabilidade oxidativa, comportamento termoplástico e formação de redes cristalinas, importantes para desempenho sensorial e

funcional (Pereira *et al*, 2020; Queiroz & Muehlmann, 2024).

Essas características dos óleos e manteigas vegetais os tornam componentes essenciais em formulações alimentícias, farmacêuticas, cosméticas e em tecnologias lipídicas nanoestruturadas (Tabela 1).

Tabela 1: Diferenças entre óleos e manteigas vegetais quanto à composição lipídica, grau de saturação e comportamento físico-químico.

Óleos (líquidos)	Manteigas (sólidas)
Alto teor de ácidos graxos insaturados	Alto teor de ácidos graxos saturados
Maior fluidez	Alta cristalinidade
Mais suscetíveis à oxidação	Mais estáveis
Menor ponto de fusão	Maior ponto de fusão

Do ponto de vista funcional e biológico, os óleos vegetais são fontes importantes de ácidos graxos essenciais, como o linoleico (ômega-6) e o α -linolênico (ômega-3), que não são sintetizados pelo organismo humano e participam da manutenção da integridade das membranas celulares, da modulação inflamatória e da função cardiovascular (Gunstone, 2011; Tian *et al*, 2023). Além disso, a presença de compostos antioxidantes naturais, como tocoferóis (vitamina E) e carotenóides, auxilia na proteção contra a oxidação lipídica, prolongando a vida de prateleira dos produtos e contribuindo para efeitos benéficos à saúde e à pele (Bohn *et al*, 2024; Liu *et al*, 2025). Já as manteigas vegetais são amplamente valorizadas por sua ação emoliente, hidratante e restauradora da barreira lipídica da pele. Os triacilglicerídeos com radicais acil graxos saturados promovem a formação de um filme protetor sobre a epiderme, reduzindo a perda transepidérmica de água, aumentando a maciez e recuperando a elasticidade cutânea (Reatgui, 2021). Além disso, muitas manteigas contêm outros compostos bioativos, assim como os óleos, que atuam como antioxidantes naturais capazes de neutralizar radicais livres e proteger contra danos ambientais (Feitosa *et al*, 2021; Lozano-Garzón *et al*, 2023).

As propriedades físico-químicas dos óleos vegetais, como índice de acidez, peróxidos,

densidade, viscosidade e tensão superficial, são determinantes para sua estabilidade e comportamento em formulações, especialmente em sistemas dispersos como nanoemulsões, microemulsões e nanopartículas lipídicas (Sahasrabudhe *et al*, 2017; Miadonye *et al*, 2023). A polaridade moderada desses óleos os torna solventes ideais para compostos bioativos lipofílicos (licopeno, curcumina e coenzima Q10), facilitando sua incorporação e liberação controlada em matrizes biológicas (Salvia-Trujillo *et al*, 2018; Choi & McClements, 2020; Zhao *et al*, 2020; Maciejewska-Stupska *et al*, 2024).

Os óleos e manteigas vegetais destacam-se por sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e origem renovável, tornando-se alternativas sustentáveis a solventes e lipídeos sintéticos em cosméticos, fármacos e alimentos funcionais, além de proporcionar formulações sustentáveis (Yara-Varón *et al*, 2017). No campo da nanotecnologia, os óleos servem como matriz lipídica líquida em CLNs e como fase oleosa em nanoemulsões, atuando tanto na solubilização quanto na estabilização de moléculas sensíveis à oxidação e luz (Khan, 2019; Masiero *et al*, 2021). Assim, os óleos vegetais combinam funções estruturais, funcionais e bioativas, sendo essenciais para o desenvolvimento de produtos naturais e sustentáveis. As manteigas destacam-se como lipídeos sólidos para a construção dessas nanoestruturas. Sua estrutura cristalina promove rigidez, proteção do ativo, menor mobilidade molecular e, em muitos casos, liberação controlada de compostos bioativos lipofílicos (Queiroz & Muehlmann, 2024). Em CLNs, a combinação de manteigas com óleos líquidos melhora a eficiência de encapsulamento e reduz o fenômeno de expulsão do ativo durante a cristalização lipídica (Tang & Dong, 2023; Queiroz & Muehlmann, 2024).

2.3.1 ÓLEO DE CANOLA

Entre os diversos óleos vegetais utilizados em formulações alimentícias, cosméticas e farmacêuticas, o óleo de canola destaca-se por seu perfil lipídico equilibrado, elevado teor de compostos bioativos e origem sustentável. Derivado das sementes de cultivares melhoradas da *Brassica napus* L. e *Brassica rapa*, o termo “canola” (Canadian Oil Low Acid) refere-se a variedades de colza geneticamente selecionadas com baixos teores de ácido erúico (<2%) e glicosinolatos (<30 µmol/g), tornando-o seguro para consumo humano e amplamente aceito industrialmente (Daun *et al*, 2015; Gunstone, 2022).

O óleo de canola é composto predominantemente por triacilgliceróis formados a partir de ácidos graxos de cadeia longa, sendo o ácido oleico o componente majoritário, seguido

pelos ácidos linoleico e α -linolênico. O conteúdo de ácidos graxos saturados é relativamente baixo ($< 7\%$), predominando o ácido palmítico e o esteárico (Golodnizky *et al*, 2025). Essa composição confere ao óleo de canola um perfil nutricional favorável, com excelente relação entre ácidos graxos poli-insaturados e saturados, aspecto importante para a função inflamatória (Ghobadi *et al*, 2019). Além dos triacilgliceróis, o óleo de canola contém fitosteróis, tocoferóis, carotenóides e fenóis, os quais contribuem para sua estabilidade oxidativa e atividade antioxidante (Tileuberdi *et al*, 2022; Ahmad *et al*, 2024). Esses compostos atuam como sequestradores de radicais livres, retardando a peroxidação lipídica e conferindo maior vida de prateleira em relação a outros óleos poli-insaturados (Culina *et al*, 2025). O perfil físico-químico do óleo de canola também favorece seu uso em sistemas dispersos e nanoestruturados uma vez que apresenta baixa viscosidade, ponto de fusão reduzido ($-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$), indicando alto grau de insaturação e boa fluidez em ampla faixa de temperaturas (Roiaini *et al*, 2015; Silva-Paz *et al*, 2025). Essa característica o torna adequado como fase lipídica líquida em nanoemulsões, NLS e CLNs, sendo que em tais sistemas o óleo de canola contribui para solubilizar compostos lipofílicos, modular a cristalização da fase sólida e aumentar a eficiência de encapsulamento (EE%), especialmente de moléculas antioxidantes sensíveis, como licopeno (Zhao *et al*, 2020; Queiroz & Muehlmann, 2024; Lüdtkke *et al*, 2025). Essas propriedades justificam sua incorporação em alimentos funcionais, suplementos nutracêuticos e cosméticos antioxidantes, alinhando-se à tendência global de desenvolvimento de produtos naturais e com tecnologia verde.

Sob o ponto de vista sustentável e tecnológico, o óleo de canola é amplamente considerado uma matriz lipídica ecológica. Por ser biodegradável, não tóxico e de ampla disponibilidade agrícola, ele tem substituído lipídeos sintéticos em formulações ecocompatíveis e livres de solventes orgânicos, principalmente quando associado a processos de emulsificação de baixa energia, como o método de temperatura de inversão de fase (PIT) (Liu *et al*, 2019; Javed *et al*, 2022). Em carreadores lipídicos nanoestruturados, sua inclusão como fase líquida reduz o grau de cristalinidade da matriz sólida, aumentando a flexibilidade estrutural das nanopartículas e favorecendo a liberação controlada do bioativo (Khalid *et al*, 2023; Queiroz & Muehlmann, 2024).

Apesar de suas vantagens, o alto teor de insaturações torna o óleo de canola suscetível à oxidação térmica e foto-oxidação, principalmente durante armazenamento prolongado ou exposição à luz (Kato *et al*, 2018; Golodnizky *et al*, 2025). Assim, o uso de antioxidantes

naturais e condições de estocagem adequadas são essenciais para manter sua integridade química e sensorial (Shang *et al*, 2018; Zaunschirm *et al*, 2018).

2.3.2 MANTEIGA DE MURUMURU

A manteiga de murumuru é obtida a partir das sementes da palmeira amazônica *Astrocaryum murumuru*, amplamente distribuída na região Norte do Brasil. A extração da gordura dessa semente gera uma manteiga vegetal sólida (à temperatura ambiente), rica em triacilglicerídeos, que tem ganhado destaque na cosmética, farmacêutica e tecnologias de liberação de ativos, além de apresentar características funcionais interessantes para formulações sustentáveis (Reatgui, 2021). Esse ciclo extrativista envolve de maneira expressiva comunidades tradicionais e indígenas que realizam o manejo, a coleta do fruto, o beneficiamento da amêndoa e a comercialização da manteiga, promovendo geração de renda local, valorização de conhecimentos tradicionais e conservação da biodiversidade (Silva, 2022; Silva 2024). Assim, o uso do murumuru como matéria-prima está de acordo com o conceito de matriz lipídica natural e renovável, considerando que a palmeira é nativa, a coleta se dá em florestas naturais e o produto gera valor agregado para cadeias locais, em consonância com estratégias de bioeconomia amazônica.

Essa manteiga se caracteriza por elevados teores de ácidos graxos saturados de cadeia média e longa, como o ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, esteárico e oleico (EMBRAPA, 2022). Essa manteiga apresenta ponto de fusão relativamente elevado, $\sim 32^{\circ}\text{C}$, em comparação a outros lipídeos vegetais de cadeia média, o que favorece a estabilidade em formulações e a consistência desejável em cosméticos e sistemas lipídicos (EMBRAPA, 2022). Além disso, a baixa insaturação indica menor propensão imediata à oxidação em relação a óleos muito poli-insaturados (Feitosa *et al*, 2021; Sousa *et al*, 2024). Ela exerce função emoliente e hidratante ao aplicar na pele contribuindo para a restauração da barreira lipídica, retenção de umidade, melhoria da elasticidade e proteção contra agressões externas (Reatgui, 2021). Além disso, possui compostos antioxidantes (como vitamina A e E) e fitoativos que podem exercer ação protetora contra radicais livres, contribuindo para a saúde da pele (Lozano-Garzón *et al*, 2023). No trabalho de Reatgui (2021), foram desenvolvidas NLS a base de manteiga de murumuru para carrear metronidazol e curcumina, apresentando eficiência contra o crescimento microbiano e um perfil de liberação controlada dos ativos.

Apesar das vantagens ambientais e sociais, a manteiga de murumuru enfrenta desafios

técnicos e estruturais. Em termos de formulação, sua consistência sólida, em função do alto teor de ácidos graxos saturados, exige que, ao ser incorporada em sistemas lipídicos, seja derretida ou misturada com lipídeos líquidos ou compatibilizantes para garantir dispersão homogênea e estabilidade da fase lipídica (Lozano-Garzón *et al*, 2023). Além disso, essa predominância de lipídeos saturados pode limitar a fluidez em determinadas formulações (Pereira *et al*, 2019; Queiroz & Muehlmann, 2024).

2.4 CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS (CLNs)

Os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) representam a segunda geração dos sistemas nanoestruturados à base de lipídeos, desenvolvidos para superar limitações clássicas das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), como expulsão do ativo durante a cristalização e baixa capacidade de encapsulamento. Estes sistemas combinam, em sua matriz, lipídeos sólidos e líquidos, formando uma estrutura menos ordenada, com imperfeições cristalinas que aumentam a EE%, a estabilidade e a capacidade de carregar compostos altamente lipofílicos (Viegas *et al*, 2023; Queiroz & Muehlmann, 2024) (Figura 4). Do ponto de vista estrutural, os CLNs apresentam uma matriz parcialmente cristalina que permite o aprisionamento de moléculas bioativas. A presença de lipídeos líquidos provoca distorções na rede cristalina, reduzindo a expulsão do ativo durante o armazenamento e aumentando seu tempo de retenção. Isso confere aos carreadores lipídicos características superiores de estabilidade físico-química, com distribuição de tamanho geralmente até 300 nm, baixa polidispersidade e potencial Zeta adequado para interações biológicas (Queiroz & Muehlmann, 2024).

Os CLNs oferecem uma série de vantagens tecnológicas, tais como alta capacidade de encapsulamento de compostos lipofílicos; proteção contra oxidação; degradação térmica e fotoisomerização; liberação controlada ou sustentada, dependendo da organização cristalina; baixa toxicidade, por serem produzidos majoritariamente com lipídeos biocompatíveis; possibilidade de incorporação de lipídeos naturais, incluindo óleos e manteigas vegetais, alinhando-se à nanotecnologia verde (Viegas *et al*, 2023; Queiroz & Muehlmann, 2024; Schuh *et al*, 2024).

Os CLNs possuem matriz parcialmente cristalina, mas ainda sujeita a polimorfismo lipídico, ou seja, mudanças das formas cristalinas ao longo do tempo. Isso pode resultar em expulsão do ativo durante o armazenamento, aumento do tamanho de partícula e diminuição da EE%. Dependendo da proporção entre lipídeo sólido e líquido, ainda podem ocorrer

processos de instabilidade da nanoformulação como gelificação e separação de fases, comum quando o lipídeo líquido interfere excessivamente na cristalização do sólido (Patel *et al*, 2024; Queiroz & Muehlmann, 2024).

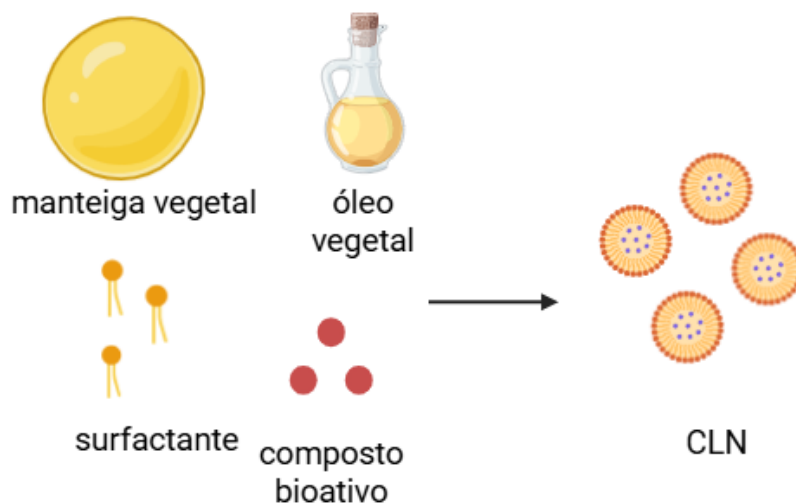


Figura 4: Esquema representando a formação de um Carreador Lipídico Nanoestruturado (CLN), composto por fase lipídica sólida (manteiga vegetal), fase lipídica líquida (óleo vegetal), surfactante e ativo incorporado após emulsificação.

A combinação do método PIT com lipídeos vegetais naturais, como óleo de canola e manteiga de murumuru, caracteriza o sistema desenvolvido como uma estratégia de nanotecnologia verde. O método PIT evita o uso de solventes orgânicos tóxicos, requer baixo consumo energético e promove formação de nanodispersões pela redução espontânea da tensão interfacial em temperaturas específicas. Além disso, o uso de lipídeos renováveis e biodegradáveis reduz o impacto ambiental, valoriza recursos naturais e permite o encapsulamento de compostos bioativos diretamente na matriz oleosa extraída de resíduos agroindustriais.

2.5 MÉTODO PIT (TEMPERATURA DE INVERSÃO DE FASE)

O método PIT, ou método da Temperatura de Inversão de Fase, é uma técnica de emulsificação de baixa energia amplamente utilizada na produção de nanoemulsões e nanocarreadores lipídicos. Ele se baseia nas mudanças de afinidade entre a fase aquosa e oleosa de surfactantes não iônicos em função da temperatura, permitindo formar gotas ultrafinas sem a necessidade de equipamentos de alta pressão ou solventes orgânicos, o que o

caracteriza como uma abordagem central da nanotecnologia verde (Reatgui, 2021; Mello *et al*, 2022; Queiroz & Muehlmann, 2024) (Figura 5).

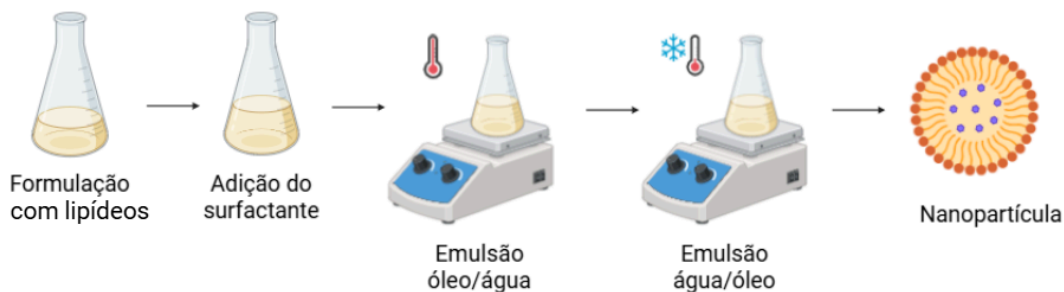


Figura 5: Representação esquemática do processo de obtenção de nanopartículas lipídicas pelo método PIT (Inversão de fase por temperatura). A formulação inicial contendo lipídeos é preparada antes da adição do surfactante. Após o aquecimento, ocorre a inversão de fases da emulsão óleo/água para água/óleo. O resfriamento rápido estabiliza o sistema, resultando na formação das nanopartículas.

Esse método depende das propriedades termossensíveis de tensoativos não iônicos, onde a hidrofobicidade aumenta com a temperatura devido à desidratação dos grupos etoxilados (Shinoda & Saito; 1969). Esse fenômeno altera a curvatura interfacial da gota, levando a uma reorganização progressiva das fases dependentes da temperatura. Em baixas temperaturas, o surfactante é mais hidrofílico, favorecendo a formação de emulsões O/A (óleo em água). Em temperaturas intermediárias, ocorre equilíbrio entre afinidade hidrofílica e lipofílica, onde forma-se uma fase altamente instável, com mínima tensão interfacial. Em temperaturas elevadas, o surfactante torna-se mais lipofílico, favorecendo a formação de emulsões A/O (água em óleo). O ponto no qual há equilíbrio entre essas forças, gerando curvatura espontânea zero, é chamado PIT. Quando a mistura é aquecida até esse ponto e, em seguida, resfriada rapidamente, ocorre a formação de nano-gotas, cuja distribuição depende diretamente da velocidade de troca de curvatura e da cinética de resfriamento (Forgiarini *et al*, 2004; Lemahieu *et al*, 2019).

O método PIT destaca-se como uma abordagem eficiente dentro da nanotecnologia verde, principalmente por ser um processo livre de solventes orgânicos tóxicos, de baixo consumo energético e altamente compatível com lipídeos vegetais renováveis (Sharma *et al*, 2021). Entre as principais vantagens deste método encontram-se a baixa demanda energética, em comparação a processos de alta pressão; eliminação de solventes orgânicos, tornando a formulação mais segura e limpa; compatibilidade com lipídeos naturais; e potencial de

escalonamento industrial, dada a simplicidade e reprodutibilidade do processo (Pérez-Sánchez *et al*, 2020; Queiroz & Muehlmann, 2024). Por outro lado, o método apresenta algumas limitações, sendo que a principal delas é a necessidade de controle preciso da temperatura, já que o PIT depende diretamente do ponto em que o surfactante apresenta balanço hidrofílico-lipofílico neutro. Além disso, surfactantes que não respondem à temperatura não podem ser utilizados nesse processo. Em formulações contendo lipídeos sólidos, a cristalização pode dificultar a inversão de fase, exigindo ajustes de proporção entre lipídeos sólidos e líquidos. Outro desafio surge quando o resfriamento após o PIT não é suficientemente rápido, o que pode comprometer a estabilidade da nanoemulsão (Koroleva *et al*, 2012; Lin *et al*, 2023).

2.6 NANOTECNOLOGIA VERDE

A nanotecnologia verde configura-se como uma abordagem interdisciplinar nas ciências biológicas e dos materiais, voltada ao desenvolvimento de nanossistemas seguros, sustentáveis e ambientalmente responsáveis, considerando todo o ciclo de vida dos materiais, desde a escolha das matérias-primas até as etapas de produção, aplicação e descarte. Essa abordagem incorpora princípios da química verde, da bioeconomia e do design sustentável, priorizando a substituição de insumos tóxicos, a redução do consumo energético, a minimização da geração de resíduos e o uso de fontes renováveis (Khan *et al.*, 2023; Irshad *et al.*, 2025). Inserida no contexto da economia circular, a nanotecnologia verde valoriza resíduos agroindustriais — como cascas, sementes e bagaços — como fontes renováveis de lipídeos e compostos bioativos, promovendo estratégias de reaproveitamento com menor impacto ambiental (Capanoglu *et al.*, 2022; Vucurovic *et al.*, 2024; de Oliveira *et al.*, 2025). Além do desempenho técnico, expresso por propriedades como eficiência de emulsificação e estabilidade coloidal, essa abordagem busca alinhar inovação tecnológica e sustentabilidade, favorecendo processos mais limpos e matérias-primas renováveis (Stubbs *et al.*, 2022).

No contexto das formulações lipídicas nanoestruturadas, a nanotecnologia verde vem se consolidando como um campo promissor pela capacidade de utilizar lipídeos naturais, biodegradáveis e de baixo impacto ambiental, como óleos vegetais, manteigas e ceras de origem vegetal, em substituição aos lipídeos sintéticos tradicionalmente utilizados em NLS e CLNs. Esses lipídeos naturais, como óleo de canola e manteiga de murumuru, conferem ao nanossistema uma matriz ecocompatível, reduzindo riscos toxicológicos e contribuindo para

formulações mais seguras e alinhadas aos princípios de sustentabilidade (Pérez-Sánchez *et al*, 2020; Feitosa *et al*, 2021).

Os tensoativos desempenham um papel essencial no desenvolvimento de nanodispersões lipídicas, atuando como agentes estabilizantes e estruturantes em diferentes tipos de nanossistemas, como nanoemulsões, microemulsões e CLNs (Miyazawa *et al*, 2021; Queiroz & Muehlmann, 2024). Dentro dessa perspectiva sustentável, a escolha de tensoativos de origem natural, biodegradáveis e biocompatíveis tem se tornado uma prioridade, uma vez que esses componentes podem substituir tensoativos sintéticos e reduzir significativamente o impacto ambiental das formulações.

Os métodos de produção adotados na nanotecnologia verde também seguem princípios sustentáveis. Técnicas como emulsificação de baixa energia, especialmente o método de inversão de fase por temperatura (PIT) e o método EPI (inversão de fase de emulsão), têm ganhado destaque por dispensarem solventes orgânicos e reduzirem o consumo energético durante a produção das nanopartículas (Reatgui, 2021; Sharma *et al*, 2021). Essas metodologias são particularmente eficientes quando combinadas com lipídeos naturais, que apresentam maior compatibilidade com surfactantes não iônicos e menor necessidade de etapas agressivas de purificação (Pérez-Sánchez *et al*, 2020). Assim, a nanotecnologia verde permite não apenas o desenvolvimento de nanossistemas mais seguros, mas também a redução do impacto ambiental da própria cadeia produtiva.

Entre os tensoativos não iônicos mais utilizados nesse contexto, destaca-se o Brij O10, com alto equilíbrio hidrofílico-lipofílico (HLB ~ 12). Esse valor de HLB o torna adequado para a formação de sistemas óleo-em-água (O/A), favorecendo a dispersão estável de compostos lipofílicos em matrizes aquosas, refletindo uma convergência entre eficiência tecnológica e sustentabilidade, reduzindo a tensão interfacial, prevenindo a coalescência das gotículas (Boscán *et al*, 2018; Mello *et al*, 2025) e em conjunto com lipídeos vegetais, o Brij O10 atua tanto na formação da barreira física do nanocarreador quanto na modulação da liberação controlada de bioativos (Pink *et al*, 2021). Por ser um surfactante não iônico, o Brij O10 apresenta baixa toxicidade, boa compatibilidade com outros ingredientes e reduzida sensibilidade a variações de pH e eletrólitos, características desejáveis em formulações farmacêuticas, cosméticas e alimentícias (Gagliardi *et al*, 2021; Sazdanić *et al*, 2023). O Brij é um álcool graxo etoxilado com estrutura simples e linear, o que faz com que ele responda

muito bem ao aumento de temperatura, permitindo que a inversão de fase aconteça (Shinoda & Saito, 1969). Essa característica favorece a formação de partículas menores, mais homogêneas e com menor polidispersidade (Rissi *et al*, 2014; Mello *et al*, 2025).

No caso dos Tween, apesar de também serem surfactantes não iônicos, a estrutura é mais complexa e volumosa, o que dificulta a desidratação dos grupos etoxilados e resulta em um PIT menos definido e com maior variação de tamanho de partícula (Attwood, 2012). Já os Span não apresentam grupos etoxilados, então eles não funcionam sozinhos no método PIT e sua atuação só ocorre como co-surfactantes quando associados a surfactantes etoxilados (Ly *et al*, 2017). Além disso, o Brij apresenta maior estabilidade oxidativa em comparação ao Tween, que é conhecido por sofrer oxidação, principalmente o Tween 80 (Weber *et al*, 2023). Tais características tornam o Brij O10 um agente de escolha para a produção de CLNs contendo lipídeos naturais, como manteiga de murumuru ou óleo de canola, resultando em sistemas de alto desempenho e baixo impacto ambiental (Mello *et al*, 2022).

Um aspecto relevante é o potencial biológico das nanopartículas lipídicas verdes. Lipídeos vegetais são naturalmente ricos em fitoesteróis, tocoferóis, compostos fenólicos e carotenóides que atuam não apenas como excipientes sustentáveis, mas como coadjuvantes bioativos dentro da formulação. Dessa forma, carreadores verdes podem apresentar propriedades adicionais, como atividade antioxidante, fotoproteção, regeneração cutânea e sinergia com o ativo encapsulado (Lozano-Garzón *et al*, 2023). Essa funcionalidade o potencializa para usos como cosméticos, fármacos, nutracêuticos e alimentos funcionais.

Dessa forma, os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) produzidos pelo método de inversão de fases por temperatura (PIT) representam uma abordagem que concilia segurança, desempenho tecnológico e sustentabilidade, alinhando-se aos princípios da nanotecnologia verde. Nesse contexto, o desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo licopeno extraído de resíduos agroindustriais do tomate configura-se como uma estratégia inovadora e sustentável, que integra os princípios da nanotecnologia verde, da química verde e da economia circular. Assim, o que anteriormente seria descartado torna-se uma oportunidade tecnológica de alto valor agregado para a indústria de alimentos, ao mesmo tempo em que contribui para o avanço do conhecimento científico na área de sistemas nanoencapsulados.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver, otimizar e caracterizar carreadores lipídicos nanoestruturados contendo licopeno extraído da casca de tomate e avaliar seu potencial de aplicações farmacêuticas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter e avaliar o extrato lipídico contendo licopeno a partir da casca do tomate, analisando sua estabilidade, teor de licopeno e potencial de aplicação em sistemas nanoestruturados.
- Desenvolver carreadores lipídicos nanoestruturados contendo licopeno, avaliando sua morfologia a influência da concentração do bioativo nas propriedades físico-químicas e na estabilidade das formulações sob diferentes condições de armazenamento.
- Investigar o potencial funcional e a segurança dos carreadores lipídicos nanoestruturados contendo licopeno, por meio da avaliação de sua atividade antioxidante e de sua interação com modelos celulares.

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS

Tabela 2: Lista dos reagentes, insumos químicos, linhagens celulares e meios utilizados nos experimentos, acompanhados de seus respectivos fabricantes.

Materiais	Fabricante
Ácido ascórbico	Sigma Aldrich
Brij O10	
Clorofórmio	
DPPH	
DMSO	
Hexano	
Licopeno <i>all-trans</i>	
MTT	
NaCl	
Óleo de canola	
PBS	
Acetato de amônio	J. T. Baker
Acetona	Dinâmica
Etanol	
Acetonitrila	Merck
Metanol	
B16-F10	ATCC
HaCaT	
Diclorometano	Sharlab
DMEM	Gibco
Manteiga de murumuru	Industria Amazon oil

4.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO OLEOSO CONTENDO LICOPENO A PARTIR DAS CASCAS DE TOMATE

Os tomates foram adquiridos do CEASA - DF e lavados em água corrente. A casca do tomate foi retirada com o auxílio de um descascador e congelada até o processo de secagem por liofilização. As cascas foram liofilizadas em equipamento Liotop operando a -80 °C e 2

mBar (Modelo K105, LIOBRAS) por 24 h. Após esse período as cascas foram trituradas em liquidificador até a obtenção do pó.

A casca do tomate liofilizada foi adicionada ao óleo de canola na proporção de 2,5% de casca de tomate liofilizada (p/v), permanecendo em agitação magnética por 1 h, sob temperatura de 80 °C e velocidade de agitação de 400 rpm. O extrato, então, foi peneirado e filtrado em filtro de seringa 0,22 µm (KASVI, K18-230) com posterior armazenamento em frasco âmbar à temperatura ambiente (Figura 6). O método foi baseado no trabalho de Kehili (2019).

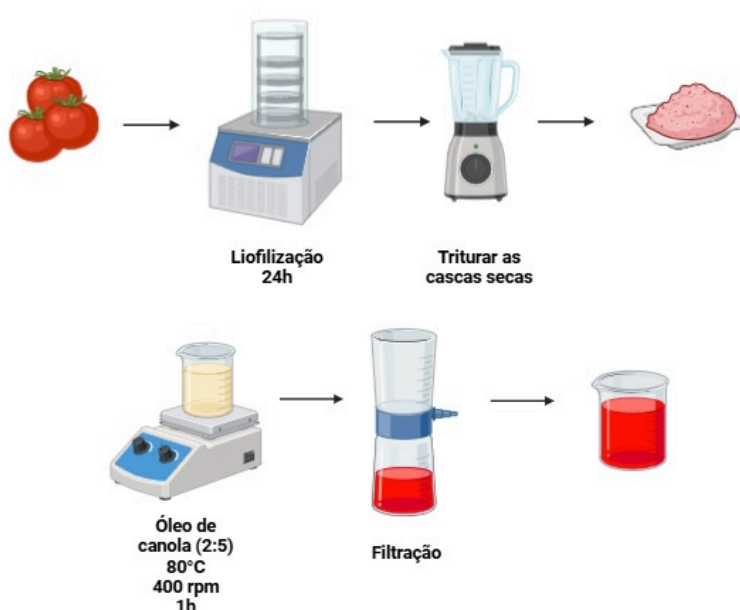


Figura 6: Fluxograma da extração de licopeno a partir de cascas de tomate: liofilização das cascas (24 h); trituração do material seco; extração em óleo de canola (razão 2,5% casca seca/óleo; 80 °C, 400 rpm, 1 h); filtração; obtenção do extrato oleoso rico em licopeno.

4.3 DESENVOLVIMENTO DOS CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS COM LICOPENO

Os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) foram preparados pela técnica de inversão de fase por temperatura (PIT), baseadas no método descrito por Mello (2022). A composição-base de cada formulação foi de 2,5 g de matriz lipídica, 3 g de Brij O10 e 30 mL de água destilada. Variaram-se as proporções internas da matriz lipídica, composta por

manteiga de murumuru e óleo de canola, com o objetivo de selecionar a razão mais adequada para a posterior incorporação do licopeno. As formulações foram identificadas de acordo com a percentagem de óleo de canola ou de extrato presente na matriz lipídica total, mantendo-se constante a massa total de lipídeos.

Tabela 3: Composição da matriz lipídica das formulações testadas. Cada formulação foi composta por 2,5g de matriz lipídica, 3 g do tensoativo Brij O10 e 30 mL de água destilada.

Composição da matriz lipídica das formulações		
Formulação (%)	Manteiga de murumuru (g)	Óleo de canola (g)
20	2,0	0,5
25	1,875	0,625
30	1,75	0,75
35	1,625	0,875
40	1,5	1,0
45	1,375	1,125
50	1,25	1,25
55	1,125	1,375
60	1	1,5
65	0,875	1,625
70	0,75	1,75
75	0,625	1,875
80	0,5	2,0

Inicialmente, constituiu-se a fase oleosa pesando-se a manteiga de murumuru, o óleo de canola e o Brij O10. A mistura foi aquecida em agitador magnético até a completa fusão da manteiga, obtendo-se uma fase homogênea. Em seguida, adicionou-se a fase aquosa (água destilada previamente aquecida a 50 °C) sob agitação contínua. O sistema foi mantido sob aquecimento até atingir o ponto de nuvem, permanecendo nessa condição por 3 min. Por fim, realizou-se o resfriamento controlado em banho-maria a 10 °C, sob agitação magnética, até temperatura ambiente de aproximadamente 25 °C (Figura 7).

Foram desenvolvidos carreadores lipídicos sem licopeno (CLN-B), com o objetivo de avaliar a estabilidade físico-química da matriz lipídica e determinar a proporção mais adequada entre os componentes da formulação. Essa etapa preliminar permitiu verificar a influência da fase lipídica, do tensoativo e da fase aquosa sobre o diâmetro hidrodinâmico (d.nm), índice de polidispersividade (PDI) e potencial Zeta permitindo identificar a faixa de estabilidade ideal antes da incorporação do composto bioativo (Cassayre *et al*, 2025).

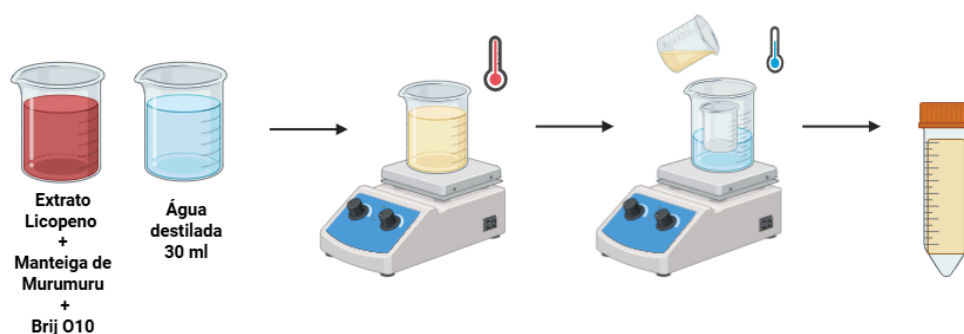


Figura 7: Preparo dos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados com licopeno (CLN-L) pelo método PIT (inversão de fase por temperatura): preparo da fase oleosa (extrato com licopeno + manteiga de murumuru + Brij O10) e da fase aquosa (água destilada, 30 mL); aquecimento da fase oleosa sob agitação até fusão e homogeneização; adição da fase aquosa sob agitação, com passagem pelo ponto de nuvem e resfriamento controlado em banho-maria frio; coleta/armazenamento da nanoformulação obtida.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS

O equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern, Worcestershire, Reino Unido) foi utilizado para caracterizar o diâmetro das gotas (d.nm), o índice de polidispersividade (PDI) e o potencial Zeta (ZP.mV) das nanoemulsões. Para as análises, 100 µL das nanoemulsões foram diluídas em 900 µL de água ultrapura. O diâmetro das gotas foi determinado usando a técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e o potencial Zeta foi medido por mobilidade eletroforética. O pH das nanoemulsões não diluídas foi verificado com um medidor de pH digital (Digimed, modelo DM-22) emergindo diretamente o eletrodo nas amostras à temperatura ambiente (25 °C). Os resultados foram expressos em média de análises em triplicata e desvio-padrão.

4.4.1 ESTUDOS DE ESTABILIDADE

Os mesmos parâmetros utilizados na caracterização das nanoemulsões (diâmetro hidrodinâmico, PDI, potencial Zeta e pH) foram analisados para avaliar sua estabilidade. Os CLNs foram armazenados em tubos Falcon por 90 dias em diferentes temperaturas: 4 °C e temperatura ambiente (~25 °C). A estabilidade foi monitorada nos dias 0, 1, 7, 15, 30, 60 e 90. Os resultados foram expressos em média de análises em triplicata e desvio-padrão. Além disso, os tubos foram fotografados para verificar possíveis separações de fases.

O teste de estabilidade acelerada por centrifugação foi conduzido com o objetivo de avaliar a resistência físico-química da nanoformulação frente às forças gravitacionais simuladas, possibilitando prever sua tendência a processos de instabilidade, como sedimentação, cremagem e coalescência, em menor intervalo de tempo. Para isso, amostras recém-preparadas foram submetidas à centrifugação, protegidas da luz devido à sensibilidade do licopeno à fotodegradação. Inicialmente, a formulação foi centrifugada a 3.000 rpm durante 30 minutos a 25 °C, etapa de triagem. Em seguida, as amostras foram submetidas a 5.000 rpm (30 minutos, 25 °C) e, finalmente, à condição de maior estresse, 10.000 rpm por 60 minutos a 25 °C. Após cada ciclo, foram realizadas inspeções visuais (presença de separação de fases ou anéis de creme/sedimento) e após a última fase foram feitas análises por DLS, registrando o diâmetro hidrodinâmico, PDI e o potencial Zeta. Como critérios de aceitação, foram adotados a ausência de separação macroscópica, por indicar a manutenção da integridade física da dispersão ao longo do armazenamento, a variação absoluta de $PDI \leq 0,05$ para assegurar a preservação de uma distribuição de tamanho relativamente homogênea, evitando processos significativos de agregação ou coalescência, e um aumento do tamanho médio de partícula limitado a $\leq 15\text{--}20\%$ em relação aos valores iniciais, com base na variabilidade esperada para sistemas lipídicos nanoestruturados durante o armazenamento, sendo esse intervalo indicativo de estabilidade coloidal adequada sem comprometimento da funcionalidade do sistema.

4.4.2 MORFOLOGIA DO CARREADOR LIPÍDICO COM LICOPENO

A avaliação da morfologia do CLN foi realizada por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) utilizando o equipamento JEOL 1011 (Tóquio, Japão), operado a uma tensão de aceleração de 100 kV. As suspensões foram diluídas 1:10 ($v : v$) com água Milli-Q® e depositadas sobre grades de cobre revestidas com filme de Formvar, e,

posteriormente, contrastadas com vapor de tetróxido de ósmio. Esperou-se 24 horas para a fixação da amostra antes da análise no MET (Mello *et al*, 2022). O microscópio foi operado em modo de campo claro com ampliação de 10.000, 15.000 e 40.000 vezes para análise morfológica. As micrografias foram realizadas no Laboratório de Microscopia e Microanálise do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (IB-UnB).

4.5 QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE LICOPENO NO EXTRATO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

A técnica de HPLC foi utilizada para determinar o conteúdo de licopeno, conforme descrito previamente (Vasconcelos, 2021), com adaptações. A análise foi realizada em um cromatógrafo líquido (Shimadzu, Japão), equipado com um sistema 34 de bombas binário (LC-20AR), um detector de arranjo de fotodiodos (DAD, SPDM20A), um autoinjeter (SIL-10AF) e um software de análise e processamento de dados LabSolutions versão 5.92. O extrato foi diluído na mistura de hexano:clorofórmio (1:1, v/v) e, em seguida, filtrado por seringa acoplada a filtro de nylon de 0,45 µm, garantindo a remoção de partículas e impurezas antes da injeção no sistema cromatográfico. A análise foi conduzida em um cromatógrafo equipado com coluna RPAQUEOUS Develosil C30 (4,6 × 150 mm; 5 µm), especialmente indicada para separação de carotenóides.

A fase móvel consistiu de uma mistura de acetonitrila, metanol, hexano, diclorometano e acetato de amônio (55:22:11,5:11,5:0,02; v/v/v/v/m), operando em modo isocrático com vazão de 1 mL/min e tempo total de corrida de 20 min. A detecção foi realizada por arranjo de fotodiodos (DAD), com varredura espectral de 190 a 800 nm a uma velocidade de 1,2 nm/s, sendo o monitoramento principal efetuado em 472 nm, comprimento de onda correspondente ao máximo de absorção do licopeno. A quantificação foi obtida por meio de curva de calibração construída com o padrão comercial de licopeno *all-trans* (Sigma-Aldrich®), em concentrações de 0,1 a 10 µg/mL, utilizando as mesmas condições cromatográficas descritas.

4.6 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO (EE%)

A eficiência de encapsulamento das nanoformulações (EE%) foi determinada pelo método indireto, adaptado de Vasconcelos (2017) e Araújo *et al* (2020). Inicialmente, 500 µL da nanoemulsão foram transferidos para tubos Falcon de 15 mL, aos quais foram adicionados

1 mL de etanol e, em seguida, 1 mL de hexano, com agitação por 1 min em vórtex após cada adição. Posteriormente, acrescentou-se 1 mL de solução saturada de NaCl fria, promovendo a separação de fases e a liberação do licopeno não encapsulado. As amostras foram submetidas a banho ultrassônico por 5 min em água fria para auxiliar a ruptura completa das nanopartículas e a difusão do composto lipofílico para a fase orgânica. Em seguida, realizou-se centrifugação a 5000 rpm por 10 min a 4 °C obtendo-se a fase hexânica superior, de coloração avermelhada, característica do licopeno. Essa fração foi cuidadosamente coletada, filtrada em seringa acoplada a filtro de PTFE (0,45 µm) e transferida para frascos âmbar contendo 500 µL de clorofórmio, em proporção 1:1 (v/v), visando estabilizar o analito e evitar degradação oxidativa e fotoquímica. Para o cálculo, foi aplicado um fator de correção igual a 4, correspondente às diluições realizadas durante o preparo das amostras.

A quantificação do composto foi realizada por HPLC, empregando a mesma fase móvel utilizada para a quantificação do extrato. A EE% foi calculada segundo a Equação:

$$\%EE = \frac{C_{obtida}}{C_{teórica}} \times 100$$

onde, C_{obtida} = concentração de licopeno determinada por HPLC após extração, e $C_{teórica}$ = concentração total de licopeno adicionada à formulação.

4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante dos CLNs e extrato foi avaliada pelo ensaio de sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), amplamente empregado para matrizes vegetais (Oliveira, 2015). Neste ensaio, a diminuição da absorbância do DPPH após a adição das amostras indica que quanto maior a redução, maior a capacidade de neutralização do radical livre. Utilizou-se ácido ascórbico (AA) como padrão de referência e o procedimento experimental seguiu, com adaptações, o protocolo descrito por Anwar (2020). Para isso, preparou-se uma solução-estoque de DPPH a 100 µM em etanol. As amostras foram previamente homogeneizadas e diluídas em suas respectivas condições experimentais. Para cada reação, foram pipetados 100 µL da amostra ou branco em poços da microplaca, seguidos pela adição de 100 µL da solução de DPPH.

Para controle do branco experimental, utilizou-se uma mistura de etanol + água na

mesma proporção usada para preparar as amostras, garantindo compatibilidade com o meio aquoso das nanoformulações. Para o controle de AA, foram utilizados 100 μL água e 100 μL da solução de DPPH. Todas as amostras foram submetidas a 4 diluições seriadas para a análise e em triplicata. A microplaca foi incubada no escuro, à temperatura ambiente, por 30 minutos para permitir o equilíbrio da reação. Após o período de incubação, a leitura foi realizada em Varioskan (marca, modelo) em comprimento de onda de 517 nm. O efeito inibitório do DPPH é calculado conforme a fórmula abaixo, sendo que quanto maior a porcentagem de radical reduzido, maior será a atividade antioxidante (Kedare *et al*, 2011):

$$\% \text{ Atividade antioxidante} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100$$

Onde A_c é a absorbância do controle e A_s é a absorbância na presença do extrato/padrão.

Para a calibração do ensaio de atividade antioxidante, utilizou-se o AA como padrão de referência devido o seu reconhecido potencial redutor e amplo emprego em métodos baseados em sequestro de radicais livres. Uma curva padrão foi construída a partir de diferentes concentrações de AA preparadas em etanol, cobrindo a faixa linear de resposta do DPPH. As soluções-padrão foram submetidas às mesmas condições experimentais aplicadas às amostras, incluindo tempo de incubação, proteção à luz e leitura espectrofotométrica a 517 nm. A quantidade de antioxidantes presentes na amostra foi calculada como equivalentes de ácido ascórbico utilizando a fórmula abaixo:

$$C_{eq} \text{ AA} = \frac{C \times V}{M} \text{ (equivalente de AA } \mu\text{L g}^{-1}\text{)}$$

Onde C é a concentração equivalente de ácido ascórbico, V é o volume da amostra e M é a massa em gramas de licopeno.

A partir dos dados de atividade antioxidante obtidos em diferentes concentrações das amostras (extrato com licopeno, CLN-L 20 e CLN-L 70), foi determinada a concentração inibitória média (IC_{50}), definida como a concentração necessária para promover 50% de sequestro do radical DPPH. Para cada amostra foram construídas curvas-resposta, relacionando a atividade antioxidante (%) (eixo y) com a concentração da amostra ($\mu\text{g/mL}$)

(eixo x). O valor de IC_{50} foi obtido por interpolação linear entre os dois pontos experimentais adjacentes que apresentavam valores de inibição imediatamente abaixo (I_1) e acima (I_2) de 50% (Molyneux, 2004). A concentração correspondente à IC_{50} foi calculada pela seguinte equação:

$$C_{IC50} = C_1 + \left(\frac{50 - I_1}{I_2 - I_1} \right) \times (C_2 - C_1)$$

C_1 e C_2 são as concentrações da amostra ($\mu\text{g/mL}$) que resultaram em atividades antioxidantes I_1 e I_2 , respectivamente; I_1 é a % de inibição imediatamente inferior a 50%; I_2 é a % de inibição imediatamente superior a 50%; e C_{IC50} é a concentração estimada da amostra ($\mu\text{g/mL}$) necessária para atingir 50% de inibição.

Para as formulações brancas, que não continham licopeno, o cálculo do IC_{50} foi realizado de forma semelhante, porém utilizando como variável independente o fator de diluição empregado no ensaio, em vez da concentração em $\mu\text{g/mL}$. O IC_{50} em termos de fração volumétrica foi determinado pela mesma equação de interpolação linear.

4.8 VIABILIDADE CELULAR

As linhagens celulares B16-F10 (melanoma murino) e HaCaT (queratinócitos humanos) foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de solução antibiótica-antimicótica (penicilina/estreptomicina), mantidas a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 . O protocolo de tratamento com a nanoformulação contendo 70% de extrato contendo licopeno (CLN-L 70) foi realizado de acordo com Araújo *et al* (2023), com modificações. Inicialmente, 10^4 células foram semeadas em microplacas de 96 poços e incubadas por 24 h, a fim de permitir a aderência e o estabelecimento do crescimento celular. Após este período, as células foram tratadas com as amostras CLN-L 70, CLN-B 70 (sem licopeno) e meio DMEM (controle), na concentração inicial de 183,3 mg/mL de nanopartículas, o que corresponde à 1,9 $\mu\text{g/mL}$ de licopeno para o CLN-L 70, e posteriores 14 diluições seriadas, por 45 min a 37 °C e 5% de CO_2 , favorecendo a internalização celular dos compostos. Para cada poço, foi adicionado um volume final de 150 μL , composto pela mistura da nanoformulação diluída em meio DMEM. Concluída a incubação, as amostras foram removidas e as células lavadas

cuidadosamente com tampão fosfato salino (PBS, pH 7,4) para eliminação de resíduos extracelulares. Em seguida, foi adicionado DMEM a cada poço, e as células foram novamente incubadas por 24 h sob as mesmas condições de cultivo (37 °C e 5% de CO₂), permitindo a avaliação dos efeitos celulares após o período de internalização inicial.

A viabilidade celular das linhagens B16-F10 e HaCaT foi analisada por meio de ensaios com MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]. Após 24 h do tratamento, o meio de cultivo foi descartado, e os poços foram lavados com tampão fosfato salino (PBS, pH 7,4) para remoção de resíduos das amostras. Em seguida, foi adicionada 150 µL da solução de MTT (0,5 mg/mL) em cada poço, e as placas foram incubadas por 2 h a 37 °C e 5% de CO₂.

Após a incubação, a solução de MTT foi removida, e os cristais de formazan formados foram solubilizados pela adição de 100 µL de DMSO por poço. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 565 nm. A viabilidade celular foi calculada com base na razão entre a absorbância das células tratadas e a absorbância do controle não tratado, sendo os resultados expressos em porcentagem, de acordo com a equação:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \times 100$$

onde *A_{amostra}* corresponde à absorbância das células tratadas com as nanoformulações e *A_{controle}* à absorbância das células controle, consideradas como 100% de viabilidade.

Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos em três experimentos independentes.

4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como média ± desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas no software *GraphPad Prism*. As curvas de calibração e as análises de DPPH foram avaliadas por regressão linear. Para os dados de caracterização físico-química (diâmetro hidrodinâmico, PDI e potencial Zeta), foram utilizados testes de normalidade seguidos de ANOVA de uma via, aplicados individualmente para cada dia de armazenamento e para cada conjunto de formulações, com teste post hoc de

Tukey para identificar diferenças entre porcentagens de óleo e condições experimentais. Para comparar o efeito da temperatura de armazenamento (4 °C vs. 25 °C) em nanopartículas correspondentes, aplicou-se o teste *t* pareado, permitindo verificar variações induzidas exclusivamente pelo estresse térmico.

A viabilidade celular foi analisada como função da concentração das nanoformulações por meio de modelos de regressão não linear para determinação dos valores de IC₅₀, calculados por interpolação logarítmica entre os pontos adjacentes a 50% de viabilidade. Como algumas formulações apresentaram valores superiores a 100% em baixas concentrações, indicando proliferação celular, foi realizada análise de tendência (*Trend Analysis*) baseada em regressões lineares e quadráticas, demonstrando comportamento hormético estatisticamente significativo tanto para CLN-L quanto para CLN-B. Em todos os casos, adotou-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$) e os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio-padrão dos experimentos independentes ($n = 3$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 TEOR DE LICOPENO PRESENTE NO EXTRATO

As cascas de tomate foram coletadas, higienizadas e submetidas à liofilização. O peso antes da liofilização foi de 190,36 g, resultando em 11,74 g de casca liofilizada. A liofilização teve por objetivo remover a água preservando compostos termo-sensíveis, como o licopeno e facilitar a padronização dos rendimentos em base seca (Coşkun *et al*, 2024).

A perda de massa durante a liofilização foi de 178,62 g, correspondendo a um teor de umidade inicial estimado em 93,83% (m/m) e a 6,17% de matéria seca. Cada 1 g de casca liofilizada representa ~16,21 g da casca fresca original. Durante a extração, foi utilizado 5 g de casca liofilizada para 200 mL de óleo de canola, o que equivale a um fator de diluição de 0,025 g de casca por mL de extrato. Assim, cada concentração medida em µg/mL pôde ser convertida em base mássica (g de licopeno por g de casca seca) pela relação:

$$\text{Licopeno (g/g seco)} = \frac{\text{concentração (g/mL)}}{0,025}$$

e, considerando o rendimento da liofilização:

$$\text{Licopeno (g/g in natura)} = \frac{\text{Licopeno (g/g seco)}}{16,21}$$

A identificação do licopeno foi confirmada por meio da análise do padrão puro utilizando HPLC, com detecção no comprimento de onda de 472 nm. O cromatograma obtido para o padrão apresentou um pico simétrico, com tempo de retenção de aproximadamente 8,20 minutos (Figura 8), valor compatível com o relatado na literatura para o licopeno sob condições semelhantes (Pataro *et al*, 2020). A área do pico principal foi utilizada para a construção da curva de calibração, que serviu de base para estimar a concentração de licopeno presente nos extratos e encapsulado nas nanoformulações.

A curva obtida apresentou linearidade no intervalo analisado, com equação da reta $Y = 341645 \cdot X - 87766$ e coeficiente de determinação $R^2 = 0,998$, indicando forte correlação entre a concentração do analito e a área do pico detectado (Figura 9). A linearidade obtida demonstra a adequação do método analítico para quantificação de licopeno em diferentes

matrizes, mesmo na presença de componentes lipídicos ou emulsificantes (Fish, 2002). Além disso, o uso de uma curva de calibração construída com padrão de licopeno assegura maior confiabilidade aos resultados obtidos, considerando que o composto pode sofrer degradações oxidativas ou isomerizações que influenciam sua absorção espectral. O grau de confiança da curva também contribui para a interpretação dos picos secundários observados nos cromatogramas dos extratos, permitindo a exclusão de interferentes com diferentes tempos de retenção ou espectros de absorção (Lee & Chen, 2001; Lin *et al*, 2003).

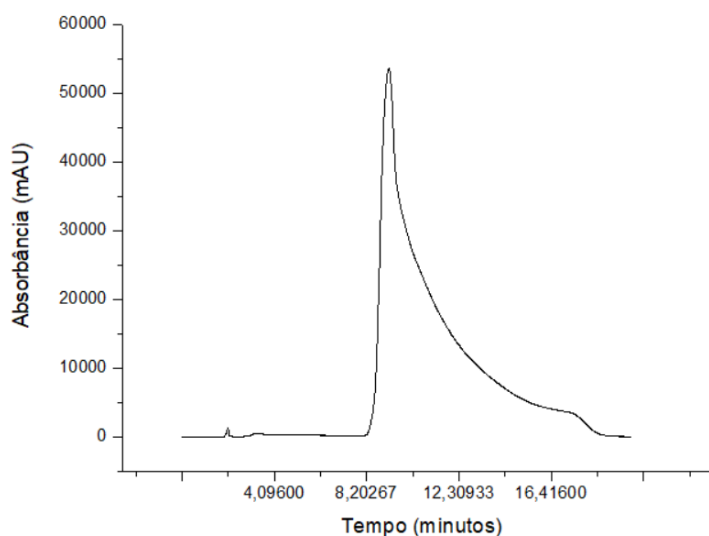


Figura 8: Cromatograma representativo do padrão de licopeno obtido por HPLC com detecção a 472 nm, com absorbância expressa em mili-unidades de absorbância (mAU). Pico principal com tempo de retenção em 8,20 minutos. Imagem obtida pelo OriginPro 7.

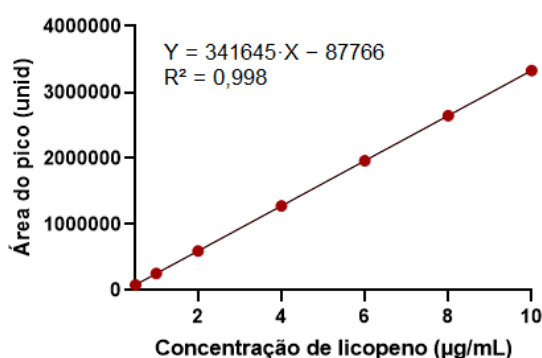


Figura 9: Curva de calibração para a quantificação do licopeno presente no extrato da casca de tomate obtida por HPLC-UV, utilizando concentrações entre 0 e 10 µg/mL. As análises foram realizadas com detecção de 472 nm. Imagem feita no software GraphPad Prism 8.0.1..

A estabilidade do licopeno presente no extrato lipídico foi avaliada sob diferentes condições e tempos de armazenamento, a fim de determinar o método mais adequado para preservação do composto. O extrato foi mantido em três condições distintas: congelador (-18 °C), refrigeração (4 °C) e temperatura ambiente (~25 °C), sendo analisado após 1 semana e após 1 mês de armazenamento. A concentração inicial de licopeno presente no extrato era de 12,50 µg/mL (Figura 10). O extrato mantido em congelador apresentou boa estabilidade inicial, preservando seu teor de licopeno após a primeira semana (12,49 µg/mL), contudo, após um mês, observou-se redução, atingindo cerca de 9,93 µg/mL. O armazenamento em geladeira resultou em uma queda mais pronunciada, com concentração reduzida para 11 µg/mL após uma semana e 4,25 µg/mL após um mês. Já o extrato mantido à temperatura ambiente apresentou o maior grau de degradação, com valores de 4,56 µg/mL e 3,63 µg/mL após uma e quatro semanas, respectivamente. A Tabela 4 resume a quantificação do licopeno obtida por HPLC, incluindo o padrão, o extrato em óleo de canola e as conversões para base seca (casca liofilizada) e casca *in natura*. Para a quantificação do teor de licopeno no extrato, foi aplicado um fator de correção igual a 2, correspondente à diluição realizada previamente à injeção das amostras no HPLC.

Tabela 4: Quantificação do Licopeno de acordo com área do pico observado na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) do padrão e do extrato em óleo de canola nas diferentes condições de armazenamento. Concentração expressa por grama de casca de tomate liofilizada e *in natura*. Extrato C (armazenado em congelador, -18°C). Extrato G (armazenado em geladeira, 4°C). Extrato TA (armazenado em temperatura ambiente, 25°C).

Amostra	Tempo (dias)	Área (unidades)	Concentração de licopeno (µg/mL)	Concentração de licopeno por casca seca (µg/g)	Concentração de licopeno por casca <i>in natura</i> (µg/g)
Padrão	-	6673473	19,53	-	-
Extrato	-	2048759	12,50	500,29	30,86
Extrato C	7	2046731	12,49	499,81	30,83
Extrato C	30	1608951	9,93	397,30	24,50
Extrato G	7	1791789	11,0	444,11	27,15
Extrato G	30	639190	4,25	170,22	10,50
Extrato TA	7	691378	4,56	182,44	11,25
Extrato TA	30	533490	3,63	145,47	8,97

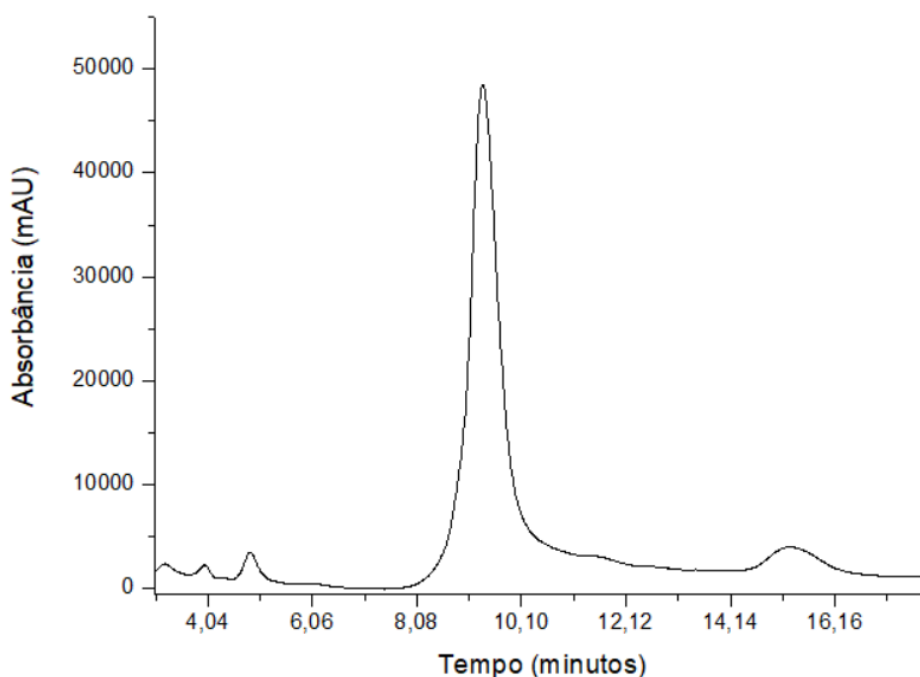


Figura 10: Cromatograma do extrato contendo licopeno da casca de tomate em óleo de canola. O pico principal, com tempo de retenção de aproximadamente 8,08 min, corresponde ao licopeno, identificado por comparação com o padrão analítico e com base no espectro de absorção característico ($\lambda_{\text{máx}} \approx 472$ nm). Imagem obtida pelo OriginPro 7.

O pico do padrão apresentou área de 6.673.473, correspondente a 19,53 $\mu\text{g/mL}$. Ao comparar o extrato inicial (12,50 $\mu\text{g/mL}$) com os extratos armazenados sob diferentes condições, observa-se um padrão de degradação térmica e oxidativa. O extrato mantido em congelador (-18 °C) apresentou a menor perda ao longo do tempo, com redução de aproximadamente 20% em 30 dias, enquanto os armazenados em geladeira e temperatura ambiente apresentaram quedas de 66% e 70%, respectivamente. Esses valores estão de acordo com estudos de Shi *et al* (2007) e Goula *et al.* (2006) que relatam degradações superiores a 50% em extratos contendo licopeno após 30 dias sob temperaturas acima de 20 °C, atribuídas à oxidação dos grupos poli-insaturados e à formação de isômeros *cis*. Além disso, os valores obtidos neste estudo (3–12 $\mu\text{g/mL}$) estão dentro da faixa observada em outros estudos de extração de licopeno a partir de subprodutos do tomate utilizando óleos vegetais como solventes, que variaram de 2 a 15 $\mu\text{g/mL}$ dependendo da proporção sólido/solvente e da estabilidade do pigmento (Szabo *et al*, 2022; Kultys & Kurek, 2022).

O comportamento observado reforça a necessidade de armazenamento sob congelamento e proteção à luz e ao oxigênio para preservar a integridade do carotenoide. A variação de aproximadamente 3,4 vezes entre o valor máximo e mínimo mostra a sensibilidade do licopeno às condições ambientais, destacando a importância do controle de temperatura como fator determinante na estabilidade de extratos lipídicos e nanoestruturados. No trabalho de Kehili (2019), que foi utilizado como metodologia de referência para esse trabalho, a concentração de licopeno foi de 35 mg/kg de casca seca, valor inferior ao encontrado neste trabalho, que variou de 145,47 a 500,29 mg/kg de casca seca, concentração que está de acordo com os valores encontrados em outros estudos para extratos obtidos por métodos verdes com óleos vegetais, que variam de 100 a 600 mg/kg, dependendo do tipo de tomate e das condições de extração (Ramadan & Moersel, 2009; Kuckelhaus *et al*, 2017).

No trabalho de Vasconcelos (2021), que teve a goiaba como fonte de licopeno e utilizou a mesma metodologia de quantificação que o presente estudo, foi relatada uma concentração de *trans*-licopeno de 13 µg/g de extrato seco, valor também inferior ao encontrado neste trabalho. Além disso, uma nanoemulsão contendo licopeno purificado de goiaba vermelha apresentou elevada estabilidade, com perda média de apenas $9,80 \pm 0,29\%$ após 12 meses de armazenamento a 8 °C. Em contraste, o extrato de licopeno utilizado exibiu cerca de 50% de degradação em apenas um mês sob as mesmas condições (Amorim *et al*, 2020). Essa diferença reforça que a nanoencapsulação exerce papel determinante na preservação do licopeno, protegendo contra os principais fatores que aceleram sua degradação. Essas estruturas atuam como um microambiente hidrofóbico e fisicamente isolante, reduzindo a exposição direta do carotenoide ao oxigênio molecular e calor, além de limitar a difusão de oxidantes (Qian *et al*, 2013).

Os resultados obtidos neste estudo reforçam esse comportamento descrito por Amorim *et al*. (2020). Como todos os extratos foram obtidos a partir do mesmo extrato inicial, a comparação direta da degradação do licopeno revela diferenças marcantes entre os métodos de armazenamento. O armazenamento em congelador apresentou a melhor estabilidade, preservando praticamente todo o teor inicial aos 7 dias e mantendo cerca de 80% após 30 dias. Em contraste, o armazenamento em temperatura ambiente foi a condição menos favorável, resultando em degradação acentuada logo na primeira semana, com retenção de apenas 36,5% em 7 dias e cerca de 30% após 30 dias. O armazenamento em geladeira, embora tenha

apresentado retenção intermediária no início (88% aos 7 dias), exibiu a maior taxa de degradação ao longo do tempo, caindo para apenas 34% aos 30 dias.

Em cada etapa de monitoramento, uma nova nanoformulação foi preparada a partir do respectivo extrato, com o objetivo de avaliar alterações visuais e físico-químicas decorrentes da degradação do licopeno, como variações de coloração, opacificação e estabilidade coloidal. Durante a etapa de preparo das nanoformulações, foi observado que o uso do extrato com maior teor de licopeno interferiu nas características físico-químicas e visuais das dispersões. As nanoformulações com teores mais elevados de licopeno apresentaram aspecto mais opaco e formação de espuma superficial, em contraste ao observado nas nanoformulações contendo menores concentrações, que mantiveram aparência translúcida e estável (Figura 11). Para a análise da interferência da concentração de licopeno presente na nanoformulação, foram preparadas nanoformulações com 2,5 g de matriz lipídica, na proporção 1:1 de extrato e manteiga de murumuru (1,25 gramas), com 3 g de Brij O10 e 30 mL de água destilada, com resfriamento por banho-maria à 10°C.



Figura 11: Aspecto visual dos CLNs após a obtenção do extrato inicial e após armazenamento por 7 e 30 dias em diferentes condições: congelado (C), refrigerado (G) e temperatura ambiente (TA). Da esquerda para direita: Extrato inicial, Extrato congelador 7 dias, Extrato congelador 30 dias, Extrato geladeira 7 dias, Extrato geladeira 30 dias, Extrato temperatura ambiente 7 dias e Extrato temperatura ambiente 30 dias.

Do ponto de vista coloidal, o excesso de licopeno altera o equilíbrio interfacial entre a fase oleosa e o surfactante (Brij O10), afetando a estabilização das partículas formadas

durante o processo (Karthic *et al*, 2017; Sazdanić *et al*, 2023). Devido a isso, há tendência de aumento do diâmetro hidrodinâmico, o que explica o aspecto turvo e a presença de regiões instáveis com espuma. Além disso, o licopeno, por ser um pigmento altamente hidrofóbico e de cadeia poliênica longa, pode interagir com as cadeias lipídicas e modificar a organização cristalina da matriz, interferindo na homogeneidade da dispersão (Tadros, 2013; Kaur & Sogi, 2023).

A opção por adotar a concentração de 4,25 µg/mL para o extrato com licopeno precursora da nanoformulação foi fundamentada em critérios de equilíbrio entre carga de ativo, estabilidade coloidal e clareza óptica. Estudos indicam que concentrações elevadas aumentam o risco de cristais ou agregados e promovem turvação da dispersão, comprometendo a estabilidade e a bioacessibilidade do carotenoide (Tadros, 2013; Zhao *et al*, 2020; Kaur & Sogi, 2023). Além disso, como o licopeno é suscetível à isomerização e oxidação, inclusive em ambientes lipídicos com excesso de carga, a menor concentração contribui para melhor preservação do composto durante o processo de nanoencapsulação e armazenamento, como evidenciado em revisões sobre nanocarreadores de carotenóides (Dos Santos *et al*, 2018).

Estudos com sistemas lipídicos carregados com licopeno demonstram que a estabilidade, a dispersibilidade e a eficiência de encapsulação são fortemente dependentes da carga de ativo empregada. Okonogi e Riangjanapatee (2015) relataram encapsulação melhorada em CLNs quando a concentração de licopeno foi otimizada, evitando agregados visíveis. Rehman *et al* (2020) reforçam que cargas elevadas podem promover cristalização ou precipitação do carotenoide, comprometendo a estabilidade coloidal e a liberação controlada. Sirikhet *et al* (2021) evidenciaram que, embora a inclusão em CLNs melhore a estabilidade térmica e oxidativa do licopeno, a escolha da carga deve ser moderada para evitar efeitos adversos na matriz lipídica que poderiam desestabilizar o coloide.

Abaixo está representado o cromatograma e o espectro UV comparativo do extrato escolhido para a formulação dos CLNs e do padrão de licopeno (Figura 12 e 13).

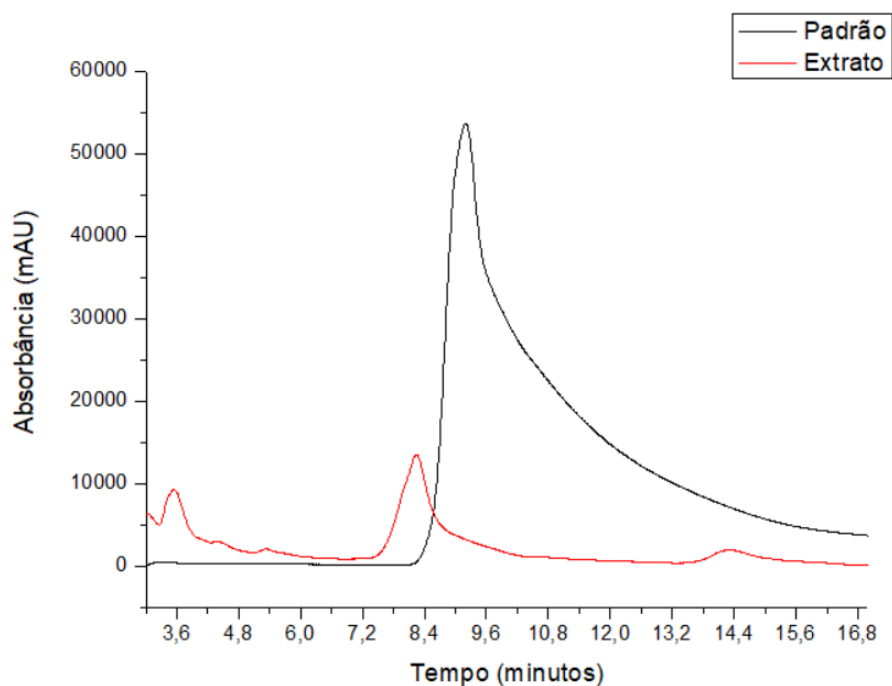


Figura 12: Cromatograma representativo do padrão de licopeno e do extrato contendo licopeno do tomate em óleo de canola, na concentração de 4,25 $\mu\text{g/mL}$, obtido por HPLC com detecção a 472 nm, com pico de retenção do extrato em 7,27 minutos e do padrão em 8,2 minutos. Imagem obtida pelo OriginPro 7.

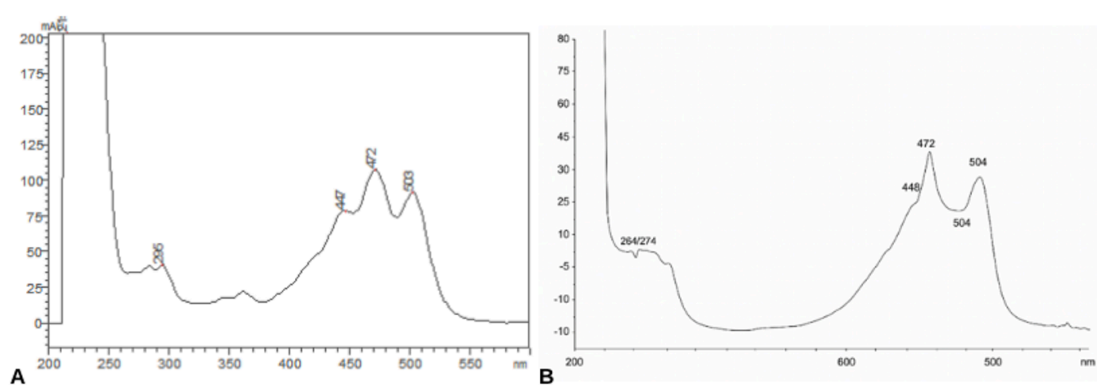


Figura 13: Espectros de absorção na região do UV obtidos para o licopeno. (A) Espectro do padrão de licopeno dissolvido em hexano:clorofórmio (1:1), evidenciando os picos característicos em 295, 447, 472 e 503 nm. (B) Espectro do extrato lipídico com licopeno da casca de tomate em óleo de canola, apresentando máximos em 448, 472 e 504 nm. Imagem obtida pelo software Lab Solutions.

A semelhança entre os espectros e as bandas confirmam a presença do licopeno no extrato, enquanto pequenas variações no tempo de retenção, nos comprimentos de onda e na intensidade relativa das bandas estão associadas à interação do carotenoide com a matriz lipídica e à possível formação de isômeros *cis* durante o processo de extração, sendo essa

diferença esperada e descrita na literatura (Vasconcelos, 2017; Amorim *et al*, 2020). Isso ocorre porque o padrão é uma substância com alto teor de pureza, enquanto o extrato contém o licopeno associado a uma matriz complexa, com lipídios, ácidos graxos, tocoferóis e outros compostos que afetam diretamente o comportamento cromatográfico. O licopeno no extrato está dissolvido ao óleo de canola, que interage com a fase estacionária, competindo ou modificando sua polaridade local, alterando o coeficiente de partição do licopeno e resultando em tempos de retenção diferentes.

A Figura 13 apresenta os espectros de varredura no UV obtidos para o padrão de licopeno (A) e para o extrato nanoencapsulado (B). Em ambos é possível identificar o conjunto de bandas características do licopeno, com máximos de absorção na região de 447–448 nm, 472 nm e 503–504 nm. Esses máximos são amplamente descritos na literatura como marcadores espectrais do licopeno em solução orgânica ou em matrizes complexas (Britton, 1995; Li & Chen, 2001; Fish, 2002). No espectro 13A, se observa um perfil mais definido e picos mais intensos, como esperado para um composto de alta pureza. Já no espectro 13B, os mesmos máximos são mantidos, mas com variações na intensidade relativa, especialmente no pico em 504 nm. Essa diferença ocorre por conta do ambiente lipofílico do extrato, que pode promover alterações na solvatação e deslocamento dos equilíbrios entre isômeros *trans* e *cis*, sem modificar a identidade espectral do composto. A presença de bandas entre 264–274 nm no espectro do extrato sugere absorção adicional de componentes lipídicos ou traços de compostos minoritários, o que também é descrito em sistemas contendo carotenóides dispersos em matrizes lipídicas (Khoo *et al*, 2011; Rodriguez-Amaya, 2019). A manutenção das posições dos máximos de absorção confirma que o licopeno permaneceu estruturalmente íntegro após o processo de extração, uma vez que a degradação ou oxidação geraria deslocamentos ou perda dos picos principais. Assim, a comparação entre os espectros mostra que o método aplicado foi eficiente para preservar a estrutura característica do licopeno.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS (CLNs) E ESTABILIDADE

5.2.1 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE BRIJ O10 NAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

As nanoformulações foram preparadas em duas etapas. Na etapa 1, desenvolveu-se a formulação controle, sem a incorporação de licopeno. Essa fase permitiu padronizar o processo PIT (ponto de nuvem, perfil de aquecimento e resfriamento) e identificar o efeito dos componentes de base sobre os parâmetros de diâmetro hidrodinâmico, PDI, potencial Zeta, aparência e estabilidade (inclusive sob estresse), assegurando que a estrutura e a estabilidade dos CLNs estejam consolidadas antes da introdução do carotenoide. Na etapa 2, o licopeno foi incorporado, mantendo-se as mesmas condições de preparo. Essa sequência é fundamental porque o licopeno é termo, foto e oxissensível, sendo suscetível à isomerização *cis/trans* e oxidação (Vasconcelos, 2017). Otimizar primeiro a formulação minimiza degradação durante o processo, melhora a encapsulação, confere reprodutibilidade e permite interpretar de forma confiável a liberação, atividade antioxidante e estabilidade química do ativo, sem interferência de instabilidades físico-químicas da base (Cassayre *et al*, 2025).

Inicialmente, foram testadas diferentes proporções de tensoativo e composição de matriz lipídica. Manteve-se 2,5 g de matriz lipídica e 30 mL de água destilada, alterando a proporção de tensoativo. Avaliando os resultados do DLS, a utilização de 3 gramas de Brij O10 indicou desempenho superior. Para todas as formulações testadas o PDI apresentou valores $< 0,20$, caracterizando sistemas monodispersos (Kaur & Sogi, 2023), indicando redução da distribuição de tamanhos e aumento da homogeneidade em toda a faixa de composição oleosa (Figura 14). A média do diâmetro hidrodinâmico também foi inferior ($52,01 \pm 9,87$ nm), indicando uma possível melhora na estabilidade física (Figura 15). Os valores de potencial Zeta mantiveram-se na faixa entre -6 e -10 mV para todos os níveis de Brij, coerente com a estabilização estérica típica de tensoativos não iônicos (Figura 16). Assim, a escolha de 3 gramas de Brij O10 foi guiada pela melhora da cobertura interfacial durante a passagem pelo PIT e diminuição da ocorrência de fenômenos de instabilidade, resultando em partículas menores e mais monodispersas, inclusive na condição mais crítica (80% de canola: 55,80 nm; PDI 0,078). Como observado no estudo de Sharma *et al* (2021), que produziu NLCs carregadas com licopeno, com tamanho entre 16 e 22 nm e índice de polidispersividade $< 0,5$, a redução do tamanho das partículas observada nas concentrações entre 2% e 4% de tensoativo Tween 60, pode estar associada à diminuição da tensão interfacial entre a fase lipídica e a fase aquosa, promovida pela ação do surfactante. Esse agente reduz a energia necessária para a formação das interfaces e favorece a dispersão mais eficiente da matriz lipídica, resultando na geração de nanopartículas menores e mais

uniformes (Miyazawa *et al*, 2021). Além disso, o tensoativo atua como barreira estérica e eletrostática, prevenindo a coalescência das partículas recém-formadas e, conseqüentemente, melhorando a estabilidade físico-química ao longo do tempo (Hogarth *et al*, 2024).

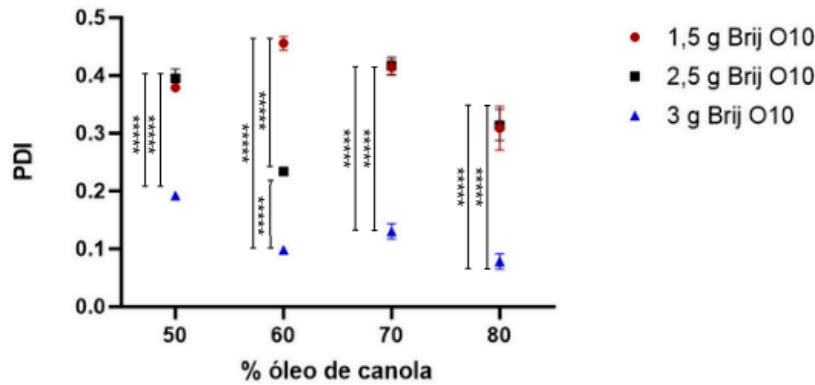


Figura 14: Efeito da concentração de Brij O10 e da proporção de óleo de canola no índice de polidispersão (PDI) das nanoformulações obtidas pelo método PIT. Os pontos representam a média dos valores ($n = 3$) para cada condição experimental: 1,5 g de Brij O10 (círculos vermelhos), 2,5 g de Brij O10 (quadrados pretos) e 3 g de Brij O10 (triângulos azuis). As barras verticais conectando os símbolos indicam comparações pareadas entre as concentrações de Brij O10 dentro de cada porcentagem de óleo de canola. A significância estatística foi determinada por One-Way ANOVA seguido do teste *post hoc* de Tukey, realizado separadamente para cada nível de óleo de canola. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. 50% de óleo: $p < 0,0001$ (***) para comparação entre 1,5 g vs 3 g e 2,5 g vs 3 g. 60% de óleo: $p < 0,0001$ (***) para todas as comparações. 70% de óleo: $p < 0,0001$ (***) para comparações 1,5 g vs 3 g e 2,5 g vs 3 g. 80% de óleo: $p < 0,001$ (***) para 1,5 g vs 3 g e 2,5 g vs 3 g. Comparações não mencionadas não apresentaram diferenças estatísticas significativas.

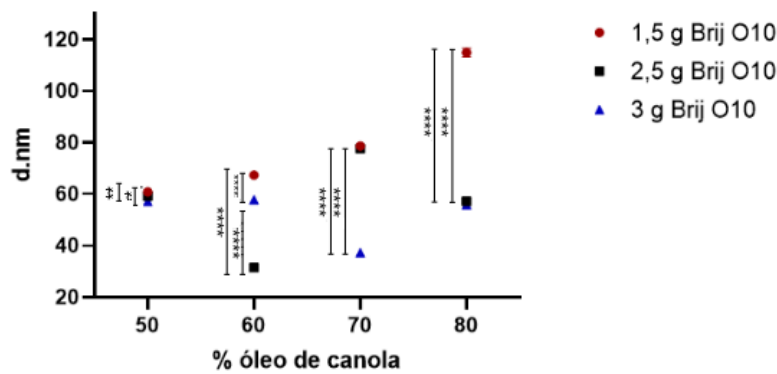


Figura 15: Efeito da concentração de Brij O10 e da proporção de óleo de canola no diâmetro hidrodinâmico (d.nm) das nanoformulações obtidas pelo método PIT. Os pontos representam a média dos valores ($n = 3$) para cada condição experimental: 1,5 g de Brij O10 (círculos vermelhos), 2,5 g de Brij O10 (quadrados pretos) e 3 g de Brij O10 (triângulos azuis). As barras verticais conectando os símbolos indicam comparações pareadas entre as concentrações de Brij O10 dentro de cada porcentagem de óleo de canola. A significância estatística foi determinada por One-Way ANOVA seguido do teste *post hoc* de Tukey realizado separadamente para cada nível de óleo de canola. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre grupos, conforme descrito: 50% de óleo: $p < 0,05$ (*) para 2,5 g vs 3 g, e $p < 0,01$ (**) para 1,5 g vs 3 g. 60% de óleo: todas as comparações apresentaram $p < 0,0001$ (****). 70% de óleo: $p < 0,0001$ (****).

(***) para 1,5 g vs 3 g e 2,5 g vs 3 g. 80% de óleo: $p < 0,0001$ (***) para 1,5 g vs 2,5 g e 1,5 g vs 3 g. As comparações não mencionadas não apresentaram diferenças estatísticas significativas.

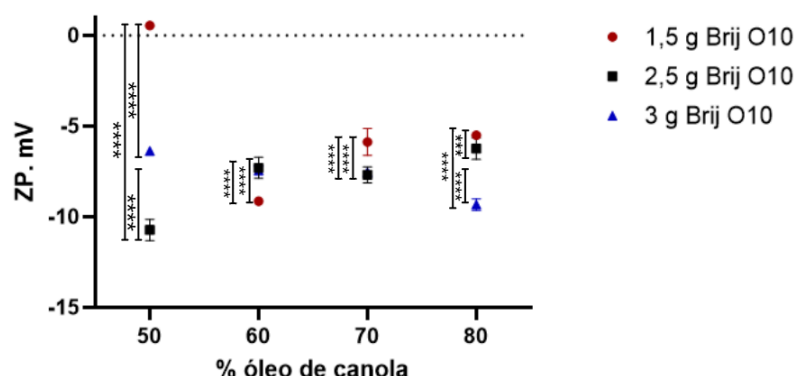


Figura 16: Efeito da concentração de Brij O10 e da proporção de óleo de canola no potencial Zeta das nanoformulações obtidas pelo método PIT. Os pontos representam a média dos valores ($n = 3$) para cada condição experimental: 1,5 g de Brij O10 (círculos vermelhos), 2,5 g de Brij O10 (quadrados pretos) e 3 g de Brij O10 (triângulos azuis). As barras verticais conectando os símbolos indicam comparações pareadas entre as concentrações de Brij O10 dentro de cada porcentagem de óleo de canola. A significância estatística foi determinada por One-Way ANOVA, seguida do teste *post hoc* de Tukey, realizado separadamente para cada nível de óleo de canola. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. 50% de óleo: $p < 0,0001$ (***) para todas as comparações. 60% de óleo: $p < 0,0001$ (***) para 1,5 g vs 2,5 g e 1,5 g vs 3 g. 70% de óleo: $p < 0,0001$ (***) para 1,5 g vs 2,5 g e 1,5 g vs 3 g. 80% de óleo: $p < 0,01$ (***) para 1,5 g vs 2,5 g e $p < 0,0001$ (***) para 1,5 g vs 3 g e 2,5 g vs 3 g. Comparações não mencionadas não apresentaram diferenças estatísticas significativas.

5.2.2 EFEITO DO RESFRIAMENTO CONTROLADO NA ESTABILIDADE DAS NANOFORMULAÇÕES

Inicialmente, após a passagem pelo ponto de nuvem (PIT), o sistema era resfriado em bancada sob agitação magnética. Entretanto, na presença de licopeno, observou-se instabilidade física com aumento do diâmetro hidrodinâmico, elevação do PDI e tendência à separação de fases em algumas composições. Com isso, após atingir o PIT, o procedimento foi padronizado para transferência dos frascos para resfriamento em banho-maria frio a ~ 10 °C com agitação magnética contínua até 25 °C (temperatura ambiente). Esse ajuste promoveu queda de temperatura mais rápida e controlada, o que reduziu a coalescência e a floculação observada no resfriamento lento. As Figuras 17 e 18 apresentam, respectivamente, os resultados de diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersidade (PDI) das nanoformulações contendo óleo de canola e extrato lipídico rico em licopeno, avaliadas no dia seguinte à sua preparação.

Do ponto de vista físico-químico, o resfriamento controlado e mais rápido limita a reorganização desfavorável dos lipídeos, polimorfismo e recristalização desordenada, estabilizando o tensoativo. Na prática, após a adoção do banho-maria frio com agitação, as nanoformulações contendo licopeno tendem a apresentar menor diâmetro hidrodinâmico, PDI mais baixo e ausência de separação visível, configurando melhora consistente de estabilidade e reprodutibilidade entre lotes.

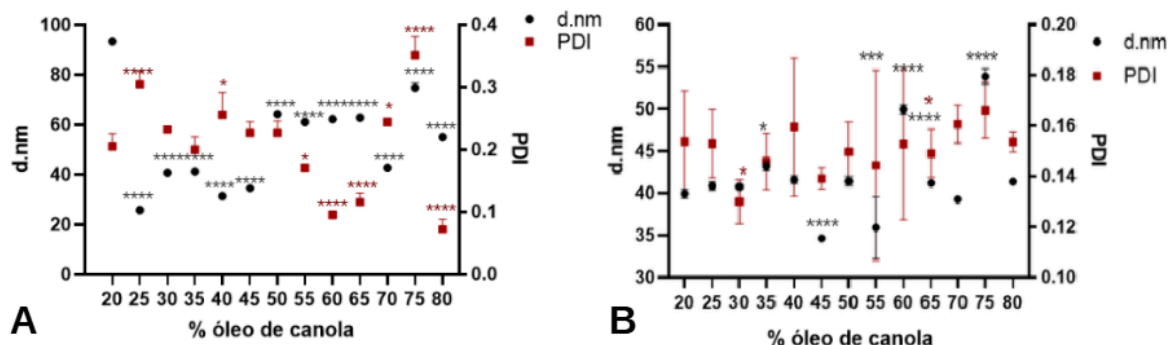


Figura 17: Comparação dos dois procedimentos de resfriamento após o PIT na preparação das nanoformulações CLN-B no dia 1, variando a % de óleo de canola na matriz lipídica (20–80%), com 3 g de Brij O10: (A) resfriamento em bancada sob agitação magnética; (B) resfriamento em banho-maria frio (~10 °C) sob agitação. Os pontos representam a média $\pm$ desvio padrão (DP). As diferenças entre as porcentagens de óleo foram analisadas por ANOVA One-Way seguida de Tukey, separadamente em cada método. Asteriscos indicam nível de significância: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$. Comparações não indicadas não apresentaram diferenças estatísticas significativas. Imagem gerada pelo GraphPad Prism 8.0.

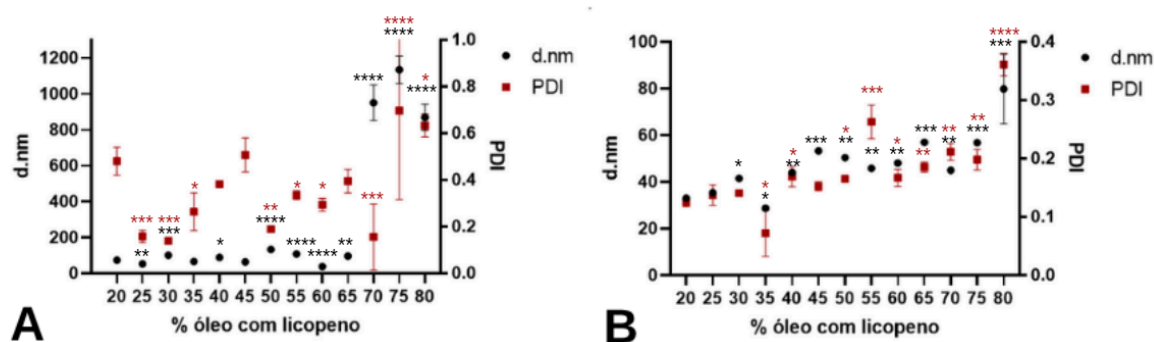


Figura 18: Comparação dos dois procedimentos de resfriamento após o PIT na preparação das nanoformulações CLN-L no dia 1, variando a % de extrato incorporado na matriz lipídica (20–80%), com 3 g de Brij O10: (A) resfriamento em bancada sob agitação magnética; (B) resfriamento em banho-maria frio (~10 °C) sob agitação. Os pontos representam a média $\pm$ desvio padrão (DP). As diferenças entre as porcentagens de óleo foram analisadas por ANOVA One-Way seguida de Tukey, separadamente em cada método. Asteriscos indicam nível de significância: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$. Comparações não indicadas não apresentaram diferenças estatísticas significativas. Imagem gerada pelo GraphPad Prism 8.0.

Em ambas as técnicas de formulação, foi possível observar uma melhora da estabilidade das nanoformulações, principalmente nas formulações com maior concentração de óleo, que, no geral, apresentaram elevado PDI e diâmetro hidrodinâmico. O teste *t* pareado

para as CLN-B revelou diferenças significativas entre as duas condições de resfriamento tanto para o diâmetro hidrodinâmico ($p < 0,0001$) quanto para o PDI ($p = 0,0038$). Para os CLN-L, o teste *t* pareado também demonstrou diferenças significativas entre os métodos de resfriamento. Para o diâmetro hidrodinâmico, o resfriamento em banho-maria resultou em valores menores que o resfriamento em bancada ($p < 0,0001$), evidenciando maior eficiência na estabilização da matriz lipídica durante o processo de solidificação. De forma semelhante, o PDI também foi inferior no banho-maria ($p = 0,0017$), indicando partículas mais homogêneas e com menor tendência à agregação. Esses resultados reforçam que o controle térmico suave do banho-maria favorece a formação de nanocarreadores mais estáveis e uniformes quando comparado ao resfriamento ao ar.

O método de resfriamento exerce influência direta sobre a organização interna da matriz lipídica e, conseqüentemente, sobre a estabilidade físico-química das nanoformulações obtidas pelo método PIT. As formulações a partir de 65% de extrato com licopeno em óleo de canola apresentaram processos de instabilidade quando resfriadas por temperatura ambiente, como a cremação. A Figura 19 apresenta o aspecto macroscópico das nanoformulações lipídicas contendo licopeno obtidas pelo método PIT, variando-se a proporção de fase lipídica (20–80%) e o tipo de resfriamento aplicado. Embora ambas as abordagens utilizem o mesmo método de preparo, pode-se observar a diferença evidente no aspecto físico e na homogeneidade entre as formulações.

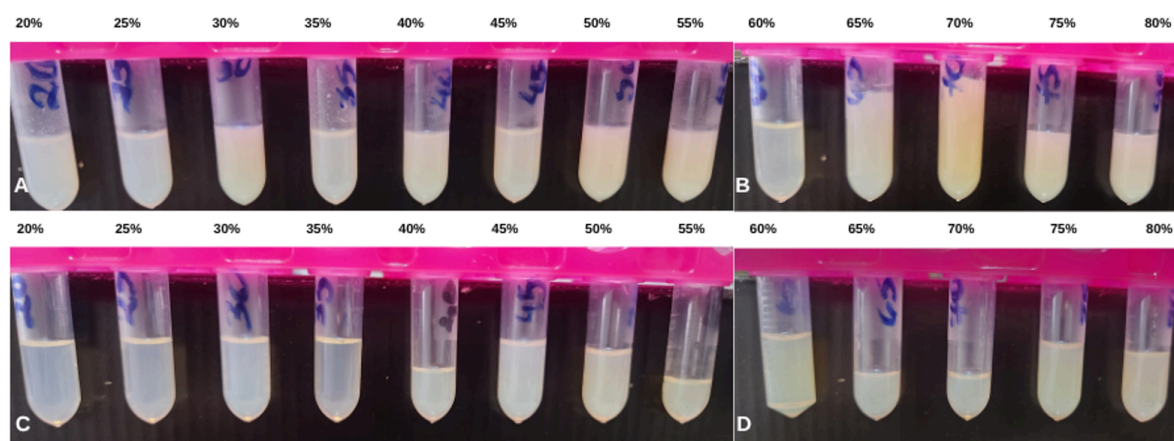


Figura 19: Aspecto visual das nanoformulações lipídicas com diferentes proporções de extrato contendo licopeno (20–80%) obtidas pelo método PIT com 3 g de Brij O10. (A–B) Formulações preparadas com resfriamento apenas por agitação ambiente. (C–D) Formulações preparadas pelo método com resfriamento por agitação em banho-maria a 10 °C.

O resfriamento rápido favoreceu a formação de uma matriz lipídica menos cristalina, com maior presença de defeitos estruturais que facilitam o aprisionamento do licopeno e reduzem sua expulsão durante o processo de solidificação. Em contraste, o resfriamento lento permitiu maior tempo para reorganização das cadeias lipídicas, favorecendo a formação de polimorfos mais ordenados. Nas amostras preparadas com resfriamento em banho-maria a 10 °C (Figura 19C e D), nota-se maior uniformidade visual, ausência de separação de fases e coloração mais homogênea, o que sugere boa dispersão da matriz lipídica e incorporação eficiente do licopeno. Esse comportamento pode ser atribuído à solidificação mais controlada e gradual da fase lipídica, que favorece a formação de núcleos lipídicos estáveis e reduz a coalescência das gotículas (Mehnert & Mäder, 2012; Queiroz & Muehlmann, 2024). Por outro lado, nas formulações produzidas com resfriamento apenas por agitação magnética (Figura 19A e B), é possível observar maior turbidez, variação de cor e presença de zonas opacas, indicando instabilidade coloidal e possível agregação de partículas.

A ausência de controle térmico durante o processo de solidificação leva à cristalização irregular da fase lipídica, resultando em heterogeneidade de tamanho e menor encapsulamento do licopeno (Tang *et al*, 2023; Lüdtke *et al*, 2025). Além disso, nas formulações acima de 65% de extrato, pode-se observar 2 fases, sendo uma fase inferior de aspecto mais denso e cremoso e uma fase superior com aparência espumosa. A fase cremosa inferior corresponde à fração lipídica concentrada, onde houve coalescência de gotículas e precipitação da fase lipídica solidificada. Nessa região, a matriz lipídica, já parcialmente cristalizada, retém parte do licopeno e do surfactante, apresentando coloração mais intensa e textura densa. A fase superior espumosa, por sua vez, é resultado da retenção de ar e material tensoativo (Brij O10), que estabiliza temporariamente bolhas formadas durante a emulsificação. Quando a viscosidade aumenta, especialmente em sistemas ricos em lipídeos, o surfactante não consegue redistribuir o ar aprisionado, originando essa camada superficial com aparência de espuma e de menor densidade (Akanda *et al*, 2023; Qian *et al*, 2013). Esse comportamento indica solidificação desordenada da matriz lipídica, que favorece a coalescência e o crescimento de partículas maiores, resultando em menor estabilidade coloidal e maior polidispersidade, fenômeno que está associado à reorganização lenta da fase lipídica durante o resfriamento (Mehnert & Mäder, 2012; Lüdtke *et al*, 2025).

Esse aspecto bifásico indica a limitação da capacidade de emulsificação do sistema, onde com o aumento da proporção de fase lipídica, a quantidade de surfactante se torna

insuficiente para manter todas as gotículas dispersas, o que favorece a fusão e o crescimento de partículas maiores. Além disso, a solidificação desordenada da fase lipídica por conta do resfriamento lento, impede a organização homogênea da rede cristalina da matriz lipídica, levando à migração de parte do licopeno para a superfície e à expulsão parcial de água, que contribuem tanto para a formação da camada espumosa quanto para a textura cremosa observada (Mehnert & Mäder, 2012; Qian *et al*, 2013). Assim, a taxa de resfriamento funciona como um modulador estrutural e determina o grau de cristalização do núcleo lipídico e a estabilidade final dos CLNs.

A Figura 20 apresenta os perfis de distribuição de tamanho dos CLNs contendo proporções de extrato com licopeno entre 65 e 80%, preparadas pelo método PIT sob as duas condições distintas de resfriamento. Foi possível observar que o modo de resfriamento exerceu influência significativa sobre a distribuição das populações de partículas, indicando impacto direto na cinética de cristalização lipídica e, conseqüentemente, na estabilidade coloidal do sistema.

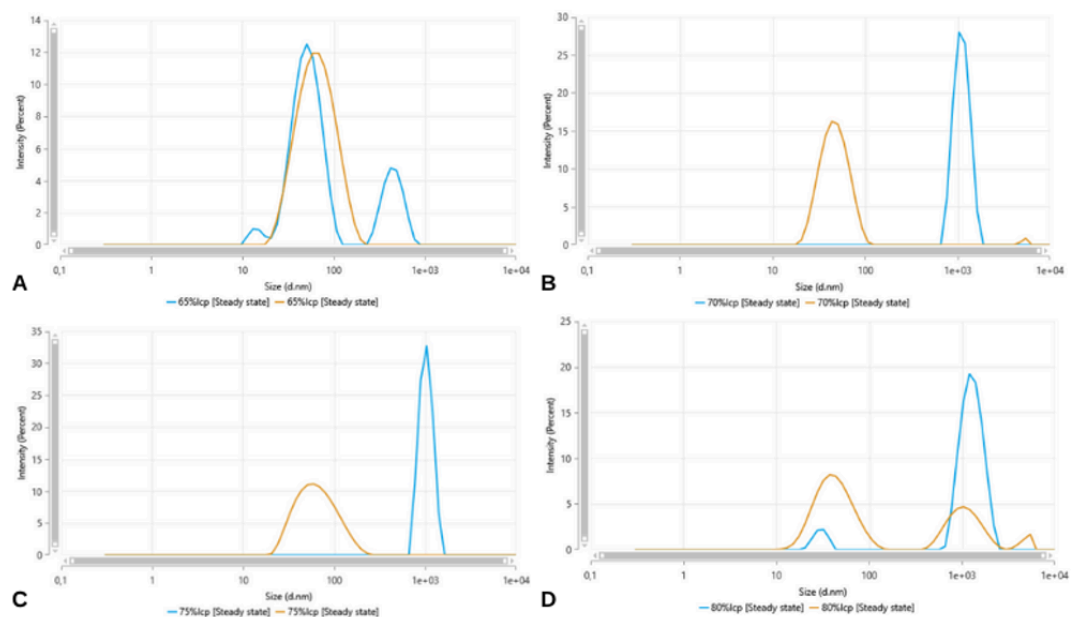


Figura 20: Distribuição de tamanho dos CLNs contendo licopeno obtidas pelo método PIT, comparando os modos de resfriamento. (A) 65% de extrato contendo licopeno, (B) 70%, (C) 75% e (D) 80% com 3 g de Brij O10. Linha laranja: método com resfriamento por agitação em banho-maria a 10 °C. Linha azul: método com resfriamento por agitação.

As amostras preparadas com resfriamento apenas por agitação (linha azul) exibiram picos mais amplos e deslocados para maiores diâmetros, sugerindo formação de agregados e heterogeneidade nas populações. Esse comportamento indica reorganização mais lenta da fase lipídica durante o processo de solidificação, o que favorece a coalescência parcial e o aumento da polidispersividade (Mehnert & Mäder, 2012; Lüdtke *et al*, 2025.). Em contraste, as amostras submetidas ao resfriamento por agitação em banho-maria a 10 °C (linha laranja) apresentaram distribuições mais estreitas e picos predominantes na faixa de 50–150 nm, evidenciando formação mais uniforme de nanopartículas. O resfriamento controlado e gradual promoveu a solidificação ordenada da matriz lipídica, limitando a migração de licopeno e reduzindo a tendência de agregação, efeito também reportado outros estudos sobre NLC contendo compostos carotenóides (Qian *et al*, 2013; Sharma *et al*, 2021).

Além disso, houve influência da concentração do extrato. Em 65% de licopeno (Figura 20A), observa-se um perfil mais homogêneo e estável, enquanto nas formulações com 70% a 80% (Figuras 20 B–D) ocorrem múltiplas populações de partículas, indicando instabilidade coloidal e saturação da matriz lipídica. Embora a formulação com 80% de extrato ainda apresente mais de uma população, o resfriamento em banho-maria proporcionou uma redução no tamanho das nanopartículas e não proporcionou a separação de fases observada no resfriamento por agitação magnética. Esses resultados sugerem que tanto o modo de resfriamento quanto a proporção de licopeno são determinantes para o controle da morfologia e estabilidade das nanopartículas.

5.2.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS CLN-B

A caracterização por DLS foi realizada em amostras submetidas ao armazenamento em temperatura ambiente (25 °C) e em geladeira (4 °C). O pH variou $5,58 \pm 0,62$ para todas as formulações, no período de 1 a 90 dias e foi observado que a temperatura não proporcionou variações no pH em todas as formulações. A Figura 21 mostra o comportamento do diâmetro hidrodinâmico e do PDI dos CLNs contendo diferentes proporções de óleo de canola, comparando o efeito da temperatura de armazenamento ao longo de 90 dias.

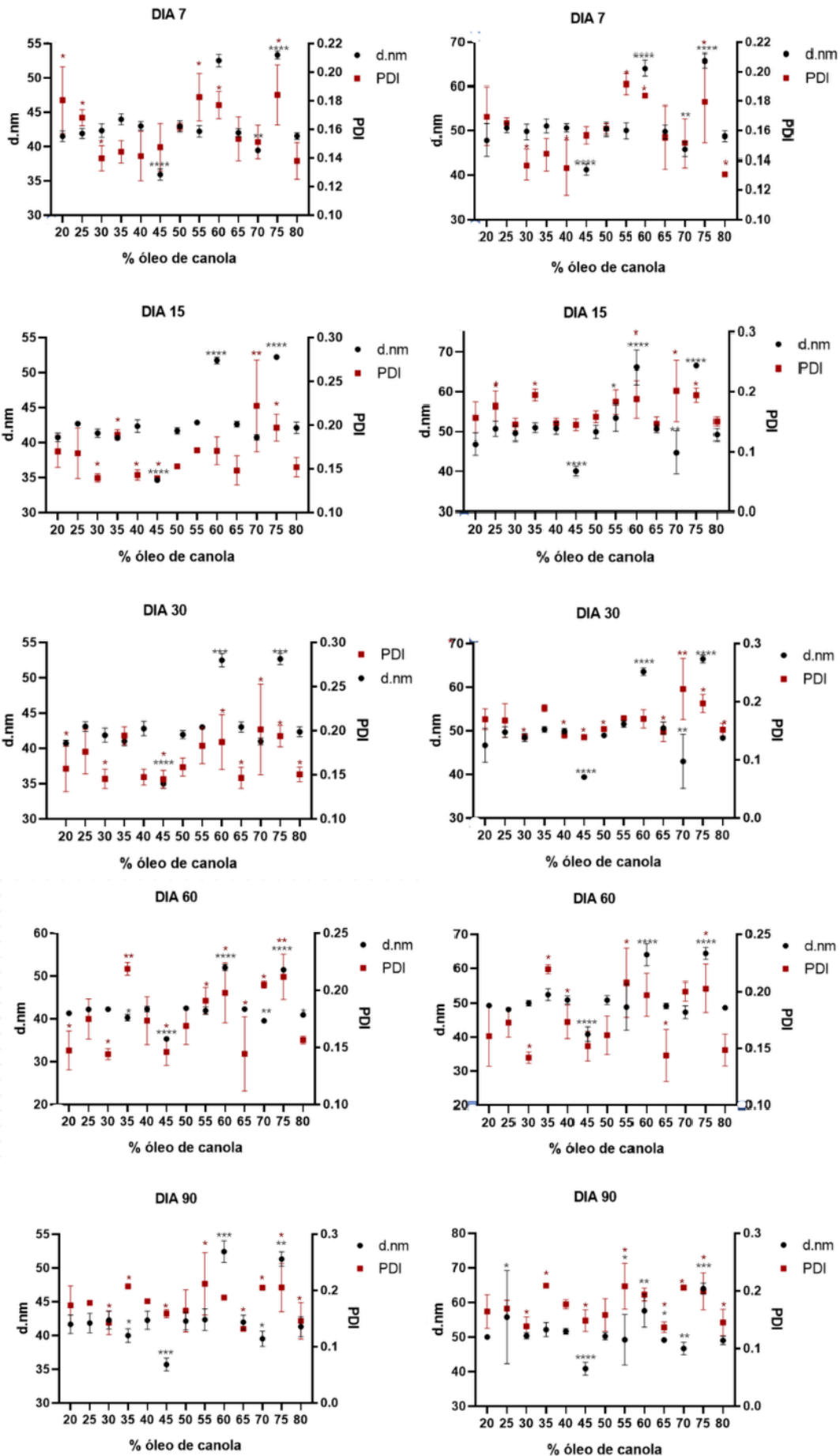


Figura 21: Variação do diâmetro hidrodinâmico (d.nm) e do índice de polidispersividade (PDI) das nanoformulações contendo diferentes porcentagens de óleo de canola (20–80%) ao longo de 90 dias de armazenamento. Os gráficos da coluna esquerda representam as amostras mantidas em temperatura de refrigeração (4 °C), enquanto os gráficos da coluna direita correspondem às amostras mantidas em temperatura ambiente (25 °C). Os círculos pretos (●) indicam os valores médios de d.nm e os quadrados vermelhos (■), os valores de PDI, ambos apresentados com seus respectivos desvios-padrão (n = 3). As diferenças estatisticamente significativas entre as formulações (One-Way ANOVA seguido de teste de Tukey, $\alpha = 0,05$) são indicadas por asteriscos: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Para avaliar se a composição lipídica influenciou o comportamento físico-químico das nanoformulações ao longo do armazenamento, foi realizado, em cada dia de análise (7, 15, 30, 60 e 90 dias), o teste One-Way ANOVA, seguido do teste *post hoc* de Tukey, representado no gráfico. Esse procedimento estatístico permitiu comparar todas as porcentagens de óleo de canola (20–80%) dentro de cada tempo, identificando quais formulações diferiram entre si.

No dia 7, sob refrigeração (4 °C), os valores médios de d.nm permaneceram próximos entre as diferentes formulações, indicando comportamento estrutural globalmente homogêneo e sugerindo que a baixa temperatura limita a mobilidade molecular da matriz lipídica recém-formada. Ainda assim, formulações contendo 60 e 75% de óleo de canola apresentaram valores individuais superiores a 50 nm, estatisticamente distintos da média geral ($43,46 \pm 4,93$ nm; $p < 0,05$ – $0,001$), indicando que elevadas frações de óleo líquido podem induzir ajustes estruturais pontuais mesmo sob condições refrigeradas. Em contraste, em temperatura ambiente (25 °C), observou-se aumento do diâmetro hidrodinâmico médio global para $51,21 \pm 7,12$ nm já no início do armazenamento, refletindo maior mobilidade da matriz lipídica em função da temperatura. Apesar desse aumento no tamanho médio das partículas, o PDI apresentou valores semelhantes entre as duas condições de armazenamento ($0,156 \pm 0,020$ em 25 °C e $0,162 \pm 0,015$ em 4 °C), indicando que a distribuição de tamanhos permaneceu relativamente uniforme e sem indícios de instabilidade física precoce.

Aos 15 dias, as diferenças estatísticas observadas concentraram-se principalmente nas formulações contendo 45, 60 e 75% de óleo de canola, sugerindo que esse intervalo corresponde a um período de ajustes estruturais da matriz lipídica. Em 4 °C, essas variações não se refletiram em aumentos expressivos do d.nm ou do PDI, reforçando o papel da refrigeração na preservação estrutural das nanopartículas. Por outro lado, em 25 °C, as formulações contendo entre 55 e 80% de óleo de canola apresentaram aumento mais pronunciado do tamanho médio das partículas (60–70 nm), acompanhado por diferenças

estatisticamente significativas ($p < 0,0001$) e maior heterogeneidade no PDI, indicando maior sensibilidade dessas composições às condições térmicas mais elevadas.

Nos períodos de 30 e 60 dias, a comparação temporal não revelou diferenças estatisticamente significativas nos valores médios de d.nm e PDI quando se compara esses dois períodos, indicando manutenção global da estabilidade físico-química das nanoformulações. No entanto, variações pontuais entre formulações persistiram dentro de cada período, especialmente em função da proporção de óleo de canola. Sob refrigeração, as nanopartículas mantiveram-se estruturalmente preservadas, enquanto em temperatura ambiente observou-se maior variabilidade nos valores de PDI em formulações contendo $\geq 60\%$ de óleo de canola, refletindo heterogeneidade interna, mas sem evidências de instabilidade progressiva ao longo do tempo. Resultados semelhantes foram observados na comparação entre 60 e 90 dias, na qual não foram detectadas diferenças significativas nos valores médios de d.nm e PDI entre os tempos de análise. Ainda assim, em 25 °C, as formulações com maior teor de óleo de canola apresentaram diferenças mais evidentes entre si, reforçando o papel da composição lipídica na organização estrutural das nanoformulações quando armazenadas em condições térmicas menos favoráveis.

A comparação direta entre as duas condições de armazenamento, realizada por teste t pareado, confirmou que o diâmetro hidrodinâmico foi consistentemente maior nas amostras mantidas em temperatura ambiente em comparação às armazenadas sob refrigeração. No dia 7, essa diferença já foi significativa ($t(12) = 2,94$; $p = 0,012$) e se manteve até o dia 90 ($t(12) = 9,01$; $p < 0,00001$), evidenciando o papel da temperatura na reorganização da matriz lipídica, possivelmente associada a transições polimórficas, maior mobilidade dos lipídios líquidos e processos de coalescência parcial. Em contraste, o PDI não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre as temperaturas em nenhum dos tempos avaliados, indicando que, apesar do aumento no tamanho médio das partículas em temperatura ambiente, a uniformidade da distribuição de tamanhos foi amplamente preservada.

A análise por two-way ANOVA, realizada considerando todo o período de armazenamento para cada condição de temperatura avaliada, reforçou esses achados. Para as amostras armazenadas a 4 °C, o diâmetro apresentou apenas tendência de aumento ao longo do tempo ($F(4,48) = 2,47$; $p = 0,057$), sugerindo que a refrigeração foi eficaz em conter alterações estruturais significativas durante os 90 dias de armazenamento. Em temperatura

ambiente, não foram detectadas diferenças significativas entre os tempos para o diâmetro ($F(4,48) = 0,37$; $p = 0,832$). Em relação ao PDI, observou-se variação significativa ao longo do tempo em 25 °C ($F(4,48) = 3,02$; $p = 0,027$), enquanto em 4 °C houve apenas tendência ($p = 0,077$), sugerindo redistribuições internas da matriz lipídica induzidas pela temperatura.

Considerando o papel do óleo de canola, sua composição rica em triacilglicerídeos contendo radicais acil graxos insaturados tende a aumentar a desorganização da matriz lipídica, principalmente em condições mais quentes. Quanto maior for a fração de óleo insaturado na matriz lipídica, maior a mobilidade e menor a rigidez da matriz lipídica, o que pode facilitar reorganizações internas. Assim, enquanto na refrigeração sua viscosidade e baixa mobilidade favorecem a estabilidade, na temperatura ambiente há um favorecimento da reorganização interna e consequentemente a variação de tamanhos, comportamento alinhado com estudos clássicos sobre estabilidade de NLC contendo óleos vegetais (Radtke *et al*, 2014; Sakellari *et al*, 2022).

O potencial zeta das nanoformulações foi avaliado após armazenamento a 4 °C e 25 °C ao longo de 90 dias, com o objetivo de complementar a análise da estabilidade coloidal do sistema. De modo geral, todas as formulações apresentaram valores de potencial zeta negativos, variando aproximadamente entre -6 e -11 mV, independentemente da proporção de óleo de canola e da condição de armazenamento (Tabela 5).

A comparação entre as duas temperaturas não evidenciou diferenças estatisticamente significativas nos valores de potencial zeta para a maioria das formulações, indicando que a condição térmica não exerceu influência relevante sobre a carga superficial das nanopartículas. De forma semelhante, não foi observada tendência de variação progressiva do potencial zeta em função do tempo de armazenamento, sugerindo que a estabilidade eletrostática do sistema foi mantida ao longo dos 90 dias. Embora os valores absolutos de potencial zeta sejam relativamente baixos, esse comportamento é característico de carreadores lipídicos estabilizados predominantemente por mecanismos estéricos, como aqueles formulados com tensoativos não iônicos, a exemplo do Brij O10. Nesse contexto, a ausência de variações expressivas no potencial zeta, associada à manutenção do diâmetro hidrodinâmico e do índice de polidispersidade, indica que as nanoformulações permaneceram fisicamente estáveis, mesmo sob temperatura ambiente, com a estabilidade sendo governada

majoritariamente por repulsão estérica e organização da matriz lipídica, e não por interações eletrostáticas (Hogarth *et al*, 2024).

Tabela 5: Potencial zeta (ZP, mV) das nanoformulações sem licopeno (CLN-B) em diferentes concentrações, determinados após armazenamento a 4 °C e 25 °C, ao longo de 90 dias. Resultados expressos como média ± DP.

% Óleo de canola	Armazenamento	ZP mV
20	4° C	-7,48 ± 0,27
	25° C	-7,91 ± 0,95
25	4° C	-9,82 ± 0,23
	25° C	-9,12 ± 0,64
30	4° C	-8,54 ± 0,20
	25° C	-8,32 ± 0,34
35	4° C	-8,33 ± 0,18
	25° C	-9,95 ± 0,77
40	4° C	-6,13 ± 0,22
	25° C	-7,41 ± 0,17
45	4° C	-9,41 ± 0,21
	25° C	-8,33 ± 1,33
50	4° C	-8,36 ± 0,23
	25° C	-9,37 ± 0,83
55	4° C	-9,26 ± 0,66
	25° C	-8,38 ± 0,27
60	4° C	-8,45 ± 1,06
	25° C	-9,68 ± 0,14
65	4° C	-7,73 ± 0,63
	25° C	-8,34 ± 0,65
70	4° C	-10,77 ± 0,08
	25° C	-9,74 ± 0,27
75	4° C	-9,10 ± 0,63
	25° C	-8,11 ± 0,46
80	4° C	-9,98 ± 0,39
	25° C	-9,62 ± 0,66

5.2.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS CLN-L

A avaliação da estabilidade físico-química dos CLN-L durante o armazenamento foi conduzida por meio da comparação entre o diâmetro hidrodinâmico e o PDI obtidos a 4 °C e a 25 °C para cada porcentagem de extrato. Para isso, foi aplicado o teste *t* pareado entre as três réplicas de cada condição, permitindo determinar se a mudança de temperatura afeta significativamente a estrutura coloidal das nanopartículas, o teste One-Way ANOVA com *post hoc* Tukey para avaliar a interferência da quantidade de extrato em cada formulação dentro de cada período, representado no gráfico, e armazenamento analisado e o Two-Way ANOVA para avaliar simultaneamente o efeito do tempo de armazenamento e da porcentagem de extrato com licopeno sobre os parâmetros físico-químicos (d.nm e PDI), bem como a interação entre esses fatores (Figura 22).

De maneira consistente em todas as formulações, observou-se que o diâmetro hidrodinâmico aumentou quando as nanopartículas foram armazenadas a 25 °C. Todas as porcentagens de extrato apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), assim como o observado para os CLN-B. Esse comportamento sugere que o aumento da temperatura promove maior mobilidade dos lipídios, reorganização da matriz lipídica, possível expansão das cadeias hidrocarbônicas, tendência à fusão parcial e relaxamento estrutural, além do aumento da espessura da camada hidratada ao redor das partículas (Muller *et al*, 2002). Esse conjunto de efeitos resulta na expansão térmica das nanopartículas, fenômeno típico de NLCs estabilizados por surfactantes não iônicos (Doktorovova *et al*, 2010). As variações observadas indicam que formulações com maior fração líquida apresentam maior sensibilidade ao estresse térmico, refletindo reorganizações estruturais mais pronunciadas. Embora o diâmetro hidrodinâmico tenha aumentado em todas as formulações, o comportamento do PDI foi mais heterogêneo e dependente da concentração de óleo. Para a maioria das amostras (20–60%), não houve diferença significativa entre 4 °C e 25 °C ($p > 0,05$), indicando que o aumento no tamanho não foi acompanhado por perda relevante de uniformidade. Assim, apesar da expansão térmica, as nanopartículas mantiveram estabilidade estrutural, sem sinais de agregação ou desestabilização coloidal.

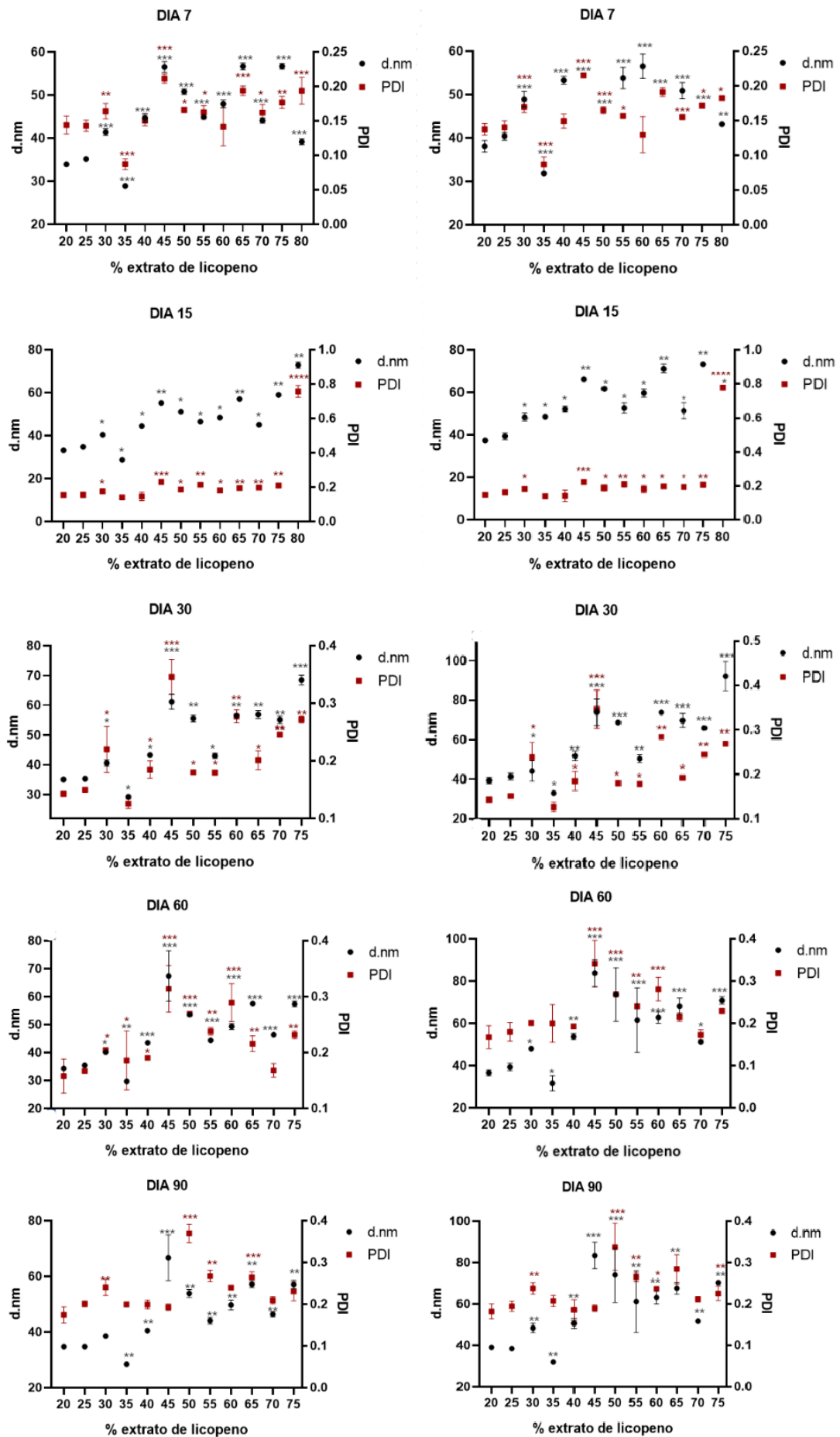


Figura 22: Efeito da composição de extrato contendo licopeno sobre o diâmetro hidrodinâmico (d.nm) e o índice de polidispersidade (PDI) dos CLN-L ao longo do armazenamento. Os gráficos da esquerda representam as amostras mantidas em geladeira (4 °C), enquanto os gráficos da direita correspondem às amostras armazenadas em temperatura ambiente (25 °C). Cada ponto representa a média $\pm$ desvio-padrão (n = 3). As análises foram realizadas nos dias 7, 15, 30, 60 e 90 após a síntese. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas entre as formulações dentro de cada tempo experimental, determinadas por One-Way ANOVA seguida do teste de Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

O One-Way ANOVA confirmou que tanto o diâmetro hidrodinâmico quanto o PDI variam em função da porcentagem de extrato com licopeno na formulação (d.nm: $F(12, 26) = 415,7$; $p < 0,0001$; PDI: $F(12, 26) = 67,4$; $p < 0,0001$). A análise *post hoc* de Tukey revelou grupos distintos de formulações, com padrões definidos de tamanho e polidispersidade. Formulações com baixos teores de extrato (20–40%) apresentaram diâmetros reduzidos e comportamento homogêneo, enquanto concentrações intermediárias (40–55%) exibiram aumento progressivo em d.nm e PDI. Já formulações mais concentradas (65–75%) apresentaram os maiores valores, caracterizando um grupo estatisticamente separado. Esses resultados reforçam que pequenas variações na razão entre fase sólida e fase líquida são suficientes para alterar a organização interna das nanopartículas obtidas pelo método PIT, influenciando diretamente a fluidez e a estrutura final do sistema.

Nos gráficos correspondentes às amostras mantidas sob refrigeração, observa-se que no 7º dia, as formulações apresentaram tamanhos médios estáveis em torno de $44,67 \pm 8,79$ nm e PDI baixo $0,161 \pm 0,032$, indicando boa homogeneidade e estabilidade coloidal. Mesmo após 15 dias, a variação no tamanho das partículas foi mínima com diâmetro de $46,81 \pm 8,26$ nm e PDI de $0,186 \pm 0,028$. Essa estabilidade sugere que a baixa temperatura retardou processos de recristalização e coalescência, preservando a integridade das nanopartículas. As amostras armazenadas em temperatura ambiente mostraram aumento gradativo no diâmetro médio das partículas, com $52,76 \pm 12,09$ nm no 7º dia e $55,19 \pm 11,26$ nm no 15º dia. O PDI variou de $0,158 \pm 0,032$ para $0,181 \pm 0,028$ no 15º dia. O armazenamento em temperatura ambiente promoveu aumento progressivo do tamanho e da polidispersividade, principalmente em formulações com maior teor de licopeno.

A formulação contendo 80% de extrato com licopeno apresentou valores mais elevados de diâmetro e PDI, resultado atribuído à separação de fases observada na análise do 15º dia, tanto para a formulação armazenada em geladeira quanto em temperatura ambiente. Essa instabilidade levou à formação de agregados e heterogeneidade na dispersão, que foi observada nos valores de $72,82 \pm 1,39$ nm para o diâmetro hidrodinâmico e $PDI = 0,757 \pm$

0,034, indicando maior polidispersividade e perda da uniformidade do sistema. Devido a isso, não foram realizadas análises dessa formulação nas etapas seguintes.

No período entre 7 e 15 dias, observou-se efeito da porcentagem de extrato nas nanoformulações ($F(12,52) = 1013,3$; $p < 0,0001$), confirmando que a variação da razão lipídica impacta a estrutura das nanopartículas. Além disso, o fator “dia de armazenamento” também apresentou efeito significativo ($F(1,52) = 304,5$; $p < 0,0001$), indicando que o sistema sofreu reorganização estrutural, mesmo sob refrigeração. De forma importante, foi detectada interação entre porcentagem de extrato e tempo ($F(12,52) = 248,8$; $p < 0,0001$), demonstrando que o efeito do armazenamento não é uniforme entre as formulações, algumas composições são mais sensíveis ao tempo, exibindo maior variação de tamanho, enquanto outras permanecem mais estáveis ao longo do período avaliado.

Na análise do dia 30, os CLN-L apresentaram aumento gradual do diâmetro e elevação do PDI, com diâmetro $48,35 \pm 11,87$ nm e PDI $0,210 \pm 0,064$ para as armazenadas à 4 °C, e $58,67 \pm 17,65$ nm e PDI $0,211 \pm 0,065$ para as armazenadas em temperatura ambiente. O teste *t* pareado não apresentou variação significativa no PDI, mas confirmou o aumento observado no diâmetro ($p < 0,05$), indicando sensibilidade da matriz lipídica à temperatura. As maiores diferenças foram encontradas nas formulações com 45%, 55% e 65% de óleo, que apresentaram aumento expressivo no diâmetro ($p < 0,001$). Apenas a formulação contendo 75% de óleo não apresentou diferença significativa ($p = 0,41$), sugerindo maior estabilidade térmica relativa. Isso sugere que o licopeno pode atuar como um modulador da estrutura interna dos CLNs, interferindo na organização dos lipídeos durante a cristalização. Por ser altamente hidrofóbico e apolar, dificulta a compactação ordenada da matriz sólida, gerando zonas amorfas e de menor coesão, o que leva à heterogeneidade do sistema e aumento do PDI ao longo do armazenamento (Akhoond Zardini *et al*, 2018; Jandang *et al*, 2024).

No dia 30, o efeito da composição permaneceu significativo ($F(11,24) = 411,7$; $p < 0,0001$), embora com menor magnitude em comparação ao dia 15 ($F(11,24) = 589,4$; $p < 0,0001$). A comparação entre os valores de PDI obtidos nos dias 15 e 30 evidenciou que o efeito do tempo sobre a polidispersidade é dependente da composição lipídica. Nas formulações com menor teor de óleo de canola (20% e 25%), observou-se uma discreta redução do PDI ao longo do tempo, sugerindo estabilização da distribuição de tamanhos e maior homogeneidade do sistema. De forma semelhante, as formulações 50% e 55% também

apresentaram diminuição do PDI no dia 30 em relação ao dia 15, indicando reorganização estrutural em direção a um estado mais uniforme. Em contraste, formulações contendo 30%, 40%, 45%, 60%, 65%, 70% e 75% de óleo mostraram aumento do PDI no dia 30, com destaque para as proporções de 45% e 60%, nas quais a polidispersidade aumentou de forma mais acentuada. Esse comportamento indica que, nessas composições, o armazenamento promove maior heterogeneidade da população de partículas, possivelmente associada à formação de subpopulações de tamanhos distintos e à reorganização tardia da matriz lipídica. Esses resultados reforçam que o impacto do tempo de armazenamento sobre a estabilidade coloidal não é uniforme entre as formulações.

A comparação entre os resultados obtidos no dia 30 e no dia 60 mostra padrões de estabilidade física dos sistemas, influenciados tanto pela condição de armazenamento quanto pela proporção de extrato com licopeno utilizados nas formulações. Nos gráficos referentes às amostras refrigeradas, as nanoformulações mantiveram comportamento mais estável ao longo do tempo, apresentando menor variação tanto no tamanho médio das partículas quanto no PDI. No dia 30, os tamanhos permaneceram entre $29,24 \pm 0,36$ nm e $92,22 \pm 7,30$ nm com PDI entre $0,1255 \pm 0,0082$ e $0,4622 \pm 0,0292$. No dia 60, mesmo havendo ligeiro aumento em alguns pontos, principalmente na faixa de 45 e 50% de extrato com licopeno, a maior parte das formulações manteve-se próxima das faixas observadas, sem evidências de crescimento acentuado, com diâmetro que variou de $29,70 \pm 0,25$ nm e $83,78 \pm 6,37$ nm e PDI de $0,2336 \pm 0,0584$. Esse comportamento está em concordância com o esperado para esses sistemas nanoestruturados, principalmente os resultados das diferentes condições de armazenamento, já que a menor energia térmica reduz a taxa de coalescência e de reorganização lipídica, favorecendo a manutenção da estrutura ao longo do tempo (Qian *et al.*, 2013; Choi & McClements, 2020). Foi possível observar que as nanoformulações mantidas em temperatura ambiente apresentaram maior amplitude de variação já no dia 30, especialmente com 45 e 75% de extrato com licopeno, onde alguns tamanhos ultrapassam 70 nm. No dia 60 essa tendência se intensifica, especialmente nas formulações contendo acima de 40% de extrato armazenadas em temperatura ambiente, que chegam a atingir valores acima de 80 nm. Esse conjunto sugere maior sensibilidade dessas formulações a processos de reorganização interna, mobilidade lipídica e oxidação dos carotenóides, fenômenos que são acelerados em temperaturas acima da faixa fria e estão bem descritos na literatura para nanocarreadores

lipídicos contendo carotenóides (Kehili *et al*, 2019; Rostamabadi *et al*, 2019; Rehman *et al*, 2020).

A avaliação da influência do tempo de armazenamento sobre as propriedades físico-químicas das nanoformulações demonstrou diferenças significativas em função da composição lipídica (Two-Way ANOVA; $p < 0,0001$ para d.nm e para PDI). Para o diâmetro hidrodinâmico, a interação entre tempo e formulação também foi significativa, indicando que o efeito do tempo depende da proporção de extrato empregada. O teste de Tukey revelou aumentos significativos no tamanho médio em formulações intermediárias (30–60%) e particularmente acentuados em 45% (+22,6 nm) e 55% (+19,8 nm), sugerindo transições polimórficas e reorganização da matriz lipídica entre 30 e 60 dias. O PDI apresentou comportamento semelhante, com aumento significativo em 35%, 50% e 55%, indicando redução da uniformidade nessas formulações com o avanço do armazenamento. A formulação 75% apresentou diminuição significativa do PDI, sugerindo compactação estrutural e possível reorganização para estados mais homogêneos.

A comparação entre os valores de PDI aos 60 e 90 dias mostrou que as nanoformulações permaneceram estáveis ao longo do período avaliado. O diâmetro das formulações variou de $28,43 \pm 0,38$ a $83,40 \pm 6,56$ nm, que quando comparado ao do dia 60 ($29,70 \pm 0,25$ nm e $83,78 \pm 6,37$ nm), não indica tendência de aumento de heterogeneidade. A variação do PDI manteve-se semelhante entre os dois períodos com média de $0,2298 \pm 0,0495$ para 90 dias e $0,2336 \pm 0,0584$ para 60 dias. Apesar desse aumento, a diferença é moderada e não caracteriza perda significativa de estabilidade. A ausência de aumentos acentuados ou valores extremos de PDI reforça que as nanoestruturas permaneceram estáveis em ambos os períodos, com média menor que 0,25 (Sharma *et al*, 2021). Esses resultados reforçam a estabilidade físico-química do sistema, mesmo após três meses de armazenamento (Efendi *et al*, 2024). A comparação entre os tempos de armazenamento de 60 e 90 dias revelou alterações significativas nos parâmetros físico-químicos das nanoformulações, indicando que o comportamento coloidal ao longo do tempo é fortemente dependente da composição lipídica. De acordo com os testes estatísticos realizados, houve efeito significativo do tempo ($p < 0,0001$), da formulação ($p < 0,0001$) e da interação tempo vs. formulação ($p < 0,0001$) sobre o diâmetro hidrodinâmico, demonstrando que a magnitude e o sentido das mudanças variam de acordo com a porcentagem de extrato presente na matriz lipídica.

O teste de Tukey confirmou que, entre 60 e 90 dias, a maior parte das formulações apresentou redução no tamanho das nanopartículas no armazenamento à 4° C. Reduções ($p < 0,001$) foram observadas em 40%, 55%, 60% e 70%, enquanto decréscimos ocorreram em 45%, 75% ($p < 0,01$) e 30%, 50% ($p < 0,05$). Em contrapartida, as formulações 20%, 25% e 35% mantiveram estabilidade dimensional ao longo do período ($p > 0,05$), indicando maior resistência a rearranjos estruturais tardios. A formulação 65% foi a única a apresentar aumento significativo de tamanho ($p < 0,05$), o que pode estar relacionado à formação de estruturas mais hidratadas ou reorganização superficial que favorece expansão vesicular. Para o PDI, o teste estatístico revelou efeito significativo do tempo ($p = 0,018$), da formulação ($p < 0,0001$) e da interação tempo vs. formulação ($p = 0,004$), indicando que a uniformidade das nanopartículas também se altera de maneira dependente da composição lipídica. O teste de Tukey demonstrou que algumas formulações exibiram aumento de PDI entre 60 e 90 dias, como 30% ($p < 0,05$) e 65% ($p < 0,05$) armazenadas em temperatura ambiente, sugerindo perda de homogeneidade e possível início de instabilidade, possivelmente associada a relaxamento da interface ou redistribuição dos lipídios interno-superficiais. Por outro lado, algumas formulações apresentaram redução significativa do PDI, indicando ganho de uniformidade ao longo do armazenamento. Isso foi observado principalmente em 45% ($p < 0,001$) e em menor intensidade em 75% ($p < 0,01$). As demais formulações não apresentaram mudanças estatisticamente significativas ($p > 0,05$), indicando estabilidade coloidal satisfatória ao longo do período avaliado.

O pH das nanoformulações avaliadas variou entre $5,20 \pm 0,46$ para os CLN-L no período de 90 dias, valor considerado ideal para aplicações dermatológicas e cosméticas e próximo ao encontrado para os CLN-B. Foi observado que a temperatura não proporcionou variações no pH nas formulações. Essa faixa levemente ácida aproxima-se do pH fisiológico da superfície cutânea, cuja variação natural situa-se entre 4,7 e 5,8 (Lambers *et al*, 2006). A manutenção de um pH próximo ao da pele é fundamental para garantir integridade da barreira epidérmica, estabilidade enzimática e preservação da microbiota, reduzindo riscos de irritação e inflamação associados a formulações mais alcalinas (Ali & Yosipovitch, 2013).

Para sistemas nanoestruturados, um pH próximo ao fisiológico contribui diretamente para a estabilidade físico-química das partículas e para a integridade dos compostos bioativos encapsulados. Estudos demonstram que nanoformulações lipídicas destinadas ao uso tópico apresentam melhor desempenho e maior estabilidade quando formuladas em pH entre 5,0 e

6,0, especialmente quando contêm bioativos lipofílicos sensíveis, como carotenoides (Müller *et al*, 2002; Jennings, Costa *et al*, 2021). Nesta faixa, há menor risco de degradação hidrolítica e maior compatibilidade com surfactantes não iônicos amplamente utilizados em sistemas CLNs e NLS. Além disso, carotenóides como o licopeno apresentam maior estabilidade em ambientes levemente ácidos. Em pH abaixo de 7, a taxa de oxidação, isomerização e clivagem oxidativa é reduzida, processos que são acelerados em valores neutros ou alcalinos (Khoo *et al*, 2011; Rodriguez-Amaya, 2019). Do ponto de vista de aplicação cosmética, formulações com pH entre 5,0 e 6,0 são recomendadas para produtos dermocosméticos pois promovem menor perturbação da barreira lipídica, melhor sensação sensorial e compatibilidade com peles sensíveis (Lopes *et al*, 2010).

A análise integrada dos tempos 1, 7, 15, 30, 60 e 90 dias (Tabela 6) demonstra que as nanoformulações se mantêm estáveis ao longo de todo o período avaliado. Em relação ao diâmetro hidrodinâmico, observou-se que todas as formulações apresentaram valores menores quando armazenadas a 4 °C, enquanto temperaturas de 25 °C resultaram em aumentos consistentes no tamanho das partículas. A magnitude desse aumento, entretanto, variou conforme a concentração do extrato contendo licopeno. Formulações entre 20 e 35% de extrato apresentaram menor expansão ao serem expostas a 25 °C. Em contraste, concentrações superiores a 45% exibiram aumentos acentuados no diâmetro, sugerindo que a matriz lipídica começa a aproximar-se de um limite de saturação, tornando as partículas mais suscetíveis à agregação e reorganização interna. O PDI variou entre 0,13 e 0,24 para a maior parte das formulações, onde as menores variações foram observadas nas formulações entre 20 e 35%, indicando distribuição mais uniforme e menor ocorrência de núcleos múltiplos ou populações heterogêneas. À medida que a concentração de extrato aumentou, observou-se uma tendência sutil ao aumento do PDI, embora ainda dentro de limites aceitáveis. Esse comportamento está alinhado com a literatura, que aponta que cargas lipofílicas elevadas podem interferir nas imperfeições cristalinas da matriz, favorecendo a formação de gotículas de tamanhos variados e aumentando a heterogeneidade (Kehili *et al*, 2019). Ainda assim, o fato de o PDI permanecer relativamente estável mesmo a 25 °C demonstra que o surfactante Brij O10 forneceu estabilização estérica adequada para todas as formulações.

Tabela 6: Caracterização por DLS das nanoformulações com licopeno em diferentes concentrações, apresentando o diâmetro médio (d.nm), o índice de polidispersividade (PDI) e o potencial zeta (ZP, mV), determinados após armazenamento a 4 °C e 25 °C, ao longo de 90 dias. Resultados expressos como média $\pm$ DP.

% Extrato com licopeno	Armazenamento	d.nm	PDI	ZP mV
20	4° C	34,05 $\pm$ 0,86	0,1505 $\pm$ 0,0227	-8,80 $\pm$ 1,46
	25° C	38,07 $\pm$ 1,01	0,1523 $\pm$ 0,0209	-8,64 $\pm$ 1,31
25	4° C	35,12 $\pm$ 0,51	0,1671 $\pm$ 0,0271	-11,15 $\pm$ 2,08
	25° C	39,86 $\pm$ 1,07	0,1597 $\pm$ 0,0205	-11,92 $\pm$ 1,33
30	4° C	40,41 $\pm$ 1,14	0,1951 $\pm$ 0,0392	-13,79 $\pm$ 3,62
	25° C	47,74 $\pm$ 1,82	0,1900 $\pm$ 0,0375	-15,16 $\pm$ 2,26
35	4° C	28,83 $\pm$ 0,61	0,1316 $\pm$ 0,0645	-10,86 $\pm$ 1,77
	25° C	31,74 $\pm$ 0,87	0,1386 $\pm$ 0,0563	-8,17 $\pm$ 5,69
40	4° C	43,40 $\pm$ 1,53	0,1984 $\pm$ 0,0732	-11,63 $\pm$ 5,15
	25° C	52,51 $\pm$ 1,25	0,1713 $\pm$ 0,0189	-13,19 $\pm$ 3,70
45	4° C	60,04 $\pm$ 7,10	0,2322 $\pm$ 0,0682	-19,10 $\pm$ 10,74
	25° C	73,51 $\pm$ 8,61	0,2449 $\pm$ 0,0766	-20,07 $\pm$ 12,06
50	4° C	52,54 $\pm$ 2,09	0,2184 $\pm$ 0,0791	-12,87 $\pm$ 5,38
	25° C	66,77 $\pm$ 6,13	0,2173 $\pm$ 0,0675	-15,09 $\pm$ 5,28
55	4° C	44,77 $\pm$ 1,35	0,2245 $\pm$ 0,0508	-11,83 $\pm$ 3,98
	25° C	54,24 $\pm$ 6,16	0,2123 $\pm$ 0,0386	-13,31 $\pm$ 2,91
60	4° C	49,98 $\pm$ 3,21	0,2036 $\pm$ 0,0544	-15,33 $\pm$ 8,66
	25° C	61,95 $\pm$ 6,57	0,2142 $\pm$ 0,0482	-17,97 $\pm$ 8,34
65	4° C	57,04 $\pm$ 0,81	0,2093 $\pm$ 0,0317	-17,52 $\pm$ 6,31
	25° C	66,61 $\pm$ 7,48	0,2124 $\pm$ 0,0284	-18,20 $\pm$ 5,65
70	4° C	47,00 $\pm$ 3,90	0,2006 $\pm$ 0,0367	-14,49 $\pm$ 5,92
	25° C	58,80 $\pm$ 12,97	0,2116 $\pm$ 0,0239	-17,02 $\pm$ 5,38

As amostras com o carotenóide, quando comparadas aos CLN-B, apresentaram aumento significativo no tamanho das partículas e maior PDI, especialmente nas concentrações acima de 65% de extrato com licopeno. A forte hidrofobicidade do licopeno faz com que ele perturbe o empacotamento cristalino dos lipídeos sólidos, ocupando as regiões de imperfeição entre as cadeias lipídicas, impedindo o empacotamento ordenado de

lipídeos sólidos. Isso aumenta o espaço interno entre as cadeias e torna a matriz mais flexível e menos rígida, padrão já relatado em outros trabalhos (Kim *et al*, 2014; Zhao *et al*, 2020; Akhoond *et al*, 2021; Sharma *et al*, 2021). Em CLNs, lipídeos tendem a se reorganizar para polimorfos mais estáveis, processo que pode gerar expulsão parcial do bioativo e redução da estabilidade coloidal (Queiroz & Muehlmann, 2024). Esse rearranjo também diminui a curvatura interfacial e favorece a fusão ou agregação de nanopartículas, resultando no aumento do diâmetro hidrodinâmico detectado por DLS (Qian *et al*, 2013).

O trabalho de Singh *et al* (2017), desenvolveu um CLN com licopeno com diâmetro de $121,9 \pm 3,66$ nm, índice de polidispersividade $0,370 \pm 0,97$ e potencial Zeta de $-29,0 \pm 0,83$ mV. Já o trabalho de Vasconcelos (2021) produziu nanocápsulas com núcleo lipídico com tamanho médio de 245,53 nm, PDI 0,1508 e potencial Zeta de $-24,83$ mV. Ambos os trabalhos observaram um aumento gradativo do tamanho das partículas devido à incorporação do licopeno na matriz lipídica, assim como neste trabalho. Diferente do que ocorreu na formulação com 80% extrato, a formulação 80% de óleo de canola não sofreu separação de fases até o final do período de análise. Essa diferença mostra que o óleo de canola isolado fornece uma matriz lipídica mais estável, enquanto a incorporação do licopeno modifica a cristalização lipídica e pode comprometer a estabilidade física, especialmente nas formulações com maior fração lipídica.

O aumento do PDI nos sistemas mantidos à temperatura ambiente, frequentemente atingindo valores próximos de 0,3–0,4, reforça a hipótese de formação de subpopulações de diferentes tamanhos ao longo do armazenamento. Esse tipo de comportamento está associado à redução da estabilidade cinética, à reorganização da interface e ao aumento do risco de crescimento descontrolado de gotículas por *Ostwald ripening*. O crescimento descontrolado de gotículas por *Ostwald ripening* se refere ao fenômeno em sistemas coloidais, como emulsões e nanopartículas, em que gotículas menores se dissolvem ou liberam moléculas na fase contínua e essas moléculas se transferem e se incorporam em gotículas maiores, que crescem ainda mais. Isso provoca um aumento do tamanho médio das gotículas e pode provocar instabilidade do sistema (Yao *et al*, 1993; Dong *et al*, 2023). A presença de licopeno pode contribuir para essa instabilidade, especialmente quando combinado com maior difusibilidade do óleo de canola na matriz lipídica em temperatura ambiente, favorecendo transições polimórficas. Estudos demonstram que o licopeno pode sofrer migração para a

interface e alterar o equilíbrio interfacial em condições térmicas mais elevadas (Kim & Choi, 2020; Sharma *et al*, 2021; Álvarez-García *et al*, 2024).

5.2.5 ESTABILIDADE ACELERADA DOS CLN-L

Em todas as etapas do ensaio de estabilidade, a maioria das nanoformulações apresentou boa resistência à centrifugação, mantendo-se homogênea, sem evidência de sedimentação ou *creaming* visível, o que sugere que a estrutura coloidal formada pelo sistema Brij O10, manteiga de murumuru e óleo de canola foi capaz de resistir à força centrífuga aplicada. Somente duas formulações apresentaram instabilidade, sendo a formulação com 75% e 80% de extrato com licopeno (Figura 23). Na formulação com 75% foi observado a coalescência após 10.000 rpm, onde ocorre a fusão das gotículas de óleo, levando ao aumento de tamanho e gerando a instabilidade (Qian *et al*, 2013). Já na formulação com 80% de extrato, o fenômeno observado foi o *cracking*, que diferente do *creaming* (reversível por agitação), o *cracking* envolve a quebra irreversível da emulsão/nanoformulação, pois a interface coloidal não consegue ser restaurada (Qian *et al*, 2013).

Esses resultados indicam que, a partir desse ponto de saturação lipídica, a rede de tensoativo e lipídeos sólidos não foi suficiente para manter o sistema disperso de forma estável frente ao estresse físico. O excesso de fase oleosa provavelmente favoreceu a coalescência e a migração de gotículas, culminando na separação observada. Esse resultado ainda confirma o encontrado na análise por DLS onde as nanoformulações com 75 e 80% de extrato apresentaram elevado PDI e aumento do diâmetro hidrodinâmico. As análises de DLS confirmaram que as variações observadas nas outras formulações foram pequenas e permaneceram dentro dos limites aceitáveis, indicando adequada estabilidade coloidal.

A manutenção da estabilidade frente a um estresse físico intenso, como o imposto pela centrifugação a 10.000 rpm, é indicativa de uma boa robustez coloidal do sistema. Esse comportamento sugere que a formulação possui resistência adequada a condições adversas de manipulação, transporte e armazenamento, aumentando a confiabilidade de seu desempenho em escala prática. Estudos anteriores relatam que emulsões e nanodispersões instáveis geralmente apresentam separação visível já em rotações mais baixas (3.000–5.000 rpm) (Tadros, 2013) o que reforça a relevância da estabilidade observada para a nanoformulação desenvolvida no presente estudo. Além disso, o teste mostrou-se uma ferramenta útil de

triagem para comparação de lotes e de formulações em diferentes proporções de lipídeos e tensoativos.

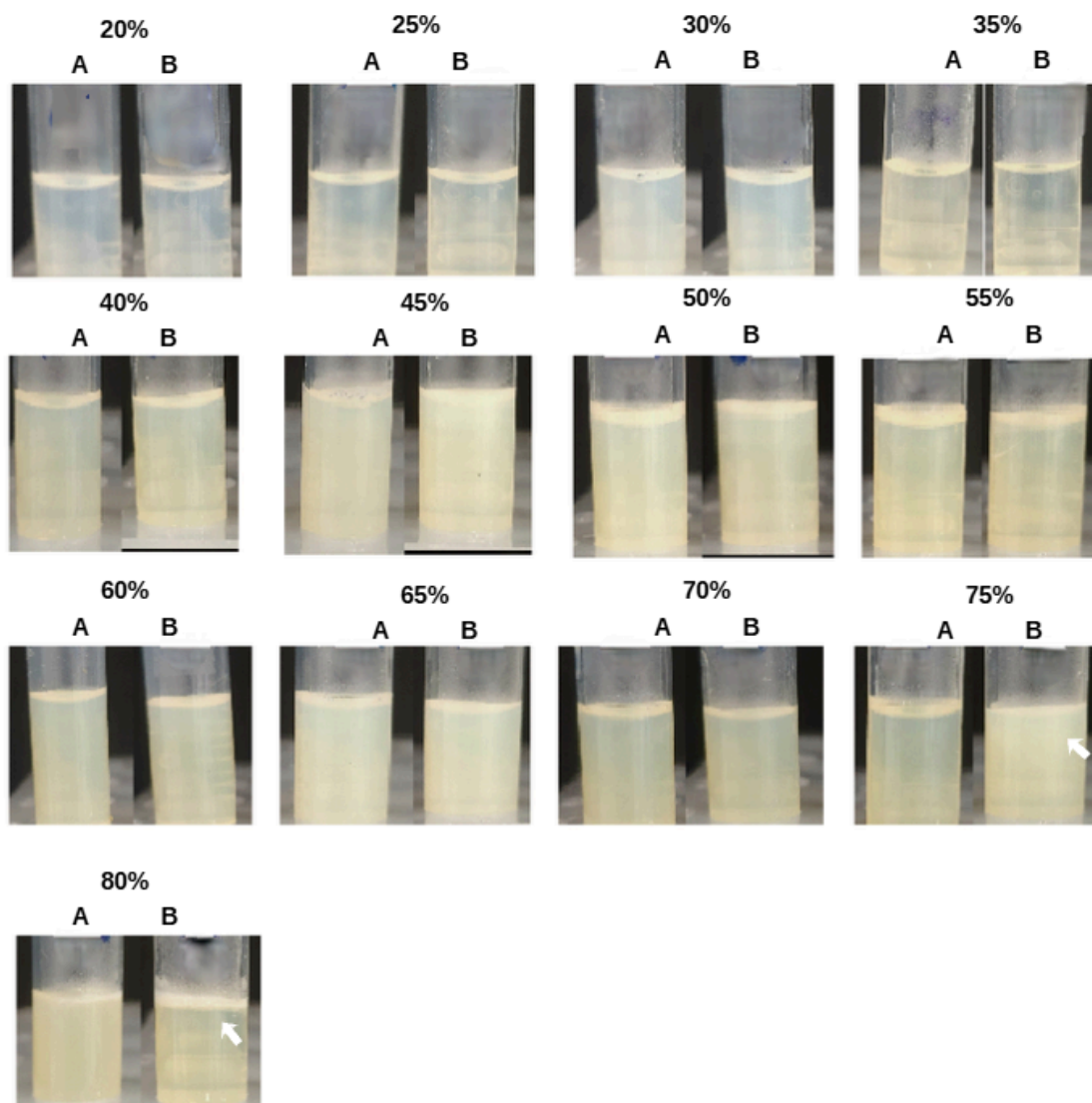


Figura 23: Comparação visual dos CLN-L antes (A) e após centrifugação (B) a 10.000 rpm por 60 minutos a 25 °C (coluna direita), nas diferentes proporções de extrato. Setas brancas indicam as alterações observadas.

5.2.6 MORFOLOGIA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

A Figura 24 apresenta as micrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) dos CLN-L 70, nas magnificações de 40.000 $\times$, 15.000 $\times$ e 10.000 $\times$ (Figura 24 A, B e C, respectivamente). Observam-se nanopartículas predominantemente esféricas, com distribuição homogênea e ausência de aglomeração evidente, indicando boa

estabilidade coloidal e interação eficiente entre os constituintes lipídicos e o licopeno encapsulado.

Foi possível observar diferenças de contraste entre o núcleo e a borda das nanopartículas. Essas diferenças são frequentemente associadas à heterogeneidade na densidade eletrônica dos constituintes lipídicos e podem indicar a presença de um núcleo mais denso, tipicamente rico em lipídeos sólidos ou bioativos encapsulados, além de uma região superficial menos densa, composta por lipídeos líquidos ou camadas de surfactantes estabilizantes. Esse fenômeno é indicativo da organização interna dos CLNs (Queiroz & Muelhmann, 2024). Segundo Muller *et al* (2002), tais contrastes também podem ser intensificados pelo uso de agentes de fixação como tetróxido de ósmio (OsO_4), que reagem de forma diferencial com lipídeos saturados e insaturados, revelando zonas de maior acúmulo lipídico no interior da partícula. A presença de núcleos eletrondensos observados nas imagens pode estar relacionada à localização do composto bioativo encapsulado (como o licopeno), que tende a se acomodar preferencialmente nas regiões mais hidrofóbicas da matriz lipídica, favorecendo uma organização com gradiente interno de densidade visível por MET.

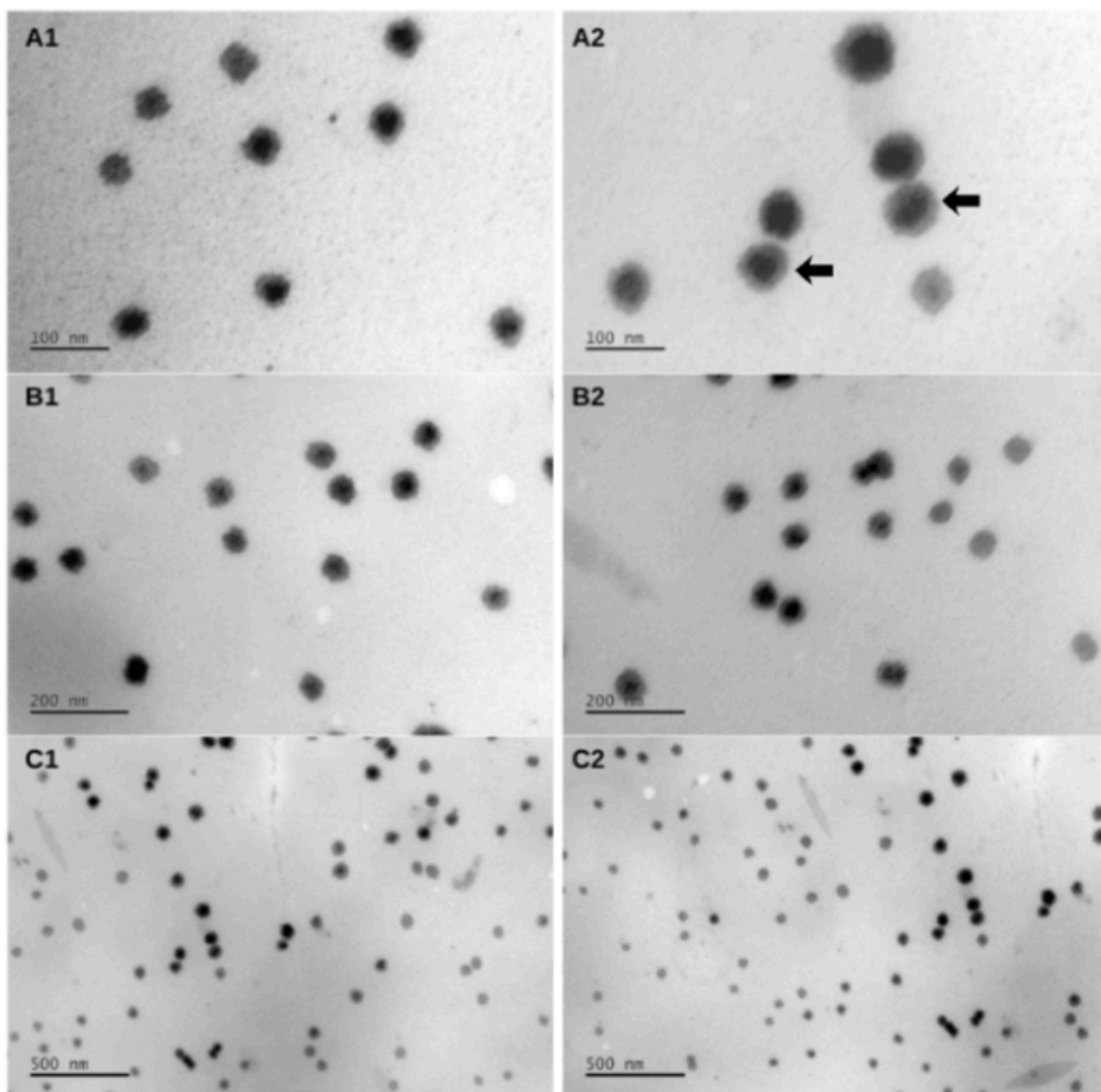


Figura 24: Micrografias MET dos CLN-L 70 em diferentes aumentos: (A1–A2) 40.000 $\times$; (B1–B2) 15.000 $\times$; (C1–C2) 10.000 $\times$. Setas pretas regiões com maior eletrodensidade no interior das nanopartículas, sugerindo a presença de núcleos lipídicos mais densos em relação à superfície. Escala inserida nas imagens.

A forma esférica regular e os tamanhos sugerem compatibilidade com os dados obtidos por DLS e aparentam eficiência na nanoencapsulação do licopeno, com preservação morfológica adequada, mesmo em diferentes escalas de ampliação. Além disso, a ausência de artefatos estruturais ou colapsos morfológicos reforça a eficácia do protocolo de preparação direta com OsO_4 , sem necessidade de inclusão em resina.

5.3 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO (EE%)

A eficiência de encapsulamento (EE%) do licopeno nas nanoformulações variou entre 21,72% e 49,75%, apresentando comportamento inversamente proporcional à concentração inicial de extrato empregada. Onde há menor concentração, existe uma melhor dispersão, melhor encapsulação e conseqüentemente melhor proteção do ativo. Conforme mostrado na Tabela 7, as formulações com maior teor de extrato exibiram menores valores de EE%, como por exemplo 21,72% na concentração de 60% de extrato, enquanto as formulações com menor concentração alcançaram eficiências superiores, chegando a 54,08% na amostra com 20% de extrato.

Tabela 7: Quantificação do teor de Licopeno de acordo com área do pico observado na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) das nanoformulações e eficiência de encapsulamento (EE%).

Nanoformulação (% de extrato)	Área (unidades)	Concentração de Licopeno (µg/mL)	Concentração de Licopeno teórica (µg/mL)	EE%
70	74515	1,899	7,43	25,54
65	53857	1,658	6,90	24,00
60	30518	1,384	6,37	21,72
55	31962	1,401	5,84	23,98
50	43295	1,534	5,31	28,88
45	21266	1,276	4,78	26,69
40	15467	1,208	4,25	28,43
35	11022	1,156	3,71	31,17
30	6404	1,102	3,18	34,58
25	14988	1,203	2,65	45,29
20	2544	1,057	2,12	49,75

Os resultados obtidos demonstraram que, independentemente da concentração inicial de extrato contendo licopeno adicionada à formulação, a quantidade efetivamente encapsulada manteve-se relativamente constante, variando entre 1,057 e 1,899 µg/mL. Esse comportamento indica que o sistema lipídico atingiu um limite de capacidade de carga, característico de nanopartículas do tipo NLS e CLNs, onde a estrutura interna apresenta uma quantidade limite de sítios capazes de acomodar moléculas bioativas, onde o excedente migra

para a superfície (Queiroz & Muehlmann, 2024). Assim, mesmo com o aumento do teor de extrato (de 20% até 70%), não foi observado ganho proporcional na concentração de licopeno encapsulado, refletindo em uma redução progressiva da EE%. Esse resultado indica que o aumento da carga de licopeno tende a saturar a matriz lipídica, reduzindo a capacidade de incorporação do composto. Na Figura 25 está representado o cromatograma do extrato e dos CLN-L contendo diferentes proporções de extrato.

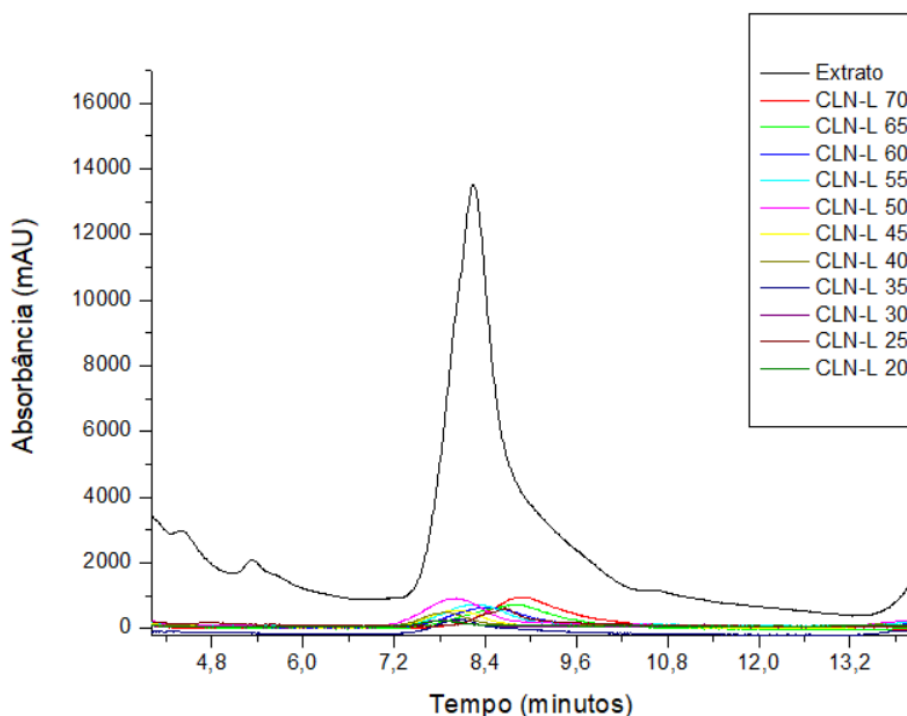


Figura 25: Cromatograma representativo do extrato contendo licopeno e das nanoformulações CLN-L contendo diferentes proporções de extrato (20–70%), obtido por HPLC com detecção a 472 nm. Imagem gerada pelo OriginPro 7.

A EE% de compostos lipofílicos como o licopeno está diretamente associada à capacidade da matriz de acomodar o ativo. Em concentrações mais baixas, o licopeno pode ser totalmente solubilizado e distribuído de forma homogênea no veículo lipídico, resultando em uma matriz mais estável e em maior EE%. Já na presença de concentrações elevadas, a capacidade de acomodar o ativo é ultrapassada, ocorrendo agregação, precipitação ou migração do licopeno para a fase aquosa ou interface, o que reduz a fração encapsulada.

Quando a carga é muito elevada, a matriz torna-se menos eficiente na proteção e a fração livre de licopeno aumenta, o que pode comprometer tanto a recuperação quanto a

estabilidade do composto. Uma vez que há mais moléculas no meio, há mais proximidade molecular com maior quantidade de oxigênio ao redor das moléculas, aumentando a probabilidade de reações em cadeia, ou seja, mais carga, mais efeito induzido pelo meio vizinho, mais domínio oxidativo (Przybylska, 2020). Por outro lado, concentrações mais baixas permitem uma distribuição mais uniforme do licopeno entre as fases sólidas e líquidas da matriz lipídica, resultando em um encapsulamento mais eficiente. Consequentemente, a fração protegida dentro do núcleo lipídico permanece praticamente inalterada, enquanto a parte superficial é mais vulnerável à degradação. Dessa forma, a escolha do extrato com concentração de 4,25 µg/mL de licopeno mostrou-se fundamentada quando correlacionada aos resultados de EE%. A Figura 26 apresenta os perfis cromatográficos das nanoformulações CLN-L 70, CLN-L 60 e CLN-L 20, selecionadas como representativas do sistema por corresponderem, respectivamente, à formulação com maior quantidade de extrato incorporado, àquela com menor eficiência de encapsulação e à formulação com maior eficiência de encapsulação (EE%).

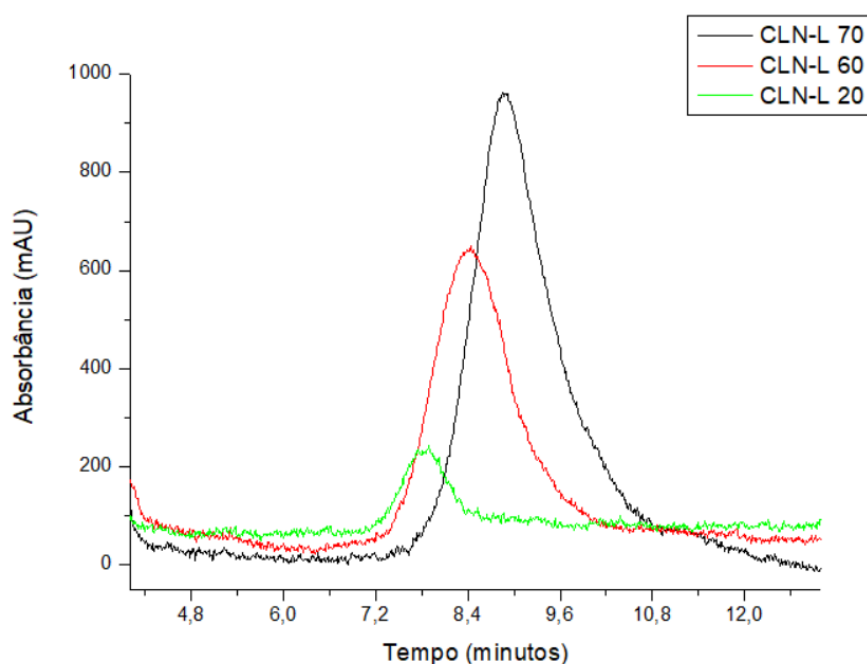


Figura 26: Cromatograma representativo das nanoformulações CLN-L 20, CLN-L 60 e CLN-L 70, obtido por HPLC com detecção a 472 nm. Imagem gerada pelo OriginPro 7.

A EE% entre 21–49% encontrada neste estudo é coerente com trabalhos envolvendo encapsulamento de carotenóides em SLN e NLC produzidos por métodos de baixa energia. Diversos estudos relatam valores reduzidos devido ao alto caráter hidrofóbico e estrutura

rígida dos carotenóides, aliados à sua baixa solubilidade em lipídeos sólidos. Zhang *et al* (2021) observaram EE% de 18–40% para licopeno encapsulado em NLCs produzidos com óleo vegetal. Trombino *et al* (2021) relataram dificuldades na solubilização de carotenóides de resíduos de tomate, com encapsulamento limitado pela matriz lipídica. Kehili *et al* (2019) demonstraram que carotenóides extraídos de resíduos agroindustriais apresentam variabilidade de solubilidade que limita o carregamento lipídico. Assim, os valores observados no presente trabalho estão dentro do intervalo esperado para sistemas lipídicos estabilizados por surfactantes não iônicos e preparados por métodos verdes, como o PIT.

Em sistemas de nanopartículas lipídicas a carga de ativo deve estar abaixo da capacidade máxima de incorporação da matriz lipídica para manter integridade, dispersão e estabilidade do sistema (Queiroz & Muehlmann, 2024; Ludtke *et al*, 2025). O trabalho de Álvarez-García (2024) demonstrou uma EE% que variou de 48-75% ao produzir emulsões carregadas com licopeno com tamanho de 2 µm e capacidade de carga que variou de 0,007-0,15 mg/g, demonstrando também variação na taxa de encapsulamento desse ativo. Liu (2024) produziu lipossomas carregados com licopeno com concentração de 498,66 µg/mL de peso seco com EE% entre 80-95%, em uma faixa de temperatura entre 30-70 °C, porém o processo de extração foi realizado com os solventes orgânicos voláteis D-mentol e ácido canônico. O estudo de Vasconcelos (2021) demonstrou eficiência de encapsulamento entre 95 e 98%, com tamanho médio das nanopartículas em torno de 200 nm, a uma concentração de 13 µg/mL.

Ao relacionar os tamanhos das nanopartículas obtidas neste estudo com a eficiência de encapsulamento, é possível observar que as nanoformulações desenvolveram diâmetros significativamente menores quando comparadas à maioria das nanoformulações lipídicas descritas na literatura para o encapsulamento de carotenóides. Estudos utilizando CLNs ou NLS com o licopeno usualmente relatam tamanhos entre 100 e 300 nm, enquanto sistemas com maior carga lipofílica podem atingir até 400–500 nm, mantendo, entretanto, valores relativamente elevados de eficiência de encapsulamento. Ma *et al* (2021) desenvolveram CLNs contendo licopeno com diâmetro médio de 210 nm e EE% superior a 85%, evidenciando que matrizes lipídicas mais volumosas e menos compactas tendem a permitir maior acomodação do carotenoide. De modo semelhante, Akhoond Zardini *et al* (2020) relataram CLNs para licopeno com tamanho médio entre 74,93 e 183,40 nm, com PDI

inferior a 0,32 e EE% de 64 a 78%. Jain *et al* (2018) obtiveram nanopartículas com licopeno de diâmetro entre 168 e 349 nm com EE% entre 53 e 64%.

Esses resultados evidenciam um padrão onde partículas maiores tendem a apresentar maior eficiência de encapsulamento, pois estruturas lipídicas volumosas e com maior proporção de lipídeo líquido proporcionam mais espaço molecular para a incorporação de carotenóides altamente hidrofóbicos. Em contraste, as nanoformulações deste estudo apresentaram partículas significativamente menores, o que está associado à maior compactação da matriz lipídica e menor disponibilidade de domínios internos. Isso explica por que, apesar da elevada organização estrutural e estabilidade hidrodinâmica observada, as formulações apresentaram EE% menores, especialmente nas maiores concentrações de extrato.

O comportamento obtido nesse trabalho é coerente com resultados descritos na literatura para nanocarreadores lipídicos contendo carotenóides. Kaur *et al* (2023) observou que a eficiência de encapsulamento de licopeno em CLNs varia entre 30% e 70%, dependendo da proporção de fase lipídica e do tipo de surfactante. Também foi relatado um comportamento semelhante em CLNs contendo carotenóides, onde cargas mais altas de licopeno resultam em agregação, cristalização parcial e redução da eficiência de encapsulamento, enquanto cargas moderadas maximizam a incorporação e a estabilidade do sistema. A cristalização do licopeno é um fenômeno natural que ocorre para promover mais estabilidade à molécula, principalmente térmica. Okonogi e Riangjanapatee (2015) também relataram redução de EE% em sistemas sobrecarregados, atribuindo o fenômeno à instabilidade interfacial e recristalização parcial da fase sólida. Além disso, o uso de Brij O10 como surfactante não iônico de baixo HLB contribuiu para a formação de micelas estáveis e compatíveis com compostos hidrofóbicos, favorecendo a retenção do licopeno principalmente nas formulações intermediárias (30–40%), que apresentaram valores de EE% entre 28,43% e 34,58%. Esses resultados demonstram que há um limite ótimo de carga de ativo, no qual o equilíbrio é maximizado. Gomes *et al* (2022), observaram que a adição de β -caroteno alterou a tensão interfacial em sistemas estabilizados por Tween 80 ou WPI. Como também destacado em revisões sobre nanoemulsões de compostos lipofílicos (Choi & McClements, 2020), a estabilidade depende criticamente do tipo e da concentração do emulsificante/óleo. Dessa forma, quando comparados à literatura, os resultados deste trabalho demonstram que a menor

dimensão das nanopartículas, embora favoreça estabilidade, transparência e adesão dérmica, limita parcialmente o espaço para incorporação do licopeno.

Outro ponto que pode ter interferido no resultado da EE% é a escolha do método de PIT, utilizado para a obtenção das nanoformulações lipídicas. Ele envolve um aquecimento da mistura entre 80 e 90 °C, temperatura necessária para a transição entre as fases óleo/água e a formação do CLN. Embora esse procedimento favoreça a dispersão uniforme dos componentes e a estabilização da interface, ele também pode provocar alterações estruturais e oxidativas no licopeno, comprometendo parcialmente sua integridade e, consequentemente, a eficiência de encapsulamento. O licopeno é um carotenoide altamente insaturado e termossensível, cuja estrutura poliênica o torna suscetível à isomerização *cis-trans* e à oxidação quando exposto a calor, luz e oxigênio (Kim *et al*, 2020). Durante o aquecimento do processo PIT, parte do licopeno pode sofrer isomerização do isômero *all-trans*, que é sua forma predominante e mais estável, para formas *cis*, que apresentam menor intensidade de absorção e solubilidade alterada na fase lipídica (Gomes *et al*, 2022). Além disso, a exposição prolongada a altas temperaturas pode ocasionar processos oxidativos nas ligações duplas conjugadas, reduzindo a quantidade de moléculas ativas disponíveis para encapsulamento, uma vez que a oxidação induzida por oxigênio, calor e luz são as principais causas de degradação do licopeno. A isomerização do licopeno também pode ocorrer por esse processo, alterando suas propriedades físicas, químicas e biológicas, interferindo na sua atividade antioxidante e bioacessibilidade (Honda *et al*, 2019). No trabalho de Akhoond Zardini (2018), foram produzidas NLC com licopeno, apresentando tamanho entre 83-135 nm, com EE% e capacidade de carga variando de 64,79% a 78,89% e de 4,54% a 5,52%, respectivamente, sendo esse, segundo os autores, um resultado positivo levando em conta à natureza altamente lipofílica do licopeno e enfatizando que para esse tipo de composto uma capacidade de carga muito alta pode danificar a superfície das nanopartículas.

Esses fenômenos explicam as eficiências de encapsulamento moderadas (23–54%) observadas neste estudo, especialmente nas formulações produzidas com maior proporção de extrato. A degradação térmica parcial do licopeno durante o processo de emulsificação pode ter contribuído para a redução do teor efetivamente incorporado à matriz lipídica, já que moléculas degradadas ou oxidadas perdem afinidade com a fase lipídica sólida, migrando para o meio externo. Entretanto, o impacto térmico também depende da matriz lipídica e do surfactante utilizados. O óleo de canola e a manteiga de murumuru oferecem um

microambiente hidrofóbico que retarda a difusão de oxigênio, atenuando a oxidação. Além disso, o surfactante Brij O10 apresenta propriedades protetoras, formando uma barreira interfacial que pode minimizar a degradação térmica. Estudos de Kaur *et al* (2023) e Okonogi & Rianganapatee (2015) relatam que formulações lipídicas produzidas via PIT mantêm boa eficiência de encapsulamento quando o tempo de aquecimento é limitado e a taxa de resfriamento é rápida, o que reduz a degradação térmica do composto. Também no trabalho de Kaur *et al* (2023) foi relatada uma eficiência de encapsulamento de 41,25%, que corrobora com a identificada nesse trabalho. Em síntese, embora o aquecimento seja uma etapa essencial do método PIT para garantir a formação adequada das nanopartículas, ele representa um fator crítico para a estabilidade do licopeno.

5.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante das amostras foi avaliada pelo método de sequestro do radical DPPH. A Tabela 8 apresenta a curva padrão construída com concentrações crescentes de ácido ascórbico (0–10 µg/mL), que foi usado como referência antioxidante no ensaio. É possível observar aumento progressivo da atividade antioxidante conforme a concentração de ácido ascórbico se eleva, até 81,36% na maior concentração testada (10 µg/mL), confirmando o comportamento dependente da concentração, esperado para esse composto. A Figura 27 apresenta a curva de calibração construída a partir desses dados, demonstrando a relação inversamente proporcional entre a concentração de ácido ascórbico e a absorbância remanescente do radical DPPH.

Tabela 8: Curva padrão de ácido ascórbico utilizada no ensaio de sequestro do radical DPPH. Concentrações crescentes de ácido ascórbico (0–10 µg/mL) foram incubadas com a solução de DPPH e avaliadas a 517 nm. Os valores de atividade antioxidante (%) foram calculados com base na redução da absorbância do radical em relação ao controle (solução com DPPH + água destilada).

Concentração de AA (µg/mL)	Absorbância (nm)	Atividade antioxidante (%)
0	0,7084	0
2,5	0,544	23,20
5	0,345	51,29
10	0,132	81,36

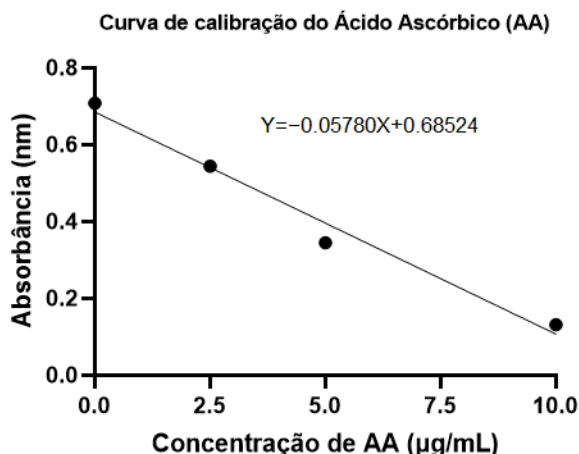


Figura 27: Curva de calibração do ácido ascórbico (AA) obtida no ensaio de DPPH. A relação entre a concentração de ácido ascórbico (0–10 µg/mL) e a absorbância remanescente do radical DPPH a 517 nm. $R^2 = 0,9797$. Imagem obtida pelo GraphPad Prism 8.0.1.

Os resultados apresentados na Figura 28 e Tabela 9 demonstram diferenças marcantes na capacidade antioxidante entre o extrato contendo licopeno e as nanoformulações lipídicas preparadas com diferentes proporções de extrato. Os resultados mostraram diferenças significativas entre as amostras, com impacto direto da concentração de licopeno, da matriz lipídica e do ambiente nanoestruturado sobre o potencial antioxidante.

A determinação da IC_{50} de redução do radical DPPH permitiu comparar a potência antioxidante das diferentes amostras avaliadas. Entre as formulações avaliadas, apenas o extrato contendo licopeno, a nanoformulação CLN-L 70 e a formulação branca CLN-B 70 atingiram inibição superior a 50% nas concentrações testadas, possibilitando o cálculo da IC_{50} . Já a CLN-L 20 e a CLN-B 20 não alcançaram 50% de redução do radical, o que impossibilitou a determinação desse parâmetro. O extrato contendo licopeno apresentou IC_{50} de aproximadamente 3,42 µg de licopeno/mL, o CLN-L 70 apresentou IC_{50} em torno de 1,26 µg de licopeno/mL ou 25,3 mg de nanopartícula/mL e CLN-B 70 apresentou IC_{50} em termos de fração volumétrica de nanoformulação (~ 0,61 v/v) de 112 mg de nanopartícula/mL, refletindo a quantidade de formulação necessária para atingir 50% de inibição. A IC_{50} do ácido ascórbico foi de 4,82 µg/mL.

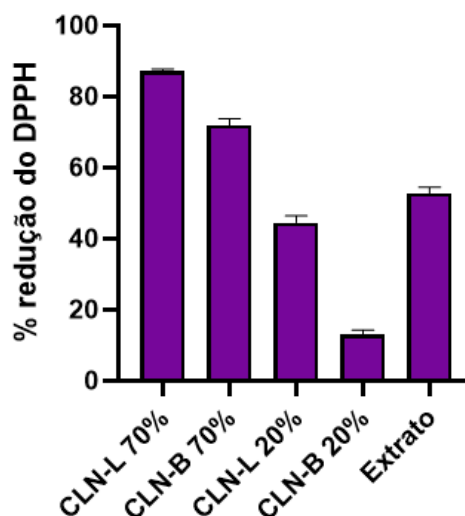


Figura 28: Porcentagem de redução do radical DPPH para as nanoformulações contendo licopeno (CLN-L 70% e CLN-L 20%), suas respectivas formulações brancas (CLN-B 70% e CLN-B 20%) e para o extrato contendo licopeno livre. Os valores estão expressos como média $\pm$ desvio-padrão das triplicatas.

O extrato apresentou uma atividade antioxidante de 51,71%, equivalente a 5,94 μg equivalente de ácido ascórbico (Ceq AA) por mL de extrato. No trabalho de Popescu *et al* (2019) foi produzida uma oleorresina sólida a partir do bagaço do tomate utilizando CO_2 supercrítico, que apresentou $1016,94 \pm 23,95$ mg de licopeno/100 g de extrato, $35,25 \pm 0,14$ mg equivalentes de ácido gálico por grama de extrato e $67,02 \pm 5,11\%$ de inibição do DPPH. Considerando os resultados, observa-se que a quantidade de licopeno extraída e atividade antioxidante foi superior a encontrada nesse trabalho, porém cabe ressaltar que foram utilizados solventes orgânicos voláteis e método de extração de alta energia. Campos-Lozada e colaboradores (2022), apresentaram uma redução de 26% do radical ao preparar extratos de licopeno com óleo de semente de uva, empregando extração por agitação. Rahimi *et al* (2022) elaboraram uma extração assistida por ultrassom de licopeno a partir do óleo de girassol 104,85 mg de licopeno por 100 g de resíduos do tomate secos, com redução de 50% de DPPH. A mesma proporção de redução foi encontrada no trabalho de Nazir & Adrian (2016) ao avaliar a atividade antioxidante da bebida preparada com licopeno.

Tabela 9: Valores médios de absorbância (517 nm) e atividade antioxidante (%) obtidos no ensaio de sequestro do radical DPPH para o extrato contendo licopeno e para as diferentes nanoformulações lipídicas (CLN-L e CLN-B) contendo 20% ou 70% de extrato, e suas respectivas equivalências em ácido ascórbico (Ceq-AA). Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão (n = 3).

Formulação	Média $\pm$ DP (Absorbância)	Atividade antioxidante (%)	Ceq AA (μg/g de casa seca)
Extrato	0,342 $\pm$ 0,043	51,71 $\pm$ 6,07	237,2 $\pm$ 29,7
CLN-L 70%	0,087 $\pm$ 0,064	87,71 $\pm$ 9,03	414,8 $\pm$ 44,3
CLN-L 20%	0,381 $\pm$ 0,043	46,18 $\pm$ 6,07	210,4 $\pm$ 29,7
CLN-B 70%	0,211 $\pm$ 0,022	70,20 $\pm$ 3,11	328,0 $\pm$ 15,2
CLN-B 20%	0,615 $\pm$ 0,026	13,08 $\pm$ 3,67	48,8 $\pm$ 18,0

Entre as nanoformulações, a CLN-L 70% apresentou a menor absorbância média ($0,0872 \pm 0,0645$) e, conseqüentemente, a maior atividade antioxidante (87,71%), com 10,37 mg de Ceq AA/g. Esse aumento em relação ao extrato livre está de acordo com diversos estudos que demonstram que o encapsulamento de licopeno em CLNs potencializa o desempenho antioxidante, principalmente devido à proteção contra isomerização e oxidação, bem como à dispersão mais homogênea em ambiente aquoso (Ahmed *et al*, 2021). Em formulações com alta carga de licopeno, como a CLN-L 70%, parte do bioativo excede a capacidade de acomodação no núcleo lipídico e permanece mais acessível na interface, aumentando sua reatividade frente ao DPPH (Zhao *et al*, 2021; Ma *et al*, 2021).

Okonogi & Rianganapatee (2015) incorporaram o licopeno em CLNs, compostos por Eumulgin, cera de laranja e óleo de farelo de arroz, utilizando homogeneização de alta pressão. A eficiência de encapsulamento do licopeno foi de 100% e os CLNs carregadas com 50 mg de licopeno apresentaram a maior atividade antioxidante, com IC₅₀ de $14,1 \pm 0,6$ mg/mL, inferior à da formulação sem licopeno, que foi $17,7 \pm 0,4$ mg/mL. Esse encontrada foi maior do que o achado nesse trabalho, que foi de aproximadamente 1,26 μ g/mL para a formulação CLN-L 70%. Ahmed *et al* (2021) comparou a atividade antioxidante do licopeno livre, licopeno encapsulado e em nanopartículas com polietilenoglicol (PEG) como controle. Os resultados demonstraram IC₅₀ de 0,055 μ g/mL para o licopeno livre, seguido pelas nanopartículas de licopeno, com valores de IC₅₀ de 0,115 μ g/mL e atividade antioxidante das nanopartículas de PEG com IC₅₀ de 2,50 μ g/mL.

A formulação CLN-L 20, por outro lado, apresentou atividade antioxidante inferior (46,18%) ao extrato livre e à formulação CLN-L 70. Esse comportamento já foi descrito na literatura quando a carga de licopeno é insuficiente para saturar o núcleo lipídico, resultando em menor quantidade disponível para interagir com o radical DPPH. De acordo com Kaur *et al* (2021) e Li *et al* (2023), quando a concentração de licopeno incorporada é baixa, há tendência de ocorrer encapsulamento altamente eficiente, pois o núcleo lipídico tem de espaço livre para acomodar o carotenoide de maneira mais estável. Entretanto, essa mesma condição pode resultar em retenção excessiva do licopeno dentro da matriz lipídica, reduzindo sua disponibilidade imediata para reagir com o radical DPPH.

Isso explica por que a CLN-L 20, mesmo apresentando o maior EE%, exibiu menor atividade antioxidante. Entretanto, sua capacidade antioxidante foi equivalente a 5,26 µg de ácido ascórbico por mL (µg AAE/mL), um valor semelhante ao observado para o extrato que exibiu 5,94 µg AAE/mL. Essa proximidade indica que, apesar da menor fração lipídica e da menor quantidade de licopeno solubilizado por unidade de volume, a CLN-L 20 mantém uma atividade antioxidante expressiva e comparável ao extrato não encapsulado. Isso ocorre porque a encapsulação aumenta a eficiência do licopeno, ampliando sua área superficial de contato com o DPPH, melhorando sua dispersão no meio e protegendo-o contra degradação. No extrato, grande parte do licopeno permanece retida na fase oleosa e pouco acessível ao radical, o que reduz a eficiência da reação. Assim, a nanoencapsulação diminui a quantidade necessária de licopeno para atingir atividade semelhante ao extrato não encapsulado. Por outro lado, a formulação CLN-L 70 demonstrou um desempenho superior, atingindo 10,35 µg AAE/mL, praticamente o dobro da atividade antioxidante da CLN-L 20. Esse comportamento reforça que a maior fração de extrato na composição da CLN-L 70 favorece a solubilização, mobilidade e acessibilidade do licopeno na interface, aumentando sua capacidade de transferência de elétrons ao radical DPPH, mesmo com menor EE%. Nesse caso, a elevada carga de extrato leva o sistema lipídico a um estado próximo da saturação, o que favorece a presença de licopeno na interface ou parcialmente exposto ao meio aquoso. A literatura demonstra que, quando o carotenoide excede a capacidade de incorporação cristalina ou amorfa do núcleo lipídico, parte do ativo permanece mais disponível no ambiente externo (Zhao *et al*, 2021; Ma *et al*, 2021).

A Figura 29 apresenta a redução do radical DPPH em função da concentração para o extrato contendo licopeno livre, bem como para as nanoformulações CLN-L 20 e CLN-L 70

de extrato. A rápida queda na atividade do CLN-L 70 com a diminuição da concentração reflete a forte dependência da resposta antioxidante com a quantidade de bioativo presente no meio, comportamento característico de sistemas nanoestruturados com carga mais elevada de carotenoides. Os valores mais baixos do CLN-L 20 refletem a menor disponibilidade de licopeno no sistema, o que limita a capacidade antioxidante, sobretudo nas menores concentrações.

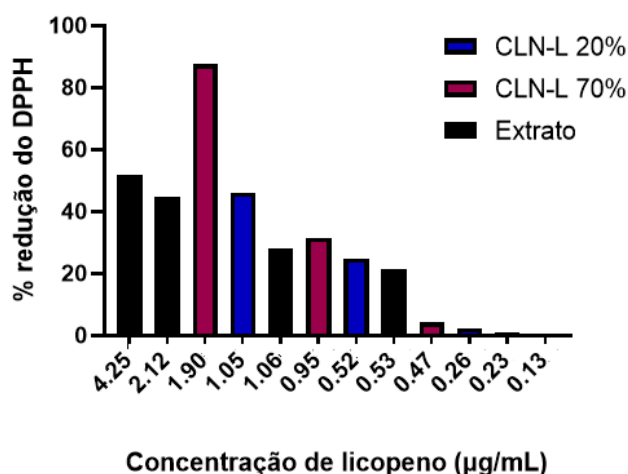


Figura 29: Porcentagem de redução do radical DPPH em função da concentração de licopeno das amostras para o extrato contendo licopeno livre e para as nanoformulações contendo 20% (CLN-L 20%) e 70% (CLN-L 70%) de extrato.

O extrato livre apresentou perfil mais linear entre as diferentes concentrações. Isso ocorre porque o licopeno livre está totalmente exposto ao meio reacional e acessível para reagir com o radical, sem barreiras difusionais impostas pela matriz lipídica. Entretanto, mesmo em concentrações elevadas, seu desempenho ainda é inferior ao da CLN-L 70%, demonstrando que a nanoencapsulação aumenta a eficiência do licopeno (Zhao *et al*, 2021). A estabilidade física também contribui para maiores valores de atividade antioxidante. Esse comportamento se justifica pelo fato de que a estabilidade coloidal contribui para reduzir a degradação oxidativa do licopeno ao longo do tempo. Quanto mais estável é a nanoestrutura, menor a exposição do carotenoide ao oxigênio, luz e temperatura. Dessa forma, há uma correlação direta entre a capacidade da matriz lipídica em preservar o licopeno e seu desempenho funcional.

As formulações brancas (CLN-B), apresentaram valores inferiores, especialmente a

CLN-B 20, com atividade antioxidante de apenas 13,08%, evidenciando a contribuição do licopeno como principal composto antioxidante. A CLN-B 70 apresentou atividade de redução de 70,2%, mostrando que a maior proporção de matriz lipídica exerce impacto direto na resposta antioxidante observada. Esse comportamento está relacionado à composição química do óleo de canola, que é rico em ácidos graxos monoinsaturados, tocoferóis e compostos fenólicos naturais (Roiaini *et al*, 2015; Ahmad *et al*, 2024; Silva-Paz *et al*, 2025). Dessa forma, na formulação CLN-B 70, que possui maior quantidade de óleo de canola por volume de nano, há uma concentração maior desses antioxidantes naturais no sistema.

Isso explica por que a atividade antioxidante dessa formulação é superior à da CLN-B 20, mesmo na ausência de licopeno. A diferença não resulta de qualquer sinergia com o licopeno, mas sim da maior concentração de óleo naturalmente antioxidante, que amplia a capacidade da formulação de interagir com o radical DPPH. Além disso, estudos recentes mostram que a dispersão nanométrica de óleos vegetais pode aumentar a exposição superficial dos tocoferóis e fitoesteróis, melhorando temporariamente sua reatividade com radicais livres (Khalid *et al*, 2023; Silva-Paz *et al*, 2025). As diferenças observadas entre CLN-B 20 e CLN-B 70 reforçam que, embora o óleo de canola contribua com uma fração antioxidante intrínseca, sua atividade é inferior à exercida pelo licopeno. Somente quando presente em proporções elevadas o óleo de canola é capaz de produzir respostas antioxidantes.

5.5 VIABILIDADE CELULAR

A análise da citotoxicidade das nanoformulações CLN-L e CLN-B demonstra um perfil de resposta dependente da concentração, com redução progressiva da viabilidade celular conforme o aumento da concentração, comportamento amplamente descrito para CLNs contendo compostos hidrofóbicos bioativos (Das *et al*, 2020; Moia *et al*, 2020; Theodosios-Nobelos *et al*, 2025). No teste de viabilidade na linhagem HaCaT, a CLN-L 70 apresentou IC₅₀ com base na concentração total de nanopartículas (matriz lipídica + Brij O10), foi de aproximadamente 180 mg/mL (0,098% v/v), o que corresponde à IC₅₀ de 0,00187 µg de licopeno/mL, indicando elevada potência citotóxica em linhagens HaCaT. Para a formulação CLN-B (sem licopeno), o valor de IC₅₀ com base na concentração total de nanopartículas foi de aproximadamente 140 mg/mL (0,074% v/v). O perfil obtido para ambas as formulações evidencia uma queda abrupta da viabilidade entre 0,179 e 0,716 mg/mL, consistente com estudos que demonstram que nanopartículas contendo licopeno ou outros carotenóides podem

apresentar toxicidade em concentrações relativamente baixas devido à elevada afinidade destes compostos pela membrana celular, promovendo estresse oxidativo, perturbação da integridade lipídica e modulação de vias pró-apoptóticas (Palozza *et al*, 2010; Bi *et al*, 2019) (Figura 30).

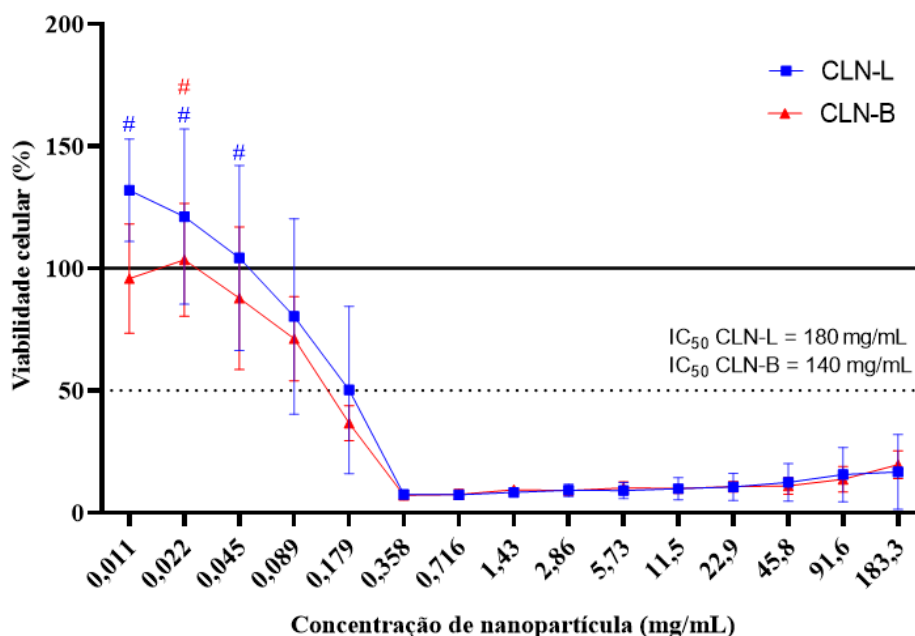


Figura 30: Viabilidade celular (%) da linhagem HaCaT após exposição às nanoformulações CLN-L e CLN-B, em diferentes concentrações (mg/mL) obtida pelo ensaio de MTT após 24 h de incubação. Os símbolos # indicam pontos com proliferação estatisticamente significativa (viabilidade >100%) identificada por teste de tendência (*Trend Analysis*; $p < 0,05$). A linha contínua em 100% representa o controle (células não tratadas) e a linha pontilhada em 50% corresponde ao ponto de referência utilizado para determinação da IC_{50} que foi determinada por interpolação logarítmica entre as diluições adjacentes ao ponto de 50% de viabilidade. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$).

Nas menores concentrações testadas, porém, tanto CLN-L quanto CLN-B induziram aumento da viabilidade das células HaCaT para valores superiores a 100%, sugerindo um efeito proliferativo inicial. Esse tipo de resposta tem sido descrito para compostos antioxidantes naturais, carotenóides e sistemas nanoestruturados lipídicos, sendo conhecido como efeito hormético ou hormese celular. A hormese é definida como uma resposta bifásica em que baixas doses de um composto promovem adaptação celular ao estresse enquanto doses mais elevadas causam efeitos inibitórios ou citotóxicos (Nitti *et al*, 2022). Palozza *et al* (2012) relatam que concentrações baixas de licopeno aumentam a proliferação de células epiteliais por meio da ativação das vias PI3K/Akt e ERK1/2, além da modulação da fluidez de membrana e do fortalecimento das defesas antioxidantes endógenas.

O aumento de viabilidade encontrado no presente trabalho para as formulações CLN-L 70% e CLN-B nas concentrações mais baixas é coerente com o papel mitogênico de compostos antioxidantes em doses reduzidas. Para determinar se esse aumento inicial era estatisticamente significativo, foi aplicada uma análise de tendência (*Trend Analysis*) baseada em regressão polinomial de primeiro e segundo grau utilizando as concentrações reais das nanoformulações como variável independente. Esse tipo de teste é mais adequado que comparações pontuais, pois avalia o padrão global da curva e identifica tendências de aumento ou queda associadas à dose, sendo amplamente utilizado para caracterizar respostas horméticas. Em ambos os sistemas estudados a análise revelou tendência significativa de proliferação. Para CLN-L, tanto o componente linear da regressão ($p= 0,012$) quanto o quadrático ($p= 0,004$) foram estatisticamente significativos, indicando que a formulação promoveu estímulo proliferativo em baixas concentrações, seguido por acentuada queda de viabilidade em concentrações mais altas. Para CLN-B, embora a proliferação tenha sido menos pronunciada, a análise também identificou tendência significativa (linear: $p= 0,041$; quadrático: $p= 0,019$), demonstrando que a nanoformulação sem licopeno também induziu aumento de viabilidade em concentrações reduzidas.

No trabalho de Shin *et al* (2020) foi investigado o efeito da astaxantina, um carotenoide, nas linhagens celulares de astroglioma que tiveram uma resposta bifásica de viabilidade celular, onde baixas concentrações do composto foram capazes de regular positivamente o ciclo celular proliferativo, com efeito hormético dose e tempo-dependente. Além dos efeitos do bioativo, é importante considerar o papel dos CLNs no estímulo proliferativo observado. Diversos estudos demonstram que nanopartículas lipídicas, mesmo na ausência de princípios ativos, podem promover leve estimulação celular devido à presença de componentes antioxidantes na sua formulação e à interação de seus lipídeos com a membrana celular (Montenegro, 2017; Khurana *et al*, 2019).

Segundo Muller *et al* (2002) e Souto *et al* (2022), NLS e CLNs podem melhorar o metabolismo celular por fornecer substratos lipídicos utilizados em processos anabólicos, além de interagir favoravelmente com a membrana celular, aumentando sua fluidez e facilitando trocas metabólicas. Isso ajuda a explicar o aumento de viabilidade observado para CLN-B em baixas concentrações, mesmo sem a presença de licopeno, sugerindo que os lipídeos e surfactantes, em doses reduzidas, são bem tolerados e até utilizados pela célula. No caso específico de carreadores contendo antioxidantes naturais, como licopeno, a combinação

entre lipídeos biocompatíveis e carotenoides potencializa a resposta hormética, gerando um estímulo protetor em baixas doses, seguido de queda abrupta da viabilidade quando a concentração atinge valores capazes de gerar estresse oxidativo, disfunção mitocondrial ou danos de membrana (Liang *et al*, 2020; Shin *et al*, 2020). Esse padrão é o observado nas nanoformulações do presente estudo, com um pico de estimulação nas primeiras concentrações, seguido por um declínio acentuado após aproximadamente 0,179 mg/mL, intervalo no qual ocorre a transição para o efeito citotóxico, coerente com o IC₅₀ determinada.

A elevação da viabilidade celular observada na maior concentração testada (1,9 µg/mL), após o ponto de mínima atividade metabólica registrado na faixa intermediária, representa um comportamento que tem sido descrito na toxicologia celular e nanotoxicologia. Em primeiro lugar, esse comportamento pode ser compreendido dentro do conceito de hormese estendida. A hormese, tradicionalmente descrita como uma curva em “U”, se dá por estimulação celular em baixas doses e inibição em doses mais altas (Nitti *et al*, 2022). Entretanto, para compostos lipofílicos, especialmente antioxidantes como o licopeno ou sistemas lipídicos nanoestruturados, ocorre um estímulo em baixas concentrações, forte citotoxicidade em concentrações intermediárias e aparente estabilização ou retorno parcial da viabilidade em concentrações extremas (Calabrese & Baldwin, 2003; Liang *et al*, 2020). Essa fase final envolve mecanismos específicos relacionados à sobrevivência seletiva, estresse metabólico e interferências do sistema de detecção.

Um dos fatores mais importantes para explicar esse fenômeno é a seleção de subpopulações celulares resistentes. Em concentrações intermediárias das nanoformulações CLN-L 70 e CLN-B, ocorre intensa internalização das nanopartículas pelas células HaCaT, levando a estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e dano de membrana, o que explica a queda acentuada da viabilidade (Fröhlich, 2012). Nesse ponto, as células mais sensíveis são eliminadas, restando apenas uma fração de células mais resistentes e metabolicamente mais ativas. Na concentração máxima testada (183,3 mg/mL), a maioria das células vulneráveis morre e as células remanescentes exibem hiperativação metabólica compensatória. Assim, o aumento de sinal no ensaio não reflete maior número de células, mas um metabolismo elevado por célula sobrevivente. Outro aspecto relevante é a barreira física criada pelo excesso de lipídeos na concentração mais alta. Em concentrações altas, parte das nanopartículas tende a se agregar superficialmente, formando um microfilme lipídico que reduz a disponibilidade direta do bioativo para interagir com a membrana celular. Essa micro

barreira diminui temporariamente o impacto citotóxico direto, pois limita o contato com o citoplasma. Assim, a maior concentração pode resultar em menor citotoxicidade do que concentrações intermediárias mais dispersas, funcionalmente mais biodisponíveis (Muller *et al*, 2002; McClements, 2013; Qian *et al*, 2013; Strachan *et al*, 2020).

A avaliação da citotoxicidade das nanoformulações frente à linhagem B16-F10 (melanoma murino) revelou também um comportamento concentração-dependente, com diferenças expressivas entre as amostras contendo ou não licopeno. Ambas as formulações reduziram progressivamente a viabilidade celular com o aumento da concentração, porém a presença de licopeno alterou o perfil de resposta biológica, modulando a intensidade e a dinâmica do efeito citotóxico (Figura 31). A CLN-L apresentou IC_{50} de 0,44 mg/mL, correspondendo a 0,00449 μ g de licopeno/mL, enquanto a CLN-B apresentou IC_{50} de 0.092 mg/mL.

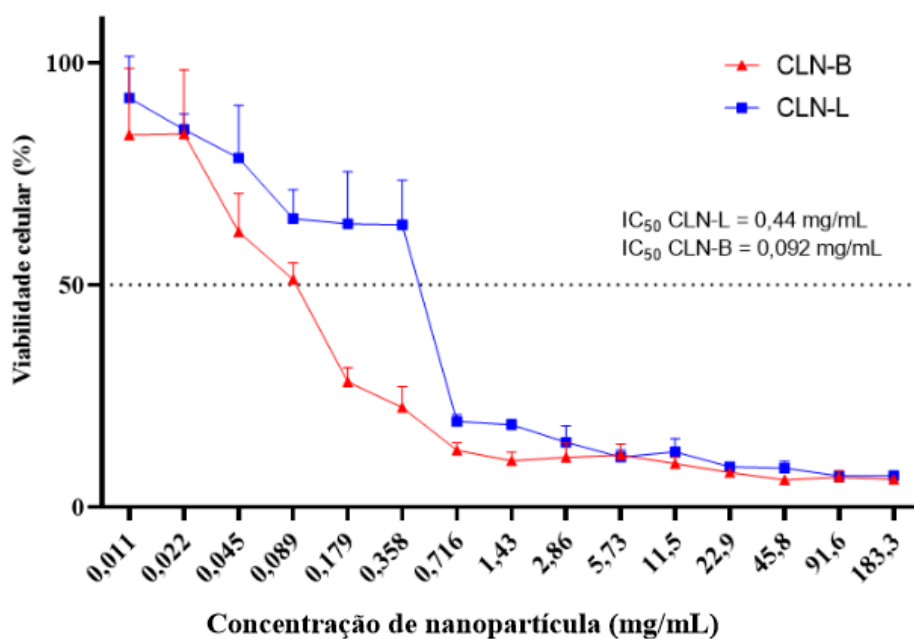


Figura 31: Viabilidade celular (%) da linhagem B16-F10 após exposição às nanoformulações CLN-B e CLN-L em diferentes concentrações (mg/mL) obtida pelo ensaio de MTT após 24 h de incubação. A linha pontilhada em 50% corresponde ao ponto de referência utilizado para determinação da IC_{50} que foi determinada por interpolação logarítmica entre as diluições adjacentes ao ponto de 50% de viabilidade. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$).

Nas maiores diluições, a CLN-B já demonstrou acentuada citotoxicidade, reduzindo a viabilidade celular para valores entre 20–40%, o que indica que os componentes lipídicos e surfactantes, isoladamente, já apresentam atividade sobre células B16-F10. Esse

comportamento é coerente com estudos prévios que relatam que nanopartículas lipídicas podem induzir estresse oxidativo, desorganização de membrana plasmática e disfunção mitocondrial, especialmente em células tumorais altamente sensíveis (Nasirizadeh & Malaekheh-Nikouei, 2020; Marwah & Dewangan, 2024). Isso provavelmente ocorre devido ao acúmulo intracelular das nanopartículas, sobrecarga lipídica, aumento de espécies reativas de oxigênio e colapso mitocondrial, mecanismos já descritos na literatura para células tumorais expostas a NLS e CLNs (Haron *et al*, 2018). A queda da viabilidade entre 0,358 e 0,716 mg/mL sugere um limiar onde o acúmulo intracelular de nanopartículas supera a capacidade de resposta antioxidante da célula, levando rapidamente à perda de integridade.

A presença de licopeno alterou o perfil de citotoxicidade, resultando em valores de viabilidade significativamente mais elevados nas mesmas concentrações. Esse comportamento é compatível com o papel antioxidante e estabilizador de membrana do licopeno, que pode reduzir a peroxidação lipídica e mitigar os danos atribuídos ao sistema lipídico nanoestruturado, onde o licopeno retarda o dano em concentrações menores (Qian *et al*, 2013). A partir de 0,716 mg/mL, ambas as formulações apresentaram viabilidade celular inferior a 20%, indicando que em concentrações mais elevadas o efeito tóxico do sistema lipídico é dominante, superando completamente o efeito modulador do licopeno. A resposta dose-dependente está diretamente relacionada ao processo de internalização endocítica das nanopartículas. Células tumorais, como a B16-F10, apresentam taxa de endocitose mais elevada, internalizando maiores quantidades de nanopartículas e, portanto, exibindo maior sensibilidade citotóxica. Estudos mostram que NLS e CLNs podem se acumular no citoplasma, promover estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e ruptura de membranas, contribuindo para maior citotoxicidade em linhagens tumorais (Nasirizadeh & Malaekheh-Nikouei, 2020; Marwah *et al*, 2023). A internalização diferencial explica os menores valores de IC₅₀ observados na B16-F10 em comparação às células HaCaT.

A literatura demonstra que o licopeno nanoencapsulado pode apresentar atividade citotóxica aumentada em comparação ao licopeno livre, devido à maior estabilidade, solubilidade e internalização mediada por nanopartículas. Saini *et al* (2020) observaram que sistemas NLC carregados com licopeno promoveram redução significativa da viabilidade em linhagens tumorais, com IC₅₀ inferior ao composto não encapsulado. Zhang *et al* (2021) também reportaram aumento da atividade antiproliferativa de licopeno nanoestruturado em células de melanoma, correlacionando o efeito ao aumento da taxa de internalização. A

comparação com o presente estudo mostra tendência semelhante, onde o CLN-L apresenta citotoxicidade, mesmo em concentrações baixas.

A comparação entre os valores de IC_{50} dos CLN-B e CLN-L 70 frente às linhagens HaCaT e B16-F10 mostra diferenças de sensibilidade entre células não tumorais e tumorais. As células HaCaT, que representam uma linhagem celular não cancerosa, mostraram-se mais susceptíveis ao tratamento. A viabilidade diminuiu de forma mais acentuada, entretanto houve efeito proliferativo em doses mais baixas, indicando que queratinócitos humanos possuem menor tolerância ao sistema lipídico e ao estresse oxidativo induzido pelas nanopartículas. Além disso, a presença de licopeno exerceu um efeito modulador importante em ambas as linhagens, reduzindo a toxicidade. Nas células B16-F10, caracterizadas por metabolismo acelerado, também houve esse papel protetor quando comparada ao CLN-B, mas apresentaram sensibilidade inferior às nanoformulações sem licopeno.

A comparação integrada entre HaCaT e B16-F10 evidencia que a presença de licopeno exerce um papel protetor, reduzindo a toxicidade da nanoestrutura lipídica. Em ambas as linhagens avaliadas, a CLN-B apresentou maior citotoxicidade, especialmente nas concentrações intermediárias, nas quais a internalização das nanopartículas é mais eficiente. A ausência do licopeno, que atua como antioxidante e estabilizador de membranas, favorece maior estresse oxidativo, perturbação estrutural e disfunção mitocondrial, resultando em queda mais acentuada da viabilidade celular (Saini *et al*, 2020). Por outro lado, a CLN-L 70 modulou esse efeito, apresentando valores de viabilidade mais elevados em várias faixas de concentração para ambas as linhagens, indicando que o licopeno atenua o estresse causado pelo sistema lipídico. Nas células HaCaT esse efeito protetor se manteve por uma faixa mais ampla de concentrações, enquanto em B16-F10, altamente endocíticas, o licopeno retardou a queda da viabilidade, mas não impediu o colapso metabólico em concentrações mais elevadas (Trombino *et al*, 2021). Assim, os resultados demonstram que a toxicidade observada não decorre primariamente do licopeno, mas sim da matriz lipídica, sendo o licopeno responsável por reduzir e modular essa resposta citotóxica.

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que a aplicação de metodologias de nanotecnologia verde, especialmente o método de inversão de fase (PIT), associado ao uso de lipídeos vegetais renováveis constitui uma estratégia eficaz, sustentável e de baixo impacto ambiental

para o desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) com a encapsulação de um extrato rico em licopeno advindo da casca do tomate. A utilização de extração oleosa como etapa de obtenção do extrato possibilitou o aproveitamento de subprodutos vegetais, reforçando a relevância do estudo para o contexto da economia circular e da valorização de resíduos agrícolas.

A produção de nanoformulações, com e sem o extrato contendo licopeno, preparadas sob diferentes condições de resfriamento, permitiu analisar de forma abrangente a influência da composição lipídica, do processo de síntese e da presença do carotenoide sobre as propriedades físico-químicas, estabilidade coloidal e desempenho funcional das nanoestruturas. As análises de DLS evidenciaram que o método PIT favoreceu a formação de CLNs predominantemente menores que 100 nm, com distribuição uniforme e baixa polidispersividade, confirmando a alta eficiência do processo de emulsificação de baixa energia. A estabilidade observada ao longo de 90 dias demonstrou que a matriz lipídica composta por óleo de canola, manteiga de murumuru e Brij O10 é eficaz na proteção estrutural das nanopartículas, especialmente sob armazenamento refrigerado. Esse resultado reforça a importância do controle térmico tanto na etapa de produção quanto no armazenamento, reduzindo degradação física e química.

A quantificação de licopeno revelou eficiências de encapsulamento moderadas, porém compatíveis com o comportamento esperado para carotenóides altamente hidrofóbicos em matrizes lipofílicas sólidas. A proximidade das concentrações encapsuladas ao longo das formulações indica a existência de um limite de solubilidade do licopeno na matriz utilizada, fazendo com que níveis intermediários, como a formulação com 4,25 µg/mL, se destaquem como ponto ótimo entre estabilidade, solubilização e prevenção de precipitação.

Os ensaios antioxidantes demonstraram que a nanoencapsulação protege o licopeno contra degradação oxidativa, resultando em maior atividade antioxidante em comparação ao extrato livre. Em paralelo, os testes de viabilidade celular revelaram comportamento dose-dependente, com toxicidade acentuada em concentrações menores, especialmente para as formulações contendo licopeno, sugerindo potenciais interações entre nanopartículas e membranas biológicas.

Em conjunto, este estudo comprovou a viabilidade científica e tecnológica da encapsulação de licopeno a partir de resíduos de tomate por meio de CLNs obtidos por

métodos ecológicos, contribuindo para o avanço da nanotecnologia verde, para a agregação de valor a subprodutos agrícolas e para o desenvolvimento de sistemas inovadores com potencial aplicação em cosméticos, nutracêuticos e formulações farmacêuticas.

7 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Algumas limitações foram identificadas ao longo da pesquisa. A baixa solubilidade do licopeno em lipídeos sólidos, aliada à sua elevada susceptibilidade à oxidação e isomerização, limitou a eficiência máxima de encapsulamento alcançável nos CLNs produzidos. A sensibilidade do sistema às condições de resfriamento indicou que pequenas variações térmicas afetam a organização cristalina dos lipídeos, podendo comprometer a estabilidade coloidal.

Além disso, não foram realizadas análises termoanalíticas, como DSC e TGA, que são fundamentais para caracterizar polimorfismo lipídico e compreender a dinâmica de expulsão ou retenção do bioativo durante o resfriamento. Da mesma forma, os ensaios celulares foram realizados em apenas duas linhagens, o que limita os dados sobre os mecanismos de internalização e toxicidade. Também não foram conduzidos estudos de liberação *in vitro*, permeação cutânea ou avaliação de biodisponibilidade, que são necessários para determinar o comportamento funcional das nanoformulações em contextos de uso real.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir das limitações observadas, várias oportunidades de complementação deste trabalho se tornam evidentes. Estudos complementares utilizando DSC e TGA poderão esclarecer a estrutura interna das nanopartículas e sua relação com a eficiência de encapsulamento. Ensaio de liberação controlada, permeação cutânea e estabilidade oxidativa devem ser desenvolvidos para avaliar o desempenho funcional dos CLNs em aplicações cosméticas ou nutracêuticas. A ampliação dos estudos de citotoxicidade para modelos de pele e para linhagens adicionais poderá esclarecer mecanismos celulares, vias de estresse oxidativo e padrões de internalização. Estudos de escalabilidade industrial, análise de custo-benefício e aplicação das nanoformulações em protótipos reais de cosméticos ou suplementos alimentares representam caminhos promissores para a transferência tecnológica deste projeto.

REFERÊNCIAS

- Ahmad, F., et al.,** (2024). Canola Oil as a Bio-additive: Properties, Processing and Applications. *Vegetable Oil-Based Composites: Processing, Properties and Applications*, 59–85.
- Ahmed, H. A., et al.,** (2021). Lycopene nanoparticles ameliorate the antioxidants, antimicrobial and anticancer potencies of tomato pomace. *Egyptian Journal of Chemistry*, 64(7), 3739–3749.
- Akanda, M., Mithu, M. S. H., & Douroumis, D.** (2023). Solid lipid nanoparticles: An effective lipid-based technology for cancer treatment. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 86, 104709.
- Akhoond Zardini, A., et al.,** (2018). Production and characterization of nanostructured lipid carriers and solid lipid nanoparticles containing lycopene for food fortification. *Journal of Food Science and Technology*, 55(1), 287–298.
- Ali, M. Y., et al.,** (2021). Nutritional composition and bioactive compounds in tomatoes and their impact on human health and disease: A review. *Foods*, 10(1), Article 45.
- Ali, S. M., & Yosipovitch, G.** (2013). Skin pH: from basic science to basic skin care. *Acta Dermato-Venereologica*, 93(3), 261–267.
- Álvarez-García, S., et al.,** (2024). Lycopene-loaded emulsions: Chitosan versus non-ionic surfactants as stabilizers. *Molecules*, 29(21), 5209.
- AMORIM, A. et al.,** (2020). Anti-inflammatory and antioxidant activity improvement of lycopene from guava on nanoemulsifying system. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 1–11.
- AMORIM, A. G. N.; LEITE, J. R. S. A.; PINTADO, M. E.** (2018). *Obteintment process of carotenoids concentrate rich in lycopene from red fruits and/or red fruit pulp*. Patente EP3400812 A1.
- AMORIM, A. G. N.; LEITE, J. R. S. A.; ROPKE, C. D.** (2016). *Obtenção de extrato rico*

em licopeno e licopeno puro de fonte natural. Patente BR102016030594-2.

ANWAR, S., et al., (2020). "Efeitos protetores do extrato de gengibre contra a glicação e complicações de saúde induzidas pelo estresse oxidativo: um estudo in vitro" *Processos* 8, no. 4: 468.

Araujo, V. H. S., et al., (2020). The influence of NLC composition on curcumin loading under a physicochemical perspective and in vitro evaluation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 602, 125070.

Araújo, J. L., et al., (2023). Photodynamic therapy directed to melanoma skin cancer by thermosensitive hydrogel containing chlorophyll A. *Pharmaceuticals*, 16(12), 1659.

Astrocaryum murumuru – Astrocaryum murumuru (Murumuru). (2022). Brasília: EMBRAPA. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/...>

Attwood, D. (2012). *Surfactant systems: their chemistry, pharmacy and biology*. Springer Science & Business Media.

Bi, S., et al., (2019). Lycopene upregulates ZO-1 and downregulates claudin-1 through autophagy inhibition in COLO-16 cells. *Journal of Cancer*, 10(2), 510.

Biswas, S., et al., (2013). Pharmacological and dietary antioxidant therapies for COPD. *Current Medicinal Chemistry*, 20(12), 1496–1530.

Bohn, V. F., et al., (2024). Polyphenol antioxidants in vegetable oils. *Studies in Natural Products Chemistry*, 80, 407–436.

Boileau, T. W.-M., Boileau, A. C., Erdman, J. W. (2002). Bioavailability of lycopene isomers. *Experimental Biology and Medicine*, 227(10), 914–919.

Boscán, F., Barandiaran, M. J., Paulis, M. (2018). From miniemulsion to nanoemulsion polymerization. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 58, 1–8.

Boulaajine, S., & Hajjaj, H. (2024). Lycopene extracted from tomato—A review. *Food Science and Technology*, 12(1), 1–14.

Britton, G. (1995). UV/visible spectrometry. *Carotenoids*, 1, 13–62.

Calabrese, E. J., & Baldwin, L. A. (2003). Hormesis: the dose–response revolution. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 43(1), 175–197.

Campos-Lozada, G., et al., (2022). High-intensity ultrasound and oils on lycopene extraction. *Antioxidants*, 11(7), 1404.

Capanoglu, E., Nemli, E., Tomas-Barberan, F. (2022). Valorization of agricultural wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(23), 6787–6804.

Canene-Adams, K., et al., (2005). The tomato as a functional food. *Journal of Nutrition*, 135(5), 1226–1230.

Cassayre, M., et al., (2025). Optimization of SLN formulation via DoE. *Nanomaterials*, 15(13), 1034.

Carvalho, G. C., Sábio, R. M., Chorilli, M. (2021). Properties and analytical methods for lycopene in nanocarriers. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 51(7), 674–686.

CEAGESP. (2021). Programa HortiMais. <https://ceagesp.gov.br/hortimais>

Chen, J., Song, Y., Zhang, L. (2013). Lycopene supplementation and oxidative stress. *Journal of Medicinal Food*, 16(5), 361–374.

Chen, M. L., et al., (2012). Lycopene inhibits angiogenesis via signaling pathways. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56(6), 889–899.

Choi, S. J., & McClements, D. J. (2020). Nanoemulsions for lipophilic nutraceuticals. *Food Science and Biotechnology*, 29(2), 149–168.

Cooperstone, J. L., et al., (2015). Enhanced bioavailability of cis-lycopene. *Molecular Nutrition & Food Research*, 59(4), 658–669.

Correa, K. L., et al., (2024). Physicochemical and nutritional properties of Brazilian vegetable oils. *Foods*, 13(10), 1565.

Coşkun, N., et al., (2024). Freeze drying impact on bioactivity and physical properties. *Applied Sciences*, 14(20), 9183.

Costa, A., et al., (2021). Lycopene-enriched extracts in topical emulsions. *Applied Sciences*, 11(11), 5120.

Čulina, P., et al., (2025). Stability of fatty acids, tocopherols and carotenoids in spray-dried encapsulated sea buckthorn oil. *Applied Sciences*, 15(3), 1194.

Da Silva, B. D., et al., (2021). Chemical composition, extraction sources and action mechanisms of essential oils: Natural preservative and limitations of use in meat products. *Meat Science*, 176, 108463.

Das, S. S., Verma, P. R. P., Singh, S. K. (2020). Quercetin-loaded nanomedicine as nutritional application. In *Nanomedicine for Bioactives: Healthcare applications* (pp. 259–301). Springer Singapore.

Daun, J. K., Eskin, M. N., Hickling, D. (Eds.). (2015). *Canola: Chemistry, production, processing, and utilization*. Elsevier.

De Oliveira, J. S., et al., (2025). Circular economy as a tool for the valorization of agro-industrial residues... *Cleaner and Circular Bioeconomy*, 100188.

De Souza, A. L. R., et al. (2021). Bioactive compounds and antioxidant potential of tomato varieties and by-products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 98, 103836.

Di Mascio, P., Kaiser, S., Sies, H. (1989). Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 274(2), 532–538.

Dong, Y., et al., (2023). Control of Ostwald ripening. *Science China Materials*, 66(3), 1249–1255.

Dos Santos, P. P., et al., (2018). Nanoencapsulation of carotenoids... *Journal of Food Science and Technology*, 55(10), 3851–3860.

Dos Santos, S. F., et al., (2020). Post-harvest losses of fruits and vegetables... *Waste Management*, 101, 161–170.

Efendi, Z., et al., (2024). Characteristic and storage stability of nanostructured lipid carriers containing red palm oil. *Food Research*, 8(3), 363–375.

Eslami, E., et al., (2022). Overview of tomato by-product valorization... *Foods*, 12(1), 166.

Embrapa Hortaliças. (2020). Mattos, L. M., & Moretti, C. L. *Perdas pós-colheita de hortaliças: causas e prevenção*. Embrapa.

Fadda, A., et al., (2022). Innovative and Sustainable Technologies to Enhance the Oxidative Stability of Vegetable Oils. *Sustainability*, 14(2), 849. <https://doi.org/10.3390/su14020849>

FAO. (2011) *Global food losses and food waste: extent, causes and prevention*. Rome. Disponível em: <https://www.fao.org/4/mb060e/mb060e.pdf>

FAO. (2019). *The State of Food and Agriculture: Food Loss and Waste*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Fasina, O. O., et al., (2008). Predicting melting characteristics of vegetable oils... *LWT – Food Science and Technology*, 41(8), 1501–1505.

Feitosa, J. M., et al., (2021). Evaluation of the quality of Amazonian butters... *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 42, 1–11.

Finke, J. H., et al., (2017). Overview of techniques and established processes. In *Pharmaceutical Nanotechnology: Innovation and Production*.

Fish, W. W. (2012). Refinements of spectral equations for β -carotene and lycopene quantification. *Postharvest Biology and Technology*, 66, 16–22.

Forgiarini, A., et al., (2001). Formation of nano-emulsions by low-energy emulsification... *Langmuir*, 17(7), 2076–2083.

Fröhlich, E. (2012). The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 5577–5591.

Gagliardi, A., et al., (2021). Brij-stabilized zein nanoparticles as potential drug carriers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 201, 111647.

Gharby, S. (2022). Refining Vegetable Oils: Chemical and Physical Refining. *ScientificWorldJournal*, 2022:6627013. doi:10.1155/2022/6627013.

- Ghatak, B., et al.,** (2017). Discrimination of tomatoes based on lycopene using cyclic voltammetry. *Sensor Letters*, 15(10), 827-836.
- Ghobadi, S., et al.,** (2019). Effects of canola oil consumption on lipid profile. *Journal of the American College of Nutrition*, 38(2), 185–196.
- Gomes, F. R., et al.** (2022). Cis/trans isomerization of lycopene and its impact on bioavailability: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(5), 1398–1412.
- Golodnizky, D., et al.,** (2025). The effect of minor components on canola oil oxidation: Oxidation kinetics explained by molecular interactions. *Current Research in Food Science*, 101056.
- Goula, A. M., et al.,** (2006). Prediction of lycopene degradation during drying. *Journal of Food Engineering*, 74(1), 37–46.
- Guerra, A. S., et al.,** (2021). Extraction and preservation of lycopene: nanotechnology advancements. *Trends in Food Science & Technology*, 116, 1120–1140.
- Gunstone, F. (Ed.)** (2011). *Vegetable oils in food technology: composition, properties and uses*. John Wiley & Sons.
- Haron, A. S., et al.,** (2018). Cytotoxic effect of thymoquinone-loaded NLC on liver cancer. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, 1549805.
- Henz, G. P.** (2017). Postharvest losses of perishables in Brazil. *Horticultura Brasileira*, 35, 6–13.
- Herrera-Covarrubias, D., et al.,** (2013). The role of lycopene in prevention of prostate cancer. *Eneurobiología*, 4(8), 1–16.
- Hogarth, C., et al.,** (2024). Navigating the challenges of lipid nanoparticle formulation: the role of unpegylated lipid surfactants in enhancing drug loading and stability. *Nanoscale Advances*, 6(2), 669-679.
- Honda, M., et al.,** (2019). Enhanced Z-isomerization of tomato lycopene. *Scientific Reports*, 9(1), 7979.

Honda, M., et al., (2018). Enhanced solubility and reduced crystallinity of carotenoids by Z-isomerization. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 120(11), 1800191.

IBGE. Produção de tomate no Brasil. Disponível em:

<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/tomate/br>

IBGE – Produção de tomate no Brasil. “Produção de Tomate no Brasil” (dados gerais).

Disponível em:

[https://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_\[mensal\]/Fasciculo_Indicadores_IBGE/2025/estProdAgri_202501.pdf](https://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo_Indicadores_IBGE/2025/estProdAgri_202501.pdf)

Instituto Escolhas. (2022). Perdas e desperdício de alimentos no Brasil: panorama e caminhos.

<https://www.escolhas.org/wp-content/uploads/2022/03/Estudo-Perdas-e-Desperdicio.pdf>

Irshad, M. A., et al., (2025). Challenges and Perspectives of Green Nanotechnology. *Nanomaterial Green Synthesis*, 547–595.

Jaiswal, P., Gidwani, B., Vyas, A. (2014). Nanostructured lipid carriers and targeted drug delivery. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 44(1), 27–40.

Jain, A., et al., (2018). Lycopene-loaded whey protein isolate nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 546(1–2), 97–105.

Jandang, W., Ampasavate, C., Kiattisin, K. (2024). Natural Stabilizers and NLC Entrapment for Curcumin and Capsaicin. *Pharmaceutics*, 16(3), 412.

Javed, A., et al., (2025). Valorization of vegetable waste for high-value food products. *International Journal of Vegetable Science*, 1–57.

Javed, S., et al., (2022). Nanostructured lipid carrier system: A compendium of their formulation development approaches, optimization strategies by quality by design, and recent applications in drug delivery. *Nanotechnology reviews*, 11(1), 1744-1777.

- Khan, S. H.** (2019). Green nanotechnology for the environment and sustainable development. In *Green materials for wastewater treatment* (pp. 13-46). Cham: Springer International Publishing.
- Kanhere, S. M., Singh, R. P., Kedare, S. B.** (2011). Gênese e desenvolvimento do método DPPH de ensaio antioxidante. *Revista de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 48(4), 412–422.
- Karthik, P., Ezhilarasi, P. N., Anandharamakrishnan, C.** (2017). Challenges associated in stability of food grade nanoemulsions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(7), 1435–1450.
- Kato, S., et al.,** (2018). Determination of triacylglycerol oxidation mechanisms in canola oil using LC–MS/MS. *npj Science of Food*, 2, 1.
- Kaur, H., & Sogi, D. S.** (2021). Effect of processing and storage on lycopene stability. *Food Research International*, 147, 110515.
- Kedare, Sagar B.; Singh, RP** Gênese e desenvolvimento do método DPPH de ensaio antioxidante. *Revista de ciência e tecnologia de alimentos* , v. 48, n. 4, pág. 412-422, 2011.
- Kehili, M., et al.,** (2019). Optimization of lycopene extraction from tomato peels using maceration in olive oil. *Food and Bioproducts Processing*, 117, 321–328.
- Khalid, A., et al.,**(2023). Nanoemulsion of vitamin D3-enriched canola oil. *Frontiers in Nutrition*, 10:1205200.
- Khalil, A., et al.,** (2021). Carotenoids: Therapeutic strategy in the battle against viral emerging diseases, COVID-19: An overview. *Preventive Nutrition and Food Science*, 26(3), 241.
- Khoo, H. E., et al.,** (2011). Carotenoids and their isomers. *Molecules*, 16(2), 1710–1738.
- Khurana, A., et al.,** (2019). Yttrium oxide nanoparticles and pancreatitis. *Nanomedicine*, 18, 54–65.
- Kim, J., & Choi, S. J.** (2020). Improving lycopene stability in beverage emulsions. *Foods*, 9(8), 971.

- Kim, S. O., et al.,** (2014). Optimization of lycopene nanoemulsions for beverages. *Journal of Food Science*, 79(8), N1604–N1610.
- Knothe, G., & Dunn, R. O.** (2009). Melting points of fatty acids and esters by DSC. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86, 843–856.
- Koroleva, M. Y., & Yurtov, E. V.** (2012). Nanoemulsions: properties, preparation, applications. *Russian Chemical Reviews*, 81(1), 21–43.
- Kuckelhaus, S. A. S., Medeiros, J. V. R., & de Sá Leite, J. R.** (2017). Lycopene-rich extract from red guava: anti-inflammatory profile in mice.
- Kultys, E., & Kurek, M. A.** (2022). Green extraction of carotenoids: A review. *Molecules*, 27(2), 518.
- Kumar, M., et al.,** (2022). Valorization potential of tomato seed. *Horticulturae*, 8(3), 265.
- Kyriakoudi, A., et al.,.** (2021). Delivery systems with plant bioactives. *Plants*, 10, 1238.
- Lavelli, V.** (2021). Circular food supply chains and safety. *Trends in Food Science & Technology*, 114, 323–332.
- Lambers, H., et al.,** (2006). Natural skin pH below 5. *International Journal of Cosmetic Science*, 28(5), 359–370.
- Lee, M. T., & Chen, B. H.** (2001). Separation of lycopene isomers by LC. *Chromatographia*, 54(9), 613–617.
- Lemahieu, G., et al.,** (2019). Using PIT as a method to track formulation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 557, 746–756.
- Li, Z., & Yu, F.** (2023). Recent advances in lycopene for food preservation. *Foods*, 12(16), 3121.
- Liang, X., et al.,** (2019). Bioactivity and stability of lycopene. *Trends in Food Science & Technology*, 93, 185–196.

- Liang, W. L., et al.,** (2019). SLN-induced apoptosis in macrophages. *International Journal of Nanomedicine*, 3283–3295.
- Lin, C.-H., & Chen, B. H.** (2003). Determination of carotenoids in tomato juice. *Journal of Chromatography A*, 1012, 103–109.
- Lin, C.-Y., Lin, K.-H., Yang, H.** (2023). PIT emulsification variables. *Processes*, 11(4), 1091.
- Ly, Y., et al.,** (2017). Effects of combined sorbitan monolaurate anti-agglomerants on viscosity of water-in-oil emulsion and natural gas hydrate slurry. *Energies*, 10(8), 1105.
- Liu, W. Y., et al.,** (2023). Crystalline status modification of carotenoids. *Pharmaceutics*, 15(2), 485.
- Liu, Y., & Liu, Y.** (2024). Lipid–biomacromolecular delivery of carotenoids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 64(6), 1653–1676.
- Liu, Y., et al.,** (2025). Analytical strategies for tocopherols in vegetable oils. *Pharmaceutics*, 18(8), 1137.
- Lopes, L. B., et al.,** (2010). Topical lycopene in microemulsions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99(3), 1346–1357.
- Lozano-Garzón, K., et al.,** (2023). Oils and fats of six Amazon species. *Biomolecules*, 13(6), 985.
- Lüdtke, F. L., et al.,** (2025). Lipid nanoparticles: Methods & characterization. *Foods*, 14(6), 973.
- Ma, Y. Q., et al.,** (2021). Optimization of lycopene-loaded NLC by RSM.
- Maciejewska-Stupska, K., Czarnecka, K., Szymański, P.** (2024). Bioavailability enhancement of coenzyme Q10. *Archiv der Pharmazie*, 357(8), 2300676.
- Masiero, J. F., et al.,** (2021). Vegetable oils in lipid nanocarriers. *Industrial Crops and Products*, 170, 113838.

- McClements, D. J.** (2013). Edible lipid nanoparticles: Digestion, absorption and toxicity. *Progress in Lipid Research*, 52, 409–423.
- Mehnert, W., & Mäder, K.** (2012). Solid lipid nanoparticles: production and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 83–101.
- Mello, V., et al.,** (2022). Aluminum-phthalocyanine NLC for PDT. *Nanomaterials*, 12, 3547.
- Mello, V. C., et al.,** (2025). Cerrado byproduct extracts in green NLC. *Antioxidants*, 14, 290.
- Meroni, E., & Raikos, V.** (2018). Orange oil-in-water emulsions for lycopene delivery. *Food Research International*, 106, 439–445.
- Miadonye, A., et al.,** (2023). Quality parameters of vegetable-based transformer fluids. *Heliyon*, 9(4): e14763.
- Miyazawa, T., et al.,** (2021). Surfactant-coated nanoparticles in nanomedicine and food. *International Journal of Nanomedicine*, 3937–3999.
- Moia, V. M., et al.,** (2020). Lycopene nanodrug for rheumatoid arthritis. *Colloids and Surfaces B*, 188, 110814.
- Molyneux, P.** (2004). O uso do radical livre estável difenilpicrilhidrazil (DPPH) para estimar a atividade antioxidante. *Songklanakarin J. sci. technol* , 26 (2), 211-219.
- Montenegro, L.** (2017). Lipid nanoparticles for dermal antioxidants. *Current Drug Metabolism*, 18(5), 469–480.
- Müller, R. H., Radtke, M., Wissing, S. A.** (2002). SLN and NLC in dermatological preparations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, S131–S155.
- Marwah, H., & Dewangan, H. K.** (2024). SLN and NLC for breast cancer therapy. *Current Pharmaceutical Design*, 30(37), 2922–2936.
- Nasirizadeh, S., & Malaekheh-Nikouei, B.** (2020). Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers in oral cancer drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 55, 101458.

- Nazir, N. N., & Adrian, M. R.** (2016). The improvement lycopene availability and antioxidant activities of tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill) jelly drink. *Agric. Agric. Sci. Procedia*, 9, 328–334.
- Nitti, M., et al.,** (2022). Hormesis and oxidative distress: pathophysiology of reactive oxygen species and the open question of antioxidant modulation and supplementation. *Antioxidants*, 11(8), 1613.
- Offord, E. A., et al.,** (2002). Photoprotective potential of lycopene, β -carotene, vitamin E, vitamin C and carnosic acid in UVA-irradiated human skin fibroblasts. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(12), 1293–1303.
- Oliveira, G. L. S.** (2015). Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. *Revista Brasileira De Plantas Medicinai*s, 17(1), 36–44. https://doi.org/10.1590/1983-084X/12_165
- Okonogi, S., & Riangjanapatee, P.** (2015). Physicochemical characterization of lycopene-loaded nanostructured lipid carrier formulations for topical administration. *International Journal of Pharmaceutics*, 478(2), 726–735.
- Palozza, P., et al.,** (2010). Tomato lycopene and inflammatory cascade: basic interactions and clinical implications. *Current Medicinal Chemistry*, 17(23), 2547–2563.
- Palozza, P., et al.,** (2012). Lycopene as a guardian of redox signalling. *Acta Biochimica Polonica*, 59(1).
- Park, M. S., et al.,** (2016). In vitro and in vivo α -glucosidase and α -amylase inhibitory effects of the water extract of leaves of pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Dangjo) and the active constituent luteolin 7-O-glucoside. *Journal of Food Biochemistry*, 40(5), 696–703.
- Pataro, G., et al.,** (2020). Recovery of lycopene from industrially derived tomato processing by-products by pulsed electric fields-assisted extraction. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 63, 102369.
- Patel, P., et al.,** (2024). Lipid-based nanoparticles in delivering bioactive compounds for improving therapeutic efficacy. *Pharmaceutics*, 17(3), 329.

Pateiro, M., et al., (2021). Nanoencapsulation of promising bioactive compounds to improve their absorption, stability, functionality and the appearance of the final food products. *Molecules*, 26(6), 1547.

Pereira, E., et al., (2019). Physical properties of Amazonian fats and oils and their blends. *Food Chemistry*, 278, 208–215.

Pink, D. L., et al., (2021). Interplay of lipid and surfactant: Impact on nanoparticle structure. *Journal of Colloid and Interface Science*, 597, 278–288.

Popescu, M., et al., (2022). Valuable natural antioxidant products recovered from tomatoes by green extraction. *Molecules*, 27(13), 4191.

Przybylska, S. (2020). Lycopene – a bioactive carotenoid offering multiple health benefits: a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(1), 11–32.

Qian, C., et al., (2013). Impact of lipid nanoparticle physical state on particle aggregation and β -carotene degradation: Potential limitations of solid lipid nanoparticles. *Food Research International*, 52(1), 342–349.

Queiroz, M. D. C. V., & Muehlmann, L. A. (2024). Characteristics and preparation of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers. *Journal of Nanotheranostics*, 5(4), 188–211.

Rahimi, S.; Mikani, M. (2019). Extração assistida por ultrassom de verde de licopeno usando óleo comestível acompanhada de otimização de desempenho da metodologia de superfície de resposta (RSM): Aplicação em resíduos de processamento de tomate. *Microchemical Journal*, 146, 1033–1042.

Rajput, S. A., et al., (2021). Lycopene protects intestinal epithelium from deoxynivalenol-induced oxidative damage via regulating Keap1/Nrf2 signaling. *Antioxidants*, 10(9), 1493.

Ramadan, M. F., & Moersel, J. T. (2009). Oil extractability from enzymatically treated goldenberry (*Physalis peruviana* L.) pomace: range of operational variables. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(3), 435–444.

Raikos, V., et al., (2019). Optimising the ratio of long-to short-chain triglycerides of the lipid phase to enhance physical stability and bioaccessibility of lycopene-loaded beverage emulsions. *International Journal of Food Science and Technology*, 54(4), 1355-1362.

Reatgui, W. S. (2021). Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas baseadas em manteiga de murumuru... Dissertação de Mestrado, UnB.

Rehman, A., et al., (2020). Carotenoid-loaded nanocarriers: A comprehensive review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 275, 102048.

Rinaldi, M., et al. (2023). Nutritional and functional properties of tomatoes and derived products. *Foods*, 12(6), 1289.

Rissi, N. C., et al., (2014). Relationship between composition and organizational levels of nanostructured systems... *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50(3), 653-661.

Rodriguez-Amaya, D. B. (2015). *Food carotenoids: chemistry, biology and technology*. Wiley-Blackwell.

Rodriguez-Amaya, D. B. (2020). *Natural food pigments and colorants*. Wiley-Blackwell.

Roiaini, M., Ardiannie, T., Norhayati, H. (2015). Physicochemical properties of canola oil, olive oil and palm olein blends. *International Food Research Journal*, 22(3), 1227-1233.

Rostamabadi, H., Falsafi, S. R., Jafari, S. M. (2019). Nanoencapsulation of carotenoids within lipid-based nanocarriers. *Journal of Controlled Release*, 298, 38–67.

Sahasrabudhe, S. N., et al., (2017). Density, viscosity and surface tension of five vegetable oils... *International Journal of Food Properties*, 20(sup2), 1965–1981.

Saini, R. K., Shin, J., Oh, J. W. (2020). Low dose astaxanthin treatments trigger hormesis in astrogloma cells... *Biomedicines*, 8(10), 434.

Sakellari, G. I., et al., (2022). SLN and NLC of dual functionality at emulsion interfaces. *Colloids and Surfaces A*, 654, 130135.

Salvia-Trujillo, L., et al., (2018). Emulsion-based nanostructures for delivery of active ingredients in foods. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 2, 79.

- Sarker, M. T., et al.,** (2021). Dietary lycopene supplementation alleviates AFB1 intestinal damage... *Animals*, 11(11), 3165.
- Sazdanić, D., et al.** (2023). Green extraction of polyphenols from red grape pomace mediated by surfactants. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 32, 100439.
- Schuh, L., et al.,** (2024). NADES integrated into NLCs: an industrial look. *Pharmaceuticals*, 17(7), 855.
- Shafe, M. O., et al.,** (2024). Lycopene: a potent antioxidant with multiple health benefits. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 6252426.
- Shahidi, F., & Zhong, Y.** (2010). Lipid oxidation and improving oxidative stability. *Chemical Society Reviews*, 39, 4067–4079.
- Shang, W., et al.,** (2018). Endogenous antioxidants and thermal stability of canola oil. *RSC Advances*, 8(63), 36096-36103.
- Sharma, S., et al.,** (2021). Lycopene-loaded NLC from carboxymethyl OPF cellulose. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 2, 100049.
- Shi, J., et al.,** (2007). Antioxidant and synergistic activity of lycopene and natural antioxidants. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(7), 603–608.
- Shin, J., Saini, R. K., Oh, J. W. (2020).** Low dose astaxanthin treatments trigger the hormesis of human astrogloma cells by up-regulating the cyclin-dependent kinase and down-regulated the tumor suppressor protein P53. *Biomedicines*, 8(10), 434.
- Shinoda, K., & Saito, H.** (1969). Stability of O/W emulsions as a function of temperature and HLB: PIT method. *Journal of Colloid and Interface Science*, 30(2), 258–263.
- Silva, F. D., et al.,** (2023). Application of tomato byproducts in foods—A review. *Food Science & Engineering*, 4, 103–115.
- Silva-Paz, R. J., et al.** (2025). Encapsulation of canola oil by sonication for protein/starch systems. *Colloids and Interfaces*, 9(1), 10.

Silva, R. (2022). *Manejo Florestal Sustentável do Murumuru...*

DOI:10.35170/ss.ed.9786586283686

Silva, R. J. (2024). Impacts of human activity on murumuru resources. *Trees, Forests and People*, 15, 100517.

Sinkora, M., et al., (2024). Growing and processing conditions modify viscosity in tomato purée. *Food Research International*, 189, 114495.

Singh, A., et al., (2017). Lipid nanoformulation of lycopene improves oral delivery and efficacy. *Journal of Microencapsulation*, 34(4), 416–429.

Souza, P. T., et al., (2024). Comprehensive analysis of Amazonian oil and fats with different fatty composition: Murumuru fat (*Astrocaryum murumuru*), cupuassu fat (*Theobroma grandiflorum*), and pracaxi oil (*Pentaclethra macroloba*). *Food Research International*, 196, 115022.

Srivastava, S.; Srivastava, A. K. (2015). Lycopene chemistry, biosynthesis, metabolism and degradation. *Journal of Food Science and Technology*, 52(1), 41–53.

Stahl, W., & Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24(6), 345–351.

Stajčić, S., et al., (2015). Tomato waste: carotenoids, antioxidant activity, cytotoxicity. *Food Chemistry*, 172, 225–232.

Stubbs, S., Yousaf, S., Khan, I. A. (2022). Bio-based surfactants from green chemistry. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30, 407–426.

Szabo, K., et al., (2022). Carotenoid recovery from tomato by-products via green chemistry. *Molecules*, 27(12), 3771.

Tadros, T. F. (2013). Emulsion formation, stability, and rheology. *Emulsion formation and stability*, 1–75.

Tang, C. H., Chen, H. L., Dong, J. R. (2023). Solid lipid nanoparticles (SLNs) and nanostructured lipid carriers (NLCs) as food-grade nanovehicles for hydrophobic nutraceuticals or bioactives. *Applied Sciences*, 13(3), 1726.

Theodosios-Nobelos, P., et al., (2025). Antioxidant naturally occurring pleiotropically acting bioactive compounds, as polymeric nanotherapeutics against autoimmune diseases progression. *Current Issues in Molecular Biology*, 47(6), 411.

Tian, M., et al., (2023). The chemical composition and health-promoting benefits of vegetable oils—A review. *Molecules*, 28(17), 6393.

Tileuberdi, N., et al., (2022). Extraction, isolation of bioactive compounds and therapeutic potential of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Molecules*, 27(24), 8824.

Tomate BR. Safra de tomate industrial 2024 com produção de 1,7 milhão de toneladas. Disponível em:

<https://revistacultivar.com.br/noticias/safra-de-tomate-industrial-encerra-2024-com-producao-estavel>

Trombino, S., et al., (2021). Valorization of tomato waste as a source of carotenoids. *Molecules*, 26(16), 5062.

Varela, E. L. P., et al., (2022). Potential benefits of lycopene consumption: rationale for using it as an adjuvant treatment for malaria patients and in several diseases. *Nutrients*, 14(24), 5303.

Vasconcelos, A. G. et al. (2017). Lycopene rich extract from red guava (*Psidium guajava* L.) displays anti-inflammatory and antioxidant profile by reducing suggestive hallmarks of acute inflammatory response in mice. *Food Research International*, 99, 959–968.

Vasconcelos, A. G. (2021). Desenvolvimento de nanoformulações contendo licopeno obtido da goiaba vermelha (*Psidium guajava* L.): avaliação das atividades anticâncer e anti-inflamatória, biodisponibilidade e toxicidade. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) — Universidade de Brasília, Brasília, 145 f.

Victoria-Campos, C. I., et al., (2023). Dietary sources, bioavailability and health effects of carotenoids. *Biotechnia*, 25(1), 156–168.

Viegas, C., et al., (2023). Solid lipid nanoparticles vs. nanostructured lipid carriers: A comparative review. *Pharmaceutics*, 15(6), 1593.

Voorhees, P. W. (1985). The theory of Ostwald ripening. *Journal of Statistical Physics*, 38(1), 231–252.

Vučurović, D., et al., (2024). Biotechnological utilization of agro-industrial residues and by-products—Sustainable production of biosurfactants. *Foods*, 13(5), 711.

Weber, J., et al., (2023). Oxidation of polysorbates—An underestimated degradation pathway? *International Journal of Pharmaceutics: X*, 6, 100202.

Wei, R. R., et al., (2023). The sources, properties, extraction, biosynthesis, pharmacology, and application of lycopene. *Food & Function*, 14(22), 9974–9998.

Yao, J. H., et al., (1993). Theory and simulation of Ostwald ripening. *Physical Review B*, 47(21), 14110.

Yara-Varón, E., et al., (2017). Vegetable oils as alternative solvents for green oleo-extraction, purification and formulation of food and natural products. *Molecules*, 22(9), 1474.

Zaunschirm, M., et al., (2018). Contribution of the ratio of tocopherol homologs to the oxidative stability of commercial vegetable oils. *Molecules*, 23(1), 206.

Zago, E. C., & Franzini, C. M. (2021). Revisão sistemática sobre a ação do licopeno perante ao envelhecimento cutâneo em nutricosméticos. *Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação*, 7(9), 863–883.

ZH, K. M., & BEKNAZAR, R. (2024). Lycopene as an effective agent for skin protection and restoration. *Вестник Актыбинского регионального университета имени К. Жубанова*, 78(4), 188–194.

Zhang, F., et al., (2020). Silica nanoparticles enhance germ cell apoptosis via ROS formation in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Toxicological Sciences*, 45(3), 117–129.

Zhao, C., et al., (2020). Encapsulation of lycopene within oil-in-water nanoemulsions using lactoferrin: Impact of carrier oils on physicochemical stability and bioaccessibility. *International Journal of Biological Macromolecules*, 153, 912–920.

Zhou, J., et al. (2024). Lycopene as a multifunctional antioxidant: Mechanisms and emerging applications. *Phytomedicine*, 129, 155205.

