



**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO HUMANA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**SISTEMAS NANOEMULSIONADOS À BASE DE OLEO DE SEMENTE DE
ABÓBORA: CARACTERIZAÇÃO E ESTABILIDADE FÍSICOQUÍMICA**

MARIA ISABEL ORDOÑEZ LOZADA

**BRASÍLIA/DF
Dezembro/2020**



**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO HUMANA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**SISTEMAS NANOEMULSIONADOS À BASE DE OLEO DE SEMENTE DE
ABÓBORA: CARACTERIZAÇÃO E ESTABILIDADE FÍSICOQUÍMICA**

MARIA ISABEL ORDOÑEZ LOZADA

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Nutrição Humana
Área de pesquisa: Alimentos, dietética e Bioquímica aplicada à Nutrição. Pelo Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília.
Orientadora: Dra. Livia de Lacerda de Oliveira. Co-Orientadora: Dra. Iriani Maldonade

Brasília

2020

**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO HUMANA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**SISTEMAS NANOEMULSIONADOS À BASE DE OLEO DE SEMENTE DE
ABÓBORA: CARACTERIZAÇÃO E ESTABILIDADE FÍSICOQUÍMICA**

MARIA ISABEL ORDOÑEZ LOZADA

Banca Examinadora

**Profa. Dra. Livia de Lacerda de Oliveira Pineli,
PPGNH/UNB
Orientador**

**Prof. Dr. Marcio Antônio Mendonça
PPG-Agronomia/UNB
Examinador externo**

**Profa. Dr. Patricia Bento da Silva
PPG-nano/UNB
Examinador Externo**

**Profa. Dr. Wilma Maria Coelho Araújo
PPGNH/UNB
Examinador Interno**

Brasília- DF, dezembro, 2020.

Ordoñez Lozada, Maria Isabel

Sistemas nanoemulsionados à base de óleo de semente de abóbora:
caracterização e estabilidade físicoquímica/ Maria Isabel Ordoñez Lozada

Tese de doutorado/Faculdade de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
graduação em Nutrição Humana, Universidade de Brasília, Brasília, 2020.

Área de Concentração: Alimentos, dietética e Bioquímica aplicada à Nutrição.

Orientadora: Lívia de Lacerda de Oliveira Pineli

1. Óleo de semente de abóbora
2. Nanoemulsões
3. Compostos bioativos
4. Carotenoides
5. Ester
6. Estabilidade.

*Dedico esta tese a
minha mãe, Maria Eugenia e aos meus
avos Pedro Pablo (in memoriam) e Maria
Lida, por acreditarem em mim e serem a
inspiração de todos meus sonhos.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser sempre maravilhoso comigo, por todas as oportunidades que me brinda, por me dar fortaleza, sabedora e por me acompanhar sempre.

A minha mãe Maria Eugenia, por dar tudo de si para que eu pudesse ter o melhor. Por ser sempre minha maior fortaleza, e me apoiar em todos meus sonhos. Obrigada pelo seu amor infinito.

Aos meus avós Pedro Pablo e Maria lida, pelas orações, apoio e amor incondicional

Minha tia Luz e prima Patrícia, pelo apoio e carinho.

Ao meu pai Luís Eduardo, pelo apoio, incentivo e por acreditar em mim, obrigada por me apoiar em meus sonhos.

Ao meu amor Fabian, pelo apoio, compreensão e amor. Por me dar força nos momentos difíceis e por toda sua parceria durante estes anos. Por não medir esforços para me ajudar a qualquer momento em que eu precisei.

A minha amiga Jennifer, por ter me apoiado incondicionalmente. Por sua amizade, carinho e sempre querer meu bem. Obrigada por ter me dado uma força no desenvolvimento dos experimentos e pela torcida para que tudo desse certo nesta jornada.

À professora Dra Livia, pela orientação, pelos ensinamentos, disponibilidade, dedicação e paciência, para me guiar nessa trajetória, e me colocar no rumo correto. Obrigada pela compreensão e apoio.

A Dr Iriani, por ter se tornado uma mentora, por sempre me compreender e escutar, pelo aconselhamento e apoio nos momentos de dificuldade, além de me fornecer um outro ponto de vista nas situações difíceis quando eu precisei. Obrigada pelo apoio e todos os ensinamentos.

A Dr. Daniele Bobrowski, por todos os ensinamentos, por ter-me apresentado o mundo dos carotenoides. Obrigada pela compreensão, ajuda e paciência. Você foi fundamental para o desenvolvimento desta tese.

À Débora por me ajudar a desenvolver toda a parte das nanoemulsões. Pela paciência em me ensinar, e por toda a disponibilidade. A Danielle Galdino, por ter-me ajudado durante o desenvolvimento do trabalho, por sua disponibilidade infinita, por sua paciência e carinho.

Aos meus amigos: Beatriz, Florence, Dagma, Carolina, Alejandra e Wilson pela amizade incondicional, por ter me escutado nos momentos difíceis, por tornar-se um apoio emocional nesta jornada.

Aos técnicos do laboratório da UnB, Desterro, Mário e Luís pela paciência, ajuda e compreensão durante essa jornada.

A Embrapa Hortaliças por ter me permitido usar suas instalações para o desenvolvimento do meu trabalho. Aos técnicos do laboratório de ciência e tecnologia de alimentos; ao Deusanio e João pela ajuda quando eu precise e ao Ricardo por todos os ensinamentos e colaboração no desenvolvimento de meu trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de Nanociência e Nanotecnologia do departamento de genética e morfologia e o Laboratório de Micologia do departamento de Fitopatologia pela parceria e disposição sempre que eu precisei.

Aos professores do programa de pós-graduação em Nutrição Humana pelos ensinamentos. E demais professores que me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho por estarem sempre disponíveis para responder os meus questionamentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos e fomento à pesquisa.

A Universidade de Brasília, pela oportunidade de continuar meus estudos e aperfeiçoamento dos meus conhecimentos.

A todos que participaram e contribuíram de alguma maneira para que esse projeto de pesquisa e de vida se concretizasse. Minha gratidão eterna!

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito.*

*Não sou o que deveria ser,
mas Graças a Deus,
não sou o que era antes”.*

Marthin Luther King

RESUMO

As abóboras (*Cucurbita* spp.) são cultivadas extensivamente em todo o mundo, pois são consideradas espécies com importante valor nutricional e importância econômica. O óleo da sua semente é considerado uma rica fonte natural de compostos bioativos, como fitoesteróis, tocoferóis, ácidos graxos poli-insaturados e carotenoides. A presente proposta buscou alternativas tecnológicas para a aplicação alimentar do óleo da semente de abóboras, por meio do desenvolvimento de nanoemulsões. O projeto foi conduzido em duas etapas. Na primeira etapa, foi determinada a composição, os parâmetros físico-químicos de qualidade e a capacidade antioxidante dos óleos de sementes de abóbora (OSA) de *Cucurbita pepo*, *C. maxima* e *C. moschata* jacarezinho cultivada no Brasil. Posteriormente, foram desenvolvidas nanoemulsões com cada OSA (nanopepo, nanomax e nanomosc, respectivamente) e suas estabilidades físicas foram avaliadas durante o armazenamento a duas temperaturas (4 e 25 °C). A composição do óleo de semente de abóbora variou conforme a espécie avaliada. OSA *C. pepo* apresentou os maiores teores de ácidos graxos poli-insaturados, carotenoides totais e clorofilas, e estabilidade oxidativa mais baixa. Por outro lado, OSA *C. maxima* apresentou maior estabilidade à oxidação e teor de tocoferóis totais e OSA *C. moschata* tinha um maior teor de β -caroteno e δ -tocopherol. Nanomax e nanopepo foram mais estáveis para o crescimento de gotículas a 4 °C que a 25 °C, enquanto nanomosc foi mais estável em 25 °C. Nanopepo foi a formulação mais estável após os ciclos de aquecimento-resfriamento, enquanto nanomax foi o mais estável sob centrifugação independentemente da temperatura. Na segunda etapa foram desenvolvidas nanoemulsões de OSA e de óleo de soja carregadoras de luteína extraídas das flores de *Tagetes* spp., e foi avaliada a estabilidade física e química sob condições de temperatura e luz ultravioleta. A luteína foi carregada em duas formas: livre ou esterificada com ácido palmítico por meio de uma síntese orgânica. Os dados obtidos apresentaram um comportamento consistente com modelo cinético de primeira ordem. As nanoemulsões apresentaram uma boa estabilidade física de forma geral. Com relação às nanoemulsões carregadoras de luteína, o éster produzido pela síntese foi menos estável sob condições de luz e temperatura (45 °C) que aquelas com luteína livre. As nanoemulsões com OSA geraram maior retenção do carotenoide até o final do armazenamento sob 45 °C. Enquanto as nanoemulsões sob exposição à luz UV, as

nanoemulsões de OSA foram mais estáveis no que diz respeito ao éster de luteína, enquanto a luteína livre apresentou menor degradação nas nanoemulsões de óleo de soja. Esta pesquisa sobre OSA buscou promover o consumo e aplicação do óleo em sistemas nanoemulsificados. Ademais a termo e foto estabilidades de compostos bioativos, especificamente da luteína, é fundamental para um melhor entendimento do seu comportamento nas condições de aplicação industrial, manutenção dos compostos bioativos e da caracterização química das emulsões.

ABSTRACT

Pumpkins (*Cucurbita* spp.) are grown extensively around the world, as they are considered species with important nutritional value and economic importance. Its seed oil is considered a rich natural source of bioactive compounds, such as phytosterols, tocopherols, polyunsaturated fatty acids and carotenoids. This proposal sought technological alternatives for the food application of pumpkin seed oil, through the development of nanoemulsions. The project was conducted in two stages. In the first stage, the composition, the quality physico-chemical parameters and the antioxidant capacity of pumpkin seed oils (PSO) from *Cucurbita pepo*, *C. maxima* and *C. moschata* jacarezinho cultivated in Brazil were determined. Subsequently, nanoemulsions were developed with each PSO (nanopepo, nanomax and nanomosc, repetitively) and their physical stability was evaluated during storage at two temperatures (4 and 25 ° C). The composition of pumpkin seed oil varied according to the species evaluated. *C. pepo* PSO showed the highest levels of polyunsaturated fatty acids, total carotenoids and chlorophylls, and the lowest oxidative stability. On the other hand, *C. maxima* PSO showed greater oxidation stability and total tocopherol content and *C. moschata* PSO had a higher content of β -carotene and δ -tocopherol. Nanomax and nanopepo were more stable for droplet growth at 4 ° C than at 25 ° C, while nanomosc was more stable at 25 ° C. Nanopepo was the most stable formulation after heating-cooling cycles, while nanomax was the most stable under centrifugation regardless of temperature. In the second stage, PSO nanoemulsions and lutein-bearing soybean oil extracted from *Tagetes* spp. Flowers were developed, and the physical and chemical stability was evaluated under conditions of temperature and ultraviolet light. Lutein was loaded in two forms: free or esterified with palmitic acid through organic synthesis. The data obtained showed a behavior consistent with the first order kinetic model. The nanoemulsions showed good physical stability in general. Regarding lutein-carrying nanoemulsions, the ester produced by the synthesis was less stable under light and temperature conditions (45 ° C) than those with free lutein. PSO nanoemulsions generated greater carotenoid retention until the end of storage under 45 ° C. Under exposure to UV light, PSO nanoemulsions were more stable with respect to lutein ester, while free lutein showed less degradation in soybean oil nanoemulsions. This research on PSO sought to promote oil consumption and application in nanoemulsified

systems. In addition, the term and photo-stability of bioactive compounds, specifically lutein, is fundamental for a better understanding of their behavior under conditions of industrial application, maintenance of bioactive compounds and the chemical characterization of emulsions.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I	26
Figura 1. Esquema de uma nanoemulsão formulada com óleo, água e estabilizante (tensoativos).	31
Figura 2. Métodos de baixa energia para obtenção de nanoemulsões do tipo óleo em água (O/A).	36
Figura 3. Métodos de alta energia para obtenção de nanoemulsões do tipo óleo em água (O/A).	37
Figura 4. Nomenclatura <i>cis/trans</i> e <i>E/Z</i> para isômeros geométricos.	41
Figura 5. Estrutura química de xantofilas e carotenos.	41
Figura 6. Estrutura química da luteína.	42
Figura 7. Espectro de absorção para luteína em 446 nm.	43
Figura 8. Flores de <i>Tagetes</i> spp. Fonte: Autor	44
Figura 9. Estruturas químicas de ésteres de carotenoides. R1, R2: ácido graxo.	45
Figura 11. Mecanismo de esterificação de Steglich.	48
Figura 12. Produção de abóbora no mundo por continentes desde 1994 até 2018.	50
Figura 13. Ilustrações de três espécies de aboboras.	52
Figura 14. Sementes de abóbora do campo experimental da Embrapa Hortaliças. (A) <i>Cucurbita moschata</i> , (B) <i>C. máxima</i> , (C) <i>C. moschata</i> jacarezinho, (D) <i>C. pepo</i> .	53
Figura 15. Claificação de ácidos graxos segundo seus números de insaturações	55
Figura 16. Metabolismo dos ácidos graxos linoleico e linolênico.	56
Figura 17. Mecanismo de ação dos antioxidantes	41
Figura 18. Sinal ERP do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH*).	42
CAPITULO II	73
Figura 1. Capacidade antioxidante dos óleos de semente de abóbora pelo método DPPH por Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (ERP). Óleo de <i>C. moschata</i> jacarezinho (Moschata OSA), óleo de <i>C. maxima</i> (Maxima OSA) e óleo de <i>C. pepo</i> (Pepo OSA).	109
Figura 2. Análise de componentes principais de compostos bioativos em óleos de sementes de abóbora de <i>Cucurbita moschata</i> , <i>C. maxima</i> e <i>C. pepo</i> .	112
Figura 3. Variação do diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e carga de superfície das nanoemulsões feitas com óleo de três espécies de sementes de abóbora durante o armazenamento a 4 °C (A, C, E e G) e 25 °C (B, D, F e H).	114
Figura 4. Imagenes de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) de nanoemulsões de óleo de semente de <i>Cucurbita maxima</i> (A, D), <i>C. moschata</i> (B, E) e	

C. <i>pepo</i> (C, F). As imagens foram capturadas em ampliação de 5000 (A, B e C) e 15000 (D, E. e F).	116
Figura 5. Impacto dos ciclos de temperatura em (A) tamanho da gota (diâmetro), (B) índice de polidispersão e (C) carga superficial de gotículas de nanoemulsão (potencial zeta). A Figura 5D mostra o efeito do pH no potencial zeta de nanoemulsões feitas com óleo de três espécies de sementes de abóbora.	121
CAPITULO III	133
Figura. 1. Estrutura química de luteína livre (<i>all-trans</i>).	144
Tabela 1. Características UV-vis de extrato saponificados de pétalas de marigold e extrato esterificado.	145
Figura 2. Cromatogramas de HPLC-DAD de extrato de <i>Tagetes spp</i> saponificado. luteína livre ((<i>all-E</i>)-luteína) (A) e extrato de luteína esterificada com ácido palmítico (<i>all-E</i>)-dipalmitato de luteína (B).	146
Figura 3. Estrutura química de <i>all-E-dipalmitato de luteína</i> (homodiester).	147
Figura 4. Mudanças no teor de carotenoides de nanoemulsões com óleo de semente de abóbora (OSA) e soja (SO) transportadoras de luteína durante 15 dias de armazenamento a 4 °C (A) e 45 °C (B).	150
Figura 5. Mudanças na cor de nanoemulsões com óleo de semente de abóbora (OSA) e soja (SO) transportadoras de luteína durante 15 dias de armazenamento a 4 °C (A , C) e 45 °C (B,D): a* (“vermelhidão”); b* (“amarelecimento”).	158
Figura 6. Mudanças na cor de nanoemulsões com óleo de semente de abóbora (OSA) e soja (SO) transportadoras de luteína durante 15 dias de armazenamento a 4 °C (A, C) e 45 °C (B, D): C* (saturação); L* (luminosidade).	159
Figura 7. Mudanças na cor de nanoemulsões com óleo de semente de abóbora (OSA) e soja (SO) transportadoras de luteína durante 15 dias de armazenamento a 4 °C (A) e 45 °C (B): h (tonalidade).	160
Figura 8. Aparência das nanoemulsões de óleo de semente de abóbora e óleo de soja transportadoras de luteína. Termoestabilidade durante 15 dias a 4 e 45 °C.	162
Figura 9. Variações no diâmetro hidrodinâmico das gotículas e no índice de polidispersão em nanoemulsões com óleo de semente de abóbora (OSA) e soja (SO) transportadoras de luteína durante 15 dias de armazenamento a 4 °C (A, C) e 45 °C (B,D).	163
Figura 10. Mudanças no potencial zeta de nanoemulsões com óleo de semente de abóbora (OSA) e soja (SO) transportadoras de luteína durante 15 dias de armazenamento a 4 °C (A) e 45 °C (B).	164
Figura 11. Variações no teor de carotenoides de nanoemulsões com óleo de semente de abóbora (OSA) e soja (SO) transportadoras de luteína durante 240 minutos expostas a luz ultravioleta. Controle (A) e Expostas (B).	166

Figura 12. Aparência das nanoemulsões de óleo de semente de abóbora e óleo de soja transportadoras de luteína. Foto-estabilidade durante 420 minutos. 169

Figura 13. Variações no diâmetro hidrodinâmico das gotículas, índice de polidispersão e potencial zeta de nanoemulsões com óleo de semente de abóbora (OSA) e soja (SO) transportadoras de luteína durante 240 minutos expostas a luz ultravioleta. Expostas (A,C,D) e controle (B,D,E). 171

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I	26
Tabela 1. Estudos realizados para avaliar o teor de ácidos graxos (%) em óleo de sementes de abóbora.	36
Tabela 2. Estudos realizados sobre determinação de teor de tocoferóis em óleo de semente de abóbora.	38
CAPITULO II	73
Tabela 1. Composição de ácidos graxos, carotenoides e tocoferóis, teor de clorofila, caracterização físico-química e capacidade antioxidante do óleo de três espécies de sementes de abóbora	102
Tabela 2. Teste de centrifugação de nanoemulsões baseadas em óleo de semente de abóbora durante armazenamento de 120 dias a 4 °C e 25 °C	119
CAPITULO III	133
Tabela 1. Características UV-vis de extrato saponificados de pétalas de marigold e extrato esterificado.	145
Tabela 2. Parâmetros cinéticos e coeficientes de determinação (R^2) para nanoemulsões com óleo de semente de abóbora (OSA) e soja (SO) carregadoras de luteína durante 15 dias de armazenamento a 4 °C e 45 °C.	152
Tabela 3. Parâmetros cinéticos e coeficientes de determinação (R^2) para nanoemulsões com óleo de semente de abóbora (OSA) e soja (SO) carregadoras de luteína durante 240 minutos de exposição a luz ultravioleta.	167

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1-Avaliação visual da formulação de nanoemulsões com três surfactantes por 15 dias.	186
ANEXO 2- Cromatogramas de HPLC de nanoemulsões de luteína no último dia de tratamento: Termo e foto –estabilidade.	187
ANEXO 3- Cromatogramas de HPLC de termoestabilidade de nanoemulsão de óleo de semente de abóbora carregadora de luteína armazenadas durante 15 dias de armazenamento.	189
ANEXO 4- Cromatogramas de HPLC de foto-estabilidade de nanoemulsão de óleo de semente de abóbora carregadora de luteína durante 240 minutos de exposição a luz UV.	191
ANEXO 5-Teor de carotenoides de nanoemulsões com óleo de semente de abóbora (OSA) e soja (SO) carregadoras de luteína.	191
ANEXO 6-Characterização física das nanoemulsões: diâmetro da gota (DH), índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta (PZ) de nanoemulsões com óleo de semente de abóbora (OSA) e soja (SO) carregadoras de luteína	192
ANEXO 7-Parametros de cor de nanoemulsões de nanoemulsões com óleo de semente de abóbora (OSA) e soja (SO) carregadoras de luteína	194
ANEXO 8-Imagens	195

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOAC	AOAC Internacional (Asociación de Químicos Analíticos Oficiales)
AAPH	2,2-azobis (2-amidino-propano) dicloridrato
AEP	Ácido eicosapentaenóico
AGMI	Ácido graxo monoinsaturado
AGPI	Ácido graxo poli-insaturado
AGS	Ácido graxo saturado
APD	Ácido docosapentaenóico
A/O	Água em Óleo
β -car	β -caroteno
BHA	Butil hidroxianisol
BHT	Butil hidroxitolueno
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DAD	Detector de arranjo de diodos
DH	Diâmetro hidrodinâmico
DMPA	4-(dimetilamino)-piridina
CF	Clorofila
CT	Carotenoides totais
DPPH	2,2- difenil-1-picril-hidrazila
Ea	Energia de ativação
EE	Eficiência de encapsulamento
ERP	Espectroscopia de ressonância paramagnética
FAME	Fatty Acid Methyl Ester Standards,
FAO	Food and Agriculture Organization (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura)
AG	Ácidos graxos
FL	Detector de fluorescência
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power (Poder antioxidante redutor do ferro)
HPLC	High performance liquid chromatography
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IPD	Índice de polidispersão
K	Constantes de taxa de reação

Luz UV	Luz ultravioleta
LT	Luteína;
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MTBE	Éter metil terc-butílico
Nanomax	Nanoemulsão de óleo de semente de <i>Cucurbita máxima</i>
Nanomosc	Nanoemulsão de óleo de semente de <i>Cucurbita moschata</i> jacarezinho
Nanopepo	Nanoemulsão com óleo de semente de <i>Cucurbita pepo</i>
O/A	Óleo em Água
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity (Capacidade de absorção do radical de oxigênio)
EO	Estabilidade oxidativa
PIT	Métodos de temperatura de inversão de fase
PE	<i>Phycoerythrin</i>
Potencial ζ	Potencial zeta
OSA	Óleo de semente de abóbora
OSANES	Nanoemulsão de óleo de semente de abóbora com éster de luteína
OSALU	Nanoemulsão de óleo de semente de abóbora com luteína livre
p-V	p-anisidina
SONES	Nanoemulsão de óleo de soja com éster de luteína
SONLU	Nanoemulsão de óleo de soja com luteína livre
TI	Tempo de indução
TPTZ	TPTZ (2,4,6-Tri (2-piridil) -s-triazina)
TOTOX	Valor de oxidação total
TT	Tocoferóis totais
VA	Valor de acidez;
VI	Valor de iodo
VP	Valor de peróxido
VS	Valor de saponificação
γ -T	γ -tocoferol;
δ -T	δ -tocoferol.
α -T	α -tocoferol

SUMARIO

LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE ANEXOS	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xviii
SUMARIO	xx
CAPÍTULO I	26
1. INTRODUÇÃO GERAL	27
2. HIPÓTESE DA PESQUISA	30
3. OBJETIVOS	30
3.1. Objetivo geral	30
3.2. Objetivos específicos	30
4. REVISÃO	31
4.1. Nanoemulsões	31
4.1.1. <i>Composições das nanoemulsões.</i>	32
4.1.2. <i>Método de homogeneização</i>	34
4.1.3. <i>Características das partículas</i>	37
4.2. Nanoemulsões transportadoras de carotenoides	38
4.3. Carotenoides	40
4.3.1. <i>Luteína</i>	42
4.3.2. <i>Ésteres de carotenoides</i>	44
4.4. Abóbora	49
4.5. Sementes de abóbora	52
4.6. Óleo de semente de abóbora (OSA)	53
4.6.1. <i>Ácidos graxos</i>	54
4.6.2. <i>Tocoferóis</i>	37
4.6.3. <i>Carotenoides</i>	39
4.6.4. <i>Atividade antioxidante</i>	40
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
CAPITULO II	73
1. INTRODUÇÃO	75
2. MATERIAIS E MÉTODOS	76
2.1. Químicos e materiais	76

2.2. Amostras	77
2.3. Extração de óleo	77
2.4. Caracterização química do OSA	77
2.4.1. <i>Composição de ácidos graxos (AG) por GC-MS</i>	77
2.4.2. <i>Extração e análise de carotenoides por HPLC-DAD</i>	78
2.4.3. <i>Composição de tocoferol por HPLC-FL</i>	79
2.4.4. <i>Conteúdo de clorofila</i>	79
2.5. Caracterização físico-química e parâmetros de qualidade do OSA	80
2.6. Capacidade antioxidante	80
2.7. Formulação e preparação das nanoemulsões	81
2.8. Caracterização das nanoemulsões de OSA	83
2.8.1. <i>Medições de tamanho de partícula</i>	83
2.8.2. <i>Medição de pH</i>	83
2.8.3. <i>Microscopia eletrônica de transmissão de emissão de campo (FE-TEM)</i>	83
2.9. Ensaio de estabilidade física	83
2.9.1. <i>Determinação da estabilidade das nanoemulsões OSA durante o armazenamento</i>	83
2.9.2. <i>Estabilidade das nanoemulsões OSA sob ciclos de aquecimento-resfriamento</i>	84
2.9.3. <i>Estabilidade das nanoemulsões de OSA em diferentes condições de pH</i>	84
2.10. Análises estatísticas	84
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
3.1. Caracterização química do óleo de semente de abóbora (OSA)	85
3.1.1. <i>Composição de ácidos graxos</i>	85
3.1.2. <i>Composição de carotenoides</i>	104
3.1.3. <i>Composição do tocoferol</i>	104
3.1.4. <i>Teor de clorofila</i>	104
3.1.5. <i>Parâmetros de qualidade do OSA</i>	105
3.2. Capacidade antioxidante	107
3.3. Relação entre a composição química do OSA, parâmetros de qualidade e capacidade antioxidante por Análise de Componentes Principais - PCA	109
3.4. Caracterização da nanoemulsão OSA	113
3.5. Estabilidade física	116

3.5.1. <i>Estabilidade durante o armazenamento a longo prazo sob diferentes temperaturas</i>	116
3.5.2. <i>Estabilidade de nanoemulsões OSA sob ciclos de aquecimento-resfriamento</i>	120
3.5.3. <i>Estabilidade sob diferentes pH</i>	122
4. CONCLUSÕES	122
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124
CAPITULO III	133
1. INTRODUÇÃO	135
2. MATERIAL E MÉTODOS	137
2.1. Químicos e materiais	137
2.2. Obtenção de luteína de flores de marigold	137
2.3. Síntese de éster de luteína	138
2.4. Formulação das nanoemulsões	138
2.5. Estudo de estabilidade	139
2.5.1. <i>Termo-estabilidade</i>	139
2.5.2. <i>Foto-estabilidade</i>	140
2.6. Caracterização química	140
2.6.1. <i>Extração de carotenoides da emulsão</i>	140
2.6.2. <i>Separação, identificação e quantificação de carotenoides por HPLC-DAD</i>	140
2.6.3. <i>Eficiência de encapsulamento (EE)</i>	141
2.6.4. <i>Modelagem cinética</i>	142
2.6.5. <i>Avaliação de cor das nanoemulsões</i>	143
2.7. Caracterização física	143
2.8. Análises estatísticas	143
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	144
3.1. Síntese química de um diéster de luteína	144
3.2. Caracterização das nanoemulsões	147
3.3. Impacto da temperatura na estabilidade química e física de nanoemulsões enriquecidas com luteína	149
3.3.1. <i>Degradação da luteína livre e do éster de luteína das nanoemulsões</i>	149
3.3.2. <i>Efeito da temperatura na cor das nanoemulsões</i>	156

3.3.3. <i>Efeito da temperatura na estabilidade física das nanoemulsões</i>	162
3.4. Impacto da luz UV na estabilidade química e física de nanoemulsões enriquecidas com luteína	165
3.4.1. <i>Degradação da luteína livre e do éster de luteína das nanoemulsões</i>	165
3.4.2. <i>Impacto da Luz UV na estabilidade física das nanoemulsões</i>	170
4. CONCLUSÕES	172
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	172
CONCLUSÕES GERAIS E CONSIDERAÇÕES FINAIS	184
ANEXOS	186
APÊNDICE	196

ESTRUTURA DA TESE

Esta tese está estruturada como descrito a seguir: o **capítulo 1** é composto por introdução geral, hipóteses, objetivos e revisão bibliográfica com o fim de contextualizar os tópicos avaliados durante a pesquisa. No **capítulo 2**, serão apresentadas a caracterização físico-química das três espécies de semente de abóbora (*Cucurbita máxima*, *C. pepo* e *C. moschata* jacarezinho), e o desenvolvimento de suas respectivas nanoemulsões pelo método de baixa energia (Método de inversão de fase de temperatura). Neste capítulo também será mostrada a estabilidade física das nanoemulsões em diferentes condições experimentais durante um armazenamento de longo prazo (120 dias). Este capítulo está conformado por uma introdução, material e métodos, resultados e discussão e conclusões. Será apresentado o formato de um artigo original, intitulado “Physicochemical characterization and emulsification of seed oils from three pumpkin species in nanostructured systems with focus on their physical stability” publicado no periódico “Food Chemistry”. O **capítulo 3**, apresenta-se o desenvolvimento de nanoemulsões de óleo semente de abóbora (*C. moschata* jacarezinho) e nanoemulsões com óleo de soja transportadoras de luteína livre e esterificada. Foi avaliada sua termo e foto estabilidades com relação a seus parâmetros físicos e químicos. Este capítulo está composto por introdução, material e métodos, resultados e discussão e conclusões. E finalmente, serão apresentados: conclusões gerais e considerações finais.

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO GERAL

A tendência do consumidor pela procura de alimentos mais saudáveis e seu interesse na ingestão de alimentos funcionais vêm crescendo continuamente. Os alimentos funcionais, além das suas funções nutritivas, são capazes de reduzir o risco de algumas doenças e auxiliar em funções fisiológicas do organismo (STARK; MADAR, 1994; PINTO; PAIVA, 2010).

O óleo de semente de abóbora (OSA) é uma rica fonte de compostos bioativos naturais como triterpenos, fitoesteróis, tocoferóis, ácidos graxos poli-insaturados e carotenoides (DURANTE et al., 2014). Estudos confirmam que o OSA apresenta grande conteúdo de alfa e delta tocoferol, sabendo-se que o α -tocoferol apresenta maior atividade como vitamina E, e exibe fortes níveis de atividade antioxidante. Adicionalmente, o OSA contém carotenoides como antioxidantes lipofílicos (FRUHWIRTH et al., 2003; NEDERAL et al., 2012; POTOČNIK et al., 2018; LOZADA et al., 2020). Estudos relatam que sua composição físico-química depende de vários fatores como tipo de espécie, condições de produção, extração e clima (AKIN et al., 2018).

Embora se conheçam as propriedades nutritivas e os benefícios do óleo de semente de abóbora, ele não é muito consumido em comparação com os demais óleos como de milho, de soja ou de coco, pois o aroma muda rapidamente durante o aquecimento, gerando odores de óleo queimado (MURKOVIC, 2009). Por ser um composto hidrofóbico com baixa hidrossolubilidade, sua incorporação em alimentos à base de água é dificultada (POTTEL et al., 2014). Sendo propenso à degradação química devido à oxidação lipídica, o que reduz sua qualidade pela produção de sabores indesejáveis (COUPLAND; MCCLEMENTS, 1996).

Na procura de superar esses desafios, existe uma necessidade de desenvolver sistemas de fornecimento eficazes que incorporem OSA rico em bioativos em diferentes produtos alimentícios funcionais (MCCLEMENTS, 2010), tornando-se uma alternativa para sistemas de entrega de grau alimentício baseados em nanoemulsões (MCCLEMENTS; DECKER; PARK, 2009). Estes sistemas não são apenas alternativas interessantes para fornecer compostos bioativos de óleos comestíveis, mas também fornecem uma proteção contra oxidação aos compostos do óleo, permitindo uma melhor estabilidade química e sendo útil no mascaramento de sabor.

Por outra parte, os óleos nanoemulsionados podem também ser usados para aprisionar e transportar compostos bioativos de outras fontes como vitaminas, minerais, antioxidantes e carotenoides (RAO et al., 2013; OZTURK et al., 2015).

Os carotenoides são compostos isoprenoides lipofílicos responsáveis pela cor amarela e vermelha em flores, frutas, vegetais, micro-organismos e em alguns animais (BOON et al., 2010; KHALID et al., 2019). Dentre deles, encontra-se a luteína, uma xantofila que possui dois grupos hidroxila nas duas extremidades de suas moléculas que lhes conferem propriedades hidrofílicas (RIBAYA-MERCADO; BLUMBERG, 2004; BRITTON, 2008). Ela não pode ser sintetizada pelo nosso corpo e precisa ser ingerida, dada a sua importância na saúde como protetor ocular e sua atividade antioxidante (ALVES-RODRIGUES; SHAO, 2004).

A fortificação de alimentos com luteína é uma alternativa para a incorporação deste nutriente em nossa dieta. Os produtos de luteína podem ser baseados em luteína livre ou em ésteres de luteína. A esterificação é uma ferramenta útil para derivatização dos carotenoides. As razões para a síntese de ésteres são bastante amplas. Vários estudos sobre o éster se relacionam com sua maior estabilidade do carotenoide nativo, que pode ser vantajoso ou desvantajoso, dependendo do uso desses derivados em alimentos ou produtos farmacêuticos (WEIGEL et al., 2017; NAGY et al., 2019). Estudos realizados Yang et al. (2015) demonstraram maior termo estabilidade (cocção) dos diésteres de astaxantina em comparação com a astaxantina livre em camarões brancos do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*). Subagio, Wakaki e Morita, (1999) extraíram luteína de flores de Marigold, produzindo a luteína livre e seus ésteres e demonstraram que o extrato de ésteres de luteína foi mais estável quando expostos a alta temperatura (60 °C por 96h) e luz UV (10 °C por 3 dias).

Embora sejam conhecidos os benefícios da esterificação de carotenoides com relação a sua estabilidade comparada com suas xantofilas livres em matrizes alimentares específicas ou extratos puros, não existe um estudo que avalie nanoemulsões de luteína na sua forma livre e seus ésteres obtidos a partir de uma síntese orgânica. Além disso, a maioria de sistemas nanoemulsionados carregadores de carotenoides são com base de óleos de soja, ou triglicerídeos de cadeia longa ou curta (QUIAN et al., 2005) mas não existem matrizes alimentares deste tipo com OSA.

Com relação aos OSA, como foi mencionado anteriormente, sua composição pode mudar entre as espécies, sendo importante sua caracterização físico-química. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo primeiramente caracterizar físico-quimicamente o óleo de três espécies de OSA produzidas no Brasil e desenvolver nanoemulsões a partir destes óleos com foco na sua estabilidade física. Além disso, foram desenvolvidas nanoemulsões de OSA e soja carregadoras de luteína em sua forma livre e esterificada, avaliando sua estabilidade físico-química em condições adversas de luz ultravioleta e temperatura. Estes estudos nos ajudaram a compreender os mecanismos de degradação dos carotenoides e conhecer o potencial de óleos pouco explorados no desenvolvimento de nanoemulsões carregadoras de carotenoides, para assim aprimorar o desenvolvimento de tecnologias para a incorporação desses compostos em alimentos funcionais.

2. HIPÓTESE DA PESQUISA

Os óleos de semente de abóbora - OSA de *Cucurbita máxima*, *C. pepo* e *C. moschata* jacarezinho apresentam características físico-químicas diferentes. Os OSA podem ser aplicados no desenvolvimento de nanoemulsões pelos métodos de baixa e alta energia. Os ésteres de luteína são mais estáveis que a luteína livre em nanoemulsões de OSA, em condições de altas temperaturas (45 °C) e sob exposição a luz ultravioleta.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Desenvolver sistemas de nanoemulsões com óleo de semente de abóbora - OSA

3.2. Objetivos específicos

Caracterizar físico-quimicamente três espécies de OSA: *Cucurbita pepo*, *C. moschata* jacarezinho e *C. máxima*.

Determinar a atividade antioxidante dos OSA de *Cucurbita pepo*, *C. moschata* jacarezinho e *C. máxima*.

Avaliar a estabilidade física das nanoemulsões de OSA *Cucurbita pepo*, *C. moschata* jacarezinho e *C. máxima* em diferentes temperaturas e dias de armazenamento.

Sintetizar um diéster de luteína a partir das flores *Tagetes* spp.

Desenvolver nanoemulsões de OSA carregadoras de luteína livre e luteína esterificada.

Avaliar a termoestabilidade e foto-estabilidade das nanoemulsões de OSA carregadora de luteína.

4. REVISÃO

4.1. Nanoemulsões

As nanoemulsões consistem em pequenas gotículas com uma faixa de tamanho entre 50 e 200 nm (JAISWAL et al., 2015). As nanoemulsões (Figura 1) consistem em uma fase dispersa em outra fase contínua, onde cada gota do disperso é envolvida por uma fina camada interfacial composta por moléculas emulsificantes (TADROS et al. 2004; MCCLEMENTS, 2007; ACOSTA, 2009). As nanoemulsões podem ser classificadas de acordo com a organização espacial das fases de óleo e de água. As nanoemulsões óleo em água (O/A) consistem em gotículas de óleo dispersas na fase aquosa. Quando o óleo é a fase contínua com gotículas de água dispersas tem-se a nanoemulsão de água em óleo (A/O) (MCCLEMENTS; RAO, 2011). O desenvolvimento de nanoemulsões permite a entrega de substâncias lipofílicas, já que podem atuar como transportadores de óleos, como medicamentos, vitaminas, antioxidantes e agentes antimicrobianos. O pequeno tamanho de gotícula permite entrega eficiente, liberação prolongada e absorção rápida de agentes bioativos hidrofóbicos e agentes alimentares, como carotenoides ou vitaminas (TAN; NAKAJIMA, 2005; MCCLEMENTS; RAO, 2011)

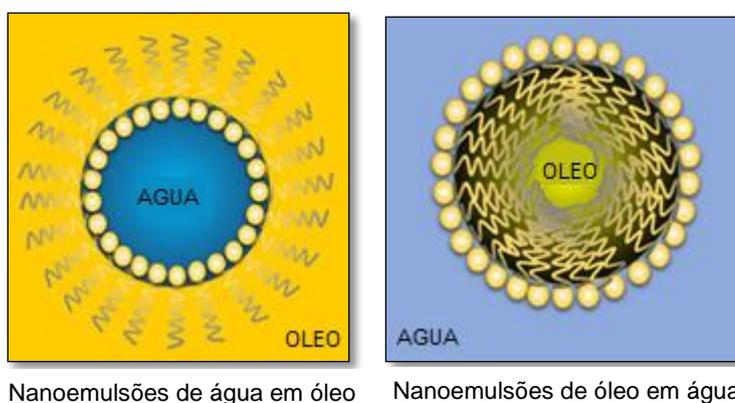


Figura 1. Esquema de uma nanoemulsão formulada com óleo, água e estabilizante (tensoativos). Fonte: Adaptado de Che Marzuki; Wahab; Abdul Hamid, (2009).

São sistemas metaestáveis, cuja estrutura depende do processo usado para prepará-los. São considerados sistemas transparentes ou translúcidos e que podem ser incorporadas como ingredientes de bebidas e géis alimentares, nutraceuticos e preparações farmacêuticas sem perda de clareza (JAFARI; HE; BHANDARI, 2006;

TARVER, 2006; CHU et al., 2007; SARI et al., 2015). A nanoemulsificação de produtos alimentícios permite potencializar o uso de compostos ativos visando ao direcionamento do produto isolado, aumentando sua estabilidade, protegendo o produto interno do ambiente externo de fatores ambientais como pH, luz, oxigênio, mascarar de compostos de sabor indesejável, retardando alterações que podem resultar em perda de aroma, alteração de cor ou perda do valor nutricional, também permite a liberação diretamente no organismo (MODARRES-GHEISARI et al., 2019). Esta tecnologia permite desenvolver novos alimentos, os quais permaneceram inertes no corpo até liberarem seus nutrientes para as células, quando fosse necessário.

4.1.1. Composições das nanoemulsões.

Diversos componentes estão envolvidos na composição de uma nanoemulsão: fase oleosa, fase aquosa e estabilizadores.

- *Fase oleosa.* Formada a partir de compostos apolares como qualquer tipo de óleo, incluindo triacilgliceróis de cadeia longa ou curta, ácidos graxos livres, óleos aromatizantes, óleos essenciais, óleos minerais, substitutos de gordura e vitaminas solúveis em óleo (MCCLEMENTS; RAO, 2011). Na indústria de alimentos, muitas vezes é desejável preparar nanoemulsões usando óleos de triacilglicerol devido ao seu baixo custo, abundância e atributos funcionais ou nutricionais, como os óleos de milho, soja, girassol, oliva, linhaça, algas ou óleos de peixe. Geralmente, o tipo de óleo usado na formulação da nanoemulsão determina o composto bioativo disponível como ácidos graxos ou vitaminas (DAS et al, 2005). O tipo de óleo também pode afetar o desenvolvimento e a estabilidade da emulsão dada as características físico-químicas da fase oleosa como polaridade, viscosidade, solubilidade em água, índice de refração, viscosidade, densidade e estabilidade química (TADROS et al., 2004; MCCLEMENTS, 2005; WOOSTER et al., 2008).

- *Fase aquosa.* A fase aquosa utilizada para preparar uma nanoemulsão que consiste geralmente em água ou soluções tampão, mas também pode conter outros componentes como proteínas, minerais, ácidos e bases, para evitar o crescimento de micro-organismos como bactérias ou fungos durante o armazenamento. A fase aquosa determina propriedades da emulsão como polaridade,

pH e força iônica, que por sua vez afetará a formação, a estabilidade físico-química da nanoemulsão (MCCLEMENTS; RAO, 2011; DAS et al., 2020).

- *Estabilizantes.* Os surfactantes, também conhecidos por tensoativos ou emulsificantes, são moléculas anfifílicas que estabilizam nanoemulsões, reduzindo a tensão interfacial e impedindo a agregação de gotículas. Se não fosse utilizado surfactante para o preparo de uma nanoemulsão, o sistema normalmente iria se decompor rapidamente por mecanismos diferentes, como: floculação de gotículas, coalescência, maturação de Ostwald e separação gravitacional (MCCLEMENTS, 2010; MCCLEMENTS; RAO, 2011). Deste modo, é muitas vezes necessário em misturas adicionar vários tipos de surfactantes para melhorar a estabilidade das nanoemulsões a longo prazo. Se o surfactante principal é solúvel em água, a formação de um sistema de O/A é favorecida, e o inverso ocorre se o surfactante for solúvel em óleo. A seleção adequada do surfactante, além de influenciar o tamanho das partículas e a estabilidade da nanoemulsão, também define sua toxicidade, farmacocinética e farmacodinâmica (MCCLEMENTS, 2007). Na indústria de alimentos são utilizados surfactantes de fosfolipídios, proteínas e polissacarídeos (BAI et al., 2016). Neste sentido, as proteínas são uma mistura de aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos sendo consideradas tensoativas. Durante o processo de homogeneização elas podem absorver as interfaces de óleo-água e revestir a cada gotícula de óleo. Ademais, podem evitar a agregação delas nas nanoemulsões porque possuem aminoácidos ácidos que apresentam cargas negativas ($-\text{COO}^-$) ou positivas ($-\text{NH}_3^+$) (OZTURK; MCCLEMENTS, 2016). Algumas das proteínas estudadas são: proteína de soro de leite (ADJONU et al., 2014) e proteína de ervilha (DONSÌ et al., 2010). Estudos realizados por Gumus, Decker e McClements, (2017) demonstraram que gotículas de óleo revestidas de proteína de lentilha foram as mais estáveis a estresses ambientais, como pH, força iônica e mudanças de temperatura comparadas com proteínas de feijão. Outros tipos de estabilizantes usados na indústria de alimentos são as saponinas que podem ser extraídas de várias fontes naturais e são consideradas pequenas moléculas anfifílicas solúveis em água que podem ser isolados especialmente da árvore de *Quillaja saponária*. Sua atividade surfactante é devido ao fato de conterem grupos de açúcar hidrofílicos ligados a grupos não polares

da aglicona. Recentemente, um ingrediente de qualidade alimentar (Q-Naturale) extraído desta árvore tornou-se comercialmente disponível (OZTURK E MCCLEMENTS, 2016). Os fosfolipídios também são comumente usados na indústria de alimentos, sendo moléculas anfifílicas naturais encontradas nas membranas celulares de espécies animais, vegetais e microbianas. Dentre deles, encontram-se a lecitina extraída de soja, gema de ovo, leite ou grãos de girassol (FLORES-ANDRADE et al., 2020).

4.1.2. Método de homogeneização

As nanoemulsões podem ser preparadas em um processo de duas etapas. Primeiramente, é preparada uma macroemulsão ou uma emulsão grosseira, que depois será convertida em nanoemulsão em uma segunda etapa (GRUPTA et al., 2016). A formação de nanoemulsões pode-se levar a cabo por diferentes métodos, categorizados em alta energia ou baixa energia ou uma combinação deles.

- *Métodos de baixa energia.* Os métodos de baixa energia não necessitam de equipamentos especializados para a produção de nanoemulsões e não precisam de altas quantidades de energia. Este método pode ser recomendado para encapsular compostos sensíveis ao calor e se caracteriza pela utilização da energia armazenada no sistema para produzir gotículas ultrafinas. Às vezes, podem ser limitados pelo tipo de óleo e emulsificantes usados (ANTON; VANDAMME, 2009; KOMAIKO; MCCLEMENTS, 2016).

Os métodos de baixa energia podem ser classificados como métodos térmicos ou isotérmicos. Os métodos térmicos dependem da formação de emulsões devido a mudanças nas propriedades do surfactante com a temperatura, enquanto os métodos isotérmicos formam emulsões devido a mudanças na composição do sistema local a uma temperatura fixa. Neste sentido, os métodos de emulsificação espontânea e inversão de fase de emulsão se enquadram na segunda categoria enquanto o método de temperatura de inversão de fase é um exemplo de método térmico (SABERI et al., 2013).

Método de inversão de fase. Este método envolve a adição de uma fase aquosa a uma fase orgânica agitada (óleo mais surfactante). Neste método, primeiramente

uma macroemulsão A/O é preparada à temperatura ambiente e é então diluída lentamente com água. Durante essa diluição, o sistema passa por um ponto de inversão onde ocorre a transformação da emulsão A/O para emulsão O/A. Nesse ponto de inversão, a tensão interfacial da interface óleo-água é muito baixa levando a formação de pequenas gotas (diâmetro menor a 200 nm) sem utilização de uma grande quantidade energia (Figura 2) (FORGIARINI, 2001).

Métodos de temperatura de inversão de fase. Primeiramente o surfactante, o óleo e a água são agitados à temperatura ambiente para formar uma emulsão grosseira. Em seguida, a mistura SOA (surfactante-óleo-água) é lentamente aquecida até ao redor ou acima da temperatura de inversão (específica para cada formulação utilizada). Finalmente, a solução é rapidamente resfriada ou diluída em água fria sempre com agitação contínua, o que resulta na formação de uma nanoemulsão O/A (Figura 2) (MCCLEMENTES; RAO, 2011; KOMAIKO; MCCLEMENTS, 2016).

A formação destas nanoemulsões pode estar relacionada com as alterações nas características estruturais e físico-químicas dos surfactantes durante o aquecimento. Por exemplo, a mudança de temperatura de baixa para alta leva à abertura e reversão da estrutura interfacial, levando a inversão de fase. Quando isso é seguido por um rápido resfriamento, a estrutura interfacial fecha novamente, prendendo o óleo ou a água. Neste processo as gotículas nascentes permanecem estáveis por um período considerável de tempo devido à cobertura de surfactantes (KOMAIKO E MCCLEMENTS, 2016).

Emulsificação espontânea. Este método ocorre quando dois líquidos imiscíveis são colocados em contato e emulsionam sem qualquer ajuda externa (térmica ou mecânica). O procedimento envolve a preparação de duas fases, primeiramente é preparada uma fase orgânica homogênea consistindo em óleo mais surfactante lipofílico em um solvente miscível na fase aquosa composta por água e surfactante hidrofílico. A fase orgânica é injetada em fase aquosa sob agitação magnética contínua, é formada a emulsão e o solvente é removido por evaporação sob pressão reduzida (TADROS et al. 2004; SOLANS et al. 2005).

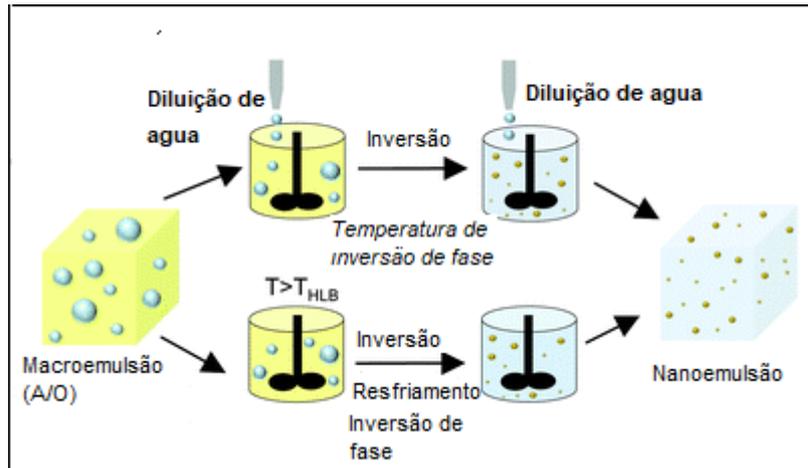


Figura 2. Métodos de baixa energia para obtenção de nanoemulsões do tipo óleo em água (O/A). Fonte: Grupta et al. (2016).

- *Métodos de alta energia.* Este método permite formar nanoemulsões com qualquer tipo de óleo. Depende de equipamentos mecânicos capazes de gerar uma grande força para redução de tamanho. Como mostra a Figura 3, o primeiro passo na preparação de uma nanoemulsão usando este método é preparar uma macroemulsão, que geralmente é realizada misturando óleo, água e surfactante em um sistema simples com uso de um agitador por um período de tempo e velocidade suficiente. Na segunda etapa, a macroemulsão é convertida em nanoemulsão. Nesta última etapa é utilizado um homogeneizador, com uma bomba de alta pressão que empurra a macroemulsão através de uma folga, onde as gotículas grandes quebram em gotículas menores à medida que são submetidas a extrema tensão de alongamento e cisalhamento. Este processo de homogeneização pode ser repetido várias vezes (vários ciclos) até que o tamanho da gota (diâmetro da gota menor a 200 nm) se torne adequado e constante (FLOURY et al., 2004; GRUPTA et al., 2016).

Um das suas principais desvantagens é o uso de altas temperaturas que podem afetar algum composto termossensível, além do uso de equipamentos de maior porte. Existem vários processos para emulsificação de alta energia, usando equipamentos como homogeneizadores de alta pressão como ultrassom e microfluidizador.

Microfluidizador. Este equipamento utiliza concomitantemente cisalhamento hidráulico, impacto, turbulência e cavitação, para reduzir o tamanho das gotículas com uma bomba de alta pressão. Dois fluidos imiscíveis (óleo e água) fluem através dos microcanais sob alta pressão de até 50.000 psi, combinados e processados em um homogeneizador em linha para criar uma emulsão grossa (macroemulsão). O tamanho das gotículas é reduzido pelas forças de alto cisalhamento e cavitação, mais ainda por colisões em alta velocidade com outras gotículas, que é a principal força da microfluidização. As desvantagens mais conhecidas são os altos custos de fabricação, canais entupidos por partículas sólidas e o longo tempo de emulsificação (HÖRMANN; ZIMMER, 2016).

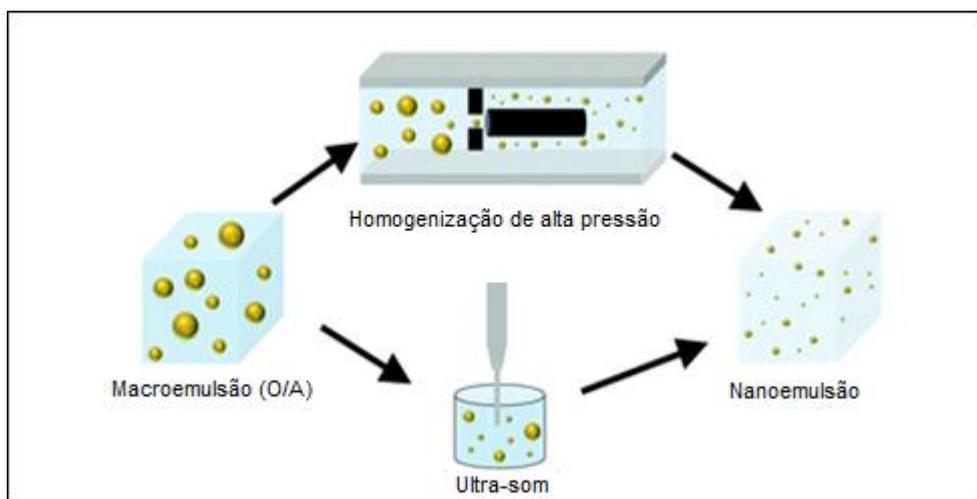


Figura 3. Métodos de alta energia para obtenção de nanoemulsões do tipo óleo em água (O/A). Fonte. Grupta et al. (2016).

4.1.3. Características das partículas

As partículas das nanoemulsões podem ser caracterizadas fisicamente com base no seu tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta, propriedades determinantes na estabilidade das nanoemulsões.

- *Tamanho de partícula.* As análises do tamanho das partículas são realizadas utilizando espectroscopia de correlação de fótons usando o equipamento da marca Malvern Zetasizer, que monitora a variação na dispersão da luz devido ao

movimento browniano das partículas em função do tempo (MCCLEMENTES, 2010; GURPREET; SINGH, 2018). O tamanho pode ser expresso em raio ou diâmetro. Estas análises também podem ser realizadas por microscopia eletrônica de transmissão (ALKA et al. 2007; FARHAN et al. 2008).

- *Distribuição de tamanho de partícula.* A distribuição de tamanho de partícula de uma emulsão representa a fração de partículas dentro de diferentes classes de tamanho (MCCLEMENTS, 2005). A distribuição de tamanho de partícula geralmente é mensurada com o índice de polidispersão que pode variar de 0 a 1, onde 0 (zero) significa sistema monodisperso e 1 para dispersão de partículas polidispersas (BABOOTA et al., 2007).

- *Carga de partículas.* As partículas das emulsões costumam apresentar uma carga elétrica, que desempenha um papel importante em seu desempenho funcional e estabilidade. O potencial zeta é influenciado diversos fatores como força iônica, concentração de aditivos e temperatura, mas especialmente pelo pH do meio. O potencial zeta é o potencial entre a superfície da gota e o meio líquido dispersante e pode ser usado para estimar a carga superficial das gotas no meio de dispersão, é frequentemente usado como um indicador da estabilidade das gotículas, representa a carga superficial das nanopartículas e reflete sua estabilidade a longo prazo, em que valores mais positivos que +30 mV e mais negativos que -30 mV indicam boa estabilidade contra a coalescência (HUNTER 1986; TEO et al., 2015). Emulsões com alto potencial zeta (negativo ou positivo) são eletricamente estabilizadas, enquanto emulsões com baixo potencial zeta tendem a coagular ou flocular, possivelmente levando a uma baixa estabilidade física. Em geral, quando o potencial zeta de uma emulsão é alto, as forças repulsivas excedem as forças atrativas, resultando em um sistema relativamente estável (MCCLEMENTS, 2005; LU; GAO, 2010)

4.2. Nanoemulsões transportadoras de carotenoides

Os benefícios para a saúde dos carotenoides são diversos como ação antioxidante e de pró-vitamina A. Ademais, podem aumentar a resposta imunológica

levando a prevenção de muitas doenças crônicas (MONEGO; DA ROSA; DO NASCIMENTO, 2017; KAULMANN; BOHN, 2014). Sua aplicação na indústria alimentícia e farmacêutica é limitada pela sua pouca solubilidade em água, alto ponto de fusão e baixa estabilidade química em diversos processamentos ou ambientes não adequados como altas temperaturas ou exposição a luz (DOS SANTOS et al., 2018). Neste sentido, o desenvolvimento de nanoemulsões tem se tornado um método eficiente para o transporte destes compostos, melhorando a estabilidade e a liberação efetiva de carotenoides (AFFANDI; JULIANTO; MAJEED, 2011). Estes sistemas de entrega, por apresentar partículas com tamanho nanométrico, ajudam a aumentar a solubilidade, melhorando a disponibilidade e as características sensoriais (REHMA et al., 2020).

Numerosos estudos demonstraram que as emulsões e nanoemulsões são sistemas de encapsulação eficazes para a luteína e outros carotenoides, convertendo-se em uma alternativa para a entrega e transporte destes compostos hidrofóbicos. Não há síntese de carotenoides no organismo humano, conseqüentemente há a necessidade de ingestão dessas substâncias. Assim, estes sistemas de entrega baseados em nanoemulsões de carotenoides podem transportar estas substâncias com atividade biológica tornando possível o aproveitamento de seus benefícios (SHANMUGAPRIYA; KIM; KANG, 2019).

A biodisponibilidade das nanoemulsões transportadoras de carotenoides depende do sistema de entrega, o tipo de óleo utilizado, tipo de armazenamento, de emulsificante e as condições ambientais como pH, força iônica e temperatura durante o processamento de alimentos, o que pode afetar consideravelmente a estabilidade da nanoemulsão enriquecida com carotenoides (QIAN et al., 2012; SUN et al., 2015). Diversos estudos fornecem informações úteis para facilitar o projeto de sistemas de entrega para encapsular e estabilizar carotenoides para aplicações em alimentos, bebidas e produtos farmacêuticos. Nanoemulsões transportadoras de β -caroteno demonstraram que a degradação do β -caroteno foi consideravelmente mais lenta nas nanoemulsões estabilizadas com β -lactoglobulina do que nas estabilizadas com Tween 20 (QIAN et al., 2012). As estabilidades física e química de nanoemulsões carregadoras de luteína com diversos tipos de emulsificante (Quillaja saponina, Tween 80, proteína do soro e caseína) e antioxidantes (EDTA, ácido ascórbico, catequina,

alfa tocoferol, palmitato de ácido ascórbico) foram estudadas e foi demonstrado que a saponina de *Quillaja* produziu emulsões com a melhor estabilidade geral para agregação de gotículas, creme e desbotamento da cor durante o armazenamento a 45 °C por dez dias. Ademais, surpreendentemente, a maioria dos antioxidantes promoveu a degradação da luteína (WEIGEL et al, 2018).

A natureza do óleo transportador usado para dispersar a luteína também pode afetar sua estabilidade e biodisponibilidade. Emulsões carregadas de luteína formuladas usando triglicerídeos de cadeia média como a fase oleosa foram mais estáveis com pequenas gotículas (diâmetro = 200 nm) e com uma distribuição de tamanho de partícula monomodal estreita (índice de polidispersão= 0,23) do que aquelas formadas usando triglicerídeos de cadeia longa (SURH; DECKER: MCCLEMENTS, 2017).

4.3. Carotenoides

Os carotenoides são responsáveis pela maioria de tons vermelho, laranja e amarelo das folhas, frutas e flores das plantas, bem como pelas cores de alguns pássaros, insetos, peixes e crustáceos. Somente plantas, bactérias, fungos e algas podem sintetizar carotenoides. Como os animais são incapazes de sintetizar carotenoides eles são obtidos por meio da dieta a partir dessas fontes (FRASER; BRAMLEY, 2004). Na indústria alimentar, eles são usados como corantes e antioxidantes naturais (BRAMLEY, 2003).

Os carotenoides são isoprenoides, geralmente derivados de uma estrutura basal de 40 carbonos. São caracterizados por apresentar uma cadeia de polieno, que pode se estender de 3 a 15 ligações duplas conjugadas. O comprimento do cromóforo determina o espectro de absorção da molécula e, portanto, é responsável pela sua cor (SAINI; NILE; PARK, 2015; BRITTON, 2008; WEEDON et al., 1995).

Devido ao isomerismo em torno das ligações duplas C=C, são possíveis diferentes configurações. Quando as ligações duplas estão localizadas em uma posição diferente na cadeia de carbono os isômeros posicionais ocorrem. Esta isomeria acontece quando os substituintes são arranjados de maneira diferente no espaço devido à rotação restrita de uma ligação dupla na molécula. Em princípio, cada

ligação dupla na cadeia de polieno de um carotenoide pode existir em duas formas ou configurações, designadas *trans* ou *cis*, quando os dois ligantes ligados a átomos separados conectados pela ligação dupla estão no mesmo lado de um plano, eles são considerados como estando localizados na posição *cis* entre si. Se eles estiverem em lados opostos, sua posição relativa é descrita como *trans* (Figura 4). Atualmente, para diversos produtos químicos, a configuração de uma ligação dupla é designada *E* ou *Z*. Nos carotenoides, *E* e *Z* são geralmente equivalentes a *trans* e *cis*, respectivamente (BRITTON, LIAAEN-JENSEN; PFANDER; 1995; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2019).

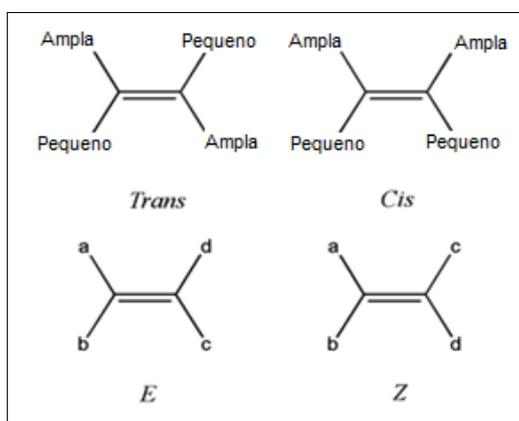


Figura 4. Nomenclatura *cis/trans* e *E/Z* para isômeros geométricos. Fonte: Meléndez-Martínez et al. (2019).

Os carotenoides podem ser classificados dependendo da sua estrutura química (Figura 5). Aqueles formados exclusivamente por átomos de carbono e hidrogênio são chamados de carotenos, enquanto os carotenoides contendo oxigênio são conhecidos como xantofilas (NAMITHA; NEGI,2010; MELÉNDEZ-MARTINEZ et al., 2019).

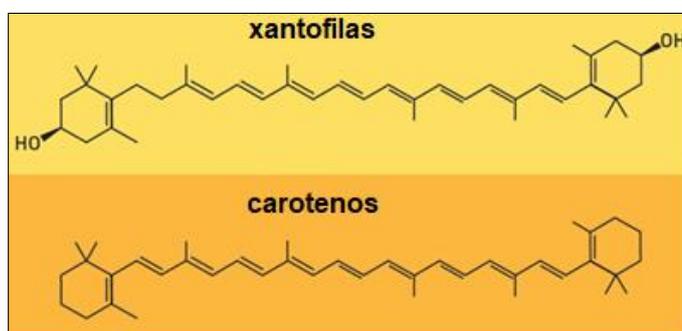


Figura 5. Estrutura química de xantofilas e carotenos. Fonte.Autor (2020).

4.3.1. Luteína

Dentro das xantofilas encontra-se a luteína, caracterizada por possuir em sua estrutura dois grupos hidroxila nas extremidades da molécula (Figura 6), os quais desempenham um papel crítico na sua função biológica (JOHNSON, 2002; ALVES-RODRIGUES; SHAO, 2004). A luteína pode existir em oito formas estereoisoméricas como resultado da presença de três estereocentros nos átomos de carbono de 3, 39 e 69. Além disso, o grupo hidroxila no carbono 39 da luteína é alílico (STRAUB, 1987; LANDRUM; BONE, 2001).

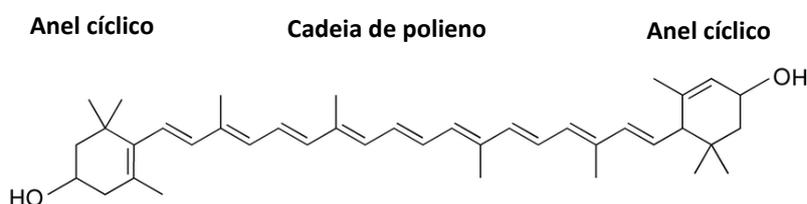


Figura 6. Estrutura química da luteína. Fonte. Adaptado de Arteni et al. (2015).

Sua intensa coloração é resultado da conjugação extensa na cadeia de polieno. As diferenças de cor dos carotenoides surgem das diferenças no número de ligações conjugadas. Os espectros de UV-visível de cada carotenoide (Figura 7) têm uma assinatura típica possuindo um máximo central flanqueado em comprimentos de onda mais longos por um máximo secundário e um ombro distinto em comprimentos de onda mais curtos. Essas transições são numeradas I, II e III de comprimento de onda curto para comprimento de onda longo (KLAUI; BAUERNFEIND, 1981; BRITTON, LIAAEN-JENSEN; PFANDER; 1995; LANDRUM; BONE, 2001). A luteína apresenta seu pico de absorção em 446 nm no espectro de luz visível, filtra a luz azul e protege as plantas, enquanto permite a passagem de outros comprimentos de onda de luz essenciais para a fotossíntese. Embora não seja abertamente evidente em vegetais com folhas verdes devido a um efeito de mascaramento da clorofila, a luteína cristalina purificada realmente emite uma cor amarelo-laranja (ALVES-RODRIGUES; SHAO, 2004).

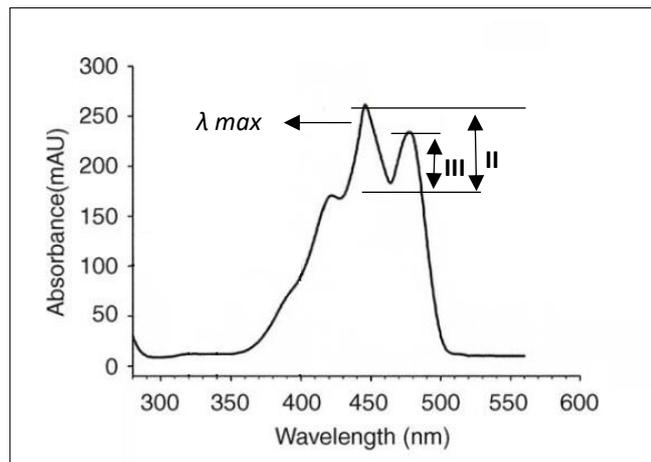


Figura 7. Espectro de absorção para luteína em 446 nm. Fonte: Adaptado de Alves-Rodrigues e Shao, (2003).

A luteína é o principal pigmento em vegetais verdes, como espinafre, couve de Bruxelas, brócolis e ervilha. A principal fonte de luteína são as flores de marigold (*Tagetes erecta* L) (Figura 8). As pétalas da marigold são ricas em luteína e ésteres de ácido graxo de luteína que, em geral, representam mais de 90% dos pigmentos identificados nesta planta. Geralmente, a luteína é encontrada quase completamente na forma de éster nas pétalas (BREITHAUPT; WIRT; BAMEDI, 2002). As contribuições deste carotenoide para a saúde são diversas. Principalmente, é encontrada na retina humana (BERNSTEIN et al., 2016), onde é concentrada na mácula junto com a zeaxantina, sendo conhecidas como pigmento macular. O pigmento macular absorve a luz azul (alta energia, luz de comprimento de onda curto), protegendo a retina de lesões fotoquímicas. Ademais, possui propriedades antioxidantes locais, com a capacidade de neutralizar o oxigênio singleto e espécies reativas de oxigênio (radicais hidroxis e superóxidos), de proteger contra a peroxidação induzida por UV, e de reduzir a formação de lipofuscina e o estresse oxidativo e seus danos associados (BARKER et al., 2011).



Figura 8. Flores de *Tagetes* spp. Fonte: Autor

A degeneração macular relacionada à idade é um problema crescente entre a população idosa em todo o mundo (WONG et al., 2014). Estudos demonstraram que a suplementação de luteína e zeaxantina pode melhorar o desempenho visual, aumentar a densidade ótica do pigmento macular, reduzindo a sensibilidade ao contraste e aumentando a tolerância ao brilho e a recuperação de foto-estresse, mesmo em pessoas saudáveis (KVANSAKUL et al., 2006; FEENEY et al., 2013; HAMMOND et al., 2014; NOLAN et al., 2016). Estudos controlados com placebo também sugerem que a suplementação com luteína ou luteína mais zeaxantina pode ter efeitos cognitivos benéficos. Além disso, existem evidências de que a luteína é importante para o desenvolvimento cognitivo e visual em bebês (HAMMOND, 2008; HENRIKSEN; CHAN, 2014). Sabe-se que a luteína junto com a zeaxantina são os principais carotenoides presentes no leite humano (JACKSON et al, 1998; BETTLER et al., 2010).

O estabelecimento de diretrizes dietéticas para a luteína encorajaria o consumo de alimentos ou suplementos contendo luteína e aumentaria a conscientização pública sobre os potenciais benefícios à saúde. No entanto, apesar das evidências que apoiam os benefícios para a saúde ocular, a maioria dos países não possui valores de referência na ingestão alimentar para a luteína, que é classificada inclusive como um nutriente não essencial (SEMBA; DAGNELIE, 2003; EGGERSDORFER; WYSS, 2018).

4.3.2. Ésteres de carotenoides

Xantofilas como a luteína e zeaxantina podem ser encontradas na natureza tanto na forma livre quanto acilada com ácidos graxos formando os conhecidos

ésteres de carotenoides. Os ésteres (R-COO-R') são classificados como compostos orgânicos oxigenados derivados de ácido carboxílico. São complexos de baixa polaridade e com ponto de ebulição menor do que os ácidos carboxílicos de peso molecular semelhante (FERREIRA, 2018). A esterificação pode ocorrer em uma ou em duas das hidroxilas das xantofilas, formando os monoésteres ou os diésteres dos carotenoides (Figura 9). Os diésteres de carotenoides podem ser classificados como homodiésteres quando o mesmo ácido graxo é acilado em ambos os grupos hidroxila ou heterodiésteres, quando diferentes os ácidos são acilados nos dois grupos hidroxila. Por exemplo, β -criptoxantina e zeinoxantina são carotenoides com apenas um grupo hidroxila na molécula, existindo apenas uma posição possível para acilação com diferentes ácidos graxos. São conhecidos como carotenoides mono-hidroxilados. Quando xantofilas com dois grupos hidroxila na sua molécula como a luteína podem formar mono ou diéster. Como ela pode ser esterificada por dois ácidos graxos diferentes pode levar a formação de dois monoésteres ou dois ésteres (MERCADANTE et al., 2017; MARIUTTI; MERCADANTE,2018).

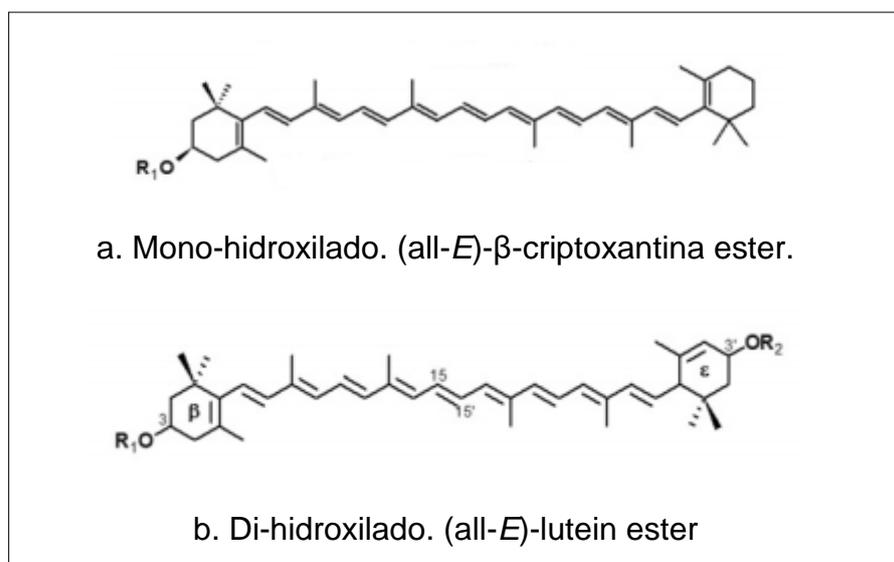


Figura 9. Estruturas químicas de ésteres de carotenoides. R1, R2: ácido graxo.
 Fonte: Adaptado Melendez-Martinez et a. (2019).

As sínteses de ésteres são muito utilizadas para aumentar a estabilidade do carotenoide nativo já que foi relatado que os ésteres de carotenoides são mais estáveis do que os carotenoides na sua forma livre (SCHWEIGGERT et al., 2007; MERTZ et al., 2010). Esta estabilidade aprimorada pode estar relacionada ao aumento

na lipossolubilidade em comparação com xantofilas livres, proporcionando uma melhor integração em estruturas de membrana, reduzindo, portanto, a suscetibilidade a condições adversas em seu ambiente (MINGUEZ-MOSQUERA; HORNERO-MÉNDEZ, 1994). A esterificação também altera as propriedades físico-químicas da molécula como seu tamanho, já que ao ser ligadas a outra molécula este parâmetro se vê afetado pelo aumento da molécula. Por outra parte, esta reação de acilação não modifica o cromóforo do carotenoide esterificado, desta forma seus espectros de cor e UV-visível serão bastante semelhantes aos de suas contrapartes livre. A esterificação também afeta a solubilidade, já que os ésteres de xantofilas se tornam mais lipofílicos que seus correspondentes livres (MELÉNDEZ-MARTINEZ et al., 2019).

Para a identificação de ésteres de xantofila, é necessário o mínimo das informações combinadas fornecidas pela ordem de eluição cromatográfica, características dos espectros UV-vis (comprimento de onda de absorção máxima (máx), estrutura fina espectral (% III/II) e pico de *cis* intensidade (% AB/All) e características do espectro de massa (RODRIGUES et al., 2016; MERCADANTE et al., 2017; RODRIGUES et al., 2018). Levando em consideração a importância química do éster, atualmente existem metodologias que permitem o processo de esterificação. Dentro delas, encontra-se método mais conhecido para obtenção de ésteres, desenvolvido por Emil Fischer e Arthur Speier em 1895. É o método mais comum e conhecido como esterificação de Fischer, que ocorre entre um ácido carboxílico e um álcool, com presença de um ácido forte como catalisador, sob aquecimento (OLIVEIRA et al., 2014).

De acordo com o mecanismo representado na Figura 10, na esterificação de Fischer primeiramente, ocorre a protonação do oxigênio carbonílico (1) fazendo com que o par de elétrons da ligação dupla existente entre C=O desloque-se para esse oxigênio possa tornar o carbono acílico mais reativo, com caráter eletrofílico, o que facilita o ataque feito em seguida pelo álcool, gerando um intermediário tetraédrico (2). Neste intermediário 2, o oxigênio positivamente carregado perde um próton para o meio gerando o intermediário 3. Uma das hidroxilas do intermediário 3 capta o próton do meio ácido, formando uma molécula de água ligada ao carbono acílico (4). Esta molécula de água é formada, e assim, com a saída desta, a hidroxila compartilha um

par de elétrons com o carbono, re-estabelecendo a carbonila (5), o que contribui para a perda do próton pelo oxigênio, regenerando o meio ácido e formando finalmente o éster (6) (FERREIRA,2018).

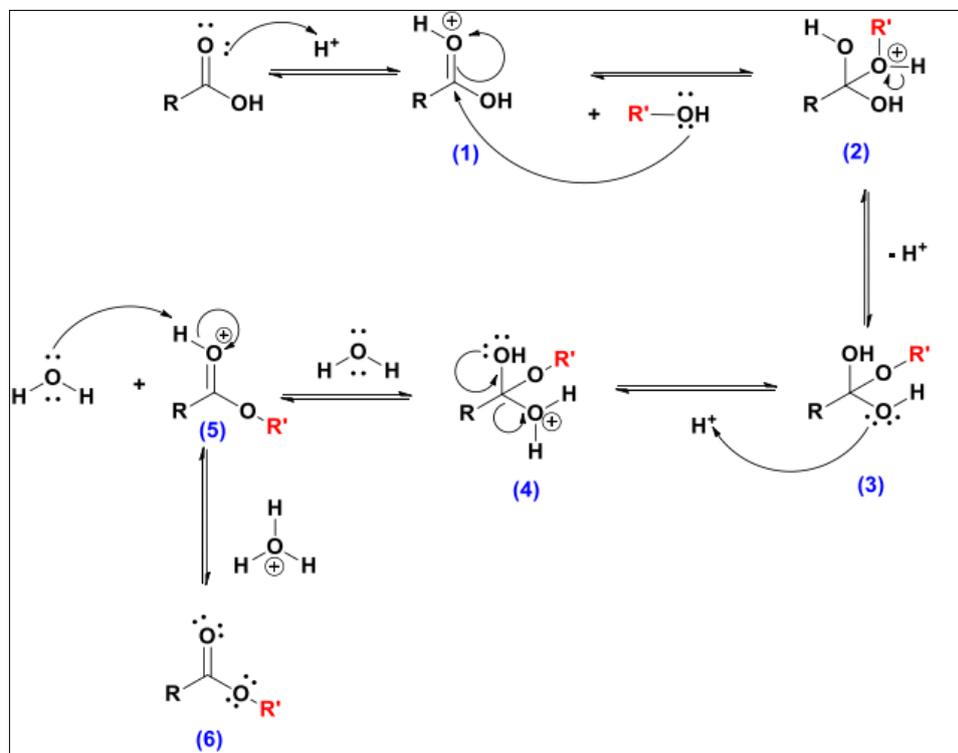


Figura 10. Mecanismo de esterificação de Fisher. Fonte: Ferreira,(2018).

A esterificação é uma reação reversível, por isso é importante ter cautela durante toda a reação e processo de purificação. Uma das etapas mais laboriosas é a de purificação do éster, pois como a reação é catalisada por um ácido ou uma base é necessário um controle rigoroso na neutralização do meio reacional e na destilação (LOWRY; RICHARDSON,1976). Outro método utilizado destinado à preparação de ésteres é a reação de Steglich, desenvolvida por Wolfgang Steglich e Bernhard Neises, em 1978. Para esta reação, é necessário o uso de um catalisador nucleofílico conhecido como 4-(dimetilamino)-piridina (DMAP) e a diciclohexilcarbodiimida (DCC) como agente de acoplamento. Geralmente, é usado o diclorometano como solvente e as condições empregadas são agitação e temperatura ambiente (GILLES et al., 2015; STEGLICH; NEISES, 1978).

Com base na figura 11, primeiramente ocorre uma reação ácido-base entre o DMAP (base) e o ácido carboxílico, resultando no ácido conjugado do DMAP que facilita o ataque nucleofílico da hidroxila no carbono deficiente de elétrons da amida formada (1).

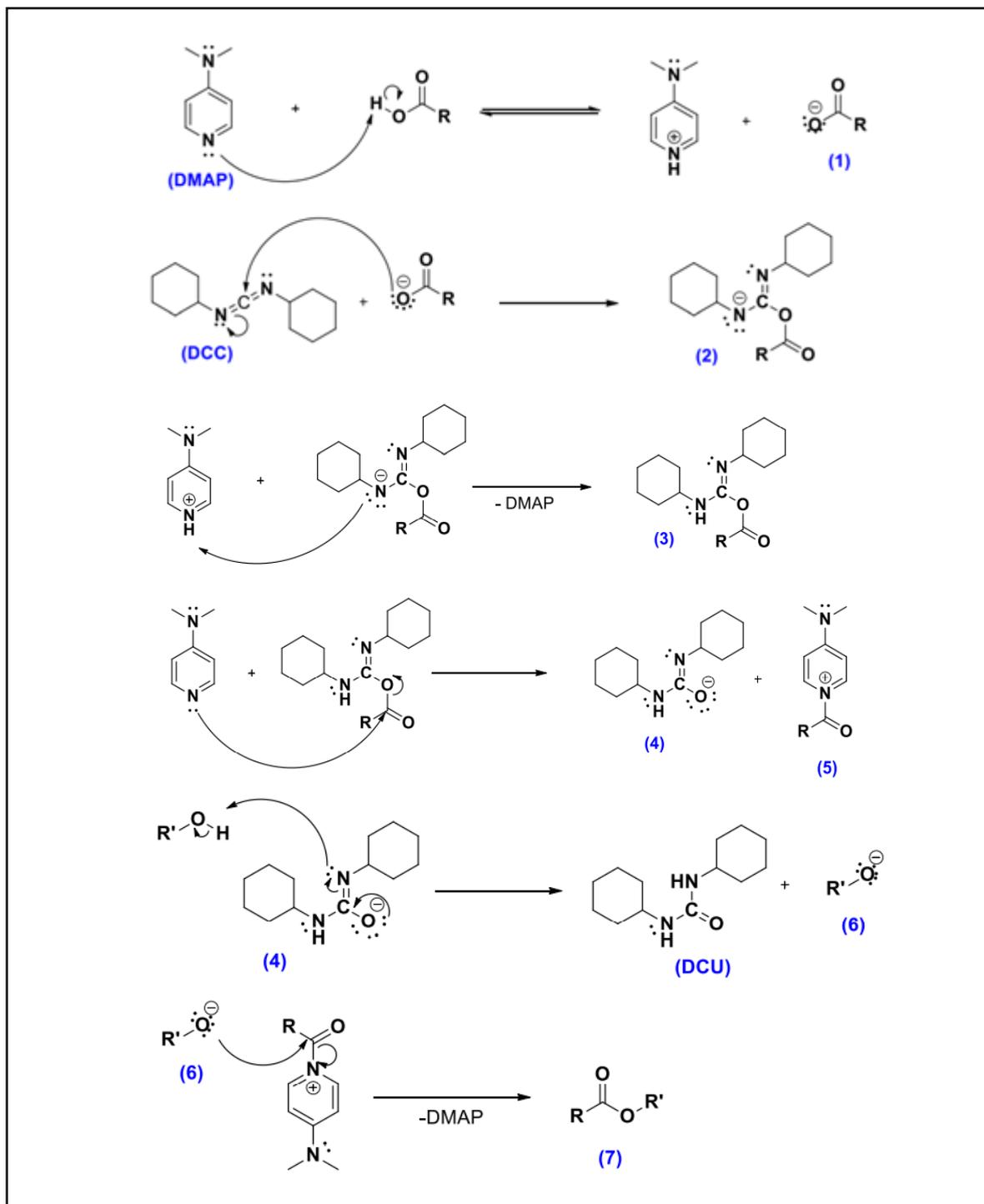


Figura 11. Mecanismo de esterificação de Steglich. Fonte: Ferreira,2018.

Este nucleófilo, realiza um ataque ao carbono central da estrutura do DCC que apresenta caráter eletrofílico devido à proximidade aos dois nitrogênios, assim o par de elétrons da ligação entre C=N vai para o nitrogênio (2) que, dessa forma, abstrai um próton do ácido conjugado do DMAP o que reestabelece o catalisador da reação e gera o intermediário 3. Seguidamente, o DMAP realiza uma adição ao carbono da carbonila do intermediário 3 formando o intermediário 4 e o grupo acila (5). Depois, o intermediário 4 abstrai um próton do álcool utilizado formando o grupo alcóxido (6) e a diciclohexiureia (DCU) que é o subproduto da reação pouco solúvel em diclorometano. Na última etapa, o alcóxido (6) realiza o ataque ao carbono da carbonila de 5, eliminando o DMAP e formando o éster (7) (FERREIRA,2018.). Esta metodologia tem sido utilizada para o desenvolvimento de ésteres de carotenoides. Por exemplo, Young et al. (2007) utilizaram ácidos esteárico, palmítico e mirístico para o desenvolvimento de ésteres de luteína e zeaxantina e obtiveram laurato, miristato, palmitato, e estearato mono e diésteres de luteína e zeaxantina.

Atualmente, a pesquisa tem se focado no uso de sistemas de entrega baseados na nanotecnologia para eficiência de entrega em sistemas alimentares, assim com a procura de novos agentes com atividade funcional é de extrema importância, principalmente em um país como o Brasil que oferece uma biodiversidade de frutos que contribuem no desenvolvimento de substâncias ricas em compostos bioativos e eficientes no controle de doenças. Várias pesquisas têm comprovado a eficiência do uso de substratos de plantas no controle de doenças como uma alternativa no controle de diversas patologias (CAI et al., 2003; XIONG; CAO, 2011;). Dentre delas, encontrasse a abóbora, um fruto que apresenta compostos bioativos como tocoferol, carotenoides e ácidos graxos poli-insaturados que quando são incorporados na alimentação humana podem ser tornar um fator protetor de diversas doenças reduzindo o risco de desenvolvimento de patologias, como arteriosclerose e câncer (DAVIS; O'CONNOR, 2006; KIM et al, 2012).

4.4. Abóbora

A abóbora pertence à família das cucurbitáceas, ao gênero *Cucurbita*. Esta planta é originária das Américas e, segundo relatos foi distribuída amplamente no sudeste do México, América Central, Colômbia e Peru (WHITAKER; DAVIS, 1962). O cultivo de abóbora é realizado em países tropicais e subtropicais, e seu período de

produção vai de abril a julho (PORTUGAL, 2012). Sua importância relaciona-se, principalmente, ao valor alimentício e à versatilidade culinária do fruto, a seu alto teor de vitamina E e a sua ação antioxidante (MURKOVIC et al., 2004; AHAMED et al., 2011; JIAO et al., 2014), sendo fonte de carotenoides como α -caroteno e β -caroteno (ARIMA; RODRIGUEZ-AMAYA, 1988; AZEVEDO-MELEIROS, 2003)

A abóbora é uma planta monoica, ou seja, apresenta flores femininas e masculinas na mesma planta, e sua fecundação é predominantemente cruzada (WHITAKER; DAVIS, 1962; WHITAKER; ROBINSON, 1986). Desenvolve-se bem em temperatura de 20 °C até 30 °C; as plantas não suportam alta umidade relativa do ar e, por isso grande parte das cucurbitáceas são cultivadas na época seca do ano (PESSOA, 1998; SOUZA et al., 2002).

Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO, 2018) a produção de abóboras no mundo vem aumentando progressivamente nos últimos anos. No ano de 2018 a produção foi de 27.643.932 toneladas com uma área de produção de 2.042.955 hectares. A Figura 12 mostra a porcentagem de produção de abóbora por continentes. O maior produtor é o continente asiático (61,5%), seguido da Europa e as Américas com 15,8 e 11,7%, respectivamente. Dentro do continente asiático destaca-se a China como o maior produtor de abóbora (5.492.388 toneladas), seguido da Índia e da Rússia, com uma produção de 4.179.570 e 959.276 toneladas, respectivamente.

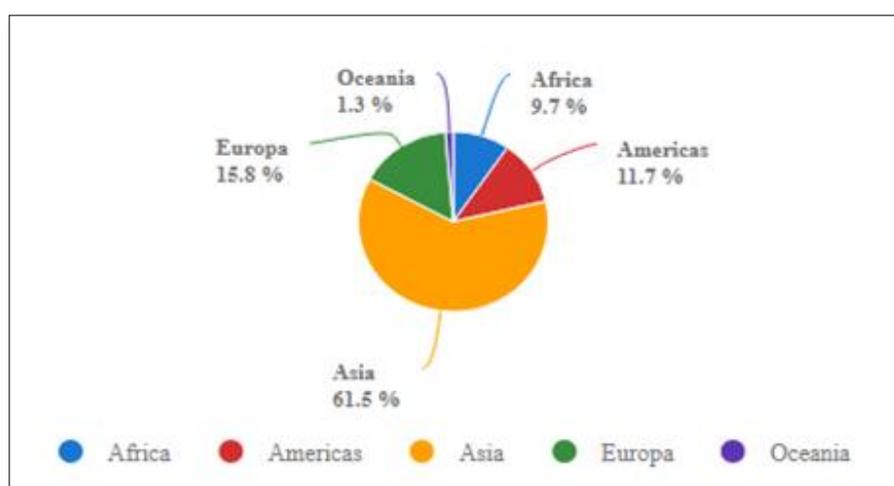


Figura 12. Produção de abóbora no mundo por continentes desde 1994 até 2018. Fonte: FAO. 2018

O cultivo da abóbora apresenta importância econômica e social no Brasil, pois a área de cultivo representa cerca de 8.000 hectares e sua produção gera milhões de empregos diretos e indiretos. Apesar de ser consumida no mundo todo, sua produção é realizada em pequenas propriedades, tendendo a ser uma atividade econômica da agricultura familiar. O Censo do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) realizado em 2010 evidenciou que 127.738 estabelecimentos rurais se dedicavam à produção de abóbora, em 88,2 mil hectares, sendo o principal produtor o sudeste do país. Os principais produtores no Brasil são os estados de São Paulo, Minas Gerais, Bahia, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Maranhão. Segundo o IBGE, o consumo *per capita* é de aproximadamente 1,19 kg médio anual (IBGE, 2010).

Dentro do cultivo das abóboras, são destacadas algumas espécies por sua importância econômica e alimentar como: *Cucurbita moschata* (abóbora), *Cucurbita pepo* (abobrinha), *Cucurbita máxima* (moranga) (Figura 13). A abóbora é conhecida por uma variedade de nomes populares, assim, algumas vezes, as abobrinhas, morangas e jerimuns são chamados indistintamente de abóbora. Nordeste brasileiro, a abóbora é conhecida como abóbora de leite ou jerimum de leite (RESENDE; BORGES; GONÇALVES, 2013; FERREIRA et al., 2006). A *C. máxima* cresce principalmente nas regiões subtropicais, principalmente no sul e oeste da Índia (SESHADRI, 1989). No Brasil ela é usada principalmente para alimentação humana. Ela pode ser conhecida por diferentes nomes por sua variabilidade genética como: moranga, abóbora-crioula, abóbora-de-tortéi, abóbora-cogumelo, abóbora-coração-de-boi, abóbora-gaúcha, moranga de-bunda, entre outros (FISCHER et al., 2012).

C. pepo é cultivada na primavera, verão e outono, especialmente no nordeste do México e no leste dos EUA (DECKER, 1988). Esta espécie apresenta maior variabilidade dentro de todas as espécies de abóbora cultivadas. Ela é cultivada no solo para fins de alimentação, mas também com objetivos ornamentais. No Brasil, a mais conhecida é a abobrinha, mas também são conhecidas variedades como: abóbora-estrela, abóbora-de-coco e abóbora-teta-de-égua. As variedades conhecidas como moranga são as mais comuns no sul do Rio Grande do Sul (FISCHER et al., 2012).

C. moschata é uma espécie mais comum nos Estados Unidos e na África do Sul (NATH et al., 1979). Esta espécie é conhecida por ser menor em comparação às

outras espécies. Pode ser usada para alimentação animal e humana. No Brasil, os frutos são conhecidos como abóbora, abóbora-crioula, abóbora-de-pescoço, abóbora-gigante, abóbora-de-vaca, abóbora-menina e moranga, entre outros (FISCHER et al., 2012). Nesta espécie, encontra-se a cultivar Jacarezinho, a qual é cultivada no nordeste do Brasil, suscetível a doenças florais, mas, muito produzida devido ao seu tamanho menor e cor característica, o que a torna muito desejada (SEGOVIA, 1999; RAMOS et al., 2010). Apresentam um peso de 2 a 3 kg e são geralmente de formato globular com uma coloração verde externamente e amarelo-laranja na sua polpa (RAMOS et al., 2010).



Cucurbita moschata
jacarezinho
(abóbora)

Cucurbita pepo
(abobrinha)

Cucurbita máxima
(moranga)

Figura 13. Ilustrações de três espécies de abóboras. Fonte: Florido et al. (2015).

4.5. Sementes de abóbora

A semente de abóbora apresenta uma coloração branca, com formato oval, achatada e afilada nas suas extremidades (Figura 14). Elas são consumidas na forma torrada ou salgada. A semente de abóbora é um alimento rico em proteínas, fibras, óleo e fitoesteroides (CERQUEIRA et al., 2008). Nyam et al. (2013) reportam uma composição de 24-47% de óleo, 20% de proteína, 30,78% de fibras, 19% de carboidratos e cerca de 6% de açúcares totais em semente de *Cucurbita pepo* L. Segundo ALFAWAZ (2004), as sementes de abóbora (*C. maxima*) contêm

aproximadamente 39,25% de proteína bruta, 27,83% de óleo bruto, 4,59% de cinzas e 16,84% de fibra bruta; além de apresentar concentrações moderadas de minerais, especialmente P, Mg e K.

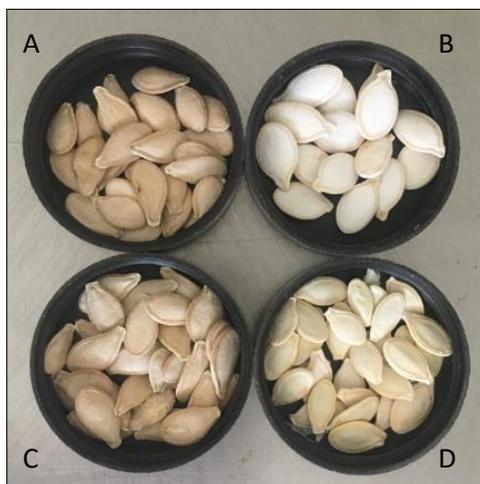


Figura 14. Sementes de abóbora do campo experimental da Embrapa Hortaliças. (A) *Cucurbita moschata*, (B) *C. máxima*, (C) *C. moschata* jacarezinho, (D) *C. pepo*. Fonte: Autor

A semente apresenta umidade de aproximadamente 5,20%, muito inferior às demais partes da abóbora. Elas apresentam alto conteúdo de vitamina E, em suas formas alfa, beta e gama tocoferol (YOUNIS; GHIRMAY; AL-SHIHRY, 2000; MURKOVIC et al., 2004). Ardabili; Farhoosh e Khodaparast, (2011) encontraram valores de tocoferóis totais na semente abóbora de 882.65 mg α -tocoferol/kg. O teor de ácidos graxos saturados presente na semente é de aproximadamente 27,73% composto por 16,41% de ácido palmítico e 11,14% de ácido esteárico. Enquanto os ácidos graxos insaturados apresentam-se em uma porcentagem maior que 73,03% e consiste principalmente em ácido oleico e de ácido linoleico (ALFAWAZ, 2004).

4.6. Óleo de semente de abóbora (OSA)

A partir das sementes de abóbora, pode-se obter o óleo, que apresenta uma cor verde escuro com forte fluorescência vermelha. Esse óleo é utilizado para fins culinários, principalmente nas saladas (MURKOVIC et al., 2004). O teor de óleo da

semente de abóbora varia de 24-54% e a composição de ácidos graxos depende de vários fatores como genótipo, espécie, área em que as plantas são cultivadas, clima, estado de amadurecimento das sementes (NAWIRSKA-OLSZAŃSKA et al., 2013; NEDERAL et al., 2014; POTOČNIK et al., 2016; TÜRKMEN et al., 2017). Este tipo de óleo não é muito utilizado em processos de fritura em comparação com os demais óleos comerciais como milho, soja ou coco, pois o aroma muda rapidamente durante o aquecimento, gerando odor de óleo queimado (MORRISON et al., 2009).

Recentemente, o óleo de semente de abóbora tem recebido atenção por apresentar benefícios para a saúde humana, por apresentar efeito benéfico para tratamento da hipertensão, aterosclerose, hipertrofia prostática, hiperplasia da bexiga, e diversos cânceres como de próstata, gástrico, mamário e de pulmão (FRUHWIRTH et al., 2003; GOSSELL-WILLIAMS; DAVIS; O'CONNOR, 2006). Além de apresentar atividades antioxidantes, hiperlipidêmicas e hiperglicêmicas (STEVENSON et al., 2007; REZIG et al., 2012; KOSTÁLOVÁ et al., 2013; JIAO et al., 2014). FRUHWIRTH et al. (2003) demonstraram que o óleo proveniente das sementes de *Cucurbita pepo* apresentam efeito benéfico em doenças relacionadas à próstata provavelmente relacionadas os compostos presentes no óleo como ácidos graxos essenciais, carotenos, luteína, tocoferóis e fitoesteróis.

4.6.1. Ácidos graxos

Os ácidos graxos encontram-se presentes nas diversas formas de vida, desempenhando funções importantes para nosso organismo como na estrutura das membranas celulares e nos processos metabólicos. Os ácidos graxos classificam-se de acordo com o número de insaturações presentes na sua estrutura (Figura 15). Os ácidos que apresentam duas ou mais insaturações são conhecidos como ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) como o ácido linoleico (18:2n-6) e linolênico (18:3n-3) que são os mais comuns. Os ácidos com uma insaturação são conhecidos como monoinsaturados (AGMI), como o ácido oleico. Ácidos saturados (AGS) não apresentam nenhum tipo de insaturações e são sólidos à temperatura ambiente (MARTIN et al., 2006).

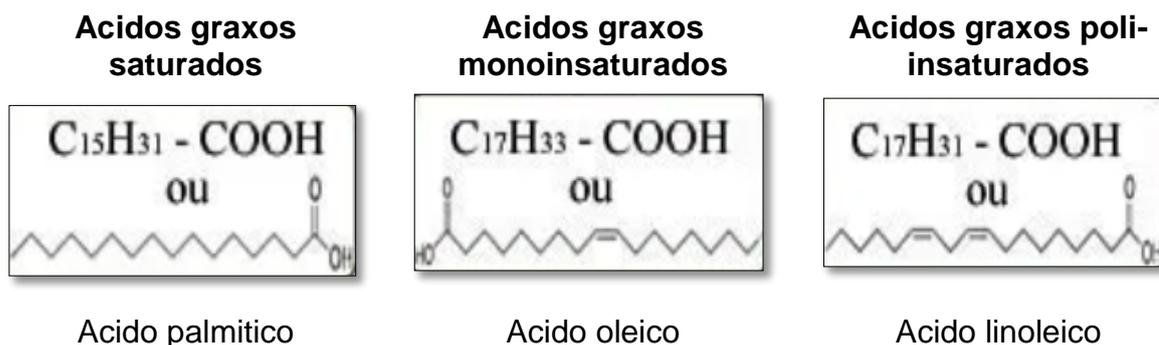


Figura 15. Classificação de ácidos graxos segundo seus números de insaturações

Os AGPI desempenham um papel fundamental no desenvolvimento e funcionamento normal do cérebro e do sistema nervoso central (SCHUCHARDT et al., 2010). Os ácidos linoleico e alfa-linolênico são necessários para manter sob condições normais, as membranas celulares, as funções cerebrais e a transmissão de impulsos nervosos. Eles também participam da transferência do oxigênio atmosférico para o plasma sanguíneo, da síntese da hemoglobina e da divisão celular, sendo essenciais para nosso organismo (YOUDIM; MARTIN; JOSEPH, 2000; MARTIN et al., 2006). O consumo de ácido graxo linoleico demonstrou benefícios na saúde humana, relacionadas com a prevenção de doenças como aterosclerose (WEIR et al, 2020), redução de risco de câncer e diabetes (MADIGAN et al., 2000; ZHOU et al., 2016) e proteção contra acidentes vasculares cerebrais (ISO et al., 2002). Neste sentido, os ácidos graxos poli-insaturados como o ácido linoleico e linolênico entram nos enterócitos por meio de uma proteína localizada na parede intestinal. Eles são esterificados para formar triacilgliceróis e seguidamente vão para a circulação sanguínea através da via linfática.

Na parede interna dos capilares sanguíneos a lipoproteína lipase hidrolisa os triacilgliceróis presentes nas lipoproteínas dos quilomícrons, liberando ácidos graxos, incluindo AGPIs livres que são incorporados aos triacilgliceróis do tecido adiposo e inibem a expressão gênica de enzimas envolvidas na lipogênese; no músculo, e por conseguinte aumentam a oxidação de ácidos graxos reduzindo o acúmulo de triacilgliceróis. Por outra parte, no fígado são incorporados aos triacilgliceróis e suprimem a síntese de lipídios e estimulam a oxidação de ácidos graxos (RODRÍGUEZ–CRUZ et al.,2005). Dentro do fígado (Figura 16), é possível obter sequencialmente γ -linolênico pela ação da enzima $\Delta 6$ -dessaturase, seguidamente,

ácido araquidônico através de elongações e ação de $\Delta 5$ -dessaturase. O α -ácido linoleico é convertido em ácido estearidônico pela enzima $\Delta 6$ -dessaturase; o ácido estearidônico é alongado e convertido em AEP (ácido eicosapentaenóico) via $\Delta 5$ -dessaturase. AEP adiciona dois carbonos via alongase para formar ácido docosapentaenóico (APD), em seguida, adiciona mais dois carbonos via alongase seguido por dessaturação por $\Delta 6$ -desaturase para produzir ácido tetracosahexaenóico; o subsequente, a remoção de dois carbonos por β -oxidação produz ADH (ácido docosahexaenóico) (LI et al., 2019).

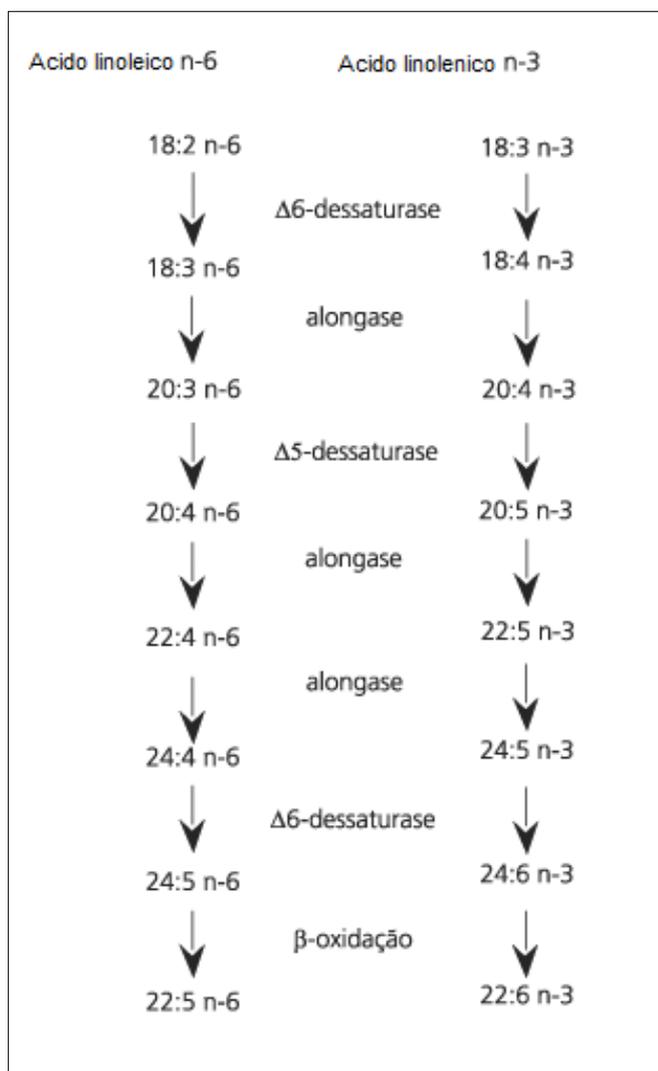


Figura 16. Metabolismo dos ácidos graxos linoleico e linolênico. Fonte. Martin et al., 2006.

O APD e ADH são incorporados em muitas partes do corpo, incluindo membranas celulares e desempenham um papel nos processos antiinflamatórios e na viscosidade das membranas celulares, ademais de atuar como precursores de diversos metabólitos que são potentes mediadores lipídicos (FARVID et al., 2014). O consumo destes tipos de ácidos graxos pode desempenhar um papel importante na prevenção e tratamento de doenças das artérias coronárias, hipertensão, diabetes, artrite, outros distúrbios inflamatórios e autoimunes e câncer (CALDER, 2006; SIMOPOULOS; SALEM, 1996).

Por outro lado, os ácidos saturados aumentam os níveis de colesterol plasmático. Este efeito varia segundo o tamanho da cadeia de ácido graxo, quantidade de colesterol da dieta e níveis prévios de colesterol plasmático (BONANOME; GRUNDY, 1988; PADOVESI; MANCINI-FILHO, 2002).

Diversos estudos têm avaliado o conteúdo de ácidos graxos presentes no óleo de semente de abóbora (Tabela 1). Os OSA são compostos principalmente pelos ácidos palmítico (9,5-14,5%), ácido esteárico (3,1-7,4%), ácido oleico (21,0-46,9%) e ácido linoleico (35,6-60,8%). Estes quatro ácidos graxos compõem 98% do total. Outros ácidos graxos estão bem abaixo 0,5% (MURKOVIC et al, 1996; YOUNIS; GHIRMAY; AL-SHIHRY, 2000). O óleo de semente de abóbora é considerado um óleo rico em ácidos graxos insaturados, por apresentar uma grande proporção de ácidos poli-insaturados de aproximadamente uma proporção de 34-53%.

Tabela 1. Estudos realizados para avaliar o teor de ácidos graxos (%) em óleo de sementes de abóbora.

Espécie	Amostra	Extração	Ácidos Graxos (%)													AGS	AGMI	AGPI	Referências
			14:0	16:0	16:1	17:0	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	20:1	22:0	22:1	24:0				
<i>Cucurbita Pepo</i>	12 tipos de OSA comerciais - diferentes regiões da Itália e Eslovênia	Amostras de óleo Sem extração	0.1	9 – 13	0.1 - 0.2	-	0.3 - 0.6	34 – 43	44 - 52	0.2 - 0.6	0.3 - 0.4	0.1 – 0.3	0.1 – 0.4	0.07 Poucas amostras	0.2 – 0.6	9,2-15	34,21-43,57	44,02-52,06	Procida et al., 2012
<i>Cucurbita Pepo</i>	6 sementes diferentes (husk /naked) Sem assar	Prensagem a frio	0.2	11.2 a 15.5	0.2	-	5.2 – 6.2	37.5 – 43.6	37.3 – 44.5	0.1 - 0.3	-	-	0,1-0,4	-	-	16.4 – 21.1	37.1 – 43.6	37 – 44.7	Rabrenović et al., 2014
<i>Cucurbita máxima</i>	Estação de Pesquisa Agrícola em Deirab	Soxleth	0.18	16,41	0.16	-	11,14	18,14	52,69	1.27	-	-	-	0.76	-	27,73	18,9	53,96	Alfawa, 2004
<i>Cucurbita pepo</i> L	Assadas	Banho supersônico	-	5.43	-	-	12.4	27.6	54.6	-	-	-	-	-	-	17,83	27,6	54,6	Murkoviet al., 2004
<i>Cucurbita pepo</i> L	100 linhagens	Soxleth	0,1	9.5-14.5	0,1-0,2	-	3.1-7.4	21.0-46.9	35.6-60.8	-	0,1	-	0,1-0,2	0-0,15	0,2-0,3	13,1-22,5	21,1-47,25	35.6-60.8	Murkovic et al., 1996
<i>Cucurbita máxima</i>	Academia de Ciências Agrícolas de Heilongjiang, Harbin, Província de Heilongjiang, China.	Extração enzimática aquosa assistida por microondas	0,11	12,5	0,13	0,05	5,72	23,90	57,33	0,32	0,39	-	-	-	-	18,32	24,03	57,65	Jiao et al., 2014
		Soxleth	0,68	13,71	0,14	0,07	5,99	24,63	53,72	0,18	0,88	-	-	-	-	21,33	24,77	53,90	
<i>Cucurbita pepo</i> . var. <i>Styriaca</i>)	Tabriz, Iran	Agitação em um agitador à temperatura ambiente escuro por 36 h	-	10,06	0,58	-	8,67	38,42	39,84	0,68	-	1,14	-	-	-	18,73	40,14	40,52	Ardabili et al., 2011
<i>Cucurbita máxima</i>	Um mercado local na região de Chebika	Expeller mecânico a frio	-	15,97	Trazos	-	4,68	44,11	34,77	Trazos	0,41	-	-	-	-	21,07	44,12	34,78	Rezig et al., 2012
<i>Cucurbita pepo</i> L	Grécia	Soxhlet	0,11	12,51	0,15	0,12	5,43	37,07	43,72	0,18	0,5	-	0,14	0,06	-	18,87	37,28	43,9	Schinas et al., 2009
<i>Cucurbita moschata</i>	Bulgaria, Sur	Soxhlet	0,2-0,3	21,5-25,9	-	0,1	6,7-9,3	20,5-21	40,8-50,2	0,2-1,9	0,1-0,4	0,1	0,3-0,4	-	-	28,6-36,7	20,6-21,1	42,7-50,4	Petkova e Antova, 2015

4.6.2. Tocoferóis

O excesso de radicais livres pode gerar uma condição de estresse oxidativo que estão relacionadas com o desenvolvimento de diversas doenças humanas como patologias cardiovasculares, Alzheimer, e diversos tipos de câncer (BONDA, 2010; CERVELLATI et al., 2014). Compostos antioxidantes ajudam a proteger as células destes radicais, considerando-se importante o consumo de alimentos com ação antioxidante na prevenção destas doenças. A vitamina E é uma vitamina lipossolúvel considerada um excelente antioxidante lipofílico (GUZ-MARK; SHAMIR, 2019). O principal papel biológico da vitamina E é proteger os ácidos graxos polinsaturados e outros componentes das membranas celulares, ademais da lipoproteína de baixa densidade (LDL) da oxidação pelos radicais livres (FAO, 2001). Ela é a denominação genérica de quatro isoformas: alfa, beta, gama e delta-tocoferol, cada um dos quais com atividades biológicas específicas, sendo que o alfa-tocoferol é o mais potente antioxidante (BIANCHINI; PENTEADO, 2003). Os tocoferóis convertem radicais livres em espécies mais estáveis por meio da doação de um átomo de hidrogênio, gerando produtos eletricamente estáveis ou menos reativos. É importante notar que, ao proteger os lipídios da oxidação, a vitamina E se converte em um radical tocoferil, precisando ser regenerada para recuperar seu potencial antioxidante (CATANIA et al., 2009). A forma mais importante e biologicamente ativa da vitamina E é o α -tocoferol, a única forma mantida no plasma (CORNELLI, 2009). A atividade biológica do γ e δ -tocoferol com relação ao alfa são de 10% e 3%, respectivamente (FAO, 2001). Para avaliar a ingestão adequada de vitamina E, é necessário levar em consideração o consumo de ácidos graxos insaturados já que eles são susceptíveis à oxidação e o aumento em sua ingestão sem um aumento concomitante da vitamina E pode levar a uma redução desta vitamina. A ingestão diária recomendada, desenvolvida pelo Conselho de Alimentação e Nutrição (FNB) do Instituto de Medicina das Academias Nacionais estabelece a ingestão de 15 mg para vitamina E (alfa-tocoferol) para pessoas maiores de 14 anos (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2020). O óleo de semente de abóbora pode apresentar na sua composição até 400 mg/100 gr de óleo (Tabela 2), considerando assim um alimento rico em tocoferóis por aportar mais que 30% do valor diário recomendado (BRASIL, 1998).

Tabela 2. Estudos realizados sobre determinação de teor de tocoferóis em óleo de semente de abóbora.

Tocoferóis								
Espécie	Amostra	Extração	δ-tocoferol	γ-tocoferol	β-tocoferol	α-tocoferol	Total	Referencias
<i>Cucurbita pepo</i> L	Assadas	Banho supersônico	-	383 µg/g	-	37.5 µg/g	420,5 µg/g	Murkovic et al., 2004
<i>Cucurbita pepo</i> L	Seis amostras	Prensagem a frio	3.39-10.44 mg/100 g	29,92-49,96 mg/100 g	2,61-5,2 mg/100 g	-	80,03-58,32 mg/100 g	Rabrenovic et al., 2014
<i>Cucurbita</i> <i>máxima</i>	Academia de Ciências Agrícolas de Heilongjiang, Harbin, Província de Heilongjiang, China	Soxhlet	-	-	-	772.31 mg α- tocoferol/kg oil	772.31 mg α- tocoferol/kg oil	Jiao et al., 2014
		Extração enzimática aquosa assistida por microondas	-	-	-	856.81 mg α- tocoferol/kg	856.81 mg α- tocoferol/kg	
<i>Cucurbita pepo</i> var. <i>Styriaca</i>	Tabriz, Iran.	Agitação em um agitador à temperatura ambiente em o escuro por 36 h	-	-	-	882.7 mg α- tocoferol/kg	882.7 mg α- tocoferol/kg	Ardabili et al., 2011
<i>Cucurbita pepo</i> L	100 linhagens	Agitação a 165 rpm	0-37 mg/kg	41-610 mg/kg	0-16 mg/kg	12-91 mg/kg	53-714 mg/kg	Murkovic et al.,1996
<i>Cucurbita</i> <i>máxima</i>	Um mercado local na região de Chebika	Expeller mecânico a frio	177 mg/100 g	113,66 mg/100 g	-	128 mg/100 g	418,66 mg/100 g	Rezig et al.,2012
<i>Cucurbita</i> <i>moschata</i>	Bulgaria, Sur	Soxhlet	50,2 mg/kg	383-944 mg/kg	-	20-894 mg/kg	423,2-1838 mg/kg	Petkova e Antova,2015
<i>Cucurbita</i> <i>moschata</i>	Apulia, Italia	Extração supercrítica com CO ₂	-	-	-	-	274-442 mg/kg	Durante et al., 2014

4.6.3. Carotenoides

Os carotenoides são as moléculas isoprenoides mais difundidas na natureza, com mais de 600 caracterizados estruturalmente e um rendimento estimado de 100 milhões de toneladas por ano (FRASER; BRAMLEY, 2004). Os carotenoides são compostos hidrofóbicos caracterizados por sua pigmentação, são amplamente utilizados na indústria como suplementos, corantes e aditivos. São conhecidos por apresentar ação antioxidante e atividade pró-vitamina A de algumas estruturas (BONE et al., 2003; SAINI; NILE; PARK, 2015; HORUZ; BELIBAGLI, 2018; NGAMWONGLUMLERT; DEVAHASTIN, 2019). Sua ação antioxidante deve-se à capacidade de eliminar os radicais de oxigênio e peroxil, protegendo a membrana celular (TAPIERO; TOWNSEND; TEW, 2004). Um dos principais carotenoides é o β -caroteno caracterizado por sua atividade de pró-vitamina A pela ação da enzima β -caroteno 15,15'-monooxigenase (WYSS et al., 2000). De acordo com o Expert Group on Vitamins and Minerals (2003), a ingestão de no mínimo 7 mg/dia de β -caroteno satisfaz as necessidades humanas de vitamina A.

A luteína é um carotenoide essencial comumente consumido na dieta, pertencente à subclasse xantofila. Este carotenoide tem demonstrado eficácia em retardar o desenvolvimento da degeneração macular relacionada à idade (FREDE et al., 2014), A luteína também foi associada ao desenvolvimento dos olhos e do sistema nervoso dos fetos, sendo mostradas correlações entre a ingestão materna de luteína e um risco reduzido de partos prematuros (ZIELINSKA et al., 2017). Também é caracterizada por possuir uma atividade antioxidante mais forte que os outros carotenoides (POPOV & LEWIN, 1996). Estudos realizados por Raczyk et al. (2017) encontraram um teor de β -caroteno e luteína maior em óleo extraído em semente de abóbora torradas (0,21 e 0,27 mg/100 g, respectivamente) que em semente sem torrar (0,12 e 0,12 mg/100 g, respectivamente). Montesano et al. (2018) encontraram em OSA uma concentração de luteína de 8 mg/L de óleo, enquanto a concentração de β -caroteno foi menor (2,5 mg/L de óleo).

4.6.4 .Atividade antioxidante

O alimento funcional pode ter um efeito metabólico ou fisiológico que contribua para a saúde física e para o desenvolvimento de doenças (BORGES, 2001). O OSA tem despertado interesse dado ao número crescente de estudos mostrando a relação entre o consumo e a sua ação benéfica em algumas condições de saúde, como aterosclerose (MORRISON et al., 2015) e hipertrofia prostática (GOSSELL-WILLIAMS; DAVIS; O'CONNOR, 2006). Além disso, atividades hipolipidêmica e anti-hipertensiva (MAJID; AHMED; KHAN, 2020) e antioxidante (KULAITIENĖ et al., 2018).

Diversas reações oxidativas que ocorrem no corpo, especificamente nas células aeróbicas, levam à formação de radicais livres, os quais são um fator de risco para a saúde contribuindo para a geração de doenças como câncer, para processos inflamatórios e para a aceleração de processos de envelhecimento (SIKORA et al., 2008; SILVA et al., 2010). O antioxidante pode ser definido como uma substância que em concentrações baixas que retardam ou inibem eficientemente a oxidação de um substrato oxidável (SIES, 1993. HANDELMAN, 2001; HUANG; OU; PRIOR, 2005). Estes antioxidantes absorvem os radicais livres e com isso inibem a cadeia das reações oxidativas (SILVA et al, 2010).

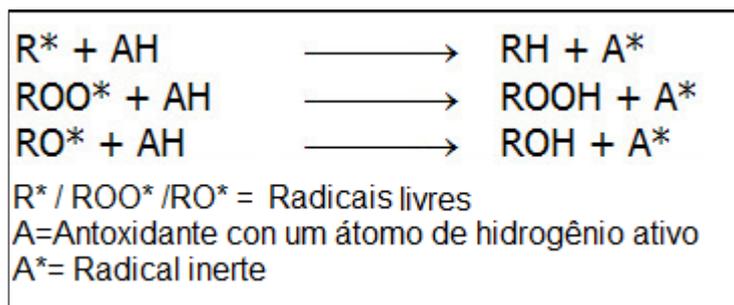
O estresse oxidativo é gerado pelo desbalanço entre os sistemas antioxidantes e a produção de radicais livres (MITTLER, 2002; BARBOSA et al., 2010). Para alcançar uma proteção eficiente, nosso corpo dispõe da produção de antioxidantes endógenos como enzimáticos (superóxido dismutase, catalases, glutathione peroxidase e sistemas tioredox), e não enzimáticos como o ácido úrico, a glutathione, a bilirubina, os hormônios sexuais estrogênicos, coenzima Q, a melanina, a melatonina, e o ácido lipoico (RIZZO et al., 2010). Os antioxidantes exógenos são obtidos por meio do consumo dos alimentos que contenham compostos fenólicos, vitamina E, ácido ascórbico e carotenoides (WILLCOX et al., 2004; SILVA et al, 2010).

Os antioxidantes sintéticos são os mais utilizados atualmente pela indústria alimentar, por sua eficiência e estabilidade, mas estes devem ser usados de acordo com a ingestão diária aceitável (IDA), estabelecida pelo Codex Alimentarius e sujeita à legislação de cada país. Dentre os antioxidantes primários mais comuns estão o butil hidroxianisol (BHA) e butilhidroxitolueno (BHT). Por outro lado, existem os antioxidantes naturais, os quais vêm despertando mais interesse por serem mais seguros e por serem oriundos de fontes naturais, destacando-se os compostos

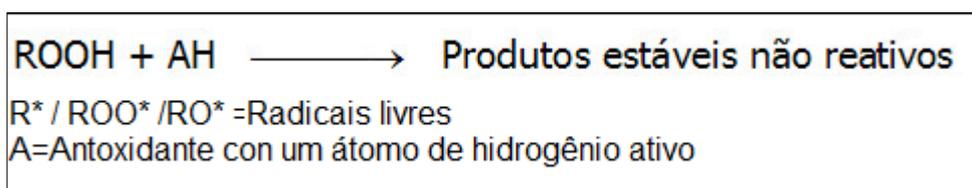
fenólicos, e as vitaminas C e E (TAKEMOTO et al., 2009). Atualmente, a indústria de alimentos está buscando compostos naturais que apresentem esta atividade antioxidante e que, com isso possam substituir os antioxidantes sintéticos, além de ajudar na prevenção e redução da presença de doenças crônicas (CAMPOS et al., 2008). Os OSA apresentam compostos como carotenoides, flavonoides, tocoferol, compostos fenólicos, considerando-se uma importante fonte de compostos antioxidantes (SIANO et al., 2016; POTOČNIK; CIZEJ; KOŠIR, 2018).

Mecanismo de ação dos antioxidantes

As substâncias antioxidantes podem ser classificadas em antioxidantes primários e secundários. Esta classificação depende dos mecanismos ou da forma de agir nas diversas etapas do processo oxidativo (Figura 17).



(a) Mecanismos de ação dos antioxidantes primários



(b) Mecanismos de ação dos antioxidantes secundários

Figura 17. Mecanismo de ação dos antioxidantes

Os antioxidantes primários também conhecidos como inibidores da reação, têm a capacidade de inibir ou de retardar a oxidação, sequestrando os radicais livres, transformando-os em substâncias estáveis, como os tocoferóis e carotenoides. Os antioxidantes secundários podem agir de diversas maneiras: ligação de íons metálicos, inativação do estresse oxidativo, conversão de hidroperóxidos em espécies

não radicais ou absorção de radiação ultravioleta. Eles não convertem os radicais livres em compostos mais estáveis (SHAHIDI; NACZK, 2004; MAISUTHISAKUL; SUTTAJIT; PONGSAWATMANIT, 2007).

Atualmente, existem diversas técnicas para avaliar a atividade antioxidante *in vitro*. Dentro dos métodos mais utilizados encontra-se: o DPPH (2,2- difenil-1-picril-hidrazila), que consiste em avaliar a atividade sequestrante do 2,2- difenil-1-picril-hidrazila, avaliando a capacidade do DPPH em interagir com doadores de hidrogênio. Pela ação do antioxidante ou uma espécie radicalar, o DPPH de coloração violeta é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela. Assim, é determinada a porcentagem da atividade antioxidante, correspondente à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante (HUANG; OU; PRIOR,2005; JAYAPRAKASHA et al, 2007. OLDONI, 2007; TIVIERON, 2010).

A espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (ERP) tem sido utilizada para avaliação da atividade antioxidante como radicais DPPH*, e se baseia no princípio da presença de campos magnéticos fortes, que resultam na absorção da radiação de micro-ondas (eletromagnéticas) por elétrons não emparelhados, gerando sinais de ERP. Portanto, as moléculas ou átomos precisam estar nessa condição para liberarem o sinal desejado. Com isso, os radicais livres mostram um comportamento paramagnético e podem ser identificados por esta técnica (NAIK et al., 2014; SANTOS, 2015).

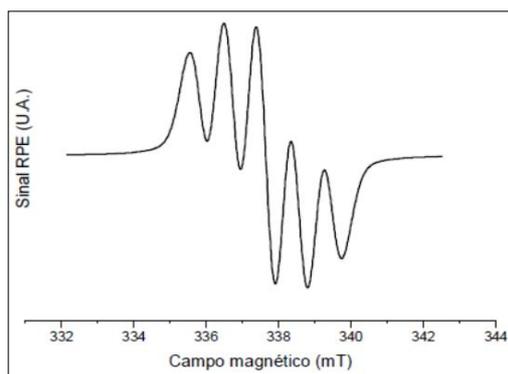


Figura 18. Sinal ERP do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH*). Fonte: Santos, (2015).

Segundo Naik et al. (2014) a detecção do radical livre DPPH* por ERP em extratos oleosos antioxidantes resulta na obtenção de um espectro complexo que

reduz a intensidade do sinal padrão. Em resumo, os resultados da atividade antioxidante da amostra avaliada são verificados com a redução do sinal ERP do DPPH (Figura 18) quando na presença de antioxidantes (SANTOS, 2015).

O método de avaliação da atividade antioxidante *Ferric-Reducing Ability of Plasma* (FRAP) determina a atividade antioxidante por meio da redução do ferro (Fe^{3+} -TPTZ ((ferritripiridiltriazina) (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina), a ferroso-tripiridiltriazina (Fe^{2+} -TPTZ), a reação ocorre a pH de 3,6 e desenvolve-se uma intensa cor azul em uma absorbância máxima de 593 nm (HUANG; OU; PRIOR, 2005). Já o método *Oxygen Radical Absorbancy Capacity* (ORAC) é baseado na transferência de elétron. Este método usa a proteína ficoeritrina (*Phycoerythrin* - PE), fotossintética, marcadora de fluorescência, como alvo dos radicais (VASCONCELOS et al, 2007). Dentro das suas desvantagens, encontra-se a necessidade de equipamentos caros, a grande variabilidade dos dados entre os equipamentos, a sensibilidade ao pH e a necessidade de muito tempo para quantificar os resultados. Em contrapartida, apresenta vantagens como o uso de radicais livres biologicamente relevantes e a integração entre o grau e o tempo de reação antioxidante (ZULUETA; ESTEVE; FRÍGOLA, 2009). Vale registrar a existência de mais métodos para avaliar a atividade antioxidante, como TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter), TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) ou Teste do ABTS.

Os métodos se fundamentam em uma reação de transferência de elétron único ou uma reação de transferência de átomo de hidrogênio entre um oxidante e um radical livre. Nos métodos baseados em transferência de elétron como o FRAP, os antioxidantes são oxidados por oxidantes, como Fe (III). Como resultado, um único elétron é transferido da molécula antioxidante para o oxidante. Os métodos como ORAC baseados em transferência de átomos de hidrogênio, utiliza um iniciador de radical para gerar o radical peróxil ROO^{\bullet} . O ROO^{\bullet} abstrai um átomo de hidrogênio do antioxidante, como resultado, a reação entre ROO^{\bullet} e a sonda da molécula alvo é retardada ou inibida (OU et al., 2002). A alteração da absorbância do antioxidante ou do oxidante é medida por um espectrofotômetro UV-visível (FRAP) ou espectrofotômetro de fluorescência (ORAC) e o valor da absorbância é usado como quantificação para a capacidade de redução do antioxidante. O uso testes para determinar a atividade antioxidante deve ser feito com cautela e depende também da amostra a ser analisada, por isso torna-se necessário avaliar a capacidade

antioxidante por diferentes ensaios, porque cada antioxidante pode agir com um mecanismo de ação diferente (VASCONCELOS et al, 2007; TIVIERON ,2010).

Jiao et al. (2014) demonstraram que a ação antioxidante pelo método de DPPH do óleo de semente de *Cucurbita máxima* obtido por ação enzimática, aumenta com o aumento da concentração do óleo. Relataram, ainda, que a extração enzimática exibiu maior eficácia na eliminação dos radicais DPPH (IC₅₀:123,93 mg/mL) em comparação com o método de Soxhlet (IC₅₀:150,38 mg/mL). Um estudo desenvolvido por NAWIRSKA-OLSZĄŃSKA et al. (2013) demonstrou que o óleo de *Cucurbita máxima* apresentou atividade antioxidante na faixa de 0,141-0,970 µM Trolox/g, enquanto o óleo de *Cucurbita pepo* variou de 0,176-0,622 µM Trolox/g pelo método de DPPH. Ao passo que a atividade antioxidante por FRAP exibiu valores de 4,39-7,62 µmol Trolox/g e 3,52-7,92 µmol Trolox/g, respectivamente. Outro estudo demonstrou que o óleo de semente de *Cucurbita pepo* do cultivar “Miranda” extraído por prensagem a frio exibiu uma atividade antioxidante de 3,28 µmol/g com o método DPPH (KULAITIENĖ et al., 2018).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, E. Biodisponibilidade de nanopartículas na entrega de nutrientes e nutracêuticos. *Opinião atual em Colloid & Interface Science*, v. 14, n. 1, p. 3–15, 2009.

ADJONU, R.; DORAN, G.; TORLEY, P.; AGBOOLA, S. Formation of whey protein isolate hydrolysate stabilised nanoemulsion. *Food Hydrocolloids*, v.41, p.169–177, 2014.

AFFANDI, M. M.; JULIANTO, T.; MAJEED, A. Development and Stability Evaluation of Astaxanthin Nanoemulsion. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, v. 4, p. 142-148, 2011.

AHAMED, K. U.; AKHTER, B.; ISLAM, M. R.; ARA, N.; HUMAUAN, M. R. An assessment of morphology and yield characteristics of pumpkin (*Cucurbita moschata*) genotypes in N. Bangladesh. *Tropical Agricultural Research and Extension*, v. 14, n. 1, p. 7-11, 2011.

AKIN, G.; ARSLAN, F.N.; KARUK ELMAS, S. N.; YILMAZ, I. Cold pressed pumpkin seed (*Cucurbita pepo* L.) oils from the central Anatolia region of Turkey: Characterization of phytosterols, squalene, tocopherols, phenolic acids, carotenoids and fatty acid bioactive compounds. *International institute of fats and oils*, v. 69, n.1, e232, 2018.

ALKA, A. J. A.; BABOOTA, S.; SHAKEEL, F.; SHAFIQ, S. Design development and evaluation of novel nanoemulsion formulations for transdermal potential of Celecoxib. *Acta Pharmaceutica*, v. 57, p. 315–332, 2007.

ALFAWAZ, M.A. Chemical Composition and Oil Characteristics of Pumpkin (*Cucurbita maxima*) Seed Kernels. *Food Science and Agriculture*. Res. Center, King Saud Univ., p. (5-18) 2004

ALVES-RODRIGUES, A.; SHAO, A. The science behind lutein. *Toxicology Letters*, v. 150, n. 1, p. 57-83, 2004.

ANTON, N.; VANDAMME, T. F. The universality of low-energy nano-emulsification. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 377, n. 1-2, p. 142–147, 2009.

ARDABILI, A. G.; FARHOOSH, R.; KHODAPARAST, M. H. H. Chemical Composition and Physicochemical Properties of Pumpkin Seeds (*Cucurbita pepo* Subsp. *pepo* Var. *Styriaca*) Grown in Iran. *Journal of Agricultural Science and Technology*, v. 13, p.1053-1063, 2011.

ARIMA, H. K.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Carotenoid composition and vitamin A value of commercial Brazilian squashes and pumpkins. *Journal of Micronutrient Analysis*, v. 4, n. 3, p. 177-191, 1988.

ARTENI, A.A.; FRADOT, M.; GALZERANO, D.; MENDES-PINTO, M.M.; SAHEL, J.A.; PICAUD, S. Structure and Conformation of the Carotenoids in Human Retinal Macular Pigment. *PLoS ONE*, v.10, n. 8, e0135779, 2015.

AZEVEDO-MELEIROS, C. H. Análise de Carotenoides em Alimentos Brasileiros por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Espectrometria de Massas. 2003. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo.

BABOOTA, S.; SHAKEEL, F.; AHUJA, A.; ALI, J.; SHAFIQ, S. Design, development and evaluation of novel nanoemulsion formulations for transdermal potential of Celecoxib. *Acta Pharmaceutica*, v. 57, n. 3, p. 315-332, 2007.

BAI, L.; HUAN, S.; GU, J.; MCCLEMENTS, D. J. Fabrication of oil-in-water nanoemulsions by dual-channel microfluidization using natural emulsifiers: Saponins, phospholipids, proteins, and polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, v. 61, p. 703–711, 2016.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors; *Revista de Nutrição*, v. 23, n. 4, 2010.

BARKER, F. M.; SNODDERLY, D. M.; JOHNSON, E. J.; SCHALCH, W.; KOEPCKE, W.; GERSS, J.; NEURINGER, M. Nutritional manipulation of primate retinas, V: effects of lutein, zeaxanthin, and n-3 fatty acids on retinal sensitivity to blue-light-induced damage. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 52, n. 7, p. 3934-3942, 2011.

BERNSTEIN, P.S.; LI, B.; VACHALI, P. P.; GORUSUPUDI, A.; SHYAM, R.; HENRIKSEN, B. S.; NOLAN, J. M. Lutein, zeaxanthin, and meso-zeaxanthin: the basic and clinical science underlying carotenoid-based nutritional interventions against ocular disease. *Progress in Retinal and Eye Research*, v. 50, p. 34-66, 2016.

BETTLER, J.; ZIMMER, J. P.; NEURINGER, M.; DERUSSO, P. A. Serum lutein concentrations in healthy term infants fed human milk or infant formula with lutein. *European Journal of Nutrition*, v. 49, n. 1, p. 45- 51, 2010.

BIANCHINI, R.; PENTEADO, M. V. C. Vitamina E. In: Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos. Barueri: Manole; 2003. p.23-164.

BONANOME, A.; GRUNDY, S. M. Effect of dietary stearic acid on plasm cholesterol and lipoprotein levels. *The New England Journal of Medicine*, v. 318, n. 19, 1244-48, 1988.

BONDA, D. J.; WANG, X.; PERRY, G.; NUNOMURA, A.; TABATON, M.; ZHU, X.; SMITH, M. A. Oxidative stress in Alzheimer disease: A possibility for prevention. *Neuropharmacology*, v. 59, n. 4-5, p. 290–294, 2010.

BONE, R. A.; LANDRUM, J. T.; GUERRA, L. H.; RUIZ, C. A. Lutein and Zeaxanthin Dietary Supplements Raise Macular Pigment Density and Serum Concentrations of these Carotenoids in Humans. *The Journal of Nutrition*, v. 133, n. 4, p. 992–998, 2003.

BOON, C. S.; MCCLEMENTS, D. J.; WEISS, J.; DECKER, E. A. Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 50, n. 6, p. 515-532, 2010.

BORGES, V. C. Alimentos funcionais: prebióticos, probióticos, fitoquímicos e simbióticos. In: Waitzberg DL. *Nutrição Enteral e Parenteral na Prática Clínica*. São Paulo: Atheneu; 2001.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 27, de 13 de janeiro de 1998. Regulamento Técnico referente à Informação Nutricional Complementar (declarações relacionadas ao conteúdo de nutrientes). Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs1/1998/prt0027_13_01_1998.html. Acesso em: 12 dic. 2019.

BRAMLEY, P. The genetic enhancement of phytochemicals: the case of carotenoids. In: JOHNSON, I; WILLIAMSON, G (Ed.). *Phytochemical functional foods*. CRC Press, 2003, p. 253-274.

BREITHAUPT, D. E.; WIRT, U.; BAMEDI, A. Differentiation between lutein monoester regioisomers and detection of lutein diesters from marigold flowers (*Tagetes erecta* L.) and several fruits by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 66–70, 2002.

BRITTON, P. D.; LIAAENJENSEN; D. H C S; PFANDER. P. D. H. (Eds.). *Carotenoids*. Birkhäuser Basel. 2008, 350 p.

BRITTON, G. Functions of Intact Carotenoids. In: BRITTON, P. D.; LIAAENJENSEN; D. H C S.; PFANDER. P. D. H. (Eds.). *Carotenoids*. Birkhäuser Basel. 2008, p. 189–212.

CAI, T.; LI, Q.; YAN, H.; LI, N. Study on the hypoglycemic action of pumpkin seed protein. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, v. 3, p. 7-1, 2003.

CALDER, P. C. n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v.83, n.6, 1505S-1519S, 2006.

CAMPOS, F. M.; MARTINO, H. S. D.; SABARENSE, C. M.; PINHEIRO-SANTANA, H. M. Estabilidade de compostos antioxidantes em hortaliças processadas: uma revisão. *Alimentos e Nutrição*, v.19, n.4, p. 481-490, 2008.

CATANIA, A. S.; DE BARROS, C. R.; FERREIRA, S. R. G. Vitaminas e minerais com propriedades antioxidantes e risco cardiometabólico: controvérsias e perspectivas. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 53, n. 5, 2009.

CERQUEIRA, P. M.; FEITAS, M. C. J.; PUMAR, M.; SANTANGELO, S. B. Efeito da farinha de semente de abóbora (*Curcubita maxima*, L.) sobre o metabolismo glicídico e lipídico em ratos. *Revista Nutrição*, v. 21, n. 2, p.129-136, 2008.

CERVELLATI, F.; CERVELLATI, C.; ROMANI, A.; CREMONINI, E.; STICOZZI, C.; BELMONTE, G.; VALACCHI, G. Hypoxia induces cell damage via oxidative stress in retinal epithelial cells. *Free Radical Research*, v. 48, n. 3, p. 303–312, 2014.

CHE MARZUKI, N. H.; WAHAB, R. A.; ABDUL HAMID, M. An overview of nanoemulsion: concepts of development and cosmeceutical applications. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, v. 33, n.1 , 779–797, 2019.

CHU, B. S.; ICHIKAWA, S.; KANAFUSA, S.; NAKAJIMA, M. Preparation of protein-stabilised β -Carotene nanodispersions by emulsification–evaporation method. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 84, n. 11, p. 1053-1062, 2007.

CORNELLI, U. Antioxidant use in nutraceutical. *Clinics in Dermatology*, v. 27, n. 2, p. 175-194, 2009.

COUPLAND, J. N.; MCCLEMENTS, D. J. Lipid oxidation in food emulsions Trends. *Journal of Food Science and Technology*, v. 7, p.83– 90,1996.

DAS, A. K.; NANDA, P. K.; BANDYOPADHYAY, S.; BANERJEE, R.; BISWAS, S.; MCCLEMENTS, D. J. Application of nanoemulsion-based approaches for improving the quality and safety of muscle foods: A comprehensive review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 19, n. 5, p. 2677-2700, 2020.

DECKER, D. S. Origin(s), evolution and systematics of *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). *Economic Botany*, v. 42, p. 4–15, 1988.

DONSÌ, F.; SENATORE, B.; HUANG, Q.; FERRARI, GIOVANNA (2010). Development of Novel Pea Protein-Based Nanoemulsions for Delivery of Nutraceuticals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, n.19, p.10653–10660.

DOS SANTOS, P. P.; ANDRADE, L. D.; FLÔRES, S. H.; RIOS, A. Nanoencapsulation of carotenoids: a focus on different delivery systems and evaluation parameters. *Journal of Food Science and Technology*, v. 55, n. 10, p. 3851–3860, 2018.

DURANTE, M.; LENUCCI, M.S.; MITA, G. Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids from pumpkin (*Cucurbita* spp.): A review. *International Journal of Molecular Sciences*, v.15, p. 6725-6740, 2014.

DURANTE, M.; LENUCCI, M. S.; D'AMICO, L.; PIRO, G.; MITA, G. Effect of drying and co-matrix addition on the yield and quality of supercritical CO₂ extracted pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) oil. *Food Chemistry*, v.148, p.314–320, 2014.

EGGERSDORFER, M.; WYSS, A. Carotenoids in human nutrition and health. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 652, p. 18–26, 2018.

EXPERT GROUP ON VITAMINS AND MINERALS. Safe Upper Levels for Vitamins and Minerals, 2003. Disponível em: <<https://cot.food.gov.uk/sites/default/files/vitmin2003.pdf>>. Acesso em: 15 ago.2020.

FAO- ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A ALIMENTAÇÃO E A AGRICULTURA. Chapter 9. Vitamin E, 2001. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>>. Acesso em: 25 jun.2020.

FAO- ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A ALIMENTAÇÃO E A AGRICULTURA. Production share of Pumpkins, squash and gourds by region, 2018. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>>. Acesso em: 25 jun.2020.

FARHAN, A. J.; MUSHIR, A.; FAIYAZ, S.; CUSHMAN, T.; ROOP, K. K.; SHEIKH, S. Investigation of nanoemulsion system for transdermal delivery of domperidone: ex-vivo and in vivo studies. *Current Nanoscience*, v. 4, p. 381–390, 2008.

FARVID, MS; DING, M .; PAN, A .; SUN, Q .; CHIUVE, SE; STEFFEN, LM; WILLETT, WC; HU, FB Dietary linoleic acid and risk of coronary heart disease: A sistemático review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Circulation*, v. 130 , p. 1568–1578, 2014.

FEENEY, J.; FINUCANE, C.; SAVVA, G. M.; CRONIN, H.; BEATTY, S.; NOLAN, J. M.; KENNY, R. A. Low macular pigment optical density is associated with lower cognitive performance in a large, population-based sample of older adults. *Neurobiology of Aging*, v. 34, n.11, p. 2449-2456, 2013.

FERREIRA, M. A J.; MELO, A. M. T.; CARMO, C. A. S.; SILVA, D. J. H.; LOPES, J. F.; QUEIROZ, M. A.; MOURA, M. C. C. L.; DIAS, R. C. S.; BARBIERI, R. L.; BARROZO, L. V.; GONÇALVES, E. M.; NEGRINI, A. C. A. 2006. Mapeamento da distribuição geográfica e conservação dos parentes silvestres e variedades crioulas de Cucurbita. In: Parentes Silvestres das espécies de plantas cultivadas. Secretaria de Biodiversidade e Florestas. Brasília. 44p

FERREIRA, A.R. Ésteres sintéticos do ácido 3-metil-nitrobenzoico e avaliação da sua actividade antifúngica. 2018. Dissertação (mestrado em produtos naturais e sintéticos bioativos) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Paraíba, João Pessoa.

FISCHER, S. Z.; BARBIERI, R. L.; STUMPF, E. R. T.; PEIL, R. M. N.; SCHWENGE, J. E. Cultivo e uso de abóboras ornamentais Embrapa Clima Temperado Pelotas, Embrapa: pelotas 2012, 39p.

FLORES-ANDRADE, E.; ALLENDE-BALTAZAR, Z.; SANDOVAL-GONZÁLEZ, P. E.; JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ, M.; BERISTAIN, C. I.; PASCUAL-PINEDA, L. A. Carotenoid nanoemulsions stabilized by natural emulsifiers: Whey protein, gum Arabic, and soy lecithin. *Journal of Food Engineering*, v.290, n.110208, 2021

FLOURY, J.; BELLETTRE, J.; LEGRAND, J.; DESRUMAUX, A. Analysis of a new type of high pressure homogeniser. A study of the flow pattern. *Chemical Engineering Science*. v. 59, n. 4, p. 843–853, 2004.

FORGIARINI, A.; ESQUENA, J.; GONZALEZ, C.; SOLANS, C. Formation of Nano-emulsions by Low-Energy Emulsification Methods at Constant Temperature. *Langmuir*, v. 17, n. 7, p. 2076–2083, 2001.

FRASER, P.; BRAMLEY, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research*, v. 43, n. 3, p. 228-265, 2004.

FREDE, K.; HENZE, A.; KHALIL, M.; BALDERMANN, S.; SCHWEIGERT, F. J.; RAWEL, H. Stability and cellular uptake of lutein-loaded emulsions. *Journal of Functional Foods*, v. 8, p. 118- 127, 2014.

FRUHWIRTH, G. O.; WENZL, T.; EL-TOUKHY, R.; WAGNER, F. S.; HERMETTER, A. Fluorescence screening of antioxidant capacity in pumpkin seed oils and other natural oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 105, p. 266–274, 2003.

GILLES, V. VIEIRA, M.A.; VALDEMAR LACERDA V.J.; CASTRO, E.V.R.; SANTOS, R.B; EDNILSON ORESTES, E.; CARNEIRO, J.W.M.; GRECO, S.J. A New, Simple and Efficient Method of Steglich Esterification of Juglone with Long Chain Fatty Acids: Synthesis of a New Class of Non-Polymeric Wax Deposition Inhibitors for Crude Oil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 26, n. 1, p. 74–83, 2015.

GUMUS, C. E.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. Formation and Stability of ω -3 Oil Emulsion-Based Delivery Systems Using Plant Proteins as Emulsifiers: Lentil, Pea, and Faba Bean Proteins. *Food Biophysics*, v.12, n.2, p.186–197, 2017.

GOSSELL-WILLIAMS, M.; DAVIS A.; O'CONNOR, N. Inhibition of testosterone-induced hyperplasia of the prostate of sprague-dawley rats by pumpkin seed oil. *Journal of Medicinal Food*, v. 9, n. 2, p. 284 – 286, 2006.

GUPTA, A.; ERAL, H. B.; HATTON, T. A.; DOYLE, P. S. Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft Matter*, v. 12, n.11, p. 2826-2841, 2016.

GURPREET, K.; SINGH, S. K. Review of Nanoemulsion Formulation and Characterization Techniques. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 80, n. 5, p. 781-789, 2018.

GUZ-MARK, A.; SHAMIR, R. Vitamin E. *Reference Module in Biomedical Sciences Encyclopedia of Gastroenterology (Second Edition)*, p. 734-736, 2019.

HAMMOND JR, B.R. Possible role for dietary lutein and zeaxanthin in visual development, *Nutrition Reviews*, v. 66, n. 12, p. 695-702, 2008.

HAMMOND, B.R.; FLETCHER, L.M.; ROOS, F.; WITTEWER, J.; SCHALCH, W. A double-blind, placebo-controlled study on the effects of lutein and zeaxanthin on photostress recovery, glare disability, and chromatic contrast. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 55, n.12, p. 8583- 8589, 2014.

HANDELMAN, G. J. The evolving role of carotenoids in human biochemistry. *Nutrition*, v.17, n. 10, p .818-822, 2001.

HENRIKSEN, B.S.; CHAN, G.M. Importance of carotenoids in optimizing eye and brain development, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, v. 59, n. 5, 2014.

HÖRMANN, K.; ZIMMER, A. Drug delivery and drug targeting with parenteral lipid nanoemulsions — A review. *Journal of Controlled Release*, v. 223, p. 85-98, 2016.

HORUZ, T. I.; BELIBAĞLI, K. B. Nanoencapsulation of carotenoids extracted from tomato peels into zein fibers by electrospinning. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 99, n.2, 2018.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n. 6, p. 1841–1856, 2005.

HUNTER, R. J. *Foundations of Colloid Science*. Oxford: Oxford Univ. Press. 816 p, 1986.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2010. Consumo per capita da abóbora no Brasil. Disponível em: <<http://www.ibge.org.br>>. Acesso em: 30 maio. 2019.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2012. Produção Agrícola Municipal. Disponível em <www.sidra.ibge.gov.br> Acesso em: 18 fev. 2020.

ISO, H.; SATO, S.; UMEMURA, U.; KUDO, M.; KOIKE, K.; KITAMURA, A.; IMANO, H.; OKAMURA, T.; NAITO, Y.; SHIMAMOTO, T. Linoleic Acid, Other Fatty Acids, and the Risk of Stroke. *Stroke: A Journal of Cerebral Circulation*, v. 33, n. 8, 2002.

JACKSON, J.G.; LIEN, E.L.; WHITE, S.J.; BRUNS, N.J.; KUHLMAN, C.F. Major carotenoids in mature human milk: longitudinal and diurnal patterns, *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 9, n. 1, p. 2-7, 1998.

JAFARI, S.; HE, Y.; BHANDARI, B. Nano-emulsion production by sonication and microfluidisation – a comparison. *International Journal of Food Properties*, v. 9, n. 3, p. 475-485, 2006.

JAISWAL, M.; DUDHE, R.; SHARMA, P. K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. *3 Biotech*, v. 5, n. 2, p. 123 – 127, 2015.

JAYAPRAKASHA, G. K.; NEGI, P. S.; JENO, B. S.; RAO, J. M. Antioxidant and antimutagenic activities of cinnamomum zeylanicum fruit extracts. *Jornal of Food Comsposition and Analysis*, v. 20, n. 3-4, p. 330-336, 2007.

JIAO, J.; LI, Z.G.; GAI, Q.Y.; LI, X.J.; WEI, F.Y.; FU, Y.J.; MA, W. Microwave-assisted aqueous enzymatic extraction of oil from pumpkin seeds and evaluation of its physicochemical properties, fatty acid compositions and antioxidante activities. *Food Chemestry*, v. 147, p. 17-24, 2014.

JOHNSON, E. J. The role of carotenoida in human health. *Nutrition in Clinical Care*, v. 5, n. 2, p. 56–65, 2002.

KAULMANN, A.; BOHN, T. Carotenoids, inflammation, and oxidative stress—implications of cellular signaling pathways and relation to chronic disease prevention. *Nutrition Research*, v. 34, n. 11, p. 907-929, 2014.

KHALID, M.; BILAL, M.; IQBAL, H. M.; HUANG, D. Biosynthesis and biomedical perspectives of carotenoids with special reference to human health -related applications. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v.17, p.399-407, 2018.

KIM, M.Y.; KIM, E.J.; KIM, Y.V; CHOI, C.; LEE, B.H. Comparison of the chemical compositions and nutritive values of various pumpkin (Cucurbitaceae) species and parts. *Nutrition Research and Practice*, n. 6, p. 21-27, 2012.

KLAUI, H.; BAUERNFEIND, J. C. Carotenoids as food colors. In: BAUERNFEIND, J. C. CH. (Ed). *Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors* 2. New York: Academic Press, 1981, p. 48-317.

KOMAIKO, J.S.; MCCLEMENTS, J.D. Formation of food-grade nanoemulsions using low-energy preparation methods: a review of available methods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v.15, 331-352, 2016.

KOSTÁLOVÁ, Z.; HROMÁDKOVÁ, Z.; EBRINGEROVÁ, A.; POLOVKA, M.; MICHAELSEN, T. E.; PAULSEN, B. S. Polysaccharides from the Styrian oil-pumpkin with antioxidant and complement-fixing activity. *Industrial Crops and Products*, v.41, p. 127–133, 2013.

KULAITIENĖ, J.; ČERNIAUSKIENĖ, J.; JARIENĖ, E.; HDANILČENKO, H.; LEVICKIENĖ, D. Antioxidant Activity and other Quality Parameters of Cold Pressing Pumpkin Seed Oil. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, v. 46, n. 1, p.161-166, 2018.

KVANSAKUL, J.; RODRIGUEZ-CARMONA, M.; EDGAR, D. F.; BARKER, F. M.; KÖPCKE, W.; SCHALCH, W.; BARBUR, J. L. Supplementation with the carotenoids lutein or zeaxanthin improves human visual performance. *Ophthalmic and Physiological Optics*, v. 26, n. 4, p. 362-371, 2006.

LANDRUM, J. T.; BONE, R. A. Lutein, Zeaxanthin, and the Macular Pigment. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 385, n. 1, p. 28–40, 2001.

LI, X., BI, X.; WANG, S.; ZHANG, Z.; LI, F.; ZHAO, A. Z. Therapeutic Potential of ω -3 Polyunsaturated Fatty Acids in Human Autoimmune Diseases. *Frontiers in Immunology*, v.10, 2019.

LOZADA, M. I. O.; MALDONADE, I. R.; RODRIGUES, D. B.; SANTOS, D. S.; SANCHEZ, B. A. O, DE SOUZA, P. E. N.; LONGO, J. P.; AMARO, G. B.; DE LACERDA, L. P. O. Physicochemical Characterization and Nano-Emulsification of Three Species of Pumpkin Seed Oils with Focus on Their Physical Stability, *Food Chemistry*. 128512. (2020).

LOWRY, T. H.; RICHARDSON, K. S. Mechanism and theory in organic chemistry. Editora Harper and Row, 1976

LU, G.H.; GAO, P. Emulsions and Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery. In. KULKARNI, V.S. (Ed.). *Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems*. Elsevier Inc, 2010.

MADIGAN, C; RYAN, M.; OWENS, D.; COLLINS, P.; TOMKIN, G.H. Dietary unsaturated fatty acids in type 2 diabetes: higher levels of postprandial lipoprotein on a linoleic acid-rich sunflower oil diet compared with an oleic acid-rich olive oil diet. *Diabetes Care*, v.23, n .10, p. 1472 – 1477, 2000.

MAISUTHISAKUL, P.; SUTTAJIT, M.; PONGSAWATMANIT, R. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chemistry*, v. 100, n. 4, p. 1409-1418, 2007.

MAJID; A.K; AHMED; Z.; KHAN, R. Effect of pumpkin seed oil on cholesterol fractions and systolic/diastolic blood pressure. *Food Science and Technology*, v.40, n.3, p. 769-777, 2020.

MARIUTTI, L. R. B.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoid esters analysis and occurrence: What do we know so far?. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 648, p. 36–43, 2018.

MARTIN, C. A.; DE ALMEIDA, V. V.; RUIZ, M. R.; VISENTAINER, J. E. L.; MATSHUSHITA, M.; DE SOUZAI, N. E.; VISENTAINER, J. V. V. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Revista de Nutrição*, v.19, n. 6, 2006.

MCCLEMENTS, D. J. Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 47, n. 7, p. 611-649, 2007.

MCCLEMENTS, D. J. Emulsion Design to Improve the Delivery of Functional Lipophilic Components. *Annual Review of Food Science and Technology*, v.1, n.1, p.241–269, 2010.

MCCLEMENTS, D. J. *Food Emulsions: Principles, Practice, and Techniques*. Boca Raton, FL: CRC Press. 632 pp. 2nd ed., 2005.

MCCLEMENTS, D.J.; DECKER, E.A.; PARK, Y. Controlling lipid bioavailability through physicochemical and structural approaches. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 49, n. 2, p. 48 – 67, 2009.

MCCLEMENTS, D. J. Emulsion Design to Improve the Delivery of Functional Lipophilic Components. *Annual Review of Food Science and Technology*, v.1, n.1, p.241–269, 2010.

MCCLEMENTS, D. J.; RAO, J. Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity. *Critical reviews in food science and nutrition*, v. 51, n. 4, p. 285-330, 2011.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A.J.; VICARIO, I.M.; HEREDIA ,F.J. Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v. 54, n. 2, p. 209–215, 2004.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A.J.; MAPELLI-BRAHM, P.; HORNERO-MÉNDEZ, D.; VICARIO, I.M. CHAPTER 1: Structures, Nomenclature and General Chemistry of Carotenoids and Their Esters, In: MERCADANTE, A.Z (Ed.) *Carotenoid Esters in Foods: Physical, Chemical and Biological Properties*, 2019, pp. 1-50

MERCADANTE, A. Z.; RODRIGUES, D. B.; PETRY, F. C.; MARIUTTI, L. R. B. Carotenoid esters in foods - A review and practical directions on analysis and occurrence. *Food Research International*, v. 99, p. 830–850, 2017.

MERTZ, C.; BRAT, P.; CARIS-VEYRAT, C.; GUNATA, Z. Characterization and thermal stability of carotenoids and vitamin C of tamarillo fruit (*Solanum betaceum* Cav.). *Food Chemistry*, v. 119, n. 2, p. 653–659, 2010.

MINGUEZ-MOSQUERA, M. I.; HORNERO-MENDEZ, D. Comparative Study of the Effect of Paprika Processing on the Carotenoids in Peppers (*Capsicum annuum*) of the Bola and Agridulce Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 42, n. 7, p. 1555–1560, 1994.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, v. 7, n. 9, p. 405–410, 2002.

MODARRES-GHEISARI, S.M.; GAVAGSAZ-GHOACHANI, R.; MALAKI, M.; SAFARPOUR, P.; ZANDI, M. Ultrasonic nano-emulsification – A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, v.52, p.88-105, 2019.

MONEGO, D. L.; M.B. DA ROSA, M. B.; DO NASCIMENTO, P. C. Applications of computational chemistry to the study of the antiradical activity of carotenoids: a review. *Food Chemistry*, v. 217, p. 37-44, 2017.

MONTESANO, D.; BLASI, F.; SIMONETTI, M.; SANTINI, A.; COSSIGNANI, L. Chemical and Nutritional Characterization of Seed Oil from *Cucurbita maxima* L. (var. Berrettina) Pumpkin. *Foods*, v. 7, n. 3, p. 30, 2018.

MORRISON, M. C.; MULDER, P.; STAVRO, P. M.; SUÁREZ, M.; AROLA-ARNAL, A.; VAN MURKOVIC, M. Pumpkin Seed oil, in *Gourmet and HealthPromoting Specialty Oils*, Moreau R. A and A. Kamal-Eldin (Eds) AOCS Press, Champaign, Illinois, p. 345–358, 2009.

MORRISON, M. C.; MULDER, P.; STAVRO, P. M.; SUÁREZ, M.; AROLA-ARNAL, A.; VAN DUIVENVOORDE, W.; KOOISTRA, T.; WIELINGA, P.Y.; KLEEMANN, R. Replacement of dietary saturated fat by AGPI-rich pumpkin seed oil attenuates non-alcoholic fatty liver disease and atherosclerosis development, with additional health effects of virgin over refined Oil. *PLOS ONE*, v. 10, n. 9, p.1-19, 2015.

MURKOVIC, M.; HILLEBRAND, A.; WINKLER, J.; LEITNER, E.; PFANNHAUSER, W. Variability of fatty acid content in pumpkin seeds (*Cucurbita pepo* L). *European Food Research and Technology*, v. 203, n. 3, p. 216–219, 1996.

MURKOVIC, M.; PIIRONEN, V.; LAMPI, A. M.; KRAUSHOFER, T.; SONTAG, G. Changes in chemical composition of pumpkin seeds during the roasting process for production of pumpkin seed oil (Part 1: non-volatile compounds). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 84, p. 359–365, 2004.

MURKOVIC, M. Pumpkin Seed Oil. *Gourmet and Health-Promoting Specialty Oils*, 2009. p. 345–358.

NAGYA, V.; DELI, J.; ATTILA AGÓCS, A. Chemical Synthesis of Carotenoid Esters. Food Chemistry, Function and Analysis. In: MERCADANTE, A.Z. *Carotenoid Esters in Foods: Physical, Chemical and Biological Properties*. Royal Society of Chemistry, 2019. p. 68-107.

NAIK, A.; MEDA, V.; LELE, S. S. Application of EPR Spectroscopy and DSC for Oxidative Stability Studies of *Nigella sativa* and *Lepidium sativum* Seed Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91, 935–941, 2014.

NATH, P.; DUTTA, O. P.; VELAYUDHAN, S.; SWAMY, K. R. M. Inheritance of Leaf Characters in Pumpkin (*Cucurbita Maxima* Duch). *Indian Journal of Horticulture*, v. 36, n. 2, p. 171- 174, 1979.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (NIH). Vitamin E, 2020. Disponível em :< <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminE-HealthProfessional/#en6>>. Acesso em: 20 jun. 2020.

NAWIRSKA-OLSZAŃSKA, A.; KITA, A.; BIESIADA, A.; SOKÓŁ-ŁĘTOWSKA, A.; KUCHARSKA, A. Z. Characteristics of antioxidant activity and composition of pumpkin seed oils in 12 cultivars. *Food Chemistry*, v. 139, p. 155-161, 2013.

NEDERAL, S.; ŠKEVIN, D.; KRALJIĆ, K.; OBRANOVIĆ, M.; PAPEŠA, S.; BATALJAKU, A. Chemical composition and oxidative stability of roasted and cold pressed pumpkin seed oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v. 89, p.1763-1770. 2012.

NEDERAL, S.; PETROVIC, M.; VINCEK, D.; PUKEC, D. Variance of quality parameters and fatty acid composition in pumpkin seed oil during three crop seasons. *Industrial Crops and Products*, v. 60, p.15–21, 2014.

NEISES, B; STEGLICH, W. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. *Angewandte Chemie International*, v. 553, n. 7, p. 12–14, 1978.

NGAMWONGLUMLERT, L.; DEVAHASTIN, S. Carotenoids. Encyclopedia of Food Chemistry. L. Melton, F. Shahidi and P. Varelis. Oxford, Academic, p. 40-52, 2019.

NOLAN, J.M.; POWER, R.; STRINGHAM, J.; DENNISON, J.; STACK, J.; KELLY, D.; MORAN, R.; AKUFFO, K.O.; CORCORAN, L.; BEATTY, S. Enrichment of macular pigment enhances contrast sensitivity in subjects free of retinal disease: central retinal enrichment supplementation trials - Report 1, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, n. 57, n. 7, p. 3429-3439, 2016.

NYAM, K.L.; LAU, M.; TAN, C.P. Fibre from Pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) Seeds and Rinds: Physico-chemical Properties, Antioxidant Capacity and Application as Bakery Product Ingredients. *Malaysian Journal of Nutrition*, v. 19, n. 1, p. 99 - 109, 2013.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, n. 10, p. 4619-4626, 2001.

OU, B.; HUANG, D.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J.A.; DEEMER, E.K. Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 11, p. 3122–3128, 2002.

OZTURK, B.; ARGIN, S.; OZILGEN, M.; MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsion delivery systems for oil-soluble vitamins: Influence of carrier oil type on lipid digestion and vitamin D3 bioaccessibility. *Food Chemistry*, v.187, p. 499–506, 2015.

PADOVESI, R.; MANCINI-FILHO, J. Ácidos graxos trans. In: Curi, R.; Pompéia, C.; Miyasaka, C. K.; Procópio, J. Entendendo as gorduras. São Paulo: Manoli; 2002. cap. 36. p. 509-21.

PETKOVA, Z.Y, ANTOVAHANGES, G.A. Changes in the composition of pumpkin seeds (*Cucurbita moschata*) during development and maturation. *Grasas y aceites*, v.66, n.1, p. 1-9, 2015.

PESSOA, H.B.S.V. *Produção de sementes híbridas de abóbora do tipo Tetsukabuto*. Circular Técnica n 12, Brasília: Embrapa -CNPQ, p. 22, 1998.

PINTO, A.L.C.; PAIVA, C.L. Desenvolvimento de uma massa funcional pronta para tortas utilizando o método de Desdobramento da Função Qualidade (QFD). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 30, p. 36-43, 2010.

POPOV, I.; LEWIN, G. Photochemiluminescent detection of antiradical activity; IV: testing of lipid-soluble antioxidants. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 31, p. 1–8, 1996.

PORTUGAL. Ministério da Agricultura, do Mar, do Ambiente e do Ordenamento do Território (MAMAOT) (2012). Catálogo Nacional de Variedades. Direção Geral de Alimentação e Veterinária. Lisboa, p. 1-74. Disponível em

<https://www.drapc.gov.pt/base/documentos/cnv_2012.pdf>. Acesso em: 30 jun. 2020.

POTOČNIK, T.; OGRINC, N.; POTOČNIK, D.; KOŠIR, I. J. Fatty acid composition and $\delta^{13}\text{C}$ isotopic ratio characterisation of pumpkin seed oil. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 53, p. 85–90, 2016.

POTOČNIK, T.; CIZEJ, R. M.; KOŠIR, I. J. Influence of seed roasting on pumpkin seed oil tocopherols, phenolics and antiradical activity. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 69, p. 7-12, 2018.

POTTEL, L.; LYCKE, M.; BOTERBERG, T.; FOUBERT, I.; POTTEL, H.; DUPREZ, F.; GOETHALS, L.; DEBRUYNE, P. R. Omega-3 fatty acids: physiology, biological sources and potential applications in supportive cancer care. *Phytochemistry Reviews*, v.13, p. 223– 244, 2014.

PROCIDA, G.; STANCHER, B.; CATENI, F.; ZACCHIGNA, M. Chemical composition and functional characterisation of commercial pumpkin seed oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 93, n.5, p.1035–1041, 2012.

PRIOR, R. L.; HOANG, H.; GU, L.; WU, X.; BACCHIOCCA, M.; HOWARD, L.; HAMPSCH-WOODILL, M.; HUANG, D.; OU, B.; JACOB, R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, n. 11, p. 3273-3279, 2003.

QIAN, C.; DECKER, E. A.; XIAO, H.; MCCLEMENTS, D. J. Physical and chemical stability of β -carotene-enriched nanoemulsions: Influence of pH, ionic strength, temperature, and emulsifier type. *Food Chemistry*, v.132, n. 3, p. 1221-1229, 2012.

RACZYK, M.; SIGER, A.; RADZIEJEWSKA-KUBZDELA, E.; RATUSZ, K.; RUDZIŃSKA, M. Roasting pumpkin seeds and changes in the composition and oxidative stability of cold-pressed oils. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*. v. 16, n. 3, p. 293–301, 2017.

RAO, J.; DECKER, E. A.; XIAO, H.; MCCLEMENTS, D. J. Nutraceutical nanoemulsions: influence of carrier oil composition (digestible versus indigestible oil) on β -carotene bioavailability. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 93, n. 13, p. 3175–3183, 2013.

RAMOS, S. R. R.; LIMA, N. R. S.; ANJOS, J. L.; CARVALHO, H. W. L.; OLIVEIRA, I. R.; SOBRAL, L. F.; CURADO, F. F. Aspectos técnicos de cultivos de abóbora na região do nordeste do Brasil, Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2010.

REHMAN, A.; TONG, Q.; JAFARI, S. M.; ASSADPOUR, E.; SHEHZAD, Q.; AADIL, R. M.; ASHRAF, W. Carotenoid-loaded nanocarriers: A comprehensive review. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 275, 2020.

RABRENOVIĆ, B. B.; DIMIĆ, E. B.; NOVAKOVIĆ, M. M.; TEŠEVIĆ, V. V.; BASIĆ, Z. N. (2014). The most important bioactive components of cold pressed oil from different pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seeds. *LWT - Food Science and Technology*, 55(2), 521–527.

RESENDE, G. M.; BORGES, R. M. E.; GONÇALVES, N. P. S. Produtividade da cultura da abóbora em diferentes densidades de plantio no Vale do São Francisco. *Horticultura Brasileira*, v. 31, p. 504-508, 2013.

REZIG, L.; CHOUAIBI, M.; MSAADA, K.; HAMDY, S. Chemical composition and profile characterisation of pumpkin (*Cucurbita maxima*) seed oil. *Industrial Crops and Products*, v. 37, p. 82–87, 2012.

RIBAYA-MERCADO, J.D.; BLUMBERG, J.B. Lutein and zeaxanthin and their potential roles in disease prevention. *Journal of the American College of Nutrition*, v. 23, n.6, p.567s -587s. 2004.

RIZZO, A. M., BERSELLI, P., ZAVA, S., MONTORFANO, G., NEGRONI, M., CORSETTO, P., & BERRA, B. Endogenous Antioxidants and Radical Scavengers. In: GIARDI M.T., REA G., BERRA B. (Ed.) *Bio-Farms for Nutraceuticals. Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer: Boston, MA. 2010, p 57-97;

RODRIGUES, D. B.; MARIUTTI, L. R. B.; MERCADANTE, A. Z. Two-step cleanup procedure for the identification of carotenoid esters by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1457, p. 116–124, 2016.

RODRIGUES, D. B.; MERCADANTE, A. Z.; MARIUTTI, L. R. B. Marigold carotenoids: Much more than lutein esters. *Food Research International*, v. 119, p. 653-664, 2018.

RODRÍGUEZ–CRUZ, M; TOVAR, A.R; DEL PRADO, M; TORRES, N. Mecanismos moleculares de acción de los ácidos grasos poliinsaturados y sus beneficios en la salud. *Revista de Investigación Clínica*, v.57, n.3, 2005

SABERI, A. H.; FANG, Y.; MCCLEMENTS, D. J. Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: Factors affecting particle size using using spontaneous emulsification. *Jornal of Colloid and Interface Science*, v. 391, p. 95-102, 2013.

SAINI, R. K.; NILE, S. H.; PARK, S. W. Carotenoids from fruits and vegetables: Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. *Food Research International*, v. 76, p. 735–750, 2015.

SANTOS, D, S. Desenvolvimento e avaliação do potencial antioxidante in vitro de nanoformulações contendo óleo do fruto *Orbignya phalerata* Martius. 2015. Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia), Universidade de Brasília, Brasília, 114 p.

SIMOPOULOS, A.P., SALEM, N. Fatty acids and lipids from cell biology to human disease. *Lipids* 31, S1 (1996).

SARI, T. P.; MANN, B.; KUMAR, R.; SINGH, R. R. B.; SHARMA, R.; BHARDWAJ, M.; ATHIRA, S. Preparation and characterization of nanoemulsion encapsulating curcumin. *Food Hydrocolloids*, v. 43, p. 540–546, 2015.

SCHINAS, P.; KARAVALAKIS, G.; DAVARIS, C.; ANASTOPOULOS, G.; KARONIS, D.; ZANNIKOS, F.; STOURNA, S.; LOIS, E. Pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seed oil as an alternative feedstock for the production of biodiesel in Greece. *Biomass and Bioenergy*, v. 33, n. 1, p. 44-49, 2009.

SCHUCHARDT, J. P.; HUSS, M.; STAUSS-GRABO, M.; HAHN, A. Significance of long-chain polyunsaturated fatty acids (AGPIs) for the development and behaviour of children. *European Journal of Pediatrics*, v. 169, n.149–164, 2010.

SCHWEIGGERT, U.; KURZ, C.; SCHIEBER, A.; CARLE, R. Effects of processing and storage on the stability of free and esterified carotenoids of red peppers (*Capsicum annuum* L.) and hot chilli peppers (*Capsicum frutescens* L.). *European Food Research and Technology A*, v. 225, n. 2, p. 261–270, 2007.

SEGOVIA, L. F.O.; ALVES, R. M. M. Recomendações técnicas para o cultivo de Abóbora (*Cucurbita moschata* L.) no Amapá-Macapá. Circular Técnica n 08, Embrapa Amapá, p. 22, 1999.

SEMBA, R.D.; DAGNELIE, G. Are lutein and zeaxanthin conditionally essential nutrients for eye health?. *Medical Hypotheses*, v. 61, n. 4, p. 465-472, 2003.

SESHADRI, V. S. Cucurbits. *Indian Horticulture*, v. 33, n. 4, p. 28-30, 1989

SHAHIDI, F.; NACKZ, M. Phenolics in food and Nutraceuticals. *CRC Press*, p. 403-427, 2004.

SHANMUGAPRIYA, K.; KIM, H.; KANG, H. W. *In vitro* antitumor potential of astaxanthin nanoemulsion against cancer cells via mitochondrial mediated apoptosis. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 560, p. 334-346, 2019.

SIANO, F.; STRACCIA, M.C.; PAOLUCCI, M.; FASULO, G.; BOSCAINO, F.; VOLPE, M.G. Physico-chemical properties and fatty acid composition of pomegranate, cherry and pumpkin seed oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 96, p.1730–1735, 2016.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*, v. 215, n. 2, p. 213–219, 1993.

SIKORA, E.; CIESLIK, E.; LESZCZYNSKA, T.; FILIPIAK-FLORKIWUACZ, A.; PISULEWSKI, P. M. The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing. *Food Chemistry*, v. 107, p. 50-55, 2008.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S.; KOBLITZ, A. G. B. Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SIMOPOULOS, A. P. Essential fatty acids in health and chronic disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 70, Edição 3, 1999.

SOLANS, C.; IZQUIERDO, P.; NOLLA, J.; AZEMAR, N.; GARCIACELMA, M. Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 10, n. 3-4, p. 102–110, 2005.

SOUZA, M.; LÚCIO, A.; STORCK, L.; CARPES, R.; SANTOS, P.; SIQUEIRA, L. Tamanho da amostra para peso da massa de frutos, na cultura da abóbora italiana em estufa plástica. *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 8, n. 2, p. 123-128, 2002.

STARK, A.; MADAR, Z. Dietary fiber. In: GOLDBERG, I. *Functional foods*. New York: Editora Chapman and Hall, 1994. Cap.3, p.183-201.

STEVENSON, D.; ELLER, F.J.; WANG, L.; JANE, J.-L.; WANG, T. Oil and tocopherol content and composition of pumpkin seed oil in 12 Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, n. 10, p. 4005-4013, 2007.

STRAUB, O. *Key to Carotenoids*. 2nd ed., Birkhauser: Basel, 1987.

SUBAGIO, A.; WAKAKI, H.; MORITA, N. Stability of lutein and its myristate esters. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 63, p. 1784–1786, 1999.

SUN, Y., MA, G., YE, X., KAKUDA, Y., & MENG, R. Stability of all-trans- β -carotene under ultrasound treatment in a model system: Effects of different factors, kinetics and newly formed compounds. *Ultrasonics Sonochemistry*, v.17, n. 4, 654–661, 2010.

SURH, J.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. Utilisation of spontaneous emulsification to fabricate lutein-loaded nanoemulsion-based delivery systems: Factors influencing particle size and colour. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 52, n. 6, p. 1408-1416, 2017.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 108–109, p. 303–318, 2004.

TAKEMOTO, E.; TEIXEIRA FILHO, J. T.; GODOY, H. T. Validação de metodologia para a determinação de antioxidantes sintéticos em óleos vegetais, margarinas e gorduras hidrogenadas por clareamento/UV. *Química Nova*, v. 32, n.5, p. 1189-1195, 2009.

TAN, C. P.; NAKAJIMA, M. β -Carotene nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation. *Food Chemistry*, v. 92, n. 4, p. 661–671, 2005.

TAPIERO, H.; TOWNSEND, D.; TEW, K. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 58, n.2, p.100–110. 2004.

TARVER, T. Food nanotechnology. *Food Technology*, v. 60, n. 11, p. 22-26, 2006.

TEO, S.Y.; LEE, S.Y.; ONG, H.L.; ONG, C.L.; GAN, S.N.; RATHBONE, M.J.; COOMBES, A.G.A. Evaluation of biosourced alkyd nanoemulsions as drug carriers. *Journal of Nanomaterials*, v.2015, p.1–8, 2015.

TIVIERON, A. P. Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidas no Brasil. 2010. Dissertação (Mestrado em ciência e tecnologia de alimentos). 103 p. Universidade de São Paulo escola superior de agricultura Luiz de Queiroz. Piracicabana.

TÜRKMEN, Ö.; ÖZCAN, M. M.; SEYMEN, M.; PAKSOY, M.; USLU, N.; FIDAN, S. Physico-chemical properties and fatty acid compositions of some edible pumpkin seed genotypes and oils. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, v. 23, n. 4, p. 229-235, 2017.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio,

antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quimica Nova*, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007

WEIGEL, F.; WEISS, J.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. Lutein-enriched emulsion-based delivery systems: Influence of emulsifiers and antioxidants on physical and chemical stability. *Food Chemistry*, v. 242, p. 395-403, 2018.

WEIR, N. L.; NOMURA, S. O.; STEFFEN, B. T.; GUAN, W., KARGER, A. B.; KLEIN, R.; KLEIN, E.K; COTHIC, F.M.; TSAI, M. Y. Associations between omega-6 polyunsaturated fatty acids, hyperinsulinemia and incident diabetes by race/ethnicity: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Clinical Nutrition*. v.39, n.2020, p. 3031-3014, 2020.

WHITAKER, T. W.; DAVIS, G. N. Cucurbits: Botany, cultivation on utilization. London: Hill, 250 p. 1962.

WHITAKER, T. W.; ROBINSON, R. W. Squash breeding. In: BASSET, M. J. ed. Breeding vegetable crops. Westport: AVI, p. 209-246, 1986.

WILLCOX, J. K.; ASH, S. L.; CATIGNANI, G. L. Antioxidants and Prevention of Chronic Disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 44, n. 4, p. 275–295, 2004.

WYSS A, WIRTZ G, WOGGON W, BRUGGER R, WYSS M, FRIEDLEIN A, BACHMANN H, HUNZIKER W. Cloning and expression of beta,beta carotene 15,15'-dioxygenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 271, n. 2 p. 334–336, 2000.

WONG, W.L.; SU, X.; LI, X.; CHEUNG, C.M.; KLEIN, R.; CHENG, C.Y.; WONG, T. Y. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden

projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis, *The Lancet. Global Health*, v. 2, n. 2, p. e106-e116, 2014.

WOOSTER, T. J.; GOLDING, M.; SANGUANSRI, P. Impact of Oil Type on Nanoemulsion Formation and Ostwald Ripening Stability. *Langmuir*, v. 24, n. 22, p. 12758–12765, 2008.

XIONG, X.; CAO, J. Study of extraction and isolation of effective pumpkin polysaccharide component and its reducing glycemia function. *Chinese Journal Modern Application Pharmacy*, v.18, p. 662-664, 2001.

YANG, S.; ZHOU, Q.; YANG, L.; XUE, Y.; XU, J.; XUE, C. Effect of Thermal Processing on Astaxanthin and Astaxanthin Esters in Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Oleo Science*, v. 64, n. 3, p. 243–253, 2015.

YOU DIM, K. A.; MARTIN, A.; JOSEPH, J. A. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v. 18, n. 4-5, p. 383-99, 2000.

YOUNIS, Y. M. H.; GHIRMAY, S.; AL-SHIHRY, S. S. African *Cucurbita pepo* L.: properties of seed and variability in fatty acid composition of seed oil. *Phytochemistry*, v. 54, n. 1, p. 71-75, 2000.

YOUNG, J. C.; ABDEL-AAL, E.-S. M.; RABALSKI, I.; BLACKWELL, B. A. Identification of Synthetic Regioisomeric Lutein Esters and Their Quantification in a Commercial Lutein Supplement. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, n. 13, p. 4965–4972, 2007.

ZIELINSKA, M. A.; WESOLOWSKA, A.; PAWLUS, B.; HAMULKA, J. Health Effects of Carotenoids during Pregnancy and Lactation. *Nutrients*, v. 9, n. 8, p. 25, 2017.

ZHOU, Y.; WANG, T .; ZHAI, S .; LI, W .; MENG, Q. Linoleic acid and breast cancer risk: A meta-analysis. *Public Health Nutrition*. v.19, p.1457–1463, 2016.

ZULUETA, A.; ESTEVE, M.J.; FRÍGOLA, A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, v. 114, n. 1, p. 310-316, 2009.

CAPITULO II

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E NANOEMULSIFICAÇÃO DE TRÊS ESPÉCIES DE ÓLEOS DE SEMENTES DE ABÓBORA COM FOCO NA SUA ESTABILIDADE FÍSICA

RESUMO¹

Apresentamos a composição química, os parâmetros de qualidade e a capacidade antioxidante dos óleos de semente de abóbora (OSA) de *Cucurbita pepo*, *Cucurbita máxima* e *Cucurbita moschata* jacarezinho cultivados no Brasil. Além disso, nanoemulsões de OSA (nanopepo, nanomax e nanomosc) foram desenvolvidas e suas estabilidades físicas foram avaliadas em armazenamento de longo prazo em duas temperaturas (4 e 45 °C). Dentre os OSA, *C. pepo* apresentou os maiores teores de ácidos graxos poliinsaturados, carotenoides totais e clorofilas, mas a menor estabilidade oxidativa. Por outro lado, *C. maxima* OSA apresentou maior estabilidade oxidativa e teor de tocoferol total, mas o menor teor de clorofila. Nanomax e nanopepo foram mais estáveis ao crescimento de gotículas a 4 °C, enquanto nanomosc foi mais estável a 25 °C. Nanopepo foi a formulação mais estável após os ciclos de aquecimento-resfriamento, enquanto nanomax foi a mais estável sob centrifugação independentemente da temperatura. No geral, todas as nanoemulsões apresentaram diâmetro de gotícula inferior a 200 nm e potencial ζ próximo a -30 mV até o final do armazenamento (120 dias).

Palavras-chave: óleo de semente de abóbora; ácidos graxos poli-insaturados; tocoferol; emulsificação de baixa energia; nanoemulsões de óleo em água; armazenamento de longo prazo.

¹ Artigo publicado na Revista Food Chemistry em 07/Nov./2020, doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128512.

1. INTRODUÇÃO

A abóbora (*Cucurbita* spp.) é uma hortaliça pertencente à família das Curcubitaceas, que inclui cerca de 27 espécies. *Cucurbita pepo*, *Cucurbita máxima* e *Cucurbita moschata* estão entre as maiores produzidas, principalmente nos países em desenvolvimento, onde são alimentos básicos e importantes. Recentemente, o óleo comestível obtido das sementes de abóbora (óleo de semente de abóbora, OSA) tem despertado interesse devido ao crescente número de estudos que associam seu consumo a benefícios à saúde em algumas condições como aterosclerose (MORRISON et al., 2015), hipertrofia prostática (GOSSELL-WILLIAMS; DAVIS; O'CONNOR, 2006) e disfunção urinária (NISHIMURA, et al., 2014). Além disso, as atividades antioxidantes, hipoglicêmicas e hipolipidêmicas foram descritas (ABD-ELNOOR, 2019; CUCO et al., 2019). Esses efeitos têm sido associados principalmente aos compostos bioativos presentes no OSA, como carotenoides e tocoferóis (RABRENOVIC et al., 2014; CUCO et al., 2019).

A crescente demanda por produtos naturais saudáveis tem fomentado o mercado de suplementos dietéticos de OSA, com a oportunidade de desenvolvimento de formulações diversificadas para atender às necessidades do consumidor. Além disso, o OSA tem potencial para ser mais amplamente utilizado em produtos alimentícios, considerando suas propriedades nutricionais e de saúde. A emulsificação em sistemas nanoestruturados (<200 nm) tem sido reconhecida como uma alternativa eficaz para superar as dificuldades tecnológicas relacionadas à incorporação de óleos a granel em produtos alimentícios à base de água, devido ao seu caráter lipofílico (MCCLEMENTS, 2007). Portanto, com o desenvolvimento das nanoemulsões de OSA, esse óleo poderia ser mais prontamente incorporado em diferentes preparações. Além disso, as nanoemulsões de OSA podem ser usadas como um veículo para a entrega de compostos bioativos solúveis em gordura ou outros lipófilos alvo incorporados na fase de óleo (MCCLEMENTS; RAO, 2011), ou como uma formulação base para a preparação de emulsões de excipientes (MCCLEMENTS; XIAO, 2014).

As nanoemulsões podem ser produzidas por métodos de alta e baixa energia. O método de temperatura de inversão de fase (PIT) é uma abordagem de baixa energia com base na mudança na curvatura do surfactante ou no equilíbrio lipofílico-hidrofílico de alguns surfactantes não iônicos induzido pela temperatura (KOMAIKO;

MCCLEMENTS, 2016). Como resultado, a afinidade do surfactante é trocada em direção ao óleo ou à fase aquosa, promovendo a inversão de uma emulsão óleo em água (O/A) para uma emulsão água-em-óleo (A/O) ou vice-versa (MORALES et al., 2003). O processo básico consiste em aquecer a mistura de surfactante-óleo-água para cerca ou acima da temperatura de inversão de fase, em que a afinidade do surfactante para as fases de água e óleo é balanceada e invertida e, em seguida, a temperatura do sistema é diminuída rapidamente sob agitação para produzir gotas finas. Este método não requer nenhum equipamento especializado, permitindo assim a produção de sistemas nanoestruturados com baixo custo (MCCLEMENTS; RAO, 2011).

As nanoemulsões são dispersões coloidais metaestáveis e o conhecimento sobre seu comportamento físico em diferentes condições de armazenamento é uma etapa inicial, mas crucial para o desenvolvimento de formulações estáveis (MCCLEMENTS; RAO, 2011). No entanto, o desenvolvimento e a estabilidade de formulações de nanoemulsão contendo OSA são pouco explorados na literatura. Além disso, embora a caracterização de alguns OSA já tenha sido relatada na literatura, sua composição química e parâmetros de qualidade podem variar, por exemplo, dependendo do genótipo da abóbora, das condições edafoclimáticas e dos métodos de extração (CAN-CAUICH et al., 2019). Nessa perspectiva, o objetivo deste trabalho foi determinar a composição de compostos lipofílicos, os parâmetros de qualidade e a capacidade antioxidante do OSA não refinado de três espécies de abóbora produzidas no Brasil: *C. máxima* (Moranga), *C. pepo* (Abobrinha) e *C. moschata* (Abobora). Além disso, formulações de nanoemulsão contendo OSA de cada cultivar foram desenvolvidas usando um método PIT de baixa energia e suas estabilidades físicas foram avaliadas em diferentes condições experimentais durante um armazenamento a longo prazo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Químicos e materiais

Padrões de δ -tocoferol e α -tocoferol (90%, HPLC) e (all-E) β -caroteno (95%, HPLC) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), enquanto γ -tocoferol (99%, HPLC) foi adquirido da Merck (Darmstadt, Alemanha). O padrão mix FAME

(Supelco, EUA) foi gentilmente doado pela Professora Neura Bragagnolo (UNICAMP, Brasil). DPPH^{*} (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), TPTZ (2,4,6-Tri (2-piridil) -s-triazina), AAPH (2,2-azobis (2-amidino-propano) dicloridrato), Trolox, fluoresceína, Solutol[®] HS 15, Tween 80 e Span 80 foram adquiridos à Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Os outros reagentes analíticos e de qualidade para HPLC foram obtidos na Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha).

2.2. Amostras

Sementes de três espécies de abóbora, *C. moschata jacarezinho*, *C. maxima* e *C. pepo* foram fornecidas pela Embrapa Hortaliças (Gama, Brasília-DF, Brasil - 15,93° S; 48,15° W) em setembro de 2017. Abóboras maduras foram colhidas e as sementes separadas manualmente, lavadas com água e secas ao sol, até que fosse avaliado o teor de umidade de 10% (g/100 g fw) (AOAC, 1988). Finalmente, as sementes foram armazenadas a 4 °C em sacos de polietileno na ausência de luz até a extração do óleo.

2.3. Extração de óleo

Quarenta gramas de sementes de cada espécie de abóbora foram triturados separadamente em misturador (Thermomixtm, SP, Brasil), peneirados (peneira padrão Bronzinox, nº 45-0,4 mm, SP, Brasil) e imediatamente submetidos à extração sólido-líquido. Os óleos das sementes foram extraídos com éter de petróleo (200 mL) em aparelho Soxhlet por 5 ha 60 °C. Após a conclusão da extração do óleo, o solvente orgânico foi evaporado em um evaporador rotatório (T <40 °C, Tecnal-TE210, Brasil) e o óleo foi armazenado em atmosfera de N₂ no escuro a 4 °C.

2.4. Caracterização química do OSA

2.4.1. Composição de ácidos graxos (AG) por GC-MS

Os FA foram esterificados de acordo com a metodologia de Christie (1989) e os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) foram analisados por cromatografia gasosa. Resumidamente, as amostras de cada óleo foram saponificadas (0,5 M KOH

em metanol) a 70 °C por 5 min e os ácidos graxos foram esterificados pela adição de trifluoreto de boro em metanol (14%, v/v) com aquecimento (70 °C) por mais 5 min. Em seguida, foi adicionada uma solução saturada de cloreto de sódio e hexano de qualidade para HPLC. A mistura foi centrifugada a 12000 rpm durante 10 min. Em seguida, o sobrenadante foi coletado, seco sob N₂ e armazenado a -18 °C até a análise cromatográfica.

Os extratos (sobrenadantes) contendo os FAME foram ressuspensos em hexano e filtrados (0,45 µm - Millipore, MA, EUA), antes de serem injetados (1 µL) no GC-MS (GCMS-QP2010, Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com um injetor automático (AOC-5000). Os compostos foram separados em uma coluna DB-23 (60 m x 0,25 mm ID, 0,25 µm de espessura de fase estacionária, J&W Scientific 122-2362), usando hélio como gás de arraste a 0,49 mL/min. Foi usado um injetor Split (1:200). A temperatura do forno foi mantida a 140 °C durante 5 min, depois aumentada para 240 °C a uma taxa de 2 °C por min. A temperatura do injetor e do detector foi ajustada em 260 °C, enquanto a temperatura da fonte de íons foi de 200 °C. O modo de ionização foi usado no impacto eletrônico de 0,86 kV; e o espectrômetro de massa foi ajustado para varrer na faixa de massa de 40-600 m/z. A identificação do FA das amostras de óleo foi realizada por comparação com a ordem de eluição, tempo de retenção e características do espectro de massa da mistura de padrões (Supelco 37 componente FAME mix). Os resultados foram expressos em porcentagem da área de cada AG em relação à área de AG total.

2.4.2. Extração e análise de carotenoides por HPLC-DAD

Para a extração de carotenoides, 5 g de OSA e 20 mL de acetona foram transferidos para o tubo de ensaio e a mistura foi agitada por 2 h a 4 °C no escuro (1.000 rpm, NI 1232 - Dubnoff, Nova Instruments, SP, Brasil), antes da centrifugação (4.000 rpm, 10 min, 4 °C - Thermo Electro Corporation, Solvall RC 6 plus, EUA). O extrato foi particionado em éter de petróleo e saponificado com hidróxido de potássio em metanol (40%, p/v) por 2 h a 25 °C. Após centrifugação (8.000 rpm por 30 min a 4 °C), o sobrenadante foi coletado e seco sob N₂ e armazenado a -20 °C até a análise cromatográfica.

Os carotenoides foram analisados por cromatografia líquida usando uma cromatografia Shimadzu (Kyoto, Japão) equipada com um detector de arranjo de

diodos (SPD-M20A). A separação foi realizada em coluna C18 (4,6 x 150 mm x 5 µm, Thermo Scientific, EUA) mantida a 25 °C em condições isocráticas. A fase móvel consistia em uma mistura de acetonitrila: metanol: acetato de etila (8: 1: 1, v/v/v), e a taxa de fluxo foi fixada em 0,8 mL/min. Os carotenoides foram identificados considerando a informação combinada fornecida pelo tempo de retenção e ordem de eluição em C18, características do espectro UV-Vis, co-cromatografia com padrões e comparação com dados da literatura (CAN-CAUICH et al., 2019). A quantificação foi realizada usando uma curva analítica externa de β-caroteno. Os resultados foram expressos em µg de β-caroteno/100 g de óleo.

2.4.3. Composição de tocoferol por HPLC-FL

Amostras de óleo foram diluídas com isopropanol: acetonitrila (7:3, v/v), filtradas (0,45 µm - Millipore, MA, EUA) e analisadas por sistema de HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japão) com detector de fluorescência (FL) (RF-20A). A separação foi realizada a 25 °C em coluna C18 (4,6 x 150 mm x 5 mm, Thermo Scientific, Hypersil ODS, EUA). Um gradiente linear de acetonitrila: metanol: isopropanol foi aplicado de 50:40:10 (v/v/v) nos primeiros 10 min, linearmente alterado para 30: 65: 5 (v/v/v) até 33 min, mantendo-se nessa proporção por 12 min e retornou às condições iniciais em 5 min. A taxa de fluxo foi de 1 mL/min. Comprimentos de onda de 290 nm e 330 nm foram usados para excitação e emissão, respectivamente. A identificação foi realizada por comparação com o tempo de retenção e espectros de padrões autênticos. A quantificação foi realizada por meio das curvas de calibração de δ-tocoferol, α-tocoferol e γ-tocoferol. Os resultados foram expressos em mg/100 g de óleo.

2.4.4. Conteúdo de clorofila

O conteúdo de clorofila foi estimado usando um método padronizado (Cc 13d-55, AOCS 1988). A amostra de óleo foi homogeneizada, filtrada (0,45 µm - Millipore, MA, EUA) e a absorbância medida a 630, 670 e 710 nm (Espectrofotômetro Agilent 8453, SC, EUA). O conteúdo de clorofila foi calculado usando a seguinte equação:

$$C(\text{mg feofitina } a / \text{kg of oil}) = 345.3 * \frac{A_{670} - 0,5 * A_{630} - 0,5 * A_{710}}{L} \quad \text{Equação 1}$$

Onde L é o comprimento do percurso óptico em mm da cubeta, e A670, A630 e A710 são unidades de absorbância da amostra, medidas em 630, 670 e 710 nm, respectivamente. O conteúdo total de pigmentos de clorofila foi expresso em mg feofitina a/kg de óleo.

2.5. Caracterização físico-química e parâmetros de qualidade do OSA

Os parâmetros de qualidade do OSA foram avaliados de acordo com os métodos oficiais (AOCS, 1997). O valor de peróxido (VP) (Cd 8-53), o valor de iodo (Cd 1-25), o valor de saponificação (Cd 3-25) e o valor de acidez (Cd 3d-63) foram determinados por titulação. O valor de p-anisidina (pAV) foi determinado espectrofotometricamente (Cd 18-90) e o valor de Oxidação Total (TOTOX) foi calculado de acordo com a fórmula $(2 \cdot VP + pAV)$ (SHAHIDI; ZHONG, 2005). A estabilidade oxidativa de cada óleo foi determinada medindo o tempo de indução de oxidação (TI) em um dispositivo Rancimat (Metrohm 873 Biodiesel Rancimat, SP, Brasil) seguindo o método de Hadorn e Zurcher (1974). A amostra de óleo (3 g) foi aquecida a 110 °C a uma taxa de ar de 20 L/h, a condutividade foi medida continuamente e o tempo de indução foi determinado.

A cor das amostras de óleo foi avaliada por meio de um colorímetro HunterLab (Hunter Color Quest XE, VA, EUA). Uma alíquota de cada óleo foi transferida para uma cubeta de vidro e a cor foi medida contra um fundo preto em unidades Hunter de claridade ou luminosidade (L^*), vermelhidão (a^*) e amarelecimento (b^*). Posteriormente, o parâmetro de saturação (croma, C^*) e o ângulo de Hue (h) foram calculados usando as seguintes equações:

$$h = \tan^{-1} \left(\frac{a}{b} \right) \quad \text{Equação 2}$$

$$C^* = ((a^*)^2 + (b^*)^2)^{\frac{1}{2}} \quad \text{Equação 3}$$

2.6. Capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante foi determinada pelos métodos DPPH, ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) e FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*).

O DPPH foi avaliado pela Espectroscopia de ressonância paramagnética (ERP). Em resumo, o DPPH foi dissolvido em 5 mL de etanol (concentração final de 125 $\mu\text{mol/L}$) como radical livre. O óleo em diferentes concentrações (2500, 25000 e 75000 $\mu\text{g/mL}$ de óleo) foi adicionado à solução de DPPH. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 60 min e protegido da luz. Posteriormente, 50 μL de cada amostra foi colocado em microcapilares e congelado em nitrogênio líquido até sua leitura. Os dados de ERP foram capturados por um espectrômetro Bruker Bio Spin, Modelo EMX Plus, em uma banda de 9,35 GHz, com campo de modulação de 10 G e 100 kHz. A potência das microondas foi de 20 mW, com ganho no Receptor de 30 dB, tempo de varredura de 5 s, largura de 100 G e 6 varreduras. Os resultados foram expressos em % de inibição de DPPH (FERREIRA-NUNES et al., 2018).

O ORAC foi realizado com o método adaptado de Ou, Hampsch-Woodill e Prior (2001). Em síntese, 50 μL de amostra e 150 μL de uma solução de fluoresceína (63 mM/L) e 25 μL de tampão foAGSto (pH 7,4) foram transferidos para uma microplaca preta de 96 poços (Black Immunoplate (Fluoro-e Lumino-Plate) SPL, Ciencor, Brasil). Após o tempo de incubação (10 min/37 °C protegido pela luz), 50 μL de uma solução AAPH (178 mM/L) foram adicionados e a fluorescência foi lida imediatamente a 515 nm (λ_{ex} : 490 nm). A perda de fluorescência foi seguida a cada minuto por 2 h a $37 \pm 0,1$ °C, com 5 seg de agitação antes de cada medição. O resultado foi expresso em $\mu\text{mol Trolox equivalente/g}$ óleo.

O ensaio de poder antioxidante redutor férrico (FRAP) dos OSA foi realizado de acordo com o método de Pulido. Bravo e Saura-Calixto (2000) com algumas modificações. A solução de reagente FRAP consistiu em tampão acetato de 0,3 mM, TPTZ 10 mM e solução de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 20 mM. Aproximadamente 270 μL do reagente FRAP foi misturado com a amostra (90 μL). Em seguida, colocou-o no banho maria a 37 °C por 30 minutos e realizou uma leitura de absorbância a 595 nm. Os resultados foram expressos em μMol de trolox equivalente/g, calculado a partir da curva de calibração.

2.7. Formulação e preparação das nanoemulsões

As nanoemulsões (2,5 mg de OSA/mL de emulsão) foram preparadas usando OSA obtido de *C. pepo* (nanopepo), *C. maxima* (nanomax) e *C. moschata*

(nanomosc). Testes de avaliação macroscópica preliminares foram realizados para escolher um surfactante apropriado (entre Tween 80, Span 80 e Solutol[®] HS15) e determinar as quantidades dos outros componentes. A estabilidade da emulsão OSA foi avaliada por meio de observação visual em direção à separação gravitacional, creme, floculação ou coalescência por 15 dias em temperatura ambiente (Anexo 1).

Com base nesses testes, Solutol[®] HS 15 foi escolhido como o surfactante (tensoactivo) para preparar as nanoemulsões finais, uma vez que nenhuma separação física foi notada visualmente durante o período de teste. As nanoemulsões óleo-em-água (O/A) foram preparadas com base no método PIT (MONGE-FUENTES et al., 2017) com adaptações.

A fase oleosa foi composta por OSA (100 mg) de determinada espécie e óleo de mamona (25 mg), os quais foram homogeneizados sob agitação constante (300 rpm) por 5 min à temperatura ambiente com o surfactante Solutol[®] HS 15 (350 mg, previamente fundido a 30 °C). O uso de óleo de mamona ou sua mistura com outros lipídios é relatada para produzir uma diminuição da viscosidade do óleo de rícino e a tensão interfacial da fase oleosa (JUMMA; MULLER, 1998; ARAÚJO et al., 2011). O óleo de rícino é composto principalmente de ácido ricinoléico, um ácido graxo monoinsaturado que apresenta um grupo funcional hidroxila, o que torna esse óleo menos apolar. Isso poderia facilitar a dispersão da fase oleosa na água e facilitar a formação de nanoemulsão. Então, por causa disso, o óleo de mamona foi usado no óleo fase do presente estudo. Também foi relatado que os ácidos graxos livres contidos no o óleo de mamona pode atuar como co-surfactante, sendo um fator estabilizador adicional (YAMAGUCHI et al., 1995; JUMMA; MULLER, 1998).

A fase aquosa, consistindo em 25 mL de água ultrapura, foi aquecida a 70 °C e misturada à fase oleosa para formar uma emulsão grosseira. O sistema permaneceu sob agitação (300 rpm) em agitador magnético de placa quente até atingir 80 °C ± 2 °C, com a formação de uma emulsão com aspecto turvo. Em seguida, mais 15 mL de água fria (4 °C) foram adicionados e o sistema foi rapidamente resfriado a 4 °C em um banho de gelo sob agitação constante para obter uma nanoemulsão O/A translúcida. Para cada espécie de OSA, 2 lotes de amostras foram preparados à temperatura ambiente, em triplicata. Uma triplicata foi armazenada a 4 °C e o outro a 25 °C, por 120 dias ao abrigo da luz.

2.8. Caracterização das nanoemulsões de OSA

2.8.1. Medições de tamanho de partícula

O tamanho das gotículas de nanoemulsão (diâmetro hidrodinâmico) e o índice de polidispersão (IPD) foram medidos por espalhamento dinâmico da luz, enquanto o potencial zeta (potencial ζ) foi medido por mobilidade eletroforética. As nanoemulsões foram diluídas com água ultrapura (1:10 v/v) antes da análise para evitar múltiplos efeitos de espalhamento. As medições foram realizadas em um Zetasizer (ZEN3690, Malvern Instruments, England, UK) usando ângulo de espalhamento de 90 °.

2.8.2. Medição de pH

O pH foi medido com pHmetro (NTPHM, Nova Técnica, SP, Brasil). A estabilidade das nanoemulsões, colocadas em tubo de ensaio transparente (McClements, 2007).

2.8.3. Microscopia eletrônica de transmissão de emissão de campo (FE-TEM)

A morfologia e a estrutura das gotículas de nanoemulsão de OSA foram registradas por microscopia eletrônica de transmissão de emissão de campo (FE-TEM, JEM-1011; JEOL, Tóquio, Japão). Nanoemulsões de OSA (3 μ L) foram espalhadas em uma grade ultrafina de TEM por 10 seg, em seguida, o reagente de tetróxido de ósmio foi usado para contraste negativo e observado após secagem (24 h). Finalmente, as grades de TEM foram secas durante a noite a 25 °C. A morfologia das gotas de óleo foi, então, observada com ampliação de 5x e 15x a uma tensão de aceleração operacional de 80 kV.

2.9. Ensaio de estabilidade física

2.9.1. Determinação da estabilidade das nanoemulsões OSA durante o armazenamento

A estabilidade física das nanoemulsões foi monitorada medindo o tamanho médio das gotas, IPD, potencial ζ e pH das nanoemulsões após 0, 7, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 dias de armazenamento a 4 e 25 °C. Além disso, alíquotas de nanoemulsões foram submetidas a centrifugação (centrífuga Hettich Zentrifugen, Mikro 220R,

Tuttlingen e Baden-Württemberg, Alemanha) a 2500, 3500 e 7000 rpm sequencialmente por 15 min para avaliar sua estabilidade sob força centrífuga (GHOSH; MUKHERJEE; CHANDRASEKARAN, 2014). Após centrifugação, separação de fases, cremosidade ou floculação foram observadas visualmente.

2.9.2. Estabilidade das nanoemulsões OSA sob ciclos de aquecimento-resfriamento

As nanoemulsões foram submetidas a cinco ciclos alternados de temperatura, cada ciclo consistindo em resfriamento em geladeira (modelo RFCT451, BSH Continental® 279, Brasil) ajustado a 4 °C por 24 horas seguido de aquecimento em forno (modelo DL-SE, De Leo 281 Equipamentos, Brasil) ajustado em 40 °C por 24 horas, totalizando um ciclo de 48h. Após o final de cada ciclo, foram medidos o diâmetro hidrodinâmico, o índice de polidispersão espalhamento dinâmico da luz, enquanto o potencial ζ foi medido por mobilidade eletroforética (BALI; ALI; ALI, 2010).

2.9.3. Estabilidade das nanoemulsões de OSA em diferentes condições de pH

Soluções com diferentes pH (3,0, 5,0, 7,0, 9,0 e 11,0 a 25 °C) foram preparadas usando alíquotas de 0,1 M HCl, 0,1 M NaOH e água ultrapura. As nanoemulsões foram diluídas (1:10, v/v) em cada solução de diferentes pH, e a amostra foi submetida à análise de potencial ζ (TANG et al., 2012).

2.10. Análises estatísticas

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão (SD). A análise de variância (ANOVA) unilateral seguida pelo teste post-hoc de Tukey ($\alpha=5\%$) foi realizada usando o software GraphPad Prism 8.3.1. A Análise de Componentes Principais (PCA) foi realizada para estimar a interação de algumas respostas e diferentes OSA usando o método computacional do software XLSTAT 2015 (Addinsoft, Paris, França).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização química do óleo de semente de abóbora (OSA)

3.1.1. Composição de ácidos graxos

Seis ácidos graxos foram identificados nos diferentes OSA avaliados neste estudo (Tabela 1): palmítico (16:0, 13,6-15,9%), esteárico (18:0, 11,5-15,7%), oleico (18:1, 28,9-38,9%), linoleico (18:2, 26,9-42,4%), linolênico (18:3, 0,8-1,7%) e eicosanóico (20:0, 1,4-1,8%).

C. pepo OSA apresentou as menores proporções de AGMI (28,88%) e a maior proporção de AGPI (44,13%), principalmente ácido linoleico (42,41%), entre os OSA avaliados. Um perfil semelhante de ácidos graxos insaturados e saturados foi encontrado em OSA *C. maxima* e *C. moschata*, com menores proporções de AGPI (29,86% e 27,73%, respectivamente), e maior conteúdo de ácido oleico, monoinsaturado (38,86% e 39,40%, respectivamente) em contraste com OSA *C. pepo* ($p < 0,05$). As diferenças no perfil e no conteúdo de certos ácidos graxos em nossas variedades testadas estão provavelmente relacionadas à origem de cultivares de óleo de semente de abóbora, fatores genéticos, origem geográfica, condições climáticas e condições ambientais, conforme descrito em outras investigações (AKIN et al., 2018).

No estudo de Nederal et al. (2014), o óleo prensado a frio de sementes torradas de *C. pepo* apresentou proporções de 45,9%, 35,4% e 12,30% para os ácidos linoleico, oleico e palmítico, respectivamente. Rezig et al. (2012) encontraram maiores proporções de oleico (44,11%), linoleico (34,77%) e palmítico (15,97%) em OSA *C. maxima* extraído pelo método de extração mecânica a frio, que são semelhantes às proporções de ácidos graxos de *C. maxima* neste estudo. Além disso, a proporção de ácido oleico (38,7%), linoleico (31,5%) e ácido palmítico (21,6%) de OSA *C. moschata* no estudo de Stevenson et al. (2007) também está próximo de nossos resultados.

Na Tabela 1, é possível observar que o ácido graxo eicosanoico foi encontrado em pequena proporção em todos os óleos de sementes (menos de 2%). Este ácido graxo não é muito comum no OSA, mas já foi descrito por Jiao et al. (2014) em OSA *C. pepo* extraído por microondas (0,88% do total de ácidos graxos). A quantidade de 20:0 (ácido eicosanóico) encontrada em nosso estudo também foi um pouco maior que a relatada por Rezig et al. (2012) para óleo de *C. maxima* (0,41%).

Tabela 1. Composição de ácidos graxos, carotenoides e tocoferóis, teor de clorofila, caracterização físico-química e capacidade antioxidante do óleo de três espécies de sementes de abóbora

Compostos	Óleo de semente de <i>C. máxima</i>	Óleo de semente de <i>C. moschata</i>	Óleo de semente de <i>C. pepo</i>
Composição de ácidos graxos (%)			
16:0	14.05 ^{bC} ± 0.35	15.94 ^{aC} ± 0.48	13.65 ^{bC} ± 0.43
18:0	15.71 ^{aC} ± 0.08	15.56 ^{aC} ± 0.48	11.52 ^{bC} ± 0.34
18:1	38.86 ^{aA} ± 0.60	39.40 ^{aA} ± 1.31	28.88 ^{bB} ± 0.16
18:2	28.45 ^{bB} ± 0.51	26.91 ^{bB} ± 0.20	42.41 ^{aA} ± 1.16
18:3	1.41 ^{aD} ± 0.44	0.82 ^{bD} ± 0.21	1.72 ^{aD} ± 0.22
20:0	1.53 ^{aD} ± 0.13	1.37 ^{aD} ± 0.27	1.83 ^{aD} ± 0.08
AGMI	38.86 ^a ± 0.59	39.40 ^a ± 1.30	28.88 ^b ± 0.15
AGPI	29.86 ^b ± 0.32	27.73 ^b ± 0.13	44.13 ^a ± 0.98
AGS	31.28 ^a ± 0.55	32.88 ^a ± 1.23	26.99 ^b ± 0.85
Carotenoides (µg/100 g)			
Luteína	38.09 ^{bB} ± 0.14	38.82 ^{bB} ± 1.35	205.53 ^{aA} ± 0.31
β-caroteno	44.38 ^{cA} ± 0.18	80.65 ^{aA} ± 3.04	67.24 ^{bB} ± 1.51
Total	82.48 ^c ± 0.31	119.48 ^b ± 4.38	272.78 ^a ± 1.34
Tocoferol (mg/100 g)			
γ-tocoferol	359.56 ^{aA} ± 23.59	241.63 ^{bA} ± 6.11	238.32 ^{bA} ± 12.19
α-tocoferol	74.27 ^{aB} ± 2.25	62.95 ^{bC} ± 1.39	26.81 ^{cB} ± 0.65
δ-tocoferol	76.45 ^{bB} ± 0.85	91.80 ^{aB} ± 2.25	29.53 ^{cB} ± 0.59
Total	510.29 ^a ± 24.50	396.40 ^b ± 9.93	294.66 ^c ± 13.01
Clorofila (mg feofitina a/kg)	0.46 ^c ± 0.01	0.89 ^b ± 0.10	1.59 ^a ± 0.02

Compostos	Óleo de semente de <i>C. máxima</i>	Óleo de semente de <i>C. moschata</i>	Óleo de semente de <i>C. pepo</i>
Características Físico-químicas			
Valor de <i>p</i> -anisidina	4.14 ^a ± 0.39	3.87 ^a ± 1.11	3.08 ^a ± 0.47
Valor de peroxide (meq O ₂ /kg)	2.49 ^b ± 0.01	1.01 ^b ± 0.03	14.06 ^a ± 2.34
TOTOX	9.12 ^b ± 0.37	5.90 ^b ± 1.14	31.20 ^a ± 4.47
Valor de acidez (mg KOH/g óleo)	0.15 ^b ± 0.01	0.27 ^a ± 0.02	0.25 ^a ± 0.02
Valor de iodo (g I ₂ /100 g)	75.63 ^b ± 3.89	78.49 ^b ± 5.91	99.76 ^a ± 3.62
Valor de saponificação (mg KOH/g óleo)	100.68 ^a ± 1.42	99.12 ^a ± 1.83	89.64 ^a ± 7.05
Estabilidade oxidativa (h)	11.47 ^a ± 0.21	5.02 ^b ± 0.43	4.39 ^b ± 0.27
Parâmetros de cor			
Luminosidade (L*)	10.77 ^a ± 0.88	9.32 ^a ± 0.82	6.14 ^b ± 1.02
Vermelhidão (a*)	4.73 ^a ± 0.34	3.51 ^b ± 0.08	2.23 ^c ± 0.30
Amarelecimento (b*)	0.69 ^a ± 0.08	-0.77 ^b ± 0.08	-0.77 ^b ± 0.31
Saturação (C*)	4.78 ^a ± 0.35	3.59 ^b ± 0.10	2.39 ^c ± 0.23
Ângulo de Hue (h)	8.34 ^b ± 1.00	347.66 ^a ± 1.14	340.41 ^a ± 1.08
Capacidade antioxidante			
FRAP (̑mol TE/g)	76.23 ^b ± 8.47	117.73 ^a ± 3.97	108.20 ^a ± 5.59
ORAC (̑mol TE/g)	276.64 ^a ± 10.38	280.80 ^a ± 13.18	214.84 ^b ± 3.59
DPPH (% Inibição)			
2500 µg/MI	9.95 ^{aC} ± 1.69	8.58 ^{aC} ± 1.93	3.42 ^{bC} ± 0.72
25000 µg/mL	33.86 ^{aB} ± 1.19	34.30 ^{aB} ± 2.52	32.30 ^{aB} ± 1.23
75000 µg/MI	87.82 ^{bA} ± 0.75	71.46 ^{cA} ± 0.31	99.16 ^{aA} ± 0,59

Os dados representam a média ± desvio padrão de três réplicas independentes (n = 3). Os dados foram submetidos à ANOVA de um fator, diferenças entre os grupos foram detectadas usando procedimentos de comparação múltipla (teste post hoc de Tukey, p <0,05). Letras minúsculas sobrescritas diferentes na mesma linha indicam diferenças entre as amostras de óleo e letras maiúsculas sobrescritas diferentes na mesma coluna indicam diferenças entre os compostos em uma determinada amostra de óleo. AGS, ácidos graxos saturados; AGMI, ácidos graxos monoinsaturados; AGPI, ácidos graxos poliinsaturados; TOTOX, valor de oxidação total; ORAC, capacidade de absorção do radical de oxigênio; FRAP, o poder antioxidante redutor férrico, DPPH, 2,2-difenil-1-picrilhidrazi

3.1.2. Composição de carotenoides

Em relação aos carotenoides, o β -caroteno foi o principal composto encontrado em OSA *C. moschata* e *C. maxima*, enquanto a luteína foi o principal carotenoide em OSA *C. pepo* (Tabela 1). OSA *C. pepo* apresentou teor de carotenoides totais 2,3 vezes maior do que o óleo de semente de *C. moschata*, que, por sua vez, apresentou teor de carotenoides 45% maior do que o contido no óleo de semente de *C. maxima* (Tabela 1). Embora o óleo de semente de *C. maxima* tenha apresentado a menor quantidade de β -caroteno (44,38 $\mu\text{g}/100\text{ g}$), o teor foi superior a 10,7 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de óleo de semente de *C. maxima* relatado por Siano et al. (2016). A luteína foi o principal carotenoide encontrado em OSA *C. pepo*, representando cerca de 75% do conteúdo total de carotenoides deste óleo. Isso está de acordo com a porcentagem (80%) de luteína relatada em um estudo anterior (JEZNACH et al., 2012).

3.1.3. Composição do tocoferol

α -, δ - e γ -tocoferóis foram identificados em todos os OSA estudados, com γ -tocoferol sendo o composto principal, independentemente da espécie de abóbora (Tabela 1). OSA *C. maxima* apresentou o maior teor de tocoferol total, com destaque para a quantidade de γ -tocoferol (359,56 mg/100 g óleo), enquanto os níveis de γ -tocoferol em *C. moschata* foram 20% superiores aos de *C. maxima* e 3 vezes maior do que em *C. pepo*. Potočnik, Cizej e Košir (2018) encontraram um menor teor de γ -tocoferol (61,9 mg/100 g) no óleo de semente de *C. moschata*. Can-Cauch et al. (2019) indicou que os níveis de tocoferóis totais e γ -tocoferol foram de 660,1 e 283,0 mg/100 g de OSA de *C. moschata* valores próximos aos encontrados no presente estudo. Com base nos resultados obtidos, os teores de tocoferóis apresentados em todos os OSA estão de acordo com os encontrados na literatura, portanto, podem ser considerados como fontes ricas em tocoferol.

3.1.4. Teor de clorofila

O conteúdo total de clorofila de OSA *C. pepo* foi cerca de 1,8 e 3,5 vezes maior do que em *C. moschata* e *C. maxima*, respectivamente (Tabela 1). Quanto maior o teor de clorofila do óleo de *C. pepo*, mais suscetível o óleo fica para os processos de foto-oxidação. Independentemente da espécie, todos os OSA apresentaram menores teores de clorofila (inferior a 2 mg/kg) quando comparados a outros óleos não

refinados, como o azeite virgem extra, conforme relatado por Borello e Domenici, (2019).

3.1.5. Parâmetros de qualidade do OSA

OSA *C. pepo* apresentou o maior valor de peróxido (14,06 meq O₂/kg óleo), 5,6 e 14 vezes maior que os valores encontrados nos óleos de sementes de *C. maxima* e *C. moschata*, respectivamente. No entanto, o valor de peróxido do óleo de semente de *C. pepo* é inferior ao valor limite (20 meq O₂/kg de óleo) estabelecido para o azeite virgem extra, que foi usado como base de comparação no presente estudo (CODEX ALIMENTARIUS, 1999). O maior teor de peróxidos encontrado no óleo de *C. pepo* pode estar relacionado ao maior teor de AGPI, clorofila e menor teor de tocoferóis do que os encontrados nas outras cultivares OSA, apesar do maior teor de carotenoides, principalmente luteína. Foi relatado que a luteína também tem atividade pró-oxidante tanto no escuro quanto no claro. Devido à instabilidade dos carotenoides contra o calor e a luz, seus compostos de degradação podem promover a oxidação lipídica (SUBAGIO; MORITA, 2001). Nederal et al. (2012) relataram que o óleo de semente de *C. pepo* teve um valor de peróxido de 5,23 meq O₂/kg de óleo, menor do que o encontrado em nosso estudo. Por outro lado, Ali et al. (2017) observaram que o óleo obtido para sementes de *C. maxima* apresentou um valor de peróxido de até 12 meq O₂/kg de óleo. Os valores de peróxidos podem variar dependendo das condições de extração e armazenamento e da composição química da cultivar.

Os produtos de oxidação secundários podem ser determinados pelo valor de p-anisidina. Os óleos estudados não apresentaram diferenças estatísticas entre si em relação aos índices de p-anisidina (Tabela 1). No entanto, em relação ao índice de peroxidação (valor TOTOX), OSA *C. pepo* apresentou a maior oxidação com um valor TOTOX de 5,3 e 3,4 vezes maior que OSA *C. moschata* e *C. maxima*, respectivamente.

A estabilidade oxidativa dos óleos foi determinada pelo método RANCIMAT e expressa como tempo de indução de oxidação (TI). Em geral, para oxidação de óleos e gorduras naturais nas mesmas condições, quanto maior o valor TI, mais estável é o óleo comestível (HADORN; ZURCHER, 1974). OSA *C. maxima* apresentou o TI mais longo (11,43 h), sendo, portanto, o OSA mais estável (p <0,05), quando comparado a OSA *C. moschata* e *C. pepo* (5,02 e 4,39 h, respectivamente). Essa baixa estabilidade de OSA *C. moschata* e *C. pepo* pode estar relacionada ao maior teor de carotenoides

(119,48 e 272,78 78 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, respectivamente) e clorofila (0,18 e 1,69 mg de feofitina a/kg, respectivamente), que neste caso pode ter tido ação pró-oxidante. No entanto, Barda et al. (2016) relataram aproximadamente 3 h de TI de OSA *C. moschata*, que foi mais curto do que o encontrado neste estudo. Tempos de indução mais longos podem estar relacionados a menores teores de AGPI e à presença de antioxidantes naturais, como tocoferóis (MURKOVIC; PFANNHAUSER, 2000). Nesse caso, o maior teor de tocoferol total (510,29 mg/100 g) pode explicar os tempos de indução mais longos do OSA de *C. maxima*. Carotenoides, tocoferóis e clorofilas de alguma forma desempenham um papel importante na estabilidade oxidativa devido à sua natureza antioxidante no escuro e atividade pró-oxidante na luz.

A acidez é um parâmetro relacionado ao processamento do óleo, preservação e qualidade da matéria-prima. Este parâmetro também se relaciona com a formação de ranço hidrolítico. De acordo com Codex Alimentarius (1999), a acidez máxima permitida para óleos virgens e refinados é de 4 e 0,6 mg KOH/g de óleo, respectivamente. No presente estudo, a acidez de todos os óleos de semente de abóbora foi inferior a 0,3 mg KOH/g óleo, sendo que OSA *C. maxima* apresentou acidez de aproximadamente 55%, inferior aos outros óleos de semente de abóbora (Tabela 1). Esses valores foram inferiores aos encontrados por Rezig et al. (2012) para OSA *C. máxima* (7,54 mg KOH/g óleo). Da mesma forma, El-Adawy e Taha (2001) encontraram um valor de ácido de 2,88 mg KOH/g, que foi 10 vezes maior que o encontrado neste estudo para OSA *C. pepo*.

O valor de iodo de *C. pepo* OSA foi de 99,76 g de $\text{I}_2/100\text{ g}$ de óleo, que foi aproximadamente 22% significativamente maior ($p < 0,05$) do que o valor dos outros OSA, alinhado com a maior proporção de AG insaturados encontrada em *C. pepo* OSA. O valor de iodo de *C. pepo* OSA encontrado neste estudo foi inferior ao de 115 g de $\text{I}_2/100\text{ g}$ de óleo de semente de *C. pepo*, relatado por Potočnik et al. (2018).

Em relação ao valor de saponificação, o óleo das sementes de *C. maxima* apresentou um valor de 100,68 mg KOH/g óleo, o que não diferiu dos demais OSA ($p > 0,05$). Segundo o Codex Alimentarius (1999), o azeite virgem deve ter valor máximo de saponificação de 184-196 mg KOH/g, para que os óleos de sementes avaliados neste estudo estejam dentro do valor estipulado para saponificação. No momento, não há valor estipulado para OSA, portanto a comparação foi feita com o azeite virgem.

A cor é um dos principais atributos que afetam a percepção dos consumidores sobre a qualidade dos óleos comestíveis. A tonalidade de cor dos óleos de sementes de *C. moschata* e *C. pepo* foram semelhantes e ambas amostras estavam localizadas no quarto quadrante do globo de cor com ângulos de tonalidade de 347,66 e 340,41, respectivamente, embora *C. moschata* tenha mostrado maior vermelhidão (a^*), OSA *C. maxima*, que estava localizado no primeiro quadrante, apresentou um ângulo de tonalidade de 8,34 com um valor positivo de b^* . Este resultado indicou a maior tendência ao amarelo de OSA *C. maxima* do que os outros OSA. O parâmetro de luminosidade (L^*) foi maior para OSA *C. moschata* e *C. máxima* (10,77 e 9,32) do que para OSA *C. pepo* (6,14), enquanto os valores de Chroma (C^*) aumentaram na ordem: *C. pepo* (2,39) < *C. moschata* (3,59) < *C. maxima* (4,78) ($p < 0,05$). Cromo ou saturação representa um atributo quantitativo para a intensidade da cor, enquanto cores claras apresentam baixa saturação, cores vivas e intensas apresentam alta saturação. Nesse sentido, OSA *C. pepo* apresentou a cor menos viva entre os três OSA. O óleo de semente de *C. maxima* estudado por Rezig et al. (2012) apresentaram valores superiores para o parâmetro luminosidade (44,8) que os valores encontrados em nosso estudo, além de maior valor de b^* (28,88), sendo mais amarelado que os óleos de sementes aqui avaliados.

3.2. Capacidade antioxidante

Avaliar a capacidade antioxidante dos óleos é importante para determinar o efeito protetor da amostra contra espécies reativas. Existem vários métodos para avaliar a capacidade antioxidante *in vitro*, como os métodos FRAP, ORAC e DPPH*. O OSA de *C. moschata* apresentou os maiores valores absolutos de capacidade antioxidante nos métodos FRAP e ORAC (Tabela 1). Utilizando o método FRAP, as capacidades antioxidantes de OSA *C. moschata* e *C. pepo* foram observadas estatisticamente maiores ($p = 0,05$) do que a de *C. maxima*. Neste caso, OSA *C. maxima* foi o redutor de íon metálico mais eficaz em comparação com outras espécies. No entanto, OSA *C. moschata* (280,8 $\mu\text{mol TE/g}$ óleo) e *C. máxima* (276,6 $\mu\text{mol TE / g}$ óleo) mostraram melhor atividade antioxidante que OSA *C. pepo* (214,8 $\mu\text{mol TE / g}$ óleo), quando o método ORAC foi empregado (Tabela 1). Os resultados mostraram que as espécies de sementes de abóbora podem afetar significativamente a

capacidade antioxidante, e que o resultado depende do método empregado. O FRAP avalia a capacidade de uma amostra em reduzir o ferro férrico (Fe^{+3}) à forma ferrosa (Fe^{+2}), portanto, avalia a capacidade de reduzir os radicais livres por transferência de elétrons. O ensaio ORAC avalia a eliminação do radical peroxil, por meio da transferência de átomos de hidrogênio. Curiosamente, os óleos de sementes dessas espécies apresentaram diferentes níveis de tocoferol total e de carotenoides totais, ou seja, o óleo das sementes de *C. pepo* apresentou menor tocoferol total e maior teor de carotenoides totais do que o outro OSA, enquanto OSA *C. maxima* tinha um conteúdo de tocoferol mais alto e carotenoides totais mais baixos do que seus homólogos. A reatividade da vitamina E com radicais peroxil orgânicos está associada às propriedades redox do anel cromano, responsável pela atividade antioxidante da vitamina E, que se acredita ser sua principal função bioquímica. Os tocoferóis protegem os lipídios eliminando os radicais peroxil sem reagir em outras fases da propagação da cadeia (TRABER; ATKINSON, 2007). Por outro lado, os carotenoides são compostos biológicos importantes que podem inativar moléculas excitadas eletronicamente, um processo denominado como extinção (DECKER, 2003).

Para o método DPPH (Tabela 1 - Fig. 1), a capacidade antioxidante do OSA foi função da concentração de óleo, quanto maior a concentração de óleo, maior o percentual de inibição do DPPH^{*}, independente da amostra. Porém, a eficiência de cada óleo em inibir o radical DPPH^{*} variou na maior e na menor concentração de óleo utilizada. Notavelmente, na menor concentração de óleo (2.500 µg/mL), o óleo de semente de *C. pepo* apresentou o menor percentual de inibição do DPPH^{*} (3,42%, $p < 0,05$). Enquanto o efeito de inibição desta amostra ultrapassou os de suas contrapartes na maior concentração de óleo (99,16% de inibição de DPPH^{*} em contraste com 87,82% e 71,46% para *C. maxima* e *C. moschata*, respectivamente).

Estudos realizados com óleo de semente de *Lepidium sativum* (Agião-de-jardim) foram mais eficientes para inibir os sinais dos radicais DPPH^{*}, necessitando de menor concentração (50000 µg/mL) para obter 100% de inibição (NAIK; MEDA ; LELE, 2014), enquanto o OSA utilizado neste estudo exigiu uma concentração mais elevada (75000 µg/mL) para obter a inibição máxima dos radicais DPPH^{*}.

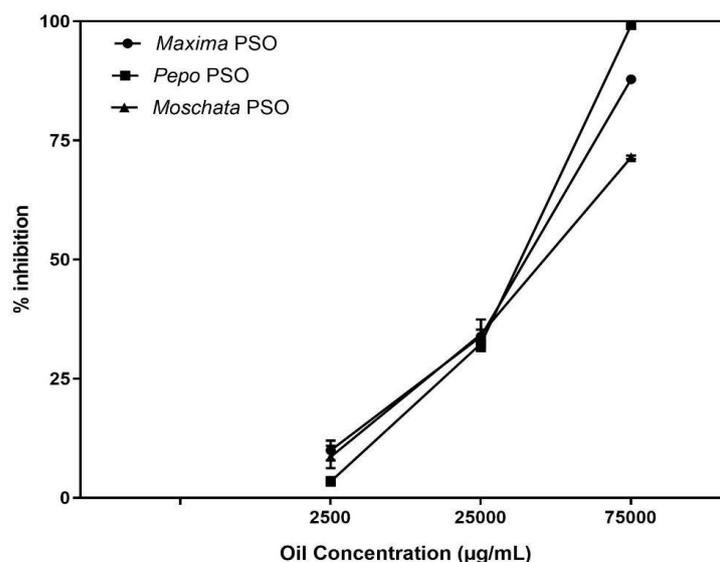


Figura 1. Capacidade antioxidante dos óleos de semente de abóbora pelo método DPPH por Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (ERP). Óleo de *C. moschata* jacarezinho (Moschata OSA), óleo de *C. maxima* (Maxima OSA) e óleo de *C. pepo* (Pepo OSA).

3.3. Relação entre a composição química do OSA, parâmetros de qualidade e capacidade antioxidante por Análise de Componentes Principais - PCA

A PCA foi realizada com os dados obtidos na caracterização química do OSA, respondendo por 98,7% da variância original dos dois primeiros componentes (Figura 2). O primeiro componente PC1 explicou 87,1% da variância total e mostrou a separação espacial de OSA *C. pepo* no lado negativo e OSA *C. maxima* no lado positivo da dimensão. Considerando os dois componentes, *C. maxima* teve uma forte associação positiva com o conteúdo de γ -tocoferol e com a estabilidade oxidativa. No primeiro componente, esse genótipo foi positivamente associado a outros tocoferóis, ácidos graxos monoinsaturados e saturados, capacidade antioxidante (ORAC), valor de saponificação e p-anisidina. A relação entre o Rancimat (EO) e o conteúdo de γ -tocoferol é esperada uma vez que este tocoferol é conhecido por ter maior atividade antioxidante (MURKOVIC; PFANNHAUSER, 2000). O valor de saponificação está relacionado ao OSA *C. maxima*, que foi positivamente associado ao teor de AGMI. Sabe-se que o valor de saponificação representa a quantidade de ácidos graxos de baixo ou alto peso molecular presente no óleo (quanto maior o peso molecular médio,

menor o índice). Com base nisto, o óleo de *C. maxima* apresentou mais quantidade de ácidos graxos com maior peso molecular em contraste com os outros óleos.

OSA *C. pepo* foi associado com o valor de peróxido e marcadores de oxidação TOTOX e com AGPI, valor de iodo, clorofila, luteína e carotenoides totais. A associação entre índice de iodo e AGPI e, conseqüentemente, marcadores de oxidação é bem esperada. *C. pepo* apresentou a maior proporção de ácido linoleico poli-insaturado, o que pode estar relacionado ao maior teor de iodo desta amostra em comparação com outros OSA. Espera-se que o maior grau de instauração desse óleo contribua para sua maior susceptibilidade aos processos de oxidação, sendo que esta amostra apresentou o maior índice de peróxidos entre os OSA analisados. Por outro lado, o papel da clorofila na foto-oxidação é profundamente estudado, assim como sua atividade pró-oxidante. Nossos resultados, entretanto, sugeriram que a luteína, o principal carotenoide em OSA *C. pepo*, não contribui muito para a capacidade antioxidante do óleo. Foi revelado que a luteína tem atividade pró-oxidante, o que significa que ela não só desempenha um papel antioxidante, mas também promove a oxidação de lipídios por sua instabilidade em condições de luz e temperatura (SUBAGIO; SHIGEMURA; MORITA, 2001).

PC2 explicou 11,6% da variação total e foi útil para discriminar OSA *C. moschata* das outras espécies (Figura 2). As variáveis associadas positivamente foram conteúdo de β -caroteno, capacidade antioxidante FRAP e acidez, enquanto DPPH, valor de peróxido e TOTOX foram as principais variáveis negativamente associadas com OSA *C. moschata*. Essa relação negativa era esperada pelo maior teor de β -caroteno nesta espécie e sua ação antioxidante. Por outro lado, a PCA mostrou no primeiro quadrante que o valor de p-anisidina estava positivamente associado ao AGMI, o que pode ser devido à formação de compostos aldeídos como: octanal, nonanal, decanal, 2-decenal e 2-undecenal resultante da oxidação secundária do ácido oleico, um ácido graxo monoinsaturado (CAO et al., 2020). Além disso, no terceiro quadrante, a associação positiva entre índice de peróxido, carotenoides, luteína, clorofila e negativa com tocoferóis sugere que carotenoides e clorofila possivelmente não atuam como antioxidante, mas sim como pró-oxidantes em determinadas condições.

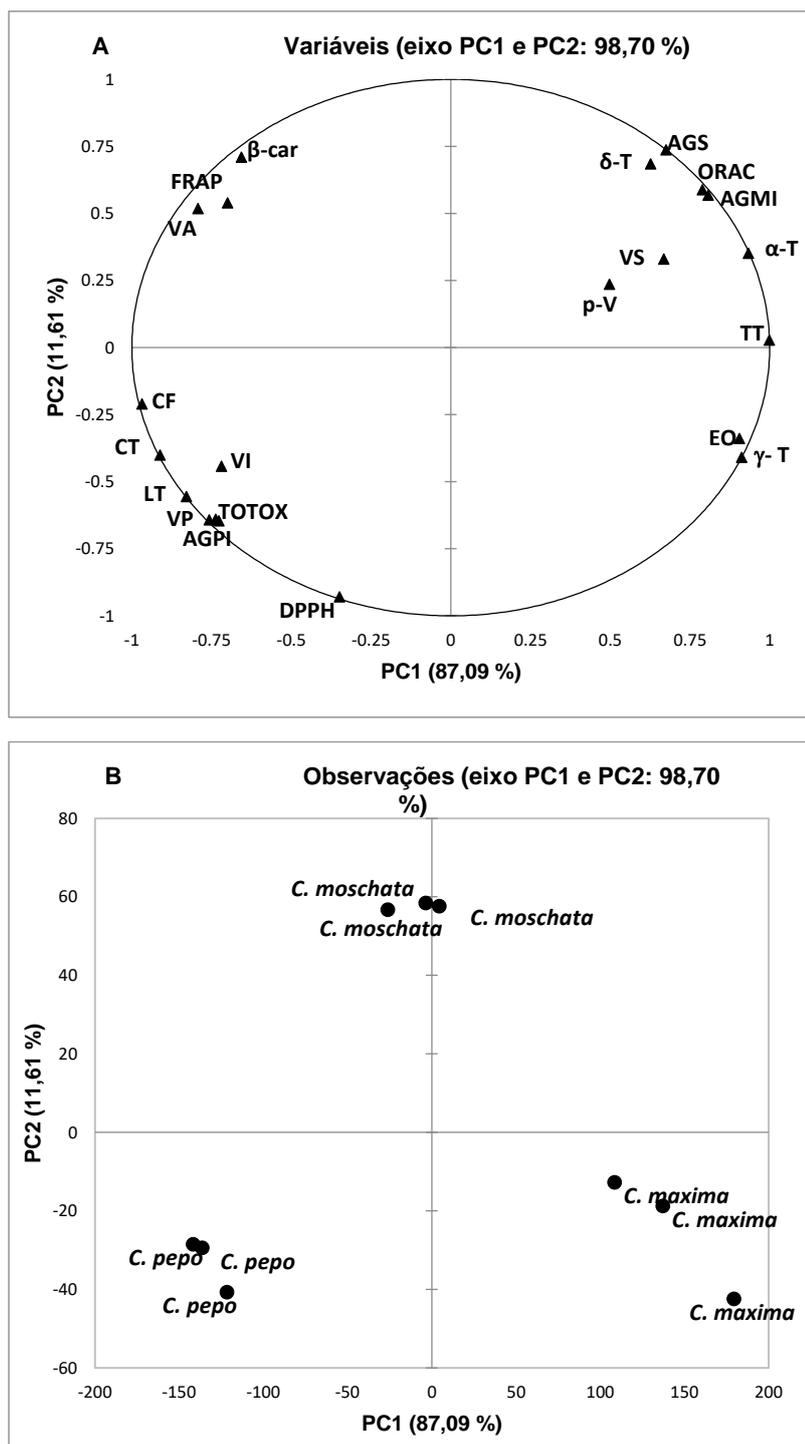


Figura 2. Análise de componentes principais de compostos bioativos em óleos de sementes de abóbora de *Cucurbita moschata*, *C. maxima* e *C. pepo*. Variáveis: AV, valor de acidez; CF, Clorofila; β-carro, β-caroteno; CT, Carotenoides totais; VI, valor de iodo; VP, valor de peróxido; LT, Luteína; AGS, ácidos graxos saturados; AGMI, ácidos graxos monoinsaturados; AGPI, ácidos graxos poliinsaturados; TOTOX, valor de oxidação total; ORAC, capacidade de absorção do radical de oxigênio; FRAP, Poder antioxidante redutor do ferro; VS, valor de saponificação; p-V, p-anisidina; TT, Tocoferóis totais; EO, estabilidade oxidativa; γ-T, γ-tocoferol; α-T, α-tocoferol; δ-T, δ-tocoferol.

Em relação aos métodos de capacidade antioxidante, a PCA indicou que o ORAC está positivamente associado aos tocoferóis, e negativamente associado aos carotenoides, valor de acidez e clorofila. O DPPH foi mais associado à luteína, enquanto o FRAP foi associado ao β -caroteno. O método ORAC mede a proteção fornecida por um antioxidante a uma molécula alvo que está sendo oxidada por radicais peroxila. O ORAC foi positivamente relacionado aos tocoferóis, que são capazes de estabilizar espécies reativas, como os radicais peroxila (Pegoraro et al., 2017). O DPPH é baseado na medida da capacidade antioxidante de uma determinada substância em sequestrar o radical DPPH^{*}, nesse sentido, a luteína é um carotenoide capaz de dissipar a energia dos radicais livres e apresentou forte atividade sequestrante de radical.

3.4. Caracterização da nanoemulsão OSA

Durante o processo de produção da nanoemulsão, uma macromulsão (emulsão grosseira) com aspecto turvo foi obtida com temperaturas entre 70 a 80 °C. Este aspecto turvo foi alterado para uma dispersão transparente translúcida quando a temperatura da emulsão foi reduzida devido à adição de água fria (4 °C). Esta solução final translúcida límpida indicou a formação de gotículas de óleo de tamanho nano, então nanoemulsões de óleo em água foram obtidas.

Em testes preliminares, a formulação de base ideal para a produção de emulsões de OSA usando o método de inversão de temperatura de fase foi determinada, resultando em nanoemulsões com tamanho de gota inferior a 200 nm (Fig. 3). Este é um resultado importante, uma vez que as nanoemulsões foram preparadas com uma metodologia simples e de baixo consumo de energia, o que abre a oportunidade de produzir essas formulações em lotes em escala industrial.

Lotes independentes de nanoemulsões de cada amostra foram preparados para serem armazenados nas duas temperaturas diferentes, conforme mencionado anteriormente. No dia 0 de armazenamento, os diâmetros médios das gotículas dos lotes nanomax, nanopepo e nanomosc que seriam armazenados a 4 °C foram 94,66, 56,06 e 128,40 nm, respectivamente (Fig. 3A), enquanto as mesmas nanoemulsões que seriam armazenadas em 25 °C apresentaram os respectivos tamanhos de gotas de 155,70, 135,50 e 98,30 nm (Fig. 3B).

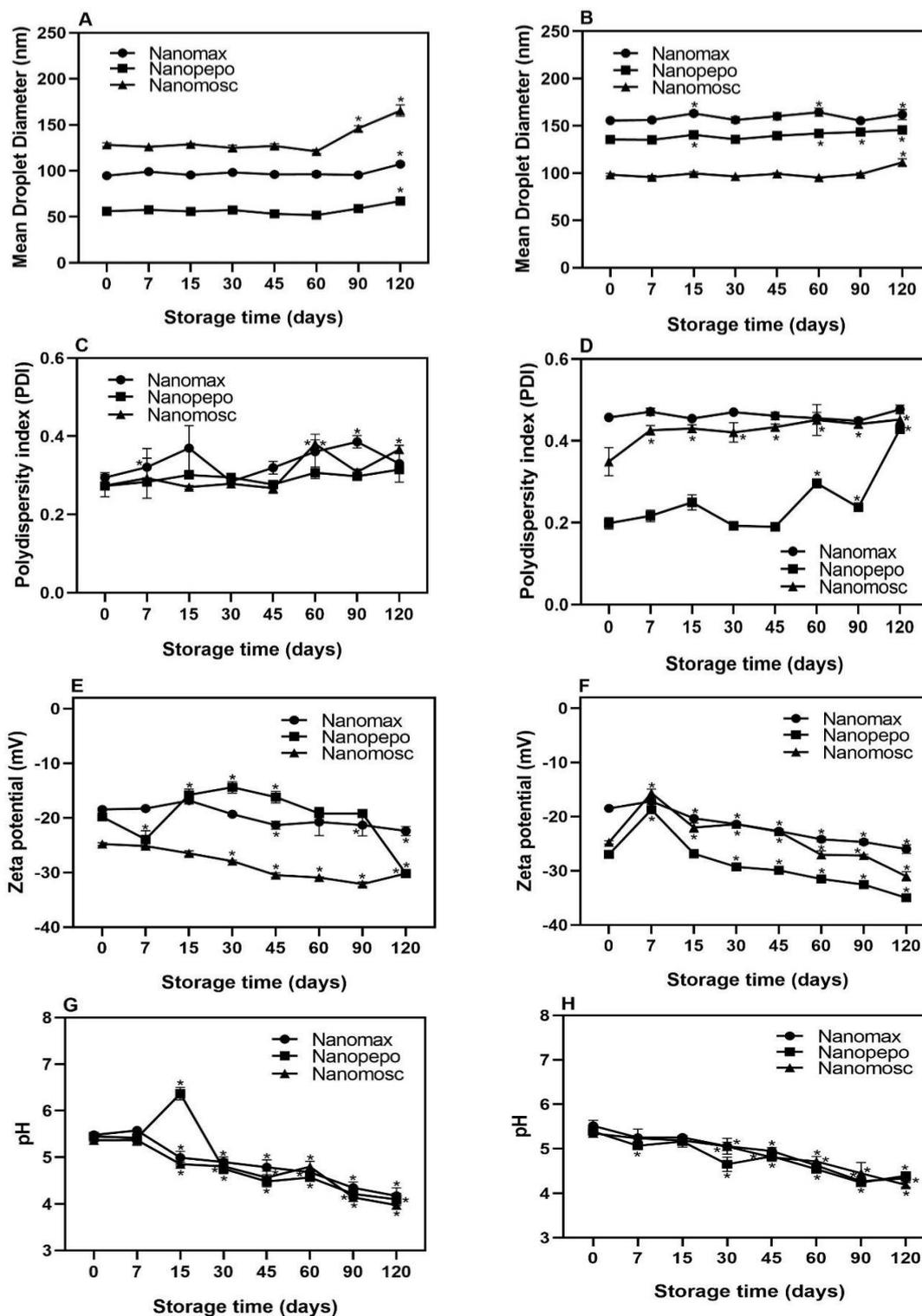


Figura 3. Variação do diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e carga de superfície das nanoemulsões feitas com óleo de três espécies de sementes de abóbora durante o armazenamento a 4 °C (A, C, E e G) e 25 °C (B, D, F e H). Nanomax, Nanopepo e Nanomosc referem-se a nanoemulsões baseadas em OSA de óleos de sementes de *Cucurbita maxima*, *C. pepo* e *C. moschata*, respectivamente. Os asteriscos indicam diferenças significativas dentro de uma mesma amostra pelo teste post hoc de Tukey ($p < 0,05$).

A 25 °C, o tamanho médio inicial da gota do nanomax e nanopepo foi maior do que aquelas armazenadas a 4 °C, enquanto o diâmetro inicial do nanomosc que seria armazenado a 25 °C foi 30 nm menor do que a amostra que seria armazenada a 4 °C.

IPD indica a uniformidade do tamanho das gotas dentro do sistema de emulsão. Quanto maior o IPD, menos uniforme é a distribuição do tamanho da gota (MCCLEMENTS; RAO, 2011). No dia 0 de armazenamento, nanomax, nanopepo e nanomosc, que foram armazenados a 4 °C, apresentaram valores de IPD de 0,294, 0,273 e 0,274, respectivamente (Fig. 3C). Todas as nanoemulsões apresentaram valores de IPD próximos a 0,3, o que pode sugerir uma certa homogeneidade durante o armazenamento. No entanto, nanomax, nanopepo e nanomosc que foram armazenados a 25 °C mostraram o respectivo IPD de 0,457, 0,198 e 0,349 (Fig. 3D), sugerindo uma maior variação de tamanho inicial observada em nanomax e nanomosc, mas não em nanopepo.

O potencial ζ é usado para medir a carga em uma superfície de nanoemulsão, em geral os valores de potencial $\zeta > + 30$ mV ou $\zeta < - 30$ mV são considerados bons indicadores de estabilidade de longo prazo (TEO et al., 2015). Inicialmente a 4 °C, os valores de potencial ζ de nanomax, nanomosc e nanopepo foram -18,47, -24,80 e -19,83 mV, respectivamente (Fig. 3E). O nanomosc apresentou uma melhor estabilidade em relação às outras duas nanoemulsões que apresentaram valores mais próximos de zero. A 25 °C (Fig. 3F) os respectivos valores para nanomax, nanomosc e nanopepo foram -18,50, -24,77 e -26,97 mV, mostrando que nanomosc e nanopepo apresentaram melhor estabilidade física em relação ao nanomax ($p < 0,05$). Por outro lado, nanopepo, nanomosc e nanomax apresentaram valores de pH iniciais de 5,45, 5,37 e 5,48, respectivamente a 4 °C e 5,59, 5,35 e 5,52, respectivamente a 25 °C (Fig. 3G-3H).

Além disso, as imagens de TEM das nanoemulsões de OSA mostraram que as gotículas lipídicas apresentavam uma aparência esférica (Fig.4), com diâmetro de gotícula de aproximadamente 200 nm, confirmando assim a avaliação medida pelo espalhamento de luz dinâmico.

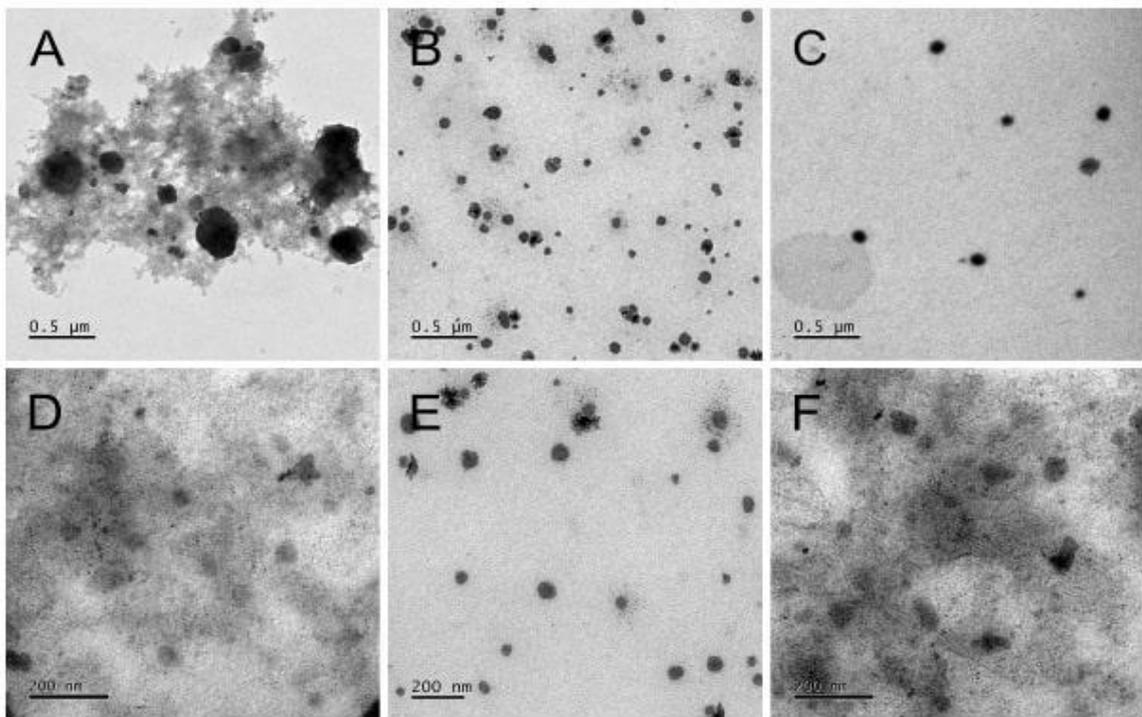


Figura 4. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) de nanoemulsões de óleo de semente de *Cucurbita maxima* (A, D), *C. moschata* (B, E) e *C. pepo* (C, F). As imagens foram capturadas em ampliação de 5000 (A, B e C) e 15000 (D, E. e F).

3.5. Estabilidade física

3.5.1. Estabilidade durante o armazenamento a longo prazo sob diferentes temperaturas

Durante o armazenamento, as emulsões nanomax e nanopepo mostraram um comportamento semelhante a 4 °C. Não houve mudança observada no hidrodinâmico das gotículas de nanomax e nanopepo, no entanto, um aumento no diâmetro das gotas de nanomosc foi observado após 120 dias de armazenamento (107,20 e 67,20 nm, respectivamente) (Fig. 3A). A nanomosc mostrou flutuações no diâmetro das gotas após 60 dias (de 121,00 nm no dia 60 a 146,10 e 164,40 nos dias 90 e 120). Com relação ao armazenamento a 25 °C, nanomax e nanopepo tiveram um aumento significativo ($p < 0,05$) no diâmetro médio das gotas após 15 dias de armazenamento (163,30 e 140,50 nm, respectivamente, Fig. 3B). O tamanho da nanomosc permaneceu estável até aumentar significativamente aos 120 dias de armazenamento (111,50 nm, $p < 0,05$). Observou-se que todas as nanoemulsões apresentaram um maior diâmetro hidrodinâmico após 120 dias de armazenamento independente da

temperatura. Nanomax e nanopepo podem ser considerados mais estáveis a uma temperatura de 4 °C, uma vez que não apresentaram aumento de seu diâmetro durante 90 dias de armazenamento. Por outro lado, a nanomosc apresentou comportamento semelhante, mas a uma temperatura de 25 °C. O efeito da temperatura nas nanoemulsões, especificamente nanomax e nanopepo pode ter levado a um aumento no tamanho médio das gotículas, o que pode ser explicado pelos fenômenos chamados coalescência e amadurecimento de Ostwald, que levam a um aumento no tamanho médio das gotas (KARTHIK; EZHILARASI; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2015).

No entanto, a mudança geral no tamanho das gotas durante o armazenamento em ambas temperaturas foi relativamente pequena para nanomax, nanopepo e nanomosc, e o diâmetro não excedeu 200 nm, independentemente da amostra, indicando que eles eram relativamente estáveis ao crescimento de gotas e sugerindo que a separação de fases não ocorreu. Durante o armazenamento a 25 °C, nanomax não apresentou alteração significativa no IPD, mas na temperatura de 4 °C houve um aumento significativo no IPD após a segunda semana de armazenamento (de 0,294 para 0,370, $p < 0,05$). Apesar dessas mudanças, o IPD permaneceu menor em comparação ao armazenamento a 25 °C. O IPD de nanopepo permaneceu inalterado durante o armazenamento a 4 °C, enquanto a 25 °C aumentou em relação à primeira avaliação após 60 dias (de 0,198 para 0,296, $p < 0,05$). Finalmente, a nanomosc apresentou um aumento no IPD a 4 °C desde o segundo mês, enquanto que a 25 °C o IPD aumentou após 7 dias (de 0,349 para 0,426, $p < 0,05$). Aos 120 dias de armazenamento a 4 °C, as nanoemulsões apresentaram IPD inferior (0,333, 0,315 e 0,366 para nanomax, nanopepo e nanomosc, respectivamente), e permaneceram mais homogêneas do que aquelas armazenadas a 25 °C (IPD de 0,477, 0,428 e 0,452 para as mesmas amostras, respectivamente). Conforme descrito acima, as emulsões nanopepo e nanomosc armazenadas a 25 °C apresentaram um aumento de tamanho no início do armazenamento que pode induzir a formação de sistemas polidispersos. O efeito da temperatura no amadurecimento de Ostwald, resulta em um aumento do tamanho das gotas e IPD das nanoemulsões. O amadurecimento de Ostwald ocorre como resultado da difusão de moléculas de óleo de gotículas menores para maiores através do fluido intermediário (MCCLEMENTS; RAO, 2011) e pode ser a razão para o ligeiro aumento no tamanho das partículas durante o armazenamento.

O potencial ζ é o indicador da carga elétrica na partícula superficial e fornece informações sobre as forças repulsivas entre as nanopartículas; portanto, é o principal marcador para prever a estabilidade física de sistemas coloidais (MCCLEMENTS; RAO, 2011). Todas as emulsões apresentaram valores negativos de potencial ζ na faixa de -18 a -31, longe de zero (Fig. 3). De acordo com as Figuras 3E e 3F, observou-se que o potencial ζ da nanoemulsão a 4 e 25 °C foi se afastando de zero com o aumento dos dias de armazenamento, adquirindo maior estabilidade. Porém, os valores do potencial ζ se aproximaram de -30 mV sem sobrepor este valor. Nesse caso, gotículas de nanoemulsões com potenciais zeta menores que ± 30 mV fornecem apenas boa estabilidade de curto prazo, com tendência de aglomeração de partículas (MISHRA et al., 2009).

Segundo Mun, Decker e McClements, (2005), em princípio, surfactantes não iônicos como o Solutol® HS 15, utilizado no presente estudo, não deveriam carregar as gotas. No entanto, na prática, devido à adsorção preferencial de íons hidroxila da fase aquosa ou devido à presença de impurezas iônicas remanescentes, como ácidos graxos livres no surfactante ou fases oleosas, as gotículas podem ter uma carga negativa (YI et al., 2019). A diferente composição química dos óleos de sementes de *Cucurbita* pode ter influenciado essa diferença, principalmente no potencial ζ . Apesar de ser do mesmo gênero, o OSA apresentou diferentes teores de ácidos graxos livres, relacionados ao seu índice de acidez, o que pode gerar variações em seu comportamento como variações no potencial zeta. Por exemplo, nanomax apresentou valores de carga mais próximos de zero em comparação com outras emulsões (-22,40 e -26,00 mV a 4 °C e 25 °C, respectivamente por 120 dias), o que pode estar relacionado ao fato de OSA *C. maxima* ter um menor índice de acidez (0,15 mg KOH/g) em comparação com outros óleos.

Todas as nanoemulsões de OSA apresentaram valores de pH próximos de 5, que diminuíram significativamente ($p < 0,05$) com o tempo de armazenamento em ambas as temperaturas atingindo valores próximos de 4 (Fig. 3G-3H). Essa diminuição do pH pode estar relacionada à tendência dos ésteres de ácidos graxos presentes no óleo sofrerem hidrólise ou oxidação, liberando ácidos graxos livres que são responsáveis pela redução do pH durante o armazenamento (BERNARDI et al., 2011). Al-Okbi et al. (2017) relataram valores de pH na faixa de 4,96 a 5,2 em diversas

formulações de nanoemulsões com OSA (*C. pepo*), semelhantes aos obtidos neste estudo.

Além de avaliar a influência do armazenamento prolongado em diferentes temperaturas na estabilidade física das nanoemulsões, elas foram submetidas ao processo de centrifugação em diferentes velocidades nos mesmos dias de avaliação (Tabela 2), a fim de acelerar seu processo de desestabilização.

Tabela 2. Teste de centrifugação de nanoemulsões constituídas de óleo de semente de abóbora durante armazenamento de 120 dias a 4 °C e 25 °C

Espécie	Temperatura	Velocidade de centrifugação (rpm)	Tempo de armazenamento (dias)							
			0	7	15	30	45	60	90	120
Nanomax	4 °C	2500	N	N	N	N	N	N	N	N
		3500	N	N	N	N	N	N	N	N
		7000	N	N	N	N	N	N	N	N
	25 °C	2500	N	N	N	N	N	N	N	N
		3500	N	N	N	N	N	N	N	N
		7000	N	N	N	N	N	N	N	N
Nanopepo	4 °C	2500	N	N	N	N	N	N	C	C
		3500	N	N	N	N	N	C	C	C
		7000	N	N	N	N	N	C	C	C
	25 °C	2500	N	N	N	C	N	C	C	C
		3500	N	N	N	C	C	C	C	C
		7000	N	N	N	C	C	C	C	C
Nanomosc	4 °C	2500	N	N	N	N	N	N	C	C
		3500	N	N	N	N	N	N	C	C
		7000	N	N	N	N	N	N	C	C
	25 °C	2500	N	N	N	N	N	C	C	C
		3500	N	N	N	N	C	C	C	C
		7000	N	N	N	N	C	C	C	C

(C) Formação de creme; (N) Normal; Nanomax, Nanopepo e Nanomosc referem-se a nanoemulsões baseadas em OSA de óleos de sementes de *C. maxima*, *C. pepo* e *C. moschata*, respectivamente.

As nanoemulsões, independente do OSA e da temperatura de armazenamento, não apresentaram separação de fases após a centrifugação, o que pode ser devido ao fato de as gotas permanecerem relativamente pequenas durante o armazenamento (DH <200 nm) e os valores de potencial zeta permanecerem longe de zero. Não houve

formação de creme observada em nanomax ao longo do armazenamento a qualquer temperatura. No entanto, na nanopepo houve formação de cremosidade a partir dos 60 dias a 4 °C e sua formação cremosa ficou evidente a partir do trigésimo dia a 25 °C. Os resultados sugeriram que a temperatura de armazenamento mais alta pode ter levado a uma formação de creme mais rápida. Para nanomosc, a cremosidade foi observada a partir do 90º dia quando armazenada a 4 °C. Já a 25 °C, o processo ocorreu em até 45 dias. Esse efeito pode ser atribuído à coalescência das gotículas resultante da desidratação dos principais grupos do surfactante não iônico a 25 °C (SABERI; FANG; MCCLEMENTS, 2013).

Óleos líquidos comestíveis, como OSA, geralmente têm densidades mais baixas do que água líquida, portanto, o creme é mais prevalente em emulsões convencionais de óleo em água, conforme observado neste estudo. O movimento ascendente das partículas devido à gravidade aumenta com o aumento do tamanho das partículas nas forças gravitacionais, mas diminui com o aumento do tamanho das partículas no movimento browniano (MCCLEMENTS; RAO, 2011). Consequentemente, o movimento das partículas é dominado pela gravidade para partículas relativamente grandes em emulsões, como podemos ver nos resultados obtidos após o processo de centrifugação.

3.5.2. Estabilidade de nanoemulsões OSA sob ciclos de aquecimento-resfriamento

Muitas emulsões alimentares passam por alguns tipos de processamento térmico durante a fabricação ou uso, por exemplo, esterilização, pasteurização ou cozimento. Portanto, a capacidade das emulsões alimentares de permanecerem estáveis durante esses tipos de estresse é muito importante do ponto de vista prático. No primeiro ciclo de aquecimento e resfriamento, nanomax, nanopepo e nanomosc apresentaram tamanhos de gotículas de 92,14, 147,60 e 100,40 nm, respectivamente. Independentemente do OSA, as nanoemulsões mantiveram seu tamanho estável até o quarto ciclo de variação de temperatura (Fig. 5A), mas um ligeiro aumento significativo ($p < 0,05$) no diâmetro hidrodinâmico das gotículas foi observado no último ciclo (121,9, 164,3, 123,9 nm para nanomax, nanopepo e nanomosc, respectivamente). Isso pode ser devido à desidratação térmica dos principais grupos do surfactante hidrofílico na interface óleo-água, o que leva a uma deformação e agregação da estrutura coloidal (DEY et al., 2018). Com relação ao IPD (Fig. 5B), um

aumento na polidispersão foi observado com o aumento do número de ciclos para nanomax e nanomosc. Especificamente, nanomax mostrou um aumento significativo de IPD após o terceiro ciclo (de 0,315 para 0,447, $p < 0,05$), enquanto o IPD de nanomosc mudou após o quarto ciclo (de 0,319 para 0,388, $p < 0,05$). Para o nanopepo, a variação do IPD não apresentou diferença estatística ($p > 0,05$) entre os ciclos.

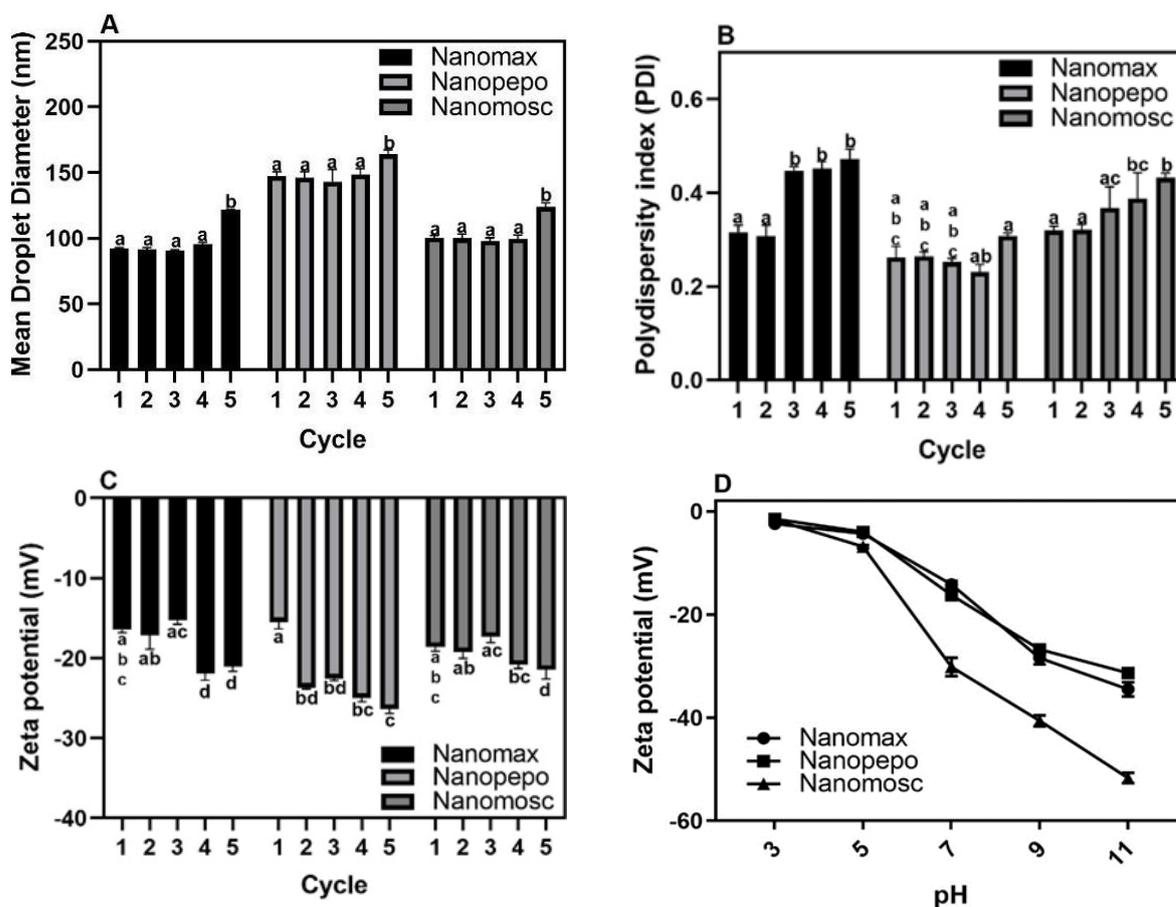


Figura 5. Impacto dos ciclos de temperatura em (A) tamanho da gota (diâmetro), (B) índice de polidispersão e (C) carga superficial de gotículas de nanoemulsão (potencial zeta). A Figura 5D mostra o efeito do pH no potencial zeta de nanoemulsões feitas com óleo de três espécies de sementes de abóbora. Nanomax, Nanopepo e Nanomosc referem-se às nanoemulsões baseadas em OSA com óleos de sementes de *Cucurbita maxima*, *C. pepo* e *C. moschata*, respectivamente. Letras minúsculas em sequência indicam diferenças significativas (teste post hoc de Tukey, $p < 0,05$) entre os ciclos dentro de cada amostra de nanoemulsão.

O potencial ζ é outro indicador importante para avaliar a estabilidade de nanoemulsões quando submetidas a estresse térmico. O potencial ζ das nanoemulsões tendeu a se tornar mais negativo (Fig. 5C). O potencial ζ foi oposto aos

resultados de tamanho hidrodinâmico da gotícula e IPD, principalmente em nanomax e nanomosc, pois a estabilidade da nanoemulsão aumentou com o número de ciclos. O potencial ζ das nanoemulsões tendeu a se distanciar mais de zero, aumentando a repulsão partícula-partícula, o que gera maior estabilidade ao sistema, atingindo valores no último ciclo de -26,37; -21,47 e -21,07 mV para nanomax, nanomosc e nanopepo, respectivamente.

3.5.3. Estabilidade sob diferentes pH

O pH da fase aquosa das emulsões pode variar e influenciar na estabilidade física das nanoemulsões, o que pode afetar sua aplicação comercial em alimentos como refrigerantes ou bebidas. Houve uma influência direta do pH no potencial ζ das partículas no sistema coloidal (Fig. 5D). Em um meio ácido (pH=1,0-2,0), as nanoemulsões tendiam a ter um valor de potencial ζ próximo de zero. Conforme o pH do meio aumentou, os valores do potencial ζ também aumentaram na direção negativa.

Houve uma diferença significativa ($p < 0,05$) no potencial ζ da nanoemulsão com uma mudança no pH de 3,0 para 11. Enquanto as nanoemulsões exibiram uma carga negativa ligeiramente líquida em pH 3,0, com valores de potencial zeta de -2,4, -1,4 e -1,6 mV para nanomax, nanopepo e nanomosc, em pH 11 valores visivelmente mais negativos de -34,5, -31,3, -51,7 mV foram encontrados para as respectivas amostras. As cargas tendem a ser mais próximas de zero em pH mais baixo, sugerindo que as nanoemulsões eram mais instáveis em condições ácidas quando comparadas àquelas com pH 11. A redução na carga negativa líquida em valores de pH baixos diminui a repulsão eletrostática entre as gotas levando à sua agregação (SARI et al., 2015).

4. CONCLUSÕES

Nossos achados mostraram que os OSA dessas três espécies produzidas no Brasil têm boa qualidade e são fonte de tocoferóis, carotenoides e AGPI, principalmente ácido linoleico, e AGMIs como o ácido oleico, compostos benéficos à saúde. A espécie de abóbora afeta o conteúdo dos compostos bioativos presentes no OSA, bem como sua estabilidade oxidativa e capacidade antioxidante. O uso de OSA *C. maxima* é sugerido para a obtenção de um produto com alto teor de tocoferóis totais

e alta estabilidade oxidativa. Para produzir óleos ricos em AGPI e carotenoides, principalmente luteína, o uso de sementes de *C. pepo* é recomendado, enquanto um maior teor de β -caroteno pode ser obtido com OSA *C. moschata* jacarezinho.

As formulações de nanoemulsões produzidas pelo método de baixa energia foram fisicamente estáveis independentemente das espécies de OSA e podem representar novas oportunidades para a utilização de OSA em diversos produtos alimentícios. A temperatura mais elevada (25 °C) gerou um aumento prematuro de gotas em nanomax e nanopepo, enquanto nanomosc foi mais estável nesta temperatura. Um comportamento oposto foi observado na temperatura de refrigeração, onde nanopepo e nanomax foram mais estáveis, enquanto nanomosc mostrou um aumento no tamanho das partículas antes do tempo de suas contrapartes. Ambas temperaturas geraram um aumento no potencial ζ e uma diminuição no pH com o aumento dos dias de armazenamento de todas as nanoemulsões. Especificamente, nanomax foi o mais estável ao processo de centrifugação durante o armazenamento. O pH influenciou as cargas de partículas das nanoemulsões. Quando o pH do meio aumentou, os valores do potencial ζ tornaram-se mais negativos, ficando mais estáveis em pH básico. O estresse térmico gerou um aumento no potencial zeta das nanoemulsões com o aumento dos ciclos de aquecimento-resfriamento, proporcionando mais estabilidade ao sistema com relação a este parâmetro. Além disso, todas as nanoemulsões tiveram um tamanho de partícula estável até o penúltimo ciclo, podendo ser consideradas estáveis a este tipo de estresse, principalmente a nanopepo que apresentou um IPD estável até o último ciclo.

O consumo de OSA tem sido associado a benefícios na saúde e sua formulação em nanoemulsão otimizada e estável pode ser uma alternativa para o desenvolvimento de produtos nutracêuticos e cosmeceuticos à base de OSA e ingredientes funcionais, com importantes aplicações nas indústrias alimentícia e farmacêutica.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-ELNOOR, A. V. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of pumpkin seeds powder and oil on Alloxan-induced diabetic in rats. *Egyptian Journal of Food Science*, v.47 n. 2, p. 255 – 269, 2019.

AKIN, G.; ARSLAN, F. N.; KARUK ELMAS, S. N.; YILMAZ, I. Cold pressed pumpkin seed (*Cucurbita pepo* L.) oils from the central Anatolia region of Turkey: Characterization of phytosterols, squalene, tocopherols, phenolic acids, carotenoids and fatty acid bioactive compounds. *International institute of fats and oils*, v. 69, n.1, p.e232, 2018.

ALI, M. A.; NARGIS, A.; OTHMAN, N. H.; NOOR, A. F.; SADIK, G.;HOSSEN, J. Oxidation stability and compositional characteristics of oils from microwave roasted pumpkin seeds during thermal oxidation. *International Journal of Food Properties*, v.20, p. 2569-2580, 2017.

AL-OKBI, S. Y.; MOHAMED, D. A.; HAMED, T. E.; KASSEM, A. A.; ABD EL-ALIM, S. H. A.; MOSTAFA, D. M. Enhanced prevention of progression of nonalcoholic fatty liver to steatohepatitis by incorporating pumpkin seed oil in nanoemulsions. *Journal of Molecular Liquids*, v.225, p.822-832, 2017.

AOCS. American Oil Chemists' Society. *Official Methods and Recommended Practices of the AOCS*, Method Cc 13d-55. Chlorophyll pigments in refined and bleached oils. AOCS Press, Champaign. 1988.

AOCS. American Oil Chemists' Society. *Official Methods and Recommended Practices of the AOCS*, (5th ed). AOCS Press, Champaign. 1997.

ARAÚJO, F. A., KELMANN, R. G., ARAÚJO, B. V., FINATTO, R. B., TEIXEIRA, H. F., & KOESTER, L.S. Development and characterization of parenteral nanoemulsions containing thalidomide. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.2, n.3, p.238-245, 2011.

BALI, V.; ALI, M.; ALI, J. Study of surfactant combinations and development of a novel nanoemulsion for minimising variations in bioavailability of ezetimibe. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 76, p. 410–420, 2010.

BARDA, S.; HALIMA, N. B.; ALOUI, F.; MANSOUR, R. B.; JABEUR, H.; BOUAZIZ, M.; SAHNOUN, Z. Oil from pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seeds: evaluation of its functional properties on wound healing in rats. *Lipids in Health and Disease*, v.15, n.73, 2016.

BERNARDI, D. S.; PEREIRA, T. A.; MACIEL, N. R.; BORTOLOTO, J.; VIERA, G. S.; OLIVEIRA, G. C.; ROCHA-FILHO, P. A. Formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil: *in vitro* and *in vivo* assessments. *Journal Nanobiotechnology*, v.9, p.1-9, 2011.

BORELLO, E.; DOMENICI, V. Determination of pigments in virgin and extra-virgin olive oils: A comparison between two near UV-Vis spectroscopic techniques. *Foods*, v.8, n.1, 18, 2019.

CAN-CAUICH, C. A.; SAURI-DUCHA, E.; MOO-HUCHINA, V. M.; BETANCUR-ANCONA, D.; CUEVAS-GLORY., L. F. Effect of extraction method and specie on the content of bioactive compounds and antioxidant activity of pumpkin oil from Yucatan, Mexico. *Food Chemistry*, v.285, p.186-193, 2019.

CAO, J.; JIANG, X.; CHEN, Q.; ZHANG, H.; SUN, H.; ZHANG, W.; LI, C. Oxidative stabilities of olive and camellia oils: Possible mechanism of aldehydes formation in oleic acid triglyceride at high temperature. *LWT- Food Science and Technology*, v.18, p.108858. 2020.

CHRISTIE, W. W. Gas chromatography and lipids: a practical guide. Oily, Great Britain, 1989.

CODEX ALIMENTARIUS INTERNATIONAL FOOD STANDARDS (1999). SECTION 2. Codex Standards for Fats and Oils from Vegetable Sources. Disponível <<http://www.fao.org/3/y2774e/y2774e04.htm/>>. Acesso 20 Abril 2020.

CUCO, R. P.; MASSA, T. B.; POSTAUE, N.; CARDOZO-FILHO, L.; DA SILVA, C. Oil extraction from a structured bed of pumpkin seeds and peel using compressed propane as solvent. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 52, p.104568, 2019.

DECKER, E. A. Natural Antioxidants In Foods. *Encyclopedia of Physical Science and Technology*, v.3, p.335-342, 2003.

DEY, T. K.; BANERJEE, P.; CHATTERJEE, R.; DHAR, P. Designing of ω -3 AGPI enriched biocompatible nanoemulsion with sesame protein isolate as a natural surfactant: Focus on enhanced shelf-life stability and biocompatibility. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v.538, p.36-44, (2018)..

EL-ADAWY, T. A.; TAHA, K. M. Characteristics and composition of different seed oils and flours. *Food Chemistry*, v.74, n.1, p. 47-54. 2001.

FERREIRA-NUNES, R.; DA SILVA, S. S. M.; DE SOUZA, P. E. N.; MAGALHÃES, J. O.; CUNHA-FILHO, M.; GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M. Incorporation of *Eugenia dysenterica* extract in microemulsions preserves stability, antioxidant effect and provides enhanced cutaneous permeation. *Journal of Molecular Liquids*, v. 265, p.408-415, 2018.

GHOSH, V.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Eugenol-loaded antimicrobial nanoemulsion preserves fruit juice against, microbial spoilage. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.114, p.392–397, 2014.

GOSSELL-WILLIAMS, M.; DAVIS A.; O'CONNOR, N. Inhibition of testosterone-induced hyperplasia of the prostate of sprague-dawley rats by pumpkin seed oil. *Journal of Medicinal Food*, v. 9, n.2, 284–286, 2006.

HADORN, H. Zürcher, zur bestimmung der oxydationsstabilität von ölen und fetten, *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, v. 70, p. 57–65, 1974

JEZNACH, M.; DANILCENKO, H.; JARIENĚ, E.; KULAITIENĚ, J.; ČERNIAUSKIENĚ, J. Accumulation of antioxidative vitamins and minerals in seeds of oil pumpkin (*Cucurbita pepo* L. var. *styriaca*) cultivars. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, v. 10, n. 1, p. 245-247, 2012.

JIAO, J.; LI, Z. G.; GAI, Q. Y.; LI, X. J.; WEI, F. Y.; FU, Y. J.; & MA, W. Microwave-assisted aqueous enzymatic extraction of oil from pumpkin seeds and evaluation of its physicochemical properties, fatty acid compositions and antioxidant activities. *Food Chemistry*, v. 147, p. 17-24, 2014.

JUMAA, M., MÜLLER, B.W. The effect of oil components and homogenization conditions on the physicochemical properties and stability of parenteral fat emulsions. *International Journal of Pharmaceutics*, v.163, p. 81–89, 1998.

KARTHIK, P.; EZHILARASI, P. N.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Challenges associated in stability of food grade nanoemulsions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 57, n. 7, p. 1435-1450, 2015.

KOMAIKO, J. S.; MCCLEMENTS, J. D. Formation of food-grade nanoemulsions using low-energy preparation methods: a review of available methods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 15, p. 331-352, 2016.

MARTIN, C.A., DE ALMEIDA V.V., RUIZ; M.R., VISENTAINER, J.E.L., MATSHUSHITA, M., DE SOUZA, N.E., VISENTAINER, J.V. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: importance and occurrence in foods. *Revista de Nutrição*, v.19, n.6, 2006.

MCCLEMENTS, D.J. Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 47, n. 7, p. 611-649, 2007.

MCCLEMENTS, D. J.; RAO, J. Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 51, n. 4, p. 285-330, 2011.

MCCLEMENTS, D. J.; XIAO, H. Excipient foods: Designing food matrices that improve the oral bioavailability of pharmaceuticals and nutraceuticals. *Food & Function*, v. 5, n. 7, p. 1320– 1333, 2014.

MISHRA, P. R.; AL SHAAL, L.; MÜLLER, R. H.; KECK, C. M. Production and characterization of hesperetin nanosuspensions for dermal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 371, n. 1-2, p. 182-189, 2009.

MONGE-FUENTES, V.; MUEHLMANN, L. A.; LONGO, J. P. F.; SILVA, J. R.; FASCINELI, M. L.; SOUZA, P.; AZEVEDO, R. B. Photodynamic therapy mediated by acai oil (*Euterpe oleracea* Martius) in nanoemulsion: a potential treatment for melanoma. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 166, p. 301-310, 2017.

MORALES, D.; GUTIERREZ, J. M.; GARCIA-CELMA, M. J.; SOLANS, Y. C. A. Study of the relation between bicontinuous microemulsions and oil/water nanoemulsion formation. *Langmuir*, v. 19, n. 18, p. 7196-7200, 2003.

MORRISON, M. C.; MULDER, P.; STAVRO, P. M.; SUÁREZ, M.; AROLA-ARNAL, A.; VAN DUYNENVOORDE, W.; KLEEMANN, R. Replacement of dietary saturated fat by AGPI-rich pumpkin seed oil attenuates non-alcoholic fatty liver disease and atherosclerosis development, with additional health effects of virgin over refined oil. *PLOS ONE*, v. 10, n. 9, e0139196, 2015.

MUN, S.; DECKER, E.; MCCLEMENTS, D. J. Influence of droplet characteristics on the formation of oil-in-water emulsions stabilized by surfactant–chitosan layers. *Langmuir*, v. 21, n. 14, p. 6228-6234, 2005.

MURKOVIC, M.; PFANNHAUSER, W. Stability of pumpkin seed oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 102, p. 607-611, 2000.

NAIK, A.; MEDA, V.; LELE, S. S. Application of EPR spectroscopy and DSC for oxidative stability studies of *Nigella sativa* and *Lepidium sativum* seed oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 91, p. 935–941, 2014.

NEDERAL, S.; ŠKEVIN, D.; KRALJIĆ, K.; OBRANOVIĆ, M.; PAPEŠA, S.; BATALJAKU, A. Chemical composition and oxidative stability of roasted and cold pressed pumpkin seed oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 89, n. 9, p. 1763-1770, 2012.

NEDERAL, S.; PETROVIC, M.; VINCEK, D.; PUKEC, D.; ŠKEVIN, D.; KRALJIĆ, K.; OBRANOVIĆ, M. Variance of quality parameters and fatty acid composition in pumpkin seed oil during three crop seasons. *Industrial Crops and Products*, v. 60, p. 15–21, 2014.

NISHIMURA, M.; OHKAWARA, T.; SATO, H.; TAKEDA, H.; NISHIHIRA, J. Pumpkin seed oil extracted from *Cucurbita maxima* improves urinary disorder in human overactive bladder. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, v. 4, p. 72-74, 2014.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, n. 10, p. 4619-4626, 2001.

PEGORARO, N. S.; BARBIERI, A. V.; CAMPONOGARA, C.; MATTIAZZI, J.; BRUM, E. S.; MARCHIORI, M. C. L.; CRUZ, L. Nanoencapsulation of coenzyme Q10 and vitamin E acetate protects against UVB radiation-induced skin injury in mice. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 150, p. 32-40, 2017.

POTOČNIK, T.; CIZEJ, R. M.; KOŠIR, I. J. Influence of seed roasting on pumpkin seed oil tocopherols, phenolics and antiradical activity. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 69, p. 7-12, 2018.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing antioxidant power assay. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 48, n. 8, p. 3396-3402, 2000.

RABRENOVIĆ, B. B.; DIMIĆ, E. B.; NOVAKOVIĆ, M. M.; TEŠEVIĆ, V. V.; BASIĆ, Z. N. The most important bioactive components of cold pressed oil from different pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seeds. *LWT - Food Science and Technology*, 55, 521-527, 2014.

REZIG, L.; CHOUAIBI, M.; MSAADA, K. HAMDY, S. Chemical composition and profile characterization of pumpkin (*Cucurbita maxima*) seed oil. *Industrial Crops and Products*, v. 37, n. 1, p. 82–87, 2012.

SABERI, A. H.; FANG, Y.; MCCLEMENTS, D. J. Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: factors affecting particle size using spontaneous emulsification. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 391, p. 95-102, 2013.

SARI, T. P.; MANN, B.; KUMAR, R.; SINGH, R. R. B.; SHARMA, R.; BHARDWAJ, M.; ATHIRA, S. Preparation and characterization of nanoemulsion encapsulating curcumin. *Food Hydrocolloids*, 43, 540–546, 2015.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Lipid oxidation: Measurement methods. In F. Shahidi (Ed.), *Bailey's industrial oil and fat products*. Hoboken, NJ: Wiley Interscience, 2005.

SIANO, F.; STRACCIA, M. C.; PAOLUCCI, M.; FASULO, G.; BOSCAINO, F.; VOLPE, M. G. Physico-chemical properties and fatty acid composition of pomegranate, cherry and pumpkin seed oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 96, p. 1730–1735, 2016.

STEVENSON, D.; ELLER, F. J.; WANG, L.; JANE, J. -L.; WANG, T. Oil and tocopherol content and composition of pumpkin seed oil in 12 Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, n. 10, p. 4005-4013, 2007.

SUBAGIO, A.; MORITA, N. Instability of carotenoids is a reason for their promotion on lipid oxidation. *Food Research International*, 34, 183-188, 2001.

SUBAGIO, A.; SHIGEMURA, Y.; MORITA, N. Color stability and lipid oxidation of a dried food model to which carotenoids have been added. *Food Science and Technology Research*, v. 7, p. 231-234, 2001.

TANG, S. Y.; MANICKAM, S.; WEI, T. K.; NASHIRU, B. Formulation development and optimization of a novel Cremophore EL-based nanoemulsion using ultrasound cavitation. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 19, p. 330–345, 2012.

TEO, S. Y.; LEE, S. Y.; ONG, H. L.; ONG, C. L.; GAN, S. N.; RATHBONE, M. J. COOMBES, A. G. A. Evaluation of biosourced alkyd nanoemulsions as drug carriers. *Journal of Nanomaterials*, v. 2015, p. 1–8, 2015.

TRABER, M. G.; ATKINSON, J. Vitamin E, Antioxidant and Nothing More. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 43, n. 1, p. 4–15, 2007.

YAMAGUCHI, T.; NISHIZAKI, K.; ITAI, S.; HAYASHI, H.; OHSHIMA, H. Physicochemical characterization of parenteral lipid emulsion: influence of cosurfactants on flocculation and coalescence. *Pharmaceutical Research*, v.12, p. 1273–1278, 1995.

YI, J.; NING, J.; ZHU, Z.; CUI, L.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. Impact of interfacial composition on co-oxidation of lipids and proteins in oil-in-water emulsions: Competitive displacement of casein by surfactants. *Food Hydrocolloids*, v. 87, p. 20–28, 2019.

CAPITULO III

ESTABILIDADE QUÍMICA E FÍSICA DE NANOEMULSÕES BASEADAS EM LUTEÍNA: EFEITO DA FORMA QUÍMICA LUTEÍNA E CONSTITUIÇÃO DA FASE DO ÓLEO

RESUMO

A luteína é um dihidroxicarotenoide assimétrico (xantofila), reconhecido pela sua ação antioxidante que extingue e elimina espécies reativas de oxigênio fotoinduzidas (ROS). Ademais seu consumo recorrente está relacionado a prevenção de doenças oculares, como degeneração macular relacionada à idade (DMRI) e catarata. A luteína pode ser obtida na dieta de várias formas, por meio de alimentos funcionais e, mais recentemente, por suplementos. Sua estabilidade química pode ser afetada por calor, luz e por radicais livres gerados pela oxidação lipídica. O objetivo deste estudo foi desenvolver nanoemulsões transportadoras de luteína e determinar a estabilidade da luteína livre e esterificada com ácido palmítico sobre exposição a 45 °C e luz ultravioleta (UV) em nanoemulsões de óleo de semente de abóbora (OSA) e óleo de soja (SO). O modelo cinético de primeira ordem representou adequadamente a degradação de luteína livre e seus ésteres. No decorrer do tempo de exposição de 45 °C e luz UV, houve um desbotamento da cor do carotenoide com maior incidência no diéster de luteína. Obtiveram-se maiores constantes da taxa de reação nas nanoemulsões com éster de luteína e menores tempos de meia-vida comparada com as nanoemulsões com luteína livre. As nanoemulsões com OSA apresentaram menores constantes da taxa de reação que as compostas por SO submetidas a 45 °C. Enquanto na exposição de luz UV, as nanoemulsões de SO apresentaram maior constante da taxa de reação no éster de luteína enquanto na luteína livre sua constante da taxa foi inferior. Na temperatura de 4 °C e protegidas da luz UV a degradação foi significativamente menor. A pesquisa sobre luteína livre e a formação de éster de luteína e sua estabilidade são úteis para compreender os mecanismos de degradação deste carotenoide em sistemas nanoemulsionados, para assim, adquirir um melhor entendimento do seu comportamento nas condições de aplicação industrial.

Palavras chaves: carotenoides, nanoemulsões, éster, estabilidade térmica, foto-estabilidade.

1. INTRODUÇÃO

A luteína é uma xantofila dihidroxilada assimétrica encontrada em flores, grãos, frutas e vegetais (ABDEL-AAL et al., 2013). Este carotenoide é considerado um composto funcional eficaz que beneficia a saúde humana por sua ação antioxidante, principalmente na saúde ocular. Neste sentido, a luteína é seletivamente acumulada na mácula servindo como filtros de luz eficientes, extinguindo espécies reativas de oxigênio (ERO) formadas durante a foto-excitação (NWACHUKWU; UDENIGWE; ALUKO, 2016). Também é conhecido seu potencial para melhorar fatores relacionados com diversas doenças, como cardiovasculares (DWYER et al., 2001; MELO VAN LENT et al. 2016) e desenvolvimento de câncer (JANSEN et al., 2013).

A ocorrência de luteína na natureza é bastante difundida. A atual fonte comercial de luteína é a flor de marigold (*Tagetes* spp). Suas pétalas são ricas em ésteres de luteína, que representam mais de 90% dos pigmentos identificados nesta planta com um rendimento de até 20 g/kg (SANDMANN, 2015; LIN; LEE; CHANG, 2015). O Corpo humano não pode sintetizar este carotenoide, e dada sua importância na saúde, devem ser incorporados ao nosso organismo pela dieta (RUIZ-SOLA; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, 2012), tornando-se essencial a manutenção da integridade da luteína durante o processamento e armazenamento dos alimentos. No entanto, o uso de luteína na indústria de alimentos é limitado devido à sua baixa solubilidade em água, alto ponto de fusão e baixa estabilidade química causadas durante o processamento de alimentos e armazenamento (QV; ZENG; JIANG, 2011; DAVIDOV-PARDO; GUMUS; MCCLEMENTS, et al., 2016). Consequentemente, foram desenvolvidos sistemas de entrega à base de emulsão para agentes bioativos lipofílicos, que incluem emulsões óleo em água como as nanoemulsões, a fim de melhorar sua utilização, entrega e eficácia em alimentos e bebidas (WEIGEL et al., 2018). Essas estratégias podem ser projetadas para aumentar a biodisponibilidade e inibir a degradação química dos carotenoides, mantendo as propriedades físicas do sistema, reduzir a degradação na matriz alimentar e diminuindo a presença de radicais livres hidrofílicos (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ; VICARIO; HEREDIA, 2004; QV; ZENG; JIANG 2011). Por esse motivo, é essencial que qualquer sistema de transporte e entrega de compostos bioativos permaneça física e quimicamente estável quando exposto a diferentes ambientes de pH, luz e temperatura durante seu processamento, armazenamento e transporte (BOON et al., 2010; MCCLEMENTS, 2015)

Esses produtos baseados em nanoemulsões podem ser usados para aumentar o teor de luteína em alimentos através da fortificação de alimentos ou suplementos dietéticos (ABDEL-AAL et al., 2010). Vários produtos alimentícios são feitos de flores de marigold na sua forma livre ou esterificada ligada a ácidos graxos. Geralmente os ésteres de xantofilas como a luteína são encontrados naturalmente em muitas frutas, flores, animais, micro-organismos e algas ou podem ser sintetizados partir de uma síntese orgânica, uma técnica para facilitar a produção de ésteres de vários alimentos, e evitar etapas de purificação laboriosas (FERREIRA, 2018). Por outro lado, as razões para a síntese de ésteres são bastante amplas. Vários estudos demonstraram a maior estabilidade das xantofilas esterificadas. Provavelmente, isso está relacionado a aumento em sua lipossolubilidade em comparação com xantofilas livres, proporcionando melhor integração nas estruturas das membranas e, portanto, reduzindo sua suscetibilidade a condições adversas em seus ambientes (SUBAGIO; MORITA, 2013; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ; VICARIO; HEREDIA, 2004). Por outro lado, as xantofilas livres podem ser mais susceptíveis a auto-oxidação pela presença de suas hidroxilas livres (PREEDY; SRIRAJASKANTHAN; PATEL, 2013). YANG et al. (2015) avaliaram o efeito do processamento térmico de cocção na astaxantina e ésteres de astaxantina no camarão branco do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) e demonstraram que os diésteres de astaxantina são mais estáveis que suas formas livres. Subagio, Wakaki, e Morita (1999), também demonstraram que a esterificação da luteína com ácido místico aumentou sua estabilidade quando foi exposta a temperatura e a luz.

Embora seja possível encontrar na literatura trabalhos nos quais se avaliam a estabilidade e as propriedades dos carotenoides como a luteína, o conhecimento da sua estabilidade em matrizes alimentares é limitado, já que depende de vários aspectos como o tipo de sistema de entrega, tipo de matriz alimentar e das condições de armazenamento ou processamento. Neste cenário, é importante que seja realizado um estudo comparativo que demonstrem a estabilidade química e física em diversas condições como temperatura e luz UV de nanoemulsões transportadoras de luteína na sua forma livre e esterificada como uma alternativa de transporte e entrega deste carotenoide. Então, objetivou-se com o presente estudo investigar a influência da iluminação (luz UV) e da temperatura na estabilidade química e física de nanoemulsões de óleo de semente de abóbora e óleo de soja transportadoras de

luteína na sua forma livre e esterificada. Os resultados deste estudo serão úteis para projetar racionalmente sistemas de entrega capazes de nano-emulsionar a luteína em uma forma que possa ser facilmente incorporada em alimentos, bebidas e produtos farmacêuticos à base de água, sem afetar sua estabilidade.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Químicos e materiais

Padrão de (all-*E*)-luteína (95% de pureza, HPLC), ácido palmítico, N, N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC), 4-dimetilaminopiridina (99%, DMAP) e Tween 20 foram adquiridos na Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O óleo de soja (SO) (Liza[®], São Paulo-SP, Brasil) foi adquirido em um supermercado local (Brasília-DF, Brasil), enquanto o óleo de semente de abóbora (OSA) não refinado foi extraído de sementes de *Cucurbita moschata* jacarezinho. Estas sementes de abóbora foram fornecidas pela EMBRAPA Hortaliças de acordo com o procedimento descrito em Lozada et al. (2020). Estas sementes foram escolhidas porque seu óleo exibiu baixo teor de luteína durante a caracterização físico-química para assim não interferir no conteúdo de luteína adicionada e realizar um melhor control na luteína adicionada. Ademais, esta espécie teve maior disponibilidade de suas sementes. As flores de marigold (*Tagetes* spp.) foram adquiridas de um produtor local (Brasília-DF, Brasil). Metanol de grau HPLC e éter metil terc-butílico (MTBE) foram adquiridos de J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, EUA) e outros solventes de grau analítico foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). As amostras e os solventes foram filtrados, respectivamente, através de membranas Millipore de 0,22 e 0,45 µm antes da análise por HPLC.

2.2. Obtenção de luteína de flores de marigold

As pétalas foram retiradas manualmente das flores de marigold, armazenadas a -80 °C e liofilizadas (Liobras K105, São Paulo, Brasil) por 24 h. O extrato saponificado de carotenoides contendo principalmente (all-*E*)-luteína em sua forma livre (Figura 1) foi extraído dessas pétalas liofilizadas conforme descrito por Rodrigues et al. (2019). As pétalas liofilizadas foram reidratadas e particionadas com 40 mL éter etílico/éter de petróleo (2:1, v/v) por agitação em vortex durante 3 min e posteriormente

submetido a centrifugação (9000 g, 10 min, 4 °C), em centrífuga Thermo Electro Corporation (Sollvall RC 6 plus, USA). O extrato etéreo de carotenoide foi saponificado com 10% (p/v) de KOH em MeOH, *overnight* durante 16 h à temperatura ambiente. O álcali foi removido totalmente lavando o extrato com água destilada. Foi utilizado Na₂SO₄ anidro para retirar a água residual. O extrato saponificado foi concentrado em um rotovaporador (Rotavapor® R II, BUCHI, SP, Brasil; T <30 °C), seco sob N₂ gasoso e armazenado a -80 °C até análise cromatográfica no HPLC (RODRIGUES et al., 2018).

2.3. Síntese de éster de luteína

Para síntese de éster como mencionado no item anterior, foi utilizada a luteína extraída por meio de extração sólido-líquido com solventes orgânicos seguida de saponificação durante a noite (KOH a 10% em metanol, 16h). Os ésteres de luteína foram preparados de acordo com a metodologia de Young et al. (2007) com algumas modificações. Um mol de luteína livre e 3 mols de ácido palmítico foram misturados em balão de fundo redondo sob agitação constante a temperatura ambiente, protegido da luz em atmosfera de nitrogênio. Esta reação foi realizada usando diciclohexilcarbodiimida (DCC) e 4-(dimetilamino) piridina (DMAP) como condensador e catalisador, respectivamente. Em seguida, a mistura foi seca em rotovaporador e redissolvido em 48 mL de uma mistura de acetonitrila/ éter terc-butílico 1:1 (v/v). O material não dissolvido foi separado por centrifugação (4000 rpm, por 5 min). O sobrenadante (éster de luteína) foi recolhido e seco em N₂ e armazenado a -80 °C até análises em HPLC.

2.4. Formulação das nanoemulsões

Quatro nanoemulsões diferentes foram preparadas. A fase aquosa foi composta por água ultrapura contendo 1% (p/p) de Tween 20. A fase oleosa foi composta por óleo de soja ou de semente de abóbora, os quais eram enriquecidos por luteína na forma livre ou esterificada. Extratos secos de luteína livres e esterificados foram dissolvidos separadamente em acetato de etila de grau HPLC em uma determinada concentração e adicionados a óleo de soja ou óleo de semente de

abóbora para produzir óleo de soja rico em luteína livre, óleo de soja rico em éster de luteína, OSA rico em luteína livre e OSA rico em éster de luteína. O solvente orgânico foi removido sob vácuo em evaporador rotatório (Rotavapor® R II, BUCHI, SP, Brasil; $T < 30$ °C) até que nenhum odor de solvente permanecesse e o volume de óleo retornasse ao valor inicial. Alíquotas dos quatro óleos ricos em carotenoides foram tomadas para avaliar a concentração de carotenoides por espectrofotometria UV-VIS e a mesma concentração final de carotenoides ajustada/alcançada pela mistura desses óleos com seus equivalentes puros.

Uma emulsão O/A grosseira foi preparada pela mistura da fase oleosa (2%, p/v) com a fase aquosa (98%, v/v) usando um misturador de alta velocidade (Turrax M133/1281-0, Biospec Products, Inc. Bartlesville, OK, EUA) por 2 min a 8.000 rpm. A emulsão resultante foi imediatamente carregada em um microfluidizador de alta pressão (Microfluidics 110S, Newton, MA, EUA) por quatro ciclos a 13,980 psi. Foram obtidas quatro nanoemulsões finais: nanoemulsão de OSA com éster de luteína (OSANES), nanoemulsão de OSA com luteína livre (OSANLU), nanoemulsão de SO com éster de luteína (SONES) e nanoemulsão de SO com luteína livre (SONLU).

2.5. Estudo de estabilidade

2.5.1. Termo-estabilidade

As nanoemulsões foram armazenadas em frascos de vidro cobertos por papel alumínio em uma câmara BOD (Demanda Biológica de Oxigênio) (EL202/4, Eletrolab, São Paulo, Brasil) mantida a 45 °C \pm 1 °C. As amostras de controle foram armazenadas a 4 °C \pm 1 °C em geladeira (modelo RFCT 451, frostfree, BSH Continental®, São Paulo, Brasil). Alíquotas de nanoemulsões armazenadas a 4 °C e 45 °C foram retiradas a cada 3 dias durante um período total de 15 dias e submetidas a estudos de estabilidade química (teor e cor de luteína) e física (tamanho médio de gota, índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta). Para o monitoramento da cremosidade, alíquotas de cada amostra foram transferidas para tubos de ensaio transparentes logo após o preparo e armazenadas em prateleiras nas duas temperaturas na ausência de luz.

2.5.2. Foto-estabilidade

Um volume de 2 mL de todas as nanoemulsões foi transferido para tubos de ensaio transparentes, fechados e expostos em triplicata à radiação ultravioleta (UV) (lâmpada UV 30W F30T8GL) em uma câmara de espelho durante um total de 4 horas. Em intervalos de tempo pré-determinados (30, 60, 210 e 240 minutos, além do tempo 0 min), três tubos correspondentes a triplicata de cada amostra foram retirados da câmara do espelho. Alíquotas de 10uL foram retiradas para análises de tamanho, IPD e potencial zeta, e o conteúdo lavado com N₂ e imediatamente armazenado a -80 °C na ausência de luz. Tubos de ensaio de controle de cada amostra foram preparados cobrindo a superfície do tubo e removidos nos mesmos períodos pré-determinados. As amostras foram submetidas à análise de carotenoides (FERREIRA et al., 2015).

2.6. Caracterização química

2.6.1. Extração de carotenoides da emulsão

A extração de carotenoides das emulsões foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Xavier et al. (2012) com modificações. Resumidamente, 8 mL de tetra-hidrofurano foram adicionados a 2 mL de cada emulsão, e a mistura foi agitada em vórtex por alguns segundos. Os carotenoides foram particionados da emulsão em éter etílico/éter de petróleo (1:1, v/v) e o tetra-hidrofurano foi removido por lavagens com água. Foi recolhida a fase etérea e adicionado Na₂SO₄ anidro para retirar a água residual. O extrato etéreo contendo o carotenoide foi concentrado em um rotovaporador, seco sob N₂ gasoso e armazenado a -80 °C até análise cromatográfica no HPLC

2.6.2. Separação, identificação e quantificação de carotenoides por HPLC-DAD

A separação e a identificação dos carotenoides da emulsão foram realizadas aplicando-se as mesmas condições cromatográficas descritas por Rodrigues et al. (2016). As amostras foram diluídas na mistura de MTBE: metanol (1:1) e filtrado em membrana de PTFE. Os carotenoides foram separados numa coluna C30 YMC (5 µm, 250 × 4,6 mm i.d.) (Waters, MA, EUA) em um cromatógrafo líquido de alta pressão Shimadzu (Kyoto, Japão) (UFLC) equipado com bomba quaternária (LC-20AD)

acoplada em série a um detector de arranjo de diodos (DAD) (SPDM20A). As condições de detecção utilizadas foram: misturas de metanol, MTBE e água constituíram os solventes A (81: 15: 4, v/v/v) e B (16: 80.4: 3.6, v/v/v). O gradiente linear (1,0 mL/min) foi de 99% a 44% do solvente A em 39 minutos, 44% a 0% de solvente A em 6 minutos, retornando à condição inicial (99% solvente A) em 5 minutos e permanecendo nessa condição por 10 minutos, totalizando uma corrida de 60 minutos. Os espectros UV-vis foram adquiridos de 200 a 600 nm. A identificação de carotenoides foi realizada pela interpretação combinada de todos os dados obtidos por cromatografia, como ordem de eluição, características dos espectros UV-vis, comprimento de onda de absorção máxima (máx), estrutura fina espectral (% III/II) e comparação com dados de literatura (DE ROSSO; MERCADANTE, 2016; RODRIGUES et al., 2019). A quantificação dos carotenoides foi realizada usando curvas analíticas de (all-*E*) -luteína ($R^2 = 0,9983$; 1,47-46,24 $\mu\text{g/mL}$) e o extrato de éster de luteína ($R^2 = 0,9993$; 0,10- 16,59 $\mu\text{g/mL}$) obtido da síntese orgânica (seção 2.3).

2.6.3. Eficiência de encapsulamento (EE)

A eficiência de encapsulamento (EE) foi determinada pela quantificação de carotenoide livre e encapsulado. O conteúdo de luteína livre ($\mu\text{g/mL}$) na fase aquosa foi medido de acordo com Zhao, et al. (2017) com modificações. Amostras de nanoemulsões contendo luteína (2 mL) foram misturadas com hexano (5 mL) e centrifugado a 6.000 rpm (4 °C por 5 min) para separar a fase superior. Este protocolo foi repetido três vezes e os sobrenadantes foram combinados, secos com N_2 gasoso e armazenado até as análises cromatográficas no HPLC. Para determinação da quantidade total de carotenoide na nanoemulsão, pegou-se 2 mL de cada nanoemulsão e foi realizado o procedimento de extração citado na seção anterior (2.5.1). As amostras foram suspensas e foram analisadas por cromatografia líquida conforme metodologia citada anteriormente (2.5.2). A eficiência de encapsulamento foi determinada pela seguinte fórmula:

$$EE(\%) = [(Luteína\ total - luteína\ livre)/luteína\ total] \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

2.6.4. Modelagem cinética

O modelo cinético de primeira ordem foi ajustado aos dados de degradação térmica e foto-estabilidade dos carotenoides (Equação 2) (WRIGHT, 2004). Conhecendo-se a constante da taxa de reação (k), foi possível calcular a meia vida ($t_{1/2}$) para cada nanoemulsão, nas diferentes temperaturas de armazenamento (Equação 3).

$$\ln(C_t) = \ln(C_0) - kt \quad \text{Equação 2}$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k} \quad \text{Equação 3}$$

Em que,

C_t – Concentração de carotenoides ($\mu\text{g/mL}$);

C_0 - Concentração inicial de carotenoides ($\mu\text{g/mL}$);

k – Constante da taxa de reação

A dependência da temperatura da degradação dos carotenoides foi expressa em termos da energia de ativação (E_a), descrita pelo modelo de Arrhenius (Equação 4).

$$\ln\left(\frac{k_2}{k_1}\right) = -\frac{E_a}{R}\left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1}\right) \quad \text{Equação 4}$$

Em que,

T_1 – Temperatura de referência (4 °C), em escala absoluta (K);

T_2 – Temperatura de 45 °C, em escala absoluta (K);

k_1 - a constante da taxa de reação na temperatura de referência;

k_2 - a constante da taxa de reação a 45 °C;

R - constante universal do gás (8.314 J/mol.K).

2.6.5. Avaliação de cor das nanoemulsões

A cor das amostras das nanoemulsões foram avaliadas usando um colorímetro HunterLab (Hunter Color Quest XE, VA, EUA). Seis mililitros de cada nanoemulsão foram transferidos para uma cubeta de Quartzo e a cor medida contra um fundo preto nas unidades Hunter de L* (em termos de intensidade de branco a preto); a* (em termos de intensidade de vermelho e verde); e b* (em termos de intensidade de amarelo e azul). Posteriormente, as variáveis tonalidade de cor (h) e saturação de cor ou croma (C*) foram calculadas utilizando-se as Equações 5 e 6, respectivamente:

$$h = \tan^{-1} \left(\frac{a}{b} \right) \quad \text{Equação 5}$$

$$C^* = ((a^*)^2 + (b^*)^2)^{\frac{1}{2}} \quad \text{Equação 6}$$

2.7. Caracterização física

O tamanho das gotículas de nanoemulsão (diâmetro hidrodinâmico) e o índice de polidispersão foram medidos por espalhamento dinâmico de luz, enquanto o potencial ζ foi medido por mobilidade eletroforética. Todas essas análises foram realizadas em um Zetasizer (ZEN3690, Malvern Instruments, England, UK). Para evitar múltiplos efeitos de espalhamento, as amostras foram diluídas com água purificada (1:100) antes das medições. Além disso, alíquotas de todas as nanoemulsões foram transferidas para frascos de vidro no dia 0 e armazenadas adequadamente nas duas temperaturas utilizadas, para monitorar a formação de creme por observação visual a cada dia de armazenamento.

2.8. Análises estatísticas

Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. As diferenças entre os tratamentos foram determinadas usando uma análise de variância de três vias (ANOVA) para determinar a interação entre o tipo de nanoemulsão, tempo e temperatura/exposição à luz. Ademais, foi realizada ANOVA de um fator dentro de cada nanoemulsão, seguidamente do teste post-hoc de Tukey com nível de confiança de 95%. As análises estatísticas foram realizadas no software StatPlus v.5 (AnalystSoft Inc., Canada). As

análises de regressão e construção gráfica foram realizadas com o software GraphPad Prism 8.3.1.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Síntese química de um diéster de luteína

Marigold é a fonte comercial de luteína para fins industriais. A oleoresina de marigold é composta principalmente por luteína na forma esterificada, porém cerca de 20 monoésteres e 30 diésteres de luteína, além de seis carotenoides livres no extrato não saponificado já foram descritos nas pétalas desta flor (RODRIGUES et al., 2019). Para testar nossa hipótese, preferiu-se sintetizar um diéster de luteína a partir da luteína livre (Figura 1), em vez de fazer cromatografia de preparação para separar essa fração, pois os picos não são totalmente resolvidos.

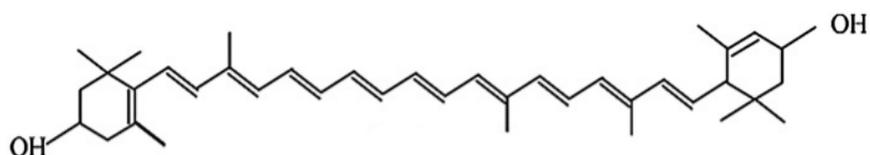


Figura. 1. Estrutura química de luteína livre (*all-trans*). Fonte. Kijlstra et al., 2012.

A luteína livre estava disponível após extração sólido-líquido, saponificação, partição e secagem sob nitrogênio gasoso. Após testes preliminares, adaptamos o método de esterificação para sintetizar/produzir um diéster de luteína. A principal dificuldade nos processos de esterificação é a separação ou purificação do éster. Comumente, estes processos de purificação são realizados em coluna aberta. Ademais, processos de esterificação como esterificação de Fisher utilizam ácidos como catalisadores, que são extremamente corrosivos e contaminantes, e precisam ser neutralizados no final da reação conforme declarado por Leng et al. (2008). O processo adotado no presente estudo pode ser considerado simples, já que só foi necessário centrifugar, separar, reservar sobrenadante e secar sob nitrogênio gasoso.

O método utilizado para a síntese de ésteres foi o mecanismo da reação de Steglich (NEISES; STEGLICH, 1978), escolhido pela sua simplicidade ao ser realizado à temperatura ambiente sem a utilização de condições ácidas ou básicas extremas (LAUE et al., 2005). Esse procedimento envolveu uma reação entre luteína livre e ácido palmítico na presença de 4-(dimetilamino) piridina (DMAP) como

catalisador nucleofílico e dicitclohexilcarbodiimida (DCC) como agente de acoplamento. Não foram necessárias etapas de purificação através de coluna cromatográfica já que o sistema HPLC-DAD demonstrou formação e boa separação dos diésteres de luteína do extrato das pétalas de marigold.

A luteína exibe uma estrutura assimétrica com os anéis β e ϵ terminais hidroxilados, respectivamente, nas posições 3 e 3', que podem levar à formação de monoésteres e diésteres. A monoacilação ou diacilação da luteína quando é realizada por diferentes ácidos graxos produz regioisômeros distintos (BREITHAUPT; WIRT; E BAMEDI, 2002). Com base nos cromatogramas obtidos (Fig. 2), nas características do espectro UV-vis e na estrutura fina espectral (Tabela 1), e em comparação com os dados descritos anteriormente na literatura (BREITHAUPT; WIRT; BAMEDI, 2002; RODRIGUES et al.,2016) podemos inferir que os ésteres formados foram diésteres de luteína, posto que durante o desenvolvimento do éster, para garantir a formação de um diester de luteína, unicamente foi usado o ácido palmítico em excesso nesta reação levando possivelmente a formação de dipalmitato de luteína (Figura 3). A tabela 1 mostra os tempos de retenção de luteína livre e os ésteres de luteína foram de aproximadamente 10,24 e 46,4 min, respectivamente, concordando com o tempo de retenção encontrado segundo o exibido por Rodrigues et al. (2016). As curvas de calibração dos pigmentos (luteína livre e os ésteres de luteína) deram boa linearidade em uma faixa de concentração para luteína livre de 1,4 – 46,2 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2 = 0,9983$) e para o éster de luteína 0,1 – 16,5 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2 = 0,9993$). Os cromatogramas típicos de HPLC-DAD mostram a luteína livre (Fig.2A) como um pico único e os ésteres de luteína (Fig. 2B) como aglomerados separados. Como esperado, o diéster de luteína encontrado apresentou características UV-visível semelhantes às da luteína livre uma vez que a acilação de um ou dois ácidos graxos em grupos hidroxila nos anéis terminais não altera o cromóforo da molécula.

Tabela 1. Características UV-vis de extrato saponificados de pétalas de marigold e extrato esterificado.

Figura	Pico	Carotenoide	Tempo de retenção (min)	λ_{max} (nm)	% (III/II)
A	1	(all- <i>E</i>)-luteína	10,24	421, 445,473	67
B	1	(all- <i>E</i>)-dipalmitato de luteína	46,4	426, 446, 474	55

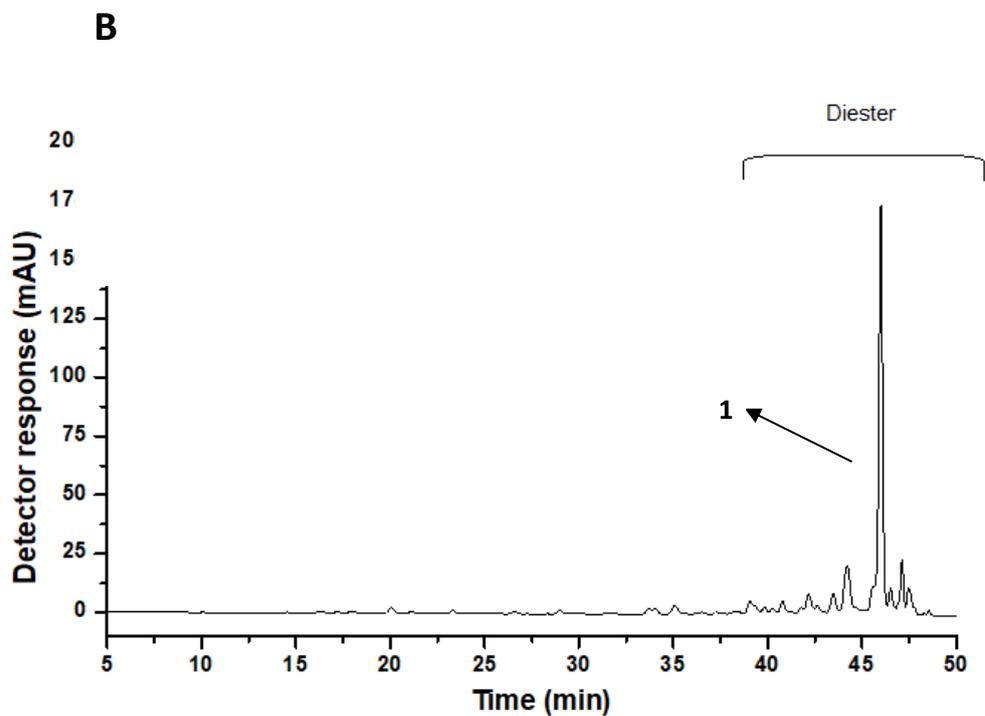
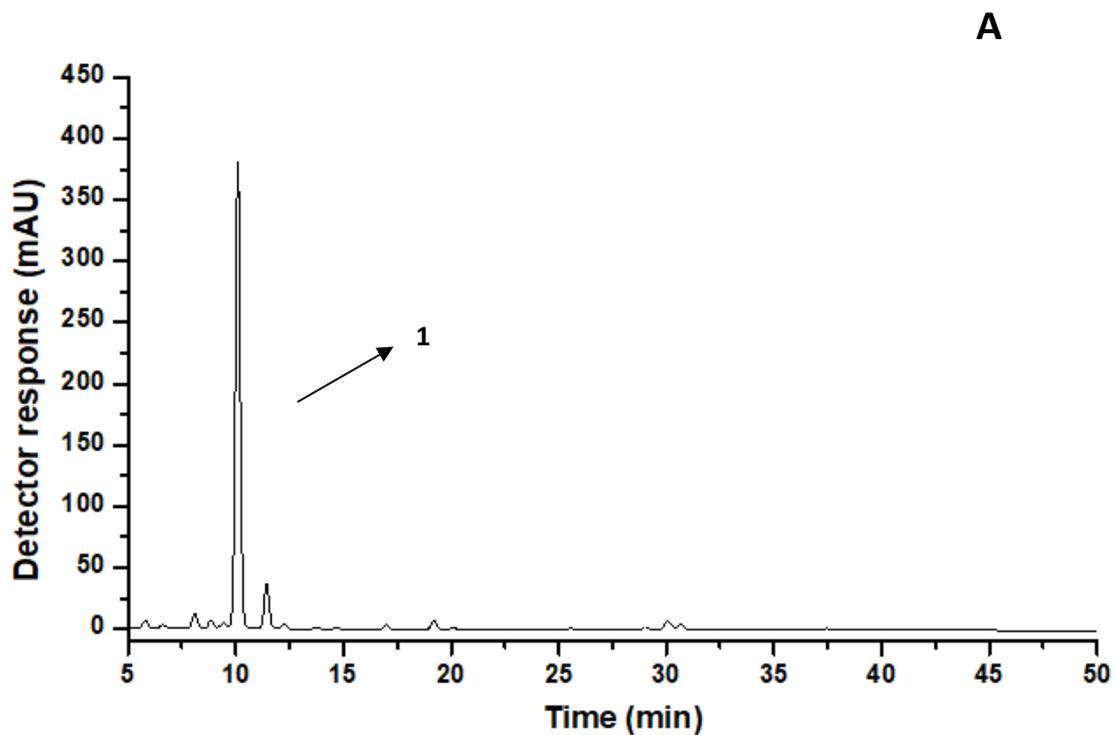


Figura 2. Cromatogramas de HPLC-DAD de extrato de *Tagetes spp* saponificado. luteína livre ((all-*E*)-luteína) (A) e extrato de luteína esterificada com ácido palmítico ((all-*E*)-dipalmitato de luteína (B)).

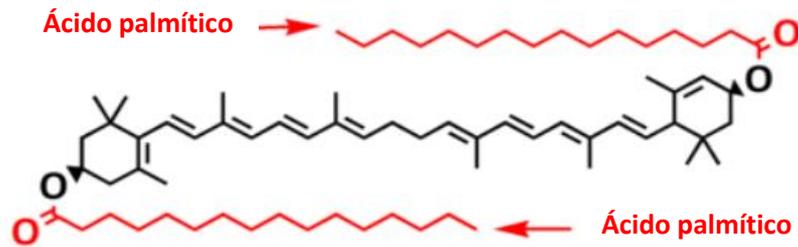


Figura 3. Estrutura química de all-*E*-dipalmitato de luteína (homodiéster). Fonte. Saini; Keum, 2018.

3.2. Caracterização das nanoemulsões

Para a realização dos cálculos do teor total do éster de luteína, foi considerado o maior pico (Fig. 2B) com tempo retenção de 46,4 min. As amostras apresentaram uma porcentagem de eficiência de encapsulação de 96,14, 96,20, 90,65 e 85,13% para OSANLU, SONLU, OSANES e SONES, respectivamente. Na figura 4, podemos observar que as nanoemulsões que foram expostas sobre influência da temperatura inicialmente apresentaram um teor de carotenoide de 12,482, 10,325, 10,810 e 9,535 µg/mL para OSANLU, OSANES, SONLU e SONES, respectivamente. A estabilidade química também foi avaliada por meio dos atributos de cor das nanoemulsões, inicialmente as nanoemulsões apresentaram um valor de a^* (Fig. 5) de -0,336, -1,076, 0,030 e -1,833 para OSALU, OSAES, SONLU e SONES, respectivamente. Sendo amostras com uma leve tendência ao verde com exceção da SONLU que apresentou uma leve tendência ao vermelho. Este parametro não é um bom indicador de retenção deste carotenoide porque caracteriza a extensão do verde ao vermelho, e essas cores não eram dominantes nas nanoemulsões. Referente ao valor b^* , de forma geral, as nanoemulsões apresentaram valores na faixa de 44,806-45,52 (Fig.5) que se atribui à cor qualitativamente amarela das nanoemulsões.

Na Figura 6, podemos observar que a saturação (C^*) das nanoemulsões apresentou valores iniciais na faixa de 44,807-45,557. Com relação a luminosidade (L^*) (Fig. 6), as amostras apresentaram valores iniciais entre 59,516-61,776, considerados valores um pouco acima de 50, pois o intervalo L^* pode assumir valores entre 0 e 100, sendo que valores mais próximos de 100 referem-se a amostras com predominância do branco (LEON et al., 2006). A tonalidade de cor (h) é considerada

um atributo quali-quantitativo de cor. Graficamente, considera-se h igual a 0° como cor vermelha, h igual a 90° , amarela, h igual a 180° , verde, e h igual a 270° , azul (MCGUIRE, 1992; PATHARE; OPARA; SAID, 2013). Com base nisto, as todas as nanoemulsões (Fig. 7) apresentam inicialmente valores próximos ao 90° , considerando-se amostras com tonalidades amarelas.

Com relação a caracterização física inicial das nanoemulsões, elas apresentaram um diâmetro médio de partícula (Fig. 9) inicial de 188,26, 185,23, 176,66 e 179,83 nm para OSANES, OSANLU, SONLU e SONES, respectivamente. O IPD é um índice que mede a distribuição do tamanho das gotículas e pode apresentar valores entre 0,05 para distribuições monodispersas e acima de 0,7 para amostras possuem uma distribuição de tamanho muito ampla (MALVERN INSTRUMENTS LIMITED, 2011). O índice de polidispersão inicial das nanoemulsões variou na faixa de 0,142 – 0,146, considerando-se amostras monodispersas.

A carga de partículas é outro fator que determina a estabilidade física de nanoemulsões. Quanto maior a repulsão eletrostática entre as partículas, maior a estabilidade física (MISHRA et al., 2009). As superfícies das gotículas foram carregadas negativamente (Fig. 10). O potencial zeta para OSANES, OSANLU, SONES e SONLU foi de aproximadamente para T_0 de -33,66, -30,16, -24,5 e -25,06 mV, respectivamente. As nanoemulsões de óleo de semente de abóbora apresentaram maiores cargas negativamente falando, sabe-se que altos valores obtidos indicam cargas superficiais relativamente altas, sendo benéficos a priori para a estabilidade física indicando uma boa estabilidade electro-cinetica.

Por outra parte, as nanoemulsões que foram submetidas ao tratamento da luz UV apresentaram inicialmente um teor de carotenoides (Fig.11) de 11,746, 9,656, 11,538 e 7,123 $\mu\text{g/mL}$ para OSALU, OSANES, SONLU e SONES, respectivamente. A caracterização física das nanoemulsões mostrou valores de tamanho de gota (Fig. 13) de 185,00, 187,06, 177,73 e 181,47 nm respectivamente para OSANLU, OSANES, SONLU e SONES. Seu índice de polidispersão foi de IPD de 0.184, 0.155, 0,155, e 0,151 e potencial zeta (Fig. 13) de -33,43, -34,07, -14,17 e -23,13 para OSANLU, OSANES, SONLU e SONES, respectivamente.

Após a preparação, as nanoemulsões apresentaram boa estabilidade visual (Fig. 8-12), com uma coloração e tonalidade amarela característica da luteína, sem separação de fases e com tamanho médio na faixa de 200 nm. Este tamanho está

dentro da faixa característica (200 nm) das nanoemulsões usadas para preparações industriais, como alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (JAISWAL et al., 2015), indicando que foi possível desenvolver nanoemulsões transportadoras de luteína pelo método de alta energia e com tamanho de partícula ótimas. Inicialmente foram consideradas amostras monodispersas por seu baixo IPD. As amostras com óleo de semente de abóbora forneceram nanoemulsões com maiores valores de potencial zeta, ao apresentar cargas maiores a -30 mV, que podem gerar uma estabilidade melhor a longo prazo (TEO et al., 2015).

3.3. Impacto da temperatura na estabilidade química e física de nanoemulsões enriquecidas com luteína

A temperatura é uma das variáveis mais importantes no que diz respeito ao processamento e qualidade dos alimentos (KIM et al., 2015). Portanto, é importante estabelecer o comportamento das nanoemulsões quando essa variável de processamento muda, pois em aplicações comerciais, a influência dos tratamentos térmicos é indicativa da estabilidade da nanoemulsão (KOMAIKO; MCCLEMENTS, 2014). Por esse motivo, foi examinado o efeito da temperatura de armazenamento na estabilidade física e química das nanoemulsões enriquecidas com luteína.

3.3.1. Degradação da luteína livre e do éster de luteína das nanoemulsões

Como apresentado na Fig. 4 e no Anexo 5, a temperatura teve um efeito significativo na degradação do teor da luteína nas duas formas em todas as nanoemulsões. Na temperatura de 4 °C, o teor de carotenoides permaneceu mais estável e apresentou redução menos drástica, quando comparado com os dados obtidos na temperatura de 45 °C. Para SONLU, verificou-se que o teor de carotenoides permaneceu estável durante o armazenamento sob refrigeração. Por outro lado, na temperatura de 45 °C, verificou-se diminuição significativa durante o armazenamento, que iniciou na segunda avaliação (T_3), com redução significativa ($p < 0.05$) de 15.64% do seu valor inicial (T_0), de 10.81 µg/mL para 9.17 µg/mL. Depois de 15 dias de armazenamento, verificou-se redução acentuada do teor de carotenoides, obtendo-se valor médio de 5,44 µg/mL, equivalente à metade do teor inicial de carotenoides aproximadamente.

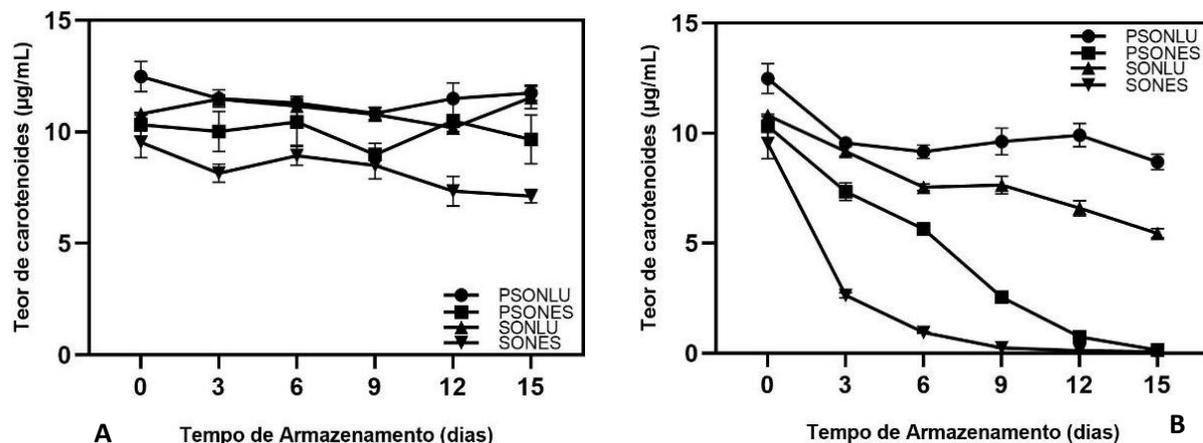


Figura 4. Mudanças no teor de carotenoides de nanoemulsões com óleo de semente de abóbora (OSA) e soja (SO) transportadoras de luteína durante 15 dias de armazenamento a 4 °C (A) e 45 °C (B). OSANES, OSANLU, SONES e SONLU referem-se a nanoemulsão de OSA com éster de luteína, nanoemulsão de OSA com luteína livre, nanoemulsão de SO com éster de luteína e nanoemulsão de SO com luteína livre.

Por outro lado, o éster apresentou uma maior redução na temperatura de 45 °C, comparado com a temperatura de refrigeração. Na temperatura de 4 °C, SONES permaneceu estável até o dia nono de armazenamento, tendo uma redução significativa de 22,94% no décimo segundo dia de armazenamento (7,343 µg/mL) ($p < 0,05$). Na temperatura de 45 °C, o éster teve uma maior degradação com uma redução radical significativa de 72,29%, de 9,53 para 2,64 µg/mL em tão somente três dias de armazenamento ($p < 0,05$). Na avaliação final (T₁₅) a redução foi de 99% observando o efeito drástico da temperatura sobre o éster.

OSANES apresentou uma redução significativa ($p < 0,05$) de 28,87%, (de 10,32 inicialmente para 7,34 µg/mL) no terceiro dia de armazenamento na temperatura de 45 °C. Nesta mesma temperatura, em T₁₅ o éster diminuiu até um 98% comparada com sua avaliação inicial, entretanto na temperatura de refrigeração o éster ficou estável durante todo seu armazenamento. OSANLU permaneceu estável na temperatura de 4 °C, embora na temperatura de 45 °C foi observada uma redução significativa ($p < 0,05$) de 24%, de inicialmente 12,48 µg/mL para 9,55 µg/mL no terceiro dia de armazenamento, com estabilidade até o final do armazenamento.

Com base nestes resultados, foi possível observar que o armazenamento a 4 °C retardou a redução da luteína, tanto a livre como esterificada. O efeito da temperatura na luteína foi também observado por Davidov-Pardo, Gumus e

McClements (2016) que avaliaram o efeito da temperatura de armazenamento na estabilidade física e química de emulsões enriquecidas com luteína livre e observaram a degradação deste carotenoide em diferentes temperaturas (5, 20, 37, 55 e 70 °C) e demonstraram que a degradação dessas reações geralmente aumenta com o aumento da temperatura, enquanto na temperatura mais baixa (5 °C) a degradação dos carotenoides foi menor.

A Tabela 2 mostra os parâmetros cinéticos e coeficientes de determinação (R^2) para a luteína em diferentes condições. Esses parâmetros cinéticos fornecem informações úteis sobre as mudanças na qualidade dos alimentos que ocorrem durante diversos processamentos (AHMED, SHIVHARE; SANDHU, 2002). As constantes de taxa de reação (k) quantificam a velocidade de uma reação química, neste contexto maiores constantes de reação levam a uma degradação mais rápida do carotenoide. Enquanto a energia de ativação (E_a) é a menor energia necessária para uma reação ocorrer. A degradação térmica da luteína apresentou um bom ajuste aos modelos cinéticos de primeira ordem com um coeficiente de variação mínimo de 0,70. Em geral, a degradação térmica dos carotenoides segue uma reação de primeira ordem. Achir et al. (2010) avaliaram a cinética de degradação de luteína e β -caroteno durante o tratamento térmico a 120, 140, 160 e 180 °C em óleos de oleína de palma e em óleo de fritura comercial, e observaram que as taxas iniciais de degradação do *trans*- β -caroteno e da *trans*-luteína aumentaram com a temperatura, e se ajustaram a modelos cinéticos de primeira ordem. Outros estudos realizados em nanoemulsões de luteína demonstraram um ajuste a um modelo cinético de primeira ordem, onde a diminuição na concentração de luteína durante o armazenamento depende da temperatura, produzindo uma linha reta com coeficientes de regressão variando de 0,63 a 0,98 (TEO et al., 2017). Outros estudos sobre degradação térmica de outros carotenoides como β -caroteno mostraram igualmente um ajuste ao modelo cinético de primeira ordem (KNOCKAERT et al., 2012; LIM; GRIFFIN; ROOS, 2014).

A energia de ativação é definida como a quantidade de energia requerida para uma determinada reação, e quanto menor o seu valor, mais rápida é a reação (JAFARI et al. 2017; CALIXTO, 2013). Partindo disto, foi observado que nas nanoemulsões com éster de luteína (reações semelhantes), especificamente OSANES exibiu maior E_a (75,12 KJ/mol⁻¹) e com isso sua reação aconteceu mais lenta que SONES (52,99 KJ/mol⁻¹). Por outro lado, as nanoemulsões compostas por luteína livre, SONLU

apresentou maior energia de ativação (20,83 KJ/mol⁻¹) comparada com OSANLU (12,57 KJ/mol⁻¹), assim a reação de OSANLU acontece mais rápido. Assim, podemos observar que o tipo de óleo nas nanoemulsões afeta as reações da luteína tanto de éster como de luteína livre. Davidov-Pardo, Gumus e McClements (2016) avaliaram o efeito da temperatura (5 a 70 °C) em emulsões enriquecidas com luteína e acharam uma energia de ativação de 38,38 kJ/mol⁻¹ maior que as Ea de OSALU e OSALU encontradas neste estudo. Também foi avaliado o efeito da temperatura na esterificação e estabilidade da luteína em grão de trigo, para a perda de luteína livre (10 e 130 °C) e éster de luteína (10 e 80 °C). Foram encontradas energias de ativação de 47,5 e 48,5 kJ/mol⁻¹, respectivamente (AHMAD et al., 2013), maiores do que as achadas neste estudo para a luteína livre (SONLU e OSALU) e menores que as energias dos ésteres (OSANES e SONES) deste estudo.

Tabela 2. Parâmetros cinéticos e coeficientes de determinação (R²) para nanoemulsões com óleo de semente de abóbora (OSA) e soja (SO) transportadoras de luteína durante 15 dias de armazenamento a 4 °C e 45 °C. OSANES, OSANLU, SONES e SONLU referem-se a nanoemulsão de OSA com éster de luteína, nanoemulsão de OSA com luteína livre, nanoemulsão de SO com éster de luteína e nanoemulsão de SO com luteína livre.

Nanoemulsão	Temperatura (°C)	Constante da taxa de reação k (dias ⁻¹)	t _{1/2} (dias)	R ²	Ea (KJ/mol ⁻¹)
OSANLU	4	0,0099	70,01	0,75	12,57
	45	0,0200	34,66	0,70	
OSANES	4	0,0041	169,06	0,93	75,17
	45	0,2745	2,53	0,90	
SONLU	4	0,0131	52,91	0,97	20,83
	45	0,0420	16,50	0,96	
SONES	4	0,0173	40,07	0,75	52,99
	45	0,3351	2,07	0,98	

Foi evidente como as nanoemulsões expostas a 45 °C apresentaram maiores constantes de taxa de reação, observando a influência da temperatura na degradação do carotenoide. Especificamente, as nanoemulsões de éster de luteína apresentaram maior degradação do carotenoide ao apresentar maiores constantes de taxa de reação (0,2745 e 0,3351 dias⁻¹ para OSANES e SONES, respectivamente), sendo

maior em SONES, considerando-se a nanoemulsão que exibiu uma degradação muito mais rápida. Dentro das amostras refrigeradas (4 °C), SONES mostrou maior constante de taxa de reação (0,0173 dias⁻¹) enquanto OSANES teve uma menor degradação por apresentar uma menor constante de taxa de reação (0,0099 dias⁻¹). Maiores constantes de taxa de reação implicam menor tempo de meia vida. Assim foi evidente como as nanoemulsões submetidas a maior temperatura apresentaram maiores constantes de taxa de reação e com isso menor tempo de meia vida contrastando com as nanoemulsões que permaneceram sob refrigeração, sendo as amostras de éster as que exibiram menor tempo de meia vida. Em 45 °C, a meia vida das nanoemulsões com éster de luteína foram semelhantes e menores (2,53 e 2,07 dias para OSANES e SONES respectivamente), comparadas com as nanoemulsões com luteína livre (34,66 e 16,5 dias para OSALU e SONLU, respectivamente). Dentro das nanoemulsões com luteína livre, a nanoemulsão de óleo de soja apresentou metade do tempo de meia vida (16,5 dias) comparada com as nanoemulsões de óleo de semente de abóbora (34,6 dias). De forma geral, as nanoemulsões de óleo OSA apresentaram maior tempo de meia vida em ambas temperaturas, destacando-se OSANES com maior tempo de meia vida de aproximadamente cinco meses e meio baixo condições de refrigeração, enquanto OSANLU apresentou aproximadamente a metade deste tempo (70,01 dias) nas mesmas condições de armazenamento.

Estudos demonstram que a esterificação promove maior solubilidade e estabilidade em ambientes adversos, sugerindo que os ésteres de carotenoides são mais estáveis que suas formas livres (MELENDEZ-MARTINEZ et al., 2019). Nosso estudo demonstrou que a luteína livre foi mais estável na temperatura de 45 °C que o éster de luteína, ao contrário dos resultados obtidos por Ahmad et al. (2013) que investigaram a síntese de ésteres de luteína e estabilidade de luteína livre e ésteres de luteína a longo de uma vasta gama de temperaturas no grão trigo e que demonstram que os ésteres de luteína são mais estáveis do que a luteína livre, com uma vida útil mais longa a 60 °C, enquanto a temperaturas ≤40 °C, a degradação da luteína foi mínima. Este comportamento não foi observado no presente estudo, já que nos sistemas nanoemulsionados, a luteína na sua forma livre apresentou maior estabilidade térmica, uma vez que a 45°C as nanoemulsões compostas por éster apresentaram maiores constantes de taxas de reação. Enquanto as emulsões com luteína livre apresentaram constantes de taxas de reação muito menores (0,0200 e

0,0420 para OSANLU e SONLU, respectivamente). Esses resultados podem ser explicados pelo teor de éster de luteína superficial (ou o teor de éster luteína que não foi encapsulado) das nanoemulsões, de forma que a *EE* de OSANES e SONES foi de 90,65 e 85,13% respectivamente, sendo menor as nanoemulsões de luteína livre (96,20 e 96,14 para OSANLU e SONLU, respectivamente).

Os sistemas avaliados anteriormente não foram em matrizes alimentares como as nanoemulsões, pode ser que quando o éster é nanoemulsionado sua taxa de degradação aumenta. Khalil et al. (2012) demonstraram que a degradação de éster de luteína das flores *Tagetes* foi maior quando foram nanoemulsionados em comparação à quando foram dispersos em uma fase de óleo a granel. Isto pode se explicar pelo fato de o carotenoide estar mais exposto a pró-oxidantes na fase aquosa de uma emulsão. Hejri et al. (2013) mediram a estabilidade de β -caroteno em nanoemulsões com Tween 20 e observaram que com aumento da temperatura a constante de reação aumenta, eles observaram valores de 0.00954, 0.06150 e 0.20726 h⁻¹ para 40, 60 e 80 °C, respectivamente. Estes resultados concordam com os achados neste estudo, onde houve um aumento da taxa de reação com o aumento da temperatura.

Por outra parte, o tipo de óleo que compõe a fase oleosa (SO e OSA) teve diferença significativa nos teores da luteína livre e do éster após 15 dias de armazenamento. Foi possível observar que os teores de carotenoides da luteína livre e do éster de luteína após 15 dias sofrem o mesmo tipo de degradação e independentemente do óleo principal na fase oleosa, porém com uma velocidade diferente e com teores significativamente diferentes na temperatura de 45 °C. A cinética pode explicar este comportamento de uma melhor forma. As amostras de óleo de soja apresentaram maiores constantes de taxas de reação nas duas formas da luteína em ambas as temperaturas. Na temperatura de 45 °C, a constante de taxa de reação de SONES foi 1,22 vez maior a OSANES, enquanto SONLU mostrou o dobro da constante de taxa de reação comparada com OSANLU. Desta forma, o tipo de óleo que compõe a fase oleosa (SO e OSA) nas duas temperaturas teve influência nos tratamentos.

As nanoemulsões de SO armazenadas a 45 °C, a degradação do éster de luteína começou mais rápido e foi mais drástica comparada com o óleo de OSA. No T₃ (terceiro dia de armazenamento) o éster teve uma diminuição aproximadamente 3

vezes maior no SO comparado com o OSA. No sexto dia de armazenamento, o éster no SO teve uma diminuição de aproximadamente a metade do teor do éster no OSA. Nesta mesma temperatura, mas com relação a luteína livre, no final do armazenamento a nanoemulsões de OSA sofreram uma diminuição de 30.37% enquanto no SO foi de 49.87%, mostrando um aumento na degradação neste óleo de aproximadamente 20% a mais. Nos controles não foi observado diferenças entre as emulsões de luteína livre, mas no éster foi observada uma diminuição de 25,94% no óleo de soja enquanto o OSA permaneceu estável até T₁₅.

Com base nestes resultados, foi possível confirmar que a temperatura tem um efeito drástico sobre o carotenoide nas suas duas formas, especialmente na sua forma éster. Também se observou a interação significativa entre tratamento, temperatura e tempo de armazenamento no teor de carotenoides ($p < 0,05$) com efeito sobre a degradação de luteína nas suas duas formas, ou seja, os três fatores juntos aceleram o processo de degradação deste carotenoide. Observou-se que as constantes de taxa de reação da luteína aumentaram com o aumento da temperatura em cada nanoemulsão. Essa tendência era esperada porque as temperaturas mais altas levam à maior degradação e oxidação dos carotenoides (DA SILVA et al., 2017). Temperaturas maiores levam a maiores perdas de carotenoides por causa da degradação de carotenoides, devido à formação de isomerização (*trans-cis*) e produção de produtos de oxidação como epóxidos, apo-carotenais, além da formação de compostos voláteis com baixo peso molecular, que dificilmente podem ser detectados por HPLC (ZEPKA et al., 2009). Especificamente, quando a luteína é exposta a tratamentos térmicos, pode sofrer processos de isomerização *trans-cis*. Estes processos de isomerização alteram as propriedades biológicas do carotenoide, levando à redução da atividade pró-vitamina A e da capacidade antioxidante (AMAN, SCHIEBER; CARLE, 2005).

Estudos realizados por Aman, Schieber e Carle (2005) demonstraram que o padrão all-*trans*-luteína continha 1,1% de 13-*cis*- e 0,9% de 13'-*cis* -luteína unicamente, mas depois de ser submetido a aquecimento a 98 °C por 60 min aumentou-se o conteúdo relativo de ambos isômeros para 18,3 e 16,8%, respectivamente. Outro estudo demonstrou que a all-(*E*)-luteína teve seu teor gradualmente reduzido durante tratamento térmico. Certas mudanças no conteúdo de seus (9Z/90Z) e (13Z/130 Isômeros Z) de luteína foram detectados. A concentração

desses isômeros aumenta gradualmente durante um determinado intervalo de tempo, até atingir um estado de equilíbrio na concentração máxima, como é esperado em reações de isomerização térmica reversível de carotenoides (MOLNÁR et al., 1997; MOLNÁR, 2009; APARICIO-RUIZ, MÍNGUEZ-MOSQUERA; GANDUL-ROJAS, 2011). Outros carotenoides mostraram isomerização quando foram submetidos a altas temperaturas. O *trans*- β -caroteno formou alguns isômeros durante o tratamento térmico, como 9-*cis*-, 13-*cis*- e 15-*cis* - β -caroteno (RIBEIRO E OLIVEIRA, 2013).

Portanto, a avaliação da estabilidade térmica de luteína é importante para compreender o comportamento da luteína dentro de uma matriz alimentar específica como as nanoemulsões, e conhecer qual é a melhor forma de entrega deste carotenoide seja na sua forma livre ou esterificada. Estes resultados nos ajudam a compreender melhor as relações estrutura-estabilidade da luteína que podem ser aplicadas industrialmente em matrizes alimentares que são tratadas termicamente, por exemplo, através da cocção ou pasteurização.

3.3.2. Efeito da temperatura na cor das nanoemulsões

A luteína normalmente possui uma cor amarela intensa, mas essa cor desaparece quando sofre degradação química. Sendo assim, a cor é um parâmetro adequado para monitorar os processos de oxidação (ANTOLOVICH et al., 2002). Portanto, a estabilidade química da luteína também foi monitorada medindo o desbotamento da cor usando um método colorimétrico não destrutivo. No espaço CIELAB as cores são descritas pelas coordenadas a^* (conteúdo de vermelho a verde) e b^* (conteúdo de amarelo e azul) ou pelo uso de coordenadas cilíndricas de luminosidade (L^*), tonalidade (h^*) e croma (C^*). A mudança nas coordenadas de cor das nanoemulsões durante o armazenamento a 4 e 45 °C é mostrada na Fig. 5, 6 e 7, tanto para as nanoemulsões de OSA como de SO.

Em geral, foi possível observar uma forte evidência da cor desvanecer-se nas nanoemulsões durante o armazenamento a 45 °C, especificamente as nanoemulsões com éster de luteína, como evidenciado por uma diminuição na intensidade de cor (em particular, b^*) e aumento da luminosidade, que são indicativos de desbotamento da cor devido à degradação do éster de luteína. SONES na temperatura de 4 °C teve o mesmo comportamento, mas houve um pequeno aumento na luminosidade e uma

diminuição apreciável no amarelo (+b*) durante o armazenamento comparada com a temperatura de 45 °C. Estes resultados sugerem que as nanoemulsões especialmente as de éster de luteína são extremamente instáveis à degradação química quando incubadas a temperaturas elevadas.

Em relação ao valor a^* (Fig. 5), observou-se que as nanoemulsões apresentaram valores próximos ao zero e negativos situando-se na cor verde. Os valores de a^* aumentaram negativamente quando a temperatura de armazenamento aumentou. Os valores de a^* aumentaram entre o valor inicial (T_0) e final (T_{15}) 6,84, 6,24, 3,38 e 108 vezes para OSANES, OSANLU, SONES e SONLU, respectivamente, na temperatura de 45 °C, e manteve-se relativamente constante, na temperatura de incubação mais baixa. Para as amostras controle houve um pequeno aumento unicamente para nanoemulsões de éster, sendo de 1,53 e 1,71 vezes para OSANES e SONES, respectivamente. Provavelmente, o principal parâmetro que afetou os valores de a^* (vermelho-verde) das nanoemulsões foi o tipo de óleo. As nanoemulsões de óleo de OSA tiveram valores mais negativos de a^* do que as nanoemulsões de óleo de soja, o que sugere que eram ligeiramente mais esverdeadas. Este efeito pode ser devido ao fato de o óleo de OSA ter um tom esverdeado. Esta relação entre o valor a^* e o tipo de óleo também foi observado por Steiner et al. (2019) em nanoemulsões de luteína em óleo de triglicérido de cadeia média e de semente de uva. Este efeito pode ser devido ao fato de o óleo de semente de uva ter um tom esverdeado enquanto o óleo de triglicérido de cadeia média era incolor.

Na figura 5, podemos observar que a intensidade da cor amarela (valor positivo b^*) não diminuiu significativamente para as emulsões armazenadas a 4 °C durante o armazenamento, com exceção da SONES, que teve uma diminuição de 1.1 vezes (de 45.52 para 41.87) até o final do armazenamento. Não obstante, na temperatura de 45 °C, o éster de luteína diminuiu abruptamente ($p < 0.05$). OSANES e SONES diminuíram 11.51 vezes (de 45.483 para 3.95) e 6.88 vezes (de 45.52 para 6.61), respectivamente, até o final da estocagem. As demais nanoemulsões de luteína diminuíram apenas ligeiramente durante o armazenamento indicando que ocorreu pouca degradação química do carotenoide na sua forma livre. Estudos realizados por Caballero; Davidov-pardo, (2020) avaliaram a retenção da cor de luteína e observaram que todas as emulsões enriquecidas com luteína diminuíram no parâmetro b^* sobre

armazenamento durante duas semanas a 4 e 55 °C, indicando a perda de cor amarela com o aumento do tempo e temperatura, que é consistente com a oxidação da luteína.

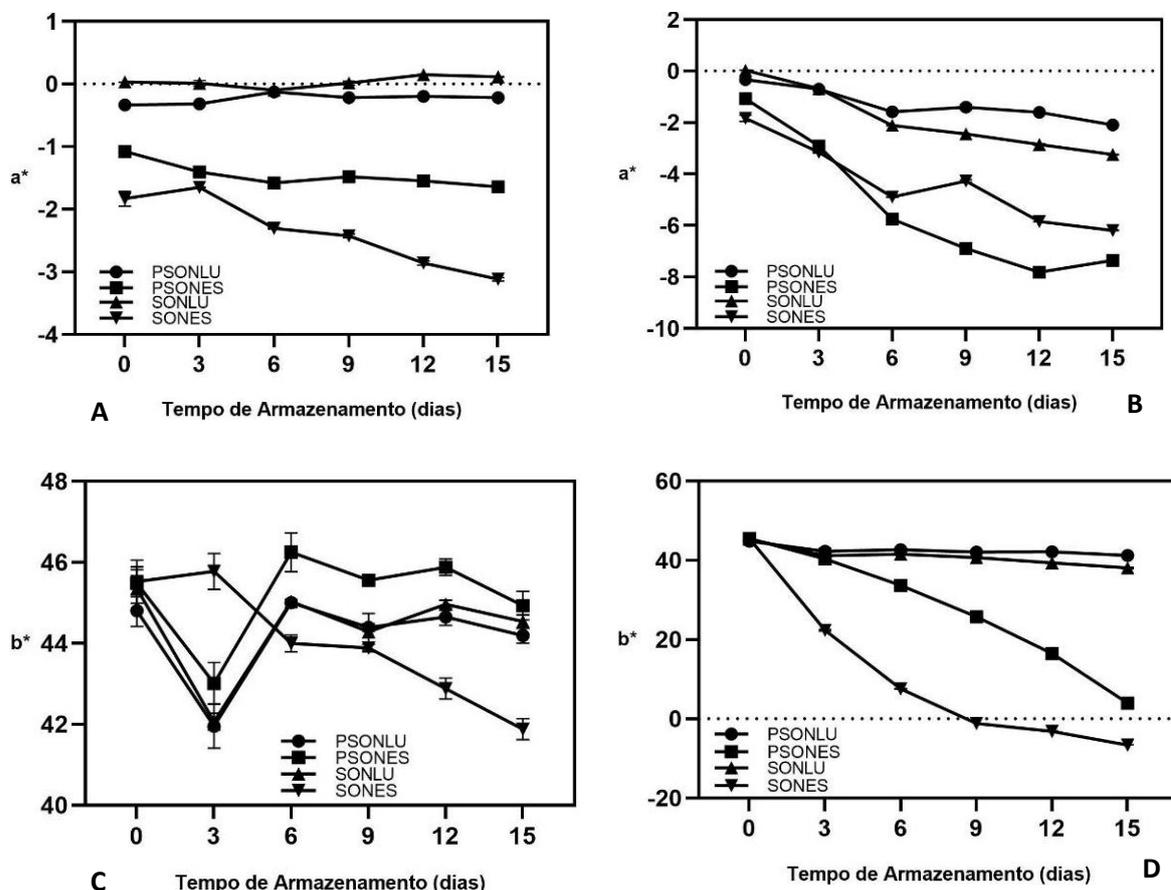


Figura 5. Mudanças na cor de nanoemulsões com óleo de semente de abóbora (OSA) e soja (SO) transportadoras de luteína durante 15 dias de armazenamento a 4 °C (A , C) e 45 °C (B,D): a* (“vermelhidão”); b* (“amarelecimento”). OSANES, OSANLU, SONES e SONLU referem-se a nanoemulsão de OSA com éster de luteína, nanoemulsão de OSA com luteína livre, nanoemulsão de SO com éster de luteína e nanoemulsão de SO com luteína livre.

Com relação a saturação de cor (C*) (Fig. 6), as nanoemulsões controle de luteína livre não apresentaram diferença significativa com relação ao seu valor inicial. Mas na temperatura de 45 °C, houve uma diminuição ligeira (1.18 vezes de 44.81 para 41.296 para OSA e 0,93 vezes 41,17 para 38,21 para SO) para ambos os óleos. Enquanto as nanoemulsões de éster de luteína apresentaram uma diminuição radical de 5.45 (de 45.50 para 8.35) e 9.04 (45.55 para 5.04) vezes para OSANES e SONES, respectivamente. Na temperatura de 4 °C, SONES teve uma ligeira diminuição de 1.18 vezes (de 45.55 para 41.99). Isso sugere que temperaturas maiores especificamente

das nanoemulsões de éster de luteína diminuem a saturação das amostras se aproximando a cores mais puras como o branco indicativo da degradação do carotenoide, sabendo que a saturação está ligada a concentração do composto corante, neste caso de luteína, que representa um atributo quantitativo para intensidade (FERREIRA; SPRICIGO, 2017).

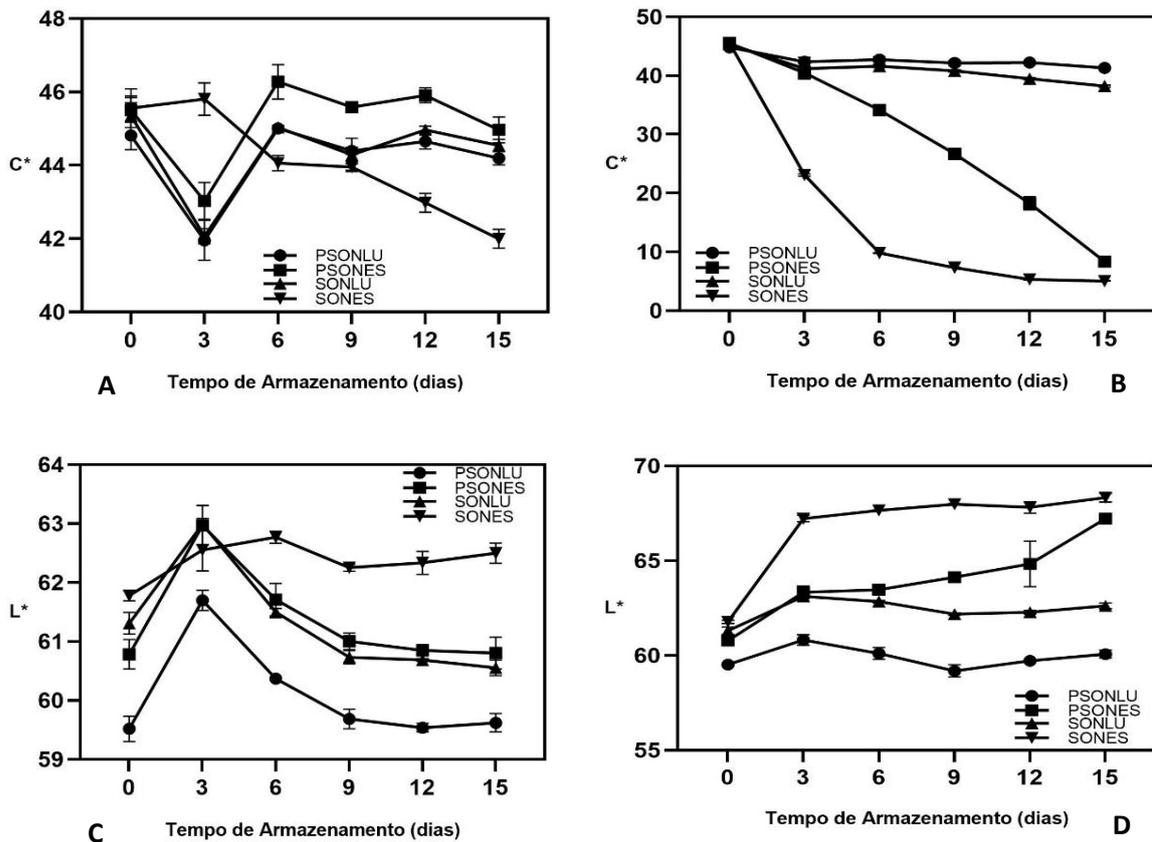


Figura 6. Mudanças na cor de nanoemulsões com óleo de semente de abóbora (OSA) e soja (SO) transportadoras de luteína durante 15 dias de armazenamento a 4 °C (A, C) e 45 °C (B, D): C* (saturação); L* (luminosidade). OSANES, OSANLU, SONES e SONLU referem-se a nanoemulsão de OSA com éster de luteína, nanoemulsão de OSA com luteína livre, nanoemulsão de SO com éster de luteína e nanoemulsão de SO com luteína livre.

A luminosidade (L*) (Fig. 6) não foi influenciada drasticamente pela temperatura. As amostras PONES e SONLU na temperatura de 45 °C foram as que apresentaram um incremento que não superou o 11% no dia 15 de armazenamento, sendo consideradas amostras mais claras. A luminosidade de uma emulsão tende a aumentar à medida que a intensidade da cor diminui, graças ao aumento da reflexão

da luz de suas superfícies (MCCLEMENTS, 2002). Isto pode explicar o fato que a diminuição da cor amarela das nanoemulsões estocadas a 45 °C poderiam ter um aumento da luminosidade como o caso da PONES. Outros estudos com nanoemulsões de luteína apresentaram o mesmo comportamento quando a temperatura aumentou de 25 para 35 °C, em que os valores L* aumentaram progressivamente em todas as amostras porque mais luz foi refletida quando a cor desbotamento ocorreu, levando a uma aparência mais brilhante (STEINER et al., 2019).

As amostras OSANES e SONES tiveram um aumento drástico de 1.65 e 2.71 vezes na tonalidade (h) (Fig.7), adquirindo valores finais de 151.77 e 244.51, respectivamente. Ao final da estocagem, as tonalidades ficaram próximas ao verde e azul, respectivamente, o que pode ser resultado da degradação do éster de luteína, perdendo sua tonalidade amarela e evidenciando-se a cor verde característica como no caso do OSA.

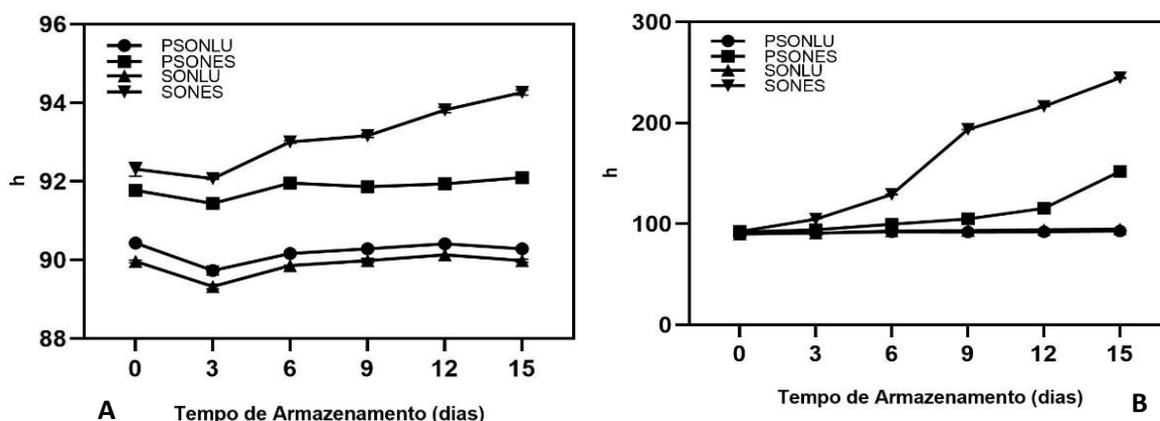


Figura 7. Mudanças na cor de nanoemulsões com óleo de semente de abóbora (OSA) e soja (SO) transportadoras de luteína durante 15 dias de armazenamento a 4 °C (A) e 45 °C (B): h (tonalidade). OSANES, OSANLU, SONES e SONLU referem-se a nanoemulsão de OSA com éster de luteína, nanoemulsão de OSA com luteína livre, nanoemulsão de SO com éster de luteína e nanoemulsão de SO com luteína livre.

Estes resultados mostraram os efeitos da temperatura na estabilização das nanoemulsões durante seu armazenamento. A temperatura teve uma influência pronunciada no desbotamento da cor. A mudança na luminosidade, tonalidade, saturação e amarelecimento durante o armazenamento foi muito menos acentuada e

evidenciada quando as emulsões foram armazenadas a 4 °C do que a altas temperaturas (45 °C).

Diversos estudos têm demonstrado que a temperatura apresenta efeito significativo no desbotamento da cor amarela característico da luteína (GUMUS, DAVIDOV-PARDO; MCCLEMENTS, 2016; STEINER; MCCLEMENTS; DAVIDOV-PARDO, 2018). Estudos realizados por Surh, Decker e McClements (2017), demonstraram que após de um mês de armazenamento das emulsões de luteína, a luminosidade aumentou, e o amarelecimento diminuiu significativamente em comparação com os valores iniciais medidos após a preparação, concordando com os resultados obtidos neste estudo. Sabe-se que a cor da luteína diminui durante o armazenamento devido à decomposição química por diferentes mecanismos como oxidação e isomerização do carotenoide (BOON et al., 2010; DAVIDOV-PARDO, GUMUS; MCCLEMENTS, 2016). Especificamente, a cadeia de polieno conjugado da luteína, responsável por sua intensa cor amarela e laranja, é suscetível à degradação oxidativa pela luz, calor e oxigênio (BOON et al., 2010).

O desbotamento das cores das nanoemulsões também foi observado pela observação visual. Fotografias de nanoemulsões durante o armazenamento a 4°C e 45 °C são apresentadas na Fig. 8. SONES tornou-se quase incolor após 15 dias de aquecimento (45 °C). Visualmente, durante o armazenamento não foi observada separação de fases até o final da estocagem. A redução da cor visual foi menos significativa na nanoemulsão armazenada a 45 °C da luteína livre comparada com o éster, demonstrando maior estabilidade da luteína livre nestas condições e neste sistema de entrega. As emulsões armazenadas a 4 °C foram visualmente estáveis sem alterações visíveis de cor, demonstrando que uma temperatura mais alta gera maior degradação do carotenoide. Este desbotamento de cor pode ter ocorrido porque algumas das moléculas de luteína oxidaram durante o armazenamento nestas temperaturas (KHALIL et al.,2012).

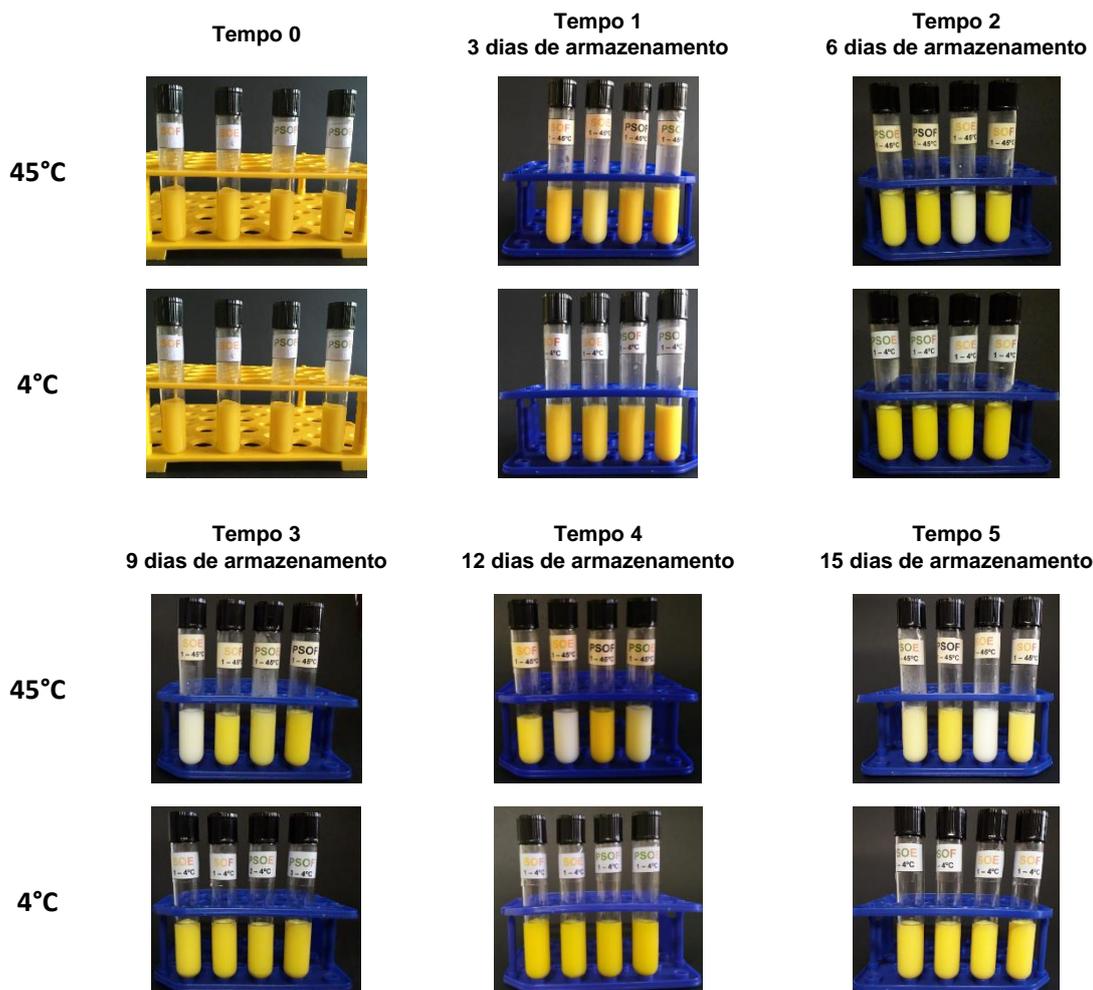


Figura 8. Aparência das nanoemulsões de óleo de semente de abóbora e óleo de soja transportadoras de luteína. Termoestabilidade durante 15 dias a 4 e 45 °C. OSANES, OSANLU, SONES e SONLU referem-se a nanoemulsão de OSA com éster de luteína, nanoemulsão de OSA com luteína livre, nanoemulsão de SO com éster de luteína e nanoemulsão de SO com luteína livre.

3.3.3. Efeito da temperatura na estabilidade física das nanoemulsões

As emulsões podem facilmente sofrer desestabilização em condições ambientais desfavoráveis, devido à sua instabilidade termodinâmica (ZHAI et al., 2018). As altas temperaturas podem gerar ou acelerar o movimento browniano para que as gotas possam se aproximar entre si (CARPENTER; SAHARAN, 2017), aumentando as chances de ocorrência de processos de desestabilização, como o amadurecimento de Oswald. Por este motivo, a estabilidade física das nanoemulsões foi avaliada ao longo de 15 dias, a 4 e 45 °C (Figura 9-10).

Foi observada interação significativa entre o tipo de óleo e de luteína (livre ou éster), tempo de armazenamento e temperatura para todos os parâmetros avaliados

de estabilidade física. A temperatura não teve efeito significativo no diâmetro hidrodinâmico das partículas. Todas as partículas apresentaram um diâmetro inferior a 200 nm até o final do armazenamento (Fig. 9). Neste sentido, o diâmetro médio de partícula inicial de OSANES, OSANLU, SONLU e SONES não mostrou alterações significativas até o final do armazenamento nas duas temperaturas, o que indicou que eram relativamente estáveis ao crescimento de gotículas, mesmo em altas temperaturas. Portanto, não se espera que o amadurecimento de Ostwald afete a estabilidade da nanoemulsão. Isto sugere que o método de homogeneização de alto cisalhamento para obter nanoemulsões foi suficiente para diminuir homoganeamente o tamanho e a distribuição das gotas de nanoemulsão. Estudos realizados em sistemas de entrega à base de emulsão enriquecida com luteína não mostraram aumento no tamanho médio das partículas quando foram armazenadas a diferentes temperaturas (5, 20, 37, 55 e 70 °C) durante 14 dias (DAVIDOV-PARDO; GUMUS; MCCLEMENTS, 2016).

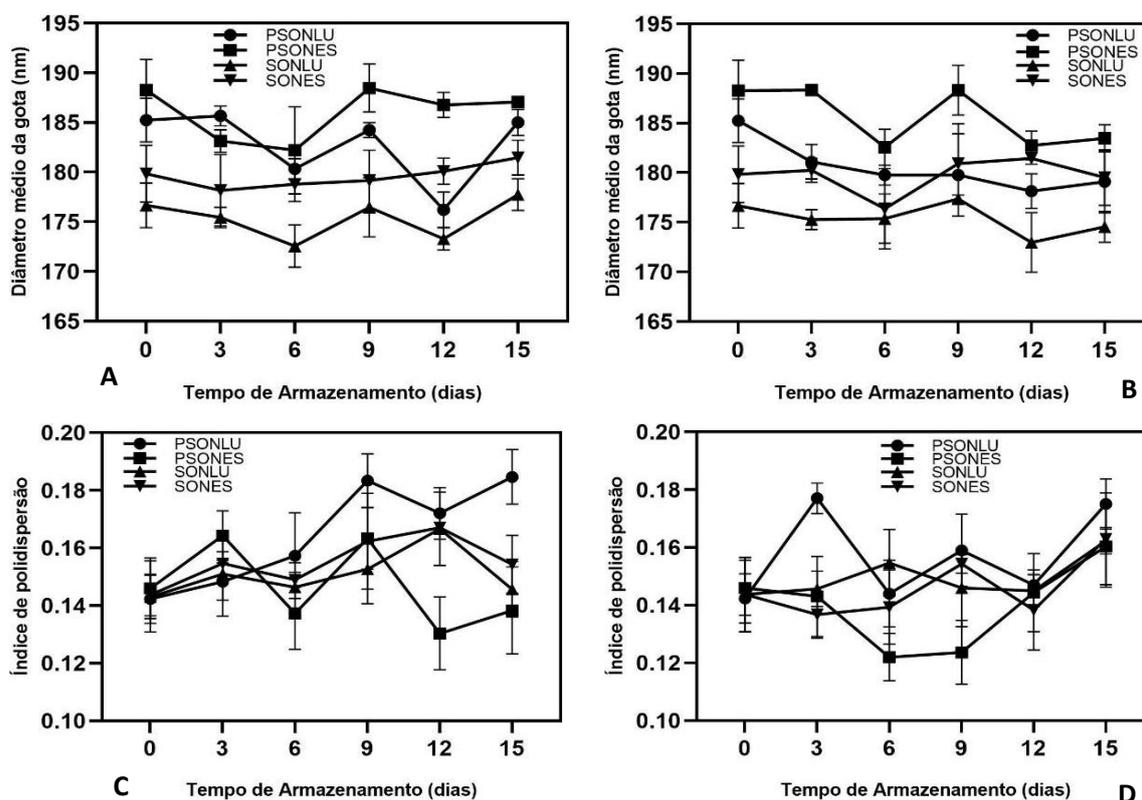


Figura 9. Variações no diâmetro hidrodinâmico das gotículas e no índice de polidispersão em nanoemulsões com óleo de semente de abóbora (OSA) e soja (SO) transportadoras de luteína durante 15 dias de armazenamento a 4 °C (A, C) e 45 °C (B,D). OSANES, OSANLU, SONES e SONLU referem-se a nanoemulsão de OSA com éster de luteína, nanoemulsão de OSA com luteína livre, nanoemulsão de SO com éster de luteína e nanoemulsão de SO com luteína livre.

Na figura 9, foi possível verificar que não houve alteração significativa no IPD com relação ao último dia (dia 15) de armazenamento das nanoemulsões nas duas temperaturas. Todas elas apresentaram um IPD maior de 0,2 (Fig 9), considerando-se amostras monodispersas independente da temperatura ($p < 0,05$).

A carga de partículas é um dos fatores que determina a estabilidade física de nanoemulsões. Quanto maior a repulsão eletrostática entre as partículas, maior a estabilidade física (MISHRA et al., 2009). O potencial zeta (Fig. 10) para OSANLU, OSANES, SONLU e SONES ao final do armazenamento foi de aproximadamente -33,43, -34,07, -23,50 e -23,13 mV e -31,56, -35,30, -14,16 e -24,75 mV para 4 e 45 °C, respectivamente. A temperatura maior teve influência nas cargas das partículas. SONLU, a 45 °C diminuiu negativamente sua carga líquida, atingindo valores mais próximos ao zero, tornando-se mais instável eletro-cineticamente falando, e mais susceptível a processos de agregação (SARI et al., 2015). Esta diminuição de potencial zeta pode ser resultado da oxidação da luteína que gera radicais altamente reativos (BOON et al., 2010). Esta tendência de diminuição de potencial zeta quando as nanoemulsões são submetidas a alta temperatura também foi observada porque observaram diminuição significativa do potencial zeta em nanoemulsões carregadoras de luteína de -40 mV para -34 mV de 5 a 70 °C (DAVIDOV-PARDO; GUMUS; MCCLEMENTS, 2016).

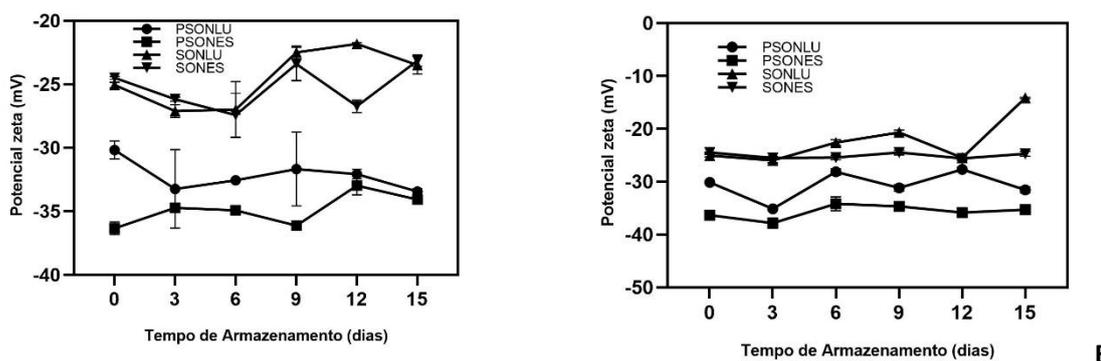


Figura 10. Mudanças no potencial zeta de nanoemulsões com óleo de semente de abóbora (OSA) e soja (SO) transportadoras de luteína durante 15 dias de armazenamento a 4 °C (A) e 45 °C (B). OSANES, OSANLU, SONES e SONLU referem-se a nanoemulsão de OSA com éster de luteína, nanoemulsão de OSA com luteína livre, nanoemulsão de SO com éster de luteína e nanoemulsão de SO com luteína livre.

3.4. Impacto da luz UV na estabilidade química e física de nanoemulsões enriquecidas com luteína

A fotodegradação é um dos processos mais comuns causando a perda de diversos compostos bioativos. No processamento e na distribuição de alimentos, existem embalagens permeáveis à luz ou situações de exposição à luz, em que os carotenoides podem apresentar perdas importantes (PESEK; WARTHESEN, 1990; HE et al., 2000). Portanto, mais informações sobre os efeitos da luz em produtos que contêm carotenoides são necessárias. Neste estudo foi avaliada a foto-estabilidade da luteína em nanoemulsões durante 240 minutos.

3.4.1. Degradação da luteína livre e do éster de luteína das nanoemulsões

Neste estudo, para todas as nanoemulsões, o tipo de exposição (com ou sem exposição à luz UV) e tempo de armazenamento apresentaram influência significativa sobre a concentração da luteína ($p < 0,05$). Na figura 11 e anexo 5, pode-se observar que as nanoemulsões quando expostas a luz UV, OSALU e OSANES apresentaram degradação química de aproximadamente 90% até o final da sua exposição. Comportamento parecido foi observado em SONLU e SONES, que apresentaram redução de 84,59% e 99,03%, respectivamente, no teor do carotenoide até os 240 minutos de exposição. Isso pode ser atribuído à formação de oxigênio singlete através dos compostos biológicos na presença de luz UV. Posteriormente, o oxigênio singlete liga-se à cadeia de hidrocarbonetos dos carotenoides, levando à sua degradação (YAHIA; ORNELAS-PAZ, 2010). Foi observado que o SONES apresentou uma diminuição de 50% trinta minutos após a exposição, enquanto SONLU, por um intervalo de tempo, durante os primeiros 30 min as amostras inicialmente exibiram boa estabilidade de luteína total ($>95,0\%$). No entanto, em contínua exposição o conteúdo de luteína caiu gradualmente.

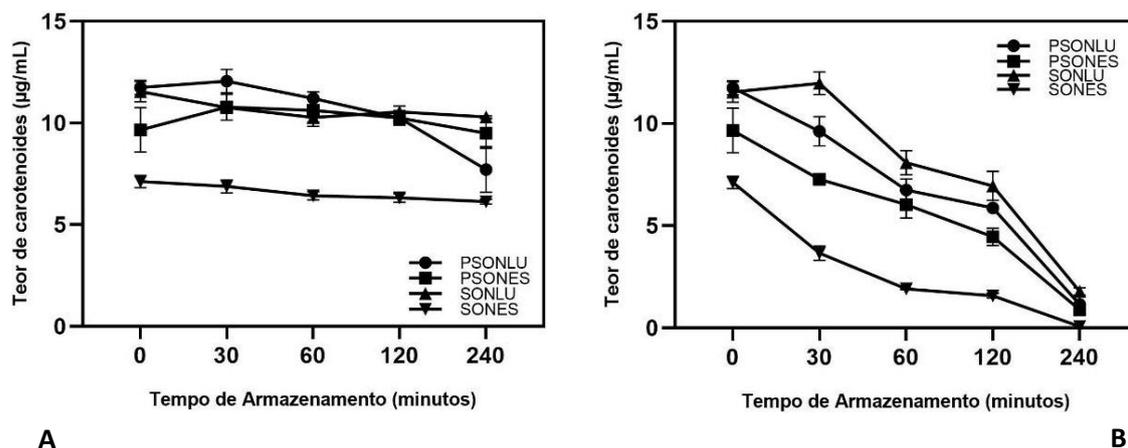


Figura 11. Variações no teor de carotenoides de nanoemulsões com óleo de semente de abóbora (OSA) e soja (SO) transportadoras de luteína durante 240 minutos expostas a luz ultravioleta. Controle (A) e Expostas (B). OSANES, OSANLU, SONES e SONLU referem-se a nanoemulsão de OSA com éster de luteína, nanoemulsão de OSA com luteína livre, nanoemulsão de SO com éster de luteína e nanoemulsão de SO com luteína livre.

As nanoemulsões que não ficaram expostas à luz (controle) exibiram maior retenção de luteína até o final da exposição, sendo consideradas mais estáveis nestas condições, já que apresentaram uma redução máxima de 13%, sendo evidente o efeito drástico da foto-exposição com luz UV sobre a luteína, seja na sua forma livre ou esterificada. Com relação ao tipo de óleo, as amostras com óleo de soja, SONES e SONLU apresentaram diferenças significativas quando foram expostas à luz enquanto não foi observado diferença nos demais tratamentos (OSA) sob ambas condições de exposição. Isto pode ser consequência de que o OSA apresenta na sua composição compostos bioativos, como tocoferóis, que poderão ter exercido alguma ação antioxidante ou protetora sobre luteína, que não permitiu observar uma diferença significativa no carotenoide neste tipo de exposição.

A Tabela 3 mostra os parâmetros cinéticos para as nanoemulsões de luteína nas duas formas, armazenadas em diferentes condições. As nanoemulsões expostas a luz UV apresentaram uma maior constante de taxa de reação, que também foi maior nas nanoemulsões carregadoras de éster de luteína, neste sentido a maior taxa de reação foi observada em SONES ($0,0184 \text{ min}^{-1}$). Isso demonstra que a degradação de luteína ocorre mais rapidamente quando estão na forma esterificada em nanoemulsões, reafirmando os resultados obtidos no teste de estabilidade térmica. Por outro lado, para as nanoemulsões com OSA, as duas formas de a luteína

apresentaram constantes de reação semelhantes (0,00095 e 0,00097 para OSALU e OSANES, respectivamente), demonstrando que sob condições de luz UV e em um sistema nanoemulsionado com OSA as luteínas livre e esterificada apresentaram um comportamento similar.

Tabela 3. Parâmetros cinéticos e coeficientes de determinação (R^2) para nanoemulsões com óleo de semente de abóbora (OSA) e soja (SO) transportadoras de luteína durante 240 minutos de exposição a luz ultravioleta. OSANES, OSANLU, SONES e SONLU referem-se a nanoemulsão de OSA com éster de luteína, nanoemulsão de OSA com luteína livre, nanoemulsão de SO com éster de luteína e nanoemulsão de SO com luteína livre.

Nanoemulsões	Exposição a luz UV	Constante de reação k (minutos⁻¹)	t_{1/2} (minutos)	R²
OSANLU	Sim	0,0095	72,96	0,95
	Controle	0,0019	364,81	0,96
OSANES	Sim	0,0097	71,46	0,96
	Controle	0,0006	1155,25	0,97
SONLU	Sim	0,0080	86,64	0,94
	Controle	0,0004	1732,87	0,73
SONES	Sim	0,0184	37,67	0,95
	Controle	0,0006	1155,25	0,78

O efeito do tipo de óleo também pode ser substancial, pois podem conceber opacidade à emulsão, protegendo os carotenoides da exposição direta à luz (DAHL et al., 1994). Isto pode ter acontecido, uma vez que o OSA apresenta uma cor mais escura. Adicionalmente, a presença de antioxidantes no óleo, como o tocoferol, pode ter gerado algum efeito protetor sobre a luteína. Mortensen e Skibsted (1999) demonstraram que a luteína, o β -caroteno e o licopeno sofreram processo de degradação refletido no seu branqueamento pela luz fluorescente. No entanto, na presença de γ -tocoferol, o efeito pró-oxidante dos carotenoides foi inibido e seu clareamento foi retardado.

A luteína é facilmente suscetível à degradação química quando exposta à luz, oxigênio e calor por meio de um mecanismo de oxidação que pode ser atribuída à sua estrutura molecular (BOON et al., 2010). Esta tendência de redução do teor de luteína também foi observada por Shi e Chen (1997) que avaliaram a foto-estabilidade de

luteína livre, e concluíram que a iluminação promoveu a redução da luteína livre em 5% de ácido ascórbico e 10 M KOH. Su et al. (2020) observaram este mesmo comportamento no teor da luteína quando elas foram expostas a luz UV, com uma redução de até 75%, enquanto as amostras-controle apresentaram perdas de 38%, eles também demonstraram que a luteína livre emulsionada retardou o processo de degradação da luteína, e observaram uma retenção de até 46 % em luteína não emulsionada enquanto a luteína emulsionada em géis apresentou uma retenção de até 78%.

Com relação ao tempo de meia vida (Tab.3), como se esperava, as nanoemulsões que não foram expostas à luz UV apresentaram maior tempo de meia vida. Dentro dos tratamentos analisados, SONES apresentou menor tempo de meia vida (37,02 min), enquanto SONLU apresentou quase o dobro de tempo (86,64 min). OSALU e OSANES apresentam o mesmo tempo de meia vida nestas mesmas condições, mas quando não foram expostas a luz UV, o tempo de meia vida de OSANES é drasticamente maior, de até três vezes a mais aproximadamente. Ferreira e Rodriguez-Amaya (2008) avaliaram o efeito da luz na degradação de licopeno, e observaram um tempo de meia vida de 13 e 10 dias para amostras armazenadas no escuro e sob luz ultravioleta em temperatura ambiente, respectivamente, demonstrando de igual modo que neste estudo, o efeito da luz na degradação expresso na redução do tempo de meia vida do carotenoide.

As xantofilas como a luteína, astaxantina e zeaxantina são sensíveis ao calor, luz e outros estressores oxidativos (MARTÍNEZ-DELGADO et al., 2017). A luteína é considerada um carotenoide fotossensível, um polímero isoprenoide contendo muitas ligações duplas conjugadas, que podem ser prontamente isomerizadas, oxidadas e degradadas. A foto-oxidação produz espécies consideradas cátions radicais carotenoides (MORTENSEN E SKIBSTED, 1996; KONOVALOVA et al., 2001). Além disso, a radiação UV pode ter levado a luteína a reagir com moléculas de solvente para formar radicais livres por meio da reação de abstração de hidrogênio, levando à degradação oxidativa (BOON et al, 2010).

Na última avaliação visual (Fig. 12) foi evidente que as nanoemulsões que ficaram expostas a luz UV, especialmente as de éster de luteína, apresentaram visualmente maior desbotamento da cor amarela característica. SONES apresentou uma coloração branca na última avaliação, podendo ser resultado de um

branqueamento irreversível no fotossistema II, quando as vias usuais de transferência de elétrons estão bloqueadas, como acontece em altas intensidades de luz. Com seus sistemas de elétrons conjugados estendidos, os carotenoides são facilmente oxidados, e o fotobranqueamento, geralmente, implica a oxidação do carotenoide. Os carotenoides podem ser fotobranqueados por dois mecanismos diferentes: (i) reações entre o carotenoide de estado excitado formado pela absorção de luz e outros compostos ou (ii) formação de estados excitados (singleto ou tripleto) ou radicais de outras moléculas por fotólises e subsequente reação dessas espécies reativas com carotenoides. Ambos os processos podem levar à degradação do carotenoide (MORTENSEN E SKIBSTED, 1999).



Figura 12. Aparência das nanoemulsões de óleo de semente de abóbora e óleo de soja transportadoras de luteína. Foto-estabilidade durante 420 minutos. OSANES, OSANLU, SONES e SONLU referem-se a nanoemulsão de OSA com éster de luteína, nanoemulsão de OSA com luteína livre, nanoemulsão de SO com éster de luteína e nanoemulsão de SO com luteína livre.

Estes resultados destacam como é importante ter uma compreensão crítica dos mecanismos de degradação e oxidação do carotenoide para que as tecnologias possam ser desenvolvidas para otimizar a estabilidade em alimentos funcionais para lograr a entrega adequada deste carotenoide.

3.4.2. *Impacto da Luz UV na estabilidade física das nanoemulsões*

As emulsões podem facilmente sofrer desestabilização em condições ambientais desfavoráveis, devido à sua instabilidade termodinâmica, aumentando as chances de ocorrência de processos de desestabilização (ZHAI et al., 2018). Foi observada interação significativa entre o tipo de nanoemulsão, tempo de armazenamento e exposição das emulsões a luz UV para todos os parâmetros avaliados de estabilidade física. A Figura 13 mostra que, dentro de cada tratamento, o diâmetro não apresentou diferença significativa com relação à última avaliação (240 min), mas nas amostras expostas a luz UV foi evidenciado um aumento do diâmetro de partícula em todas as nanoemulsões comparado com seu valor inicial, adquirindo na última avaliação valores de 196,63, 206,90, 197,10 e 198,60 nm OSANLU, OSANES, SONLU e SONES, respectivamente, sendo nanoemulsões mais sensíveis à exposição de luz UV. O índice de polidispersão permaneceu estável em todas as nanoemulsões em ambas temperaturas, com exceção de OSALU que, apesar de ter diferença significativa com seu valor inicial, não apresentou aumento no IPD. Em geral, o IPD foi maior de 0,2, sendo consideradas nanoemulsões monodispersas (MUDALIGE et al., 2019). Estes resultados concordam com estudos realizado por Mitri et al. (2011), que demonstraram que partículas carregadas com luteína submetidas à luz UV mostram aumentos significativos no tamanho de partícula com o decorrer do tempo durante um mês (166 nm a 350 nm).

Com relação ao potencial zeta, as OSANLU, SONLU e SONES apresentaram valores de -36.40, -40.43 e -48.87 mV, respectivamente. Estas nanoemulsões apresentaram um aumento significativo no seu potencial até o final da exposição. Observou-se uma leve variação no potencial nas nanoemulsões de OSANLU, OSANES e SONLU. Neste sentido, a luz UV não afetou a estabilidade física das nanoemulsões. Ao contrário, gerou mais estabilidade ao sistema ao aumentar os valores do potencial zeta (>-25 mV) (MUDALIGE et al., 2019).

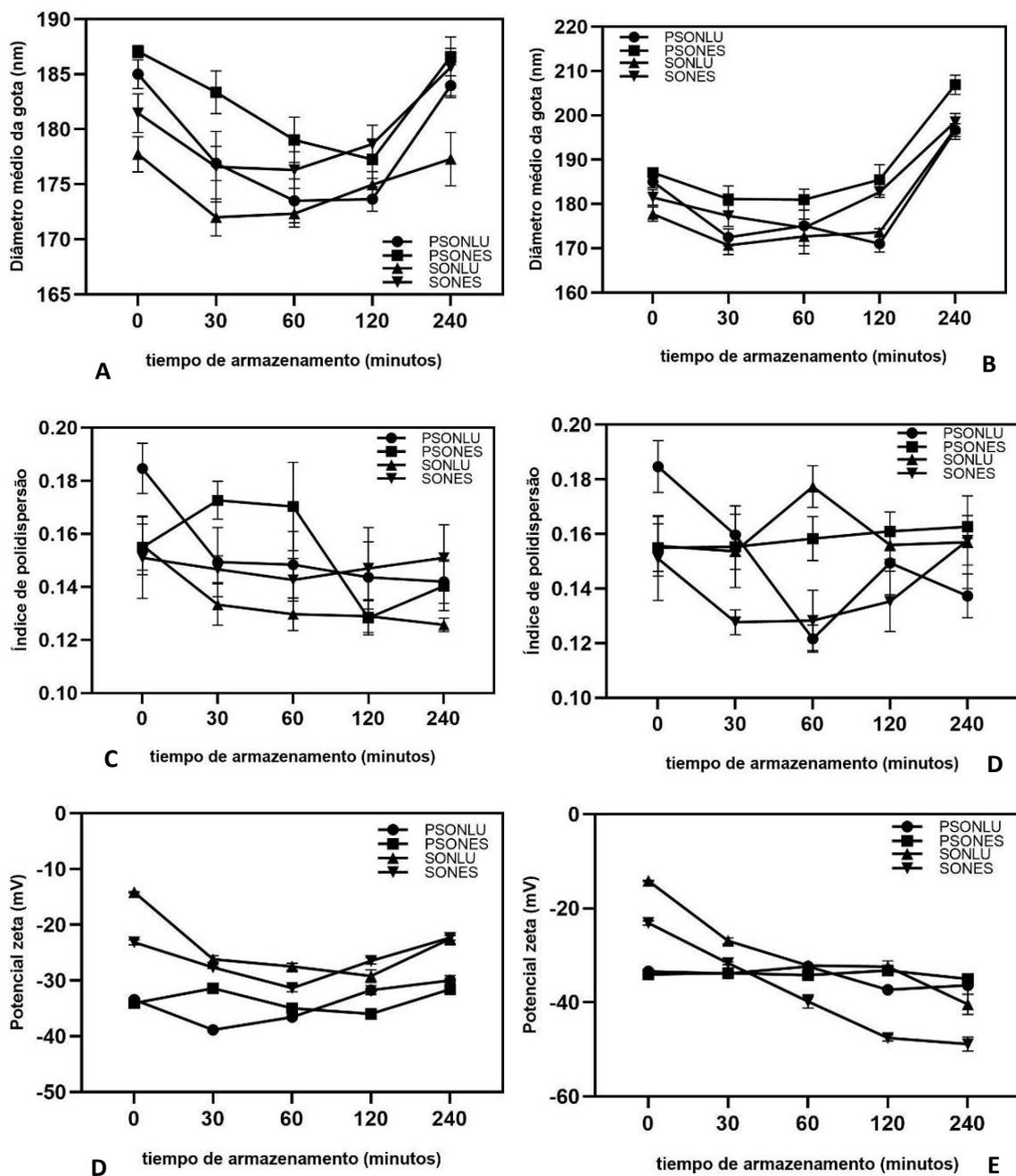


Figura 13. Variações no diâmetro hidrodinâmico das gotículas, índice de polidispersão e potencial zeta de nanoemulsões com óleo de semente de abóbora (OSA) e soja (SO) transportadoras de luteína durante 240 minutos expostas a luz ultravioleta. Expostas (A,C,D) e controle (B,D,E). OSANES, OSANLU, SONES e SONLU referem-se a nanoemulsão de OSA com éster de luteína, nanoemulsão de OSA com luteína livre, nanoemulsão de SO com éster de luteína e nanoemulsão de SO com luteína livre.

4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, é possível concluir que em um sistema de nanoemulsões, a luteína livre apresentou maior termo e foto-estabilidade comparada com o diéster de palmitato produzido pela síntese orgânica. Na condição de temperatura mais elevada (45 °C) as nanoemulsões formadas com o OSA apresentaram menor degradação comparadas com as nanoemulsões de SO. Sob exposição à luz UV, as nanoemulsões de OSA foram mais estáveis no éster de luteína, enquanto a luteína livre apresentou menor degradação nas nanoemulsões de óleo de soja. Os dados obtidos tiveram um comportamento consistente com o modelo cinético de primeira ordem. Em 45 °C e sob exposição a luz UV, SONES, apresentou a maior taxa de constante de reação, estimando assim a vida de prateleira de 2 dias e 37,67 minutos, respectivamente, sendo considerados os menores tempos de meia vida comparado com as demais nanoemulsões. Como esperado, as nanoemulsões expostas à maior a temperatura e luz UV apresentaram um desbotamento da cor do carotenoide com maior incidência no diéster de luteína. Estes resultados propõem que a temperatura de armazenamento ideal para estas nanoemulsões é 4 °C. Esta temperatura retardou a degradação da luteína, tanto livre como esterificada.

As nanoemulsões enriquecidas com luteína podem ser usadas para criar corantes naturais ou fortalecer alimentos funcionais em um nível que possa ser benéfico para a saúde humana, como na prevenção de doenças oculares degenerativas. Ademais, a termo e foto-estabilidades de compostos bioativos, especificamente da luteína, é fundamental para um melhor entendimento do seu comportamento para aplicação industrial.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-AAL, E. M.; AKHTAR, H.; ZAHEER, K.; ALI, R. Dietary Sources of Lutein and Zeaxanthin Carotenoids and Their Role in Eye Health. *Nutrients*, v. 5, n. 4, p. 1169-1185, 2013.

ACHIR, N.; RANDRIANATOANDRO, V. A.; BOHUON, P.; LAFFARGUE, A.; AVALLONE, S. Kinetic study of β -carotene and lutein degradation in oils during heat treatment. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 112, n. 3, 2010.

AHMAD, F.T.; ASENSTORFER, R.E.; SORIANO, I.R.; MARES, D.J. Effect of temperature on lutein esterification and lutein stability in wheat grain. *Journal of Cereal Science*, v. 58, n. 3, p. 408-413, 2013.

AHMED, J.; SHIVHARE, U. S.; SANDHU, K. S. Thermal Degradation Kinetics of Carotenoids and Visual Color of Papaya Puree. *Journal of Food Science*, v. 67, n. 7, p. 2692–2695, 2002.

AMAN, R.; SCHIEBER, A.; CARLE, R. Effects of Heating and Illumination on Trans–Cis Isomerization and Degradation of β -Carotene and Lutein in Isolated Spinach Chloroplasts. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 53, n. 24, p. 9512–9518, 2005.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst*, v. 127, n. 1, p. 183-198, 2002.

APARICIO-RUIZ, R.; MÍNGUEZ-MOSQUERA, M. I.; GANDUL-ROJAS, B. Thermal degradation kinetics of lutein, β -carotene and β -cryptoxanthin in virgin olive oils. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 24, n. 6, p. 811–820, 2011.

BOON, C. S.; MCCLEMENTS, D. J.; WEISS, J.; DECKER, E. A. Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 50, n. 6, p. 515-532, 2010.

BREITHAUPT, D.E.; WIRT, U.; BAMEDI, A. Differentiation between Lutein Monoester Regioisomers and Detection of Lutein Diesters from Marigold Flowers (*Tagetes erecta* L.) and Several Fruits by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 1, p. 66 – 70, 2002.

CABALLERO, S.; DAVIDOV-PARDO, G. Comparison of Legume and Dairy Proteins for the Impact of Maillard Conjugation on Nanoemulsion Formation, Stability, and Lutein Color Retention. *Food Chemistry*, v. 38, 2020.

CALIXTO, E. Accelerated Test and Reliability Growth Analysis Models. In: CALIXTO, E. (Ed.). *Gas and Oil Reliability Engineering: Modeling and Analysis*. Gulf Professional Publishing, 2013. p. 63-118.

CARPENTER, J.; SAHARAN, V. K. Ultrasonic assisted formation and stability of mustard oil in water nanoemulsion: Effect of process parameters and their optimization. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 35, p. 422–430, 2017.

DA SILVA, M. M.; PAESE, K.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; RUTZ, J. K.; FLORES CANTILLANO, R. F.; RIOS, A. de O. Thermal and ultraviolet–visible light stability kinetics of co-nanoencapsulated carotenoids. *Food and Bioprocess Processing*, v. 105, p. 86–94, 2017.

DAHL, G. B.; SVENSSON, L.; KINNANDER, N. J. G.; ZANDER, M.; BERGSTRÖM, U.K. Stability of vitamins in Soya oil fat emulsion under conditions simulating intravenous feeding of neonates and children. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, v. 18, n. 3, p. 234–239, 1994.

DAVIDOV-PARDO, G.; GUMUS, C. E.; MCCLEMENTS, D. J. Lutein-enriched emulsionbased delivery systems: Influence of pH and temperature on physical and chemical stability. *Food Chemistry*, v. 196, p. 821–827, 2016.

DE ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p. 5062–5072, 2007.

DWYER, J.H.; NAVAB, M.; M. DWYER, K.M.; HASSAN, K.; SUN, P., SHIRCORE, A.; HAMA-LEVY, S.; HOUGH, G.; WANG, X.; DRAKE, T.; MERZ, C.N.B.;

FOGELMAN, A.M. Oxygenated Carotenoid Lutein and Progression of Early Atherosclerosis. The Los Angeles Atherosclerosis Study, *Circulation (American Heart Association)*, v. 103, n. 24, p. 2922–2927. 2001.

FERREIRA, A.R. Ésteres sintéticos do ácido 3-metil-nitrobenzoico e avaliação da sua actividade antifúngica. 2018. Dissertação (mestrado em produtos naturais e sintéticos bioativos) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Paraíba, João Pessoa.

FERREIRA, J. E. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Degradation of Lycopene and β -carotene in Model Systems and in Lyophilized Guava during Ambient Storage: Kinetics, Structure, and Matrix Effects. *Journal of Food Science*, v. 73, n. 8, p. C589–C594, 2008.

FERREIRA, L.M.; CERVI, V.F.; GEHRCKE, M.; DA SILVEIRA, E.F.; AZAMBUJA, J.H.; BRAGANHOL, E.; H.M.SARI, M.H.M.; ZBOROWSKI, V.A.; NOGUEIRA, C.W.; CRU, L. Ketoprofen-loaded pomegranate seed oil nanoemulsion stabilized by pullulan: Selective antiglioma formulation for intravenous administration. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 130, n.1, p.272-277, 2015.

FERREIRA, M. D.; SPRICIGO, P. C. Colorimetria - princípios e aplicações na agricultura. In: FERREIRA, M. D. (Ed.técnico). Instrumentação pós-colheita em frutas e hortaliças. São Carlos: Embrapa Instrumentação, p. 209-220, 2017.

GUMUS, C. E.; DAVIDOV-PARDO, G.; MCCLEMENTS, D. J. Lutein-enriched emulsion-based delivery systems: Impact of Maillard conjugation on physicochemical stability and gastrointestinal fate. *Food Hydrocolloids*, v. 60, p. 38–49, 2016.

HE, Z.; KISPERT, L. D.; METZGER, R. M.; GOSZTOLA, D.; WASIELEWSKI, M. R. Carotenoids in Liposomes: Photodegradation, Excited State Lifetimes, and Energy Transfer. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 104, n. 26, p. 6302–6307, 2000.

HEJRI, A.; GHARANJIG, K.; KHOSRAVI, A.; HEJAZI, M. Effect of Surfactants on Kinetics of β -carotene Photodegradation in Emulsions. *Chemical Engineering Communications*, v. 200, n. 3, p. 437–447, 2013.

JAFARI, S.; GANJE, M.; DEHNAD, D.; GHANBARI, V.; HAJITABAR, J. Arrhenius Equation Modeling for the Shelf Life Prediction of Tomato Paste Containing a Natural Preservative. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 97, n. 15, 2017.

JAISWAL, M.; DUDHE, R.; SHARMA, P. K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. *3 Biotech*, v. 5, n. 2, p. 123 – 127, 2015.

JANSEN, J.; ROBINSON, D.P.; STOLZENBERG-SOLOMON, R.Z.; BAMLET, W.R.; DE ANDRADE, M.; OBERG, A.L. Nutrientes do consumo de frutas e vegetais reduzem o risco de câncer de pâncreas. *Journal of Gastrointestinal Câncer*, v. 44, n. 2, p. 152 – 161, 2013.

KHALIL, M.; RAILA, J.; ALI, M.; ISLAM, K.M.S.; SCHENK, R.; KRAUSE, J.P.; RAWEL, H. Stability and bioavailability of lutein ester supplements from *Tagetes* flower prepared under food processing conditions. *Journal of Functional Foods*, v. 4, n. 3, p. 602–610, 2012.

KIJLSTRA, A.; TIAN, Y.; KELLY, E. R.; BERENDSCHOT, T. T. J. M. Lutein: More than just a filter for blue light. *Progress in Retinal and Eye Research*, v. 31, n. 4, p. 303–315, 2012.

KIM, W.R.; AUNG, M.M.; CHANG, Y.S.; MAKATSORIS, C. Freshness gauge based cold storage management: A method for adjusting temperature and humidity levels for food quality. *Food Control*, v. 47, p. 510-519, 2015.

KNOCKAERT, G.; PULISSERY, S.K.; LEMMENS, L.; BUGGENHOUT, S.V.; HENDRICKX, M.; LOEY, A.V. Carrot β -carotene degradation and isomerization kinetics during thermal processing in the presence of oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. V. 60, n. 41, p. 10312–10319, 2012.

KOMAIKO, J.; MCCLEMENTS, D.J. Optimization of isothermal low-energy nanoemulsion formation: Hydrocarbon oil, non-ionic surfactant, and water systems. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 425, p. 59-66, 2014.

KONOVALOVA, T. A.; GAO, Y. L.; SCHAD, R.; KISPERT, L. D.; SAYLOR, C. A.; BRUNEI, L. C. Photooxidation of carotenoids in mesoporous MCM-41, Ni-MCM-41 and Al-MCM-41 molecular sieves. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 105, n. 31, p. 7459–7464, 2001.

LAUE, T.; PLAGENS, A. Named Organic Reactions. In: LAUE, T.; PLAGENS, A. (Ed.). John Willey & Sons Ltd, Inglaterra, 2005. p. 4–10.

LEON, K.; MERY, D.; PEDRESCHI, F.; LEON, J. Color measurement in L*a*b* units from RGB digital images. *Food research international*, v. 39, n. 10, p. 1084-1091, 2006.

LIM, A.S.L.; GRIFFIN, C.; ROOS, Y.H. Stability and loss kinetics of lutein and -carotene encapsulated in freeze-dried emulsions with layered interface and trehalose as glass former. *Food Research International*. V. 62, p. 403–409, 2014.

LIN, J.H.; LEE, D.J.; CHANG, J.S. Lutein production from biomass: Marigold flowers versus microalgae. *Bioresource Technology*, v. 184, p. 421-428, 2015.

LOZADA, M. I. O.; MALDONADE, I. R.; RODRIGUES, D. B.; SANTOS, D. S.; SANCHEZ, B. A. O, DE SOUZA, P. E. N.; LONGO, J. P.; AMARO, G. B.; DE LACERDA, L. P. O. Physicochemical Characterization and Nano-Emulsification of Three Species of Pumpkin Seed Oils with Focus on Their Physical Stability, *Food Chemistry*. 128512. (2020).

MALVERN INSTRUMENTS LIMITED. Dynamic Light Scattering Common Terms Defined, 2011. Disponível em: <http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/wp-content/uploads/2011/02/DLS_Terms_defined_Malvern.pdf>. Acesso em: 25 ago. 2020.

MARTÍNEZ-DELGADO, A. A.; KHANDUAL, S.; VILLANUEVA-RODRÍGUEZ, S. J. Chemical stability of astaxanthin integrated into a food matrix: Effects of food processing and methods for preservation. *Food Chemistry*, v. 225, p. 23-30, 2017.

MCCLEMENTS, D.J. Theoretical prediction of emulsion colour. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 97, p. 63–89, 2002.

MCCLEMENTS, D. J. Nanoscale Nutrient Delivery Systems for Food Applications: Improving Bioactive Dispersibility, Stability, and Bioavailability. *Journal of Food Science*, v. 80, n. 7, 2015.

MCGUIRE, R. G. Reporting of Objective Color Measurements. *HortScience*, v. 27, n. 12, p. 1254-1255, 1992.

MELÉNDEZ-MARTINEZ, A.J.; MAPELLY-BRAHM, P.; HORNERO-MENDEZ, D.; VICARIO, D.M. Structures, Nomenclature and General Chemistry of Carotenoids and Their Esters. In: MERCADANTE, A.Z. *Carotenoid Esters in Foods: Physical, Chemical and Biological Properties*. Royal Society of Chemistry, 2019. p. 3-50.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A.J.; VICARIO, I.M.; HEREDIA, F.J. Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v. 54, n. 2, p. 209–215, 2004.

MELO VAN LENT, D.; LEERMAKERS, E.T.M.; DARWEESH, S.K.L.; MOREIRA, E.M.; TIELEMANS, M.J.; MUKA, T.; FRANCO, O.H. The effects of lutein on respiratory health across the life course: A systematic review. *Clinical Nutrition ESPEN*, v. 13, p. e1-e7, 2016.

MISHRA, P. R.; AL SHAAL, L.; MÜLLER, R. H.; KECK, C. M. Production and characterization of hesperetin nanosuspensions for dermal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 371, n. 1-2, p. 182-189, 2009.

MITRI, K.; SHEGOKAR, R.; GOHLA, S.; ANSELMINI, C.; MÜLLER, R. H. Lipid nanocarriers for dermal delivery of lutein: Preparation, characterization, stability and performance. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 414, n. 1-2, p. 267–275, 2011.

MOLNÁR, P., KÖRTVÉLYESI, T., MATUS, Z., SZABOLCS, J. Kinetic studies on the thermal Z/E-isomerization of C40-carotenoids. *Journal of Chemical Researches*, n. 4, p. 120–121, 1997.

MOLNÁR, P. Research of the (E/Z)-isomerization of carotenoids in Pe' cs since the 1970s. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 483, p. 156–164, 2009.

MORTENSEN, A.; SKIBSTED, L. H. Carotenoid photobleaching. *Methods in Enzymology*, v. 299, p. 408–421, 1999.

MORTENSEN, A.; SKIBSTED, L. H. Kinetics of photobleaching of beta-carotene in chloroform and formation of transient carotenoid species absorbing in the near infrared. *Free Radical Research*, v. 25, n. 4, p. 355–368, 1996.

MUDALIGE, T.; QU, H.; VAN HAUTE, D.; ANSAR, S. M.; PAREDES, A.; INGLE, T. Characterization of Nanomaterials. *Nanomaterials for Food Applications*, p. 313–353, 2019.

NEISES, B.; STEGLICH, W. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. *Angewandte Chemie International Edition in English*, v. 17, n. 7, p. 522–524, 1978.

NWACHUKWU, I.D.; UDENIGWE, C.C.; ALUKO, R.E. Lutein and zeaxanthin: Production technology, bioavailability, mechanisms of action, visual function, and health claim status. *Trends in Food Science & Technology*, v. 49, p. 74-84, 2016.

PATHARE, P. B.; OPARA, U. L.; AL-SAID, F. A. Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, v. 6, p. 36–60, 2013.

PESEK, C. A.; WARTHESEN, J. J. Kinetic model for photoisomerization and concomitant photodegradation of beta-carotenes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 38, n. 6, p. 1313–1315, 1990.

PREEDY, V. R.; SRIRAJASKANTHAN, R.; PATEL, V. Handbook of Food Fortification and Health. 2013. ed. Humana Press, v. 2, 2013.

QV, X.Y.; ZENG, Z.P.; JIANG, J.G. Preparation of lutein microencapsulation by complex coacervation method and its physicochemical properties and stability. *Food Hydrocolloids*, v. 25, n. 6, p. 1596-1603, 2011.

RIBEIRO, B. D.; OLIVEIRA, R. G. Carotenoids as Colorants, In: *Natural Products*. Springer Berlin Heidelberg, p. 4017-4036, 2013.

RODRIGUES, D. B.; MARIUTTI, L. R. B.; MERCADANTE, A. Z. Two-step cleanup procedure for the identification of carotenoid esters by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography a*, v. 1457, p. 116-124, 2016.

RODRIGUES, D. B.; MERCADANTE, A. Z.; MARIUTTI, L. R. B. Marigold carotenoids: Much more than lutein esters. *Food Research International*. v. 119, p. 653-664, 2019.

RUIZ-SOLA, M.A., RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M. Carotenoid Biosynthesis in Arabidopsis: A Colorful Pathway. *Livro Arabidopsis*, v.10, e0158, 2012.

SAINI, R. K.; KEUM, Y.S. Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chemistry*, v. 240, p. 90–103, 2018.

SANDMANN, G. Carotenoids of biotechnological importance. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, v. 148, p. 449-467, 2015.

SARI, T. P.; MANN, B.; KUMAR, R.; SINGH, R. R. B.; SHARMA, R.; BHARDWAJ, M.; ATHIRA, S. Preparation and characterization of nanoemulsion encapsulating curcumin. *Food Hydrocolloids*, v. 43, p. 540–546, 2015.

SHI, X. M.; CHEN, F. Stability of lutein under various storage conditions. *Food / Nahrung*, v. 41, n. 1, p. 38-42, 1997.

STEINER, B. M.; MCCLEMENTS, D. J.; DAVIDOV-PARDO, G. Encapsulation systems for lutein: A review. *Trends in Food Science & Technology*, v. 82, n. 7, 2018.

STEINER, B. M.; SHUKLA, V.; MCCLEMENTS, D. J.; LI, Y. O.; SANCHO-MADRIZ, M.; DAVIDOV-PARDO, G. Encapsulation of Lutein in Nanoemulsions Stabilized by Resveratrol and Maillard Conjugates. *Journal of Food Science*, v. 84, n. 9, 2019.

SU, J.; GUO, Q.; CHEN, Y.; DONG, W.; MAO, L.; GAO, Y.; YUAN, F. Characterization and formation mechanism of lutein pickering emulsion gels stabilized by β -lactoglobulin-gum arabic composite colloidal nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, v. 98, 2020.

SUBAGIO, A.; MORITA, N. Prooxidant activity of lutein and its dimyristate esters in corn triacylglyceride. *Food Chemistry*, v. 81, n. 1, p. 97–102, 2003.

SUBAGIO, A.; WAKAKI, H.; MORITA, N. Stability of lutein and its myristate esters. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 63, p. 1784–1786, 1999.

SURH, J. E.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, J. D. Utilisation of spontaneous emulsification to fabricate lutein-loaded nanoemulsion-based delivery systems: factors influencing particle size and colour. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 52, n. 6, p. 1408-1416, 2017.

TEO, A.; LEE, S. J.; GOH, K. K. T.; WOLBER, F. M. Kinetic stability and cellular uptake of lutein in WPI-stabilised nanoemulsions and emulsions prepared by

emulsification and solvent evaporation method. *Food Chemistry*, v. 221, p. 1269–1276, 2017.

TEO, S.Y.; LEE, S.Y.; ONG, H.L.; ONG, C.L.; GAN, S.N.; RATHBONE, M.J.; COOMBES, A.G.A. Evaluation of biosourced alkyd nanoemulsions as drug carriers. *Journal of Nanomaterials*, v. 2015, p. 1–8, 2015.

WEIGEL, F.; WEISS, J.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. Lutein-enriched emulsion-based delivery systems: Influence of emulsifiers and antioxidants on physical and chemical stability. *Food Chemistry*, v. 242, p. 395–403, 2018.

WRIGHT, R.M. Introduction to Chemical Kinetics: 1. Ed. Editora *Wiley-Interscience*, 2004.

XAVIER, A. A.O.; MERCADANTEI, A.Z.; DOMINGOSII; L.D.; VIOTTO, W.H. Desenvolvimento e validação de método espectrofotométrico para determinação de corante à base de luteína adicionado em iogurte desnatado. *Química Nova*, v.35, n.10, 2012.

YAHIA, E.M.; ORNELAS-PAZ, J.J. Chemistry, stability, and biological actions of carotenoids. In: De La Rosa, L.A.; Alvarez-Parrilla, E.; Gonzalez-Aguilar, G.A. (Eds.), *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value and Stability*. *Wiley-Blackwell*, Ames, p. 177–222, 2010.

YANG, S.; ZHOU, Q.; YANG, L.; XUE, Y.; XU, J.; XUE, C. Effect of Thermal Processing on Astaxanthin and Astaxanthin Esters in Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Oleo Science*, v. 64, n. 3, p. 243–253, 2015.

YOUNG, J. C.; ABDEL-AAL, E.-S. M.; RABALSKI, I.; BLACKWELL, B. A. Identification of Synthetic Regioisomeric Lutein Esters and Their Quantification in a Commercial Lutein Supplement. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, n. 13, p. 4965–4972, 2007.

ZEPKA, L.Q.; BORSARELLI, C.D.; SILVA, M.A.A.P.; MERCADANTE, A.Z. Thermal degradation kinetics of carotenoids in a cashew apple juice model and its impact on the system color. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, p. 7841–7845, 2009.

ZHAI, X.; LIN, D.; LIU, D.; YANG, X. Emulsions stabilized by nanofibers from bacterial cellulose: New potential food-grade Pickering emulsions. *Food Research International*, v. 103, p. 12–20, 2018.

ZHAO, L.; TEMELLI, F.; CURTIS, J. M.; CHEN, L. Encapsulation of lutein in liposomes using supercritical carbon dioxide. *Food Research International*, v.100, p.168–179, 2017.

CONCLUSÕES GERAIS E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Observou-se que cada óleo de semente de abóbora apresentou uma caracterização físico-química diferente para cada espécie de semente. As nanoemulsões desenvolvidas com óleo de semente de *C. maxima* e *C. pepo* foram mais estáveis ao crescimento de gota durante o armazenamento de três meses em temperatura refrigerada (4 °C) enquanto nanomosc foi mais estável a 25 °C com base neste parâmetro. Nanopepo foi a mais estável após os ciclos de aquecimento-resfriamento, apresentando o índice de polidispersão estável entre as amostras, enquanto nanomax foi o mais estável quando submetida à centrifugação durante o armazenamento. Neste sentido, outros estudos são recomendados para avaliar a estabilidade química e oxidativa das nanoemulsões.

A temperatura elevada (45 °C) e a exposição à luz UV promoveram a degradação da luteína, especialmente em sua forma esterificada, refletido no desbotamento da cor. Com relação a termoestabilidade, as nanoemulsões de OSA geraram maior retenção do carotenoide até o final do armazenamento. Enquanto as nanoemulsões sob exposição à luz UV, as nanoemulsões de OSA foram mais estáveis no éster de luteína, enquanto a luteína livre apresentou menor degradação nas nanoemulsões de óleo de soja. Assim, desde o ponto de vista tecnológico foi demonstrado que nestas condições experimentais para a entrega de luteína a forma ester foi a mais indicada.

Este estudo demonstrou que tecnologicamente é possível encapsular a luteína em sistemas de entrega baseados em nanoemulsões com tamanho de partícula ≥ 200 nm, com distinta composição na sua fase oleosa como: o óleo de soja, tradicionalmente usado para formação de nanoemulsões e o OSA, pouco explorado para formação de nanoemulsões e com muitos compostos bioativos presentes, como tocoferóis e ácidos graxos insaturados. Neste contexto, são necessários mais estudos para elucidar e identificar os compostos obtidos na síntese orgânica e os compostos de degradação obtidos sobre exposição a temperatura e luz UV do éster de luteína e a luteína livre. Ademais, estudos complementares que avaliem a digestibilidade e a biodisponibilidade das nanoemulsões, são indicados. Nesse contexto, será possível valorizar e ampliar o consumo do óleo de semente de abóbora no cenário da alimentação saudável.

ANEXOS

ANEXO 1-Avaliação visual da formulação de nanoemulsões com três surfactantes por 15 dias.

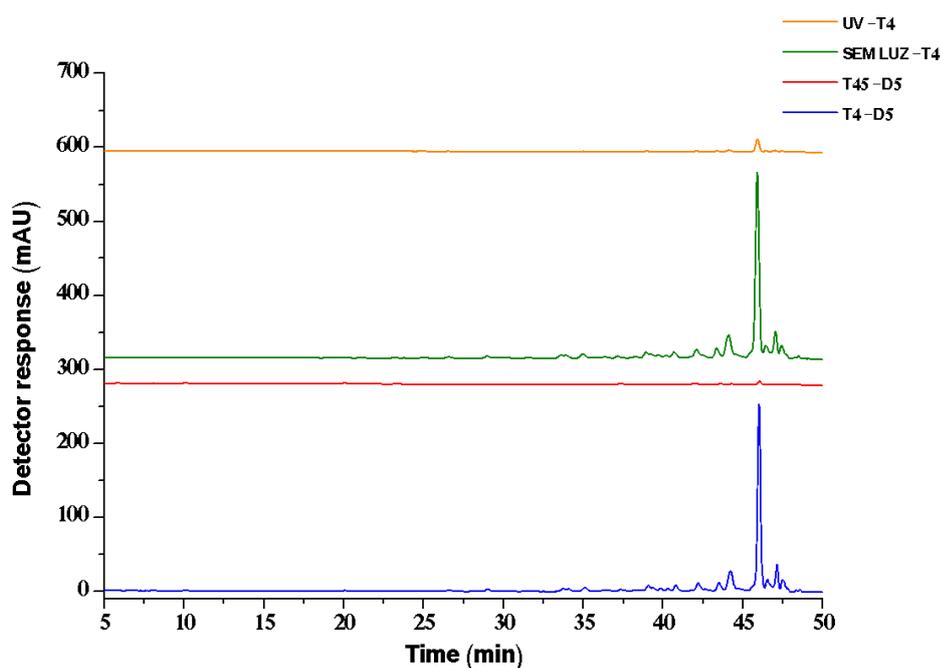
Tipo de surfactante	Avaliação visual (dias)				
	3	6	9	12	15
Tween 80,	N	F	SF	SF	SF
Span 80	N	SF	SF	SF	SF
Solutol® HS15	N	N	N	N	N

Avaliações realizadas a cada três dias. Separação de fases (FS), floculação (F), Normal (N)

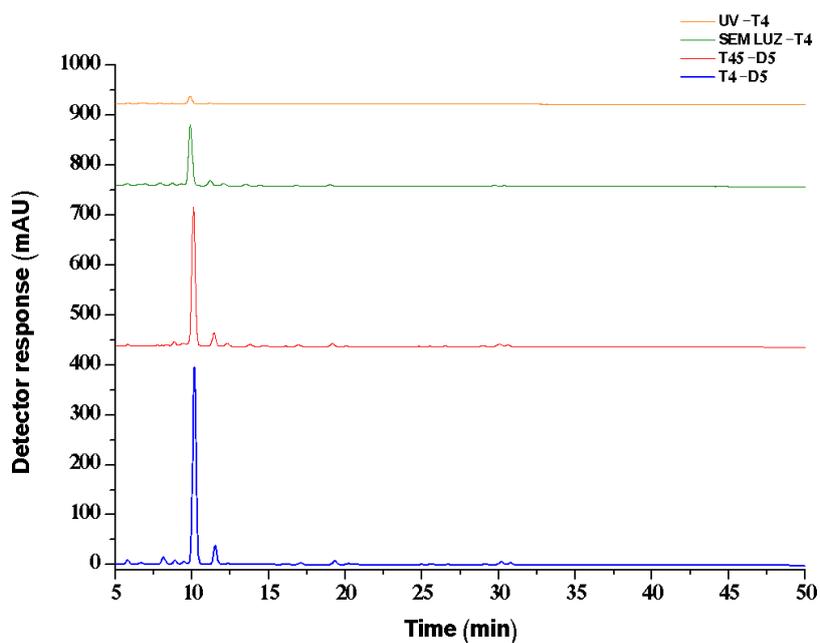
ANEXO 2- Cromatogramas de HPLC de nanoemulsões de luteína no último dia de tratamento: Termo e foto –estabilidade.

SEM LUZ-T4. Nanoemulsão sem exposição a luz UV após 240 minutos; T45-D5. Nanoemulsão exposta a 45 °C após 15 dias de armazenamento; T4-D5. Nanoemulsão exposta a 4 °C após 15 dias de armazenamento.

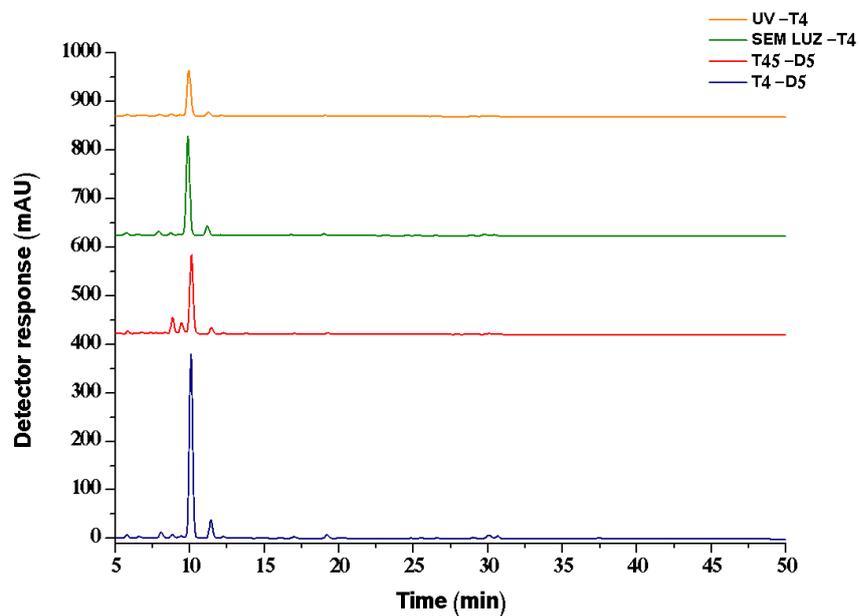
1. Nanoemulsão de óleo de semente de abóbora transportadora de éster de luteína



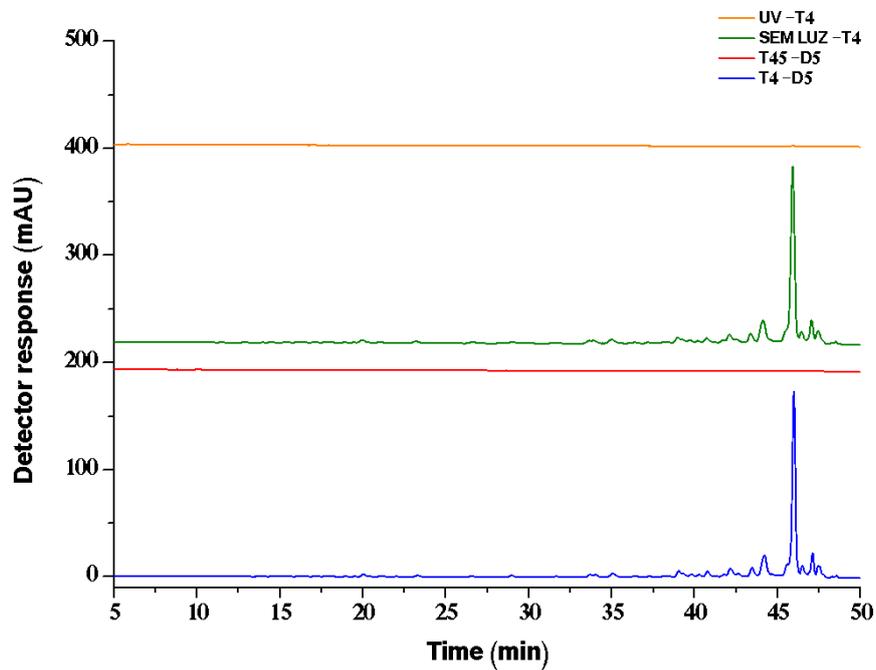
2. Nanoemulsão de óleo de semente de abóbora transportadora de luteína livre



3. Nanoemulsões de óleo de soja transportadora de luteína livre



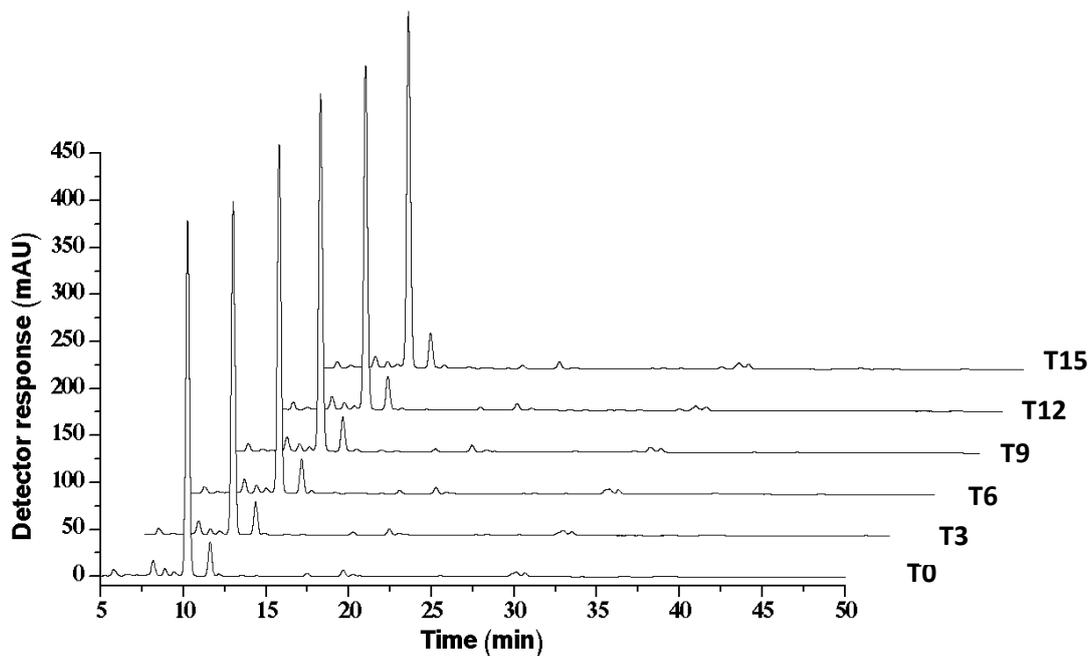
4. Nanoemulsões de óleo de soja transportadora de éster de luteína



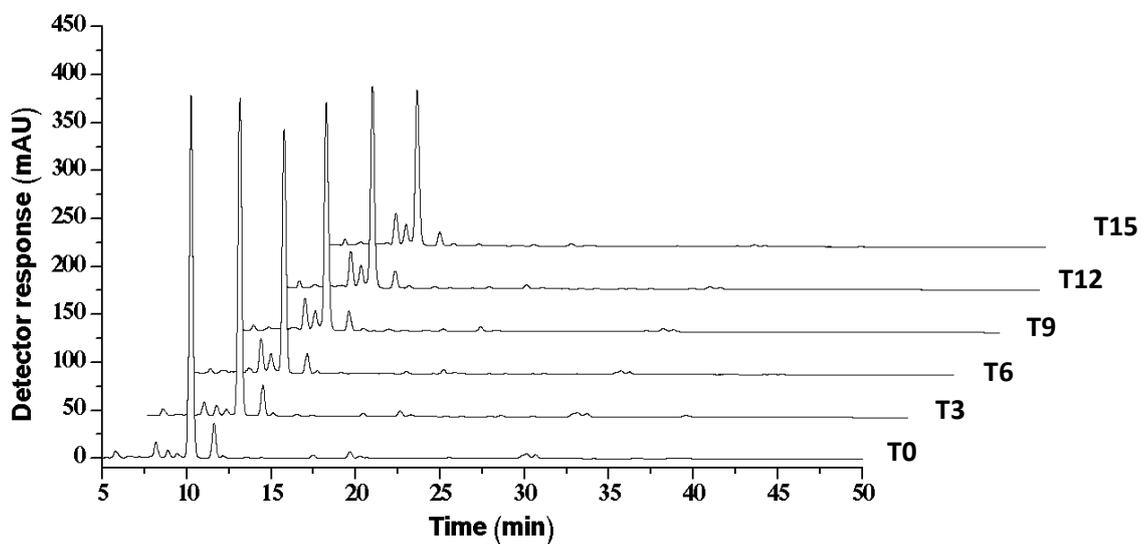
ANEXO 3- Cromatogramas de HPLC de termoestabilidade de nanoemulsão de óleo de semente de abóbora transportadora de luteína armazenadas durante 15 dias de armazenamento.

T0, T3, T6, T9, T12 e T15 correspondem a 0,3,6,9,12 e 15 dias de armazenamento, respectivamente

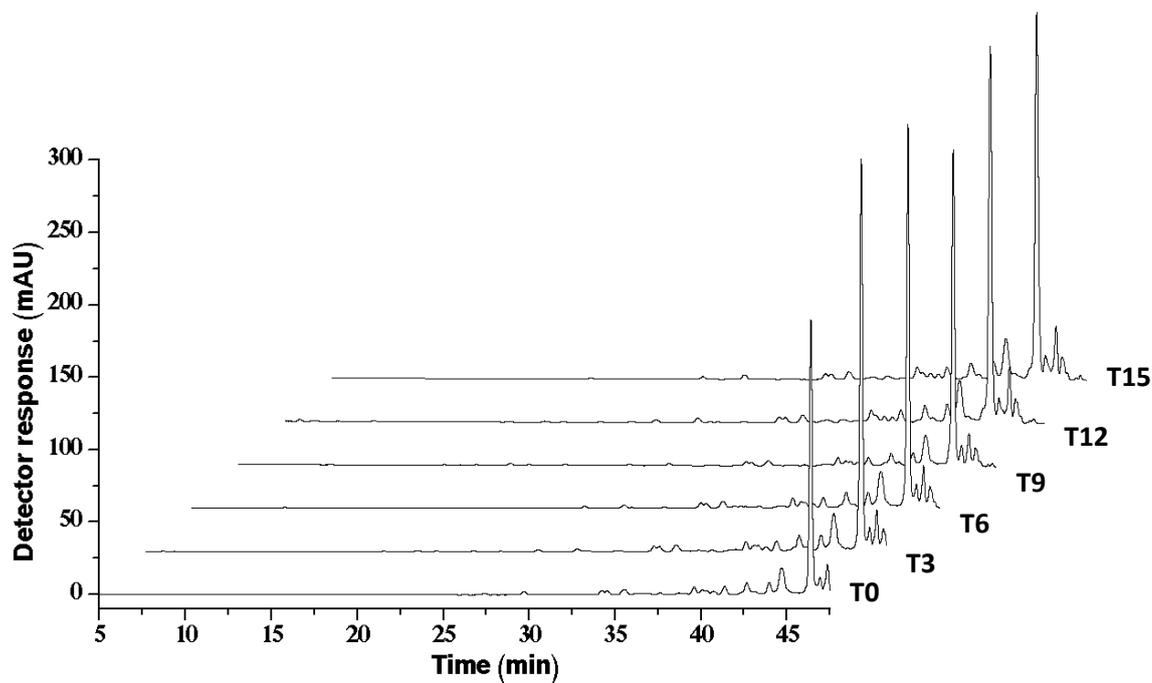
1. Nanoemulsão transportadora de luteína livre - 4 °C



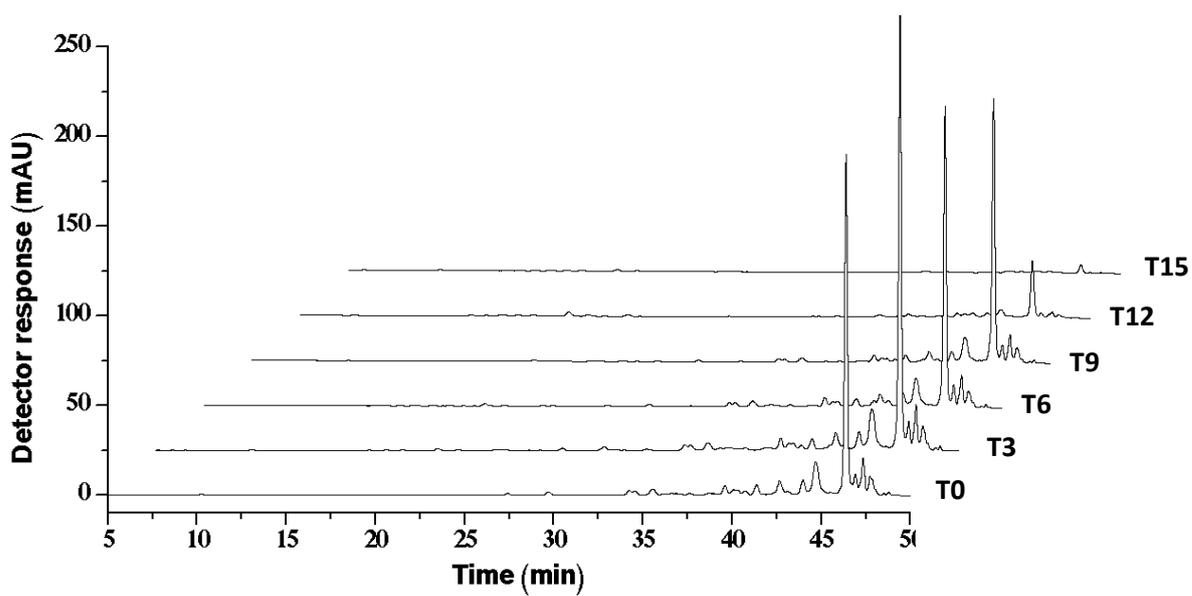
2. Nanoemulsão transportadora de luteína livre-45 °C



3. Nanoemulsão transportadora de éster de luteína- 4 °C



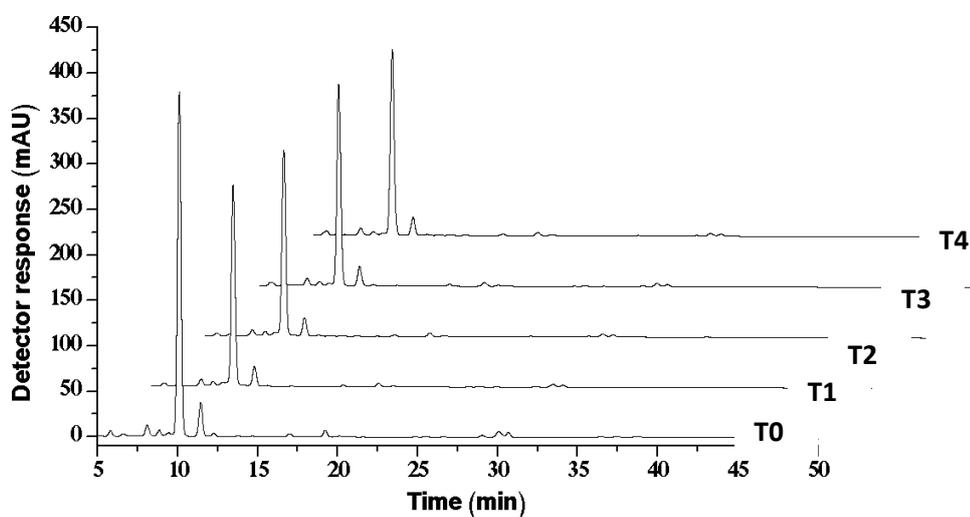
4. Nanoemulsão transportadora de éster de luteína- 45 °C



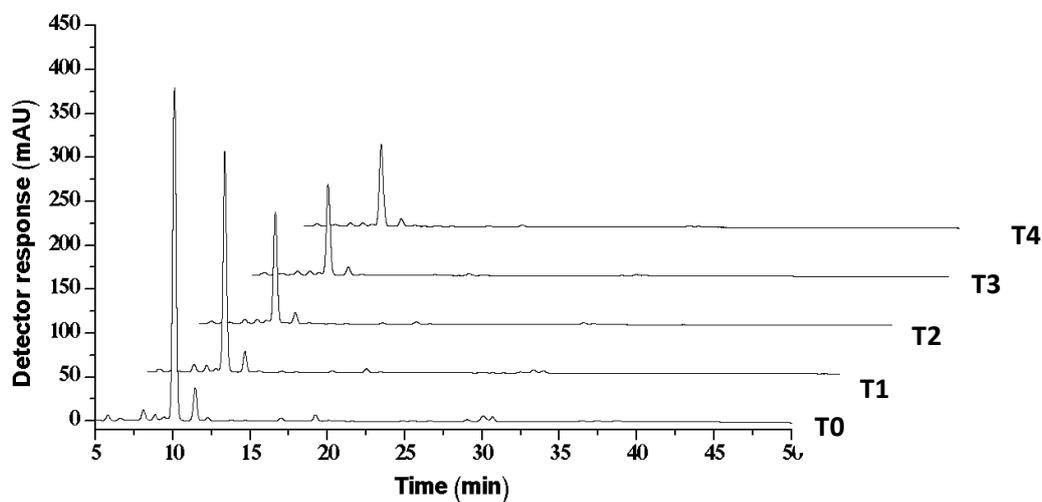
ANEXO 4- Cromatogramas de HPLC de foto-estabilidade de nanoemulsão de óleo de semente de abóbora transportadora de luteína durante 240 minutos de exposição a luz UV.

T0, T1, T2, T3 e T4 correspondem a 0, 30, 60, 90 e 120 minutos de exposição.

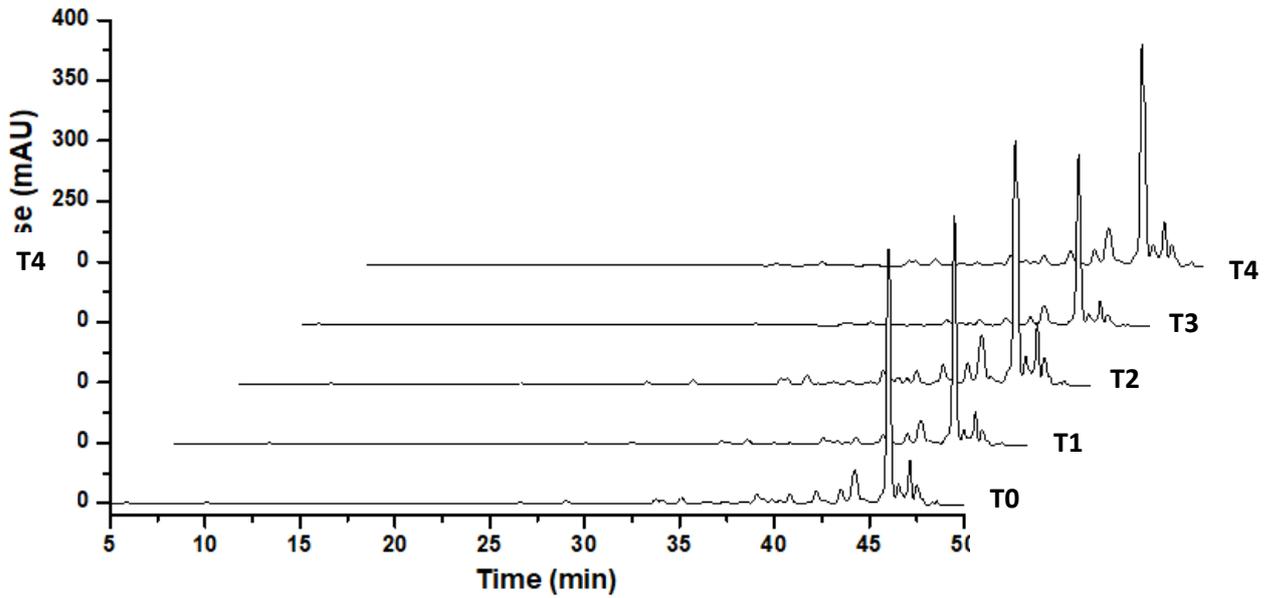
1. Nanoemulsões transportadora de luteína livre (controle)



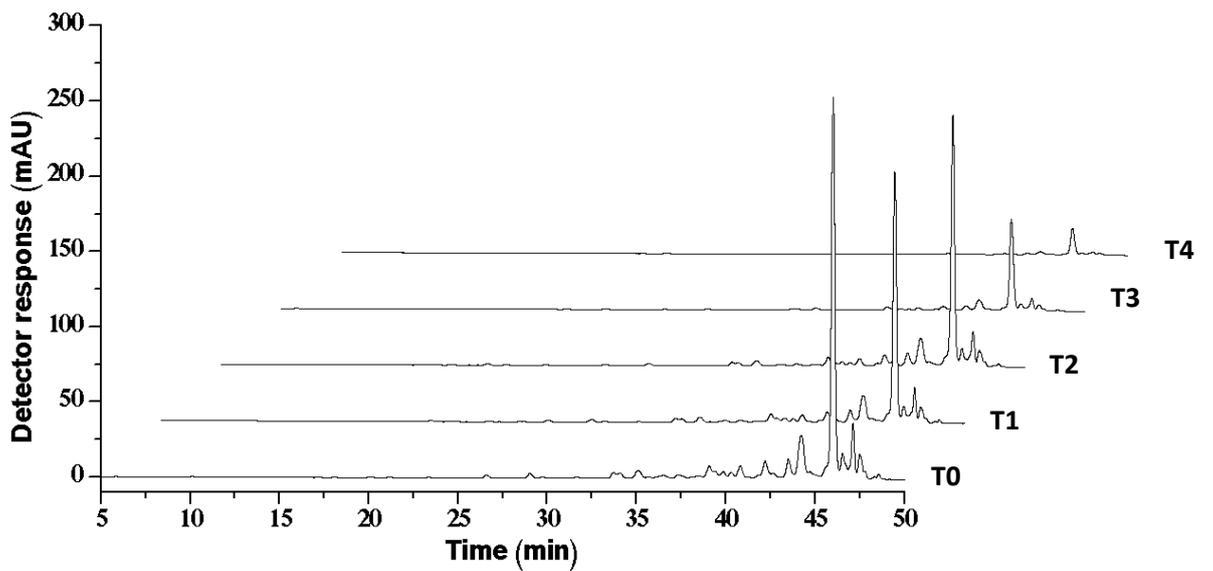
2. Nanoemulsões transportadora de luteína livre expostas a luz UV



3. Nanoemulsão transportadora de éster de luteína (controle)



4. Nanoemulsão transportadora de éster de luteína exposta a lu



ANEXO 5-Teor de carotenoides de nanoemulsões com óleo de semente de abóbora (OSA) e soja (SO) transportadoras de luteína.

1. Termoestabilidade durante 15 dias de armazenamento a 4 °C e 45 °C.

	Nanoemulsão	T° 4					T° 45						
		0	3	6	9	12	15	0	3	6	9	12	15
Teor Carotenoides (µg/mL)	OSANLU	12,482 ^a ±0,673	11,488 ^{ab} ±0,388	11,29 ^{ab} ±0,159	10,831 ^b ±0,271	11,488 ^{ab} ±0,704	11,746 ^{ab} ±0,343	12,482 ^a ±0,673	9,55 ^b ±0,113	9,154 ^b ±0,301	9,622 ^b ±0,608	9,911 ^b ±0,527	8,695 ^b ±0,347
	OSANES	10,325 ^a ±0,533	10,02 ^a ±0,896	10,438 ^a ±1,04	8,979 ^a ±0,498	10,488 ^a ±0,279	9,656 ^a ±1,094	10,325 ^a ±0,533	7,348 ^p ±0,401	5,646 ^b ±0,194	2,545 ^d ±0,028	0,745 ^e ±0,095	0,149 ^f ±0,001
	SONLU	10,8103 ^{ab} ±0,055	11,473 ^a ±0,181	11,15 ^a ±0,442	10,779 ^{ab} ±0,304	10,182 ^b ±0,158	11,538 ^a ±0,499	10,8103 ^a ±0,055	9,174 ^p ±0,223	7,544 ^c ±0,153	7,641 ^c ±0,401	6,589 ^d ±0,344	5,445 ^e ±0,206
	SONES	9,535 ^a ±0,695	8,145 ^{ab} ±0,405	8,927 ^a ±0,416	8,492 ^{ab} ±0,603	7,343 ^b ±0,665	7,123 ^b ±0,3	9,535 ^a ±0,695	2,635 ^p ±0,117	0,939 ^c ±0,028	0,239 ^{cd} ±0,012	0,117 ^d ±0,001	0,07 ^d ±0,0003

2. Foto-estabilidade durante 240 minutos de exposição a luz ultravioleta.

	Nanoemulsão	EXPOSIÇÃO A LUZ UV									
		CONTROLE				SIM					
		0	30	60	120	240	0	30	60	120	240
Teor Carotenoides (µg/mL)	OSANLU	11,746 ^{ab} ±0,343	12,06 ^a ±0,576	11,211 ^{ab} ±0,314	10,246 ^b ±0,303	7,711 ^c ±1,121	11,746 ^a ±0,343	9,618 ^b ±0,715	6,74 ^c ±0,542	5,871 ^c ±0,024	1,139 ^d ±0,058
	OSANES	9,656 ^a ±1,094	10,775 ^a ±0,627	10,621 ^a ±0,574	10,249 ^a ±0,361	9,499 ^a ±0,739	9,656 ^a ±1,094	7,264 ^b ±0,106	6,027 ^{bc} ±0,659	4,45 ^c ±0,421	0,882 ^d ±0,093
	SONLU	11,538 ^a ±0,499	10,754 ^{ab} ±0,071	10,273 ^c ±0,441	10,54 ^c ±0,295	10,288 ^c ±0,063	11,538 ^a ±0,499	11,969 ^a ±0,547	8,086 ^b ±0,586	6,944 ^b ±0,705	1,777 ^c ±0,173
	SONES	7,123 ^a ±0,3	6,877 ^{ab} ±0,317	6,417 ^{bc} ±0,201	6,313 ^{bc} ±0,222	6,134 ^c ±0,125	7,123 ^a ±0,3	3,651 ^b ±0,347	1,903 ^c ±0,029	1,574 ^c ±0,122	0,069 ^d ±0,004

Os dados representam a média ± desvio padrão de três réplicas independentes (n = 3). Os dados foram submetidos à ANOVA de um fator (teste post hoc de Tukey, p <0,05). Letras minúsculas sobrescritas diferentes na mesma linha indicam diferenças dentro de cada nanoemulsão. OSANES, OSANLU, SONES e SONLU referem-se a nanoemulsão de OSA com éster de luteína, nanoemulsão de OSA com luteína livre, nanoemulsão de SO com éster de luteína e nanoemulsão de SO com luteína livre.

ANEXO 6-Characterização física das nanoemulsões: diâmetro da gota (DH), índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta (PZ) de nanoemulsões com óleo de semente de abóbora (OSA) e soja (SO) transportadoras de luteína

1. Termoestabilidade durante 15 dias de armazenamento a 4 °C e 45 °C.

	Nanoemulsão	T° 4						T° 45					
		0	3	6	9	12	15	0	3	6	9	12	15
DH	OSANLU	185,23 ^a ±2,20	185,66 ^a ±1,00	180,33 ^b ±1,04	184,23 ^{ab} ±0,75	176,20 ^c ±1,82	185,00 ^a ±1,30	185,23 ^a ±2,20	181,10 ^{ab} ±1,73	179,76 ^{ab} ±1,00	179,76 ^{ab} ±4,15	178,13 ^b ±1,75	179,10 ^{ab} ±3,15
	OSANES	188,26 ^a ±3,07	183,13 ^a ±1,14	182,20 ^a ±4,39	188,46 ^a ±2,41	186,76 ^a ±1,27	187,06 ^a ±0,55	188,26 ^a ±3,07	188,33 ^a ±0,55	182,56 ^b ±1,79	188,30 ^a ±2,50	182,73 ^b ±1,45	183,46 ^{ab} ±1,37
	SONLU	176,66 ^a ±2,25	175,43 ^a ±1,03	172,56 ^a ±2,12	176,46 ^a ±2,97	173,30 ^a ±1,14	177,73 ^a ±1,59	176,66 ^a ±2,25	175,26 ^a ±1,01	175,36 ^a ±2,48	177,36 ^a ±0,40	172,96 ^a ±2,99	174,53 ^a ±1,55
	SONES	179,83 ^a ±2,85	178,16 ^a ±3,59	178,80 ^a ±1,76	179,16 ^a ±3,04	180,10 ^a ±1,32	181,46 ^a ±1,76	179,83 ^a ±2,85	180,23 ^a ±1,20	176,36 ^a ±4,05	180,90 ^a ±4,03	181,43 ^a ±0,57	179,50 ^a ±2,80
IPD	OSANLU	0,14 ^b ±0,009	0,15 ^b ±0,006	0,16 ^{ab} ±0,015	0,18 ^a ±0,009	0,17 ^{ab} ±0,009	0,18 ^a ±0,009	0,14 ^c ±0,009	0,17 ^a ±0,005	0,14 ^c ±0,012	0,16 ^{abc} ±0,013	0,15 ^{bc} ±0,004	0,17 ^{ab} ±0,009
	OSANES	0,15 ^{ab} ±0,0095	0,16 ^a ±0,0085	0,14 ^{ab} ±0,012	0,16 ^a ±0,011	0,13 ^b ±0,013	0,14 ^{ab} ±0,015	0,15 ^{ab} ±0,0095	0,14 ^{ab} ±0,014	0,12 ^b ±0,0082	0,12 ^b ±0,011	0,14 ^{ab} ±0,013	0,16 ^a ±0,014
	SONLU	0,14 ^a ±0,0075	0,15 ^a ±0,015	0,15 ^a ±0,0085	0,15 ^a ±0,012	0,17 ^a ±0,012	0,14 ^a ±0,009	0,14 ^a ±0,0075	0,14 ^a ±0,006	0,15 ^a ±0,0115	0,14 ^a ±0,0134	0,14 ^a ±0,0055	0,16 ^a ±0,0045
	SONES	0,14 ^a ±0,013	0,15 ^a ±0,0040	0,15 ^a ±0,0026	0,16 ^a ±0,017	0,16 ^a ±0,001	0,15 ^a ±0,0100	0,14 ^a ±0,013	0,14 ^a ±0,0081	0,14 ^a ±0,0129	0,15 ^a ±0,0032	0,14 ^a ±0,0139	0,16 ^a ±0,0159
PZ	OSANLU	-30,16 ^a ±0,709	-33,23 ^a ±3,086	-32,56 ^a ±0,379	-31,66 ^a ±2,914	-32,06 ^a ±0,379	-33,43 ^a ±0,208	-30,16 ^b ±0,709	-35,16 ^a ±0,321	-28,16 ^c ±0,586	-31,20 ^b ±0,608	-27,70 ^c ±0,458	-31,56 ^b ±0,586
	OSANES	-36,33 ^a ±0,493	-34,73 ^b ±0,289	-34,93 ^b ±0,115	-36,13 ^a ±0,115	-32,96 ^c ±0,737	-34,06 ^b ±0,153	-36,33 ^{ab} ±0,493	-37,86 ^a ±0,961	-34,20 ^b ±1,311	-34,70 ^b ±0,458	-35,83 ^{ab} ±0,586	-35,30 ^b ±0,6
	SONLU	-25,06 ^a ±0,231	-25,96 ^a ±0,451	-22,60 ^c ±0,529	-20,70 ^b ±0,458	-25,46 ^a ±0,451	23,50 ^{cb} ±0,692	-25,06 ^{ba} ±0,231	-27,10 ^a ±0,5	-27,00 ^a ±2,211	-22,50 ^{cb} ±0,5	-21,83 ^c ±0,115	-14,16 ^d ±0,153-
	SONES	-24,5 ^{cb} ±0,1	-26,1 ^{ba} ±0,15	-27,4 ^a ±1,72	-23,4 ^c ±1,3	-26,7 ^{ba} ±0,49	-23,1 ^c ±0,45	-24,5 ^b ±0,1	-25,5 ^a ±0,30	-25,4 ^{ab} ±0,40	-24,5 ^a ±0,43	-25,6 ^a ±0,3	-24,7 ^{ab} ±0,46

2. Foto-estabilidade durante 240 minutos de exposição à luz UV.

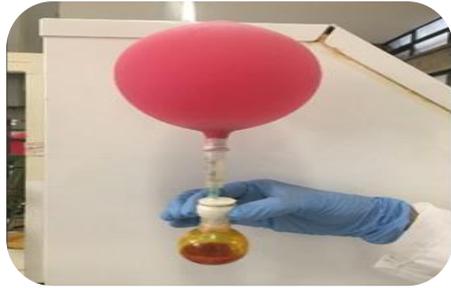
	Nanoemulsão	CONTROLE					SIM				
		0	30	60	120	240	0	30	60	120	240
DH	OSANLU	185.00 ^a ±1,3	176.90 ^b ±1,552	173.50 ^b ±1,992	173.66 ^b ±1,106	183.96 ^a ±0,907	185 ^b ±1,3	172,466 ^c ±1,913	175,1 ^c ±0,624	171,033 ^c ±1,913	196,633 ^a ±1,436
	OSANES	187,066 ^a ±0,55	183,366 ^a ±1,939	179,033 ^b ±2,05	177,266 ^b ±1,724	186,603 ^a ±0,735	187,066 ^b ±0,55	181,133 ^b ±2,928	180,966 ^b ±2,343	185,466 ^b ±3,412	206,9 ^a ±2,179
	SONLU	177,733 ^a ±1,595	172 ^b ±1,67	172,333 ^b ±1,222	174,967 ^{ab} ±1,193	177,3 ^a ±2,427	177,733 ^b ±1,595	170,66 ^c ±2,074	172,66 ^{bc} ±3,899	173,633 ^{bc} ±0,776	197,1 ^a ±2,515
	SONES	181,466 ^{ab} ±1,755	176,6 ^b ±3,195	176,3 ^b ±1,664	178,666 ^b ±1,7	185,633 ^a ±2,75	181,466 ^b ±1,755	177,333 ^{bc} ±2,413	174,633 ^c ±4,05	182,666 ^b ±1,205	198,6 ^a ±1,833
IPD	OSANLU	0,184 ^a ±0,009	0,149 ^b ±0,013	0,148 ^b ±0,012	0,143 ^b ±0,013	0,142 ^b ±0,008	0,184 ^a ±0,009	0,159 ^b ±0,007	0,121 ^c ±0,004	0,149 ^b ±0,0011	0,137 ^{bc} ±0,008
	OSANES	0,155 ^{ab} ±0,008	0,172 ^a ±0,007	0,17 ^a ±0,016	0,128 ^b ±0,006	0,14 ^b ±0,009	0,155 ^a ±0,008	0,155 ^a ±0,014	0,158 ^a ±0,008	0,161 ^a ±0,007	0,162 ^a ±0,004
	SONLU	0,155 ^a ±0,011	0,133 ^a ±0,007	0,129 ^a ±0,006	0,129 ^a ±0,006	0,125 ^a ±0,002	0,155 ^a ±0,011	0,153 ^a ±0,006	0,177 ^a ±0,007	0,156 ^a ±0,005	0,157 ^a ±0,017
	SONES	0,151 ^a ±0,015	0,146 ^a ±0,005	0,142 ^a ±0,008	0,147 ^a ±0,015	0,151 ^a ±0,012	0,151 ^a ±0,015	0,127 ^a ±0,004	0,128 ^a ±0,011	0,135 ^a ±0,011	0,157 ^a ±0,009
PZ	OSANLU	-33,433 ^c ±0,169	-38,866 ^e ±0,0942	-36,566 ^a ±0,188	-31,733 ^b ±0,634	-29,966 ^c ±0,694	-33,433 ^b ±0,208	-33,866 ^b ±0,378	-32,366 ^b ±0,305	-37,3 ^a ±0,173	-36,4 ^a ±1,946
	OSANES	-34,066 ^b ±0,152	-31,4 ^a ±0,529	-35 ^{bc} ±0,173	-36 ^c ±0,754	-31,566 ^a ±0,873	-34,066 ^{ab} ±0,152	-33,766 ^{ab} ±0,472	-34,233 ^{ab} ±0,288	-33,233 ^b ±0,776	-35,033 ^a ±0,896
	SONLU	-14,166 ^a ±0,152	-26,2 ^c ±0,624	-27,5 ^{cd} ±0,624	-29,2 ^d ±1,153	-22,533 ^b ±1,05	-14,166 ^d ±0,152	-26,933 ^c ±0,665	-32,166 ^b ±0,115	-32,433 ^b ±1,25	-40,433 ^a ±2,15
	SONES	-23,133 ^c ±0,45	-27,666 ^b ±0,152	-31,366 ^a ±0,635	-26,466 ^b ±0,55	-22,333 ^c ±0,45	-23,13 ^d ±0,45	-31,7 ^c ±0,3	-39,833 ^b ±1,404	-47,566 ^a ±0,68	-48,866 ^a ±1,484

Os dados representam a média ± desvio padrão de três réplicas independentes (n = 3). Os dados foram submetidos à ANOVA de um fator (teste post hoc de Tukey, p <0,05). Letras minúsculas sobrescritas diferentes na mesma linha indicam diferenças dentro de cada nanoemulsão. OSANES, OSANLU, SONES e SONLU referem-se a nanoemulsão de OSA com éster de luteína, nanoemulsão de OSA com luteína livre, nanoemulsão de SO com éster de luteína e nanoemulsão de SO com luteína livre.

ANEXO 7-Parametros de cor de nanoemulsões de nanoemulsões com óleo de semente de abóbora (OSA) e soja (SO) transportadoras de luteína

	Nanoemulsão	T° 4						T° 45					
		0	3	6	9	12	15	0	3	6	9	12	15
a*	OSANLU	-0,336 ^a ±0,011	-0,32 ^a ±0,01	-0,126 ^b ±0,005	-0,22 ^{ab} ±0,026	-0,196 ^b ±0,005	-0,22 ^{ab} ±0,01	-0,336 ^c ±0,011	-0,703 ^d ±0,025	-1,583 ^b ±0,066	-1,406 ^c ±0,102	-1,603 ^b ±0,005	-2,096 ^a ±0,028
	OSANES	-1,076 ^d ±0,032	-1,406 ^c ±0,041	-1,58 ^{ba±} 0,087	-1,48 ^{bc±} 0,028	-1,55 ^{ba} ±0,017	-1,643 ^a ±0,05	-1,076 ^f ±0,032	-2,913 ^e ±0,015	-5,756 ^d ±0,011	-6,896 ^c ±0,028	-7,816 ^a ±0,196	-7,356 ^b ±0,005
	SONLU	0,03 ^b ±0,02	0,013 ^b ±0,04	-0,1 ^a ±0,01	0,013 ^b ±0,03	0,149 ^a ±0,004	0,113 ^a ±0,005	0,03 ^f ±0,02	-0,69 ^e ±0,026	-2,12 ^d ±0,01	-2,446 ^c ±0,005	-2,86 ^b ±0,03	-3,243 ^a ±0,011
	SONES	-1,833 ^d ±0,119	-1,653 ^e ±0,005	-2,306 ^c ±0,011	-2,426 ^c ±0,03	-2,86 ^b ±0,034	-3,12 ^a ±0,026	-1,833 ^f ±0,119	-3,153 ^e ±0,046	-4,9 ^d ±0,01	-4,276 ^c ±0,05	-5,846 ^b ±0,005	-6,19 ^a ±0,010
b*	OSANLU	44,806 ^a ±0,387	41,95 ^b ±0,542	45 ^a ±0,129	44,39 ^a ±0,091	44,65 ^a ±0,208	44,186 ^a ±0,18	44,806 ^a ±0,387	42,33 ^{bc} ±0,781	42,71 ^b ±0,442	42,103 ^{bc} ±0,456	42,193 ^{bc} ±0,081	41,243 ^c ±0,257
	OSANES	45,483 ^{ab} ±0,336	43,013 ^c ±0,507	46,246 ^a ±0,473	45,556 ^{ab} ±0,03	45,88 ^{ab} ±0,204	44,93 ^b ±0,353	45,483 ^a ±0,336	40,393 ^b ±1,072	33,676 ^c ±0,049	25,763 ^d ±0,161	16,526 ^e ±1,148	3,95 ^f ±0,01
	SONLU	45,353 ^a ±0,536	42,063 ^c ±0,205	45,03 ^{ab} ±0,052	44,283 ^b ±0,453	44,963 ^{ab} ±0,1	44,54 ^{ab} ±0,16	45,353 ^a ±0,536	41,17 ^b ±0,376	41,556 ^b ±0,265	40,72 ^b ±0,192	39,37 ^c ±0,155	38,076 ^d ±0,185
	SONES	45,52 ^a ±0,53	45,773 ^a ±0,44	43,996 ^b ±0,205	43,883 ^b ±0,09	42,88 ^c ±0,258	41,876 ^d ±0,258	45,52 ^a ±0,53	22,346 ^b ±0,195	7,593 ^c ±0,063	-1,183 ^d ±0,005	-3,146 ^e ±0,02	-6,616 ^f ±0,047
c*	OSANLU	44,807 ^a ±0,386	41,95 ^b ±0,543	45 ^a ±0,129	44,39 ^a ±0,091	44,651 ^a ±0,208	44,187 ^a ±0,18	44,807 ^a ±0,386	42,335 ^{bc} ±0,781	42,739 ^b ±0,439	42,12 ^{bc} ±0,4526	42,223 ^{bc} ±0,081	41,296 ^c ±0,255
	OSANES	45,505 ^{ab} ±0,337	43,026 ^c ±0,506	46,273 ^a ±0,47	45,58 ^{ab} ±0,031	45,906 ^{ab} ±0,203	44,96 ^b ±0,353	45,505 ^a ±0,337	40,498 ^b ±1,07	34,165 ^c ±0,049	26,67 ^d ±0,163	18,283 ^e ±1,12	8,35 ^f ±0,006
	SONLU	45,353 ^a ±0,536	42,066 ^c ±0,205	45,03 ^{ab} ±0,052	44,283 ^b ±0,453	44,963 ^{ab} ±0,1	44,54 ^{ab} ±0,159	45,353 ^a ±0,536	41,175 ^b ±0,375	41,61 ^b ±0,264	40,793 ^b ±0,192	39,473 ^c ±0,153	38,214 ^d ±0,185
	SONES	45,557 ^a ±0,525	45,803 ^a ±0,44	44,057 ^b ±0,204	43,95 ^b ±0,089	42,975 ^c ±0,255	41,992 ^d ±0,255	45,557 ^a ±0,525	23,098 ^b ±0,189	9,796 ^c ±0,054	7,329 ^d ±0,023	5,298 ^e ±0,058	5,04 ^e ±0,008
L*	OSANLU	59,516 ^c ±0,215	61,696 ^a ±0,17	60,366 ^b ±0,005	59,686 ^c ±0,167	59,536 ^c ±0,072	59,62 ^c ±0,156	59,516 ^{bc} ±0,215	60,816 ^a ±0,272	60,11 ^b ±0,311	59,186 ^c ±0,314	59,713 ^{bc} ±0,04	60,073 ^b ±0,21
	OSANES	60,78 ^c ±0,249	62,97 ^a ±0,336	61,71 ^b ±0,277	61 ^c ±0,138	60,846 ^c ±0,095	60,803 ^c ±0,27	60,78 ^d ±0,249	63,333 ^c ±0,34	63,466 ^{bc} ±0,015	64,136 ^{bc} ±0,015	64,83 ^b ±1,195	67,22 ^a ±0,036
	SONLU	61,306 ^b ±0,185	62,99 ^a ±0,096	61,496 ^b ±0,063	60,73 ^c ±0,112	60,683 ^c ±0,023	60,55 ^c ±0,131	61,306 ^e ±0,185	63,123 ^a ±0,133	62,84 ^{ab} ±0,069	62,183 ^d ±0,064	62,286 ^{cd} ±0,092	62,616 ^{cb} ±0,153
	SONES	61,776 ^b ±0,085	62,55 ^a ±0,353	62,766 ^a ±0,101	62,25 ^{ab} ±0,06	62,333 ^a ±0,195	62,496 ^a ±0,17	61,776 ^d ±0,085	67,223 ^c ±0,168	67,66 ^{bc} ±0,026	67,983 ^{ab} ±0,03	67,813 ^b ±0,308	68,326 ^a ±0,231
H	OSANLU	90,43 ^a ±0,067	89,732 ^c ±0,113	90,16 ^b ±0,007	90,283 ^{ab} ±0,033	90,41 ^a ±0,0144	90,285 ^{ab} ±0,035	90,43 ^e ±0,067	90,951 ^d ±0,037	92,123 ^{bc} ±0,11	91,914 ^c ±0,158	92,175 ^b ±0,006	92,91 ^a ±0,058
	OSANES	91,77 ^b ±0,04	91,433 ^c ±0,059	91,957 ^{ab} ±0,128	91,864 ^b ±0,035	91,934 ^{ab} ±0,028	92,094 ^a ±0,064	91,77 ^f ±0,04	94,126 ^e ±0,093	99,7 ^d ±0,015	104,98 ^c ±0,03	115,35 ^b ±1,022	151,76 ^a ±0,063
	SONLU	89,962 ^b ±0,032	89,323 ^d ±0,057	89,856 ^c ±0,007	89,983 ^b ±0,051	90,127 ^a ±0,013	89,983 ^b ±0,038	89,962 ^f ±0,032	90,96 ^e ±0,044	92,92 ^d ±0,024	93,438 ^c ±0,012	94,154 ^b ±0,058	94,868 ^a ±0,011
	SONES	92,307 ^d ±0,177	92,068 ^e ±0,018	93 ^c ±0,029	93,164 ^c ±0,045	93,815 ^b ±0,068	94,26 ^a ±0,061	92,307 ^f ±0,177	104,662 ^e ±0,114	129,187 ^d ±0,197	193,57 ^c ±0,087	216,43 ^b ±0,198	244,51 ^a ±0,481

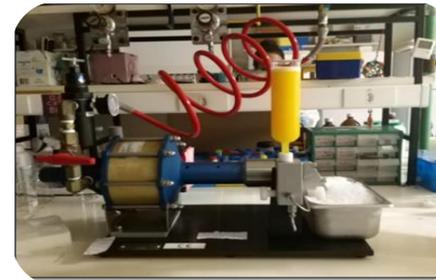
ANEXO 8-Imagens



Sínteses orgânica de palmitato de luteína. Fonte: AUTOR



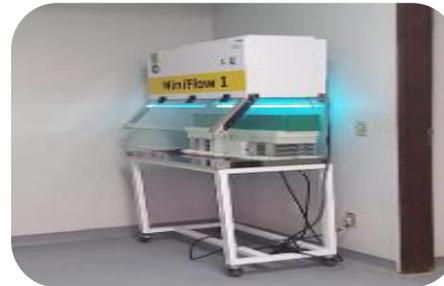
Óleo de soja e óleo de semente de abóbora enriquecido com éster de luteína. Fonte: AUTOR.



Desenvolvimento de nanoemulsão: transportadora de luteína em um Microfluidizador de alta pressão para obtenção de nanoemulsão. Fonte: AUTOR.



Exposição a luz ultravioleta de nanoemulsões de óleo de semente de abóbora e soja transportadora de luteína. Fonte: AUTOR.



Câmara de exposição a luz ultravioleta. Fonte: AUTOR.

APÊNDICE

PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION AND NANO-EMULSIFICATION OF THREE SPECIES OF PUMPKIN SEED OILS WITH FOCUS ON THEIR PHYSICAL STABILITY

Maria Isabel Ordoñez Lozada^{1*}, Iriani Rodrigues Maldonade², Daniele Bobrowski Rodrigues¹, Débora Silva Santos³, Beatriz Alejandra Ortega Sanchez¹, Paulo Eduardo Narcizo de Souza⁴, João Paulo Longo³, Geovani Bernardo Amaro², Livia de Lacerda de Oliveira¹

¹ *Faculty of Health Sciences, University of Brasilia, Campus Darcy Ribeiro, Brasilia-DF, 70910-900, Brazil.*

² *Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa) Vegetables, Brasília-DF, 70275-970, Brazil.*

³ *Institute of Biology, University of Brasilia, Campus Darcy Ribeiro, Brasilia-DF, 70910-900, Brazil.*

⁴ *Laboratory of Electron Paramagnetic Resonance, Institute of Physics, University of Brasilia, Brasilia, 70910-900, Brazil*

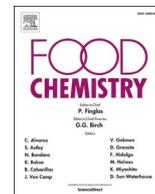
Artigo publicado na revista **Food Chemistry**

LOZADA, M. I. O.; MALDONADE, I. R.; RODRIGUES, D. B.; SANTOS, D. S.; SANCHEZ, B. A. O, DE SOUZA, P. E. N.; LONGO, J. P.; AMARO, G. B.; DE LACERDA, L. P. O. Physicochemical Characterization and Nano-Emulsification of Three Species of Pumpkin Seed Oils with Focus on Their Physical Stability, *Food Chemistry*. 128512. (2020).



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Physicochemical characterization and nano-emulsification of three species of pumpkin seed oils with focus on their physical stability

Maria Isabel Ordoñez Lozada^{a,*}, Iriani Rodrigues Maldonado^b, Daniele Bobrowski Rodrigues^a, Débora Silva Santos^c, Beatriz Alejandra Ortega Sanchez^a, Paulo Eduardo Narcizo de Souza^d, João Paulo Longo^c, Geovani Bernardo Amaro^b, Lívia de Lacerda de Oliveira^a

^a Faculty of Health Sciences, University of Brasilia, Campus Darcy Ribeiro, Brasilia, DF 70910-900, Brazil

^b Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa) Vegetables, Brasilia, DF 70275-970, Brazil

^c Institute of Biology, University of Brasilia, Campus Darcy Ribeiro, Brasilia, DF 70910-900, Brazil

^d Laboratory of Electron Paramagnetic Resonance, Institute of Physics, University of Brasilia, Brasilia 70910-900, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Pumpkin seed oil
Polyunsaturated fatty acids
Tocopherol
Low energy emulsification
Oil-in-water nanoemulsions
Long-term storage

Chemical compounds studied in this article:

δ-Tocopherol (PubChem CID: 92094)
α-Tocopherol (PubChem CID: 2117)
γ-Tocopherol (PubChem CID: 92729)
(all-*E*)- β-carotene (PubChem CID: 5280489)
DPPH: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (PubChem CID: 74358)
AAPH (2,2-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride) (PubChem CID: 76,344)
p-Anisidine (Compound CID: 7732).

ABSTRACT

We present the chemical composition, quality parameters and antioxidant capacity of pumpkin seed oils (PSO) from *Cucurbita pepo*, *Cucurbita maxima*, and *Cucurbita moschata* cultivated in Brazil. In addition, PSO nano-emulsions (nanopepo, nanomax and nanomosc) were developed and their physical stabilities were assessed under long-term storage at two temperatures. Among the PSO, *C. pepo* presented the highest contents of polyunsaturated fatty acids, total carotenoids, and chlorophylls, but the lowest oxidative stability. Conversely, *C. maxima* PSO showed highest oxidative stability and total tocopherol content but the lowest chlorophyll content. Nanomax and nanopepo were more stable to droplet growth at 4 °C, while nanomosc was more stable at 25 °C. Nanopepo was the most stable formulation after the heating-cooling cycles, whereas nanomax was the most stable under centrifugation regardless the temperature. Overall, all nanoemulsions presented droplet diameter lower than 200 nm and ζ-potential approaching -30 mV until the end of storage.

1. Introduction

Pumpkins (*Cucurbita* spp.) are vegetables from the diverse Cucurbitaceae family, which comprises about 27 species. *Cucurbita pepo* and particularly *Cucurbita maxima* and *Cucurbita moschata* are among the largest produced ones, primarily in developing countries where they are important staple foods. Recently, the edible oil obtained from the pumpkin seeds (pumpkin seed oil, PSO) has aroused interest due to the crescent number of studies associating its consumption to health benefits in some conditions such as atherosclerosis (Morrison, Mulder, Stavro, Suárez, Arola-Arnal, & Duyvenvoorde, 2015), prostatic hypertrophy (Gossell-Williams, Davis, & O'Connor, 2006) and urinary dysfunction (Nishimura, Ohkawara, Sato, Takeda, and Nishihira (2014).

Furthermore, antioxidant, hypoglycemic, and hypolipidemic activities have been described (Abd-Elnoor, 2019; Cuco, Massa, Postaua, Cardozo-Filho, & Da Silva, 2019). These effects have been mainly associated to the bioactive compounds present in PSO, such as carotenoids and tocopherols (Cuco et al., 2019; Rabrenović, Dimić, Novaković, Tešević, & Basić, 2014).

The growing demand for natural healthy products has fostered the market of PSO dietary supplements, with the opportunity for the development of diversified formulations to meet the consumer needs. Moreover, PSO has potential to be more widely utilized in food products considering its nutritional and putative health properties. Emulsification in nanostructured systems (<200 nm) has been recognized as an effective alternative to overcome technological difficulties related to the

* Corresponding author.

E-mail address: misabell1223@gmail.com (M.I. Ordoñez Lozada).

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128512>

Received 15 May 2020; Received in revised form 25 October 2020; Accepted 27 October 2020

Available online 7 November 2020

0308-8146/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

incorporation of bulk oils into water-based food products, given their lipophilic character (McClements, 2007). Therefore, with the development of PSO nanoemulsions, this oil could be more readily incorporated in different preparations. In addition, PSO nanoemulsions can be used as a vehicle for the delivery of fat-soluble bioactive compounds or other target lipophiles incorporated into the oil phase (McClements & Rao, 2011), or as a base formulation for preparation of excipient emulsions (McClements & Xiao, 2014).

Nanoemulsions can be produced by high and low energy methods. The phase inversion temperature (PIT) method is a low energy approach based on the change in the surfactant curvature or in the lipophilic-hydrophilic balance of some nonionic surfactants induced by temperature (Komaiko & McClements, 2016). As a result, the surfactant affinity is switched towards to the oil or the aqueous phase, promoting the inversion of an oil-in-water (O/W) emulsion to a water-in-oil emulsion (W/O) or vice versa (Morales, Gutierrez, Garcia-Celma, & Solans, 2003). The basic process consist of heating up the surfactant-oil-water mixture to around or above the temperature of phase inversion, where the affinity of the surfactant for the water and oil phases is balanced and inverted, and then rapidly decrease the system temperature under stirring to produce fine droplets. This method does not require any specialized equipment, thus, allowing the production of nanostructured systems at low cost (McClements & Rao, 2011).

Nanoemulsions are metastable colloidal dispersions and the knowledge about their physical behavior under different storage conditions is an early but crucial step for the development of stable formulations (McClements & Rao, 2011). However, the design and stability of nanoemulsion formulations containing PSO is poorly explored in the literature. Moreover, although the characterization of some PSO has already been reported in the literature, their chemical composition and quality parameters may vary depending, for instance, on the pumpkin genotype, edaphoclimatic conditions, and extraction methods (Can-Cauich, Sauri-Duch, Moo-Huchin, Betancur-Ancona, & Cuevas-Glory, 2019). From that perspective, we aimed to determine the composition of lipophilic compounds, quality parameters and antioxidant capacity of unrefined PSO from three species of pumpkin produced in Brazil: *C. maxima*, *C. pepo*, and *C. moschata*. In addition, nanoemulsion formulations containing PSO of each cultivar were developed using a low energy PIT method and their physical stabilities were assessed under different experimental conditions during a long-term storage.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

Standards of δ -tocopherol e α -tocopherol (90%, HPLC) and (all-*E*)- β -carotene (95%, HPLC) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), whereas γ -tocopherol (99%, HPLC) was acquired from Merck (Darmstadt, Germany). The FAME mix standard (Supelco, USA) was kindly donated by Professor Neura Bragagnolo (UNICAMP, Brazil). DPPH^{*} (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), TPTZ (2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine), AAPH (2,2-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride), Trolox, fluorescein, Solutol® HS 15, Tween 80 and Span 80 were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). The other analytical reagents and HPLC-grade were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

2.2. Sampling

Seeds from three pumpkin species, *C. moschata* jacarezinho, *C. maxima* and *C. pepo* were provided by Embrapa Vegetables (Gama, Brasília-DF, Brazil – 15,93°S;48,15°W) in September 2017. Ripe pumpkins were harvested, and seeds were manually separated, washed with water, and dried under the sun, until 10% moisture content (g/100 g fw) was evaluated (AOCS. American Oil Chemists' Society. (1988), 1988). Finally, seeds were stored at 4 °C in polyethylene bags in the

absence of light until the oil extraction.

2.3. Oil extraction

Forty grams of seeds from each pumpkin species were ground separately in a mixer (Thermomix™, SP, Brazil), sieved (Bronzinco standard sieve, n°45-0.4 mm, SP, Brazil) and immediately subjected to solid-liquid extraction. The seed oils were extracted with petroleum ether (200 mL) in a Soxhlet apparatus for 5 h at 60 °C. Upon completion of oil extraction, the organic solvent was evaporated in a rotatory evaporator (T < 40 °C, Tecnal-TE210, Brazil) and the oil was stored in an N₂ atmosphere in the dark at 4 °C.

2.4. Chemical characterization of PSO

2.4.1. Fatty acids (FA) composition by GC-MS

FA were esterified according to the methodology of Christie (1989) and the fatty acid methyl esters (FAMES) were analyzed by gas chromatography. Briefly, the oil sample was saponified (0.5 M KOH in methanol) at 70 °C for 5 min and the fatty acids were esterified by adding boron trifluoride in methanol (14%, v/v) with heating (70 °C) for further 5 min. Then, saturated sodium chloride solution and HPLC-grade hexane were added. The reaction mixture was centrifuged at 12,000 rpm for 10 min. After that, the supernatant was collected, and the sample was stored at –18 °C until the chromatographic analysis.

The extracts (supernatants) containing the FAME were dried under nitrogen, resuspended in hexane, and filtered (0.45 μ m – Millipore, MA, USA), prior to inject (1 μ L) into the GC-MS (GCMS-QP2010, Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with an automatic sampler (AOC-5000). The compounds were separated on a DB-23 column (60 m \times 0.25 mm ID, 0.25 μ m stationary phase thickness, J&W Scientific 122–2362), using helium as carrier gas at 0.49 mL/min. A split injector was used (1:200). Oven temperature was kept at 140 °C for 5 min, then increased to 240 °C at a rate of 2 °C/min. Injector and the detector temperature were set at 260 °C, while the ion source temperature was 200 °C. Ionization mode was used at electronic impact 0.86 kV; and the mass spectrometer was set to scan at 40–600 *m/z* range of mass. The identification of the FA from the oil samples was performed by comparison with the elution order, retention time and mass spectra characteristics of the mixture of standards (Supelco 37 component FAME mix). Results were expressed as the percentage of the area of each FA, in relation to the area of total FA.

2.4.2. Extraction and analysis of carotenoids by HPLC-DAD

For carotenoid extraction, 5 g of PSO and 20 mL of acetone were transferred to the reaction tube and the mixture was stirred for 2 h at 4 °C in the dark (1,000 rpm, NI 1232 – Dubnoff, Nova Instruments, SP, Brazil), before centrifugation (4000 rpm, 10 min, 4 °C – Thermo Electro Corporation, Solvall RC 6 plus, USA). The extract was partitioned to petroleum ether and saponified with potassium hydroxide in methanol (40%, w/v) for 2 h at 25 °C. After centrifugation (8000 rpm for 30 min at 4 °C), the supernatant was collected and dried under N₂ and stored at –20 °C until chromatographic analysis.

Carotenoids were analyzed by liquid chromatography using a Shimadzu chromatography (Kyoto, Japan) equipped with a diode array detector (SPD-M20A). Separation was carried out in a C₁₈ column (4.6 \times 150 mm \times 5 μ m, Thermo Scientific, USA) kept at 25 °C under isocratic conditions. The mobile phase consisted of a mixture of acetonitrile: methanol:ethyl acetate (8:1:1, v/v/v), and the flow rate was set at 0.8 mL/min. Carotenoids were identified considering the combined information provided by the retention time and elution order in C₁₈, UV-Vis spectrum characteristics, co-chromatography with standards and comparison with literature data (Can-Cauich et al., 2019). Quantification was performed using an external analytical curve of β -carotene. Results were expressed in μ g of β -carotene/100 g of oil.

2.4.3. Tocopherol composition by HPLC-FL

Samples of oil were diluted with isopropanol:acetonitrile (7:3, v/v), filtered (0.45 μm – Millipore, MA, USA) and analyzed using a HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) in series with a fluorescence (FL) detector (RF-20A). The separation was carried out at 25 °C using C18 column (4.6 \times 150 mm \times 5 mm, Thermo Scientific, Hypersil ODS, USA). A linear gradient of acetonitrile:methanol:isopropanol was applied from 50:40:10 (v/v/v) in the first 10 min, linearly changed to 30:65:5 (v/v/v) until 33 min, holding on this proportion for 12 min and returned to the initial conditions in 5 min. The flow rate was 1 mL/min. Wavelengths at 290 nm and 330 nm were used for excitation and emission, respectively. Identification was carried out by comparison to the retention time and spectra of authentic standards. The quantification was carried out using the calibration curves of α -tocopherol, δ -tocopherol and γ -tocopherol. Results were expressed in mg/100 g of oil.

2.4.4. Chlorophyll content

The chlorophyll content was estimated using a standardized method (Cc 13d-55, AOCS 1988). The oil sample was homogenized, filtered (0.45 μm – Millipore, MA, USA) and the absorbance was then measured at 630, 670 and 710 nm (Agilent 8453 Spectrophotometer, SC, USA). The chlorophyll content was calculated using the following equation:

$$C(\text{mgpheophytina/Kggofoil}) = 345.3 \cdot \frac{A_{670} - 0.5 \cdot A_{630} - 0.5 \cdot A_{710}}{L} \quad (1)$$

where L is the optical path length in mm of the cuvette, and A_{670} , A_{630} and A_{710} are sample absorbance units measured at 630, 670 and 710 nm, respectively. The total content of chlorophyll pigments was expressed in mg pheophytin a/kg of oil.

2.5. Physicochemical characteristics and quality parameters of PSO

Quality parameters of PSO were assessed according to the official methods (AOCS. American Oil Chemists' Society. (1997), 1997). Peroxide Value (PV) (Cd 8-53), iodine value (Cd 1-25), saponification value (Cd 3-25), and acidity value (Cd 3d-63) were determined by titration. The *p*-anisidine Value (pAV) was determined spectrophotometrically (Cd 18–90) and the Total Oxidation (TOTOX) value was calculated according to the formula ($2 \cdot \text{PV} + \text{pAV}$) (Shahidi & Zhong, 2005). The oxidative stability of each oil was determined by measuring the oxidation induction time (IT) in a Rancimat device (Metrohm 873 Biodiesel Rancimat, SP, Brazil) by following the method of Hadorn (1974). The oil sample (3 g) was heated to 110 °C at air rate of 20 L/h, the conductivity was continuously measured and the induction time was determined.

The color of oil samples was assessed by using a HunterLab colorimeter (Hunter Color Quest XE, VA, USA). An aliquot of each oil was transferred to a glass cuvette and the color was measured against a black background in Hunter units of lightness (L^*), redness (a^*), and yellowness (b^*). Subsequently, the saturation parameter (chroma, C^*) and hue angle (h) were calculated using the following equations:

$$h = \tan^{-1} \left(\frac{a^*}{b^*} \right) \quad (2)$$

$$C^* = ((a^*)^2 + (b^*)^2)^{\frac{1}{2}} \quad (3)$$

2.6. Antioxidant capacity

The antioxidant capacity of PSO was determined according to the methods: 1) Oxygen Radical Absorbance Capacity-ORAC (Ou, Hampsch-Woodill, & Prior, 2001), 2) Ferric Reducing Antioxidant Power-FRAP (Pulido, Bravo, & Saura-Calixto, 2000), and 3) DPPH radical by the Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy (EPR) technique in different oil concentrations (2500, 25,000 and 75000 $\mu\text{g/mL}$ of oil) (Ferreira-Nunes et al., 2018).

2.7. Nanoemulsion formulation and preparation

Nanoemulsions (2.5 mg of PSO /mL of emulsion) were prepared using PSO obtained from *C. pepo* (nanopepo), *C. maxima* (nanomax) and *C. moschata* (nanomos). Preliminary macroscopic evaluation tests were performed to choose an appropriate surfactant (among Tween 80, Span 80 and Solutol® HS15) and determine quantities of the other ingredients. The stability of PSO emulsion was evaluated through visual observation toward gravitational separation, creaming, flocculation, or coalescence for 15 days at room temperature (Supplementary Material).

Based on these tests, Solutol® HS 15 was chosen as the surfactant to prepare the final nanoemulsions since no physical separation was visually noticed over the test period. Oil-in-water (O/W) nanoemulsions were prepared based on the PIT method (Monge-Fuentes et al., 2017) with adaptations. The oil phase was composed of PSO (100 mg) of a given species and castor oil (25 mg), which were homogenized under constant agitation (300 rpm) for 5 min at room temperature with the surfactant Solutol® HS 15 (350 mg, previously melted at 30 °C). The aqueous phase, consisting of 25 mL of ultrapure water, was heated to 70 °C and mixed to the oil phase to form a coarse emulsion. The system remained under stirring (300 rpm) in a hot plate magnetic stirrer until reaching 80 \pm 2 °C, with the formation of an emulsion with a cloudy aspect. Then further 15 mL of cold water was added and the system was quickly cooled to 4 °C in an ice bath under constant agitation to obtain a translucent O/W nanoemulsion. For each PSO species, 2 batches of samples were prepared at room temperature, in triplicate. One triplicate was stored at 4 °C and the other at 25 °C, for 120 days protected from light.

2.8. Characterization of PSO nanoemulsions

2.8.1. Particle size measurements

Nanoemulsion droplet size (hydrodynamic diameter) and polydispersity index (PDI) were measured by Dynamic Light Scattering, whereas the ζ -potential was measured by electrophoretic mobility. The nanoemulsions were diluted with ultrapure water (1:10 v/v) prior to analysis to avoid multiple scattering effects. The measurements were carried out in a Zetasizer (ZEN3690, Malvern Instruments, England, UK) using 90° scattering angle.

2.8.2. pH measurement

The pH was measured with a pH-meter (NTPHM, Nova Técnica, SP, Brazil). The stability of the nanoemulsions, placed in a transparent test-tube (McClements, 2007), was monitored through a visual observation.

2.8.3. Field emission transmission electron microscopy (FE-TEM)

The morphology and the structure of PSO nanoemulsion droplets were recorded by field emission transmission electron microscopy (FE-TEM, JEM-1011; JEOL, Tokyo, Japan). PSO nanoemulsions (3 μL) were dropped on an ultra-thin TEM grid for 10 s and then the osmium tetroxide reagent was used for negative contrast and observed after drying (24 h). Finally, the TEM grids were dried overnight at 25 °C. The morphology of the oil droplets was then observed at 5x and 15x magnification at an operating acceleration voltage of 80 kV.

2.9. Physical stability assays

2.9.1. Determination of PSO nanoemulsions stability during storage

The physical stability of the nanoemulsions was monitored by measuring the mean droplet size, PDI, ζ -potential and pH of the nanoemulsions after 0, 7, 15, 30, 45, 60, 90 and 120 days of storage at 4 and 25 °C. In addition, aliquots of nanoemulsions were subjected to centrifugation (Hettich Zentrifugen centrifuge, Mikro 220R, Tuttlingen, and Baden-Württemberg, Germany) at 2500, 3500 and 7000 rpm sequentially for 15 min to assess their stability under centrifugal force (Ghosh, Mukherjee, & Chandrasekaran, 2014). After centrifugation, phase

separation, creaming or flocculation were visually observed.

2.9.2. Stability of PSO nanoemulsions under heating-cooling cycles

Nanoemulsions were subjected to five alternating temperature cycles, each cycle consisting of cooling in a refrigerator (model RFCT451, BSH Continental© 279, Brazil) set at 4 °C for 24 h followed by heating in an oven (model DL-SE, De Leo 281 Equipamentos, Brazil) set at 40 °C for 24 h, totalizing a 48 h-cycle. After the end of each cycle, the droplet diameter, polydispersity index and ζ -potential were measured (Bali, Ali, & Ali, 2010).

2.9.3. Stability of PSO nanoemulsions in different pH conditions

Solutions with different pH (3.0, 5.0, 7.0, 9.0 and 11.0 at 25 °C) were prepared using aliquots of 0.1 M HCl, 0.1 M NaOH and ultrapure water. Nanoemulsions were diluted (1:10, v/v) in each solution of different pH, and the sample was subjected to ζ -potential analysis (Tang, Manickam, Wei, & Nashiru, 2012).

2.10. Statistical analyses

All experiments were carried out in triplicate and data were presented as mean \pm standard deviation (SD). One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey *post-hoc* test ($\alpha = 5\%$) was performed using GraphPad Prism 8.3.1 software. Principal Component Analysis (PCA) was performed to estimate the interaction of some responses and different PSO using the computational method of the XLSTAT 2015 software (Addinsoft, Paris, France).

3. Results and discussion

3.1. Chemical characterization of PSO

3.1.1. Fatty acid composition

Six FA were identified in the different PSO evaluated in this study: palmitic (16:0, 13.6–15.9%), stearic (18:0, 11.5–15.7%), oleic (18:1, 28.9–38.9%), linoleic (18:2, 26.9–42.4%), linolenic (18:3, 0.8–1.7%), and eicosanoic (20:0, 1.4–1.8%) (Table 1).

C. pepo PSO showed the lowest proportions of MUFA (28.88%) and the highest proportion of PUFA (44.13%), mainly linoleic acid (42.41%), among the PSO evaluated. A similar profile of unsaturated and saturated FA were found in *C. maxima* and *C. moschata* PSO, with lower proportions of PUFA (29.86% and 27.73%, respectively), and higher content of monounsaturated oleic acid (38.86% and 39.40%, respectively) in contrast to *C. pepo* PSO ($p < 0.05$). Differences in the profile and content of certain fatty acids in our tested varieties are probably related to the origin of specific pumpkin seed oil cultivars, genetic factors, geographical origin, climatic conditions, and environmental conditions, as described in other investigations (Akin, Arslan, Karuk Elmas, & Yilmaz, 2018).

In the study by Nederal et al. (2014), the cold-pressed oil from roasted *C. pepo* seeds showed proportions of 45.9%, 35.4%, and 12.30% for linoleic, oleic, and palmitic acid, respectively. Rezig, Chouaibi, Msaada, and Hamdi (2012) found greater proportions of oleic (44.11%), linoleic (34.77%) and palmitic (15.97%) in *C. maxima* PSO extracted by mechanical cold expelling method, which are similar to the proportions of FA of *C. maxima* in this study. Moreover, the proportion of oleic acid (38.7%), linoleic (31.5%) and palmitic acid (21.6%) of *C. moschata* PSO in the study of Stevenson, Eller, Wang, Jane, and Wang (2007) is also close to our results.

In Table 1, it is possible to observe that eicosanoic FA were found in a small proportion in all seed oils (<2%). This FA is not very common in the PSO but it has already been described by Jiao et al. (2014) in *C. pepo* PSO extracted by microwave (0.88% of total fatty acids). The amount of 20:0 found in our study was also slightly greater than that reported by Rezig et al. (2012) for *C. maxima* oil (0.41%).

Table 1

Composition of fatty acids, carotenoids and tocopherols, chlorophyll content, physicochemical characterization and antioxidant capacity of oil from three species of pumpkin seeds.

Compounds	<i>C. maxima</i> seed oil	<i>C. moschata</i> seed oil	<i>C. pepo</i> seed oil
Fatty acid composition (%)			
16:0	14.05 ^b C \pm 0.35	15.94 ^a C \pm 0.48	13.65 ^b C \pm 0.43
18:0	15.71 ^a C \pm 0.08	15.56 ^a C \pm 0.48	11.52 ^b C \pm 0.34
18:1	38.86 ^a A \pm 0.60	39.40 ^a A \pm 1.31	28.88 ^b B \pm 0.16
18:2	28.45 ^b B \pm 0.51	26.91 ^b B \pm 0.20	42.41 ^a A \pm 1.16
18:3	1.41 ^a D \pm 0.44	0.82 ^b D \pm 0.21	1.72 ^a D \pm 0.22
20:0	1.53 ^a D \pm 0.13	1.37 ^a D \pm 0.27	1.83 ^a D \pm 0.08
MUFA	38.86 ^a \pm 0.59	39.40 ^a \pm 1.30	28.88 ^b \pm 0.15
PUFA	29.86 ^b \pm 0.32	27.73 ^b \pm 0.13	44.13 ^a \pm 0.98
SFA	31.28 ^a \pm 0.55	32.88 ^a \pm 1.23	26.99 ^b \pm 0.85
Carotenoids (μg/100 g)			
Lutein	38.09 ^b B \pm 0.14	38.82 ^b B \pm 1.35	205.53 ^a A \pm 0.31
β -carotene	44.38 ^c A \pm 0.18	80.65 ^a A \pm 3.04	67.24 ^b B \pm 1.51
Total	82.48 ^c \pm 0.31	119.48 ^b \pm 4.38	272.78 ^a \pm 1.34
Tocopherol (mg/100 g)			
γ -tocopherol	359.56 ^a A \pm 23.59	241.63 ^b A \pm 6.11	238.32 ^b A \pm 12.19
α -tocopherol	74.27 ^a B \pm 2.25	62.95 ^b C \pm 1.39	26.81 ^c B \pm 0.65
δ -tocopherol	76.45 ^b B \pm 0.85	91.80 ^a B \pm 2.25	29.53 ^c B \pm 0.59
Total	510.29 ^a \pm 24.50	396.40 ^b \pm 9.93	294.66 ^c \pm 13.01
Chlorophyll (mg pheophytin a/kg)	0.46 ^c \pm 0.01	0.89 ^b \pm 0.10	1.59 ^a \pm 0.02
Physicochemical characteristics			
<i>p</i> -anisidine value	4.14 ^a \pm 0.39	3.87 ^a \pm 1.11	3.08 ^a \pm 0.47
Peroxide value (meq O ₂ /kg)	2.49 ^b \pm 0.01	1.01 ^b \pm 0.03	14.06 ^a \pm 2.34
TOTOX	9.12 ^b \pm 0.37	5.90 ^b \pm 1.14	31.20 ^a \pm 4.47
Acidity value (mg KOH/g oil)	0.15 ^b \pm 0.01	0.27 ^a \pm 0.02	0.25 ^a \pm 0.02
Iodine value (g I ₂ /100 g)	75.63 ^b \pm 3.89	78.49 ^b \pm 5.91	99.76 ^a \pm 3.62
Saponification value (mg KOH/g oil)	100.68 ^a \pm 1.42	99.12 ^a \pm 1.83	89.64 ^a \pm 7.05
Oxidative stability (h)	11.47 ^a \pm 0.21	5.02 ^b \pm 0.43	4.39 ^b \pm 0.27
Color parameters			
Lightness (L*)	10.77 ^a \pm 0.88	9.32 ^a \pm 0.82	6.14 ^b \pm 1.02
Redness (a*)	4.73 ^a \pm 0.34	3.51 ^b \pm 0.08	2.23 ^c \pm 0.30
Yellowness (b*)	0.69 ^a \pm 0.08	-0.77 ^b \pm 0.08	-0.77 ^b \pm 0.31
Chroma (C*)	4.78 ^a \pm 0.35	3.59 ^b \pm 0.10	2.39 ^c \pm 0.23
Hue angle (h)	8.34 ^b \pm 1.00	347.66 ^a \pm 1.14	340.41 ^a \pm 1.08
Antioxidant capacity			
FRAP (μ mol TE/g)	76.23 ^b \pm 8.47	117.73 ^a \pm 3.97	108.20 ^a \pm 5.59
ORAC (μ mol TE/g)	276.64 ^a \pm 10.38	280.80 ^a \pm 13.18	214.84 ^b \pm 3.59
DPPH (% Inhibition)			
2500 μ g/mL	9.95 ^{aC} \pm 1.69	8.58 ^{aC} \pm 1.93	3.42 ^{bC} \pm 0.72
25000 μ g/mL	33.86 ^{aB} \pm 1.19	34.30 ^{aB} \pm 2.52	32.30 ^{aB} \pm 1.23
75000 μ g/mL	87.82 ^{bA} \pm 0.75	71.46 ^{aA} \pm 0.31	99.16 ^{aA} \pm 0.59

Data represent the mean \pm standard deviation of three independent replicates ($n = 3$). Data were submitted to one-way ANOVA, differences among groups were detected using multiple comparison procedures (Tukey post hoc test, $p < 0.05$). Different superscript lowercase letters in the same row indicate differences

among the oil samples and different superscript capital letters in the same column indicate differences among the compounds within a given oil sample. SFA, saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids; TOTOX, total oxidation value; ORAC, oxygen radical absorbance capacity; FRAP, the ferric reducing antioxidant power, DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl.

3.1.2. Composition of carotenoids

In relation to carotenoids, β -carotene was the major compound found in *C. moschata* and *C. maxima* PSO, while lutein was the main carotenoid in *C. pepo* (Table 1). *C. pepo* had 2.3 times higher total carotenoid content than the *C. moschata* seed oil, which, in turn, showed 45% higher carotenoid content than that contained in *C. maxima* seed oil (Table 1). Even though *C. maxima* seed oil presented the lowest amount of β -carotene (44.38 $\mu\text{g}/100\text{ g}$), the content was higher than that of 10.7 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ *C. maxima* seed oil reported by Siano et al. (2016). Lutein was the major carotenoid found in *C. pepo* PSO, representing about 75% of the total carotenoid content of this oil. This is in line with the percentage (80%) of lutein reported in a previous study (Jeznach, Danilcenko, Jarienė, Kulaitienė, & Černiauskienė, 2012).

3.1.3. Tocopherol composition

γ -, α - and δ -tocopherols were identified in all PSO studied, with γ -tocopherol being the major compound regardless of the pumpkin species (Table 1). *C. maxima* PSO showed the highest total tocopherol content, with emphasis on the amount of γ -tocopherol (359.56 mg/100 g oil), while the levels of δ -tocopherol in *C. moschata* were 20% higher than those in *C. maxima* and 3 times higher than those in *C. pepo*. Potočnik, Rak Gizej, and Košir (2018) found a lower content of γ -tocopherol (61.9 mg/100 g) in *C. moschata* seed oil. The findings by Can-Cauich et al. (2019) in relation to the *C. moschata* PSO indicated that the levels of total tocopherols and γ -tocopherol were 660.1 and 283.0 mg/100 g oil, which were close to those found in the present study. Based on the results obtained, the content of tocopherols presented in all PSO are in line with those found in the literature, therefore, they can be considered as rich sources of tocopherol.

3.1.4. Chlorophyll content

The total chlorophyll content of *C. pepo* PSO was about 1.8 and 3.5-fold higher than those in *C. moschata* and *C. maxima*, respectively (Table 1). The higher chlorophyll content of *C. pepo* oil, the more susceptible of the oil towards photooxidation processes. Regardless of species, all PSO showed less chlorophyll content (lower than 2 mg/kg) when compared to other unrefined oils, such as extra virgin olive oil, as reported by Borello and Domenici (2019).

3.1.5. Quality parameters of PSO

C. pepo PSO presented the highest peroxide value (14.06 meq O_2/kg oil), which was 5.6 and 14-fold higher than the values found in *C. maxima* and *C. moschata* seed oils, respectively. However, the peroxide value of *C. pepo* seed oil is lower than the limit value (20 meq O_2/kg oil) established for extra virgin olive oil, which was used as a basis for comparison in the present study (Codex Alimentarius International Food Standards (1999), 1999). The higher content of peroxides found in the oil of *C. pepo* may be related to the higher content of PUFA, chlorophyll and lower content of tocopherols than those found in the other PSO cultivar, despite the higher content of carotenoids, mainly lutein. It has been reported that lutein also has pro-oxidant activity in both dark and light. Due to the carotenoids' instability against heat and light, its degradation compounds can promote lipid oxidation (Subagio & Morita, 2001). Nederal et al. (2012) reported that *C. pepo* seed oil had a peroxide value of 5.23 meq O_2/kg oil, lower than that found in our study. On the other hand, Ali et al. (2017) observed that the oil obtained for *C. maxima* seeds showed a peroxide value of up to 12 meq O_2/kg of oil. Peroxide values may vary depending on the conditions of extraction and storage and the chemical composition of the cultivar.

Secondary oxidation products can be determined by the *p*-anisidine value. The oils studied showed no statistical differences between them in relation to the *p*-anisidine indexes (Table 1). However, regarding to the peroxidation index (TOTOX value), *C. pepo* PSO showed the highest oxidation with a TOTOX value of 5.3 and 3.4-fold higher than *C. moschata* and *C. maxima* PSO, respectively.

The oxidative stability of the oils was determined by the RANCIMAT method, and expressed as the oxidation induction time (IT). In general, for oxidation of natural oils and fats under the same conditions, the higher the IT value, the more stable the edible oil (Hadorn, 1974). *C. maxima* PSO showed the longest IT (11.43 h), thus being the most stable PSO ($p < 0.05$), when compared to *C. moschata* and *C. pepo* PSO (5.02 and 4.39 h, respectively). This low stability of *C. moschata* and *C. pepo* PSO may be related to the higher content of carotenoids (119.48 and 272.78 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, respectively) and chlorophyll (0.18 and 1.69 mg pheophytin a/kg, respectively), which in this case may have had a pro-oxidant action. However, the study of Bardaa et al. (2016) reported approximately 3 h of the IT of *C. moschata* PSO, which was shorter than that found in this study. Longer induction times may be related to lower contents of PUFA and the presence of natural antioxidants, such as tocopherols (Murkovic & Pfannhauser, 2000). In this case, the highest total tocopherol content (510.29 mg/100 g) can explain the longer induction times of the *C. maxima* PSO. Carotenoids, tocopherols and chlorophylls somehow play an important role in oxidative stability due to their antioxidant nature in the dark and pro-oxidant activity in light.

Acidity is a parameter related to oil processing, preservation and quality of the raw material. This parameter also relates to the formation of hydrolytic rancidity. According to Codex Alimentarius International Food Standards (1999) (1999), the maximum acidity allowed for virgin and refined oils is 4 and 0.6 mg KOH/g of oil, respectively. In the present study, the acidity of all the PSO was lower than 0.3 mg KOH/g oil, of which *C. maxima* PSO had approximately 55% acidity, lower than those of the other PSO (Table 1). These values were lower than those found by Rezig et al. (2012) for *C. maxima* PSO (7.54 mg KOH/g oil). Likewise, El-Adawy and Taha (2001) found an acid value of 2.88 mg KOH/g, which was 10 times higher than that found in this study for *C. pepo* PSO.

The iodine value of *C. pepo* PSO was 99.76 g of $\text{I}_2/100\text{ g}$ of oil, which was approximately 22% significantly higher ($p < 0.05$) than the value of other PSO, aligned with the higher proportion of unsaturated FA found in *C. pepo* PSO. The iodine value of *C. pepo* PSO found in this study was lower than those of 115 g of $\text{I}_2/100\text{ g}$ of *C. pepo* seed oil, reported by Potočnik et al. (2018).

Regarding the saponification value, the oil of *C. maxima* seeds showed a value of 100.68 mg KOH/g oil, which was not differing from that of other PSO ($p > 0.05$). According to Codex Alimentarius International Food Standards (1999) (1999), virgin olive oil must have a maximum saponification value of 184–196 mg KOH/g, so that the seed oils evaluated in this study are within the stipulated value for saponification. At the moment, there is no stipulated value for PSO, therefore the comparison was made to olive oil.

Color is one of the main attributes that affect consumers' perception of the quality of edible oils. The color tonality of *C. moschata* and *C. pepo* seed oils were similar and both samples were located at the fourth quadrant of color globe with hue angles of 347.66 and 340.41, respectively, although *C. moschata* showed higher redness (a^*), *C. maxima* PSO, which was located at the first quadrant, showed a hue angle of 8.34 with a positive value of b^* . This result indicated the higher tendency to yellow of *C. maxima* PSO than the other PSO. The luminosity (L^*) parameter was higher for *C. moschata* and *C. maxima* PSO (10.77 and 9.32) than that for *C. pepo* PSO (6.14), whereas the Chroma (C^*) values increased in the order: *C. pepo* (2.39) < *C. moschata* (3.59) < *C. maxima* (4.78) ($p < 0.05$). Chroma or saturation represents a quantitative attribute for color intensity, while pale colors have low saturation, vivid and intense colors present high saturation. In this sense, *C. pepo* PSO presented the least vivid and darkest color among the three PSO. *C. maxima* PSO studied by Rezig et al. (2012) showed higher values for the

parameter luminosity (44.8) than the values found in our study, besides a higher b^* value (28.88), being more yellowish than the seed oils evaluated herein.

3.2. Antioxidant capacity

Assessing the antioxidant capacity of oils is important to determine the protective effect of the sample against reactive species. There are several methods to assess the in vitro antioxidant capacity, such as the FRAP, ORAC and DPPH^{*} methods. The *C. moschata* PSO showed the highest absolute values of antioxidant capacity in the FRAP and ORAC methods (Table 1). Using the FRAP method, the antioxidant capacities of *C. moschata* and *C. pepo* PSO were observed statistically higher ($p = 0.05$) than that of *C. maxima*. In this case, *C. maxima* PSO was the most effective metal ion reducer compared to other species. However, *C. moschata* (280.8 $\mu\text{mol TE/g oil}$) and *C. maxima* PSO (276.6 $\mu\text{mol TE/g oil}$) showed better antioxidant activity than *C. pepo* PSO (214.8 $\mu\text{mol TE/g oil}$), when ORAC method was employed (Table 1). The results showed that the pumpkin seed species can significantly affect the antioxidant capacity, and that the result depends on the method employed. FRAP evaluates the ability of a sample in reducing the ferric iron (Fe^{+3}) to the ferrous form (Fe^{+2}), therefore, it evaluates the ability to reduce free radicals by electron transfer. The ORAC assay evaluates the scavenging of the peroxy radical, by transferring hydrogen atoms. Interestingly, the seed oils of these species showed different levels of total tocopherol and total carotenoids, that is, the oil from the seeds of *C. pepo* had lowest total tocopherol and highest content of total carotenoids than the other PSO, whereas *C. maxima* PSO had a highest tocopherol content and lowest total carotenoids than its counterparts. The reactivity of vitamin E with organic peroxy radicals is associated with the redox properties of the chroman ring, accounts for vitamin E's antioxidant activity, which is believed to be its main biochemical function. Tocopherols protect lipids by scavenging peroxy radicals without reacting in other stages of chain's propagation (Traber & Atkinson, 2007). On the other hand, carotenoids are important biological compounds that can inactivate electronically excited molecules, a process termed as quenching (Decker, 2003).

For the DPPH method (Table 1), the antioxidant capacity of PSO was a function of the oil concentration, the higher the oil concentration, the

higher the percentage of DPPH^{*} inhibition, regardless of the sample. However, the efficiency of each oil in inhibiting the DPPH radical varied in the highest and in the lowest oil concentration used. Remarkably, in the lowest oil concentration (2,500 $\mu\text{g/mL}$), *C. pepo* seed oil presented the lowest percentage of DPPH^{*} inhibition (3.42%, $p < 0.05$). Whereas the inhibition effect of this sample surpassed those of its counterparts in the highest oil concentration (99.16% of DPPH^{*} inhibition in contrast to 87.82% and 71.46% para *C. maxima* and *C. moschata*, respectively). Studies carried out with *Lepidium sativum* seed oil were more efficient to inhibit the signals of the DPPH^{*} radicals, requiring a lower concentration (50000 $\mu\text{g/mL}$) to obtain 100% inhibition (Naik, Meda, & Lele, 2014), while the PSO used in this study required a higher concentration (75000 $\mu\text{g/mL}$) to get the maximum inhibition of DPPH^{*} radicals.

3.3. Relationship between PSO chemical composition, quality parameters and antioxidant capacity by PCA

The PCA was performed with data obtained from the chemical characterization of PSO, accounting for 98.7% of the original variance of the first two components (Fig. 1). PC1 explained 87.1% of the total variance and showed the spatial separation of *C. pepo* PSO on the negative side and the *C. maxima* PSO on the positive side. Considering both components, *C. maxima* had a strong positive association with γ -tocopherol content and oxidative stability. In the first component, this genotype was positively associated with other tocopherols, mono-unsaturated and saturated FA, antioxidant capacity (ORAC), saponification value, and p -anisidine. The relationship between Rancimat IT and γ -tocopherol content is expected since this tocopherol is known to have higher antioxidant activity that might delay the oxidation process (Murkovic & Pfannhauser, 2000). The saponification value has related to *C. maxima* PSO, which was positively associated with the MUFA content. It is known that the saponification value represents the amount of low or high molecular weight FA present in the oil (the higher the average molecular weight, the lower the index), which is related to the higher proportion of MUFA present in *C. maxima* PSO in contrast to the other seed oils.

C. pepo was associated with the peroxide value and oxidation markers TOTOX and with PUFA, iodine value, chlorophyll, lutein and

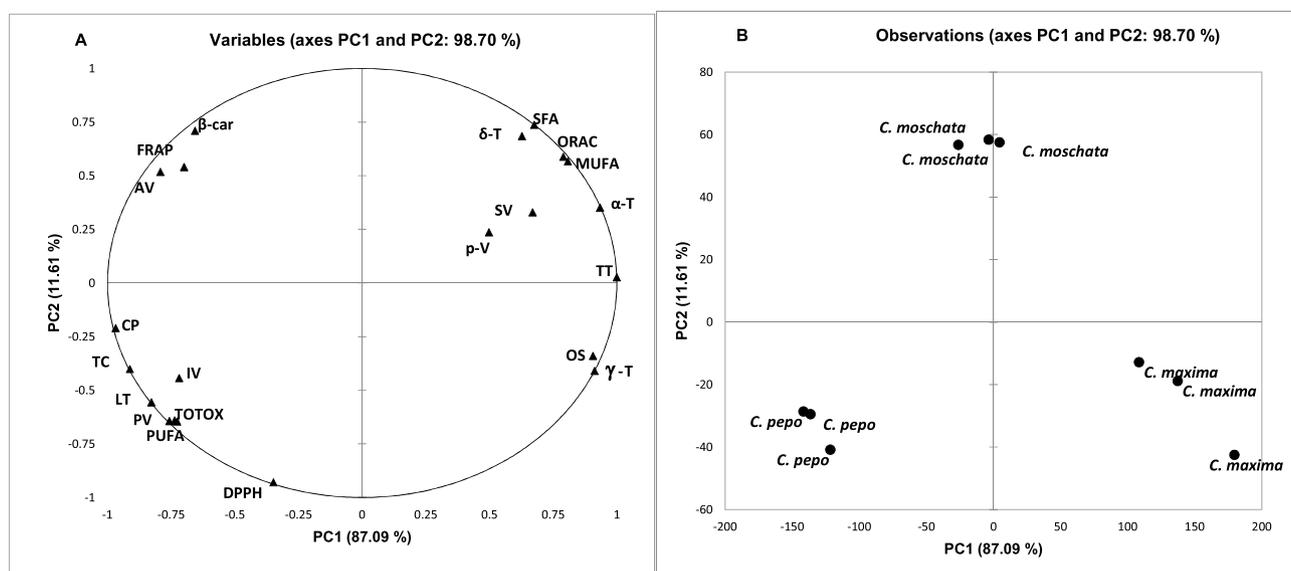


Fig. 1. Principal Component Analysis of bioactive compounds in oils from pumpkin seeds from *Cucurbita moschata*, *C. maxima* and *C. pepo*. Variables: AV, acidity value; CP, Chlorophyll; β -car, β -carotene; CT, Total carotenoids; IV, Iodine value; PV, Peroxide value; LT, Lutein; SFA, Saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids; TOTOX, total oxidation value; ORAC, oxygen radical absorbance capacity; FRAP, the ferric reducing antioxidant power; SV, Saponification value; p -V, p -Anisidine; TT, Total tocopherols; OS, Oxidative stability; α -T, α -tocopherol; γ -T, γ -tocopherol; δ -T, δ -tocopherol.

total carotenoids. The association between iodine index and PUFA and, consequently, oxidation markers is well expected. *C. pepo* showed the highest proportion of the polyunsaturated linoleic acid, which may be related to the highest iodine content of this sample in contrast to other PSO. The greater unsaturation degree of this oil is expected to contribute

to its greater susceptibility to oxidation processes, and this sample presented the highest peroxide index among the PSO analyzed. On the other hand, the role of chlorophyll in photo-oxidation is deeply studied, as well as its pro-oxidant activity. Our results, however, suggested that lutein, the main carotenoid in *C. pepo* PSO, does not contribute much to

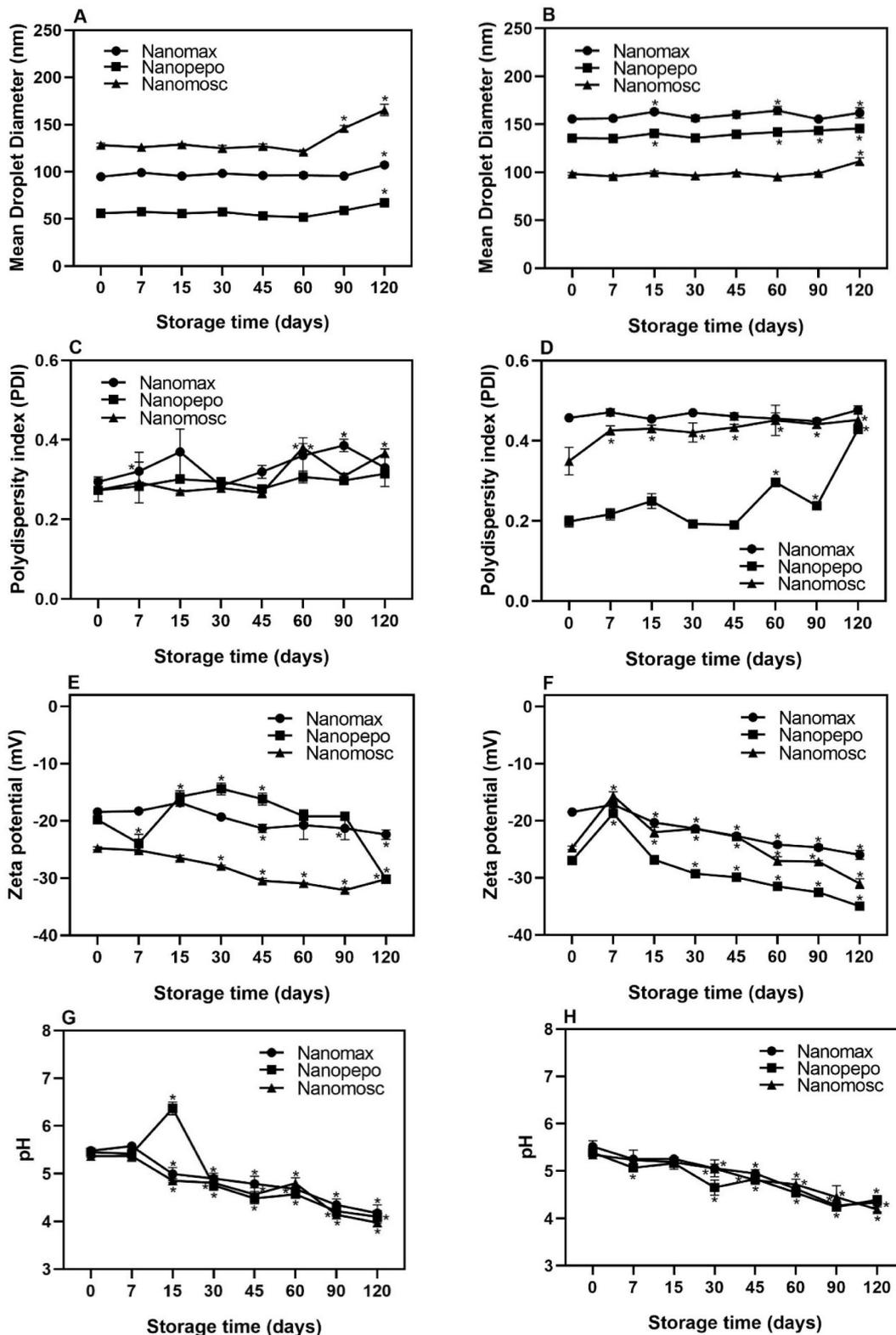


Fig. 2. Changes in the droplet size, polydispersity index and particle charge of nanoemulsions made with oil from three species of pumpkin seeds during storage at 4 °C (A, C, E and G) and 25 °C (B, D, F and H). Nanomax, Nanopepo and Nanomosc refer to PSO-based nanoemulsions from *Cucurbita maxima*, *C. pepo* and *C. moschata* seed oils, respectively. Asterisks indicate significant differences within the same sample by the Tukey post hoc test ($p < 0.05$).

the antioxidant capacity of the oil. It has been revealed that lutein has pro-oxidant activity, meaning that it not only plays an antioxidant role but also promotes lipid oxidation (Subagio, Shigemura, & Morita, 2001).

PC2 explained 11.6% of the total variation and was useful to discriminate *C. moschata* PSO from those of the other species (Fig. 1). The positively associated variables were β -carotene content, FRAP antioxidant capacity and acidity, whereas DPPH, peroxide value and TOTOX were the main variables negatively associated with *C. moschata* PSO. This negative relationship was expected for the higher β -carotene content in this species and its antioxidant action. On the other hand, the PCA showed in the first quadrant the *p*-anisidine value was positively associated with MUFA, which may be due to the formation of aldehyde compounds such as: octanal, nonanal, decanal, 2-decennial and 2-undecenal resulting from the secondary oxidation of oleic acid, a mono-unsaturated fatty acid (Cao et al., 2020). Besides, in the third quadrant, the positive association among peroxide index, carotenoids, lutein, chlorophyll and the negative with tocopherols suggested that carotenoids and chlorophyll possibly did not act as an antioxidant, but rather as a pro-oxidant.

Regarding the antioxidant capacity methods, PCA indicated that ORAC is positively associated with tocopherols, and negatively associated with carotenes, acidity value and chlorophyll. DPPH was more associated with lutein, while FRAP was associated with β -carotene. The ORAC method measures the protection provided by an antioxidant to a target molecule that being oxidized by peroxy radicals. The ORAC was positively related to tocopherols, which are capable to stabilize reactive species, such as peroxy radicals (Pegoraro et al., 2017). DPPH is based on the measurement of the antioxidant capacity of a specific substance to scavenge the DPPH radical, in this sense, lutein is a carotenoid capable of dissipating free radical energy and showed strong scavenging activity of radical.

3.4. PSO nanoemulsion characterization

During the nanoemulsion production, a coarse emulsion with a cloudy aspect was obtained around the surfactant temperature of phase inversion. This cloudy aspect was changed into a translucent clear dispersion when the temperature of the emulsion was reduced due to the addition of cold water. This final clear translucent solution indicated the formation of nano-sized oil droplets, so oil-in-water nanoemulsions were obtained.

In preliminary tests, the optimum base formulation for producing PSO emulsions using phase inversion temperature method was determined, resulting in nanoemulsions with droplet size lower than 200 nm (Fig. 2). This is an important result, since nanoemulsions were prepared using a simple and low-energy methodology, which opens the opportunity to produce these formulations in batches on an industrial scale.

Independent batches of nanoemulsions of each sample were prepared to be stored at the two different temperatures, as aforementioned. In the day 0 of storage, the average droplet diameters of the nanomax, nanopepo and nanomosc batches that would be stored at 4 °C were 94.66, 56.06 and 128.40 nm, respectively (Fig. 2A), whereas the same nanoemulsions that would be stored at 25 °C presented the respective droplet sizes of 155.70, 135.50 and 98.30 nm (Fig. 2B). At 25 °C, the initial average droplet size of the nanomax and nanopepo was greater than those stored at 4 °C, while the initial diameter of nanomosc that would be stored at 25 °C was 30 nm smaller than the sample that would be stored at 4 °C.

PDI indicates the uniformity of droplet size within the emulsion system. The higher the PDI, the less uniform the droplet size (McClements & Rao, 2011). At day 0 of storage, nanomax, nanopepo and nanomosc, which were stored at 4 °C, presented PDI values of 0.294, 0.273 and 0.274, respectively (Fig. 2C). All nanoemulsions showed PDI values close to 0.3, which might suggest good stability during storage. However, nanomax, nanopepo and nanomosc which were stored at 25 °C showed the respective PDI of 0.457, 0.198 and 0.349

(Fig. 2D), suggesting that greater initial size variation was observed in nanomax and nanopepo rather than nanomosc.

ζ -potential is used for gauging charge on a nanoemulsion surface, in general ζ -potential values $> +30$ mV or < -30 mV are considered as good indicators of long term stability (Teo et al., 2015). Initially at 4 °C, the ζ -potential values of nanomax, nanomosc and nanopepo were 18.47, -24.80 and -19.83 mV, respectively (Fig. 2E). The nanomosc presented a putative better stability in relation to the other two nanoemulsions that presented values closer to zero. At 25 °C (Fig. 2F) the respective values for nanomax, nanomosc and nanopepo were -18.50 , -24.77 and -26.97 mV, showing that nanomosc and nanopepo presented a better physical stability in relation to nanomax ($p < 0.05$). On the other hand, nanopepo, nanomosc and nanomax showed initial pH values of 5.45, 5.37 and 5.48, respectively at 4 °C and 5.59, 5.35 and 5.52, respectively at 25 °C (Fig. 2G, H).

Furthermore, the TEM images of the PSO nanoemulsions showed that the lipid droplets displayed a spherical appearance (Fig. 3), with droplet diameter of approximately 200 nm, thereby confirming the evaluation measured by Zetasizer.

3.5. Physical stability

3.5.1. Stability during long-term storage under different temperatures

During storage, the nanomax and nanopepo emulsions showed a similar behavior at 4 °C. There was no change observed in the droplet diameter of nanomax, and nanopepo, however, an increase in the drop size of nanomosc was found drastically after 120 days of storage (107.20 and 67.20 nm, respectively) (Fig. 2A). Nanomosc showed fluctuations in droplet diameter after 60 days (from 121.00 nm in day 60 to 146.10 and 164.40 in days 90 and 120). With respect to storage at 25 °C, nanomax and nanopepo had a significantly increased ($p < 0.05$) in the average diameter of the droplets after the 15 days (163.30 and 140.50 nm, respectively, Fig. 2B). The size of nanomosc remained stable until its significantly increased at 120 days of storage (111.50 nm, $p < 0.05$). It was observed that all nanoemulsions contained a greater droplet size after storage for 120 days regardless of temperature. Nanomax and nanopepo can be considered more stable at a temperature of 4 °C, since they did not show an increase in their diameter during 90 days of storage. On the other hand, nanomosc presented a similar behavior, but at a temperature of 25 °C. The effect of temperature on nanoemulsions, specifically nanomax and nanopepo may have led to an increase in the average size of the droplets, which can be explained by the phenomena called coalescence and Ostwald's ripening that lead to an increase in the average size of droplet (Karthik, Ezhilarasi, & Anandharamakrishnan, 2017).

However, the overall change in droplet size during storage at both temperatures was relatively small for nanomax, nanopepo and nanomosc, and the diameter did not exceed 200 nm, regardless of the sample, indicating that they were relatively stable to the growth of droplets and suggesting that breakdown did not occur.

Over the storage at 25 °C, nanomax showed no significant change in PDI, but at the temperature of 4 °C there was a significant increase in the PDI after the second week of storage (from 0.294 to 0.370, $p < 0.05$). Despite these changes, the PDI remained lower compared to the storage at 25 °C. Nanopepo PDI remained unchanged during storage at 4 °C, while at 25 °C it increased in relation to the first evaluation after 60 days (from 0.198 to 0.296, $p < 0.05$). Finally, nanomosc showed a smaller increase in the PDI at 4 °C since the second month, whereas at 25 °C the PDI increased after 7 days (from 0.349 to 0.426, $p < 0.05$). At 120 days of storage at 4 °C, nanoemulsions presented a lower PDI (0.333, 0.315 and 0.366 for nanomax, nanopepo and nanomosc, respectively), and remained more homogeneous than those stored at 25 °C (PDI of 0.477, 0.428 and 0.452 for the same samples, respectively). As described above, nanopepo and nanomosc emulsions stored at 25 °C showed an increase in size at the beginning of storage that can induce the formation of polydisperse systems. The effect of temperature on Ostwald's

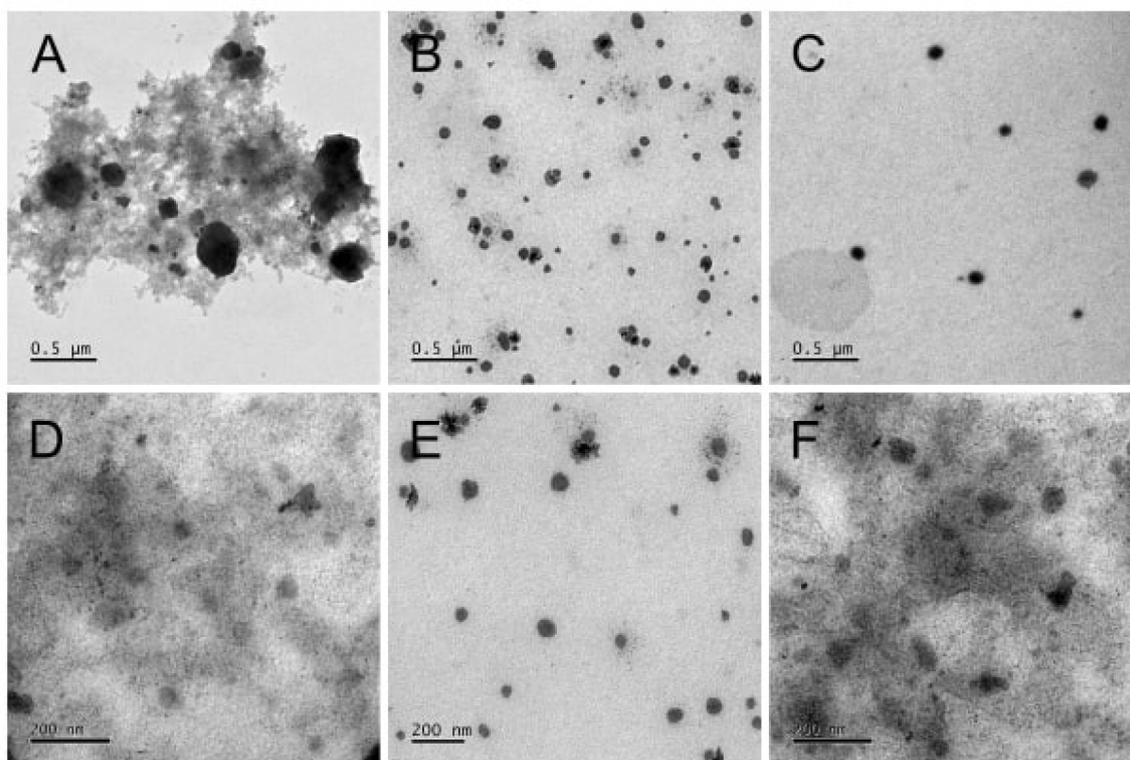


Fig. 3. Transmission electron microscopy images of seed oil nanoemulsions of *Cucurbita maxima* (A, D), *C. moschata* (B, E) and *C. pepo* (C, F). Images were captured at 5000 (A, B & C) and 15,000 magnifications and (D, E & F).

ripening, resulting in an increasing of droplet size and PDI of the nanoemulsions. Ostwald's ripening occurs as a result of the diffusion of oil molecules from smaller to larger droplets through the intermediate fluid (McClements & Rao, 2011) and it may be the reason for the slight increase in particle size during the storage.

The ζ -potential is the indicator of the electrical charge on the surface particle and provides information about repulsive forces between nanoparticles; therefore, it is the main marker for predicting the physical stability of colloidal systems (McClements & Rao, 2011). All emulsions showed negative values from ζ -potential in the range of -18 to -31 , far from zero (Fig. 2). According to Fig. 2E and F, it was observed that the ζ -potential of nanoemulsion at 4 and 25 °C was moving away from zero when increasing the storage days, acquiring more stability, however, the ζ -potential values were approached to -30 mV without overlapping this value. In this case, droplets of nanoemulsions with zeta potentials less than ± 30 mV provide only good short-term stability, with tendency for particles clump together (Mishra, Shaal, Müller, & Keck, 2009).

According to Mun, Decker, and McClements (2005), in principle, non-ionic surfactants such as Solutol® HS 15, used in the present study, should not charge the droplets. However, in practice, due to the preferential adsorption of hydroxyl ions from the aqueous phase or due to the presence of remaining ionic impurities, such as free FA in the surfactant or oily phases, the oil droplets can have a negative charge (Yi et al., 2019). The different chemical composition of *Cucurbita* seed oils may have influenced this difference, mainly in the ζ -potential. Despite being of the same genus, PSO presented different free FA content, related to their acidity index, which can generate variations in their behavior as variations in the zeta potential. For example, nanomax showed load values closer to zero compared to other emulsions (-22.40 and -26.00 mV at 4 °C and 25 °C, respectively for 120 days), which may be related to the fact that the *C. maxima* PSO has a lower acidity index (0.15 mg KOH/g) compared to other oils.

All PSO nanoemulsions had pH values of 5 which decreased significantly ($p < 0.05$) with the storage time at both temperatures reaching

values of 4 (Fig. 2G, H). This decreasing in pH may be related to the tendency for the fatty acid esters present in the oil to undergo hydrolysis or oxidation, releasing free fatty acids that are responsible for reducing the pH during storage (Bernardi et al., 2011). Al-Okbi et al. (2017) reported pH values in the range of 4.96 to 5.2 in several formulations of nanoemulsions with PSO (*C. pepo*), similar to those obtained in this study.

In addition to assessing the influence of prolonged storage at different temperatures on the physical stability of nanoemulsions, they were subjected to the centrifugation process at different speeds in the same evaluation days (Table 2), in order to accelerate their destabilization process. Nanoemulsions, regardless of PSO and storage temperature, did not show phase separation after centrifugation, which may be due to the fact that the droplets remain relatively small throughout storage ($DH < 200$ nm) and the zeta potential remain far from zero. There was no creaming observed in nanomax throughout the storage at any temperature. However, nanopepo formed creaming from 60 days at 4 °C and its creaming formation was evident since the 30th day at 25 °C. The results suggested that higher storage temperature may have led to a faster creaming formation. For nanomosc, creaming was observed from the 90th day when stored at 4 °C. Whereas at 25 °C the process was occurred within 45 days. This effect can be attributed to the droplet coalescence resulting from the dehydration of the main groups of the nonionic surfactant at 25 °C (Saber, Fang, & McClements, 2013).

Edible liquid oils, such as PSO, generally have lower densities than liquid water, therefore creaming is more prevalent in conventional oil-in-water emulsions as noted in this study. The upward movement of particles due to gravity increases with increasing particle size in the gravitational forces, but decreases with increasing particle size in Brownian motion (McClements & Rao, 2011). Consequently, the movement of particles is dominated by gravity for relatively large particles in emulsions, as we can see in the results obtained after the centrifugation process.

Table 2

Centrifugation test of PSO-based nanoemulsions during 120 days-long storage at 4 °C and 25 °C.

Specie	Temperature	Centrifugation speed (rpm)	Storage time (days)								
			0	7	15	30	45	60	90	120	
Nanomax	4 °C	2500	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3500	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		7000	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	25 °C	2500	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		3500	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		7000	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Nanopepo	4 °C	2500	N	N	N	N	N	N	C	C	
		3500	N	N	N	N	N	C	C	C	
		7000	N	N	N	N	N	C	C	C	
	25 °C	2500	N	N	N	C	C	C	C	C	
		3500	N	N	N	C	C	C	C	C	
		7000	N	N	N	C	C	C	C	C	
Nanomosc	4 °C	2500	N	N	N	N	N	N	C	C	
		3500	N	N	N	N	N	N	C	C	
		7000	N	N	N	N	N	N	C	C	
	25 °C	2500	N	N	N	N	N	C	C	C	
		3500	N	N	N	N	C	C	C	C	
		7000	N	N	N	N	C	C	C	C	

(C) Cream formation; (N) Normal; Nanomax, Nanopepo and Nanomosc refer to PSO-based nanoemulsions from *C. maxima*, *C. pepo* and *C. moschata* seed oils, respectively.

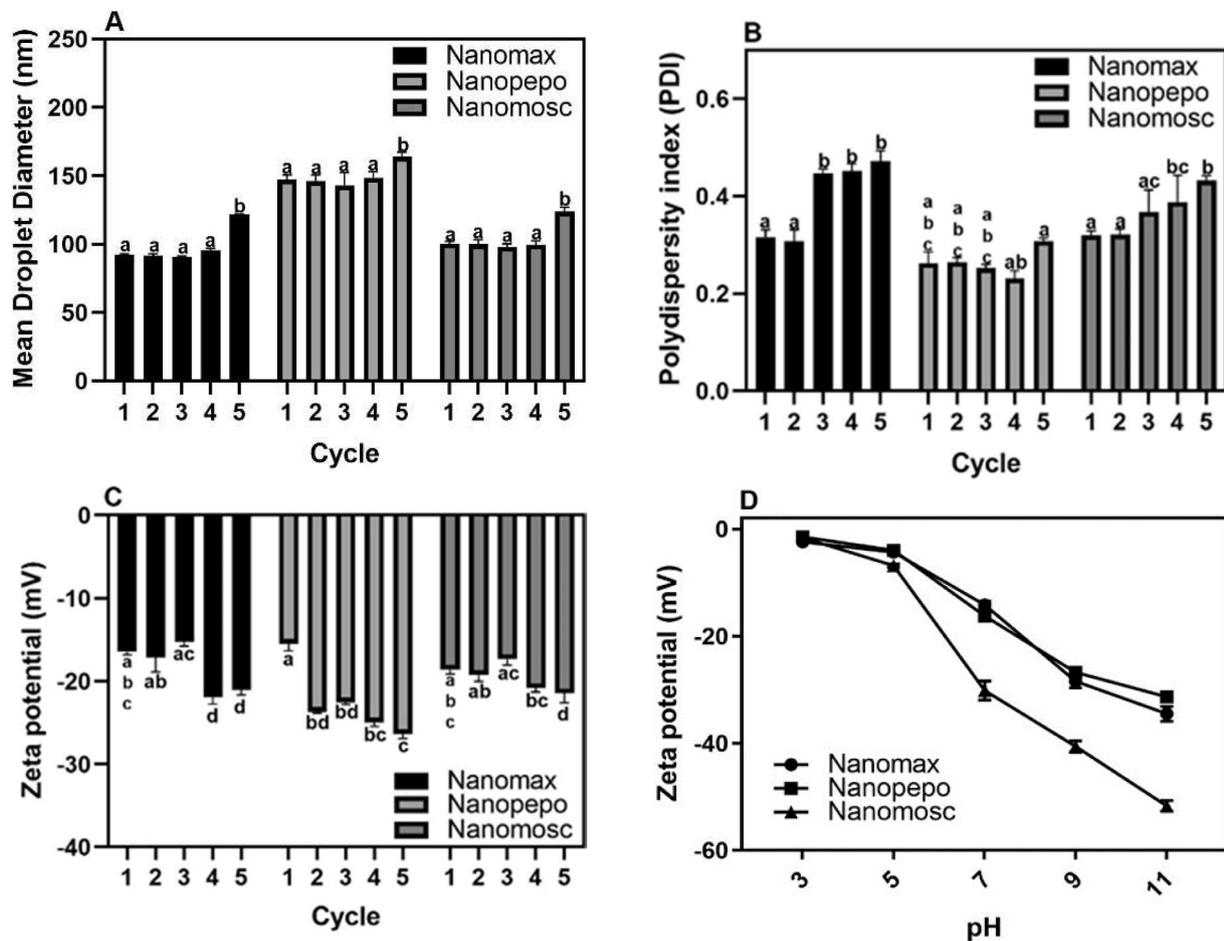


Fig. 4. Impact of temperature cycles on (A) droplet size (diameter), (B) polydispersity index, and (C) surface charge of nanoemulsion droplets. Fig. 4D shows the effect of pH on the zeta potential of nanoemulsions made with oil from three species of pumpkin seed. Nanomax, Nanopepo and Nanomosc refer to the PSO-based nanoemulsions with *Cucurbita maxima*, *C. pepo* and *C. moschata* seed oils, respectively. Different lowercase letters in a row indicate significant differences (Tukey post hoc test, $p < 0.05$) among the cycles within each nanoemulsion sample.

3.5.2. Stability of PSO nanoemulsions under heating-cooling cycles

Many food emulsions undergo some kinds of thermal processing during manufacture or use, for example, sterilization, pasteurization, or cooking. Therefore, the ability of food emulsions to remain stable during these types of stress is very important from a practical point of view. In the first cycle of heating and cooling, nanomax, nanopepo and nanomosc showed droplet sizes of 92.14, 147.60 and 100.40 nm, respectively. Regardless of the PSO, nanoemulsions kept their size stable until the fourth cycle of temperature variation (Fig. 4A), since a slight significant increase ($p < 0.05$) in the droplet diameter was observed in the last cycle (121.9, 164.3, 123.9 nm for nanomax, nanopepo and nanomosc, respectively). This may be due to the thermal dehydration of the main groups of the hydrophilic surfactant at the oil-water interface, which leads to a deformation and aggregation of the colloidal structure (Dey, Banerjee, Chatterjee, & Dhar, 2018). With regards to PDI (Fig. 4B), an increase in polydispersion was observed with the increase in the number of cycles for nanomax and nanomosc. Specifically, nanomax showed a significantly increase of PDI after the third cycle (from 0.315 to 0.447, $p < 0.05$), while the PDI of nanomosc changed after the fourth cycle (from 0.319 to 0.388, $p < 0.05$). For nanopepo, the PDI variation was not statistical difference ($p > 0.05$) among the cycles.

The ζ -potential is another important indicator to assess the stability of nanoemulsions when subjected to thermal stress. The ζ -potential of nanoemulsions tended to become more negative (Fig. 4C). The ζ -potential was opposite to the results of droplet size and PDI, mainly in nanomax and nanomosc, as the stability of nanoemulsion increased with the number of cycles. The ζ -potential of nanoemulsions tended to become more distant from zero, increasing particle-particle repulsion, which generates more stability to the system, reaching values in the last cycle of -26.37 ; -21.47 and -21.07 mV for nanomax, nanomosc and nanopepo, respectively.

3.5.3. Stability under different pH

The pH of the aqueous phase of the emulsions can vary and influence the physical stability of the nanoemulsions, which can affect their commercial application in foods such as soft drinks or beverages. There was a direct influence of pH on the ζ -potential of the particles in the colloidal system (Fig. 4D). In an acidic medium (pH = 1.0–2.0), nanoemulsions tended to have a ζ -potential value close to zero. As the pH of the medium increased, the values of ζ -potential also increased in the negative direction.

There was a significant difference ($p < 0.05$) in the ζ -potential of the nanoemulsion with a change in pH from 3.0 to 11. Whereas nanoemulsions displayed a slightly net negative charge at pH 3.0, with zeta potential values of -2.4 , -1.4 and -1.6 mV for nanomax, nanopepo, and nanomosc, at pH 11 noticeably more negative values of -34.5 , -31.3 , -51.7 mV were found for the respective samples. The charges are inclined to be closer to zero at lower pH, suggesting that the nanoemulsions were more unstable under acidic conditions when compared to those at pH 11. The reduction in the net negative charge in low pH values decreases the electrostatic repulsion between the droplets leading to their aggregation (Sari et al., 2015).

4. Conclusions

Our findings shown that PSO from these three species produced in Brazil have good quality and are a source of tocopherols, carotenoids and PUFA, especially linoleic acid, and MUFA like oleic acid, compounds that are beneficial for health. The pumpkin species affects the content of the bioactive compounds present in PSO as well as their oxidative stability and antioxidant capacity. The use of *C. maxima* PSO is suggested to obtain a product with a high content of total tocopherols and high oxidative stability. To produce oils rich in PUFA and carotenoids mainly lutein, the use of *C. pepo* seeds is recommended, while a higher β -carotene content can be attained with *C. moschata* PSO.

The nanoemulsion formulations produced by low-energy method

were physically stable regardless of the PSO species and can may represent new opportunities for the utilization of PSO in several food products. The higher temperature (25 °C) generated a premature increase of droplets at nanomax and nanopepo, while nanomosc was more stable at this temperature. An opposite behavior was observed at the refrigeration temperature, where nanopepo and nanomax were more stable, while nanomosc showed an increase in particle size before the time of their counterparts. Both temperatures generated an increase in the ζ -potential and a decrease in the pH with the increase in the days of storage of all the nanoemulsions. Specifically, nanomax was the most stable to the centrifugation process during storage. The pH influenced the particle loads of the nanoemulsions, when pH of the medium increased, the values of ζ -potential became more negative, thus being more stable in alkaline pH. The thermal stress generated an increase in the zeta potential of the nanoemulsions as the heating-cooling cycles increased, providing more stability to the system with respect to this parameter. In addition, all nanoemulsions had a size in their particle size stable until the penultimate cycle, and can be considered stable to this type of stress, especially nanopepo that showed a stable PDI until the last cycle.

PSO consumption has been associated to health outcomes and its optimized and stable nanoemulsion formulation may provide an alternative for the development of PSO-based nutraceutical and cosmeceutical products and functional ingredients, with important applications in the food and pharmaceutical industries (McClements & Xiao, 2014).

CRediT authorship contribution statement

Maria Isabel Ordoñez Lozada: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Iriani Rodrigues Maldonado:** Supervision, Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing - review & editing. **Daniele Bobrowski Rodrigues:** Supervision, Conceptualization, Methodology, Writing - review & editing. **Débora Silva Santos:** Methodology, Investigation. **Beatriz Alejandra Ortega Sanchez:** Investigation. **Paulo Eduardo Narcizo de Souza:** Methodology, Investigation. **João Paulo Longo:** Conceptualization, Resources. **Geovani Bernardo Amaro:** Conceptualization, Resources. **Lívia de Lacerda de Oliveira:** Supervision, Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Validation, Writing - original draft, Writing - review & editing.

Declaration of Competing Interest

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

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128512>.

References

- Abd-Elnoor, A. V. (2019). Hypoglycemic and hypolipidemic effects of pumpkin seeds powder and oil on Alloxan-induced diabetic in rats. *Egyptian Journal of Food Science*, 47(2), 255–269. <https://doi.org/10.21608/EJFS.2019.19348.1027>.
- Akin, G., Arslan, F. N., Karuk Elmas, S. N., & Yilmaz, I. (2018). Cold pressed pumpkin seed (*Cucurbita pepo* L.) oils from the central Anatolia region of Turkey: Characterization of phytochemicals, squalene, tocopherols, phenolic acids, carotenoids and fatty acid bioactive compounds. *International Institute of Fats and Oils*, 69(1), e232. <https://doi.org/10.3989/gya.0668171>.
- Ali, M. A., Nargis, A., Othman, N. H., Noor, A. F., Sadik, G., & Hossen, J. (2017). Oxidation stability and compositional characteristics of oils from microwave roasted pumpkin seeds during thermal oxidation. *International Journal of Food Properties*, 20(11), 2569–2580. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1244544>.
- Al-Okbi, S. Y., Mohamed, D. A., Hamed, T.-S., Kassem, A. A., El-Alim, S. H. A., & Mostafa, D. M. (2017). Enhanced prevention of progression of non alcoholic fatty

- liver to steatohepatitis by incorporating pumpkin seed oil in nanoemulsions. *Journal of Molecular Liquids*, 225, 822–832. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.10.138>.
- AOCS. American Oil Chemists' Society. (1988). Official Methods and Recommended Practices of the AOCS, Method Cc 13d-55. Chlorophyll pigments in refined and bleached oils. AOCS Press, Champaign.
- AOCS. American Oil Chemists' Society. (1997). Official Methods and Recommended Practices of the AOCS, (5th ed). AOCS Press, Champaign.
- Bali, V., Ali, M., & Ali, J. (2010). Study of surfactant combinations and development of a novel nanoemulsion for minimizing variations in bioavailability of ezetimibe. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 76(2), 410–420. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.11.021>.
- Bardaa, S., Ben Halima, N., Aloui, F., Ben Mansour, R., Jabeur, H., Bouaziz, M., & Sahnoun, Z. (2016). Oil from pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seeds: Evaluation of its functional properties on wound healing in rats. *Lipids Health Dis*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12944-016-0237-0>.
- Bernardi, D. S., Pereira, T. A., Maciel, N. R., Bortoloto, J., Viera, G. S., Oliveira, G. C., & Rocha-Filho, P. A. (2011). Formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil: *In vitro* and *in vivo* assessments. *Journal Nanobiotechnology*, 9(1), 44. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-9-44>.
- Borello, E., & Domenici, V. (2019). Determination of pigments in virgin and extra-virgin olive oils: A comparison between two near UV-Vis spectroscopic techniques. *Foods*, 8(1), 18. <https://doi.org/10.3390/foods8010018>.
- Can-Cauchic, C. A., Sauri-Duch, E., Moo-Huchin, V. M., Betancur-Ancona, D., & Cuevas-Glory, L. F. (2019). Effect of extraction method and specie on the content of bioactive compounds and antioxidant activity of pumpkin oil from Yucatan, Mexico. *Food Chemistry*, 285, 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.153>.
- Cao, J., Jiang, X., Chen, Q., Zhang, H., Sun, H., Zhang, W.-M., & Li, C. (2020). Oxidative stabilities of olive and camellia oils: Possible mechanism of aldehydes formation in oleic acid triglyceride at high temperature. *LWT*, 118, 108858. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108858>.
- Christie, W. W. (1989). *Gas chromatography and lipids: A practical guide*. Great Britain: Oily.
- Codex Alimentarius International Food Standards (1999). SECTION 2. Codex Standards for Fats and Oils from Vegetable Sources. <http://www.fao.org/3/y2774e/y2774e04.htm/> Accessed 20 April 2020.
- Cuco, R. P., Massa, T. B., Postae, N., Cardozo-Filho, L., & Da Silva, C. (2019). Oil extraction from a structured bed of pumpkin seeds and peel using compressed propane as solvent. *The Journal of Supercritical Fluids*, 152, Article 104568. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.104568>.
- Decker, E. A. (2003). Natural antioxidants in foods. *Encyclopedia of Physical Science and Technology*, 3, 335–342. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227410-5/00472-5>.
- Dey, T. K., Banerjee, P., Chatterjee, R., & Dhar, P. (2018). Designing of ω -3 PUFA enriched biocompatible nanoemulsion with sesame protein isolate as a natural surfactant: Focus on enhanced shelf-life stability and biocompatibility. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 538, 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.10.066>.
- El-Adawy, T. A., & Taha, K. M. (2001). Characteristics and composition of different seed oils and flours. *Food Chemistry*, 74(1), 47–54. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00337-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00337-X).
- Ferreira-Nunes, R., Silva, S. M. M. D., Souza, P. E. N. D., Magalhães, P. D. O., Cunha-Filho, M., Gratiéri, T., & Gelfuso, G. M. (2018). Incorporation of *Eugenia dysenterica* extract in microemulsions preserves stability, antioxidant effect and provides enhanced cutaneous permeation. *Journal of Molecular Liquids*, 265, 408–415. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.06.023>.
- Ghosh, V., Mukherjee, A., & Chandrasekaran, N. (2014). Eugenol-loaded antimicrobial nanoemulsion preserves fruit juice against microbial spoilage. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 114, 392–397. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.10.034>.
- Gossell-Williams, M., Davis, A., & O'Connor, N. (2006). Inhibition of testosterone-induced hyperplasia of the prostate of sprague-dawley rats by pumpkin seed oil. *Journal of Medicinal Food*, 9(2), 284–286. <https://doi.org/10.1089/jmf.2006.9.284>.
- Hadorn, H., & K. (1974). Zürcher, zur bestimmung der oxydationsstabilität von ölen und fetten, Deutsche Lebensmittel Rundschau, 70, 57–65.
- Jeznach, M., Danilcenko, H., Jarién, E., Kulaitienė, J., & Černiauskiene, J. (2012). Accumulation of antioxidative vitamins and minerals in seeds of oil pumpkin (*Cucurbita pepo* L. var. *stryiaca*) cultivars. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 10(1), 245–247.
- Jiao, Jiao, Li, Zhu-Gang, Gai, Qing-Yan, Li, Xiao-Juan, Wei, Fu-Yao, Fu, Yu-Jie, & Ma, Wei (2014). Microwave-assisted aqueous enzymatic extraction of oil from pumpkin seeds and evaluation of its physicochemical properties, fatty acid compositions and antioxidant activities. *Food Chemistry*, 147, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.079>.
- Karthik, P., Ezhilarasi, P. N., & Anandharamakrishnan, C. (2017). Challenges associated in stability of food grade nanoemulsions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(7), 1435–1450. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1006767>.
- Komaiko, Jennifer S., & McClements, David Julian (2016). Formation of food-grade nanoemulsions using low-energy preparation methods: A review of available methods: formation of food-grade nanoemulsions.... *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(2), 331–352. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12189>.
- McClements, David Julian (2007). Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(7), 611–649. <https://doi.org/10.1080/10408390701289292>.
- McClements, David Julian, & Rao, Jiajia (2011). Food-grade nanoemulsions: Formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(4), 285–330. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.559558>.
- McClements, David Julian, & Xiao, Hang (2014). Excipient foods: Designing food matrices that improve the oral bioavailability of pharmaceuticals and nutraceuticals. *Food Function*, 5(7), 1320–1333. <https://doi.org/10.1039/C4FO00100A>.
- Mishra, Prabhat R., Shaal, Loaye Al, Müller, Rainer H., & Keck, Cornelia M. (2009). Production and characterization of Hesperetin nanosuspensions for dermal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 371(1-2), 182–189. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.12.030>.
- Monge-Fuentes, Victoria, Muehlmann, Luis Alexandre, Longo, João Paulo Figueiró, Silva, Jaqueline Rodrigues, Fascineli, Maria Luiza, de Souza, Paulo, Faria, Fernando, Degtarev, Igor Anatolievich, Rodriguez, Anselmo, Carneiro, Fabiana Pirani, Lucci, Carolina Madeira, Escobar, Patricia, Amorim, Rivadávio Fernandes Batista, & Azevedo, Ricardo Bentes (2017). Photodynamic therapy mediated by acai oil (*Euterpe oleracea* Martius) in nanoemulsion: A potential treatment for melanoma. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 166, 301–310. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.12.002>.
- Morales, D., Gutierrez, J. M., Garcia-Celma, M. J., & Solans, Y. C. A. (2003). Study of the relation between bicontinuous microemulsions and oil/water nanoemulsion formation. *Langmuir*, 19(18), 7196–7200. <https://doi.org/10.1021/la0300737>.
- Morrison, M.C., Mulder, P., Stavro, P.M., Suárez, M., Arola-Arnal, A., Van Duyvenvoorde, W.,... Kleemann, R. (2015). Replacement of dietary saturated fat by PUFA-rich pumpkin seed oil attenuates non-alcoholic fatty liver disease and atherosclerosis development, with additional health effects of virgin over refined oil. PLOS ONE, 10(9), e0139196. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139196>.
- Mun, Saehun, Decker, Eric A., & Julian McClements, D. (2005). Influence of droplet characteristics on the formation of oil-in-water emulsions stabilized by surfactant–chitosan layers. *Langmuir*, 21(14), 6228–6234. <https://doi.org/10.1021/la050502w>.
- European Journal of Lipid Science and Technology, 102, 607-611. [https://doi.org/10.1002/1438-9312\(200010\)102:10<607::AID-EJLT607>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/1438-9312(200010)102:10<607::AID-EJLT607>3.0.CO;2-E).
- Naik, Azza, Meda, V., & Lele, S. S. (2014). Application of EPR Spectroscopy and DSC for Oxidative Stability Studies of *Nigella sativa* and *Lepidium sativum* Seed Oil. *J Am Oil Chem Soc*, 91(6), 935–941. <https://doi.org/10.1007/s11746-014-2430-5>.
- Nederal, Sandra, Petrović, Marinko, Vincek, Dragutin, Puček, Dragutin, Škevin, Dubravka, Kraljić, Klara, & Obranović, Marko (2014). Variance of quality parameters and fatty acid composition in pumpkin seed oil during three crop seasons. *Industrial Crops and Products*, 60, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.044>.
- Nederal, Sandra, Škevin, Dubravka, Kraljić, Klara, Obranović, Marko, Papeša, Suncica, & Bataljalk, Antonija (2012). Chemical composition and oxidative stability of roasted and cold pressed pumpkin seed oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89(9), 1763–1770. <https://doi.org/10.1007/s11746-012-2076-0>.
- Nishimura, Mie, Ohkawara, Tatsuya, Sato, Hiroji, Takeda, Hiroshi, & Nishihira, Jun (2014). Pumpkin seed oil extracted from *Cucurbita maxima* improves urinary disorder in human overactive bladder. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 4(1), 72–74. <https://doi.org/10.4103/2225-4110.124355>.
- Ou, Boxin, Hampsch-Woodill, Maureen, & Prior, Ronald L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 49(10), 4619–4626. <https://doi.org/10.1021/jf010586o>.
- Pegoraro, Nathali S., Barbieri, Allanna V., Camponogara, Camila, Mattiazzi, Juliane, Brum, Evelynne S., Marchiori, Marila C. L., Oliveira, Sara M., & Cruz, Letícia (2017). Nanoencapsulation of coenzyme Q10 and vitamin E acetate protects against UVB radiation-induced skin injury in mice. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 150, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.11.013>.
- Potočnik, Tanja, Rak Cizej, Magda, & Košir, Iztok Jože (2018). Influence of seed roasting on pumpkin seed oil tocopherols, phenolics and antiradical activity. *Journal of Food Composition and Analysis*, 69, 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.01.020>.
- Pulido, R., Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing antioxidant power assay. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48(8), 3396–3402. <https://doi.org/10.1021/jf9913458>.
- Rabrenović, Biljana B., Dimić, Etelka B., Novaković, Miroslav M., Tešević, Vele V., & Basić, Zorica N. (2014). The most important bioactive components of cold pressed oil from different pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seeds. *LWT – Food Science and Technology*, 55(2), 521–527. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.10.019>.
- Rezig, L., Chouaibi, M., Msaada, K., & Hamdi, S. (2012). Chemical composition and profile characterization of pumpkin (*Cucurbita maxima*) seed oil. *Industrial Crops and Products*, 37(1), 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.12.004>.
- Saberli, Amir Hossein, Fang, Yuan, & McClements, David Julian (2013). Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: Factors affecting particle size using spontaneous emulsification. *Journal of Colloid and Interface Science*, 391, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.08.069>.
- Sari, T. P., Mann, Bimlesh, Kumar, Rajesh, Singh, R. R. B., Sharma, Rajan, Bhardwaj, Minaxi, & Athira, S. (2015). Preparation and characterization of nanoemulsion encapsulating curcumin. *Food Hydrocolloids*, 43, 540–546. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.07.011>.
- Shahidi (Ed.), Bailey's industrial oil and fat products. Hoboken, NJ: Wiley Interscience.
- Siano, F., Straccia, M. C., Paolucci, M., Fasulo, G., Boscaino, F., & Volpe, M. G. (2016). Physico-chemical properties and fatty acid composition of pomegranate, cherry and pumpkin seed oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 1730–1735. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7279>.
- Stevenson, D., Eller, F. J., Wang, L., Jane, J.-L., & Wang, T. (2007). Oil and tocopherol content and composition of pumpkin seed oil in 12 Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(10), 4005–4013. <https://doi.org/10.1021/jf0706979>.

- Subagio, A., & Morita, N. (2001). Instability of carotenoids is a reason for their promotion on lipid oxidation. *Food Research International*, 34(2-3), 183–188. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00150-2](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00150-2).
- Subagio, Achmad, Shigemura, Yukiyo, & Morita, Naofumi (2001). Color stability and lipid oxidation of a dried food model to which carotenoids have been added. *FSTR*, 7 (3), 231–234. <https://doi.org/10.3136/fstr.7.231>.
- Tang, Siah Ying, Manickam, Sivakumar, Wei, Tan Khang, & Nashiru, Billa (2012). Formulation development and optimization of a novel Cremophore EL-based nanoemulsion using ultrasound cavitation. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(2), 330–345. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.07.001>.
- Teo, Siew Yong, Lee, Siang Yin, Ong, Huey Lin, Ong, Ching Lin, Gan, Seng Neon, Rathbone, Michael J., & Coombes, Allan G. A. (2015). Evaluation of biosourced alkyd nanoemulsions as drug carriers. *Journal of Nanomaterials*, 2015, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2015/537598>.
- Traber, Maret G., & Atkinson, Jeffrey (2007). Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(1), 4–15. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.024>.
- Yi, Jianhua, Ning, Jianqin, Zhu, Zhenbao, Cui, Leqi, Decker, Eric A., & McClements, David Julian (2019). Impact of interfacial composition on co-oxidation of lipids and proteins in oil-in-water emulsions: Competitive displacement of casein by surfactants. *Food Hydrocolloids*, 87, 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.07.025>.