UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE - UFAC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA – REDE BIONORTE

ESTUDO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO ÓLEO MISTO DE CASTANHA-DO-BRASIL *Bertholletia excelsa* H.B.K. E ÓLEO DEAÇAÍ *Euterpe oleracea* Mart. COM ENSAIO CITOTÓXICO POR MEIO DE SUA NANOEMULSÃO

MILTON MAIA FILHO

RIO BRANCO, ACRE
2023

MILTON MAIA FILHO

ESTUDO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO ÓLEO MISTO DE CASTANHA-DO-BRASIL *Bertholletia excelsa* H. B. K. E ÓLEO DE AÇAÍ *Euterpe oleracea* Mart. COM ENSAIO CITOTÓXICO POR MEIO DE SUA NANOEMULSÃO

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Anselmo Fortunato Ruiz Rodriguez

RIO BRANCO, ACRE

2023

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAC

M217e Maia Filho, Milton, 1957-
Estudo do potencial antioxidante do óleo misto de Castanha-do-Brasil *Bertholletia excelsa* H. B. K. e óleo de açaí *Euterpe oleracea* Mart: com ensaio citotóxico por meio de sua nanoemulsão / Milton Maia Filho; Orientador: Prof. Dr. Anselmo Fortunato Ruiz Rodriguez – 2023.
85 f.; 30 cm.

Tese (Doutorado) apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte da Universidade Federal do Acre como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.
Inclui anexo.

1. Nanoemulsões. 2. Óleo de Açaí. 3. Castanha-do-Brasil. 4. Viabilidade celular. I. Rodriguez, Anselmo Fortunato Ruiz (orientador). II. Título.
CDD: 630.891

Bibliotecário: Marcelino G. M. Monteiro CRB-11º/258.

MILTON MAIA FILHO

ESTUDO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO ÓLEO MISTO DE CASTANHA-DO-BRASIL *Bertholletia excelsa* H. B. K. E ÓLEO DE AÇAÍ *Euterpe oleracea* Mart. COM ENSAIO CITOTÓXICO POR MEIO DE SUA NANOEMULSÃO

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós- Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Acre, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Aprovada em 21/ 12/ 2023

Banca examinadora

Documento assinado digitalmente
gov.br ANSELMO FORTUNATO RUIZ RODRIGUEZ
Data: 31/01/2024 11:41:50-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Anselmo Fortunato Ruiz Rodriguez (Orientador)
UFAC/Bionorte

Documento assinado digitalmente
gov.br ROBERTO NICOLETE
Data: 31/01/2024 13:35:07-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Roberto Nicolete
FIOCRUZ- CE

Documento assinado digitalmente
gov.br MOISES BARBOSA DE SOUZA
Data: 31/01/2024 15:19:40-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Moisés Barbosa de Souza
UFAC/BIONORTE

Documento assinado digitalmente
gov.br JAMAL DA SILVA CHAAR
Data: 31/01/2024 13:51:35-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Jamal da Silva Chaar
UFAM

Documento assinado digitalmente
gov.br ANTONIO ALVES DE MELO FILHO
Data: 31/01/2024 11:57:49-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Antônio Alves de Melo Filho
UFRR/BIONORTE

TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO

Eu, MILTON MAIA FILHO, (X) autorizo ( ) não autorizo a publicação da versão final aprovada de minha Tese de Doutorado intitulada " **ESTUDO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO ÓLEO MISTO DE CASTANHA-DO-BRASIL *Bertholletia excelsa* H. B. K. E ÓLEO DE AÇAÍ *Euterpe oleracea* Mart. COM ENSAIO CITOTÓXICO POR MEIO DE SUA NANOEMULSÃO"** no Portal do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia – Rede BIONORTE (PPG-BIONORTE), bem como no repositório de Teses da CAPES ou junto à biblioteca da Instituição Certificadora.

Rio Branco - Acre, 14 de dezembro de 2023

gov.br
Documento assinado digitalmente
MILTON MAIA FILHO
Data: 31/01/2024 15:59:35-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

MILTON MAIA FILHO

CPF: 066.593.302-91

RG: 768040-84 SSP-CE

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter enviado seu filho Jesus Cristo, o qual é fonte de inspiração para todo meu aprendizado e ensinamentos.

Agradeço ao Prof. Dr. Fernando Escócio, por participar na parte experimental do trabalho e ser um entusiasta da área de biotecnologia, um dos esteios da formação da Rede Bionorte _PPG.

Agradeço à Profa. Dra. Emília Celma de Oliveira Lima, professora e pesquisadora da Universidade Federal de Goiás, que gentilmente disponibilizou o Laboratóriode Química, possibilitando as realizações das práticas em nanoemulsões.

Agradeço ao Prof. Dr. Anselmo Fortunato Ruiz Rodriguez meu orientador, pioneiro da Rede Bionorte – Polo Acre por suas relevantes contribuições neste trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Nelson Roberto Antoniosi Filho e a Dra. Dayane Cristina da Costa, ambos do Laboratório de Métodos de Extração e Separação, LAMES, do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás – UFG.

Agradeço ao Prof. Dr. José Martins do Nascimento e a acadêmica do curso de Química da Universidade Federal e Eline Gomes dos Santos do Laboratório de Neurociência da UFPA.

Agradeço à Profa. Dra. Vanessa Gisele Pasqualotto Severino Coordenadora do Laboratório de Produtos Naturais e Síntese Orgânica da Universidade Federal de Goiás e Doutorando Jorge Luiz Souza Simão do mesmo Laboratório que possibilitaram a realização de determinação de atividade antioxidante dos óleos

FILHO, Milton Maia. **ESTUDO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO ÓLEO MISTO DE CASTANHA-DO-BRASIL (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) E ÓLEO DE AÇAÍ (*Euterpe oleracea* Mart.) COM ENSAIO CITOTÓXICO POR MEIO DE SUA NANOEMULSÃO**. 85f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) – Universidade Federal do Acre, Rio Branco, 2023.

RESUMO

Neste estudo, investigou-se os óleos de *Bertholletia excelsa* H. B. K. (BE), também conhecida como Castanha-do-Brasil, e *Euterpe oleracea* Mart. (EO), conhecida como açaí. Realizou-se a caracterização das suas propriedades físico-químicas e atividades antioxidantes. Preparou-se uma formulação de nanoemulsão mista combinando volumes equivalentes dos dois óleos em uma configuração água-óleo (A/O), seguindo uma metodologia de alta energia adaptada. A nanoemulsão foi caracterizada por meio de Espalhamento de Luz Dinâmica (DLS), que nos permitiu calcular o diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas, o potencial Zeta e a polidispersão (PDI). Os resultados sugerem que as nanoemulsões de BE e EO produzidas com alta energia têm potencial para serem aplicadas em formulações alimentícias e cosméticas, oferecendo benefícios nutricionais e farmacológicos. Além disso, em cumprimento aos objetivos da pesquisa de natureza quantitativa, realizou-se Ensaios de Viabilidade em Células gliais C6 (glioblastoma murino) em cultura primária da retina de embrião de galinha, utilizando o método MTT e o método de Hemólise, onde os resultados indicam que os compostos, surfactantes Tween 80 e Span 80, bem como a nanoemulsão com os óleos de Castanha-do-Brasil e de açaí, analisados, não demonstraram efeito citotóxico significativo em células C6 até a concentração de 1% das formulações. Em relação às glias de Müller, não foi observado efeito citotóxico até a concentração de 0,4%. Entretanto, no ensaio de hemólise, notou-se que na maior concentração, a formulação contendo os óleos causou hemólise nas células, enquanto até a concentração de 0,4%, não houve hemólise significativa na formulação sem o óleo, mas foi observado um leve danonas células tratadas com a formulação que contém o óleo, ou seja, na nanoemulsão.

Palavras-chave: Nanoemulsões; Óleo de Açaí; Castanha-do-Brasil; Viabilidade Celular.

FILHO, Milton Maia. **STUDY OF THE ANTIOXIDANT POTENTIAL OF THE MIXED OIL OF BRAZIL NUT (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) AND AÇAÍ OIL (*Euterpe oleracea* Mart.) WITH CYTOTOXIC ASSAY THROUGH ITS NANOEMULSION.** 85p. Thesis (Doctorate in Biodiversity and Biotechnology) – Federal University of Acre, Rio Branco, 2023.

ABSTRACT

In this study, we investigated the oils of *Bertholletia excelsa* H. B. K. (BE), also known as Brazil nut, and *Euterpe oleracea* Mart. (EO), known as açaí. The characterization of its physicochemical properties and antioxidant activities was carried out. A mixed nanoemulsion formulation was prepared by combining equivalent volumes of the two oils in a water-oil (W/O) configuration, following an adapted high-energy methodology. The nanoemulsion was characterized using Dynamic Light Scattering (DLS), which allowed us to calculate the nanoparticles' hydrodynamic diameter, Zeta potential and polydispersity (PDI). The results suggest that BE and EO nanoemulsions produced with high energy have the potential to be applied in food and cosmetic formulations, offering nutritional and pharmacological benefits. Furthermore, in compliance with the objectives of the quantitative research, Viability Tests were carried out on C6 glial cells (murine glioblastoma) in primary culture from the retina of a chicken embryo, using the MTT method and the Hemolysis method, where the results indicate that the compounds, surfactants Tween 80 and Span 80, as well as the nanoemulsion withBrazil nut and açaí oils, analyzed, did not demonstrate a significant cytotoxic effect on C6 cells up to a concentration of 1% of the formulations. In relation to Müller glia, no cytotoxic effect was observed up to a concentration of 0.4%. However, in the hemolysis test, it was noted that at the highest concentration, the formulation containing the oils caused hemolysis in the cells, while up to the concentration of 0.4%, there was no significant hemolysis in the formulation without the oil, but a slight damage to cells treated with the formulation containing the oil, that is, in the nanoemulsion.

Keywords: Nanoemulsions; Açaí Oil; Brazil Nut; Cellular Viability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - a) Equação geral para uma reação de transesterificação; b) equação geral da transesterificação de um triacilglicerídeo.....24

Figura 2 - Exemplo de curva do DPPH x absorbância.....28

Figura 3 - Estabilização do radical livre DPPH.....29

Figura 4 - Tamanho médio, potencial Zeta e índice de polidispersividade das formulações obtidas pela técnica de alta energia em função do tempo.....36

Figura 5 - Tamanho médio e índice de polidispersividade das formulações obtidas pela técnica de baixa energia.....36

Figura 6 - Representação do raio hidrodinâmico das nanoemulsões de alto e baixa energia das nanoemulsões.....37

Figura 7 - Absorbância x concentração.....38

Figura 8 - Moléculas contidas nos óleos de açaí e de Castanha-do-Brasil 42

Figura 9 - Óleo de Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H. B. K.). Variação da condutividade em função do tempo.....42

Figura 10 - Ilustração dos picos cromatográficos da amostra 2.....43

Figura 11 - Ilustração dos picos cromatográficos da amostra1.....43

Figura 12 - Óleo de açaí (*Euterpe oleracea* Mart*)*. Variação da condutividade em função do tempo.....44

Figura 13 - Ilustração dos picos cromatográficos da mistura das amostras 1 e 2.....45

Figura 14 - Óleo misto de Castanha-do-Brasil e açaí (proporção 50/50). Variação da condutividade em função do tempo.....46

Figura 15 - Viabilidade das glias de Müller.....48

Figura 16 - Viabilidade das células C6.....49

Figura 17 - Ensaio de hemólise.....50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Preparo das soluções para curva do DPPH.....28

Tabela 2 - Valores médios de tamanho, índice de polidispersividade e potencial Zeta para as nanoemulsões obtidas por baixa energia.....37

Tabela 3 - Resultados analíticos do óleo de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H. B. K.).....41

Tabela 4 - Identificação dos picos cromatográficos e o teor percentual correspondente a cada pico cromatográfico da amostra1.....44

Tabela 5 - Identificação dos picos cromatográficos e o teor percentual correspondente a cada pico cromatográfico das amostras 1 e 2.....45

Tabela 6 - Características Físico Químicas, *Bertholletia excelsa Bonpl.-Lecythidaceae* (Óleo)....46

Tabela 7 - Características Físico Químicas, *Euterpe oleracea* Mart.-*Aracaceae* (Óleo).....47

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ABTS	2,2 –azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfônico)
ABS	Absorbância
CI50	Concentração inibitória média
^{o}C	Graus Celsius
CIM	Concentração inibitória mínima
CG-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
DSL	Dinamic Light Scattering
EM	Espectrometria de massas
EtOH	Etanol
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
mg/L	Miligrama por litro
nm	Nanômetro
NTF	Fatores neuronotróficos
TI	Tempo de indução
WHO	World Health Organization
µg/mL	Micrograma por mililitro
µNm	Micronanômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO....13
1.1 OBJETIVO GERAL....15
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS....15
2 REVISÃO DA BIBLIOGRÁFICA....16
2.1 AS NANOEMULSÕES....16
2.2 TECNOLOGIA DE NANOEMULSÕES....16
2.3 MÉTODOS DE EMULSIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO....16
2.4 ANÁLISE DE ESTABILIDADE....17
2.5 ESTRATÉGIAS DE OTIMIZAÇÃO....17
2.6 APLICAÇÕES DAS NANOEMULSÕES EM ENSAIOS DE CITOTOXIDADE....17
2.7 A NANOTECNOLOGIA E SUA ESPECTRAL APLICABILIDADE....18
2.8 MEDIDA INDIRETA DO POTENCIAL DE OXIDAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS....22
2.9 PESQUISA QUANTITATIVA, EXPLORATÓRIA E DESCRITIVA AINDA NA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA....23
2.10 O MÉTODO DA TRANSESTERIFICAÇÃO NA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA....23
2.11 ARTIGOS PUBLICADOS PELO AUTOR....25
2.11.1 Preparação e caracterização de nanoemulsão dos óleos de Euterpe oleracea e Bertholletia excelsa Bonp....25
2.11.2 Ensaio de viabilidade celular da nanoemulsão de óleo de açaí (Euterpe Precatoria Mat.) e castanha-do-Brasil (Bertholletia excelsa Bonp) em células C6 e gliais....25
3 MATERIAIS E MÉTODOS....26
3.1 PREPARAÇÃO DAS NANOEMULSÕES....26
3.2 TESTE RANCIMAT E O POTENCIAL ANTIOXIDANTE....26
3.3 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE....27
3.3.1 Método DPPH....27
3.3.2 Procedimento experimental....29
3.4 ANALISE CROMATOGRÁFICA....30
3.4.1 Perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) por CG-MS....30
3.5 MÉTODOS DE ALTA ENERGIA....31
3.6 NANOEMULSÃO DE BAIXA ENERGIA....32
3.7 CARACTERIZAÇÃO DA NANOEMULSÕES....33
3.7.1 Espalhamento Dinâmico de Luz....33
3.7.2 Potencial Zeta (ζ)....33
3.8 ANÁLISDE DA VIABILIDADE CELULAR: MTT E HEMÓLISE....33
3.8.1 Cultivo e manutenção de glioma, células C6....33

3.8.2 Plaqueamento para ensaios 33
3.8.3 Cultura e manutenção de Glias de Muller....34
3.8.4 Tratamento celular 34
3.8.5 Ensaio de viabilidade 34
3.8.6 Ensaio de Hemólise....35
3.8.7 Análise Estatistica....35
4 RESULTADOS....36
4.1 NANOEMULSÃO DE ALTA E BAIXA ENERGIA - RESULTADOS INDICADOS NO ÍTEM 4.5 E 4.6)....36
4.1 ÓLEO DE CASTANHA - RESULTADOS CROMATOGRÁFICOS NO ÍTEM 4.4....40
4.2 ÓLEO DE AÇAÍ - RESULTADOS CROMATOGRÁFICOS NO ÍTEM 4.4 43
4.3 MISTURA DOS ÓLEOS DE CASTANHA-DO-BRASIL (Bertholletia excelsa H. B. K.), E DE AÇAÍ - RESULTADOS CROMATOGRÁFICOS NO TEM 4.4 45
4.4 VIABILIDADE CELULAR - CONFORME INDICADO NO ÍTEM 4.8 48
4.4.1 Efeito nas Glias de Müller 48
4.4.2 Ensaio de Viabilidade Celular (MTT)....49
4.5 ENSAIO DE HEMÓLISE - CONFORME INDICADO NO ÍTEM 4.8 50
5 DISCUSSÃO 51
6 CONCLUSÃO....53
REFERÊNCIAS....54
ANEXOS....62

1 INTRODUÇÃO

As essências amazônicas, Açaí e Castanha-do-Brasil, destacam-se no agroextrativismo do Acre, representando a rica biodiversidade da região. Nesta tese, a bioprospecção concentra-se na análise dos óleos dessas fontes, explorando a nanociência e nanotecnologia. Essa pesquisa alinha-se aos eixos fundamentais do Programa de Pós-graduação da Rede Bionorte, contribuindo para a compreensão e aplicação de biotecnologias na preservação e aproveitamento sustentável dos recursos amazônicos.

Os frutos de açaí e os de Castanha-do-Brasil foram coletados na Região Amazônica. Os óleos de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) foi adquirido da empresa Bela Vida Natural, e o da espécie (*Euterpe precatória Mart*.) foi adquirido da Cooperativa de Produtores Agroextrativistas Frutos da Amazônia (COOPFRUTOS), localizado no município de Manoel Urbano (8º50'16''S 69º15'44''W), estado do Acre, o óleo de Castanha-do-Brasil asil (*Bertholletia excelsa* Bonp.), adquirido da empresa Olam Óleos da Amazônia, localizada no município de Rio Branco, estado do Acre (9º59'08''S 67'50'01''W); todos prensados a frio.

Conforme os parâmetros da RDC-270 ANVISA, 2005, os óleos prensados a frio e não refinados, para serem permitido o consumo, devem obter acidez máxima 4,0 mgKOH/g e Índice de Peróxido máximo de 15 meqO2/kg. (PEREIRA, G.S. et al., 2017)

No óleo de açaí proveniente da espécie (*Euterpe oleracea* Mart.), independente do processo de extração, se com solvente orgânico ou a frio, há predominância dos ácidos graxos monoinsaturados (68% a 71%) e de ácidos graxos poliinsaturados (7,7% a 10,6%). (DO NASCIMENTO, R.J.S. et al., 2008)

A espécie (*Euterpe precatoria* Mart.) é pouco conhecida e possui potencialidade tecnológica, nutricional e funcional (YAMAGUSHI et al., 2015). No estado do Acre, também conhecido como açaí-solteiro, por volta "de 90% de toda polpa de frutas produzida no estado é de *E. precatoria* oriunda do extrativismo, com o município de Feijó ocupando o primeiro lugar em volume de produção" (CARTAXO et al., 2018). Quanto a participação lipídica, cerca de 66% das gorduras são monoinsaturadas, e apresenta principalmente ácidos graxos insaturados (73,9%), entre eles, o ácido oleico (56,2%), de seguida vem o ácido linoleico (11,5%) e linolênico (0,8%). Dentre os ácidos graxos saturados, os destacados são: os ácidos palmítico e esteárico com 24,1%, e 1,6%, respectivamente (FERNANDES, 2016) citado por CARTAXO et al. (2020).

No óleo de açaí da espécie *Euterpe edulis* Mart. tem-se um teor de lipídeos totais, cuja variação foi de 25,2% a 34,2%, onde os principais ácidos graxos foram o linoléico com 22,24%, o

palmítico com 24% e o oléico com 47%, apresentando concentração maior de ácidos graxos quando comparado com o da espécie *Euterpe oleracea* Mart. (SCHIRMANN, 2009).

Em análise cromatográfica gasosa, segundo (SCHONS, 2017), o óleo da Castanha-do-Brasil, (*Bertholletia excelsa* H. B. K.), em sua composição apresentou os ácidos graxos insaturados, com teor de 68,72%.

Foram produzidas nanoemulsões de alta e baixa energia com as misturas de óleos de açaí, das duas espécies, *Euterpe precatoria* Mart. e *Euterpe oleracea* Mart, assim como também, nanoemulsões de óleo de Castanha-do-Brasil da espécie *Bertholletia excelsa* H. B. K., bem como o encapsulamento de fármaco antifúngico pelo método de nanoemulsão de baixa energia, onde se obteve o melhor tamanho de diâmetro hidrodinâmico na nanoemulsão de altas energia.

Nanoemulsões são dispersões coloidais compostas por dois líquidos imiscíveis, um dos quais está disperso no outro (GUTIÉRREZ et al., 2008). As nanoemulsões ganharam atenção significativa como sistemas de entrega dirigida de fármacos (MCCLEMENTS, 2018; SALVIA-TRUJILLO et al., 2019). A

nanoemulsão (óleo em água-O/A) é capaz de incorporar drogas hidrofóbicas e anfipáticas (ANUCHAPREEDA et al., 2012). Em uma gota em nanoescala de dispersões coloidais multifásicas são opticamente transparentes para tamanhos de 50 nm–200 nm e de aparência leitosa para tamanhos de até 500 nm (MASON et al., 2006).

O método de emulsificação de alta energia (microfluidização) foi empregado neste estudo devido à sua capacidade de reduzir o tamanho da gota de forma eficaz em um curto tempo de processo e também fornece maior flexibilidade no controle das propriedades físicas da nanoemulsão (ANUCHAPREEDA et al., 2012). Os fitonutrientes menores no óleo de palma, como carotenos, tocoferóis e tocotrienóis, fornecem benefícios à saúde, incluindo propriedades antioxidantes e anticancerígenas (OLAFISOYE et al., 2017).

Neste estudo preparamos a nanoemulsão dos óleos mistos e caracterizamos as propriedades físico-químicas, Dispersão de Luz Dinâmica para aplicações de citotoxicidade *in vitro*.

1.1 OBJETIVO GERAL

Preparar e caracterizar a nanoemulsão do óleo misto de Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H. B. K.), e óleo de açaí da espécie (*Euterpe oleracea* Mart.) e *Euterpe precatoria* Mart para aplicar no ensaio citotóxico em C6 e em células gliais, pelo método de nanoemulsão de alta energia.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar os óleos de Castanha-do-Brasil e óleo de açaí de duas espécies, quanto aos parâmetros físico-químicos, espectroscópicos, cromatográficos e seus perfis de ácidos graxos;

- Realizar ensaios de atividade antioxidante dos óleos, inclusive o misto na proporção 1:1 pelos métodos Rancimat e DPPH;

- Produzir nanoemulsão dos óleos pelo método de baixa e alta energia;

- Caracterizar as nanoemulsões quanto ao tamanho do diâmetro hidrodinâmico, polidispersão e potencial Zeta, utilizando técnica de espalhamento de luz (Dinamic Light Scattering – DSL);

- Realizar ensaio de viabilidade em C6 (gliobastoma murino) em células gliais de cultura primária da retina de embrião de galinha, por meio do método MTT e do método de Hemólise.

2 REVISÃO DA BIBLIOGRÁFICA

2.1 AS NANOEMULSÕES

As nanoemulsões têm recebido uma atenção significativa como sistemas de entrega direcionada de medicamentos e são promissoras devido às suas características únicas como melhor estabilidade, solubilidade e liberação controlada, com aplicações nas indústrias de alimentos e cosméticos (MCCLEMENTS, 2018; SALVIA-TRUJILLO et al., 2019). Nanoemulsões são dispersões coloidais compostas por dois líquidos imiscíveis, sendo um deles disperso no outro (GUTIÉRREZ et al., 2008). A nanoemulsão (óleo em água-O/A) é capaz de incorporar medicamentos hidrofóbicos e anfipáticos (ANUCHAPREEDA et al., 2012). Em uma gota em nanoescala de dispersões coloidais multifásicas são opticamente transparentes para tamanhos de 50 nm a 200 nm e de aparência leitosa para tamanhos de até 500 nm (MASON et al., 2006). Os fitonutrientes menores no óleo de palma, como carotenos, tocoferóis e tocotrienóis, fornecem benefícios à saúde, incluindo propriedades antioxidantes e anticancerígenas (OLAFISOYE et al., 2017).

2.2 TECNOLOGIA DE NANOEMULSÕES

A seleção cuidadosa de ingredientes desempenha um papel crucial na formação e estabilidade de nanoemulsões. A utilização estratégica de óleos, emulsificantes e componentes da fase aquosa tem impacto direto nesse processo(HAMEDPOUR et al., 2019). Destaca-se a escolha específica do óleo de açaí e da castanha-do-Brasil como elementos lipídicos, enriquecendo as nanoemulsões com propriedades nutricionais e bioativas notáveis, conforme estudado por Gonçalves et al. (2014) e Escribano et al. (2017). Além disso, diferentes emulsificantes, como polissorbatos, lecitina e goma arábica, foram minuciosamente avaliados por suas capacidades emulsificantes, proporcionando uma compreensão mais profunda dessa tecnologia inovadora (HAMEDPOUR et al., 2019). Essa pesquisa visa revelar a interconexão complexa entre ingredientes e o impacto subsequente nas propriedades das nanoemulsões, contribuindo para avanços significativos nesse campo.

2.3 MÉTODOS DE EMULSIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO

Métodos de baixa energia, como temperatura de inversão de fase, emulsificação espontânea e separação de fase, têm sido empregados para a produção de nanoemulsões (BOUCHEMAL et al., 2004; KOMAIKO & MCCLEMENTS, 2016). Técnicas de alta energia, incluindo homogeneização de alta pressão e ultrassom, oferecem vantagens na redução do tamanho da

partícula e aumento da estabilidade da nanoemulsão (LU & LIU, 2002; MOSQUERA et al., 2020).

Para a caracterização Físico-Química em sistemas nanoestruturados, são utilizadas técnicas de caracterização, como espalhamento dinâmico de luz, microscopia eletrônica de transmissão e análise reológica, são empregadas para avaliar o tamanho de partícula, distribuição de tamanho, morfologia e comportamento reológico de nanoemulsões (PICHOT & LEAL-CALDERON, 2004; MCCLEMENTS, 2015).

2.4 ANÁLISE DE ESTABILIDADE

A avaliação da estabilidade envolve a avaliação da estabilidade física, incluindo formação de creme, sedimentação e coalescência, bem como a estabilidade química, como degradação oxidativa e hidrolítica (TADROS et al., 2014; JAISWAL et al., 2015).

2.5 ESTRATÉGIAS DE OTIMIZAÇÃO

A otimização da produção de nanoemulsões requer um ajuste cuidadoso dos ingredientes da formulação, métodos de emulsificação e parâmetros de processamento, tudo com o objetivo de alcançar o tamanho de partícula desejado, estabilidade e atributos sensoriais ideais. Em termos de métodos, a escolha entre técnicas como homogeneização, ultrassom e alta pressão influencia diretamente a qualidade da nanoemulsão. Parâmetros cruciais, como velocidade de agitação e tempo de processamento, são determinantes para garantir a uniformidade e a eficiência do processo. Quanto aos atributos sensoriais, referem-se às características percebidas pelos sentidos, como textura, sabor e aroma, desempenhando um papel fundamental na aceitação do produto final pelo consumidor. Portanto, a otimização é uma abordagem multifacetada, considerando métodos, parâmetros e experiência sensorial para alcançar resultados ideais. (HUANG et al., 2014).

2.6 APLICAÇÕES DAS NANOEMULSÕES EM ENSAIOS DE CITOTOXIDADE

A citotoxicidade está intimamente relacionada com o potencial que uma substância tem em inibir o crescimento celular ou causar danos e lesões às células, levando-as à morte (GHASEMI et al., 2021). Sendo assim, substâncias citotóxicas podem diminuir a capacidade de autorrenovação de um tecido ou causar sua degeneração por morte das células. Tais substâncias que causam toxicidade às células podem ser de origem endógena ou exógena, como toxinas, venenos, poluentes, etc. (SOARES, N. P., 2023).

Estudos em culturas de neurônios retinais dissociados de embriões de galinha com oito dias de idade foram utilizados para investigar o papel dos fatores neuronotróficos (NTF) no desenvolvimento da retina neural (HOFMANN H.D., 1988).

O teste do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) é um teste usado para avaliar viabilidade celular. O MTT, quando incubado com células vivas tem seu substrato quebrado por enzimas mitocondriais, transformando-se de um composto amarelo em um composto azul escuro (formazan). A produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória (PERES et al., 2008).

A técnica do ensaio MTT possibilita realizar o cultivo de células em uma placa de cultura na densidade adequada, onde as células são tratadas com diferentes condições, onde diferentes concentrações das drogas de interesse permitem deixar no tempo de incubação de 24 h. Depois, procede-se com adição do MTT à cultura celular na concentração de 0,0005 g/mL, ocasião em que a placa é incubada em condições adequadas para permitir a conversão completa do MTT em formazan (5% CO2; 37 ºC) por 3 h. De seguida o meio de cultura é removido e adicionado o solvente orgânico dimetilsulfóxido (DMSO) para dissolver os cristais de formazan, ocasião que se procede com a medida da absorbância da solução em um espectrofotômetro num comprimento em torno de 570 nm. Observa-se que a quantidade de formazan formado é proporcional ao número de células ativas sendo expresso através da intensidade da cor da solução, cuja a análise é feita comparando as leituras de absorbância entre as diferentes concentrações, permitindo determinar a inibição/proliferação celular dando resposta aos diferentes tratamentos (GHASEMI et al., 2021; RISS et al., 2013).

No ensaio de hemólise, é importante ressaltar que a hemoglobina possui um espectro de absorção distinto, permitindo que o grau de hemólise seja medido em solução utilizando um espectrofotômetro ou leitor de placa, fornecendo assim valores de densidade óptica (DO), em Otimização do Ensaio de Hemólise para Avaliação de Citotoxicidade (SAEBO et al., 2023).

As nanoemulsões oferecem oportunidades para a incorporação de óleo de açaí e Castanha-do-Brasil em alimentos funcionais, bebidas e cosméticos, proporcionando benefícios nutricionais e aprimoramentos sensoriais (SALVIA-TRUJILLO et al., 2019).

2.7 A NANOTECNOLOGIA E SUA ESPECTRAL APLICABILIDADE

O sistema de entrega de fármacos há décadas vem sendo estudado, para a prevenção de efeitos colaterais indesejáveis no tratamento do câncer, onde as nanopartículas têm caráter promissor, como a compatibilidade de nanoesferas magnéticas de albumina (ESTEVANATO et al.,

2011).

É amplamente reconhecido que os triglicerídeos carregados com selênio e encapsulados em nanocápsulas têm sido objeto de estudo no contexto da terapia antitumoral, servindo como agente quimiopreventivo no tratamento do câncer de mama (ESTEVANATO et al., 2012).

As microemulsões do tipo O/A têm sido objeto de pesquisas para carreamento de fármacos poucos solúveis em água, portanto o sistema O/A passou a ser bastante estudado para o acondicionamento da droga em sistemas microemulsionados, em relevo e destacado está a pesquisa de microemulsão biocompatível óleo em água como carreador do composto antitumoral (BEVILACQUA et al., 2015).

A nanotecnologia e a nanomedicina andam de mãos dadas na atualidade utilizando nanopartículas poliméricas, inclusive em combate a doenças antivirais, como é o caso do coronavírus Doença Infecciosa COVID-19, sobretudo, quando se trata de nanopartículas de quitosona para entrega de medicamentos antivirais (SAFER et al., 2021).

As nanoformulações têm se apresentado como cunho promissor no tratamento do câncer, o composto de doxorrubicina e partículas de óxido de ferro contendo proporções de colesterol, podendo, inclusive, sensibilizar as células cancerígenas à quimioterapia (MARKIEWICZ et al., 2021).

A procura de alimentos saudáveis e ecologicamente corretos passou a ser bastante intensa, sobretudo, na substituição de produtos poliméricos tradicionais por polímeros naturais com o uso de nanoemulsões, filmes à base de gelatina reforçada óleo essencial de pimenta do reino (SARANTI et al., 2021).

No Sistema coloidal tem-se as nanoemulsões, onde os tamanhos das partículas encontram-se em escala nanométrica, sendo capazes de encapsular de forma protegida dando origem à ativos ingredientes numa formulação, em que a relação área/volume superficial é grande, ofertando aplicações em alimentos, cosméticos, fármacos, em virtude de à sua capacidade de incorporar substâncias hidrofílicas e lipofílicas, comparadas com as microemulsões (ROCHA-FILHO et al., 2020).

O tamanho das partículas coloidais é fundamental para diminuir os efeitos colaterais de quimioterápicos que são tóxicos, tanto para células saudáveis, como para células cancerígenas, visto que tais fármacos são o suficientemente pequenos, com potencialidade de atravessar o endotélio em quase todo organismo, logo após a sua administração, atingido o alvo (células

cancerígenas e normais) (ALMEIDA et al., 2005). Daí, nanopartículas de 50-800 nm não são possíveis de passar para regiões saudáveis do organismo, visto que os espaços intercelulares estão na escala de 15-30 nm (VIEIRA et al., 2016).

A liberação controlada de biofármacos, em moléculas alvo, por meio de nanoestruturas, em face do tamanho manométrico, são potenciais carreadores para liberação controlada de medicamento pese a uma preocupação latente com a segurança e seus possíveis efeitos nocivos das nanoestruturas, o que justifica a intensidade de pesquisas nesta área biotecnológica (QUINTÃO et al., 2022).

A elevação da capacidade antioxidante na pimenta, por meio da aplicação de compostos bioativos e antioxidantes, como o uso do cobre em quitosana na forma de hidrogéis, foi claramente comprovada em frutos de pimenta jalapeño. Esse aumento foi evidenciado nos testes de teor antioxidante ABTS [2,2 –azino- bis (ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfônico)] e DPPH (2,2DIFENIL-1- PICRILHIDAZIL), bem como nos níveis de fenóis totais e flavonoides (PINEDO- GUERRERO et al., 2017).

O polímero natural quitosana tem sido muito utilizado na agricultura estimulando o crescimento das culturas em seu encapsulamento com liberação controlada, por meio de nanopartículas estimulando o teor de vitamina C e de licopeno no fruto do tomateiro (HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ et al., 2018).

O extrato de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), conforme estudos recentes, possui compostos que apresentaram efeitos citotóxicos, resultando o induzimento a alterações morfológicas em linhagem celular, podendo ter a autofagia com aumento de produção de EROS no câncer de mama, em face da atividade antioxidante e os flavonoides sequestrantes de radicais livres (SILVA et al., 2021).

A instabilidade térmica de certos compostos funcionais no fruto do açaí, quando expostos a temperaturas elevadas, motivou o desenvolvimento de alternativas de encapsulação para preservar a biofuncionalidade. Isso é evidente,por exemplo, na preservação dos conteúdos polifenólicos após tratamento em altas temperaturas, conforme abordado por LOPEZ et al. (2019).

As nanopartículas de prata têm sido objeto de pesquisas na linha dabiotecnologia verde, no formato de biocompostos, como no caso do extrato de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) e tem dado respostas animadoras para o tratamentode câncer (SIBUYI et al., 2021).

Numa nanoemulsão a formação de Micelas depende da Concentração Micelar Crítica (CMC), para que se tornem estáveis, com interior hidrofóbico confinado e isolado do meio aquoso, nascendo a oportunidade em usar polímeros anfifílicos, que apresentam segmentos hidrofóbicos e hidrofílicos (PIVETTA et al., 2021).

O açaí (*Euterpe oleracea* M.*)* e a castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*) possuem compostos bioativos como no caso de ácidos graxos ômega-3; ômega- 6 e ômega-9, e outros micro e macronutrientes podem apoiar o sistema imunológico, bem como o nutricional de saúde humana (SANTOS et al., 2022).

O óleo de açaí (*Eutérpe olerácea* Mart.) têm sido alvo de formulações de microemulsões para incorporação de fármacos, e também para insumos em novos medicamentos, alimentos e cosméticos (ROCHA-FILHO et al., 2020). O aumento da condutividade elétrica do sistema é devido a maior presença de água, possibilitando e viabilizando procedimentos em processos analíticos em óleos vegetais (SILVA et al., 2015).

Existe um grande número de estudo na literatura científica ondecaracterizam nanoemulsão com gotículas até 500 nm (HAMEDPOUR et al., 2019). Componentes funcionais dos alimentos podem ser introduzidos nas gotículas, em sua região interfacial ou na fase contínua (SILVA et al., 2015). Dentro das gotículas, os encapsulamentos, sua degradação química pode ser minimizada por meio da engenharia das propriedades da camada interfacial (WEISS et al., 2006).

O processo de nanoencapsulação possibilita proteção dos ingredientes alimentares bioativos, muitas vezes sensíveis as condições ambientais desfavoráveis e incompatíveis, no caso de transportadores de lipídios (FATHI et al., 2012).

Por meio da nanotecnologia os constituintes orgânicos podem variar de tamanho, como no caso de grandes polímeros, para moléculas mais simples, em que os nanomateriais orgânicos, como no caso das proteínas, dos carboidratos e gorduras, podendo ser sintetizados para finalidades específicas, como é o caso de encapsulamento de nutrientes para melhora do sabor, da textura e da sua consistência (CUSHEN et al., 2012).

Os terpenóides são isolados e, por meio de técnicas cromatográficas, identificados utilizando a Ressonância Magnética Nuclear (RMN), o quepossibilitou o isolamento dos terpenos (CURSINO et al., 2009).

Os antioxidantes são substâncias que em baixa concentração retardam a oxidação, um processo pelo qual ocorre uma perda de elétrons, desempenhando um papel significativo na

patogênese de uma série de distúrbios que levam ao estresse oxidativo, permitindo desequilíbrio entre a produção celular de espécies reativas de oxigênio e os mecanismos de defesa antioxidante (HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ et al., 2018) ROS (por exemplo, radical superóxido, peroxinitril, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio) são produzidos decorrentes do resultado de reações metabólicas em sistemas vivos (GERONIKAKI et al., 2013).

As antocianinas, flavonoides responsáveis por pigmentação solúvel em água, demonstram diversas atividades biológicas, incluindo propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticancerígenas. Contudo, sua suscetibilidade à degradação em pH elevado, influenciada pela luz, calor e oxigênio durante manipulação e armazenamento, torna desafiador o uso de técnicas convencionais de microencapsulação. Essas técnicas frequentemente falham em proporcionar a preservação das antocianinas em ambientes fisiológicos, devido ao considerável tamanho de partícula, bem como ao baixo potencial Zeta eeficiência de encapsulamento (CHEN et al., 2019).

O açaí é rico em antocianinas (ACNs) (GONÇALVES et al., 2014). Há comprovação em estudos científicos de seus benefícios para a saúde (SCHIRMANN, 2009). Uma das formas de proteger as ACNs e aumentar sua aplicabilidade são realizadas emulsões água em óleo (A/O) formuladas comsucesso com diferentes concentrações de extratos de açaí (RABELO et al.,2018).

Os sucos de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.*)* e juçara (*Euterpe edulis* Mart.) melhoraram os níveis de colesterol HDL-c e a defesa antioxidante de adultos saudáveis em um estudo cruzado randomizado de 4 semanas (SOLTANI- KERMANSHAHI M. Et al., 2021).

2.8 MEDIDA INDIRETA DO POTENCIAL DE OXIDAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS

A estabilidade oxidativa de biodiesel é avaliada pelo método Rancimat (método oficial da norma europeia EM 14112 para biodiesel), obtida com a determinação do tempo de indução da amostra (TI), e se baseia no aumento da condutividade da água que permitem a retenção dos ácidos voláteis que são produtos da oxidação do combustível (METROHM, 2023).

O tempo de indução mostra a interação dos ácidos graxos ligados e livres, por causa do número de ligações duplas, antioxidantes e pró-oxidantes existentes em determinada amostra de óleo submetida altas temperaturas (GERIS et al., 2007).

2.9 PESQUISA QUANTITATIVA, EXPLORATÓRIA E DESCRITIVA AINDA NA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Trata-se de uma pesquisa quantitativa em que a utilização do método exploratório e descritivo estão aliados à bibliografia disponível sobre o tema comofonte de coleta de dados para a presente pesquisa e satisfação de seus objetivos, um dos meios utilizados em Ciências Naturais pelos pesquisadores no sentido de sintetizar aquilo que é investigado de forma sistemática aos conhecimentos existentes (GIL, 2008).

Na pesquisa exploratória tem-se em perspectivas fenômenos novos e que permita ao pesquisador um melhor entendimento, possibilitando aferir a viabilidade de um estudo mais profundo ou escolher os melhores métodos a serem utilizados e que tenha melhor meio de viabilizar seu objeto de estudo. (SITTA et al, 2010; GARCES, 2010).

No nível empírico da pesquisa é onde o método científico irá se manifestar de maneira mais clara, ou seja, dando subsídios sobre como fazer, analisar e interpretar observações. Pouco desse método é diretamente pertinenteao nível teórico, que é realmente a parte mais desafiadora da pesquisa científica (VILLARES; NAKANO, 2000).

2.10 O MÉTODO DA TRANSESTERIFICAÇÃO NA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os ésteres estão presentes na natureza e estão associados ao odor semelhante ao que escapam das flores e frutos. Podem ser encontrados na gordura animal e vegetais, são os triglicerídeos. Na reação de esterificação, que é um processo reversível, onde se obtendo como produto principal um éster específico. O método de esterificação de Fischer (1895), na qual, sob aquecimento, um ácido carboxílico reage com um álcool (produzindo éster e água. (LEITE O.D.; BRAGA V.S., 2022).

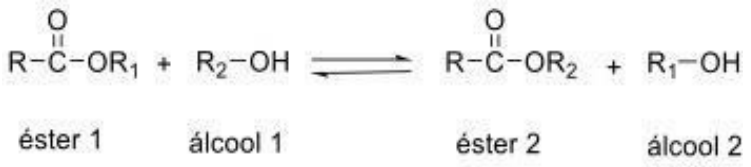
Óleos de origem vegetal são compostos de triglicerídeos (uma molécula de glicerol ligada a três de ácido graxo) e ácidos graxos livres (AGL). A transesterificação, sobretudo, na obtenção de biodiesel, estes triglicerídeos presentes no óleo são transformados em moléculas menores de ésteres de ácido graxo por meio de um agente transesterificante (álcool primário) e um catalisador (base ou ácido). (BARROS T. D.; JARDINE G. J., 2021).

A Transesterificação descreve importante classe de reações orgânicas em que um éster é transformado em outro através da troca do resíduo alcoxila. A transesterificação é uma alcoólise quando o éster reage com um álcool (Figura 1a). Trata-se de uma reação é reversível. No entanto, é necessário a presença de um catalisador (ácido ou base) para que a reação ocorra mais

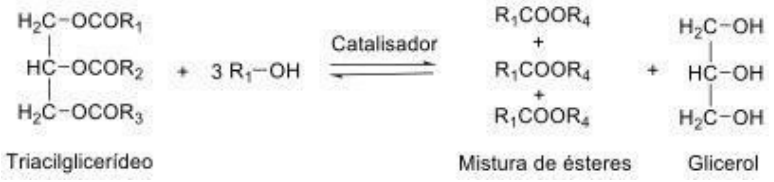
rapidamente. Quando se trata de transesterificação de óleos vegetais, um triacilglicerídeo reage com um álcool na presença de uma base ou ácido forte, obtendo-se uma mistura de ésteres de ácidos graxos e glicerol (Figura 1b) (GERIS et al., 2007).

Figura 1 - a) Equação geral para uma reação de transesterificação; b) equação geral da transesterificação de um triacilglicerídeo. Fonte: (GERIS et al., 2007).

a)



b)



Fonte: (GERIS et al., 2007).

2.11 ARTIGOS PUBLICADOS PELO AUTOR

2.11.1 Preparação e caracterização de nanoemulsão dos óleos de *Euterpe oleracea* e *Bertholletia excelsa* Bonp

Neste artigo, foram estudados os óleos de *Bertholletia excelsa* (BE) e *Euterpe oleracea* (EO), conhecidos como Castanha-do-Brasil e açaí, respectivamente. Realizamos a caracterização das propriedades físico-químicas e atividades antioxidantes desses óleos. A formulação da nanoemulsão mista foi preparada combinando volumes equivalentes dos dois óleos em uma configuração água-óleo (A/O), seguindo uma metodologia adaptada de alta energia. A nanoemulsão foi caracterizada por meio de Espalhamento de Luz Dinâmica (DLS), permitindo calcular o diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas, o potencial Zeta e a polidispersão (PDI). Os resultados sugerem que as nanoemulsões de BE e EO produzidas com alta energia têm potencial para serem aplicadas em formulações alimentícias e cosméticas, oferecendo benefícios nutricionais e distintas propriedades sensoriais. Essas nanoemulsões podem representar uma opção promissora para o desenvolvimento de produtos que agregam valor aos alimentos e cosméticos, com propriedades antioxidantes provenientes dos óleos naturais, ampliando suas aplicações e benefícios para a saúde e bem-estar (MAIA FILHO et al., 2023b).

2.11.2 Ensaio de viabilidade celular da nanoemulsão de óleo de açaí (*Euterpe Precatoria* Mat.) e castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Bonp) em células C6 e gliais

Neste artigo, foram caracterizados os óleos de açaí (*Euterpe Precatoria* Mart) e castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Bonp) em termos de propriedades físico-químicas e utilizamos a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-MS). Avaliamos a viabilidade e citotoxicidade de nanoemulsões contendo esses óleos em células C6 (glioma) e células gliais, investigando também o potencial de hemólise nas células sanguíneas. Os resultados da cromatografia gasosa revelaram composições majoritárias como ácido oleico (64,2%), palmítico (16,7%) e linoleico (8,4%) para o óleo de açaí, enquanto o óleo de castanha-do-Brasil apresentou ácido linoleico (35,3%), oleico (31,7%), palmítico (15,2%) e esteárico (14%). As nanoemulsões não demonstraram efeito citotóxico significativo nas células C6 até 1% de concentração, e nas células gliais até 0,4%. Contudo, observou-se hemólise nas células sanguíneas na maior concentração dos óleos, enquanto até 0,4%, não houve hemólise significativa. Essas informações são cruciais para embasar a aplicação segura dessas nanoemulsões em diferentes setores industriais (MAIA FILHO et al., 2023a).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo, buscou-se empregar o método científico que engloba uma ampla gama de tratamentos, ferramentas e técnicas de pesquisa. Isso inclui a utilização de dados tanto qualitativos quanto quantitativos, análises estatísticas e condução de experimentos.

3.1 PREPARAÇÃO DAS NANOEMULSÕES

Na preparação das nanoemulsões foram utilizados óleo de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) comercial adquirido da empresa Bela Vida Natural, e (*Euterpe precatória* Mart.) adquirido da Cooperativa de Produtores Agroextrativistas Frutos da Amazônia (COOPFRUTOS), localizado no município de Manoel Urbano (8º50'16''S 69º15'44''W), estado do Acre, óleo de Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Bonp.), adquirido da empresa Olam Óleos da Amazônia, localizada no município de Rio Branco, estado do Acre (9º59'08''S 67'50'01''W), com componentes lipídicos majoritário nas formulações da produção das nanoemulsões.

Os tensoativos usados nas formulações foram 80 TWEEN (Sigma Aldrich UK) e 80 SPAN (Sigma Aldrich USA), de Pluronic® F-127, foram ainda utilizados álcool etílico 98%, água ultrapura obtida no Aqua Master ALL® (Gehaka), todos osreagentes foram utilizados assim como recebidos.

3.2 TESTE RANCIMAT E O POTENCIAL ANTIOXIDANTE

No método Rancimat, a oxidação é induzida pela passagem de uma corrente de ar a uma taxa de 10 L/h através de uma amostra de biodiesel (±3 g) mantida a temperatura constante (100, 110 e 120 °C). O elétrodo é conectado a um dispositivo de medição e registro. Indica o fim do IP (ponto de indução) quando a condutividade começa a aumentar rapidamente (GERIS et al., 2007). Este aumento acelerado é causado pela dissociação de ácidos carboxílicos voláteis produzidos durante o processo de oxidação e absorvidos na água. Quando a condutividade desta solução é registrada continuamente, obtém-se uma curva de oxidação cujo ponto de inflexão, conhecido como IP, pode ser calculado pelo ponto de intersecção de duas tangentes.

As três amostras tiveram o período de indução relativamente baixo. Vale ressaltar que antes dos pontos de indução em (h), a reação é lenta, há formação de peróxidos e não há a formação de ácidos carboxílicos voláteis. Após os pontos de indução há uma aceleração da reação com formação de ácidos carboxílicos voláteis.

É comprovado que quanto maior o percentual de ácidos graxos poliinsaturados menores os períodos de indução. A oxidação do óleo vegetal altera algumas de suas propriedades químicas e físicas como por exemplo, o aumento da condutividade indesejável para uso como matéria-prima para obiodiesel e o desenvolvimento de sabor e aromas indesejáveis para uso como alimento. Os óleos vegetais que possuem um maior percentual de ácidos graxos poli-insaturados estão mais sujeitos à oxidação. Devido à natureza do biodiesel, que mantém características químicas da matéria-prima usada para produzi-lo, as presenças de insaturações nas cadeias de ácido graxo intensificam a atividade oxidativa, e como de acordo com a literatura, reduzem o período de indução PI, também denominado Tempo de Indução.

3.3 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE

3.3.1 Método DPPH

Este estudo adotou o método DPPH previamente descrito por Rufino et al., 2007. Em resumo, foram elaboradas soluções da seguinte forma:

Solução de Álcool Metílico a 50%: Em um balão volumétrico de 1 L, adicionaram-se 500 ml de álcool metílico. Completou-se o volume para 1.000 ml com água destilada, homogeneizou-se e transferiu-se para um frasco de vidro etiquetado, armazenando a temperatura ambiente indefinidamente.

Solução de Acetona a 70%: Em um balão volumétrico de 1 L, adicionaram-se 700 ml de acetona. Completou-se o volume para 1.000 ml com água destilada, homogeneizou-se e transferiu-se para um frasco de vidro etiquetado, armazenando à temperatura ambiente indefinidamente.

Solução Controle de Álcool Metílico, Acetona e Água: Em um balão volumétrico de 100 ml, adicionaram-se 40 ml da solução de álcool metílico a 50% (item "Solução de Álcool Metílico a 50%") e 50 ml da solução de acetona a 70%. Completou-se o volume para 100 ml com água destilada, homogeneizou-se e transferiu-se para um frasco de vidro etiquetado, armazenando a temperatura ambiente indefinidamente.

Solução de DPPH 0,06 mM: Dissolveram-se 2,4 mg de DPPH em álcool metílico, completou-se o volume para 100 ml em um balão volumétrico com álcool metílico, homogeneizou-se e transferiu-se para um frasco de vidro âmbar etiquetado. Preparou-se e utilizou-se apenas no dia da análise.

Preparo das Soluções

A partir da solução inicial de DPPH (60 µM), elaboraram-se, em balões volumétricos de 10 mL, soluções variando a concentração de 10 µM a 50 µM, conforme a Tabela 1.

Tabela 1 - Preparo das soluções para curva do DPPH.

Solução de DPPH (ml)	Álcool metílico (ml)	Concentração final DE DPPH(µM)
0	10	0
1,7	8,3	10
3,3	6,7	20
5,0	5,0	30
6,7	3,3	40
8,3	1,7	50
10	0	60

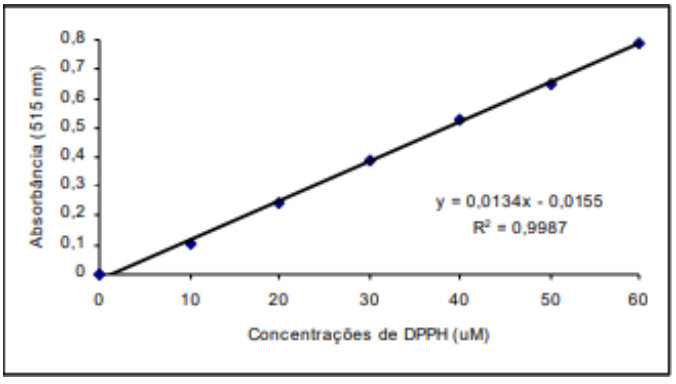
Fonte: (RUFINO et al., 2007)

Determinação da curva do DPPH

Em ambiente escuro, transferir uma alíquota de, aproximadamente, 4 ml de cada solução de DPPH (10 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM, 50 µM e 60 µM) para cubetas de vidro e realizar a leitura em espectrofotômetro a 515 nm. Utilizar álcool metílico, como branco, para calibrar o espectrofotômetro. Nos exemplos de (RUFINO et al., 2007):

Plotar as concentrações de DPPH (uM) no eixo X e as respectivasabsorbâncias no eixo Y e calcular a equação da reta (Fig. 2).

Figura 2 – Exemplo de curva do DPPH x absorbância.



Fonte: (RUFINO et al., 2007)

$$Y = AX - B$$

Onde:

Y = Absorbância inicial do controle / 2 (item "determinação da atividade antioxidante total")

X = Resultado em μM DPPH

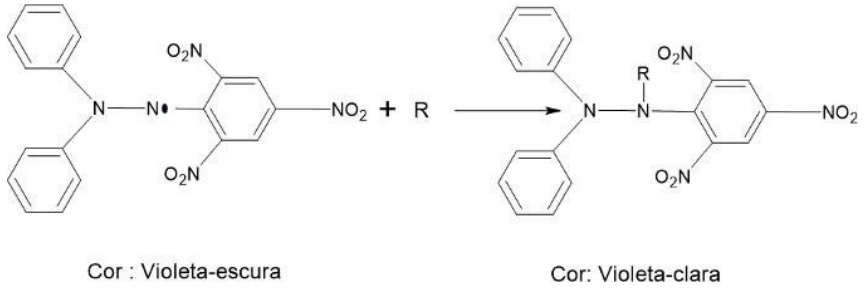
Obs: Converter para g DPPH, através da transformação:

gDPPH = (em μM DPPH / 1.000.000) * 394,3 (peso molecular do DPPH)

EC_{50}Expresso em g fruta / gDPPH

gfruta / gDPPH = (EC_{50} (mg/L / 1.000 * 1) / gDPPH

Figura 3 – Estabilização do radical livre DPPH.



Fonte: (RUFINO et al., 2007)

3.3.2 Procedimento experimental

Preparação de extratos de óleo

Os extratos polares de óleo foram preparados seguindo o método realizado por Geris et al. (2007). Todas as operações foram conduzidas sob condições de luz suave. Amostras de óleo (2-3 g) foram pesadas em um frascode 15 mL individualmente e diluídas com 5 mL de metanol. Após centrifugação (5 min, 5000 rpm), a fase superior foi coletada em um balão volumétrico. Para reduzir os danos do metanol às células, as extrações foram concentradas usando um metanol volatilizante. Todos os extratos metanólicos foram preparados em triplicata e armazenados a -80 °C até a análise (GERIS R. et al., 2007).

3.4 ANALISE CROMATOGRÁFICA

3.4.1 Perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) por CG-MS

A obtenção da composição de ácidos graxos foi obtida portransesterificação direta do óleo, segundo o método adaptado para microescalade Hartman e Lago, descrito por Filho, A. (1995). A reação de transesterificação foi realizada com 35 mg de óleo. Cada uma das amostras foi acondicionada em tubos de ensaio de 20 mL com tampa de rosca. A seguir, para cada amostra, adicionou-se 0,5 mL da solução básica de hidróxido de sódio e promoveu-se o aquecimento dos tubos de ensaio por 10 min em banho-maria a 90 °C. Posteriormente, resfriou-se os tubos de ensaios em banho de gelo e adicionou-se, em cada tubo de ensaio 1,5 mL da mistura esterificante preparada previamente (FILHO A., 1995).

As soluções contidas em tubos de ensaio foram aquecidas novamente por 10 mim em banho-maria a 90 °C. Em seguida os tubos de ensaio foram resfriados em banho de gelo. Por fim, adicionou-se 5 mL de n- heptano e 10 mL de água em cada um dos tubos de ensaio, agitando-os vigorosamente. Depois os tubos de ensaios foram colocados em repouso para separação de fases. A fase heptânica que contêm os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) foi coletada e armazenada em vials de 2 mL para injeção de líquidos (TERRA et al., 2014).

Nota: Cromatógrafo a gás (Agilent 7890B) acoplado ao espectrômetro de massas(7000D).

Descrição da amostra: Óleo de *Bertholletia excelsa* (Castanha-do-Brasil) e *Euterpe precatória* Mart. (Óleo de açaí).

Nota: A coleta/amostragem do material foi realizada sob a responsabilidade do cliente.

Método

Determinação qualitativa e semiquantitativa do perfil de ésteres metílicosde ácidos graxos (FAME) por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).

A obtenção da composição de ácidos graxos foi obtida por transesterificação direta do óleo, segundo o método adaptado para microescala de Hartman e Lago, descrito por Filho, A. (1995). A reaçãode transesterificação foi realizada com 35 mg de óleo. Cada uma das amostras foi acondicionada em tubos de ensaio de 20 mL com tampa de rosca. A seguir, para cada amostra, adicionou-se 0,5 mL da solução básica de hidróxido de sódio e promoveu-se o aquecimento dos tubos de ensaio por 10 min em banho-maria a 90 °C. Posteriormente, resfriou-se os tubos de ensaios em banho de gelo e adicionou-se, em cada tubo de ensaio 1,5 mL da mistura esterificante

preparada previamente. As soluções contidas em tubos de ensaio foram aquecidas novamente por 10 mim em banho-maria a 90 °C. Em seguida os tubos de ensaio foram resfriados em banho de gelo. Por fim, adicionou-se 5 mL de n-heptano e 10 mL de água em cada um dos tubos de ensaio, agitando-os vigorosamente. Depois os tubos de ensaios foram colocados em repouso para separação de fases. A fase heptânica que contêm os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) foi coletada e armazenada em vials de 2 mL para injeção de líquidos[1].

Nota: Cromatógrafo a gás (Agilent 7890B) acoplado ao espectrômetro de massas(7000D).

3.5 MÉTODOS DE ALTA ENERGIA

O método de emulsificação de alta energia (microfluidização) foi empregado neste estudo devido à sua capacidade de reduzir o tamanho da gota de forma eficaz em um curto tempo de processo e também fornece maior flexibilidade no controle das propriedades físicas da nanoemulsão.

Foi utilizada a técnica de homogeneização a quente para a preparação das pré-emulsões previamente descrita por Mehnert et al. (2012) e adaptada por Maia Filho et al. (2023b). Cada amostra foi preparada em um tubo de ensaio de vidro de 20 mL. A fase lipídica, contendo os surfactantes 1,22 g de (Tween 80 EHL = 15) e 0,82 g de (Span 80 EHL = 4.3) e para mistura que resultou a Nanoemulsão adotou-se na prática o EHL= 10,87, após sucessivos ensaios com base na literatura científica foi, a mistura foi aquecida em banho- maria a 75±5 ºC. Em seguida, adicionou-se água destilada à solução para completar um volume de 15 mL, em aquecimento e homogeneizou-se com o auxílio de um homogeneizador tipo rotor-estator (Turrax®-T 18) por 5,0 minutos a 6.000 rpm.

Posteriormente, seguindo o protocolo de Mehnert et al. (2012) e adaptado por Maia et al. (2023b), adicionaram-se os óleos de açaí e castanha-do-Brasil e homogeneizou-se por mais 5 minutos a uma rotação de 8.000 rpm. Em seguida, adicionou-se mais água destilada para completar o volume total de 40 mL da mistura e homogeneizou-se por 3 minutos a 8.000 rpm. Após essa etapa, realizou-se a sonicação da solução por dois ciclos: o primeiro ciclo com 35% da potência do equipamento, com um tempo de sonicação de 10 minutos; o segundo ciclo com 55% da potência do equipamento, com um tempo de sonicação de 10 minutos.

Este método de alta energia, como a homogeneização a quente, são eficazes para a produção de nanoemulsões estáveis com tamanho de gotículas reduzido, o que contribui para a preservação dos componentes ativos constantes nos óleos de açaí e de Castanha-do-Brasil, com a melhoria de suas propriedades para aplicabilidade em diferentes áreas, como a indústria

alimentícia, a cosméticae a farmacêutica.

3.6 NANOEMULSÃO DE BAIXA ENERGIA

A nanoemulsão de baixa energia foi obtida pelo método de formação do filme polimérico, seguindo o protocolo estabelecido por Gao et al. (2002) e adaptado por Maia et al. (2023b). O processo de obtenção da nanoemulsão, composta pelos óleos de açaí e castanha-do-Brasil, envolveu a preparação inicial de três soluções numeradas como 01, 02 e 03.

- **Preparo da solução 01:**

Pesou-se 0.075 g de Pluronic® F-127, as quais foram diluídos em 10 mL de álcool etílico a 98%, aquecidos numa chapa aquecedora a temperatura de 60 °C, por 5 minutos.

- **Preparo da solução 02:**

Pesou-se 0.025 g de óleo de açaí, diluiu-se em 10 mL de álcool etílico a 98% e aqueceu-se numa chapa aquecedora a 75 °C, por um tempo de 5 minutos.

- **Preparo da solução 03:**

Pesou-se 0.025 g de óleo de Castanha-do-Brasil, diluiu-se com 10 mL de álcool etílico a 98% e aqueceu-se numa chapa aquecedora a 75 ºC por um tempode 5 minutos.

Em um balão de fundo redondo de um rotaevaporador, adicionou-se 1 mL da solução 01, 0.5 mL da solução 02 e 0.5 mL da solução 03 e 3,0 mL de álcool etílico a 98%. Em seguida, sob vácuo parcial de -760 mmHg, aqueceu-se a mistura à temperatura de 45 °C e 35 rpm, por 10 min até evaporação total do soluto e formação de um filme no balão. Em seguida retirou-se a o balão e hidratou-se a solução com 5 mL de água ultrapura e acondicionou-se num frasco âmbar para as caracterizações (GAO et al., 2002) adaptado.

3.7 CARACTERIZAÇÃO DA NANOEMULSÕES

3.7.1 Espalhamento Dinâmico de Luz

A média do diâmetro hidrodinâmico da nanopartícula e o índice de polidispersividade (PDI) das dispersões de NLS foram determinadas por DLS usando um Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments; Malvern, UK). Para facilitar a medição, cada amostra foi diluída na proporção 1:100 com água bidestilada para cada medição, as leituras foram realizadas em triplicata a uma temperatura de 25 ºC.

3.7.2 Potencial Zeta (ζ)

O Potencial zeta (ζ) das nanopartículas lipídicas foi realizado usando o Zeta Sizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, Malvern, UK). As amostras foram diluídas na proporção 1:100 com água bidestilada e acondicionada em cubeta poliestireno modelo (DTS 1070).

3.8 ANÁLISDE DA VIABILIDADE CELULAR: MTT E HEMÓLISE

3.8.1 Cultivo e manutenção de glioma, células C6

As células C6, inicialmente adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC) e armazenadas no Laboratório de Neuroquímica Molecular e Celular da Universidade Federal do Pará, foram descongeladas e ressuspensas em Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). Após centrifugação e ressuspensão em 1 mL, as células foram semeadas em garrafas de cultura e passaram por um período de estabilização de aproximadamente duas semanas. Durante esse período, realizou-se a manutenção da cultura, incluindo troca de meio a cada dois dias e tripsinização. A cultura celular foi utilizada a partir da segunda passagem, com uma confluência de 90%.

3.8.2 Plaqueamento para ensaios

Para a realização dos experimentos, as células foram lavadas duas vezes com tampão fosfato salino (PBS) e dissociadas enzimaticamente (2mL de tripsina 0,05%; EDTA 0,022% por 5 min), seguido de inativação da tripsina com 4 mL de meio de cultura e centrifugação (1500 rpm/2 min). O precipitado celular foi ressuspendido em 1mL de meio e a densidade celular determinada por contagem em microscópio óptico utilizando Câmara de Neubauer de uma alíquota diluída em solução do corante azul de Trypan 0,4%. As células foram usadas em uma densidade de 106

em uma placa de 24 poços ou 105 células por poço em uma placa de 96 poços.

3.8.3 Cultura e manutenção de Glias de Muller

Resumidamente, os embriões de galinha com oito dias de desenvolvimento (E8) foram dissecados, limpos de epitélio pigmentoso e colocado em meio balanceado livre de Ca2+ e Mg2+ (CMF). Passando pelo processo de dissociação enzimática com Tripsina (concentração final de 0,05% p/v) foi adicionando ao meio e incubado a 37 °C por 10 min. Após breve centrifugação, o pellet foi suspenso em DMEM e dissociado mecanicamente com o auxílio de uma pipeta, a densidade celular foi determinada por contagem em microscópio óptico utilizando Câmara de Neubauer de uma alíquota diluída em solução do corante azul de Trypan 0,4%. As células foram semeadas com meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS) em placas de cultura de 24 poços. A placa foi transferida para uma estufa umidificada com de 95% de ar/5% de CO2. O meio foi trocado uma vez 24 h após as células terem sido plaqueadas e depois a cada dois ou três dias.

3.8.4 Tratamento celular

Após a cultura estar estabelecida e apresentando aproximadamente 70% de confluência, as células foram lavadas com PBS e tratadas seguindo uma série de diluição em concentrações crescentes.

3.8.5 Ensaio de viabilidade

Para avaliar a possível citotoxicidade foi utilizado o ensaio baseado no composto 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2-5-difenil-2H-tetrazolium bromídrico (MTT). O método consiste na redução do composto MTT, de coloração amarelada, ao composto formazan, somente por células viáveis, originando um produto de coloração azul que precipita no interior das mitocôndrias e que foi solubilizado onde utilizou-se a solução de dimetilsulfóxido (DMSO). Após os tratamentos, as células foram incubadas por 2 h a 3 h em solução 0,5 mg/mL de MTT em DMEM livre de soro. Após este período o meio de cultura foi removido e adicionado cerca de 500 µL da solução de DMSO em cada poço, onde 200 µL do produto resultante de cada poço foi transferido para uma placa de 96 poços e analisado por espectrofotometria (λ = 570 nm).

3.8.6 Ensaio de Hemólise

O ensaio de Hemólise foi aplicado para avaliar o efeito do composto no rompimento da membrana de eritrócitos. A hemoglobina é um pigmento presente nas células vermelhas do sangue e sua liberação é um indicador de hemólise. Para realização do ensaio uma amostra de sangue foi coletada e processada por centrifugação de 3000 rpm/10min e ressuspensão e solução salina tamponada (PBS) duas vezes, uma solução de eritrócitos mais diluída foi preparada a partir da processada (na concentração final de 2%). Seguidamente ocorreu a exposição à droga, e a solução de eritrócitos foi colocada em tubos diferentes, e analisada; como controle positivo: foi utilizado a solução detergente Triton na concentração de 1% e solução de eritrócitos, controle negativo: PBS + solução de eritrócitos, branco do controle positivo: Triton 1% + PBS. Passando pelo período de incubação de 1 h. Após o período de incubação os tubos foram centrifugados por 3000 rpm/10min. 100 μL do sobrenadante é adicionado em uma placa de 96 poços, a absorbância foi medida a 570 nm em um leitor demicroplacas (BioRad, Hercules, CA, EUA).

3.8.7 Análise Estatistica

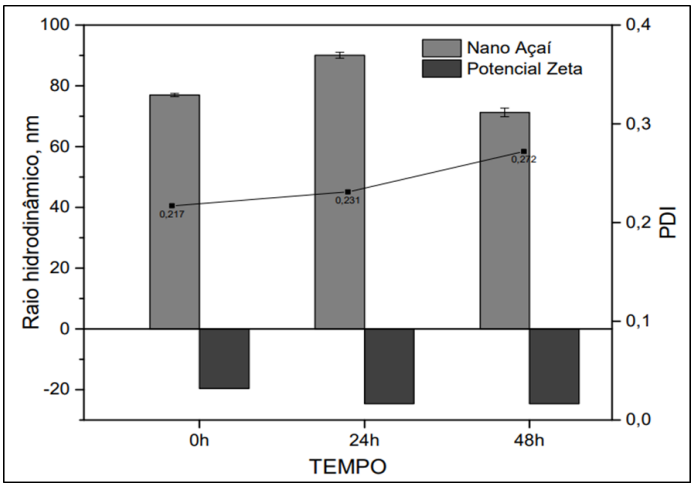
Utilizou-se do Software GraphPad Prism, para análise estatística nos resultados de viabilidade celular, conforme anexo, que combina gráficos científicos, ajuste de curvas compreensíveis (regressão não linear), estatísticasde fácil entendimento, organização e dados.

4 RESULTADOS

4.1 NANOEMULSÃO DE ALTA E BAIXA ENERGIA - RESULTADOS INDICADOS NO ÍTEM 4.5 E 4.6)

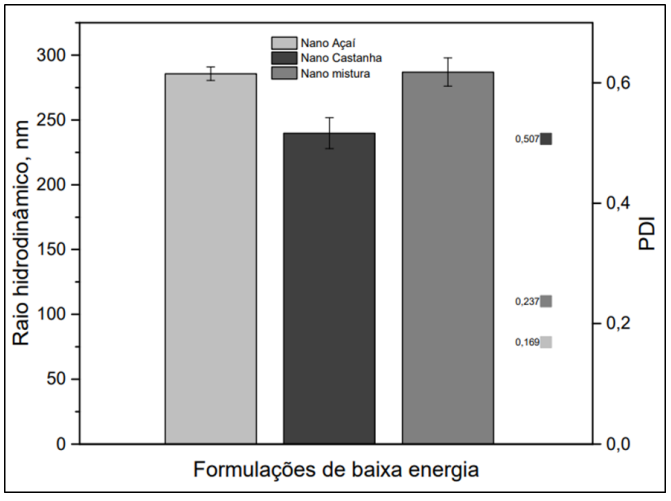
Através do método de alta energia, as nanoemulsões exibiram partículas com tamanhos variando entre 80 nm e 120 nm, conforme mostrado na Figura 4. Esse resultado evidencia a eficácia da técnica de homogeneização a quente usada na preparação das pré-emulsões, pois produziu partículas de tamanho reduzido, ideal para os ensaios de viabilidade celular.

Figura 4 - Tamanho médio, potencial Zeta e índice de polidispersividade das formulaçõesobtidas pela técnica de alta energia em função do tempo (Resultado estatístico do item 4.5).



Fonte: (MAIA FILHO et al., 2023b)

Figura 5 - Tamanho médio e índice de polidispersividade das formulações obtidas pela técnica de baixa energia (Resultado estatístico do item 4.6).



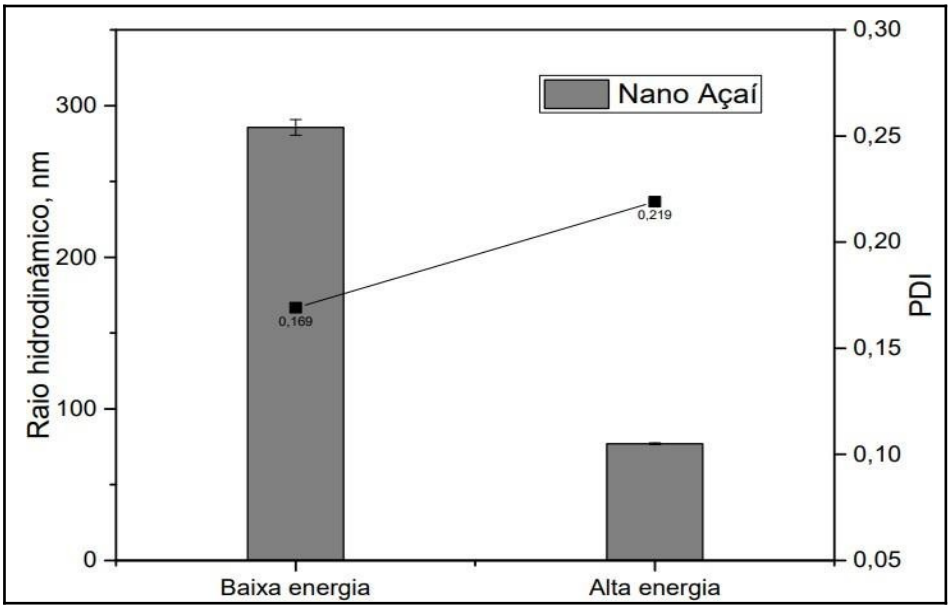
Fonte: (MAIA FILHO et al., 2023b)

Tabela 2 - Valores médios de tamanho, índice de polidispersividade e potencial Zeta para as nanoemulsões obtidas por baixa energia (Resultado estatístico do item 4.6).

Formulações	Raio hidrodinâmico (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
Nano Açaí	285,6 ± 5,17	0,169	-19,6
Nano Castanha	239,8 ± 11,98	0,507	-24,6
Nano mistura	286,9 ± 10,8	0,237	-23,13

Fonte: (MAIA FILHO et al., 2023b)

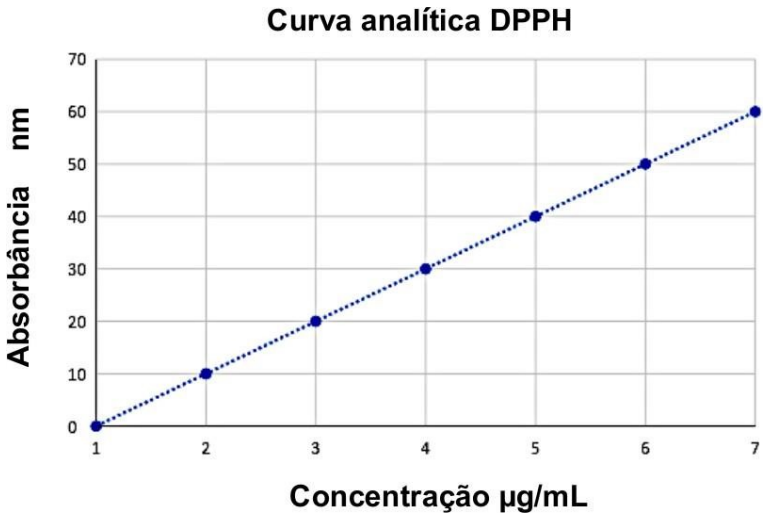
Figura 6 – Representação do raio hidrodinâmico das nanoemulsões de alto e baixa energia dasnanoemulsões.



Fonte: (MAIA FILHO et al., 2023b)

Conforme o teste RANCIMAT, a atividade antioxidante o óleo de Castanha-do-Brasil comparado com o óleo de açaí, possui atividade antioxidante maior que a do açaí, porém, quando se faz a mistura dos óleos na proporção 1:1, esta possui atividade antioxidante maior do que eles separadamente. O mesmo acontece quando se faz análise antioxidante pelo método de DPPH.

Figura 7– Absorbância x concentração.



Fonte: Autor (2023)

A equação da reta (Y = -0,0256 + 0,01175.x) representa a calibração das concentrações usando o ácido gálico como referência. Permite relacionar a concentração de substâncias nos óleos, com valores específicos para os coeficientes (a e b), simplificando a quantificação de compostos nos óleos de Castanha e Açaí.

Ácido gálico (Referencia como base) – 5,95

µg/mLMistura de óleos – 10,69 µg/mL

Óleo de Castanha – 12,77

µg/mLÓleo de Açaí – 14,02

µg/mL

Equação da Reta

$$Y = A + B \cdot X$$

Valores das variáveis:

a = -0,0256

b = 0,01175

$$Y = - 0,0256 + 0,01175 \cdot X$$

Como resultado ainda do ítem 4.5, no tocante à formulação de naoemulsão de alta energia, a mistura de tensoativos (Span 80 e Tween 80) utilizada para formar nanoemulsões. Com 5% de tensoativo em uma solução de 40 mL, foram calculadas as quantidades de Span 80 (0,77 mL) e Tween 80 (1,22 mL) necessárias, pesando 0,82 g e 1,22 g, respectivamente.

A + B = 1 (ou 100%)

(A * EHLA) + (B * EHLrec)DES

A = Porcentagem de Span 80

B = Porcentagem de Tween

80X = $EHL_{Requerido}$

$EHL_A = 4,3$

$EHL_B = 15$

Portanto:

$EHL_{Requerido} = (A * EHL_A) + (B * EHL_B) =$

$A = 100(x – EHL_B) / (EHL_A – EHL_B)$

B = 100 – A

Resolvendo para EHL de 10,87

A = 100(10,87 – 15) / (4,3 - 15)

A = 100 * -4,13/ -10,7

A = 38,59

B = 100 – 38,59

B = 61,4

Sabendo que será utilizado 5% de tensoativo de uma solução total de 40mL, ficará:

Q_t = Quantidade de tensoativo

$Q_t = 0,05 * 40$

$Q_t = 2$ mL

Q_A = Quantidade de tensoativo A

Q_B = Quantidade de tensoativo B

Q_A = 0,3859 * 2

Q_A = 0,77 ml Span 80

Q_B = 0,614 * 2

Q_B = 1,22 mL Tween 80

Como vai ser pesado em grama afim de obter maior precisão ficará:

d = Densidade, Tween 80 Densidade = 1,0 g/cm3; Span 80 Densidade = 1,06 g/cm3

d = m/v

m Span 80 = 1,0 * 1,22

m Span 80 = 0,82 g

m Tween 80 = 1,22 g

Estas foram as proporcões de tensoativos utilizados nas formulaçoes de nanoemulsões de alta energia.

4.1 ÓLEO DE CASTANHA - RESULTADOS CROMATOGRÁFICOS NO ÍTEM 4.4

Os resultados analíticos do óleo de Castanha-do-Brasil il (*Bertholletia excelsa* H. B. K.), constam na Tabela 3. Esses resultados revelaram uma composição diversificada de éster metílico do ácido, destacando-se teores significativos de ácidos graxos como palmítico (12,3%), oleico (22,6%), linoleico (35,1%), e linolênico (8,7%). A somatória dos ácidos graxos saturados (SFA) representou 23,9%, enquanto a dos insaturados (UFA) atingiu 76,1%, demonstrando a predominância de ácidos graxos insaturados no perfil lipídico do óleo.

Tabela 3 - Resultados analíticos do óleo de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H. B. K.).

Éster Metílico do Ácido	Teor (%)
Palmítico	12,3
Esteárico	8,2
Oleico	22,6
Vacênico	2,2
Linoleico	35,1
Linolênico	8,7
Araquidico	0,9
Metil 11 eicosanoico	0,5
Behenico	0,9
Ácido Hexadecanoico	0,9
Ácido octadecenoico	0,7
Ácido Oléico	2,9
Ácido octadecenoido 9,12	4,1
SFA	**23,9**
UFA	**76,1**

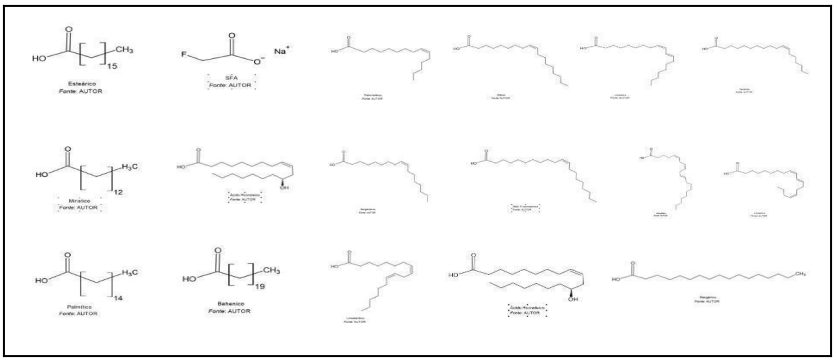
∑ SFA – Somatória do teor de FAME e Ácidos graxos saturado

∑ UFA – Somatória do teor de FAME insaturados.

Fonte: Autor (2023)

Os óleos de açaí e Castanha-do-Brasil apresentaram uma rica composição molecular, destacando-se por conterem ácidos graxos essenciais, antioxidantes e substâncias bioativas (fig. 8). Essas moléculas conferem propriedades nutricionais e antioxidantes que podem contribuir para potenciais benefícios à saúde e bem-estar.

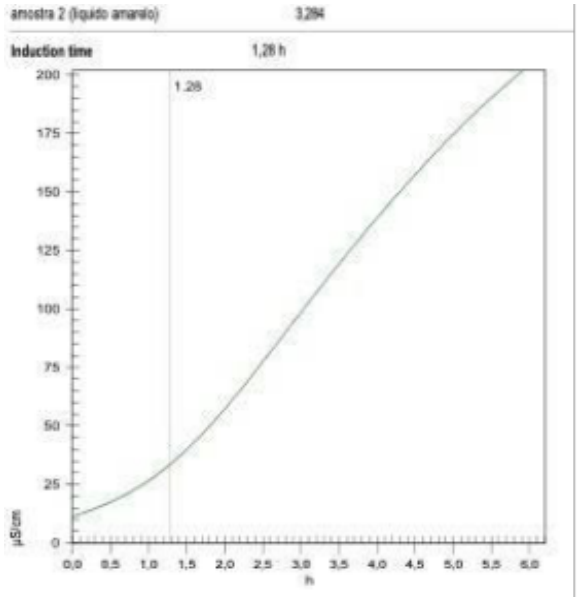
Figura 8 - Moléculas contidas nos óleos de açaí e de Castanha-do-Brasil que influenciam nas propriedades fisico-químicas da mistura dos óleos vistos nas tableas 6 e 7, conforme anexos 6 e 7.



Fonte: Autor (2023)

O óleo de Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H. B. K) foi submetido a um ensaio de variação de condutividade ao longo do tempo (fig. 9). Essa análise proporcionou insights valiosos sobre as propriedades elétricas do óleo, fornecendo informações dinâmicas sobre sua condutividade em diferentes intervalos de tempo, contribuindo para a compreensão mais abrangente de suas características físicas.

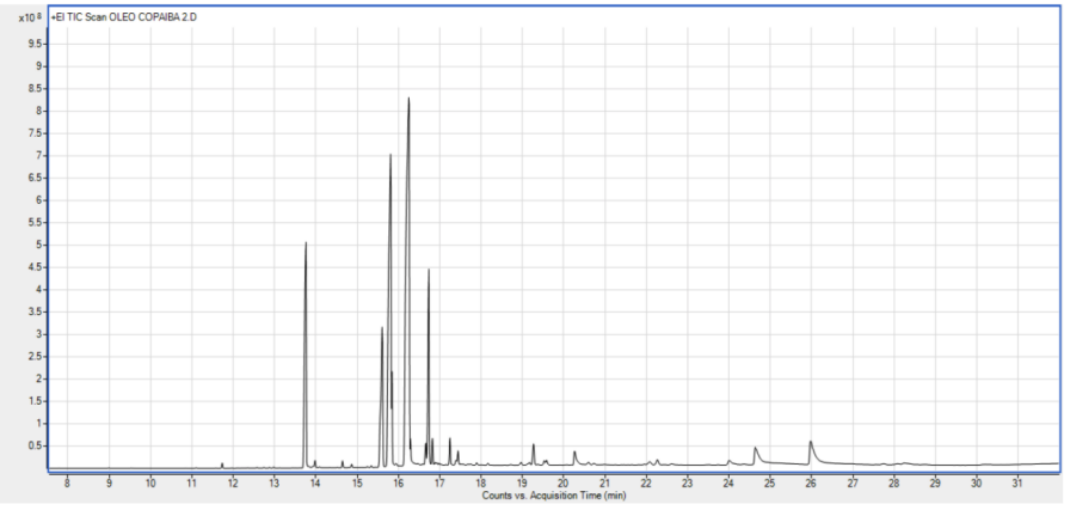
Figura 9 – Óleo de Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H. B. K.,). Variação da condutividade em função do tempo, resultado do Potencial antioxidanten conforme indicado em 4.2 pelo método Rancimat.



Fonte: Autor (2023)

A amostra 2 revelou uma rica ilustração dos picos cromatográficos por meio da análise. Os picos representam os componentes específicos presentes na amostra, destacando-se pela intensidade e posição relativa (Fig. 10). Essa ilustração fornece informações valiosas sobre a composição química da amostra 2, contribuindo para a caracterização detalhada do material analisado.

Figura 10 - Ilustração dos picos cromatográficos da amostra 2.

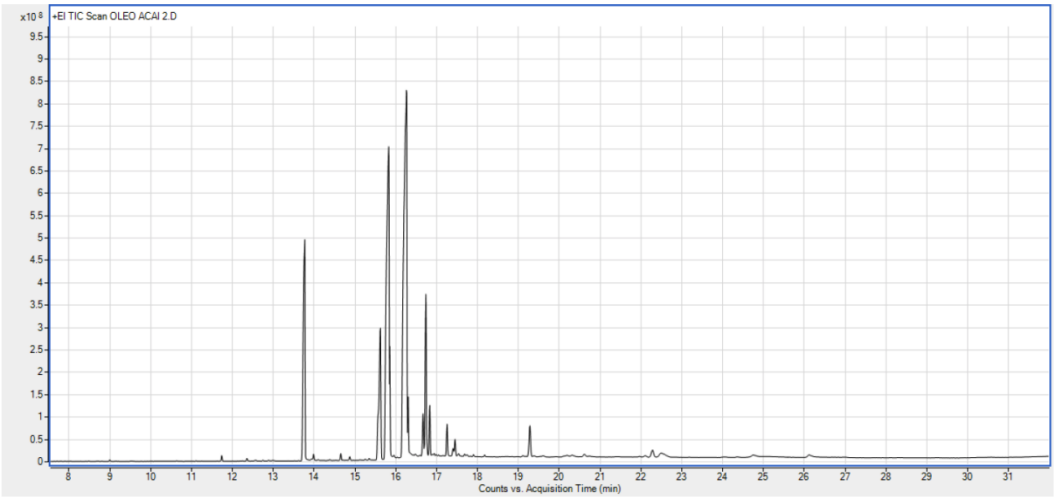


Fonte: (MAIA FILHO et al., 2023a)

4.2 ÓLEO DE AÇAÍ - RESULTADOS CROMATOGRÁFICOS NO ÍTEM 4.4

A análise cromatográfica da amostra 1 proporcionou a identificação clara dos picos, destacando os teores percentuais de ácidos graxos individuais (Fig. 11).

Figura 11 - Ilustração dos picos cromatográficos da amostra 1.



Fonte: (MAIA FILHO et al., 2023a)

O óleo revelou uma rica composição, com destaque para o ácido linoleico (37,2%) e o ácido oleico (27,3%). A soma dos ácidos graxos saturados (SFA) atingiu 23,7%, enquanto os insaturados (UFA) representaram expressivos 76,3% (Tabela 4). Essa distribuição equilibrada sugere propriedades nutricionais vantajosas e ressalta a amostra 1 como uma fonte potencialmente valiosa de ácidos graxos para aplicações alimentares e de saúde.

Tabela 4 – Identificação dos picos cromatográficos e o teor percentualcorrespondente a cada pico cromatográfico da amostra 1.

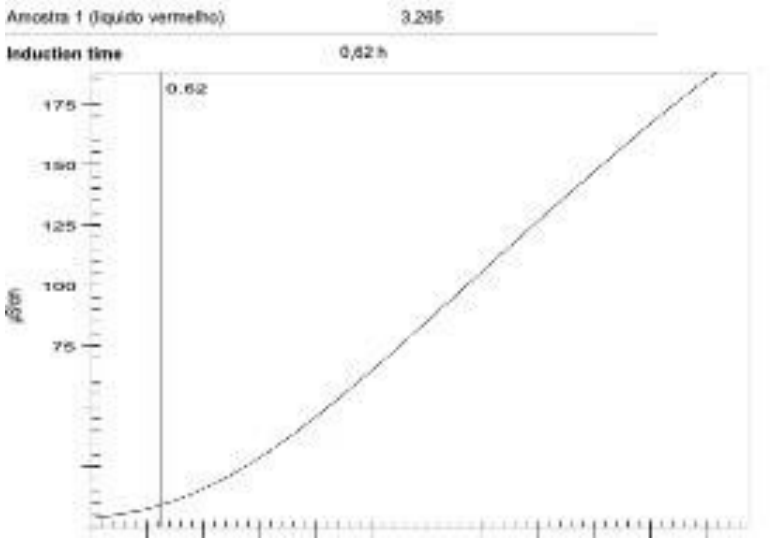
Éster Metílico do Ácido	Teor (%)
Palmítico	12,9
Esteárico	8,3
Oleico	27,3
Vacênico	2,1
Linoleico	37,2
Linolênico	9,0
Araquidico	1,0
Metil 11 eicosanoico	0,7
Behenico	1,5
SFA	**23,7**
UFA	**76,3**

∑ SFA – Somatória do teor de FAME e Ácidos graxos saturados

∑ UFA – Somatória do teor de FAME insaturados

Fonte: Autor (2023)

Figura 12 – Óleo de açaí (*Euterpe oleracea)*. Variação da condututividade em função do tempo, resultado do Potencial Antioxidante peo método Rancimat conforme indicado em 4.2.

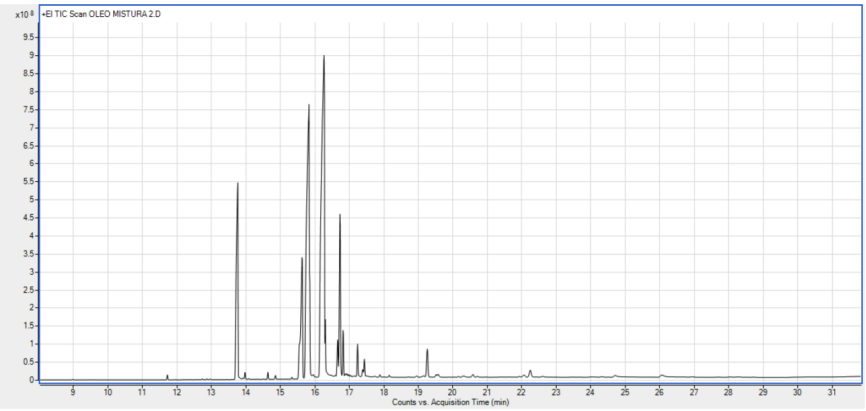


Fonte: Autor (2023)

4.3 MISTURA DOS ÓLEOS DE CASTANHA-DO-BRASIL (*BERTHOLLETIA EXCELSA* H. B. K.), E DE AÇAÍ - RESULTADOS CROMATOGRÁFICOS NO TEM 4.4

A análise cromatográfica da mistura das amostras 1 e 2, representando o óleo misto de Castanha-do-Brasil e açaí (50/50), proporcionou uma ilustração detalhada dos picos (Fig. 13).

Figura 13 - Ilustração dos picos cromatográficos da mistura das amostras 1 e 2.



Fonte: Autor (2023)

Destacam-se percentuais significativos de ácido linoleico (37,7%) e ácido oleico (28,5%), indicando uma composição semelhante às amostras individuais. A soma dos ácidos graxos saturados (SFA) atingiu 23,8%, enquanto os insaturados (UFA) representaram 76,2%.

Tabela 5 - Identificação dos picos cromatográficos e o teor percentual correspondente a cada pico cromatográfico das amostras 1 e 2.

Éster Metílico do Ácido	Teor (%)
Palmítico	12,3
Esteárico	9,2
Oleico	28,5
Linoleico	37,7
Linolênico	9,4
Araquidico	1,0
Metil 11 eicosanoico	0,6
Behenico	1,3
SFA	**23,8**
UFA	**76,2**

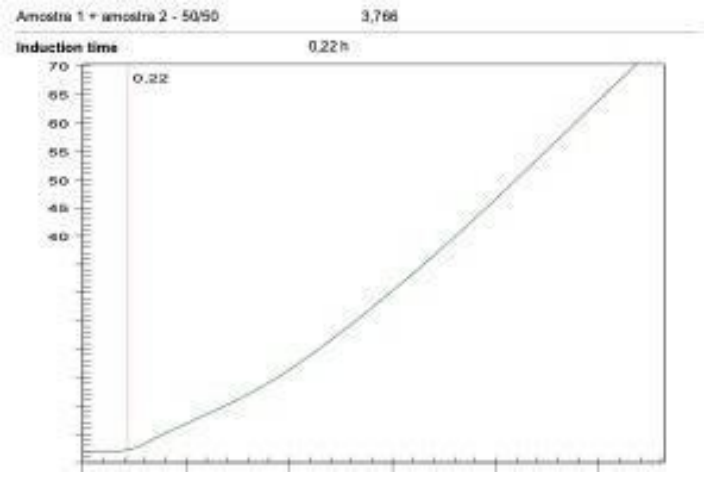
∑ SFA – Somatória do teor de FAME e Ácidos graxos saturados

∑ UFA – Somatória do teor de FAME insaturados

Fonte: Autor (2023)

A variação da condutividade em função do tempo reforça a estabilidade da mistura. Esses resultados enfatizam a viabilidade de produção de uma nanoemulsão evidenciando o potencial da mistura de óleos na promoção de benefícios à saúde.

Figura 14 – Óleo misto de Castanha-do-Brasil e açaí (proporção 50/50). Variação da condutividade em funçãodo tempo, resultado do Potencial Antioxidanten obtido pelo método Rnacimat conforme indicado em 4.2.



Fonte: Autor (2023)

Os resultados das análises físico-químicas dos óleos de *Bertholletia excelsa* H. B. K. (Castanha-do-Brasil) e *Euterpe oleracea* (açaí) demonstram conformidade com as especificações estabelecidas. O óleo de Castanha-do-Brasil apresenta características dentro dos padrões, como a cor amarela, densidade de 0,919 g/mL, índice de acidez de 4,88 mg KOH/g, índice de iodo de 118,53, índice de peróxido de 5,29 meq/kg, índice de refração de 1,4730 e índice de saponificação de 190,22 mg KOG/kg (Tabela 6).

Tabela 6 – Características Físico Químicas, (*Bertholletia excelsa* H. B. K). –*Lecythidaceae* (Óleo).

Característica	**Especificação**	**Resultado**	**Metodologia**
Cor (25°C)	Amarelo	De acordo	Propriedades organolépticas
Densidade (25°C g/mL)	0,910 - 0,920	0,919	*IAL 337/IV
Estado físico (25°C)	Líquido viscoso	De acordo	Propriedades organolépticas
Índice de Acidez (mg KOH/g)	< 10	4,88	AOCS Ca5-40
Índice de Iodo (Wijs)	100 - 135	118,53	*IAL 329/IV
Índice de Peróxido (meq/kg)	< 10	5,29	*IAL 326/IV
Índice de Refração (Nd 40°C)	1,4600 - 1,4800	1,4730	*IAL 327/IV

Índice de Saponificação (mg KOG/kg)	190 - 215	190,22	*IAL 328/IV
Odor (25°C)	Característico	De acordo	Propriedades organolépticas

*IAL-Instituto Adolfo Lutz

Fonte: Anexo 6 e 7

Da mesma forma, o óleo de açaí exibe propriedades adequadas, incluindo cor roxa, densidade de 0,916 g/mL, índice de acidez de 0,68 mg KOH/g, índice de iodo de 125,09, índice de peróxido de 9,66 meq/kg, índice de refração de 1,4715 e índice de saponificação de 197,41 mg KOG/kg (Tabela 7). Esses resultados reforçam a qualidade e conformidade dos óleos, fundamentais para diversas aplicações nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética.

Tabela 7 – Características Físico Químicas, *Euterpe oleracea* Mart. – *Aracaceae* (Óleo).

Característica	Especificação	Resultado	Metodologia
Cor (25°C)	Roxo	De acordo	Propriedades organolépticas
Densidade (25°C g/mL)	0,915-0,925	0,916	*IAL 337/IV
Estado físico (25°C)	Líquido viscoso	De acordo	Propriedades organolépticas
Índice de Acidez (mg KOH/g)	< 4,0	0,68	AOCS Ca5-40
Índice de Iodo (Wijs)	110-135	125,09	*IAL 329/IV
Índice de Peróxido (meq/kg)	< 10	9,66	*IAL 326/IV
Índice de Refração (Nd 40°C)	1,4660–1,4790	1,4715	*IAL 327/IV
Índice de Saponificação (mg KOG/kg)	170-210	197,41	*IAL 328/IV
Odor (25°C)	Característico	De acordo	Propriedades organolépticas

*IAL-Instituto Adolfo Lutz

Fonte: Anexo 6 e 7

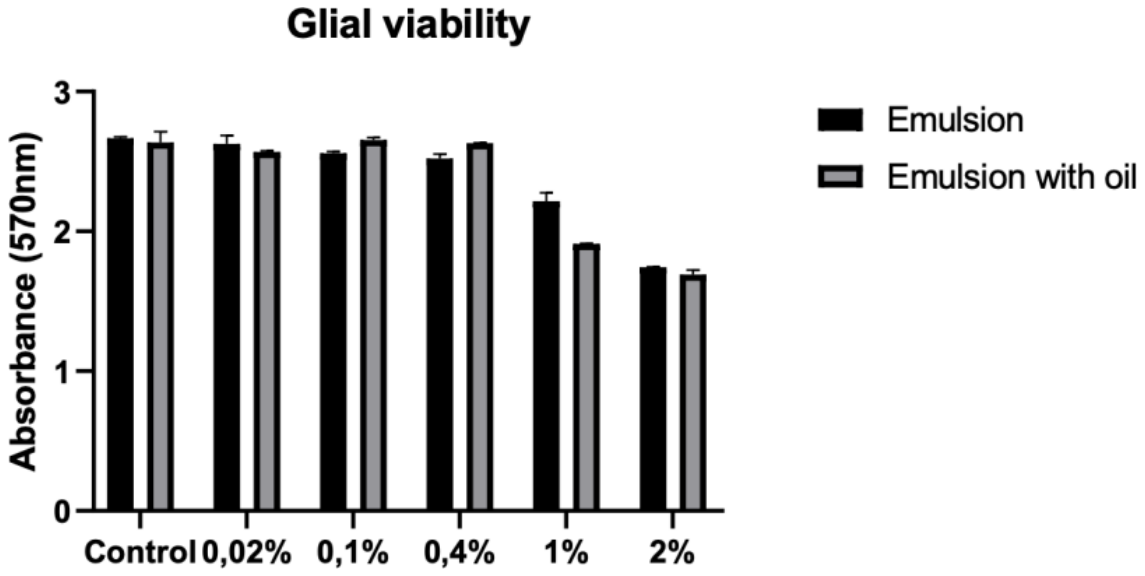
4.4 VIABILIDADE CELULAR - CONFORME INDICADO NO ÍTEM 4.8

Neste estudo, investigamos a viabilidade celular das formulações contendo óleos de *Bertholletia excelsa* H. B. K. (Castanha-do-Brasil) e *Euterpe precatória* Mart (açaí) em células C6 e glias de Müller. Os resultados revelaram que, em relação às células C6, as formulações não apresentaram efeitos citotóxicos significativos até a concentração de 1%.

4.4.1 Efeito nas Glias de Müller

No caso das glias de Müller, observamos que as formulações não demonstraram efeito citotóxico até a concentração de 0,4%, conforme mostrado na Figura 15. Esses achados indicam uma boa compatibilidade das formulações com as células C6 e as glias de Müller, sugerindo que esses óleos podem ser utilizados em aplicações que envolvem esses tipos de celulas sem causar danos significativos à viabilidade.

Figura 15. Viabilidade das glias de Müller



Fonte: (MAIA FILHO et al., 2023a)

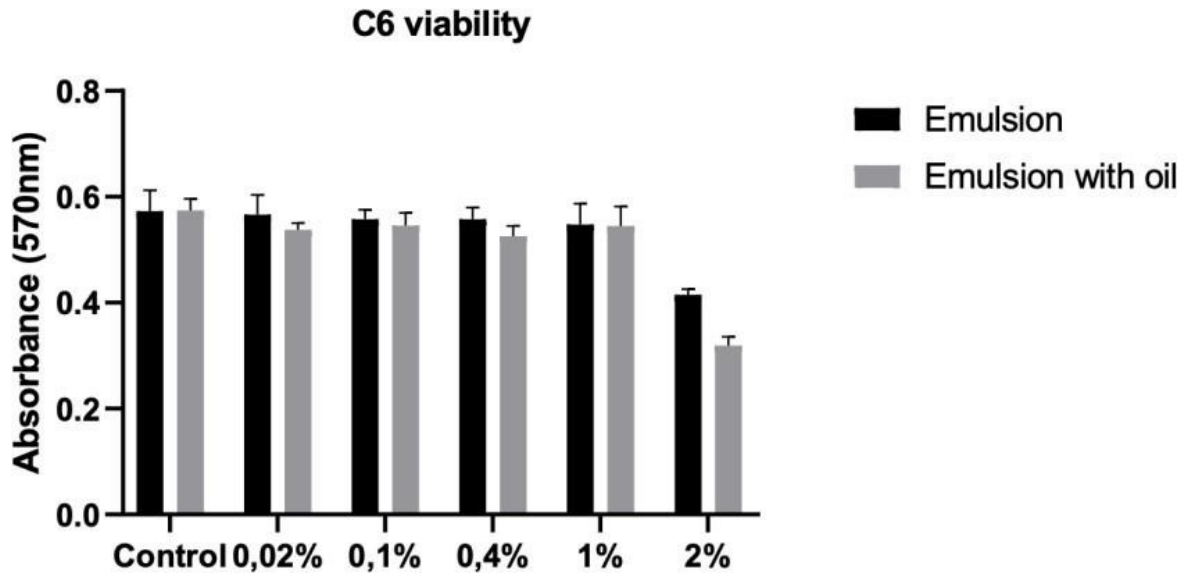
4.4.2 Ensaio de Viabilidade Celular (MTT)

Para avaliar a possível citotoxicidade das formulações contendo óleos de *Bertholletia excelsa* (Castanha-do-Brasil) e *Euterpe precatória* Mart. (açaí), utilizamos o ensaio baseado no composto 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H- tetrazolium bromídrico (MTT). Esse ensaio é amplamente utilizado na pesquisa de viabilidade celular, permitindo a avaliação da capacidade das células de converter o sal de MTT em formazan por meio de suas atividades metabólicas.

Nossos resultados indicam que as formulações não demonstraram efeito citotóxico significativo em células C6 até a concentração de 1%, conforme mostrado na Figura 16. Esses resultados sugerem que, em concentrações de até 1%, as formulações não prejudicaram a viabilidade das células C6. No entanto, é fundamental considerar que a concentração utilizada nas formulações pode influenciar nos efeitos nas células, e concentrações mais elevadas que possam requerer investigações adicionais.

Esses resultados fornecem informações valiosas sobre a segurança das formulações para células C6, contribuindo para a compreensão dos óleos de castanha-do-Brasil e açaí podem ser utilizados em diferentes aplicações sem comprometer a viabilidade celular.

Figura 16. Viabilidade das células C6.



Fonte: (MAIA FILHO et al., 2023a)

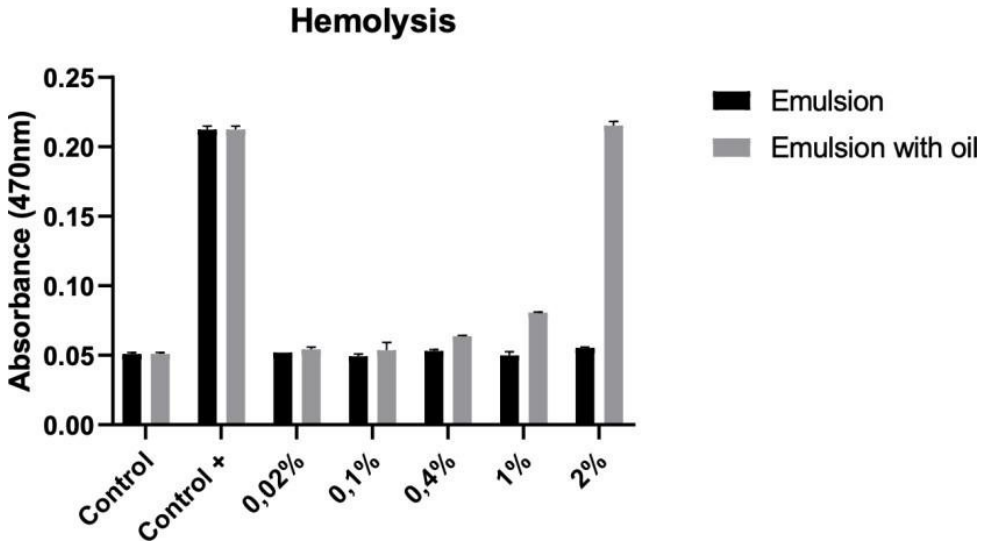
4.5 ENSAIO DE HEMÓLISE - CONFORME INDICADO NO ÍTEM 4.8

Entretanto, no ensaio de hemólise, notou-se um efeito diferente. Na maior concentração testada, a formulação contendo os óleos causou hemólise nas células. Por outro lado, até a concentração de 0,4%, não houve hemólise significativa na formulação que não continha os óleos. Observou-se, no entanto, um leve dano nas células tratadas com a formulação que continha os óleos, mesmo que a hemólise não tenha sido pronunciada.

Esses resultados destacam a importância de considerar a concentração eo tipo de células alvo ao avaliar a viabilidade e a segurança das formulações contendo óleos de *Bertholletia excelsa* e *Euterpe precatória* Mart. Enquanto as células C6 e as glias de Müller parecem ser compatíveis com as formulações em concentrações de até 0,4% e 1%, respectivamente, a presença dos óleos nas formulações pode levar a efeitos adversos nas células sanguíneas quando utilizadas em concentrações mais elevadas, conforme mostrado na Figura 17.

Esse entendimento é crucial para o desenvolvimento das aplicações de produtos que utilizam esses óleos em formulações, permitindo a otimização das concentrações para garantir tanto a eficácia quanto a segurança do produto final. Além disso, esses resultados ressaltam a importância de realizar ensaios de viabilidade celular específicos para diferentes tipos de células para avaliar com precisão os efeitos das formulações. Dessa forma, é possível garantir que esses óleos sejam aproveitados em diversas aplicações, com a devida atenção aos potenciais impactos na saúde e na segurança.

Figura 17. Ensaio de hemólise.



Fonte: (MAIA FILHO et al., 2023a)

5 DISCUSSÃO

Ficou evidente que a técnica de alta energia, como a homogeneização a quente, foi mais eficaz na redução do tamanho das partículas, resultando em nanoemulsões com partículas menores. Essa diminuição do tamanhoé vantajosa, apresentaram menor índice de polidispersão e maior estabilidade física e química pois aumenta a área de superfície, melhorando a dispersão e liberação dos componentes ativos dos óleos de açaí e Castanha-do-Brasil, potencializando seus efeitos benéficos à saúde.

Essa maior estabilidade coloidal é fundamental para garantir a uniformidade na distribuição dos componentes da formulação e evitar aglomeração indesejada das partículas ao longo do tempo. Demonstrou uma taxa de sedimentação menor e redução da coalescência das gotículas de óleo, indicando maior estabilidade ao longo do tempo. Essas nanoemulsões mostram-se promissoras para diversas aplicações industriais, oferecendo a possibilidade de incorporar óleo de açaí e Castanha-do- Brasil em formulações alimentícias funcionais, bebidas e produtos cosméticos, proporcionando benefícios nutricionais e melhorias em formulações famacológicas.

A técnica de alta energia facilitou a quebra das partículas de óleo em tamanhos menores, resultando em nanoemulsões mais estáveis e com uma maior área superficial (TADROS et al., 2014). Além disso, as nanoemulsões produzidas com alta energia apresentaram um menor índice de polidispersão, o que indica uma distribuição de tamanho de partícula mais homogênea (SALVIA-TRUJILLO et al., 2019). Esses resultados são consistentes com a eficácia da técnica de alta energia, como a homogeneização a quente, na produção de nanoemulsões com características desejáveis. A quebra das partículas de óleo em tamanhos menores contribui para a estabilidade das nanoemulsões, pois reduz a probabilidade de coalescência das gotículas de óleo e, consequentemente, evitaa separação de fases.

Além disso, a distribuição de tamanho de partícula mais homogênea nas nanoemulsões produzidas com alta energia é vantajosa, pois proporciona uma dispersão mais uniforme dos componentes ativos, resultando em uma melhor eficiência de encapsulação e liberação desses compostos. A estabilidade coloidal das nanoemulsões foi avaliada ao longo do tempo, por meio da análise da sedimentação e coalescência. Esses parâmetros são importantes para garantir que as nanoemulsões de óleo de açaí e de Castanha-do-Brasil, possam ser armazenadas e utilizadas por um período adequado, mantendo suas propriedades e benefícios para a saúde.

Observou-se que as nanoemulsões produzidas com alta energia apresentaram uma taxa menor de sedimentação e redução da coalescência das gotículas de óleo, indicando uma maior estabilidade em comparação com aquelas produzidas com baixa energia (MCCLEMENTS,

2018). Esses resultados reforçam a eficácia da técnica de alta energia, como a homogeneização a quente, na promoção da estabilidade coloidal das nanoemulsões de açaí. Dessa forma, as nanoemulsões produzidas com alta energia apresentam uma maior estabilidade coloidal ao longo do tempo, o que é essencial para sua aplicabilidade e para a manutenção das propriedades e benefícios da composição nanoestruturada do óleo de açaí da espécie *Euterpe edulis Mart.* na proporção 1:1 com óleo de Castanha-do-Brasil e surfactantes.

Quanto ao Estudo do Potencial de Oxidação dos óleos, a presença de insaturações nas cadeias de ácido graxo intensificam a atividade oxidativa, e como de acordo com a literatura científica, reduzem o período de insaturações, a presença de instaurações nas cadeias de ácido graxo intensificam a atividade oxidativa, reduzem o período de indução (PI), no caso, medido o tempo de indução da mistura na proporção 1:1, obteve-se o menor PI.

Verificou-se que no Estudo do Potencial de Oxidação dos óleos, a presença de instaurações nas cadeias de ácidos graxos intensifica a atividade oxidativa, e como de acordo com a literatura científica, reduzem o Período de Indução, a presença de insaturações nas cadeias de ácidos graxos intensificama atividade oxidativa reduzem o período de indução (PI), no caso, reduzindo o Período de indução da mistura na proporção 1:1; semelhante ocorre com o método DPPH, uma vez que nele pode-se observar que a mistura dos óleos de castanha-do-brasil e de açaí possui melhor atividade antioxidante do que analisados separadamente na mema proprção, onde utlizou-se no preparao de nanoemulsão, ocasião em que doram realizadas as análise de viabilidade celeular como proppostas nos objetivos da presente tese.

Neste estudo, além do estudo do potencial antioxidante do óleo misto na proporção 1:1 e separadamente, caracterizou-se estes óleos, de açaí (*Euterpe Precatoria* Mart.) e de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H. B. K), em termos de propriedades físico-químicas e utilizamos a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-MS). Avaliou-se a viabilidade e citotoxicidade de nanoemulsões contendo esses óleos em nanoemulsão e os surfactantes separadamente em células C6 (glioma) e células gliais, investigando também o potencial de hemólise nas células sanguíneas. Os resultados da cromatografia gasosa revelaram composições majoritárias como ácido oleico (64,2%), palmítico (16,7%) e linoleico (8,4%) para o óleo de açaí, enquanto o óleo de Castanha-do-Brasil apresentou ácido linoleico (35,3%), oleico (31,7%), palmítico (15,2%) e esteárico (14%). As nanoemulsões não demonstraram efeito citotóxico significativo nas células C6 até 1% de concentração, e nas células gliais até 0,4%. Contudo, observou-se hemólise nas células sanguíneas na maior concentração dos óleos, enquanto até 0,4%, não houve hemólise significativa.

6 CONCLUSÃO

Os resultados indicam que os compostos, surfactantes Tween 80 e Span 80, bem como a nanoemulsão com os óleos de Castanha-do-Brasil e de açaí, analisados, não demonstraram efeito citotóxico significativo em células C6 até a concentração de 1% das formulações. Em relação às glias de Müller, não foi observado efeito citotóxico até a concentração de 0,4%. Entretanto, no ensaio de hemólise, notou-se que na maior concentração, a formulação contendo os óleos causou hemólise nas células, enquanto até a concentração de 0,4%, não houve hemólise significativa na formulação sem o óleo, mas foi observado um leve dano nas células tratadas com a formulação que contém o óleo, ou seja, na nanoemulsão.

A análise dos resultados evidencia a eficácia da técnica de alta energia, especialmente a homogeneização a quente, na produção de nanoemulsões dos óleos de açaí e Castanha-do-Brasil. A redução significativa do tamanho das partículas proporcionou nanoemulsões mais estáveis, com menor índice de polidispersão e maior estabilidade física e química. A uniformidade na distribuição dos componentes ativos ao longo do tempo, demonstrada pela menor taxa de sedimentação e redução da coalescência, ressalta a vantagem da técnica de alta energia na formulação de nanoemulsões promissoras para aplicações alimentícias, cosméticas e de saúde. Além disso, os resultados do estudo de potencial de oxidação revelaram a influência das insaturações nas cadeias de ácidos graxos, indicando a necessidade de considerações específicas para manter a estabilidade antioxidante. Em suma, as nanoemulsões desenvolvidas com altaenergia mostram-se como uma opção promissora potencialidade para aplicação em diversos setores industriais, farmacêutico, destacando-se pela estabilidade colidal.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, V.L., LEITÃO, A., REINA, L.C.B., MONTANARI, C.A., DONNICI, C.L.Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular nãoespecíficos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, vol. 28, n. 1, p. 118-129, 2005. https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000100021.

ANUCHAPREEDA, S., FUKUMORI, Y., OKONOGI, S., & ICHIKAWA, H. Preparation of lipid nanoemulsions incorporating curcumin for cancer therapy. Journal of Nanotechnology, Article ID 270383. doi: 10.1155/2012/270383. 2012.

BARROS, T.D., JARDINE, J.G. Transesterificação. EMBRAPA, 2021. Disponível em: https://www.embrapa.br/agenciadeinformacaotecnologica/tematicas/agroenergia/biodiesel/tecnologia/transesterificacao. Acesso em: 01 set. 2023.

BEVILACQUA ROLFSEN FERREIRA DA SILVA G, SCARPA MV, CARLOS IZ, BASSI QUILLES M, COMELI LIA RC, TABOSA DO EGITO ES, GOMES DE OLIVEIRA A. Microemulsão biocompatível óleo-em-água como carreador do composto antitumoral dihidrojasmonato de metila. Int J Nanomedicina, 10(1), 585-594. doi: 10.2147/IJN.S67652. 2015.

BOUCHEMAL, K., BRIANÇON, S., PERRIER, E., FESSI, H., & BONNET, I. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. **International Journal of Pharmaceutics**, 280(1-2), 241-251. doi: 10.1016/j.ijpharm.2004.05.010. 2004.

CARTAXO, C. B. da C.; VASCONCELOS, M. A. M. de; PAPA, D. de A.; GONZAGA, D. S. de O. M.; ÁLVARES, V. de S. Euterpe precatoria Mart.: boas práticas de produção na coleta e pós-coleta de açaí-solteiro. Rio Branco, AC: **Embrapa Acre**, 2020. 55 p. (Embrapa Acre. Documentos, 166).

CARTAXO, C. B. da C.; GONZAGA, D. S. de O. M.; SILVA, F. de A. C. Perfil das agroindústrias familiares de frutas do Acre: Produção familiar e agroindústria rural. Brasilia: **Embrapa Acre**, 2018. 19-29 p. ISBN 978-85-7035-847-9.

CHEN, B. H., & STEPHEN INBARAJ, B. Nanoemulsion and Nanoliposome BasedStrategies for Improving Anthocyanin Stability and Bioavailability. **Nutrients.** 11(5), 1052. doi: 10.3390/nu11051052. 2019.

CUSHEN, M., KERRY, J., MORRIS, M., CRUZ-ROMERO, M., & CUMMINS, E. Nanotechnologies in the food industry - Recent developments, risks and regulation. **Trends in Food Science & Technology**, 24, 30-46. doi: 10.1016/j.tifs.2011.10.006. 2012.

CURSINO, L. M. C., & FERNANDES, C. C. et al. Triterpenos das folhas de Minquartia guianensis Aubl. (Olacaceae). **Acta da Amazônia**, 39(1), 181-186. 2009.

DO NASCIMENTO, R.J.S., COURI, S., ANTONIASSI, R., FREITAS, S.P. COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO DA POLPA DE AÇAÍ EXTRAÍDO COM ENZIMAS E COM HEXANO. **Rev. Bras. Frutic**., Jaboticabal - SP, v. 30, n. 2, p. 498-502. 2008.

DONSÌ, F., ANNUNZIATA, M., SESSA, M., & FERRARI, G. Nanoencapsulation ofessential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. LWT - **Food Scienceand Technology**, 44, 1908-1914. doi: 10.1016/j.lwt.2011.04.013. 2011.

ESCRIBANO, E., QUILES, A., CERDÁN-CALDERÓN, M., GARCÍA-MORENO, P. J., FERNÁNDEZ-ROMERO, J. M., QUILES, J. L., & MATAIX, J. Oleic acid biohydroxylation is increased in patients with rheumatoid arthritis. **Nutrition**, 42, 35-41. doi: 10.1016/j.nut.2017.05.003. 2017.

ESTEVANATO, C. O., CINTRA, D. D., BALDINI, N., PORTILHO, F. A., BARBOSA, L. R., MARTINS, M. M., & LACAVA, Z. G. Investigação preliminar de biocompatibilidade de nanoesferas magnéticas de albumina projetada como um potencial sistema versátil de liberação de fármacos. **Int J Nanomedicina**, 6, 1709-1717. doi: 10.2147/IJN.S21323. 2011.

ESTEVANATO, C. O., DA SILVA, N. R. S., FALQUEIRO, A. M., MOSINIEWICZ-SZABLEWSKA, E., SUCHOCKI, P., TEDESCO, A., ... & LACAVA, Z. G. Co-nanoencapsulação de nanopartículas magnéticas e selol para tratamento de tumor de mama: avaliação in vitro da citotoxicidade e eficácia da magnetohipertermia. **Int J Nanomedicina**, 7, 5287-5299. doi: 10.2147/IJN.S35279. 2012.

FATHI, M., MOZAFARI, M. R., & MOHEBBI, M. Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. **Trends in Food Science & Technology**, 23(1), 13-27. doi: 10.1016/j.tifs.2011.08.004. 2012.

FILHO, A. (1995). *Analise da composicao lipidica de alguns oleos vegetais com acao triatomicida*. Universidade Federal de São Carlos.

GAO, Z. et al. Diacyllipid – polymer micelles as nanocarriers for poorly soluble anticancer drugs. **Nano Lett**, v.2, n.9, p. 979 – 982, 2002.

GARCES, S. B. B. Classificação e Tipos de Pesquisas. **Universidade de Cruz Alta – Unicruz**; Abril de 2010.

GERIS R., SANTOS N.A.C., AMARAL B.A., MAIA I.S., CASTRO V.D., CARVALHO J.R.M. Biodiesel de soja – reação de transesterificação para aulas práticas de química orgânica. **Quim. Nova**, Vol. 30, No. 5, 1369-1373, 2007.

GERONIKAKI, A. A., PITTA, E. P., & LIARAS, K. S. Thiazoles and thiazolidinones as antioxidants. **Current Medicinal Chemistry**, 20(36), 4460-4480. doi: 10.2174/09298673113209990143. 2013.

GHASEMI, M.; TURNBULL, T.; SEBASTIAN, S.; KEMPSON, I. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. **Int J Mol Sci**.;22(23):12827, 2021.

GIL, ANTÔNIO CARLOS. ***Métodos e técnicas de pesquisa social.*** 6. ed. São Paulo: Atlas, 2008. https://www.scielo.br/j/inter/a/fwJKsNMmkVy3C9n7tfMGw9x/?lang=pt

GONÇALVES, C. V., CAMPOS, M. G., & TORRADO, E. G. Açaí (Euterpe oleracea Mart.) seed extract induces cell cycle arrest and apoptosis in human lung carcinoma cells. **Nutrition and Cancer**, 66(7), 1236-1246. doi: 10.1080/01635581.2014.948217. 2014.

HAMEDPOUR, S. F., TAFAZOLI-SHADPOUR, M., & SHOKRGOZAR, M. A. Nanoemulsions as promising delivery systems for phytochemicals: Preparation, characterization, and applications. **Food Research International**, 121, 99-116. doi: 10.1016/j.foodres.2019.03.020. 2019.

HERNÁNDEZ-FUENTES, A. D., ORTEGA-ORTIZ, H., BENAVIDES-MENDOZA, A., CADENAS-PLIEGO, G., & JUÁREZ-MALDONADO, A. A. Cu Nanoparticles in Hydrogels of Chitosan-PVA Affects the Characteristics of Post-Harvest and Bioactive Compounds of Jalapeño Pepper. **Molecules**, 22(6), 926. doi: 10.3390/molecules22060926. 2017.

HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, H., GONZÁLEZ-MORALES, S., BENAVIDES- MENDOZA, A., ORTEGA-ORTIZ, H., CADENAS-PLIEGO, G., & JUÁREZ-MALDONADO, A. Effects of Chitosan-PVA and Cu Nanoparticles on the Growth and Antioxidant Capacity of Tomato under Saline Stress. **Molecules**, 23(1), 178. doi: 10.3390/molecules23010178. 2018.

HOFMANN HD. Development of cholinergic retinal neurons from embryonic chicken in monolayer cultures: stimulation by glial cell-derived factors. **J Neurosci.** 1988 Apr;8(4):1361-9. doi: 10.1523/JNEUROSCI.08-04-01361.1988.PMID: 3357021; PMCID: PMC6569282.

HUANG, Q., YU, H., & RU, Q. Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology. **Journal of Food Science**, 79(7), R1071-R1084. doi: 10.1111/1750-3841.12520. 2014.

JAISWAL, M., DUDHE, R., & SHARMA, P. K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. **3 Biotech**, 5(2), 123-127. doi: 10.1007/s13205-014-0214-4. 2015.

KOMAIKO, J. S., & MCCLEMENTS, D. J. Formation of food-grade nanoemulsions using low-energy preparation methods: a review of available methods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 15(2), 331-352. doi: 10.1111/1541-4337.12178. 2016.

LEITE, O.D., BRAGA, V.S. **Esterificação e transesterificação - Conheça as características dessas reações**. **UOL,** 2023. Disponível em: https://educacao.uol.com.br/disciplinas/quimica/esterificacao-e-transesterificacao-conheca-as-caracteristicas-dessas-reacoes.htm?cmpid=copiaecola. Acesso em: 01 set. 2023.

LU, Y., & LIU, J. Comparative study of methods for preparing uniform-sized small droplets. **Journal of Colloid and Interface Science**, 249(2), 505-510. doi: 10.1006/jcis.2002.8217. 2002.

MASON, T. G., WILKING, J. N., MELESON, K., CHANG, C. B., & GRAVES, S. M. Nanoemulsions: Formation, structure, and physical properties. **Journal of Physics: Condensed Matter**, 18, R635-R666. doi: 10.1088/0953- 8984/18/41/R01. 2006.

MCCLEMENTS, D. J. Food emulsions: principles, practice, and techniques (2nd ed.). **CRC Press**. 2015.

MCCLEMENTS, D. J. Food emulsions: principles, practices, and techniques (3rd ed.). **CRC Press**. 2018.

METROHM. **Como o método Rancimat ajuda os produtores de óleos naturais a qualificar o valor de seu produto**. 2020. Disponível em:https://www.metrohm.com/pt_br/fique-por dentro/news/20-21/how-the rancimat- method-helps-producers-of-natural-oils-qualify-.html. Acesso em: 23 de jul. de 2023.

MAIA FILHO, M. et al. Ensaio de viabilidade celular da nanoemulsão de óleo de açaí (euterpe Precatoria Mat.) e castanha-do-Brasil (Bertholletia excelsa Bonp) em células C6 e gliais. **Delos**, v. 16, n. 49, p. 3990–4005, 2023a.

MAIA FILHO, M. et al. Preparação e caracterização de nanoemulsão dos óleos de *Euterpe precatória* Mart. E *Bertholletia excelsa* Bonp. **Delos**, v. 16, n. 45, p. 1847–1860, 2023b.

MOSQUERA, M., MARTÍNEZ-OHÁRRIZ, M. C., & SOLÈ, I. Impact of emulsification method on the structure and stability of β-carotene nanodispersions. **Food Hydrocolloids**, 99, 105315. doi: 10.1016/j.foodhyd.2019.105315. 2020.

O. B. OLAFISOYE, O. O. OGUNTIBEJU, & O. A. OSIBOTE. Assessment of Naturally Occurring Radionuclides Accumulation in Palm Oil from Soil. **International Journal of Environmental Science and Development**, 13(1), 8- 15. 2022.

PEREIRA, G.S., BASSO, S.l., FREITAS, P.M., LIMA, D.A., MACHADO, A.S. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E CROMATOGRÁFICA DOS ÓLEOS DE AÇAÍ (EUTERPE PRECATÓRIA), PATAUÁ (OENOCARPUS BATAUÁ) E COCÃO (ATTALEA TESSMANII). **57º CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA,** 2017. Disponível em: https://www.abq.org.br/cbq/2017/trabalhos/7/12346-24642.html.Acesso em: 01 set. 2023.

PICHOT, R., & LEAL-CALDERON, F. Nanoemulsions and microemulsions: how can their existence be ascertained? **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, 9(4-5), 287-293. doi: 10.1016/j.cocis.2005.05.002. 2004.

PINEDO-GUERRERO, Z. H., HERNÁNDEZ-FUENTES, A. D., ORTEGA-ORTIZ, H., BENAVIDES-MENDOZA, A., CADENAS-PLIEGO, G., & JUÁREZ MALDONADO, A. A. Cu Nanoparticles in Hydrogels of Chitosan-PVA Affects the Characteristics of Post-Harvest and Bioactive Compounds of Jalapeño Pepper. **Molecules**, 22(6), 926. doi: 10.3390/molecules22060926. 2017.

PIVETTA, T. P., BOTTEON, C. E. A., RIBEIRO, P. A., MARCATO, P. D., & RAPOSO, M. Nanoparticle Systems for Cancer Phototherapy: An Overview. **Nanomaterials**, 11(11), 3132. doi: 10.3390/nano11113132. 2021.

QUINTÃO, C. C. R., CAMARGO, L. S. A., BRANDÃO, H. M., SARAIVA, N. Z., MUNK, M. Challenges in the use of nanostructures as carriers of nucleic acids in clinical practice. **Einstein (Sao Paulo)**, 20, eRB5898. doi: 10.31744/einstein_journal/2022RB5898. 2022.

RABELO, C. A. S., TAARJI, N., KHALID, N., KOBAYASHI, I., NAKAJIMA, M., & NEVES, M. A. Formulation and characterization of water-in-oil nanoemulsions loaded with açaí berry anthocyanins: Insights of degradation kinetics and stability evaluation of anthocyanins and nanoemulsions. **Food Research International**, 106, 542-548. doi: 10.1016/j.foodres.2018.01.017. 2018.

RISS, T. L.; MORAVEC, R. A.; NILES, A. L.; DUELLMAN, S.; BENINK, H. A.; WORZELLA, T. J.; MINOR, L.; **Cell Viability Assays. Assay Guidance Manual** [Internet]. 2013.

ROCHA-FILHO, P. A., MONTEIRO, A. D., AGOSTINHO, L. C., & OLIVEIRA, M. P. A. The Use of Different Commercial Mineral Water Brands to Produce Oil-In- Water Nanoemulsions. **Molecules**, 25(3), 603. doi: 10.3390/molecules25030603. 2020.

RUFINO, M. do S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. de; MORAIS, S. M. de;SAMPAIO, C. de G.; PÉREZ - JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura doradical livre DPPH. **Comunicado técnico 127. Embrapa Agroindústria Tropical.** https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT/10224/1/Cot_127.pdf. Acessado em: 01-09-2023.

SAEBO (SÆBØ), I.P.; BJØRÅS, M.; FRANZYK, H.; HELGESEN, E.; BOOTH, J.A. Optimization of the Hemolysis Assay for the Assessment of Cytotoxicity. **Int. J.Mol. Sci**. 2023, 24, 2914. https://doi.org/10.3390/ijms24032914

SAFER, A. M., & LEPORATTI, S. Nanopartículas de quitosana para entrega de medicamentos antivirais: uma nova rota para o tratamento de COVID-19. **Int J Nanomedicina**, 16, 8141-8158. doi: 10.2147/IJN.S332385. 2021.

SALVIA-TRUJILLO, L., SOLIVA-FORTUNY, R., & MCCLEMENTS, D. J. Impact of emulsion characteristics on encapsulation and release of bioactive compounds. **Food & Function**, 8(2), 828-843. doi: 10.1039/C6FO01584C. 2017.

SALVIA-TRUJILLO, L., SOLIVA-FORTUNY, R., & MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions: fabrication, properties, and applications. **In Nanoemulsions** (pp. 1-22). Academic Press. 2019.

SANTOS, O. V. D., PINAFFI LANGLEY, A. C. D. C., MOTA DE LIMA, A. J., VALEMORAES, V. S., DIAS SOARES, S., & TEIXEIRA-COSTA, B. E. Nutraceutical potential of Amazonian oilseeds in modulating the immune system against COVID-19 - A narrative review. **Journal of Functional Foods**, 94, 105123. doi: 10.1016/j.jff.2022.105123. 2022.

SARANTI, T. F. D. S., MELO, P. T. S., CERQUEIRA, M. A., AOUADA, F. A., & DE MOURA, M. R. Performance of Gelatin Films Reinforced with Cloisite Na+ and Black Pepper Essential Oil Loaded Nanoemulsion. **Polymers**, 13(24), 4298. doi:10.3390/polym13244298. 2021.

SCHIRMANN, GABRIELA DA SILVA. **Composição em ácidos graxos do açaí (Euterpe edulis) de diversas regiões de Santa Catarina**. Orientador: Paul Richard Momsen Miller. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Florianópolis, 2009. Disponivel em: http://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/92945. Acesso em 18 de julho 2023.

SCHONS, E. Análise cromatográfica gasosa do óleo da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) e sua composição em ácidos graxos insaturados. [Tese de doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina]. **Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da UFSC.** 2017.

Disponivel em: https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/180959. Acesso em 18 de julho 2023.

SIBUYI, N. R. S., THIPE, V. C., PANJTAN-AMIRI, K., MEYER, M., & KATTI, K. V. Green synthesis of gold nanoparticles using Acai berry and Elderberry extracts and investigation of their effect on prostate and pancreatic cancer cells. **Nanobiomedicine**, 8, 1849543521995310. doi: 10.1177/1849543521995310. 2021.

SILVA, J. D. F. da et al. MICROEMULSIONS: COMPONENTS, CHARACTERISTICS, POTENTIALITIES IN FOOD CHEMISTRY AND OTHER APPLICATIONS. **Química Nova**, 38(10), 135-150. doi: 10.5935/0100- 4042.20150135. 2015.

SILVA, M. A. C. N. D., COSTA, J. H., PACHECO-FILL, T., RUIZ, A. L. T. G., VIDAL, F. C. B., BORGES, K. R. A., ... & DE CARVALHO, J. E. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) Seed Extract Induces ROS Production and Cell Death in MCF-7 Breast Cancer Cell Line. **Molecules**, 26(12), 3546. doi: 10.3390/molecules26123546. 2021.

SITTA E.I., ARAKAWA A.M., CALDANA M.L., PERES S.H.C.S. A contribuição de estudos transversais na área da linguagem com enfoque em afasia. Rev. **CEFAC,São Paulo**. vol.12, no.6. Nov./Dec. 2010 Epub Aug 13.

SOARES N.P. Citotoxicidade. Disponível em: https://www.infoescola.com/bioquimica/citotoxicidade/. Acesso em 10/09/2023.

TADROS, T., IZQUIERDO, P., ESQUENA, J., & SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, 205, 94-112. doi: 10.1016/j.cis.2013.04.003. 2014.

TAN, C. P., NAKAJIMA, M., & UCHIYAMA, H. Formation of O/W emulsions stabilized by β-lactoglobulin−dextran conjugate. **Langmuir**, 21(5), 1689-1694. doi: 10.1021/la0484374. 2005.

TCHOLAKOVA, S., DENKOV, N. D., & STOYANOV, S. D. Stability of protein- containing foams and emulsions: recent findings and future challenges. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, 20(4), 258-272. doi:10.1016/j.cocis.2015.08.001. 2015.

TERRA SOARES A., DAYANE CRISTINE DA COSTA, BRUNA FERREIRA SILVA, RAFAEL GARCIA LOPES, ROBERTO BIANCHINI DERNER E NELSON ROBERTO ANTONIOSI FILHO. Comparative Analysis of the Fatty Acid Composition of Microalgae Obtained by Different Oil Extraction Methods and Direct Biomass Transesterification. **Bioenerg. Res**. 2014. 7:1035–1044 DOI 10.1007/s12155-014-9446-4. 2014.

THAKKAR, H., PATEL, S., & MURTHY, R. S. Development and characterization ofwater-in-oil (W/O) nanoemulsions using low-energy emulsification techniques. **Journal of Microencapsulation**, 27(4), 292-298. doi: 10.3109/02652040903373794. 2010.

VIEIRA, D. B., & GAMARRA, L. F. Advances in the use of nanocarriers for cancer diagnosis and treatment. **Einstein (Sao Paulo)**, 14(1), 99-103. doi:10.1590/S1679-45082016RB3475. 2016.

VILLARES, R. M; NAKANO, N. D. A Produção Científica nos Anais do Encontro Nacional de Engenharia de Produção: Um Levantamento de Métodos e Tipos de Pesquisa. **ABEPRO**. Rio de Janeiro. 2000.

WEISS, J., TAKHISTOV, P., & MCCLEMENTS, D. J. Functional Materials in Food Nanotechnology. **Journal of Food Science**, 71(9), R107-R116. doi: 10.1111/j.1750-3841.2006.00147.x. 2006.

WIBOWO, D., WU, Z., & ZHAO, C. Nanoemulsion production by sonication and microfluidization - a comparison. **International Journal of Food Properties**, 14(5), 969-982. doi: 10.1080/10942910903488722, 2011.

YAGHMUR, A., & RAPPOLT, M. Structure analysis of food emulsions by cryo- TEM. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, 20(4), 222-234. doi: 10.1016/j.cocis.2015.08.002. 2015.

ANEXOS

ANEXO 1 – Tabela de Parâmetros da Amostra 1 (RESULTADOS)

Item	Ts	[µS/cm]	Item	Ts	[µS/cm]
1	0	3,77	**31**	900	5,34
2	30	3,83	**32**	930	5,43
3	60	3,83	**33**	960	5,46
4	90	3,83	**34**	990	5,53
5	120	3,86	**35**	1020	5,59
6	150	3,93	**36**	1050	5,65
7	180	3,99	**37**	1080	5,75
8	210	4,02	**38**	1110	5,78
9	240	4,08	**39**	1140	5,84
10	270	4,11	**40**	1170	5,9
11	300	4,18	**41**	1200	6
12	330	4,24	**42**	1230	6,09
13	360	4,3	**43**	1260	6,12
14	390	4,33	**44**	1290	6,19
15	420	4,4	**45**	1320	6,28
16	450	4,46	**46**	1350	6,34
17	480	4,52	**47**	1380	6,47
18	510	4,55	**48**	1410	6,5
19	540	4,62	**49**	1440	6,56
20	570	4,68	**50**	1470	6,66
21	600	4,74	**51**	1500	6,75
22	630	4,8	**52**	1530	6,85
23	660	4,84	**53**	1560	6,91
24	690	4,9	**54**	1590	6,97
25	720	4,96	**55**	1620	7,07
26	750	5,02	**56**	1650	7,16
27	780	5,12	**57**	1680	7,29
28	810	5,15	**58**	1710	7,35
29	840	5,21	**59**	1740	7,44
30	870	5,28	**60**	1770	7,54

Item	Ts	[µS/cm]	Item	Ts	[µS/cm]
61	1800	7,63	**91**	2700	11,15
62	1830	7,76	**92**	2730	11,3
63	1860	7,82	**93**	2760	11,43
64	1890	7,91	**94**	2790	11,56
65	1920	8,01	**95**	2820	11,71
66	1950	8,13	**96**	2850	11,87
67	1980	8,26	**97**	2880	12
68	2010	8,32	**98**	2910	12,15
69	2040	8,45	**99**	2940	12,31
70	2070	8,54	**100**	2970	12,44
71	2100	8,64	**101**	3000	12,59
72	2130	8,79	**102**	3030	12,75
73	2160	8,89	**103**	3060	12,91
74	2190	8,98	**104**	3090	13,06

75	2220	9,11	**105**	3120	13,22
76	2250	9,23	**106**	3150	13,38
77	2280	9,36	**107**	3180	13,53
78	2310	9,45	**108**	3210	13,69
79	2340	9,58	**109**	3240	13,85
80	2370	9,7	**110**	3270	14,01
81	2400	9,83	**111**	3300	14,16
82	2430	9,95	**112**	3330	14,32
83	2460	10,08	**113**	3360	14,51
84	2490	10,21	**114**	3390	14,66
85	2520	10,33	**115**	3420	14,82
86	2550	10,49	**116**	3450	15,01
87	2580	10,61	**117**	3480	15,17
88	2610	10,74	**118**	3510	15,32
89	2640	10,87	**119**	3540	15,51
90	2670	11,02	**120**	3570	15,7

Item	Ts	[µS/cm]	Item	Ts	[µS/cm]
121	3600	15,86	**151**	4500	21,73
122	3630	16,05	**152**	4530	21,95
123	3660	16,24	**153**	4560	22,14
124	3690	16,39	**154**	4590	22,36
125	3720	16,58	**155**	4620	22,58
126	3750	16,77	**156**	4650	22,8
127	3780	16,96	**157**	4680	23,02
128	3810	17,11	**158**	4710	23,24
129	3840	17,33	**159**	4740	23,46
130	3870	17,52	**160**	4770	23,68
131	3900	17,68	**161**	4800	23,93
132	3930	17,9	**162**	4830	24,15
133	3960	18,06	**163**	4860	24,37
134	3990	18,24	**164**	4890	24,59
135	4020	18,46	**165**	4920	24,84
136	4050	18,65	**166**	4950	25,06
137	4080	18,84	**167**	4980	25,28
138	4110	19,06	**168**	5010	25,53
139	4140	19,25	**169**	5040	25,78
140	4170	19,44	**170**	5070	26
141	4200	19,66	**171**	5100	26,25
142	4230	19,85	**172**	5130	26,47
143	4260	20,07	**173**	5160	26,72
144	4290	20,25	**174**	5190	26,97
145	4320	20,47	**175**	5220	27,19
146	4350	20,66	**176**	5250	27,45
147	4380	20,88	**177**	5280	27,7
148	4410	21,07	**178**	5310	27,95
149	4440	21,29	**179**	5340	28,2
150	4470	21,51	**180**	5370	28,45

Item	Ts	[µS/cm]	Item	Ts	[µS/cm]
181	5400	28,67	**211**	6300	36,65

182	5430	28,95	**212**	6330	36,93
183	5460	29,17	**213**	6360	37,21
184	5490	29,42	**214**	6390	37,49
185	5520	29,68	**215**	6420	37,78
186	5550	29,96	**216**	6450	38,06
187	5580	30,21	**217**	6480	38,34
188	5610	30,46	**218**	6510	38,63
189	5640	30,71	**219**	6540	38,91
190	5670	30,96	**220**	6570	39,19
191	5700	31,25	**221**	6600	39,47
192	5730	31,5	**222**	6630	39,79
193	5760	31,75	**223**	6660	40,07
194	5790	32,03	**224**	6690	40,35
195	5820	32,28	**225**	6720	40,67
196	5850	32,56	**226**	6750	40,95
197	5880	32,82	**227**	6780	41,23
198	5910	33,1	**228**	6810	41,55
199	5940	33,35	**229**	6840	41,83
200	5970	33,63	**230**	6870	42,11
201	6000	33,88	**231**	6900	42,39
202	6030	34,17	**232**	6930	42,71
203	6060	34,45	**233**	6960	42,99
204	6090	34,7	**234**	6990	43,3
205	6120	34,98	**235**	7020	43,59
206	6150	35,26	**236**	7050	43,9
207	6180	35,55	**237**	7080	44,21
208	6210	35,83	**238**	7110	44,5
209	6240	36,08	**239**	7140	44,81
210	6270	36,36	**240**	7170	45,09

Item	Ts	[µS/cm]	Item	Ts	[µS/cm]
241	7200	45,41	**271**	8100	54,73
242	7230	45,69	**272**	8130	55,05
243	7260	46	**273**	8160	55,36
244	7290	46,32	**274**	8190	55,71
245	7320	46,6	**275**	8220	56,02
246	7350	46,92	**276**	8250	56,34
247	7380	47,23	**277**	8280	56,65
248	7410	47,51	**278**	8310	56,96
249	7440	47,83	**279**	8340	57,31
250	7470	48,14	**280**	8370	57,62
251	7500	48,45	**281**	8400	57,97
252	7530	48,74	**282**	8430	58,28
253	7560	49,05	**283**	8460	58,6
254	7590	49,36	**284**	8490	58,94
255	7620	49,68	**285**	8520	59,26
256	7650	49,99	**286**	8550	59,6
257	7680	50,31	**287**	8580	59,92
258	7710	50,62	**288**	8610	60,23
259	7740	50,93	**289**	8640	60,58
260	7770	51,25	**290**	8670	60,89
261	7800	51,56	**291**	8700	61,23

262	7830	51,88	**292**	8730	61,55
263	7860	52,19	**293**	8760	61,89
264	7890	52,5	**294**	8790	62,21
265	7920	52,82	**295**	8820	62,55
266	7950	53,13	**296**	8850	62,87
267	7980	53,45	**297**	8880	63,21
268	8010	53,76	**298**	8910	63,53
269	8040	54,11	**299**	8940	63,87
270	8070	54,42	**300**	8970	64,19

Item	Ts	[µS/cm]	Item	Ts	[µS/cm]
271	9000	64,53	**301**	9900	74,64
272	9030	64,88	**302**	9930	74,99
273	9060	65,19	**303**	9960	75,33
274	9090	65,54	**304**	9990	75,68
275	9120	65,85	**305**	10020	76,03
276	9150	66,2	**306**	10050	76,37
277	9180	66,54	**307**	10080	76,68
278	9210	66,86	**308**	10110	77,03
279	9240	67,2	**309**	10140	77,41
280	9270	67,55	**310**	10170	77,72
281	9300	67,86	**311**	10200	78,1
282	9330	68,21	**312**	10230	78,44
283	9360	68,55	**313**	10260	78,76
284	9390	68,87	**314**	10290	79,1
285	9420	69,21	**315**	10320	79,48
286	9450	69,56	**316**	10350	79,83
287	9480	69,9	**317**	10380	80,14
288	9510	70,22	**318**	10410	80,52
289	9540	70,56	**319**	10440	80,83
290	9570	70,91	**320**	10470	81,21
291	9600	71,25	**321**	10500	81,52
292	9630	71,57	**322**	10530	81,9
293	9660	71,91	**323**	10560	82,24
294	9690	72,26	**324**	10590	82,56
295	9720	72,6	**325**	10620	82,9
296	9750	72,95	**326**	10650	83,25
297	9780	73,29	**327**	10680	83,59
298	9810	73,61	**328**	10710	83,97
299	9840	73,95	**329**	10740	84,32
300	9870	74,3	**330**	10770	84,66

Item	Ts	[µS/cm]	Item	Ts	[µS/cm]
331	10800	85,01	361	11700	95,46
332	10830	85,35	362	11730	95,81
333	10860	85,7	363	11760	96,15
334	10890	86,04	364	11790	96,5
335	10920	86,39	365	11820	96,85
336	10950	86,73	366	11850	97,22
337	10980	87,08	367	11880	97,57
338	11010	87,46	368	11910	97,91

339	11040	87,8	369	11940	98,26
340	11070	88,15	370	11970	98,6
341	11100	88,49	371	12000	98,98
342	11130	88,84	372	12030	99,33
343	11160	89,18	373	12060	99,67
344	11190	89,53	374	12090	100,02
345	11220	89,87	375	12120	100,36
346	11250	90,25	376	12150	100,71
347	11280	90,6	377	12180	101,08
348	11310	90,94	378	12210	101,4
349	11340	91,29	379	12240	101,78
350	11370	91,63	380	12270	102,12
351	11400	91,98	381	12300	102,47
352	11430	92,32	382	12330	102,81
353	11460	92,67	383	12360	103,16
354	11490	93,01	384	12390	103,5
355	11520	93,36	385	12420	103,85
356	11550	93,71	386	12450	104,19
357	11580	94,05	387	12480	104,54
358	11610	94,4	388	12510	104,88
359	11640	94,77	389	12540	105,23
360	11670	95,12	390	12570	105,58

Item	Ts	[µS/cm]	Item	Ts	[µS/cm]
391	12600	105,92	**421**	13500	116,35
392	12630	106,3	**422**	13530	116,69
393	12660	106,61	**423**	13560	117,07
394	12690	106,99	**424**	13590	117,38
395	12720	107,3	**425**	13620	117,76
396	12750	107,68	**426**	13650	118,1
397	12780	108,02	**427**	13680	118,45
398	12810	108,37	**428**	13710	118,8
399	12840	108,72	**429**	13740	119,14
400	12870	109,06	**430**	13770	119,49
401	12900	109,41	**431**	13800	119,83
402	12930	109,75	**432**	13830	120,18
403	12960	110,1	**433**	13860	120,52
404	12990	110,44	**434**	13890	120,87
405	13020	110,79	**435**	13920	121,25
406	13050	111,13	**436**	13950	121,59
407	13080	111,48	**437**	13980	121,94
408	13110	111,82	**438**	14010	122,28
409	13140	112,2	**439**	14040	122,63
410	13170	112,52	**440**	14070	122,97
411	13200	112,86	**441**	14100	123,32
412	13230	113,24	**442**	14130	123,66
413	13260	113,55	**443**	14160	124,01
414	13290	113,93	**444**	14190	124,35
415	13320	114,27	**445**	14220	124,7
416	13350	114,62	**446**	14250	125,04
417	13380	114,96	**447**	14280	125,39
418	13410	115,31	**448**	14310	125,74

419	13440	115,66	**449**	14340	126,05
420	13470	116	**450**	14370	126,43

Item	Ts	[µS/cm]	Item	Ts	[µS/cm]
451	14400	126,77	**481**	15300	136,91
452	14430	127,09	**482**	15330	137,26
453	14460	127,46	**483**	15360	137,61
454	14490	127,78	**484**	15390	137,95
455	14520	128,12	**485**	15420	138,3
456	14550	128,47	**486**	15450	138,61
457	14580	128,81	**487**	15480	138,96
458	14610	129,16	**488**	15510	139,27
459	14640	129,5	**489**	15540	139,62
460	14670	129,85	**490**	15570	139,96
461	14700	130,16	**491**	15600	140,27
462	14730	130,51	**492**	15630	140,62
463	14760	130,85	**493**	15660	140,93
464	14790	131,17	**494**	15690	141,28
465	14820	131,51	**495**	15720	141,59
466	14850	131,86	**496**	15750	141,91
467	14880	132,2	**497**	15780	142,25
468	14910	132,55	**498**	15810	142,6
469	14940	132,9	**499**	15840	142,94
470	14970	133,21	**500**	15870	143,26
471	15000	133,55	**501**	15900	143,6
472	15030	133,9	**502**	15930	143,92
473	15060	134,25	**503**	15960	144,26
474	15090	134,56	**504**	15990	144,61
475	15120	134,91	**505**	16020	144,95
476	15150	135,25	**506**	16050	145,27
477	15180	135,6	**507**	16080	145,61
478	15210	135,91	**508**	16110	145,93
479	15240	136,26	**509**	16140	146,27
480	15270	136,6	**510**	16170	146,62

Item	Ts	[µS/cm]	Item	Ts	[µS/cm]
511	16200	146,93	**541**	17100	156,92
512	16230	147,28	**542**	17130	157,23
513	16260	147,59	**543**	17160	157,58
514	16290	147,94	**544**	17190	157,92
515	16320	148,28	**545**	17220	158,24
516	16350	148,6	**546**	17250	158,58
517	16380	148,94	**547**	17280	158,9
518	16410	149,26	**548**	17310	159,24
519	16440	149,57	**549**	17340	159,56
520	16470	149,92	**550**	17370	159,9
521	16500	150,23	**551**	17400	160,22
522	16530	150,57	**552**	17430	160,56
523	16560	150,92	**553**	17460	160,91
524	16590	151,27	**554**	17490	161,25
525	16620	151,58	**555**	17520	161,57

526	16650	151,93	**556**	17550	161,91
527	16680	152,27	**557**	17580	162,26
528	16710	152,58	**558**	17610	162,57
529	16740	152,93	**559**	17640	162,92
530	16770	153,24	**560**	17670	163,23
531	16800	153,59	**561**	17700	163,58
532	16830	153,93	**562**	17730	163,89
533	16860	154,25	**563**	17760	164,24
534	16890	154,59	**564**	17790	164,55
535	16920	154,91	**565**	17820	164,86
536	16950	155,25	**566**	17850	165,21
537	16980	155,57	**567**	17880	165,52
538	17010	155,91	**568**	17910	165,84
539	17040	156,26	**569**	17940	166,15
540	17070	156,57	**570**	17970	166,5

Item	Ts	[µS/cm]	Item	Ts	[µS/cm]
571	18000	166,78	**601**	18900	176,14
572	18030	167,09	**602**	18930	176,42
573	18060	167,44	**603**	18960	176,73
574	18090	167,75	**604**	18990	177,02
575	18120	168,07	**605**	19020	177,33
576	18150	168,38	**606**	19050	177,64
577	18180	168,69	**607**	19080	177,93
578	18210	169,01	**608**	19110	178,24
579	18240	169,32	**609**	19140	178,52
580	18270	169,64	**610**	19170	178,81
581	18300	169,95	**611**	19200	179,12
582	18330	170,26	**612**	19230	179,4
583	18360	170,58	**613**	19260	179,72
584	18390	170,89	**614**	19290	180
585	18420	171,21	**615**	19320	180,31
586	18450	171,52	**616**	19350	180,6
587	18480	171,83	**617**	19380	180,88
588	18510	172,15	**618**	19410	181,16
589	18540	172,46	**619**	19440	181,47
590	18570	172,75	**620**	19470	181,76
591	18600	173,06	**621**	19500	182,04
592	18630	173,37	**622**	19530	182,35
593	18660	173,69	**623**	19560	182,64
594	18690	173,97	**624**	19590	182,92
595	18720	174,28	**625**	19620	183,23
596	18750	174,6	**626**	19650	183,52
597	18780	174,91	**627**	19680	183,83
598	18810	175,23	**628**	19710	184,11
599	18840	175,51	**629**	19740	184,4
600	18870	175,82	**630**	19770	184,68

Item	Ts	[µS/cm]
631	19800	184,99
632	19830	185,27
633	19860	185,56
634	19890	185,84
635	19920	186,15
636	19950	186,44
637	19980	186,72
638	20010	187
639	20040	187,32
640	20070	187,6
641	20100	187,88
642	20130	188,16

ANEXO 2 – Tabela de Parâmetros da Amostra 2 (RESULTADOS)

Item	Ts	[µS/cm]	Item	Ts	[µS/cm]
1	0	11,46	**31**	900	14,1
2	30	11,56	**32**	930	14,23
3	60	11,56	**33**	960	14,32
4	90	11,56	**34**	990	14,41
5	120	11,65	**35**	1020	14,54
6	150	11,74	**36**	1050	14,63
7	180	11,84	**37**	1080	14,76
8	210	11,93	**38**	1110	14,85
9	240	12	**39**	1140	14,95
10	270	12,09	**40**	1170	15,07
11	300	12,18	**41**	1200	15,17
12	330	12,28	**42**	1230	15,29
13	360	12,37	**43**	1260	15,39
14	390	12,47	**44**	1290	15,51
15	420	12,56	**45**	1320	15,61
16	450	12,66	**46**	1350	15,73
17	480	12,75	**47**	1380	15,83
18	510	12,84	**48**	1410	15,95
19	540	12,94	**49**	1440	16,05
20	570	13,03	**50**	1470	16,17
21	600	13,13	**51**	1500	16,27
22	630	13,22	**52**	1530	16,39
23	660	13,31	**53**	1560	16,52
24	690	13,41	**54**	1590	16,64
25	720	13,5	**55**	1620	16,74
26	750	13,63	**56**	1650	16,86
27	780	13,72	**57**	1680	16,99
28	810	13,82	**58**	1710	17,11
29	840	13,91	**59**	1740	17,24
30	870	14,01	**60**	1770	17,37

Item	Ts	[µS/cm]	Item	Ts	[µS/cm]
61	1800	17,46	**91**	2700	21,57
62	1830	17,59	**92**	2730	21,73
63	1860	17,71	**93**	2760	21,89

64	1890	17,84	**94**	2790	22,04
65	1920	17,96	**95**	2820	22,2
66	1950	18,09	**96**	2850	22,33
67	1980	18,24	**97**	2880	22,52
68	2010	18,37	**98**	2910	22,64
69	2040	18,5	**99**	2940	22,83
70	2070	18,62	**100**	2970	22,99
71	2100	18,75	**101**	3000	23,14
72	2130	18,9	**102**	3030	23,3
73	2160	19,03	**103**	3060	23,46
74	2190	19,16	**104**	3090	23,61
75	2220	19,28	**105**	3120	23,8
76	2250	19,44	**106**	3150	23,96
77	2280	19,56	**107**	3180	24,12
78	2310	19,69	**108**	3210	24,31
79	2340	19,85	**109**	3240	24,46
80	2370	19,97	**110**	3270	24,62
81	2400	20,13	**111**	3300	24,81
82	2430	20,25	**112**	3330	24,96
83	2460	20,41	**113**	3360	25,15
84	2490	20,54	**114**	3390	25,31
85	2520	20,69	**115**	3420	25,5
86	2550	20,85	**116**	3450	25,69
87	2580	20,98	**117**	3480	25,88
88	2610	21,13	**118**	3510	26,06
89	2640	21,26	**119**	3540	26,25
90	2670	21,42	**120**	3570	26,41

Item	**Ts**	**[µS/cm]**	**Item**	**Ts**	**[µS/cm]**
121	3600	26,63	**151**	4500	32,69
122	3630	26,79	**152**	4530	32,88
123	3660	26,97	**153**	4560	33,13
124	3690	27,16	**154**	4590	33,35
125	3720	27,35	**155**	4620	33,57
126	3750	27,54	**156**	4650	33,82
127	3780	27,73	**157**	4680	34,01
128	3810	27,92	**158**	4710	34,26
129	3840	28,11	**159**	4740	34,48
130	3870	28,33	**160**	4770	34,73
131	3900	28,51	**161**	4800	34,95
132	3930	28,7	**162**	4830	35,2
133	3960	28,89	**163**	4860	35,42
134	3990	29,11	**164**	4890	35,67
135	4020	29,3	**165**	4920	35,89
136	4050	29,52	**166**	4950	36,14
137	4080	29,71	**167**	4980	36,4
138	4110	29,93	**168**	5010	36,62
139	4140	30,11	**169**	5040	36,87
140	4170	30,3	**170**	5070	37,12
141	4200	30,52	**171**	5100	37,37
142	4230	30,74	**172**	5130	37,62
143	4260	30,96	**173**	5160	37,87
144	4290	31,15	**174**	5190	38,12

145	4320	31,37	**175**	5220	38,37
146	4350	31,59	**176**	5250	38,63
147	4380	31,81	**177**	5280	38,88
148	4410	32,03	**178**	5310	39,13
149	4440	32,25	**179**	5340	39,38
150	4470	32,47	**180**	5370	39,63

Item	Ts	[µS/cm]	Item	Ts	[µS/cm]
181	5400	39,88	**211**	6300	48,14
182	5430	40,16	**212**	6330	48,45
183	5460	40,42	**213**	6360	48,74
184	5490	40,67	**214**	6390	49,05
185	5520	40,95	**215**	6420	49,33
186	5550	41,2	**216**	6450	49,65
187	5580	41,48	**217**	6480	49,93
188	5610	41,73	**218**	6510	50,21
189	5640	41,99	**219**	6540	50,53
190	5670	42,27	**220**	6570	50,81
191	5700	42,55	**221**	6600	51,12
192	5730	42,8	**222**	6630	51,41
193	5760	43,08	**223**	6660	51,72
194	5790	43,37	**224**	6690	52,03
195	5820	43,62	**225**	6720	52,32
196	5850	43,93	**226**	6750	52,63
197	5880	44,18	**227**	6780	52,94
198	5910	44,43	**228**	6810	53,23
199	5940	44,75	**229**	6840	53,54
200	5970	45,03	**230**	6870	53,86
201	6000	45,31	**231**	6900	54,17
202	6030	45,6	**232**	6930	54,48
203	6060	45,88	**233**	6960	54,8
204	6090	46,16	**234**	6990	55,11
205	6120	46,44	**235**	7020	55,39
206	6150	46,73	**236**	7050	55,71
207	6180	47,01	**237**	7080	56,05
208	6210	47,29	**238**	7110	56,37
209	6240	47,57	**239**	7140	56,68
210	6270	47,89	**240**	7170	57

Item	Ts	[µS/cm]	Item	Ts	[µS/cm]
241	7200	57,31	**271**	8100	67,17
242	7230	57,62	**272**	8130	67,52
243	7260	57,94	**273**	8160	67,86
244	7290	58,28	**274**	8190	68,21
245	7320	58,6	**275**	8220	68,52
246	7350	58,91	**276**	8250	68,87
247	7380	59,23	**277**	8280	69,21
248	7410	59,57	**278**	8310	69,56
249	7440	59,88	**279**	8340	69,9
250	7470	60,2	**280**	8370	70,25
251	7500	60,54	**281**	8400	70,59
252	7530	60,86	**282**	8430	70,94
253	7560	61,2	**283**	8460	71,28
254	7590	61,52	**284**	8490	71,63

255	7620	61,86	**285**	8520	71,97
256	7650	62,18	**286**	8550	72,32
257	7680	62,49	**287**	8580	72,67
258	7710	62,84	**288**	8610	73,01
259	7740	63,15	**289**	8640	73,36
260	7770	63,5	**290**	8670	73,7
261	7800	63,84	**291**	8700	74,02
262	7830	64,16	**292**	8730	74,39
263	7860	64,5	**293**	8760	74,74
264	7890	64,81	**294**	8790	75,08
265	7920	65,16	**295**	8820	75,43
266	7950	65,51	**296**	8850	75,77
267	7980	65,82	**297**	8880	76,12
268	8010	66,17	**298**	8910	76,47
269	8040	66,51	**299**	8940	76,81
270	8070	66,86	**300**	8970	77,16

Item	Ts	[µS/cm]	Item	Ts	[µS/cm]
301	9000	77,5	**331**	9900	88,05
302	9030	77,85	**332**	9930	88,4
303	9060	78,19	**333**	9960	88,77
304	9090	78,57	**334**	9990	89,12
305	9120	78,91	**335**	10020	89,47
306	9150	79,26	**336**	10050	89,84
307	9180	79,61	**337**	10080	90,19
308	9210	79,95	**338**	10110	90,53
309	9240	80,3	**339**	10140	90,88
310	9270	80,67	**340**	10170	91,22
311	9300	81,02	**341**	10200	91,6
312	9330	81,36	**342**	10230	91,95
313	9360	81,71	**343**	10260	92,29
314	9390	82,05	**344**	10290	92,64
315	9420	82,43	**345**	10320	93,01
316	9450	82,78	**346**	10350	93,36
317	9480	83,12	**347**	10380	93,74
318	9510	83,47	**348**	10410	94,08
319	9540	83,81	**349**	10440	94,43
320	9570	84,19	**350**	10470	94,77
321	9600	84,5	**351**	10500	95,09
322	9630	84,88	**352**	10530	95,46
323	9660	85,23	**353**	10560	95,84
324	9690	85,57	**354**	10590	96,15
325	9720	85,95	**355**	10620	96,5
326	9750	86,29	**356**	10650	96,88
327	9780	86,64	**357**	10680	97,22
328	9810	86,98	**358**	10710	97,57
329	9840	87,36	**359**	10740	97,91
330	9870	87,71	**360**	10770	98,29

Item	Ts	[µS/cm]	Item	Ts	[µS/cm]
361	10800	98,64	**391**	11700	109,06
362	10830	98,98	**392**	11730	109,37
363	10860	99,33	**393**	11760	109,72

364	10890	99,7	**394**	11790	110,07
365	10920	100,02	**395**	11820	110,41
366	10950	100,36	**396**	11850	110,79
367	10980	100,74	**397**	11880	111,13
368	11010	101,08	**398**	11910	111,45
369	11040	101,43	**399**	11940	111,82
370	11070	101,78	**400**	11970	112,11
371	11100	102,12	**401**	12000	112,45
372	11130	102,47	**402**	12030	112,83
373	11160	102,84	**403**	12060	113,17
374	11190	103,19	**404**	12090	113,52
375	11220	103,53	**405**	12120	113,83
376	11250	103,88	**406**	12150	114,18
377	11280	104,22	**407**	12180	114,52
378	11310	104,57	**408**	12210	114,87
379	11340	104,92	**409**	12240	115,22
380	11370	105,26	**410**	12270	115,56
381	11400	105,58	**411**	12300	115,84
382	11430	105,95	**412**	12330	116,19
383	11460	106,3	**413**	12360	116,53
384	11490	106,64	**414**	12390	116,88
385	11520	106,96	**415**	12420	117,19
386	11550	107,33	**416**	12450	117,54
387	11580	107,68	**417**	12480	117,88
388	11610	108,02	**418**	12510	118,23
389	11640	108,34	**419**	12540	118,58
390	11670	108,72	**420**	12570	118,89

Item	**Ts**	**[µS/cm]**	**Item**	**Ts**	**[µS/cm]**
421	12600	119,24	**451**	13500	129,19
422	12630	119,58	**452**	13530	129,5
423	12660	119,89	**453**	13560	129,85
424	12690	120,24	**454**	13590	130,19
425	12720	120,55	**455**	13620	130,54
426	12750	120,9	**456**	13650	130,85
427	12780	121,21	**457**	13680	131,17
428	12810	121,56	**458**	13710	131,51
429	12840	121,87	**459**	13740	131,83
430	12870	122,22	**460**	13770	132,17
431	12900	122,53	**461**	13800	132,46
432	12930	122,88	**462**	13830	132,8
433	12960	123,22	**463**	13860	133,15
434	12990	123,54	**464**	13890	133,43
435	13020	123,88	**465**	13920	133,77
436	13050	124,2	**466**	13950	134,12
437	13080	124,54	**467**	13980	134,43
438	13110	124,89	**468**	14010	134,78
439	13140	125,2	**469**	14040	135,06
440	13170	125,55	**470**	14070	135,41
441	13200	125,86	**471**	14100	135,75
442	13230	126,21	**472**	14130	136,07
443	13260	126,55	**473**	14160	136,38
444	13290	126,87	**474**	14190	136,73
445	13320	127,21	**475**	14220	137,04

446	13350	127,49	**476**	14250	137,35
447	13380	127,87	**477**	14280	137,67
448	13410	128,18	**478**	14310	137,98
449	13440	128,53	**479**	14340	138,33
450	13470	128,84	**480**	14370	138,64

Item	Ts	[µS/cm]	Item	Ts	[µS/cm]
481	14400	138,96	**511**	15300	148,35
482	14430	139,3	**512**	15330	148,63
483	14460	139,55	**513**	15360	148,97
484	14490	139,9	**514**	15390	149,26
485	14520	140,21	**515**	15420	149,57
486	14550	140,56	**516**	15450	149,85
487	14580	140,84	**517**	15480	150,2
488	14610	141,19	**518**	15510	150,48
489	14640	141,5	**519**	15540	150,76
490	14670	141,81	**520**	15570	151,08
491	14700	142,1	**521**	15600	151,36
492	14730	142,41	**522**	15630	151,67
493	14760	142,76	**523**	15660	151,96
494	14790	143,04	**524**	15690	152,27
495	14820	143,35	**525**	15720	152,55
496	14850	143,67	**526**	15750	152,9
497	14880	144,01	**527**	15780	153,18
498	14910	144,29	**528**	15810	153,5
499	14940	144,64	**529**	15840	153,78
500	14970	144,92	**530**	15870	154,09
501	15000	145,24	**531**	15900	154,34
502	15030	145,52	**532**	15930	154,66
503	15060	145,86	**533**	15960	155
504	15090	146,15	**534**	15990	155,32
505	15120	146,49	**535**	16020	155,57
506	15150	146,81	**536**	16050	155,85
507	15180	147,12	**537**	16080	156,1
508	15210	147,4	**538**	16110	156,48
509	15240	147,72	**539**	16140	156,79
510	15270	148,03	**540**	16170	157,08

Item	Ts	[µS/cm]	Item	Ts	[µS/cm]
541	16200	157,36	**571**	17100	166,24
542	16230	157,64	**572**	17130	166,5
543	16260	157,99	**573**	17160	166,81
544	16290	158,24	**574**	17190	167,16
545	16320	158,55	**575**	17220	167,41
546	16350	158,83	**576**	17250	167,66
547	16380	159,09	**577**	17280	167,91
548	16410	159,46	**578**	17310	168,29
549	16440	159,71	**579**	17340	168,47
550	16470	160,06	**580**	17370	168,82
551	16500	160,34	**581**	17400	169,13
552	16530	160,66	**582**	17430	169,45
553	16560	160,94	**583**	17460	169,73
554	16590	161,22	**584**	17490	170,04

555	16620	161,5	**585**	17520	170,26
556	16650	161,85	**586**	17550	170,64
557	16680	162,07	**587**	17580	170,89
558	16710	162,45	**588**	17610	171,17
559	16740	162,73	**589**	17640	171,43
560	16770	162,98	**590**	17670	171,74
561	16800	163,29	**591**	17700	172,02
562	16830	163,58	**592**	17730	172,31
563	16860	163,86	**593**	17760	172,62
564	16890	164,17	**594**	17790	172,9
565	16920	164,49	**595**	17820	173,15
566	16950	164,77	**596**	17850	173,44
567	16980	165,05	**597**	17880	173,78
568	17010	165,37	**598**	17910	174,03
569	17040	165,65	**599**	17940	174,22
570	17070	165,9	**600**	17970	174,57

Item	Ts	[µS/cm]	Item	Ts	[µS/cm]
601	18000	174,79	**631**	18900	182,73
602	18030	175,1	**632**	18930	183,01
603	18060	175,29	**633**	18960	183,26
604	18090	175,6	**634**	18990	183,52
605	18120	175,89	**635**	19020	183,8
606	18150	176,17	**636**	19050	184,08
607	18180	176,42	**637**	19080	184,24
608	18210	176,7	**638**	19110	184,49
609	18240	176,98	**639**	19140	184,8
610	18270	177,24	**640**	19170	185,02
611	18300	177,46	**641**	19200	185,31
612	18330	177,8	**642**	19230	185,53
613	18360	178,05	**643**	19260	185,75
614	18390	178,24	**644**	19290	186
615	18420	178,55	**645**	19320	186,22
616	18450	178,9	**646**	19350	186,53
617	18480	179,12	**647**	19380	186,69
618	18510	179,37	**648**	19410	186,97
619	18540	179,65	**649**	19440	187,25
620	18570	179,87	**650**	19470	187,54
621	18600	180,19	**651**	19500	187,76
622	18630	180,38	**652**	19530	187,98
623	18660	180,69	**653**	19560	188,26
624	18690	180,94	**654**	19590	188,48
625	18720	181,22	**655**	19620	188,76
626	18750	181,47	**656**	19650	189,04
627	18780	181,73	**657**	19680	189,23
628	18810	181,91	**658**	19710	189,48
629	18840	182,26	**659**	19740	189,7
630	18870	182,51	**660**	19770	189,99

Item	Ts	[µS/cm]	Item	Ts	[µS/cm]
661	19800	190,24	**691**	20700	197,46
662	19830	190,49	**692**	20730	197,71
663	19860	190,74	**693**	20760	197,96

664	19890	190,96	**694**	20790	198,12
665	19920	191,18	**695**	20820	198,4
666	19950	191,46	**696**	20850	198,59
667	19980	191,68	**697**	20880	198,9
668	20010	191,93	**698**	20910	199,12
669	20040	192,15	**699**	20940	199,28
670	20070	192,37	**700**	20970	199,59
671	20100	192,65	**701**	21000	199,81
672	20130	192,94	**702**	21030	200
673	20160	193,16	**703**	21060	200,32
674	20190	193,35	**704**	21090	200,47
675	20220	193,69	**705**	21120	200,72
676	20250	193,88	**706**	21150	200,98
677	20280	194,13	**707**	21180	201,26
678	20310	194,35	**708**	21210	201,38
679	20340	194,54	**709**	21240	201,64
680	20370	194,85	**710**	21270	201,79
681	20400	195,07	**711**	21300	202,11
682	20430	195,32			
683	20460	195,57			
684	20490	195,79			
685	20520	196,05			
686	20550	196,27			
687	20580	196,52			
688	20610	196,77			
689	20640	196,99			
690	20670	197,14			

ANEXO 3 – Tabela de Parâmetros das Amostras 1+2 ACRE (RESULTADOS)

Item	**Ts**	**[µS/cm]**	**Item**	**Ts**	**[µS/cm]**
1	26	1,88	**31**	926	2,64
2	56	1,85	**32**	956	2,73
3	86	1,85	**33**	986	2,86
4	116	1,82	**34**	1016	3,01
5	146	1,82	**35**	1046	3,17
6	176	1,79	**36**	1076	3,33
7	206	1,79	**37**	1106	3,49
8	236	1,79	**38**	1136	3,67
9	266	1,79	**39**	1166	3,83
10	296	1,79	**40**	1196	3,99
11	326	1,79	**41**	1226	4,14
12	356	1,79	**42**	1256	4,27
13	386	1,79	**43**	1286	4,43
14	416	1,79	**44**	1316	4,55
15	446	1,82	**45**	1346	4,71
16	476	1,82	**46**	1376	4,84
17	506	1,82	**47**	1406	4,99
18	536	1,85	**48**	1436	5,12
19	566	1,88	**49**	1466	5,27
20	596	1,92	**50**	1496	5,43
21	626	1,98	**51**	1526	5,56
22	656	2,01	**52**	1556	5,71
23	686	2,07	**53**	1586	5,87

24	716	2,1	**54**	1616	6
25	746	2,17	**55**	1646	6,15
26	776	2,23	**56**	1676	6,28
27	806	2,29	**57**	1706	6,41
28	836	2,35	**58**	1736	6,56
29	866	2,45	**59**	1766	6,69
30	896	2,54	**60**	1796	6,81

Item	Ts	[µS/cm]	Item	Ts	[µS/cm]
61	1826	6,97	**91**	2726	11,24
62	1856	7,1	**92**	2756	11,4
63	1886	7,25	**93**	2786	11,55
64	1916	7,41	**94**	2816	11,68
65	1946	7,57	**95**	2846	11,87
66	1976	7,69	**96**	2876	12,03
67	2006	7,85	**97**	2906	12,18
68	2036	7,97	**98**	2936	12,34
69	2066	8,13	**99**	2966	12,5
70	2096	8,26	**100**	2996	12,65
71	2126	8,38	**101**	3026	12,84
72	2156	8,54	**102**	3056	13
73	2186	8,67	**103**	3086	13,16
74	2216	8,79	**104**	3116	13,34
75	2246	8,92	**105**	3146	13,53
76	2276	9,07	**106**	3176	13,69
77	2306	9,2	**107**	3206	13,88
78	2336	9,33	**108**	3236	14,07
79	2366	9,45	**109**	3266	14,25
80	2396	9,61	**110**	3296	14,41
81	2426	9,76	**111**	3326	14,6
82	2456	9,92	**112**	3356	14,79
83	2486	10,05	**113**	3386	14,98
84	2516	10,2	**114**	3416	15,17
85	2546	10,36	**115**	3446	15,38
86	2576	10,49	**116**	3476	15,57
87	2606	10,64	**117**	3506	15,76
88	2636	10,8	**118**	3536	15,98
89	2666	10,93	**119**	3566	16,17
90	2696	11,08	**120**	3596	16,36

Item	Ts	[µS/cm]	Item	Ts	[µS/cm]
121	3626	16,58	**151**	4526	23,2
122	3656	16,77	**152**	4556	23,45
123	3686	16,99	**153**	4586	23,67
124	3716	17,17	**154**	4616	23,89
125	3746	17,39	**155**	4646	24,14
126	3776	17,61	**156**	4676	24,36
127	3806	17,83	**157**	4706	24,62
128	3836	18,02	**158**	4736	24,87

129	3866	18,24	**159**	4766	25,09
130	3896	18,46	**160**	4796	25,34
131	3926	18,68	**161**	4826	25,59
132	3956	18,9	**162**	4856	25,81
133	3986	19,12	**163**	4886	26,09
134	4016	19,34	**164**	4916	26,31
135	4046	19,56	**165**	4946	26,56
136	4076	19,75	**166**	4976	26,78
137	4106	20	**167**	5006	27,03
138	4136	20,22	**168**	5036	27,28
139	4166	20,44	**169**	5066	27,54
140	4196	20,66	**170**	5096	27,79
141	4226	20,91	**171**	5126	28,04
142	4256	21,13	**172**	5156	28,29
143	4286	21,35	**173**	5186	28,54
144	4316	21,57	**174**	5216	28,76
145	4346	21,82	**175**	5246	29,04
146	4376	22,04	**176**	5276	29,29
147	4406	22,26	**177**	5306	29,55
148	4436	22,51	**178**	5336	29,8
149	4466	22,73	**179**	5366	30,05
150	4496	22,98	**180**	5396	30,3

Item	**Ts**	**[µS/cm]**	**Item**	**Ts**	**[µS/cm]**
181	5426	30,55	**211**	6326	38,43
182	5456	30,8	**212**	6356	38,68
183	5486	31,05	**213**	6386	38,96
184	5516	31,3	**214**	6416	39,25
185	5546	31,55	**215**	6446	39,5
186	5576	31,81	**216**	6476	39,78
187	5606	32,09	**217**	6506	40,06
188	5636	32,34	**218**	6536	40,35
189	5666	32,59	**219**	6566	40,6
190	5696	32,84	**220**	6596	40,88
191	5726	33,09	**221**	6626	41,16
192	5756	33,38	**222**	6656	41,41
193	5786	33,63	**223**	6686	41,73
194	5816	33,88	**224**	6716	42,01
195	5846	34,16	**225**	6746	42,26
196	5876	34,41	**226**	6776	42,54
197	5906	34,66	**227**	6806	42,83
198	5936	34,95	**228**	6836	43,11
199	5966	35,2	**229**	6866	43,39
200	5996	35,48	**230**	6896	43,67
201	6026	35,73	**231**	6926	43,96
202	6056	36,01	**232**	6956	44,27
203	6086	36,26	**233**	6986	44,52
204	6116	36,55	**234**	7016	44,8
205	6146	36,83	**235**	7046	45,09
206	6176	37,08	**236**	7076	45,37
207	6206	37,36	**237**	7106	45,65
208	6236	37,61	**238**	7136	45,93
209	6266	37,9	**239**	7166	46,25

210	6296	38,15	**240**	7196	46,5

Item	Ts	[µS/cm]	Item	Ts	[µS/cm]
241	7226	46,78	**271**	8126	55,48
242	7256	47,1	**272**	8156	55,76
243	7286	47,38	**273**	8186	56,04
244	7316	47,66	**274**	8216	56,33
245	7346	48,01	**275**	8246	56,7
246	7376	48,23	**276**	8276	56,92
247	7406	48,54	**277**	8306	57,21
248	7436	48,82	**278**	8336	57,52
249	7466	49,11	**279**	8366	57,8
250	7496	49,42	**280**	8396	58,12
251	7526	49,67	**281**	8426	58,4
252	7556	49,95	**282**	8456	58,71
253	7586	50,24	**283**	8486	59
254	7616	50,52	**284**	8516	59,28
255	7646	50,86	**285**	8546	59,59
256	7676	51,12	**286**	8576	59,88
257	7706	51,4	**287**	8606	60,16
258	7736	51,71	**288**	8636	60,47
259	7766	51,99	**289**	8666	60,75
260	7796	52,31	**290**	8696	61,04
261	7826	52,59	**291**	8726	61,35
262	7856	52,87	**292**	8756	61,66
263	7886	53,16	**293**	8786	61,95
264	7916	53,44	**294**	8816	62,23
265	7946	53,78	**295**	8846	62,54
266	7976	54,04	**296**	8876	62,83
267	8006	54,32	**297**	8906	63,11
268	8036	54,6	**298**	8936	63,39
269	8066	54,88	**299**	8966	63,71
270	8096	55,23	**300**	8996	63,99

Item	Ts	[µS/cm]
301	9026	64,27
302	9056	64,58
303	9086	64,87
304	9116	65,15
305	9146	65,46
306	9176	65,75
307	9206	66,03
308	9236	66,34
309	9266	66,63
310	9296	66,91
311	9326	67,19
312	9356	67,47
313	9386	67,76
314	9416	68,07
315	9446	68,38
316	9476	68,64
317	9506	68,95
318	9536	69,23
319	9566	69,51
320	9596	69,83
321	9626	70,11
322	9656	70,39

ANEXO 4 – NOTA FISCAL 1

15 de fevereiro de 2022 7:23
Ver mais detalhes

Bela Vida Natural

Sua Nota Fiscal foi emitida.

Referente ao Pedido **#1210861426350-01**

Olá, Milton Maia Filho . Estamos empacotando seus produtos para providenciar o envio.

PRODUTOS NA NOTA FISCAL

Óleo de Açaí 1 Litro LM Distriol
1 un. R$ 99,90

Óleo de Castanha do Pará 1 Litro LM Distriol

ANEXO 5 – NOTA FISCAL 2

RECEBEMOS DE MIRAGINA SA INDUSTRIA E COMERCIO OS PRODUTOS CONSTANTES DA NOTA FISCAL INDICADA AO LADO

DATA DE RECEBIMENTO	IDENTIFICAÇÃO E ASSINATURA DO RECEBEDOR	NF-e N. 000067848 SÉRIE 1

Identificação do emitente
MIRAGINA SA INDUSTRIA E COMERCIO
RUA DO ,0/1ARIO, 448
,0/1ARIO Cep:69900-854
RIO BRANCO/AC
Fone: 556832246482

DANFE
DOCUMENTO AUXILIAR DA NOTA FISCAL ELETRÔNICA
0-ENTRADA
1-SAÍDA [1]
N. 000067848
SÉRIE 1
FOLHA 01/01

CHAVE DE ACESSO DA NF-E
1223 0504 0636 8100 0198 5500 1000 0678 4819 0312 6885

Consulta de autenticidade no portal nacional da NF-e www.nfe.fazenda.gov.br/portal ou no site da SEFAZ Autorizada

NATUREZA DA OPERAÇÃO	PROTOCOLO DE AUTORIZAÇÃO DE USO
VENDA DE PRODUCAO DE ESTABELECIMENTO/ VENDA DE PRODUCAO DO E	312236002159329 08/05/2023 14:03:59-05:00

INSCRIÇÃO ESTADUAL	INSC.ESTADUAL DO SUBST.TRIB.	CNPJ/CPF
0100147200160		04.063.681/0001-98

DESTINATARIO/REMETENTE

NOME/RAZÃO SOCIAL	CNPJ/CPF		DATA DE EMISSÃO
ALBERTO ALVES	309.094.574-68		08/05/2023
ENDEREÇO	**BAIRRO/DISTRITO**	**CEP**	**DATA ENTRADA/SAÍDA**
CONJ. UNIVERSITARIO I, Q 48, C 4, SN	DISTRITO INDUSTRIAL	69900-000	08/05/2023
MUNICIPIO / **FONE/FAX** / **UF** / **INSCRIÇÃO ESTADUAL**			**HORA ENTRADA/SAÍDA**
RIO BRANCO / 068999853819 / AC			14:02:00

FATURA

001 08/05/2023 69,90								

CALCULO DO IMPOSTO

BASE DE CALCULO DO ICMS	VALOR DO ICMS	BASE DE CALCULO DO ICMS SUBSTITUIÇÃO	VALOR DO ICMS SUBSTITUIÇÃO	VALOR TOTAL DOS PRODUTOS
53,10	10,09	0,00	0,00	69,90

VALOR DO FRETE	VALOR DO SEGURO	DESCONTO	OUTRAS DESPESAS ACESSÓRIAS	VALOR DO IPI	VALOR TOTAL DA NOTA
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	69,90

TRANSPORTADOR/VOLUMES TRANSPORTADOS

RAZÃO SOCIAL	FRETE POR CONTA	CÓDIGO ANTT	PLACA DO VEÍCULO	UF	CNPJ/CPF
	0-REMETENTE				

ENDEREÇO	MUNICIPIO	UF	INSCRIÇÃO ESTADUAL

QUANTIDADE	ESPECIE	MARCA	NUMERAÇÃO	PESO BRUTO	PESO LIQUIDO

DADOS DO PRODUTO / SERVIÇO

COD. PROD	DESCRIÇÃO DO PROD./SERV.	NCM/SH	CST	CFOP	UN	QUANT.	V.UNITARIO	V.TOTAL	BC.ICMS	V.ICMS	V.IPI	A.ICMS	A.IPI
001251	FARINHA CONCENTRADA CASTANHA D	11063000	060	5101	UN	3,0000	17,7000	53,10	53,10	10,09	0,00	19.00%	0.00%
					KG	0,0750	708,0000						
000050	OLEO DE CASTANHA 250ML	15131900	040	5101	UN	1,0000	16,8000	16,80	0,00	0,00	0,00	0.00%	0.00%
					KG	0,0250	672,0000						

CALCULO DO ISSQN

INSCRIÇÃO MUNICIPAL	VALOR TOTAL DOS SERVIÇOS	BASE DE CÁLCULO DO ISSQN	VALOR DO ISSQN

DADOS ADICIONAIS

INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES	RESERVADO AO FISCO
Protocolo: 312230002159329 PEDIDO: 072429	

ANEXO 6 – EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE CASTANHA

Óleo de Castanha do Pará Refinado - DCPR

Nome científico	*Bertholletia excelsa Bonpl. – Lecythidaceae (Brazil nut refined Oil)*
Procedência	Produto de fabricação nacional *(Made in Brazil)*
Forma de obtenção	Prensagem a frio, filtragem e refinado *(Cold pressing, filtering and refined)*
CAS / EINECS	356065-50-4
Parte utilizada	Semente

CARACTERÍSTICAS FISICO QUÍMICAS

Característica	Especificação	Resultado	Metodologia
Cor (25ºC)	Amarelo a âmbar	De acordo	Propriedades Organolépticas
Densidade (25ºC g/ml)	0,910 – 0,920	0,919	*IAL 337/IV
Estado Físico (25ºC)	Líquido viscoso	De acordo	Propriedades Organolépticas
Índice de Acidez (mg KOH/g)	< 10	4,88	AOCS Ca5 -40
Índice de Iodo (Wijs)	100 – 135	118,53	*IAL 329/IV
Índice de Peróxido (meq/kg)	< 10	5,29	*IAL 326/IV
Índice de Refração (n_d 40ºC)	1,4600 – 1,4800	1,4730	*IAL 327/IV
Índice de Saponificação (mg KOH/kg)	190 – 215	190,22	*IAL 328/IV
Odor (25ºC)	Característico	De acordo	Propriedades Organolépticas

* IAL - Instituto Adolfo Lutz

CONTAGEM MICROBIANA

Característica	Especificação *	Resultado
Bactérias totais	$<10^3$ UFC/g	De acordo
Fungos e leveduras	$<10^2$ UFC/g	De acordo
Coliformes totais e fecais/1ml	Ausente	De acordo
Staphylococcus Aureus/1ml	Ausente	De acordo
Pseudomonas SP/1ml	Ausente	De acordo

* Metodologia - Farmacopeia Brasileira - Vol. I –6. Ed. – 2019

LOTE: 2024-1/5546 **DATA DE FABRICAÇÃO:** 01/09/2021

DATA DE VALIDADE: 12 meses após a data de fabricação em embalagens lacradas.

A validade será desconsiderada caso o produto seja manipulado ou armazenado em locais inadequados.

Conservar em local seco e arejado em temperatura ambiente de 15 a 30°C, não expor este produto ao calor nem a raios solares.

Poderá apresentar mudança de cor devido ao produto ser de origem natural ou vegetal.

Não nos responsabilizamos quando os produtos são manipulados e/ou utilizados de forma contrária aos padrões.

Matéria prima não destinada ao consumidor final.

PRINCIPAIS APLICAÇÕES: Uso alimentício e cosmético.

Consultem o médico e/ou nutricionista antes de fazer uso do produto.

RESPONSÁVEL TÉCNICO: MARY ELEN F. PEREIRA
CRF 35.303

As informações aqui contidas são fornecidas de boa fé. Recomendamos que nossos produtos sejam testados para verificar a conveniência de seu uso antes de adotá-los industrialmente. Estas informações não devem ser entendidas como permissão para utilização de métodos ou composição cobertas por qualquer patentes.

Distriol Indústria e Comércio Ltda. CNPJ: 16.935.723/0001-12
☎ (11) 4012-4568 / 4012-5069 / 4012-4174 / 4012-4380
Revisão: 7º Ed - Março/2021

ANEXO 7 – EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE AÇAÍ

Óleo de Açaí - DACA

Nome científico	*Euterpe oleracea Mart. – Aracaceae (Acai Oil)*
Procedência	Produto de fabricação nacional *(Made in Brazil)*
Forma de obtenção	Prensagem a frio e filtração *(Cold pressing and filtration)*
CAS / EINECS	79496-95-4 / 861902-11-6 / 906351-38-0
Parte utilizada	Fruto

CARACTERÍSTICAS FISICO QUÍMICAS

Característica	Especificação	Resultado	Metodologia
Cor (25ºC)	Roxo	De acordo	Propriedades Organolépticas
Densidade (25ºC g/ml)	0,915 – 0,925	0,916	*IAL 337/IV
Estado Físico (25ºC)	Líquido viscoso	De acordo	Propriedades Organolépticas
Índice de Acidez (mg KOH/g)	< 4,0	0,68	AOCS Ca5 -40
Índice de Iodo (Wijs)	110 – 135	125,09	*IAL 329/IV
Índice de Peróxido (meq/kg)	< 10	9,66	*IAL 326/IV
Índice de Refração (n_d 40ºC)	1,4660 – 1,4790	1,4715	*IAL 327/IV
Índice de Saponificação (mg KOH/kg)	170 – 210	197,41	*IAL 328/IV
Odor (25ºC)	Característico	De acordo	Propriedades Organolépticas

* IAL- Instituto Adolfo Lutz

CONTAGEM MICROBIANA

Característica	Especificação *	Resultado
Bactérias totais	$<10^3$ UFC/g	De acordo
Fungos e leveduras	$<10^2$ UFC/g	De acordo
Coliformes totais e fecais/1ml	Ausente	De acordo
Staphylococcus Aureus/1ml	Ausente	De acordo
Pseudomonas SP/1ml	Ausente	De acordo

* Metodologia – Farmacopeia Brasileira - Vol. I – 6. Ed. – 2019

LOTE: 1486/5540 **DATA DE FABRICAÇÃO:** 01/09/2021

DATA DE VALIDADE: 12 meses após a data de fabricação em embalagens lacradas.

A validade será desconsiderada caso o produto seja manipulado ou armazenado em locais inadequados.

Conservar em local seco e arejado em temperatura ambiente de 15 a 30°C, não expor este produto ao calor nem a raios solares.

Poderá apresentar mudança de cor devido ao produto ser de origem natural ou vegetal.

Não nos responsabilizamos quando os produtos são manipulados e/ou utilizados de forma contrária aos padrões.

Matéria prima não destinada ao consumidor final.

PRINCIPAIS APLICAÇÕES: Uso alimentício e cosmético.

Consultem o médico e/ou nutricionista antes de fazer uso do produto.

RESPONSÁVEL TÉCNICO: MARY ELEN F. PEREIRA
CRF 35.303

As informações aqui contidas são fornecidas de boa fé. Recomendamos que nossos produtos sejam testados para verificar a conveniência de seu uso antes de adotá-los industrialmente. Estas informações não devem ser entendidas como permissão para utilização de métodos ou composição cobertas por qualquer patentes.

Distriol Indústria e Comércio LTDA – CNPJ: 16.935.723/0001-12
☎ (11) 4012-4568 / 4012-5069 / 4012-4174 / 4012-4380

Revisão: 7º Ed - Março/2021

Documento assinado digitalmente
gov.br
MILTON MAIA FILHO
Data: 14/12/2023 09:11:43-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

ANEXO 8 – DECLARAÇÃO DA REVISTA DELOS

REVISTA DELOS DESARROLLO LOCAL SOSTENIBLE

Revista Delos Desarrollo Local Sostenible

DECLARAÇÃO

A Revista Delos Desarrollo Local Sostenible, ISSN 1988-5245 declara para os devidos fins, que o artigo intitulado **"Ensaio de viabilidade celular da nanoemulsão de óleo de açaí (euterpe Precatoria Mat.) e castanha do Brasil (Bertholletia excelsa Bonp) em células C6 e gliais"** de autoria de *Milton Maia Filho, Daniel Alves de Figueiredo Filho, Eline Gomes dos Santos, Kauã Galvão de Macedo, Anderson Luis Ramos, Fernando Sérgio Escócio Drummond Viana de Faria, Anselmo Fortunato Ruiz Rodriguez*, foi publicado no v. 16, n .49, p. 3990-4005.

A revista é on-line, e os artigos podem ser encontrados ao acessar o link:

https://ojs.revistadelos.com/ojs/index.php/delos/issue/view/53

DOI: https://doi.org/10.55905/rdelosv16.n49-029

Por ser a expressão da verdade, firmamos a presente declaração.

São José dos Pinhais, 12 de Dezembro de 2023.

QR de validade da publicação

Equipe editorial