UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

GRAZIELA VEIGA DE LARA GOMES

**Produção por método da temperatura de inversão de fases,
estudo de estabilidade físico-química, digestibilidade *in vitro* e
citotoxicidade de nanopartículas lipídicas sólidas
encapsulando beta-caroteno**

Pirassununga
2015

Graziela Veiga de Lara Gomes

Produção por método da temperatura de inversão de fases, estudo
de estabilidade físico-química, digestibilidade *in vitro* e
citotoxicidade de nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando
beta-caroteno

Tese apresentada à Faculdade de
Zootecnia e Engenharia de Alimentos
da Universidade de São Paulo como
parte dos pré-requisitos para a
obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Área de concentração: Ciências da
Engenharia de Alimentos

Orientadora: Prof^a Dr^a Samantha
Cristina de Pinho

Pirassununga
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo

G633p Gomes, Graziela Veiga de Lara
Produção por método da temperatura de inversão de fases, estudo de estabilidade físico-química, digestibilidade *in vitro* e citotoxicidade de nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando beta-caroteno / Graziela Veiga de Lara Gomes. -- Pirassununga, 2015.
117 f.
Tese (Doutorado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia de Alimentos.
Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos.
Orientadora: Profa. Dra. Samantha Cristina de Pinho.

1. Temperatura de inversão de fase 2. Encapsulação 3. bioativo 4. digestibilidade 5. citotoxicidade I. Título.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar forças, me iluminar e me guiar durante todo esse percurso, e por permitir que eu chegasse até aqui.

À Prof^a Samantha Pinho, pela orientação, compreensão, ajuda, paciência, amizade e exemplo profissional. Obrigada pelo tempo disponibilizado a este trabalho e por ter me ensinado tudo que estava ao seu alcance.

Ao meu noivo Rafael Silva, que mesmo longe se fez presente em cada situação, me dando força e ajudando em tudo o que foi necessário. Obrigada pelas horas de dedicação, pelo carinho, amor, compreensão e amizade.

Aos meus pais, Sandra e Orlando, por terem me ensinado valores e princípios, que só o amor pode fazer. Vocês são essenciais na minha vida.

Aos meus irmãos, Felipe e Marina, pela amizade, companheirismo e momentos de alegria. Há momentos que ficarão eternizados em nossos corações.

Ao Prof^o Antônio Vicente, pela orientação, e por ter aberto as portas de seu laboratório e ter me recebido com tanta alegria e dedicação. Sou muito grata por tudo que vivi e aprendi. Seus ensinamentos foram de extrema importância.

À Ana Mônica Quinta Barbosa Bittante pelas análises de calorimetria diferencial de varredura.

Ao Marcelo Thomazine pela paciência e por estar sempre apto a ajudar.

À Prof^a Rose Naal por disponibilizar o uso do espectrofluorímetro em seu laboratório.

Ao Prof^o Heidge Fukumasu por disponibilizar seu laboratório para as análises de cultivo celular. Em especial à técnica Arina Rochetti por toda paciência e explicações ao longo dos experimentos realizados.

A todos do laboratório de Coloides, pelo companheirismo, amizade e ajuda ao longo de todos esses anos. Todos vocês ficarão para sempre em minhas lembranças. De maneira especial gostaria de agradecer à Taise Toniazzo pela amizade durante todos

esses anos; e aos alunos de graduação, Mirella Sola, Luiz Fernando, Camila Garcia e Camila Cazado, pela ajuda nas análises de laboratório, sem vocês muitos resultados não teriam sido possíveis.

A todos os amigos e colegas da pós-graduação da USP/FZEA pelos momentos de alegria e companheirismos vivenciados ao longo deste período.

Aos companheiros do LIP, que me acolheram de maneira especial em seu laboratório e me transmitiram conhecimentos muito importantes. Em especial à Ana Cristina pelo suporte no uso do sistema digestivo *in vitro* dinâmico.

A todos os queridos que conheci em Portugal, que fizeram da minha estadia por lá muito mais agradável e feliz. Muitos de vocês foram como uma família para mim.

Aos meus avós, tios, tias e primos, por tornarem tão especiais cada reunião em família. Amo a cada um de vocês.

Aos meus queridos amigos, de longe e de perto, de muitos e poucos anos, mas que foram muito importantes em algum momento da minha vida.

A todos, que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho e para o meu crescimento pessoal.

À FAPESP pela concessão da bolsa de estudos no país (Processo 2010/20523-0) e no exterior (Processo 2012/18495-3).

“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)

”Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que a fez tão importante” (Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

Gomes, G. V. L **Produção por método da temperatura de inversão de fases, estudo de estabilidade físico-química, digestibilidade *in vitro* e citotoxicidade de nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando beta-caroteno.** 117 f. Tese (Doutorado). Pirassununga: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, 2015.

Nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) são sistemas coloidais nanoparticulados muito utilizados para encapsulação de substâncias hidrofóbicas, com o intuito de proteger e aumentar a sua biodisponibilidade. Tais sistemas podem ser produzidos por métodos de baixa energia, como a temperatura de inversão de fase (PIT), a qual é baseada na mudança de solubilidade do tensoativo não iônico polietoxilados com a temperatura. O estudo do comportamento de tais sistemas durante a passagem pelo trato gastrointestinal torna-se interessante, caso deseje-se incorpora-los em matrizes alimentícias. Os modelos *in vitro* dinâmicos têm sido desenvolvidos para simular mais efetivamente os atributos que ocorrem *in vivo*, e dentre eles o mais conhecido é o sistema TIM (TNO *intestinal model*), que simula os principais eventos que ocorrem no lúmen do intestino delgado. Outro parâmetro importante a ser analisado, em nanopartículas passíveis de serem ingeridas, é a citotoxicidade, que pode ser avaliado através do emprego de culturas celulares intestinais e epiteliais. O presente trabalho de doutorado teve como objetivo a utilização de manteiga de cupuaçu e manteiga de murumuru para encapsulação do beta-caroteno em nanopartículas lipídicas sólidas produzidas pelo método PIT, e o estudo de sua citotoxicidade e digestibilidade *in vitro* dinâmica. Os tensoativos utilizados foram o Cremophor RH 40 e o Span 80, e os sistemas foram produzidos na presença e na ausência de alfa-tocoferol. De maneira geral pode-se dizer que as nanopartículas apresentaram diâmetro médio ao redor de 35 nm com polidispersidade 0,2 e permaneceram estáveis por um período de 4 meses. Os sistemas produzidos com manteiga de murumuru preservaram melhor o beta-caroteno encapsulado e o alfa-tocoferol agiu como um antioxidante na preservação do bioativo. As nanopartículas apresentaram estabilidade física frente às diferentes condições de stress, exceto quando foram expostas em concentrações salinas muito altas e pH básico. No que diz respeito à digestibilidade, as nanopartículas permaneceram estáveis no estômago e começaram a desestabilizar no duodeno; a biodisponibilidade total do beta-caroteno foi de 50 e 49% para respectivamente as partículas de manteiga de murumuru e manteiga de cupuaçu; a lipólise foi de 51% para as nanopartículas de manteiga de cupuaçu e de 49,8% para as nanopartícula de murumuru. Em relação aos estudos em linhagem de células *in vitro* e a avaliação da toxicidade, pode-se dizer que as linhagens de HEPG-2 apresentaram maior viabilidade celular do que as linhagens de CaCo-2 e a morte celular começou a ser mais pronunciada na diluição de 11,38µg/ml para as células de HEPG-2 e na diluição de 5,69 µg/ml para as células de CaCo-2, portanto, caso se deseje aplicá-las em matrizes alimentícias, é aconselhável respeitar essas concentrações. Além do mais, os resultados mostram que as nanopartículas avaliadas tem um potencial muito bom para encapsular compostos bioativos lipossolúveis e se mostraram um bom veículo para serem empregadas em alimentos.

Palavras-chave: temperatura de inversão de fase, encapsulação, bioativo, digestibilidade, citotoxicidade.

ABSTRACT

Gomes, G. V. L **Production by phase inversion temperature method, study of physicochemical stability, *in vitro* digestibility and cytotoxicity of beta-carotene load solid lipid nanoparticle.** 117 f. PhD Thesis. Pirassununga: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, 2015.

Solid lipid nanoparticles are colloidal delivery systems used for encapsulation of hydrophobic substances, with the aim to protect and increase bioavailability. Such systems could be produced by low energy methods, like phase inversion temperature (PIT) which is based in the change of solubility nonionic polyethoxylated surfactants with temperature. In order to incorporate these systems in foods, it is important studying their behavior under gastrointestinal tract conditions. The *in vitro* dynamic models had been developed to simulate more effectively the properties that occur *in vivo*, between them the TIM system (TNO *intestinal model*) is one of the most known, which simulates the most important events that occur in the lumen of the small intestine. Other important parameter in nanoparticles that can be ingested is the cytotoxicity that can be evaluated using intestinal and epithelial cell cultures. This doctoral work aimed to use cupuaçu butter and murumuru butter to encapsulate beta-carotene in solid lipid nanoparticles produced by the PIT method, moreover the study of these particles cytotoxicity and digestibility in dynamic *in vitro* systems. The surfactants used were Chemophor RH 40 and Span 80, and the systems were produced in the presence and absence of alpha-tocopherol. Generally one can say that these nanoparticles present average diameter around 35 nm with polydispersity 0.2 and remain stable during 4 months. The systems based with murumuru butter showed better preservation of the beta-carotene encapsulated and alpha-tocopherol acted like an antioxidant in the bioactive preservation. The nanoparticles presented physical stability faced various stress conditions, with the exception of very high saline concentrations and basic pH. Regarding the digestibility, the nanoparticles remain stable in the stomach and start to destabilize in the duodenum; the total bioavailability of beta-carotene were 50 and 49% to the murumuru butter and cupuaçu butter, respectively; the lipolysis were 51% to the nanoparticles based in cupuaçu butter and 49.8% to the murumuru based nanoparticles. Regarding the studies of *in vitro* cellular uptake and toxicity one can say that the HEPG-2 present bigger cellular viability than the Caco-2 and the cellular death begin with dilution of 11,38µg/ml for cells of HEPG-2 and with dilution of 5,69 µg/ml for cells of CaCo-2, so if one desire to apply in food matrices it is advisable to respect these concentrations. Furthermore, the results showed that the tested nanoparticles had a very good potential to encapsulate bioactive liposoluble components and are a good way to be applied in food matrices.

Keywords: phase inversion temperature, encapsulation, bioactive, digestibility, cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: (a) Aumento da formação de vesículas, micelas mistas e micelas; (b) interação com o transporte a base de enterócitos e processos metabólicos; (c) alteração do percurso (veia porta versus sistema linfático intestinal) do transporte do bioativo para a circulação sistêmica (redução do metabolismo de primeira passagem).	4
Figura 2.2: Exemplos de diferentes tipos de partículas que podem ser produzidas para encapsulação de ativos hidrofóbicos.	5
Figura 2.3: Esquema simplificado de uma partícula lipídica sólida.	6
Figura 2.4: (a) Estrutura cristalina perfeita das partículas produzidas com somente um tipo de lipídio sólido; (b) estrutura com imperfeições das partículas produzidas com mais de um tipo de lipídio.	7
Figura 2.5: Diagrama esquemático da dependência da temperatura com a curvatura espontânea das monocamadas de tensoativo polietoxilados e sua influência nas propriedades de uma emulsão	10
Figura 2.6: Diagrama esquemático do mecanismo de geração de nanoemulsões pelo método da temperatura de inversão de fases (método PIT).	12
Figura 2.7: Evolução da condutividade em função da temperatura, a PIZ (zona de inversão de fases) é caracterizada pela abrupta variação da condutividade.	13
Figura 2.8: (a) Mapa de composição e formulação típico para sistemas água/tensoativo não iônico/óleo, mostrando a zona de inversão da emulsão. Diagrama de fase típico para o mesmo sistema, HLD como uma função da composição, (b) para pequenas quantidades de tensoativos, e (c) para grandes quantidades de tensoativo. A fronteira entre os dois comportamentos é aproximadamente definida com 10 % mássico de tensoativo.	14
Figura 2.9: Representação esquemática da digestão lipídica e solubilização do bioativo no intestino delgado.	18
Figura 2.10: Representação esquemática da bioacessibilidade de um componente bioativo. A biodisponibilidade depende de uma variedade de processos que ocorrem no trato gastrointestinal, assim como a solubilização, absorção e metabolismo.	20
Figura 2.11: Diagrama esquemático do modelo <i>in vitro</i> gastro-intestinal, TIM – 1:	24
Figura 4.1: Produção das nanopartículas lipídicas sólidas pelo método PIT. Formação da emulsão através do aquecimento e agitação mecânica da fase lipídica e da	

solução aquosa contendo tensoativo, e posterior submissão a ciclos de resfriamento e aquecimento.....	32
Figura 4.2: Sistema gastro intestinal dinâmico usado nos experimentos de digestão <i>in vitro</i> dinâmica.....	37
Figura 4.3: Representação esquemática da montagem utilizada para a digestibilidade <i>in vitro</i> estática.....	39
Figura 4.4: Esquema de visualização para contagem em câmara de Neubauer .	43
Figura 4.5: Placa de 96 poços utilizada para ensaio de MTT.....	44
Figura 5.1: Estrutura molecular do tensoativo Cremophor RH 40.....	47
Figura 5.2: Evolução da condutividade em função da temperatura para as dispersões de nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com manteiga de murumuru e manteiga de cupuaçu, e suas respectivas temperaturas de transição de fase.....	48
Figura 5.3: Aspecto das dispersões das nanopartículas lipídicas durante os diferentes estágios do método PIT..	49
Figura 5.4: : Comportamento da distribuição do tamanho de partícula das dispersões de nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando beta-caroteno submetidas à temperatura de 35° C em diferentes tempos de amostragem.....	50
Figura 5.5: Comportamento da distribuição do tamanho de partícula das dispersões de nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando beta-caroteno submetidas à temperatura de 55° C em diferentes tempos de amostragem.....	51
Figura 5.6: Comportamento da distribuição do tamanho de partícula das dispersões de nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando beta-caroteno submetidas à temperatura de 75° C em diferentes tempos de amostragem.....	52
Figura 5.7: Comportamento da distribuição do tamanho de partícula das dispersões de nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando beta-caroteno submetidas à temperatura de 95° C em diferentes tempos de amostragem.....	53
Figura 5.8: Comportamento da distribuição do tamanho de partícula das dispersões de nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando beta-caroteno submetidas às diferentes concentrações de sal.....	54
Figura 5.9: Comportamento da distribuição do tamanho de partícula das dispersões de nanopartículas lipídicas encapsulando beta-caroteno sólidas submetidas às diferentes concentrações de sacarose.	55

Figura 5.10: Comportamento da distribuição do tamanho de partícula das dispersões de nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando beta-caroteno submetidas a diferentes condições de pH.....	56
Figura 5.11: Comportamento da distribuição do tamanho de partícula das dispersões de nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando beta-caroteno submetidas às diferentes concentrações de sacarose no dia 5	63
Figura 5.12: Comportamento da distribuição do tamanho de partícula das dispersões de nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando beta-caroteno submetidas às diferentes concentrações de sal no dia 5.....	64
Figura 5.13: Comportamento da distribuição do tamanho de partícula das dispersões de nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando beta-caroteno submetidas a diferentes condições de pH no dia 5.....	65
Figura 5.14: Aspecto visual das dispersões contendo as nanopartículas lipídicas sólidas, encapsulando beta-caroteno produzidas com (a) manteiga de cupuaçu e (b) manteiga de murumuru.....	68
Figura 5.15: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando beta-caroteno, produzidas com (a) manteiga de cupuaçu e (b) manteiga de murumuru.....	68
Figura 5.16: Distribuição de tamanho de partícula ao longo do tempo de armazenamento para as nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando beta-caroteno produzidas com: (a) manteiga de murumuru, na presença de alfa-tocoferol e (b) manteiga de murumuru sem alfa-tocoferol.....	69
Figura 5.17: Distribuição de tamanho de partícula ao longo do tempo de armazenamento para as nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando beta-caroteno produzidas com: (a) manteiga de cupuaçu, na presença de alfa-tocoferol e (b) manteiga de cupuaçu sem alfa-tocoferol.....	69
Figura 5.18: Termogramas obtidos por calorimetria diferencial de varredura das nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando beta-caroteno, produzidas com manteiga de cupuaçu e manteiga de murumuru, com e sem alfa-tocoferol.	71
Figura 5.19: Perfis temporais de degradação do beta-caroteno nas nanopartículas lipídicas sólidas em termos de (a) concentração (em mg/L de dispersão) e (b) porcentagem de beta-caroteno preservado.	73

Figura 5.20: Oxidação lipídica das nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando beta-caroteno, produzidas com manteiga de cupuaçu e murumuru, durante o período de estocagem sob refrigeração.	74
Figura 5.21: Porcentagem de alfa-tocoferol nas nanopartículas lipídicas solidas preservada ao longo do tempo de estocagem.	75
Figura 5.22: Aspecto visual das dispersões de nanopartículas de manteiga de cupuaçu, respectivamente no início do processo de digestão <i>in vitro</i> dinâmica, no filtrado do jejuno, filtrado do íleo e final do íleo, respectivamente.....	77
Figura 5.23: Diâmetro médio e polidispersidade das nanopartículas de manteiga de cupuaçu ao longo da digestão <i>in vitro</i> dinâmica.....	78
Figura 5.24: Potencial zeta das nanopartículas de manteiga de cupuaçu ao longo da digestão <i>in vitro</i> dinâmica.....	79
Figura 5.25: Imagens da microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas de manteiga de cupuaçu ao longo da digestão <i>in vitro</i> dinâmica. (a) antes da digestão, (b) estômago, (c) duodeno, (d) jejuno, (e) íleo.....	80
Figura 5.26: Bioacessibilidade total do beta-caroteno ao longo do trato gastrointestinal das nanopartículas de manteiga de cupuaçu no modelo digestivo <i>in vitro</i> dinâmico.	82
Figura 5.27: Beta-caroteno não-bioacessível presente nas nanopartículas de cupuaçu no trato gastrointestinal no sistema digestivo <i>in vitro</i> dinâmico.....	82
Figura 5.28: Porcentagem de ácidos graxos livres (AGL) liberados da nanopartícula de manteiga de cupuaçu ao longo da digestão dinâmica.....	83
Figura 5.29: Aparência dos fluidos coletados ao longo do processo de digestão <i>in vitro</i> dinâmica das nanopartículas de manteiga de murumuru, respectivamente no início da digestão, no estômago, no duodeno, no filtrado do jejuno, filtrado do íleo e final do íleo.....	84
Figura 5.30: Diâmetros médios e valores de polidispersidade das nanopartículas de manteiga de murumuru ao longo da digestão <i>in vitro</i> dinâmica.....	85
Figura 5.31: Valores de potencial zeta das nanopartículas de manteiga de murumuru ao longo da digestão <i>in vitro</i> dinâmica.	85
Figura 5.32: Bioacessibilidade total do beta-caroteno ao longo do trato gastrointestinal das nanopartículas de manteiga de murumuru no modelo digestivo <i>in vitro</i> dinâmico.....	86

Figura 5.33: Beta caroteno presente nas nanopartículas de murumuru não bioacessível no trato gastrointestinal no sistema digestivo <i>in vitro</i> dinâmico.	87
Figura 5.34: Porcentagem de ácidos graxos livres (AGL) liberados da nanopartícula de manteiga de murumuru ao longo da digestão <i>in vitro</i> dinâmica.....	88
Figura 5.35: Diâmetro médio e polidispersidade das nanopartículas de manteiga de cupuaçu ao longo da digestão <i>in vitro</i> estática.	90
Figura 5.36: Potencial zeta das nanopartículas de manteiga de cupuaçu ao longo da digestão <i>in vitro</i> estática.	90
Figura 5.37: Solução duodenal utilizada nos ensaios de digestibilidade <i>in vitro</i> estática (a) antes e (b) depois da centrifugação	91
Figura 5.38: Crescimento das células da linhagem HEPG-2: (a) no início no cultivo e (b) após atingir 90% de confluência.	93
Figura 5.39: Crescimento da linhagem de células CaCo-2: (a) no início do cultivo e (b) após atingir 90% de confluência.	93
Figura 5.40: Concentração das nanopartículas lipídicas sólidas de murumuru em ordem decrescente, em termos de µg/ml de dispersão.	94
Figura 5.41: Aspecto das soluções nas placas de 96 poços nos diferentes estágios: (a) introdução do meio e do meio com as suspensões de células; (b) introdução das diferentes concentrações da amostra; (c) introdução do MTT; (d) após homogeneização dos cristais de formazam	95
Figura 5.42: Aspecto da placa de 96 poços após a homogeneização dos cristais de formazam	96
Figura 5.43: Coloração da placa de 96 poços para as células de CaCo-2 após o ensaio de MTT.....	96
Figura 5.44: Coloração da placa de 96 poços para as células de HEPG-2 após o ensaio de MTT.....	97
Figura 5.45: Viabilidade celular (%) nas diferentes diluições de nanopartículas de manteiga de murumuru frente a linhagem celulares CaCo-2 e HEPG-2.....	97
Figura 5.46: Morfologia celular para a linhagem HEPG-2 após ensaio de MTT nas concentrações de (a) 0,36 µg/ml de dispersão; (b) 11,38 µg/ml de dispersão; (c) 22,75 µg/ml de dispersão e (d) 45,5 µg/ml de dispersão (aumento de 20X).....	99
Figura 5.47: Morfologia celular para a linhagem HEPG-2 após ensaio de MTT nas concentrações de (a) 0,36 µg/ml de dispersão; (b) 11,38 µg/ml de dispersão; (c) 22,75 µg/ml de dispersão e (d) 45,5 µg/ml de dispersão (aumento de 4X).....	100

Figura 5.48: Morfologia celular para a linhagem CaCo-2 após ensaio de MTT nas concentrações de (a) 0,36 µg/ml de dispersão; (b) 2,84 µg/ml de dispersão; (c) 22,75 µg/ml de dispersão e (d) 45,5 µg/ml de dispersão (aumento de 20X)..... 101

Figura 5.49: Morfologia celular para a linhagem CaCo-2 após ensaio de MTT nas concentrações de (a) 0,36 µg/ml de dispersão; (b) 2,84 µg/ml de dispersão; (c) 22,75 µg/ml de dispersão e (d) 45,5 µg/ml de dispersão (aumento de 4X)..... 102

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1: Dados dos tensoativos empregados nos experimentos realizados..	30
Tabela 4.2: Formulações de nanopartículas lipídicas sólidas empregadas nos testes de estabilidade em diferentes condições de <i>stress</i>	34
Tabela 5.1: Diâmetro hidrodinâmico médios e concentração de beta-caroteno das nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com manteiga de cupuaçu e manteiga de murumuru quando submetidas a diferentes temperaturas.	57
Tabela 5.2: Diâmetro hidrodinâmico médios e concentração de beta-caroteno das nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com manteiga de cupuaçu e manteiga de murumuru quando submetidas a diferentes concentrações de sacarose.	58
Tabela 5.3: Diâmetro hidrodinâmico médios e concentração de beta-caroteno das nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com manteiga de cupuaçu e manteiga de cupuaçu quando submetidas a diferentes concentrações de sal.....	60
Tabela 5.4: Diâmetro hidrodinâmico médios e concentração de beta-caroteno das nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com manteiga de cupuaçu e manteiga de cupuaçu quando submetidas a diferentes valores de pH.	61
Tabela 5.5: Diâmetro hidrodinâmico médios e concentração de beta-caroteno das nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com manteiga de cupuaçu e manteiga de murumuru quando submetidas às diferentes condições de stress no dia 5 de armazenagem.	66
Tabela 5.6: Formulação das nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando beta-caroteno avaliadas ao longo do tempo de estocagem	67
Tabela 5.7: Diâmetro médio e polidispersidade das nanopartículas no início e no final do período de estocagem	70
Tabela 5.8: Dados calorimétricos (obtidos por calorimetria diferencial de varreduras) das nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando beta-caroteno, produzidas com manteiga de cupuaçu e manteiga de murumuru, com e sem tocoferol.	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB – Azul de Alamar

AGL – Ácidos graxos livres

A/O – Água em óleo

AMF – *Anhydrous milk fat*

BHT – Di-terc-butil metil fenol

BS – Sais biliares

CaCo-2 – Células de carcinoma do cólon

CMC – Concentração micela crítica

C_{fase micelar} – concentração de beta-caroteno na fração micelar

C_{raw digesta} – concentração de beta-caroteno na amostra geral

CPI – *Catastrophic phase inversion*

DMEM – *Dulbecco's modified Eagle Media*

DSC – Calorimetria diferencial de varredura

EIP – *Emulsion inversion point*

F – Biodisponibilidade global

F_A – Absorção

F_B – Bioacessibilidade

F_C – Fração de micronutriente

F_M – Metabolismo

HCl – Ácido clorídrico

HEPG-2 – Células de hepatoblastoma

HLD – Desvio lipofílico hidrofílico

IBMC – Instituto de Biologia Molecular e Celular

IC₅₀ – 50% de morte celular

LBDD – *Lipid- Based Drug Delivery*

LIP – Laboratório de Instalações Piloto

LMMD – Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

$M_{\text{lipídio}}$ – Peso molecular do lipídio

m_{NaOH} – Molaridade do hidróxido de sódio

MTT – Sal amarelo tetrazolin

NLS – Nanopartícula lipídica sólida

NR – *Neultral red*

O/A – Óleo em água

PCS – *Photon correlation spectroscopy*

PIT – *Phase inversion temperature*

PIZ - Zona de inversão de fase

PLS – Partículas lipídicas sólidas

PTL – Lipase tri glicerol pancreática

rpm – rotações por minuto

SIES – Solução eletrolítica intestinal

SLN – *Solid lipid nanoparticles*

SOR – *Surfactant oil ratio*

TBARS – Ácido tiobarbitúrico

TCA – Ácido tricloroacético

TEP – 1,1,3,3 – tetraetoxipropano

TGI – Tratogastro intestinal

TIM -1 – *TNO intestinal model*

T_m – Temperatura de transição de fases

TNO – Nutrion and Food Research

T_o – Temperatura *onset*

TPI – *transitional phase inversion*

V_{NaOH} – Volume de hidróxido de sódio

W_{lipidio} – Peso total de lipídio inicialmente presente

WOR – Razão água/óleo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1	Microencapsulação em sistemas lipídicos	3
2.1.1	Partículas Lipídicas Sólidas	6
2.1.2	Produção de nanopartículas lipídicas por métodos de baixa energia	7
2.1.3	Principais tipos de inversões de fases em sistemas emulsionados....	9
2.2	Digestibilidade de estruturas lipídicas	16
2.2.1	Biodisponibilidade e biacessibilidade de bioativos lipofílicos	18
2.3	Modelos para estudos de digestibilidade <i>in vitro</i>	21
2.3.1	Modelos dinâmicos de digestibilidade.....	22
2.4	Estudos de Citotoxicidade	25
3	OBJETIVOS.....	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1	Materiais	29
4.1.1	Produção das nanopartículas lipídicas	29
4.1.2	Ensaio de digestibilidade <i>in vitro</i>	30
4.1.3	Estudos em linhagens de células.....	30
4.2	Métodos	31
4.2.1	Produção das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) pelo método temperatura de inversão de fase (método PIT).....	31
4.2.2	Determinação da temperatura de inversão de fases	32
4.2.3	Determinação de diâmetro médio e distribuição de tamanho de partícula	32
4.2.4	Quantificação do beta-caroteno encapsulado.....	32
4.2.5	Estabilidade das nanopartículas em diferentes condições de <i>stress</i>	33
4.2.6	Quantificação de alfa-tocoferol encapsulado.....	34
4.2.7	Avaliação da oxidação lipídica	34

4.2.8	Monitoramento da vida de prateleira das nanopartículas lipídicas .	35
4.2.9	Calorimetria diferencial de varredura	35
4.2.10	Processo de digestão <i>in vitro</i> simulada	35
4.2.11	Quantificação de ácidos graxos livres liberados durante a digestão <i>in vitro</i> estática	39
4.2.12	Avaliação da bioacessibilidade do beta-caroteno encapsulado	40
4.2.13	Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	41
4.2.14	Estudos em linhagens de células <i>in vitro</i> , para avaliação da toxicidade celular das nanopartículas lipídicas.....	41
4.2.15	Análises estatísticas	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1	Determinação das condições de processo para a produção das nanopartículas lipídicas sólidas pelo método da temperatura de inversão de fase (PIT)	46
5.2	Estabilidade das nanopartículas lipídicas sólidas em diferentes condições de <i>stress</i>	49
5.3	Estabilidade físico-química das nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando beta-caroteno	67
5.4	Digestibilidade <i>in vitro</i> dinâmica das nanopartículas encapsulando beta-caroteno	77
5.4.1	Nanopartículas produzidas com manteiga de cupuaçu	77
5.4.2	Nanopartículas lipídicas produzidas com manteiga de murumuru .	84
5.5	Digestibilidade <i>in vitro</i> estática das nanopartículas encapsulando beta-caroteno	89
5.6	Estudo <i>in vitro</i> de toxicidade celular	92
5.6.1	Cultivos celulares.....	92
5.6.2	Ensaio de MTT	94
6	CONCLUSÕES.....	104
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	107

8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
---	----------------------------------	-----

1 INTRODUÇÃO

Os bioativos hidrofóbicos apresentam, em sua maioria, biodisponibilidade limitada e pouca absorção no trato gastrointestinal (TGI). Tal problemática pode ser resolvida utilizando técnicas de formulações lipídicas para desenvolver sistemas de liberação com o intuito de promover a encapsulação, proteção e liberação destes agentes funcionais no TGI. Dentre estes sistemas encontram-se as nanopartículas lipídicas sólidas que possuem um núcleo lipídico sólido envolvido por uma monocamada de tensoativo, o que as torna estruturas hidrofóbicas, mas dispersíveis em meios aquosos. Estas nanopartículas possuem características interessantes, tais como alta estabilidade físico-química, proteção de ativos sensíveis contra degradação, liberação controlada e excelente tolerabilidade.

A formação destas nanopartículas requer a adição de energia ao sistema. Esta energia pode provir de dispositivos mecânicos (métodos de alta energia) ou da energia química armazenada nos componentes do sistema (métodos de baixa energia). No primeiro caso, quanto menor o tamanho desejado, mais energia é necessária, tornando o processo mais caro, o que em certos casos, torna questionável a sua aplicação no contexto industrial. Por outro lado, os métodos de baixa energia são relativamente simples e apresentam baixo consumo energético, permitindo que o seu escalonamento seja interessante. Tais métodos dependem da formação espontânea de emulsão que resulta em mudanças nas propriedades interfaciais. Dentre tais métodos, um dos mais utilizados é o da temperatura de inversão de fase (PIT), que se baseia na mudança de solubilidade dos tensoativos não iônicos polietoxilados com a temperatura, sendo a formação da nanopartícula atribuída principalmente à formação de uma fase bicontínua.

Por sua vez, o entendimento da digestão lipídica, mais especificamente dos sistemas emulsionados, tem se beneficiado consideravelmente dos avanços nas técnicas analíticas, tanto em estudos *in vitro* quanto *in vivo*. Encontram-se disponíveis diversos ensaios *in vitro* de modelos do TGI atualmente disponíveis para a nutrição, toxicologia, farmacologia e avaliações de segurança alimentar. Os modelos *in vitro* têm sido desenvolvidos para tentar prever o comportamento *in vivo* da absorção de nutrientes. Com o intuito de simular com maior precisão os processos que ocorrem *in vivo*, têm sido utilizados os modelos *in vitro* dinâmicos, que levam em consideração os atributos

bioquímicos, biomecânicos e temporais que ocorrem *in vivo*. Dentre esses modelos, tem sido utilizado nos últimos anos o modelo intestinal TNO (sistema TIM – *TNO intestinal model*), que simula as condições fisiológicas humanas no estômago e no intestino delgado, incluindo simulações na mudança de pH, temperatura, movimentos peristálticos, secreções de enzimas, bile e suco pancreático e absorção de produtos de digestão.

Fazer uso de testes *in vitro*, empregando culturas celulares, tem facilitado o entendimento do mecanismo de absorção de muitos nutrientes, e é, com certeza, uma forma de se avaliar também a citotoxicidade.

O presente trabalho de Doutorado objetivou a produção de nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando beta-caroteno pelo método PIT e a avaliação de sua digestibilidade *in vitro* dinâmica, assim como o estudo de sua citotoxicidade.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MICROENCAPSULAÇÃO EM SISTEMAS LIPÍDICOS

O uso de formulações lipídicas para encapsulação de fármacos hidrofóbicos têm sido amplamente investigado para aumentar a biodisponibilidade deste tipo de bioativo administrado por via oral. Sabe-se que materiais lipídicos presentes nas matrizes encapsulantes dos fármacos podem aumentar a absorção da droga pela membrana intestinal, e as mesmas técnicas podem ser aplicadas a bioativos a serem incorporados em alimentos (GRIFFIN; O'DRISCOLL, 2006; ZHUANG et al., 2010; JANNIN et al., 2008). Tal abordagem é chamada de *Lipid- Based Drug Delivery* (LBDD) e vem sendo intensivamente explorada na área farmacêutica, especialmente na última década, utilizando-se de diferentes sistemas formados por matrizes lipídicas como emulsões secas, dispersões sólidas, lipossomas, micro e nano partículas lipídicas sólidas. Os processos utilizados para obter tais sistemas são muito variados, e incluem homogeneização a alta pressão, *spray drying*, *spray cooling*, extrusão e métodos empregando fluidos supercríticos (JANNIN et al., 2008).

Os mecanismos pelos quais os lipídios podem aumentar a biodisponibilidade oral dos bioativos hidrofóbicos são diversos. O primeiro mecanismo é o aumento da secreção de sais biliares e dos lipídios biliares endógenos que é induzida pela presença de lipídios no trato gastrointestinal (TGI), aumentando a formação de micelas mistas intestinais, e, portanto, aumentando a capacidade de solubilização no ambiente do TGI. O segundo mecanismo que pode ser citado é o aumento do tempo de retenção gástrica que os lipídios produzem, resultando em uma liberação lenta no sítio de adsorção e aumento do tempo disponível para absorção do bioativo. Muito embora a absorção passiva intestinal não seja considerada como uma limitação da biodisponibilidade para a maior parte dos bioativos lipofílicos, várias combinações de lipídios, produtos lipídicos de digestão e tensoativos têm demonstrado capacidade de aumentar a permeabilidade da membrana intestinal. Além disso, os lipídios e tensoativos podem reduzir a atividade de transportadores de efluxo intestinais, como a bomba de efluxo da glicoproteína P, e também o metabolismo baseado em enterócitos, aumentando a absorção do bioativo. No caso de bioativos altamente hidrofóbicos, os lipídios podem aumentar o transporte linfático e melhorar a biodisponibilidade através da redução do metabolismo de primeira passagem, permitindo que o bioativo se direcione diretamente para a circulação

sistêmica, sem passar primeiramente pelo fígado (JEONG et al., 2007; PORTER et al., 2007).

Na Figura 2.1 pode-se observar as principais formas pela qual os lipídios podem afetar a absorção dos bioativos hidrofóbicos.

Figura 2.1- (a) Aumento da formação de vesículas, micelas mistas e micelas; (b) interação com o transporte a base de enterócitos e processos metabólicos; (c) alteração do percurso (veia porta versus sistema linfático intestinal) do transporte do bioativo para a circulação sistêmica (redução do metabolismo de primeira passagem) (Adaptado de PORTER et al. 2007).

Uma grande variedade de sistemas de microencapsulação de liberação controlada foi desenvolvida para encapsular agentes bioativos lipofílicos, incluindo emulsões convencionais, nanoemulsões, emulsões múltipla, nanopartículas lipídicas sólidas, partículas de hidrogel, dentre outras. Cada um desses sistemas tem suas vantagens e desvantagens específicas para encapsular, proteger e liberar agentes funcionais, assim como cada um tem seu custo, regulamentação, facilidade de uso, biodegradabilidade e biocompatibilidade (McCLEMENTS, 2010; McCLEMENTS; LI, 2010). Em relação aos sistemas de encapsulação lipídicos, diferentes tipos de partículas

podem ser descritos, como adequadamente resumido por McClements (2010) na Figura 2.2.

Figura 2.2 - Exemplos de diferentes tipos de partículas que podem ser produzidas para encapsulação de ativos hidrofóbicos (Adaptado de McCLEMENTS, 2010).

Dentre os diferentes tipos de partículas mostrados na Figura 2.2, pode-se visualizar as partículas lipídicas sólidas (PLS), que, de forma semelhante às emulsões O/A, consistem de núcleos lipídicos recobertos por um emulsificante e dispersos em um meio aquoso, sendo que a diferença entre as PLS e as emulsões comuns é que naquelas a fase lipídica está parcial ou totalmente solidificada. Tais estruturas podem ter dimensões nanométricas (formando as partículas conhecidas genericamente na literatura como SLN, *solid lipid nanoparticles*), dependendo do processo empregado para produzi-las.

2.1.1 Partículas Lipídicas Sólidas

As primeiras micropartículas lipídicas sólidas foram descritas na literatura no início da década de 90, sendo as primeiras patentes para as micro e nanopartículas lipídicas sólidas produzidas por Gasco (1993) e Müller e Lucks (1996). Tais partículas foram preparadas aplicando-se altas intensidades de agitação para dispersar uma fase lipídica fundida em uma solução quente de tensoativo, sendo a seguir a dispersão resultante resfriada até a temperatura ambiente, resultando em partículas com um núcleo contendo lipídio sólido, conforme esquematizado na Figura 2.3:

Figura 2.3: Esquema simplificado de uma partícula lipídica sólida (Fonte: <http://www.worldfoodscience.com/>).

Tais partículas lipídicas sólidas combinam as vantagens de outros sistemas carreadores, como das partículas poliméricas (com diferentes modificações químicas), lipossomas (permeabilidade da membrana), e emulsões (biodisponibilidade) para oferecer estabilidade física, proteção a ativos sensíveis contra a degradação, liberação controlada e excelente tolerabilidade (MÜLLER et al., 2000; WISSING et al., 2004).

Dependendo das matérias primas lipídicas empregadas na preparação destas partículas lipídicas sólidas, pode-se distinguir dois tipos básicos diferentes, cujas microestruturas estão esquematicamente mostradas na Figura 2.4.:

Figura 2.4: (a) Estrutura cristalina perfeita das partículas produzidas com somente um tipo de lipídio sólido; (b) estrutura com imperfeições das partículas produzidas com mais de um tipo de lipídio (Adaptado de SOUTO, 2005).

Partículas lipídicas sólidas com a estrutura como a esquematizada na Figura 2. 4 (a) podem apresentar capacidade limitada de encapsulação bem como expulsão da droga durante a estocagem (MÜLLER et al., 2002; WISSING et al., 2004; ZHUANG et al., 2010), devido à sua estrutura cristalina altamente organizada. Já na estrutura do tipo mostrado na Figura 2.4 (b), tais problemas são minimizados, uma vez que são produzidas pela mistura de lipídios diferentes (sólidos ou sólidos + líquidos), com cadeias carbônicas espacialmente incompatíveis, que formam “espaços” ou “lacunas” no interior da matriz sólida (MÜLLER et al., 2002).

2.1.2 Produção de nanopartículas lipídicas por métodos de baixa energia

Pode-se classificar os métodos para produção de nanoemulsões e nanopartículas lipídicas, em dois grandes grupos: o primeiro envolvendo adição de grande quantidade de energia no sistema (processos de alta energia, ou de caráter *top-down*), e o segundo envolvendo os processos que exigem adição de baixa quantidade de energia (processos de baixa energia, normalmente de caráter *bottom-up*). No primeiro caso, a energia mecânica é introduzida nos sistemas por equipamentos como homogeneizadores a alta pressão, microfluidizadores ou pela aplicação de altos níveis de energia ultra-sônica (SPERNATH; MAGDASSI, 2007; ANTON et al., 2007; ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008). A introdução de grande quantidade de energia no sistema permite a atuação de forças deformantes e cisalhantes capazes de quebrar as partículas em tamanhos menores, já que a pressão de Laplace é superada. Além disso, o aumento da quantidade de tensoativo na interface reduz a pressão de Laplace; portanto, quanto menor o tamanho desejado, mais energia e/ou tensoativo são necessários, tornando tais métodos muitas vezes extremamente dispendiosos para aplicações industriais,

especialmente quando se deseja um tamanho de partícula muito pequeno (McCLEMENTS; RAO, 2011).

Nanoemulsões e nanopartículas podem ser também obtidas empregando-se os chamados métodos de baixa energia, através da manipulação adequada das propriedades físico-químicas do sistema utilizando-se o mínimo de energia, induzindo os sistemas à auto-agregação (*self-assembly*) (FERNANDEZ et al., 2004; SOLÈ et al., 2006; ANTON et al., 2007). Especial atenção tem sido dada a tais processos, pois constituem metodologias extremamente adequadas para prevenir a degradação potencial das moléculas encapsuladas durante o processo (bioativos termolábeis, por exemplo) e são igualmente interessantes para o escalonamento, já que são, teoricamente, relativamente simples e tem um baixo consumo energético (ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008).

Nos métodos de baixa energia, as nanoemulsões podem ser formadas com a perturbação de uma dispersão líquido/líquido, em que a fase contínua se torna a fase dispersa e vice-versa, ou seja, há uma transição de fase no sistema (MORAIS et al., 2009; MEI et al., 2011). A fase que se destina a ser a fase contínua é adicionada à fase dispersa, até que ocorra a inversão de fase e a formação do tipo de emulsão desejada (SAJJADI, 2006). Esta transição de fase resulta da mudança da razão entre a área ocupada pela porção hidrofílica e pela porção hidrofóbica do tensoativo, ou das rupturas interfaciais que ocorrem quando dois líquidos parcialmente miscíveis são misturados e um dos componentes se movimenta de uma fase para outra (McCLEMENTS et al., 2010; SADTLER et al., 2010; MEI et al., 2011A; MEI et al., 2011b). A mudança da citada razão pode ser conseguida através de diferentes rotas: (a) particionamento de solventes orgânicos (ex.: acetona, atanol) da fase oleosa para a fase aquosa ou por difusão da água dentro da gota inicial, ambos produzindo mudança de condições lipofílicas para hidrofílicas; (b) reações químicas que convertem tensoativos lipofílicos em hidrofílicos; (c) diminuição súbita da força iônica em sistemas contendo tensoativos iônicos; e (d) aumento na hidratação nas cadeias de tensoativos polietoxetilados não-iônicos. A reversão espontânea da curvatura de sistemas A/O em O/A reduz a capacidade de solubilização do óleo de tal forma que pode ocorrer uma supersaturação, levando a nucleação da gotícula de óleo. Nestes casos, a emulsão pode ser gerada espontaneamente. Portanto, os métodos de baixa energia são capazes de gerar emulsões de forma espontânea com tamanhos de partículas muito pequenos (menores que 50 nm) (IZQUIERDO et al., 2002; MORALES et al., 2006; WANG et al., 2008).

As inversões de fase podem ocorrer genericamente de duas formas: (i) inversão de fase catastrófica (CPI do inglês - *catastrophic phase inversion*) ou (ii) transição por inversão de fase (TPI do inglês - *transitional phase inversion*) (ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008; MORAIS et al., 2009; JAHANZAD et al., 2010).

2.1.3 Principais tipos de inversões de fases em sistemas emulsionados

As inversões catastróficas ocorrem por meio de variações na composição do sistema. Tal designação é utilizada pelo fato de ocorrer uma alteração súbita no comportamento do sistema, como resultado da mudança gradual nas condições de processo (ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008; JAHANZAD et al., 2010; SCHALBART et al., 2010). Dentre as inversões catastróficas, o método mais conhecido é a chamado ponto de inversão da emulsão (EIP- do inglês *emulsion inversion point*). No processo do tipo EIP a temperatura do sistema é mantida constante, enquanto a composição da fase dispersa varia (MORAIS et al., 2006; ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008; MEI et al., 2011). Por exemplo, em uma adição sucessiva de água em óleo, as gotículas de água são inicialmente formadas na fase oleosa contínua. No entanto, uma vez atingido o valor crítico da fase aquosa, há a migração do tensoativo desta fase para a fase oleosa, e desta forma ocorre uma mudança espontânea na curvatura interfacial, que é conduzida pela formação de estruturas intermediárias, denominadas fase lamelar e/ou bicontinua (FERNANDEZ et al., 2004; MORAIS et al., 2009; MCCLEMETS; RAO 2011). Quanto maior a concentração de tensoativo, melhor será a formação de tais estruturas, e melhor também a formação das gotículas pequenas de óleo (FERNANDEZ et al., 2004).

Já as inversões de fase transicionais ocorrem por mudanças na formulação, como alteração de parâmetros físico-químicos do tensoativo, na fase oleosa ou na fase aquosa, as quais podem alterar a afinidade hidrofílica ou lipofílica do tensoativo. (SALAGER et al., 2004; JAHANZAD et al., 2010; SCHALBART et al., 2010). O tipo mais conhecido dentre tais inversões é a inversão de fase por temperatura (PIT – do inglês - *phase inversion temperature*), que é induzida pela alteração da temperatura enquanto a composição é mantida constante. Nesta técnica todos os componentes do sistema (água, óleo e tensoativo) são misturados na temperatura ambiente sendo ligeiramente agitados; a próxima etapa é o aumento gradativo da temperatura (ANTON et al., 2007; ANTON; VANDAMME, 2009; MEI et al., 2011). Esse método foi introduzido por Shinoda

(1969) e Satio (1968), e permite a formação de nanoemulsões extremamente estáveis, se o sistema for inicialmente emulsificado perto da temperatura PIT (T_{PIT}) e depois resfriado rapidamente (SCHALBART et al., 2010). A figura 2.5 mostra esquematicamente o mecanismo de inversão de fase por temperatura.

Figura 2.5: Diagrama esquemático da dependência da temperatura com a curvatura espontânea das monocamadas de tensoativo polietoxilados e sua influência nas propriedades de uma emulsão (Adaptado de McCLEMENTS; RAO, 2011).

Através da Figura 2.5 podemos observar que no método PIT, a partir de certa temperatura, ocorre uma mudança na curvatura do tensoativo, o que altera sua afinidade permitindo a migração para a outra fase e desta forma a transição de uma emulsão O/A para uma emulsão A/O (FERNANDEZ et al., 2004; McCLEMENTS; RAO, 2011; SOLANS; SOLÈ, 2012). Neste ponto, a curvatura do tensoativo é próxima a zero e há a formação de estruturas bicontínua ou lamelar, responsável pela formação de nanopartículas com características transparente ou translúcida “azulada” (PEY et al., 2006; ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008; WANG et al., 2008; McCLEMENTS; RAO, 2011). No ponto em que a curvatura do tensoativo é próxima a zero, as barreiras que se opõem ao processo de coalescência são baixas e assim, a taxa de coalescência é extremamente alta, e é por essa razão, que a temperatura do sistema deve ser diminuída rapidamente, com o intuito de se obter nanopartículas cineticamente estáveis ao longo do tempo (SOLANS; SOLÈ, 2012).

Como pode-se perceber, a natureza do tensoativo é muito importante no método PIT, só podendo ocorrer com aqueles que são sensíveis a alteração de temperatura. Dessa forma, é necessário a utilização de tensoativos não-iônicos polietoxilados, nos quais as mudanças de temperatura induzem uma mudança na hidratação das cadeias de polioxietileno, o que permite a alteração de sua curvatura (SAJJADI et al. 2004; SALAGER et al., 2004; ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008; SOLANS; SOLÈ, 2012). De maneira simplificada pode-se dizer que em baixas temperaturas, a cabeça de tais tensoativos é hidratada, permitindo que eles sejam solúveis em água. Ao passo que em altas temperaturas, a cabeça polar se desidrata e assim, tal tensoativo se torna insolúvel em meio aquoso. A partir de uma dada temperatura, denominada temperatura PIT, a afinidade do tensoativo com a fase oleosa e aquosa é equilibrada e a tensão interfacial é, portanto, muito baixa, sendo a curvatura espontânea do tensoativo igual a zero (MORALES et al. 2006; McCLEMENTS; RAO, 2011).

Tais fenômenos foram bem analisados e explicados por Anton e Vandamme (2009), que as dividiram em quatro partes, e estão representadas na Figura 2.6. Segundo os autores, primeiramente há a formação de uma macro-emulsão leitosa e a maior parte do tensoativo não-iônico é solubilizada na fase aquosa, já que seu comportamento a baixas temperaturas é hidrofílico (a). À medida que a temperatura da mistura é aumentada, as moléculas de tensoativo não-iônico gradualmente vão se tornando hidrofóbicas, devido à desidratação, o que causa a sua migração para a fase oleosa (b). Em seguida, visto que a quantidade de tensoativo é da mesma ordem de grandeza que a de óleo, a fração volumétrica da fase dispersa aumenta. Além disso, a curvatura e a tensão interfacial são reduzidas, dando origem a condições próprias para o estabelecimento de microemulsões no equilíbrio de Winsor III e Winsor IV (c). Finalmente, quando a temperatura é fortemente aumentada acima do PIT, o sistema sofre a inversão de fase, e a água é dispersa na mistura de tensoativo e óleo (nessa temperatura o tensoativo polietoxilado passa a ser lipofílico, pois foi desidratado). Nesse ponto, depois do resfriamento, as nanopartículas são formadas. O sistema rapidamente atinge uma temperatura que dramaticamente muda o coeficiente de partição do tensoativo, tornando-os completamente hidrofílicos (d). Como resultado, o composto anfifílico se move espontaneamente da fase oleosa para a aquosa. Finalmente, as nanoemulsões são geradas, devido exclusivamente ao deslocamento dos componentes hidrofílicos.

Figura 2.6: Diagrama esquemático do mecanismo de geração de nanoemulsões pelo método da temperatura de inversão de fases (método PIT). Em (a) a temperatura do sistema está abaixo da temperatura PIT, há a formação de uma macro-emulsão leitosa e a maior parte do tensoativo não-iônico é solubilizada na fase aquosa, já que seu comportamento a baixas temperaturas é hidrofílico. o tensoativo não iônico são, sobretudo hidrofílicos, neste ponto, há a formação de uma . Em (b) ocorre aumento da temperatura, os tensoativos gradualmente se transformam em lipofílico e são solubilizados na fase oleosa. (c) na temperatura PIT a microemulsão bicontínua é formada. (d) a temperatura é levada acima do PIT, a emulsão é invertida e a água é dispersa na mistura óleo + tensoativo lipofílico. O sistema é então rapidamente resfriado, usando água diluída, tornando subitamente o tensoativo hidrofílico e induzindo a espontaneidade e a rápida migração para a fase aquosa. Tal como na emulsificação espontânea, este deslocamento turbulento induz à geração de nanoemulsão (Fonte: ANTON; VANDAMME 2009).

O processo de inversão de fase acontece na zona de inversão de fase (PIZ). Quando há a formação da emulsão O/A, a monocamada de tensoativo possui uma curvatura espontânea positiva. Neste ponto, como a fase contínua é a água, o sistema é caracterizado por altos valores de condutividade. À medida que a temperatura aumenta, a curvatura se torna negativa, e o sistema se torna emulsionado na forma W/O, havendo uma diminuição da condutividade do sistema. É na PIZ que a curvatura espontânea se aproxima do zero, e há formação da fase lamelar (ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008; EE et al., 2008; HUYNH et al., 2009).

Figura 2.7: Evolução da condutividade em função da temperatura, a PIZ (zona de inversão de fases) é caracterizada pela abrupta variação da condutividade (Adaptado de HEURTAULT et al. 2002).

A morfologia da emulsão também depende da razão água/óleo (WOR – *water oil ratio*), a qual é claramente indicada no mapa bidimensional representado pela Figura 2.8.(a). Sob uma agitação constante e com uma quantidade fixa de tensoativo na formulação, a emulsão sofre gradualmente uma inversão de fase, visto que o desvio lipofílico hidrofílico (HLD – *hydrophilic-lipophilic deviation*) é modificado pela variação de temperatura. (ALLOUCHE et al., 2004; ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008).

O HLD tem sido relatado como sendo uma espécie de coeficiente de partição do tensoativo entre as duas fases, e a diferença do potencial químico do tensoativo nas fases aquosa e oleosa (ALLOUCHE et al., 2004; JOHANS et al., 2007) e pode ser usado para prever como o comportamento do tensoativo irá mudar quando a composição do sistema e as condições ambientais são alteradas. De maneira geral pode-se dizer que o HLD tende a aumentar com o aumento da temperatura, com o aumento das concentrações salinas, com o aumento do número de grupos de óxido de etileno por molécula de tensoativo não-iônico (EON) e com a diminuição do número de alcanos presentes (o qual indica, de forma indireta, a hidrofobicidade da fase oleosa) (SALAGER et al., 2000; SALAGER et al., 2004; MCCLEMNTS; RAO 2011).

Ainda em relação ao mapa bidimensional, a linha em negrito, representada na Figura 2.8.(a), é a fronteira de inversão, ou seja, a fronteira que separa as regiões de existência das emulsões A/O e O/A. Esta linha é composta essencialmente por um ramo

horizontal central e dois ramos laterais verticais. A parte central superior indica $HLD > 0$, a inferior $HLD < 0$, e a linha em negrito apresenta $HLD = 0$, momento em que ocorre a transição de fase (ALLOUCHE et al., 2004).

A explicação das microemulsões no equilíbrio de Winsor em função da temperatura pode ser observada pelas Figuras 2.8(b) e 2.8(c). Winsor fez a predição do comportamento das fase do sistema água/óleo/tensioativo na base da teoria do R; o parâmetro R é definido como um balanço de energia entre as fases anfifílicas-óleo e anfifílicas-água. A temperatura pode afetar dramaticamente esse parâmetro em sistemas de tensioativos não-iônicos. Dessa forma, em temperaturas baixas, $R < 1$ (sistema Winsor I) e as fases de equilíbrio correspondentes são microemulsão O/A com excesso de óleo (MORALES et al., 2003; ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008).

No entanto, em altas temperaturas, $R > 1$ (sistema Winsor II) e as fases de equilíbrio correspondentes são microemulsão A/O com excesso de água. Em temperaturas intermediárias, $R = 1$, e o sistema está equilibrado. Nessa situação, ocorrem o sistema Winsor III (que consiste de um equilíbrio das fases aquosas, oleosas e a microemulsão) ou o sistema Winsor IV (uma única fase de microemulsão). Portanto, a inversão de fase de O/A para A/O ou vice-versa deve ser produzida através dos sistemas Winsor III ou Winsor IV (MORALES et al., 2003; ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008).

Figura 2.8:(a) Mapa de composição e formulação típico para sistemas água/ tensioativo não iônico/óleo, mostrando a zona de inversão da emulsão. Diagrama de fase típico para o mesmo sistema, HLD como uma função da composição, (b) para pequenas quantidades de tensioativos, e (c) para grandes quantidades de tensioativo. A fronteira entre os dois comportamentos é aproximadamente definida com 10 % mássico de tensioativo (Adaptado ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008).

Em relação ao emprego de métodos de baixa energia, mais especificamente no que se refere ao método PIT, para a produção de nanopartículas lipídicas sólidas, somente depois de 2010 é que seu estudo começou a se intensificar, mesmo assim, localizaram-se na literatura somente três grupos de pesquisadores, que empregaram tais métodos, para a produção deste tipo de partícula.

O primeiro grupo de pesquisadores empregou acetil palmitato como lipídio sólido com diferentes tensoativos para a produção de protetor solar (MONTENEGRO et al., 2011b); encapsulação do agente antioxidante idobenone para emprego em diferentes áreas, como no tratamento de doenças degenerativas (MONTENEGRO et al., 2011a), avaliação *in vitro* em possíveis aplicações no cérebro (MONTENEGRO et al., 2012a) e avaliação *in vitro* de permeação/penetração na pele de suínos usando as células de difusão de Franz (MONTENEGRO et al., 2012b). Para a produção das partículas, a fase aquosa e a fase oleosa foram aquecidas separadamente até temperatura de 90 ou 95 °C, em seguida, a fase aquosa foi adicionada à fase oleosa gota a gota sob agitação a temperatura constante. A mistura foi então resfriada a temperatura ambiente sob agitação contínua. A temperatura de inversão de fase foi determinada por condutividade. De maneira geral, as nanopartículas mostraram tamanho médio variando de 30 a 95 nm apresentando um único pico de distribuição de tamanho.

Este mesmo grupo de pesquisa objetivou estudar a preparação, caracterização físico-química e a otimização estatística de nanopartículas lipídicas sólidas catiônicas, preparada pelo método PIT como potencial carreador para terapia genética. Eles utilizaram três lipídios catiônicos com diferentes estruturas e diferentes características lipofílicas. A nanopartícula com melhores resultados apresentou diâmetro médio de 462,9 nm e a sua citotoxicidade foi avaliada em dois modelos de culturas celulares. A forma de produção, assim como a determinação da temperatura de inversão de fase foram as mesmas das citadas anteriormente (CARBONE et al., 2012).

Zhang et al. (2013) utilizaram gordura de leite anidra (do inglês *anhydrous milk fat* – AMF) e Tween 80 para produção de nanopartículas lipídicas pelo método PIT com o intuito de encapsular beta-caroteno. Para a preparação das nanopartículas, diferentes concentrações de NaCl (0 a 1M) foram acrescentadas à fase aquosa contendo tensoativo. A fase aquosa e a AMF foram aquecidas separadamente até a temperatura de 60 °C e logo depois foram misturadas e aquecidas até 95 °C. O passo subsequente foi o

resfriamento até temperatura ambiente. A temperatura de inversão de fase foi determinada por viscosidade através de estudos reológicos. As nanopartículas contendo 0,8M de NaCl apresentaram melhores resultados, com características translúcidas e tamanho de partícula menores que 25 nm.

E por fim Calderón-Colón et al. (2014) utilizou o método PIT para a produção de nanopartículas lipídicas sólidas com diferentes lipídios para encapsular corantes para possível uso tópico. O tensoativo utilizado em todos os sistemas foi o Brij, no entanto sua concentração foi variada. Para a produção das partículas os reagentes foram misturados e aquecidos até temperaturas que variaram de 50 a 90 °C, dependendo do lipídio utilizado. O passo subsequente foi o resfriamento do sistema a temperaturas abaixo do ponto de fusão de cada lipídio. Os tamanhos de partículas variaram de 7,59 a 44,9 nm com um ponto isolado apresentando 214,2 nm, e os índices de polidispersidade de 0,006 a 0,92.

2.2 Digestibilidade de estruturas lipídicas

A baixa biodisponibilidade típica de bioativos hidrofóbicos pode ser atribuída, dentre outros fatores, à sua baixa capacidade de solubilização trato gastrointestinal (TGI). A dissolução desses bioativos, portanto, se torna um processo limitante, e o tempo disponível para a absorção, durante sua passagem no TGI, é insuficiente para permitir sua absorção completa (MacGREGOR et al., 1997). No entanto, é amplamente sabido que a biodisponibilidade de tais bioativos pode ser aumentada se estes forem veiculados em matrizes lipídicas (MacGREGOR et al., 1997; JEONG et al., 2007).

Como vários sistemas coloidais utilizando matrizes lipídicas têm sido desenvolvidos para a encapsulação de bioativos, é importante entender como, que o seu comportamento durante a passagem pelo TGI será afetado pelas propriedades da matriz encapsulante, o que torna necessário o conhecimento de alguns conceitos básicos sobre os processos de digestão de lipídios (NIK et al., 2010).

A digestão lipídica é um processo interfacial dependente da adsorção de enzimas lipolíticas na superfície das gotas da emulsão. A principal característica dessas enzimas (lipases) é sua especificidade na ação de substratos insolúveis emulsificados. Tal especificidade pode ser entendida como rearranjos conformacionais que a lipase sofre

em consequência da adsorção a uma interface apolar, o que torna tal enzima ativa (REIS et al., 2009; GOLDING; WOOSTER, 2010).

A taxa da digestão lipídica é controlada pela capacidade da lipase se adsorver na interface da emulsão, que é controlada pelo tamanho da gota da emulsão e a composição da interface (ex. estrutura) (GOLDING; WOOSTER, 2010). Tal processo ocorre para hidrolisar lipídios insolúveis, resultando em produtos anfifílicos, como ácidos graxos livres e monoacilgliceróis, de modo que eles possam ser mais facilmente transportados e absorvidos pelas células epiteliais da mucosa intestinal (WILDE; CHU 2011).

As lipases mais estudadas são solúveis em água, mas muitos dos seus substratos naturais são insolúveis. É, portanto, bem estabelecido, que para uma lipase atingir atividade lipídica elevada, é requerido a existência da interface água-óleo (REIS et al., 2008).

Há três lipases principais em humanos que são importantes na digestão lipídica, que são a lipase lingual, a lipase gástrica e a lipase pancreática. A lipase pancreática, que também pode ser chamada de lipase triglicerol pancreática (PTL), é responsável pela maior parte da hidrolise lipídica, e atua no duodeno (a primeira parte do intestino delgado). Já a lipase gástrica (lipase estável ácida com atividade de pH variando de 3 a 7), também conhecida como lipase pré-duodonal, atua no estômago e hidrolisa apenas uma pequena quantidade de lipídio, que pode chegar até 30% (MALDONADO-VALDERRAMA et al., 2008; GOLDING E WOOSTER 2010; WILD E CHU 2011).

A presença de lipídios no duodeno conduz à secreção de fluido pancreático (contendo bicarbonato de sódio, lipases, proteases e amilases) e fluido biliar (contendo sais biliares, fosfolipídios e colesterol) a partir do fígado (NIK et al., 2010; NIK et al., 2011a). Quando a substância digerida se desloca do estômago para o intestino delgado, ela é misturada com a bile e as secreções pancreáticas no duodeno. A composição interfacial das gotículas de lipídio no intestino delgado é extremamente complexa, no entanto vários estudos concordam sobre o papel crucial desempenhado pelos sais biliares (BS) na digestão lipídica (MALDONADO-VALDERRAMA et al., 2008).

Na presença de concentrações elevadas de sais biliares, os produtos da digestão de lipídios (ácidos graxos, monoglicerídeos e lisofosfolipídios) são subsequentemente incorporados numa série de estruturas coloidais, incluindo-se dentre elas as vesículas

multilamelares e unilamelares e as micelas.. em conjunto, tais espécies coloidais podem ampliar significativamente a capacidade de absorção dos produtos de digestão de lipídios e dos bioativos no intestino delgado (PORTER et al., 2007).

A Figura 2.7 mostra um esquema simplificado da digestão lipídica no intestino delgado.

Figura 2.9: Representação esquemática da digestão lipídica e solubilização do bioativo no intestino delgado (Adaptado de PORTER et al., 2007).

2.2.1 Biodisponibilidade e biacessibilidade de bioativos lipofílicos

Para exibir seu efeito benéfico, a forma ativa de um micronutriente tem que ser absorvida pelo corpo humano depois da ingestão. Desta forma, a biodisponibilidade e a bioacessibilidade de tais nutrientes são mais importantes que a sua concentração total (KNOCKAERT et al., 2012).

Existem muitas definições de tais conceitos, no entanto, de maneira simplificada, pode-se definir a biodisponibilidade como “a fração de um composto que

atinge a circulação sistêmica”, e a bioacessibilidade como “a fração de um composto que é liberada no trato gastrointestinal e dessa forma se torna disponível para absorção intestinal” (FERNANDEZ-GARCIA et al., 2009).

Uma elucidação mais completa é encontrada em Joye et al. (2014), que diz que a biodisponibilidade de um composto depende de vários fatores e pode ser expresso pela Equação (1):

$$F = F_C \cdot F_B \cdot F_A \cdot F_M \quad (1)$$

Onde F_C é a fração de micronutriente que permanece em uma forma ativa no produto alimentício no momento da ingestão; F_B é a bioacessibilidade a qual é a fração de micronutriente da matriz alimentícia que é solubilizada dentro dos fluidos gastrointestinais que pode então ser absorvido; F_A é a absorção, que é a fração de micronutriente transportada através das células epiteliais; F_M é o metabolismo, que é a fração de micronutriente que está na forma bioativa depois das transformações químicas dentro do trato gastrointestinal.

Dessa forma, os autores concluem que a biodisponibilidade global (F) de um micronutriente pode ser melhor alcançada através de sistemas de liberação controlada que aumentem a fração deste micronutriente que permanece no alimento (F_C), está biodisponível (F_B), é absorvido (F_A) e está presente na forma metabolicamente ativa (F_M).

Figura 2.10: Representação esquemática da bioacessibilidade de um componente bioativo. A biodisponibilidade depende de uma variedade de processos que ocorrem no trato gastrointestinal, assim como a solubilização, absorção e metabolismo (Adaptado de JOYE et al 2014).

Como pode-se perceber, a quantificação da biodisponibilidade envolve diversos parâmetros e, por isso muitas vezes mostra algumas dificuldades práticas, motivo pelo qual muitos estudos optam por mensurar apenas a bioacessibilidade destes compostos através de testes *in vitro*, visto que o conceito de biodisponibilidade inclui bioacessibilidade (FERNANDEZ-GARCIA et al., 2009).

Compostos bioativos lipofílicos devem ser incorporados em micelas mistas no duodeno antes de serem absorvidos na mucosa intestinal e atingirem as células epiteliais (GRANADO-LORENCIO et al., 2007; KNOCKAERT et al., 2012). Esta fração de componente lipofílico liberada na fase micelar mista, depois da digestão lipídica, pode ser feita como um marcador da bioacessibilidade (GRANADO-LORENCIO et al., 2007; AHMED et al., 2012).

Como já explicado anteriormente, o local que o composto é liberado no TGI é frequentemente importante para a bioacessibilidade. Proteínas podem ser utilizadas em sistemas de encapsulação que serão dissociados prioritariamente no estômago devido à atividade da protease. Já os lipídios podem ser usados em nanopartículas que se dissociarão primeiramente no intestino delgado devido à atividade da lipase (JOYE et al., 2014).

2.3 MODELOS PARA ESTUDOS DE DIGESTIBILIDADE *IN VITRO*

Atualmente existem diversos tipos de ensaios *in vitro* para a simulação dos processos que ocorrem no TGI, disponíveis para as áreas de nutrição, toxicologia, farmacologia e estudos de avaliação de segurança alimentar. Os modelos *in vitro* testados são particularmente úteis para o teste de diferentes formulações, e para estabelecer os mecanismos físico-químicos que impactam a bioacessibilidade e absorção de componentes bioativos específicos. As vantagens da técnica *in vitro* frente à *in vivo* incluem: ausência de restrições éticas, redução de custo, rapidez e melhoria da precisão e reprodutibilidade (KONG; SINGH, 2008; KONG; SINGH, 2010; McCLEMENTS, 2010).

Os modelos *in vitro* têm progredido consideravelmente em sua complexidade; no entanto, observa-se que um modelo universal, que pode ser considerado plenamente representativo do ambiente fisiológico, ainda não foi estabelecido, e dificilmente o será. O objetivo dos modelos *in vitro* é alcançar um nível aceitável de validação das propriedades digestivas comparados com os comportamentos *in vivo*. A complexidade dos modelos varia de acordo com a maneira pela qual o processo é modelado. O desenvolvimento de modelos *in vitro* é um desafio, pois como já foi dito, os processos no intestino envolvem diversos fenômenos, e claramente, qualquer modelo único pode representar apenas uma parte deste comportamento, e de forma muito simplificada (GOLDING; WOOSTER, 2010; THARAKAN et al., 2010).

Os modelos *in vitro* descritos geralmente envolvem um, dois ou três passos da digestão, simulando a digestão gástrica, a digestão gástrica/intestino delgado e digestão gástrica/intestino delgado/intestino grosso, respectivamente. Os modelos *in vitro* são divididos em estáticos e dinâmicos, sendo que os modelos estáticos tentam recriar a bioquímica de diferentes regiões do trato gastrointestinal, individualmente ou em série. Nestes modelos, os passos da digestão são simulados pela exposição de um material teste numa solução enzimática em um pH e temperatura fixos durante um determinado período de tempo. Para cada região um coquetel simulado de enzimas (lipases, proteases, etc.), tensoativos (sais biliares, fosfolipídios) e reguladores de acidez são utilizados com base no entendimento das condições fisiológicas. A fase gástrica é reproduzida primeiramente, e no mesmo reator é simulada a fase intestinal (KONG;

SINGH, 2008; McCLEMENTS; DECKER, 2009; GOLDING; WOOSTER, 2010; GUERRA et al., 2012).

A vantagem dessa abordagem é sua facilidade, baixo custo e boa reprodutibilidade. A desvantagem de tais sistemas é que eles são totalmente incapazes de reproduzir a dinâmica das secreções bioquímicas, absorção da digestão, respostas hormonais, ou esvaziamento gastrointestinal e motilidade. O desafio de tentar obter uma boa correlação com as condições fisiológicas é também complicado pelo fato de que pode haver variação significativa nas condições bioquímicas entre os modelos (McCLEMENTS; DECKER, 2009, GOLDING; WOOSTER, 2010).

2.3.1 Modelos dinâmicos de digestibilidade

Na tentativa de alcançar uma melhor correlação entre os comportamentos *in vivo* e *in vitro*, os modelos dinâmicos de digestibilidade *in vitro* têm sido desenvolvidos para simular mais efetivamente os atributos bioquímicos, biomecânicos e temporais que ocorrem *in vivo*, assim como dos efeitos dos alimentos. Kong e Singh (2008) e Golding e Wooster (2010) relatam alguns estudos nesta área feitos por vários pesquisadores como: o uso de um tubo de silicone para fazer movimentos peristálticos, com o intuito de produzir a mistura gástrica do alimento; desenvolvimento de um simulador do ecossistema microbial do intestino humano para estudar as interações microbianas no TGI, para tal, utilizaram 6 reatores multicâmara controlados, que simula as condições do estômago, do duodeno/jejuno, do íleo, do ceco e do cólon ascendente; desenvolvimento de um sistema de digestão dinâmica no qual o pH e o conteúdo de pepsina foram ajustados por bombas peristálticas controladas pelo computador; utilização da ressonância magnética para descrição dos processos biomecânicos e de transporte que ocorrem no intestino, sendo que tais dados foram integrados em um projeto modular abrangente do estômago e do intestino delgado, incorporando condições mais realistas de mistura e simulando as forças de cisalhamento existentes no processo de digestão, especialmente no que diz respeito no trânsito entre o estômago e o intestino. Tharakan et al. (2010) desenvolveram um modelo *in vitro* para estudar o efeito da formulação na digestão do alimento; tal modelo focou-se na modelagem dos fenômenos de transporte para estudo da mistura, bem como as taxas das reações que ocorrem no processo e prever as concentrações das espécies disponíveis para absorção.

Outros modelos mecânicos de sistema de digestão têm sido desenvolvidos, tais como o modelo intestinal TNO (sistema TIM – 1 – *TNO intestinal model*), desenvolvidos pelo *TNO Nutrition and Food Research* (Zeist, Holanda) (MINEKUS; HAVENAAR, 1996). Este modelo é um sistema dinâmico multi-compartimental, controlado por sistemas computacionais, que simula as condições *in vivo* e os eventos cinéticos que ocorrem no trato gastrointestinal humano (MCALLISTER, 2010; RIBNICKY et al., 2014). O sistema TIM – 1 é um sistema gastrointestinal considerado completo e permite uma simulação muito próxima dos eventos dinâmicos *in vivo* que ocorrem no estômago e no lúmen do intestino delgado (GUERRA et al., 2012). Os parâmetros usados neste sistema são baseados em dados de estudos em voluntários humanos e integra parâmetros-chaves da digestão humana, tais como simulação das condições fisiológicas humanas no estômago e no intestino delgado, incluindo simulações na mudança de pH, temperatura, movimentos peristálticos, secreções de enzimas, bile e suco pancreático e absorção de produtos de digestão. Em particular, este modelo dinâmico do TGI tem sido largamente usado em análises farmacológicas e de alimentos para testes em humanos e animais (KONG; SINGH, 2008; REIS et al., 2008; McCLEMENTS; DECKER, 2009; MCALLISTER, 2010; THARAKAN et al., 2010).

O sistema TIM – 1 consiste de quatro sucessivos compartimentos, como mostrado na Figura 2.11, simulando o estômago, duodeno, jejuno e lúmen. Cada compartimento é formado por duas unidades básicas conectadas, revestidas de vidro com uma parede flexível dentro, onde circula água a 37° C. As paredes flexíveis são periodicamente contraídas e relaxadas, alterando a pressão da água que permite a mistura do quimo. O quimo transita por compartimentos gástricos e intestinais, abrindo e fechando as válvulas peristálticas que ligam os compartimentos. O volume de compartimentos, pH, enzimas e sais são monitorados e continuamente controlados pelo computador (KONG; SINGH, 2008; McCLEMENTS; DECKER, 2009).

Figura 2.11: Diagrama esquemático do modelo *in vitro* gastro-intestinal, TIM – 1: (A) compartimento gástrico; (B) duodeno; (C) jejuno; (D) íleo; (E) revestimento de vidro; (F) parede flexível; (G) bomba rotatória; (H) válvula pilórica; (I) eletrodos de pH; (J) válvula de secreção; (K) pré-filtro; (L) membrana de fibra oca; (M) filtrado de jejuno; (N) válvula ileal (Fonte: REIS et al., 2008).

Os compartimentos são equipados com eletrodos de pH, e os valores de pH são controlados por programas computacionais pela adição de 1 mol.L^{-1} de HCl e 1 mol.L^{-1} de NaHCO_3 , respectivamente nos compartimentos de estômago e do intestino delgado, através de bombas de seringa (KRUL et al., 2000).

Os compartimentos do jejuno e do íleo são conectados a membranas de fibras ocas, e a bioacessibilidade é definida como a quantidade de composto liberado da matriz alimentícia que podem atravessar essas membranas (VERWEI et al., 2006; RIBNICKY et al., 2014).

O sistema TIM – 1 tem sido utilizada para investigar a bioacessibilidade em diversas áreas, como em alguns fito-químicos, nutrientes normalmente encontrados na dieta e formulações farmacêuticas (BLANQUET et al., 2004; MINEKUS et al., 2005; VERWEI et al., 2006; RIBNICKY et al., 2014). No entanto, no que diz respeito a sistemas nanoparticulados, estes estudos precisam ser mais aprofundados.

2.4 ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE

Tem se verificado um aumento de estudos de toxicologia em nanopartículas, especialmente no que diz respeito ao uso médico e farmacológico (DOKTOROVOVA; SOUTO; SILVA, 2014), devido as exigências de perfis biocompatíveis aceitáveis (LOH et al., 2010). No entanto, este aumento não tem se verificado em nanopartículas de grau alimentício (YU; HUANG, 2013).

Tais estudos se tornam interessante na área alimentícia, pois nanopartículas ingeridas, se tóxicas, podem prejudicar as células do epitélio intestinal, causando o seu rompimento e, desta forma, prejudicar a sua função protetora. A absorção das nanopartículas na camada epitelial do intestino delgado é uma possível rota de transporte para a circulação sanguínea. A translocação das nanopartículas à corrente sanguínea pode resultar em transporte e absorção por órgãos, como o fígado, podendo causar efeitos tóxicos (WANG et al., 2002). Desta forma, a possível toxicidade das nanopartículas precisa ser examinada nesses dois órgãos (YU; HUANG 2013).

Modelos *in vitro* fornecem meios efetivos e rápidos para avaliar alguns parâmetros toxicológicos, além de informações refinadas sobre a forma de como as nanopartículas interagem com as células humanas (ARORA; RAJWADE; PAKNIKAR, 2012). Um ensaio comum para avaliar a citotoxicidade é o estudo da viabilidade celular (HUR et al., 2012; DOKTOROVOVA; SOUTO; SILVA, 2014), que consiste de uma abordagem *in vitro* de cultura de células (LOH et al., 2010).

O epitélio intestinal humano é composto por vários tipos de células: enterócitos, células caliciformes, células de Paneth, células endócrinas e células-tronco. Uma das principais linhagens de células usadas na pesquisa nutricional é a célula CaCo-2. Sob condições adequadas, as células CaCo-2 se diferenciam espontaneamente em enterócitos polarizados exibindo monocamadas similares às barreiras características de absorção da camada epitelial do intestino delgado. Tais células são bem conhecidas na área farmacêutica como um modelo *in vitro* do epitélio intestinal e são largamente utilizados para triagem das propriedades da permeabilidade intestinal. No entanto, também têm sido empregadas na literatura células de CaCo-2 na bioquímica dos lipídios, para examinar os aspectos intracelulares na montagem da lipoproteína, e recentemente tem sido avaliada como uma perspectiva dos modelos *in vitro* para avaliar a influência dos lipídios e excipientes lipídicos na incorporação de fármacos em

lipoproteínas e transportadores linfáticos (TREVASKIS et al., 2008; LAPPARA et al., 2009; JONES; GRAINGER, 2009).

Uma alternativa viável para a avaliação da toxicidade hepática é o estudo de células cancerígenas derivadas do hepatoblastoma humano, como as HEPG-2, as quais são de fácil crescimento (LOH et al 2010; YU e HUANG 2013). Estas células são altamente diferenciadas e exibem muitas características genótípicas e fenotípicas de células de fígado normais. Elas preservam muitas das funções celulares encontradas no fígado e podem ser cultivadas indefinidamente para estudos de longo prazo (AHMAD et al., 2012; SAHU et al., 2013).

O metabolismo celular é o foco de diversos ensaios de viabilidade celular, e o mais utilizado, quando se trata de partículas lipídicas, é o MTT. Este método é colorimétrico, rápido e quantitativo, e está baseado na clivagem do sal amarelo tetrazolin (MTT) em cristais roxos insolúveis de formazan por células metabolicamente ativas (HUR et al., 2012; DOKTOROVOVA; SOUTO; SILVA, 2014). Além do MTT, outros ensaios com base em corantes de formazan têm sido utilizados, incluindo azul de Alamar (AB), WST-1 e WST-8 (sais de tetrazólio). Outro tipo de ensaio de viabilidade celular é baseado na absorção do corante, dentre eles o Vermelho neutro (do inglês *Neutral red* - NR) e Trypan Blue. O ensaio de NR baseia-se no acúmulo deste corante nos lisossomos de células vivas. Já o Trypan Blue baseia-se no fato de que as células vivas podem excluir ativamente o corante, enquanto que as células mortas acumulam o corante. A avaliação baseia-se na contagem de células vivas vs as células mortas marcadas pelo corante acumulado (JONES; GRAINGER 2009; DOKTOROVOVA; SOUTO; SILVA, 2014).

A partir das informações expostas na presente revisão bibliográfica, é possível observar a importância do uso de sistemas coloidais lipídicos para o aumento da bioacessibilidade de bioativos hidrofóbicos. Nanopartículas lipídicas sólidas são uma das dispersões coloidais mais utilizadas para a encapsulação de tais bioativos e podem ser produzidas através de métodos de baixa energia, como o método PIT. No entanto, a produção de nanopartículas lipídicas sólidas por tal método começaram a ser desenvolvidas a pouco tempo. Outro ponto importante é que, caso se deseje incorporar estes sistemas em formulações alimentícias, é importante o estudo de seu comportamento no TGI, que podem ser realizados através do uso de sistemas como o

sistema TIM – 1 ou similares. Este modelo *in vitro* dinâmico de digestibilidade é considerado um dos mais completos da atualidade e tem sido muito utilizado em diversas áreas. No entanto, são necessários estudos mais extensivos sobre a bioacessibilidade de sistemas nanoparticulados. Como foi visto, o estudo da citotoxicidade das nanopartículas é importante para o alcance de perfis biocompatíveis aceitáveis, e podem ser realizados através de linhagens celulares; no entanto, não tem sido observado um aumento muito grande destes estudos em nanopartículas de grau alimentício. Dentro deste contexto, insere-se a importância do presente trabalho de Doutorado, que pretende ser uma contribuição à produção de nanopartículas lipídicas sólidas pelo método PIT, sendo tais sistemas lipídicos avaliados em relação à sua digestibilidade e à capacidade de tornar o bioativo encapsulado, no caso o beta-caroteno, bioacessível. Além disso, no decorrer da realização desta Tese foram realizados experimentos para acessar a citotoxicidade dos sistemas produzidos.

3 OBJETIVOS

Os objetivos principais desta Tese de Doutorado foram a produção de nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando beta-caroteno pelo método de temperatura de inversão de fase (método PIT) e a investigação de sua digestibilidade *in vitro* e citotoxicidade. Para que estes objetivos fossem alcançados, fez-se necessário alcançar os seguintes objetivos específicos:

(i) Estabelecimento do protocolo de produção das nanopartículas lipídicas sólidas pelo método PIT, incluindo-se o método de agitação, o binômio velocidade de agitação/tempo, avaliação do efeito da razão entre tensoativo/lipídio (SOR – *surfactant oil ratio*), determinação dos ciclos de aquecimento e resfriamento dos sistemas nanoparticulados de modo a garantir a sua estabilidade ao se afastar da zona de transição de fases;

(ii) Caracterização das dispersões coloidais através de análises de calorimetria diferencial de varredura e análises morfológicas por microscopia eletrônica de transmissão;

(iii) Avaliação da vida de prateleira dos sistemas coloidais produzidos, através de análises de diâmetro médio hidrodinâmico, distribuição de tamanho de partícula, quantificação do beta-caroteno, quantificação de alfa-tocoferol, avaliação da oxidação lipídica;

(iv) Avaliação da estabilidade das nanopartículas lipídicas em diferentes condições de *stress* normalmente encontradas em processos de produção de alimentos;

(v) Avaliação da digestibilidade das nanopartículas, bioacessibilidade do beta-caroteno e a liberação de ácidos graxos livres, em sistemas de digestibilidade *in vitro*.

(vi) Avaliação da citotoxicidade do bioativo encapsulado, pelo método colorimétrico MTT, através de linhagens celulares de CaCo-2 e HEPG-2, que representam respectivamente células do epitélio intestinal e do fígado.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Produção das nanopartículas lipídicas

Os lipídios utilizados para a produção das nanopartículas foram a manteiga de cupuaçu (Casa do Saboeiro, Santa Barbara D'Oeste, SP) e a manteiga de murumuru (Casa do Saboeiro, Santa Barbara D'Oeste, SP). Os tensoativos testados foram o óleo de mamona hidroxilado 40PEG (Cremophor RH40 ou Koliphor RH 40, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e o éster de sorbitan monooleato (Span 80) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

O bioativo incorporado nas nanopartículas lipídicas foi o beta-caroteno na sua forma cristalina pura (Fluka, pureza 97%). Alfa-tocoferol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, pureza 97%) foi adicionado também em algumas formulações.

Para avaliar a estabilidade das partículas em diferentes meios utilizou-se sacarose (Synth, Diadema, SP), cloreto de sódio (Synth, Diadema, SP), NaOH (Synth, Diadema, SP) e HCl (Chemycalis, Americana, SP).

Na quantificação do beta-caroteno e alfa-tocoferol encapsulado nas nanopartículas empregou-se n-hexano (Merck, Darmstadt, Alemanha), metanol (Merck, Darmstadt, Alemanha), etanol (Merck, Darmstadt, Alemanha), hidróxido de potássio (Synth, Diadema, SP) e sulfato de sódio anidro (Synth, Diadema, SP) (este ultimo somente para a quantificação do beta-caroteno)

Por sua vez, na quantificação da oxidação lipídica pelo método do TBARS (determinação de espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico) empregou-se ácido tricloroacético (TCA), ácido tiobarbitúrico, ácido clorídrico (HCl), di-terc-butil metil fenol (BHT) e o 1,1,3,3 – tetraetoxipropano (TEP), todos provenientes da Merk (Darmstadt, Alemanha).

Tabela 4.1: Dados dos tensoativos empregados nos experimentos realizados.

Tensoativo	HLB	Molécula
Cremophor RH40	15	$ \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{O}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_L-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2\text{O}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_M-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2\text{O}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_N-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3 \\ \text{O}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_X-\text{H} \\ \text{O}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_Y-\text{H} \\ \text{O}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_Z-\text{H} \end{array} $ $(L+M+N+X+Y+Z = 40)$
Span 80	4,3

(Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/85548?lang=pt®ion=PT>)

4.1.2 Ensaios de digestibilidade *in vitro*

Para os testes de digestibilidade foram usados as enzimas pepsina da mucosa gástrica suína (600 U.mL), lipase de pâncreas suíno (40 U.mL), pancreatina de pâncreas suíno (8xUSP) e extrato de bile suína em pó, todos provenientes da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Para o preparo das soluções eletrolíticas gástricas e intestinais foram empregados bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e os cloretos de sódio, potássio e cálcio provenientes da Panreac (Spain).

Na quantificação da bioacessibilidade do beta-caroteno na mucosa intestinal, empregou-se n-hexano (Panreac, Spain), metanol (Panreac, Spain), etanol (Fisher Scientific, NJ, USA) e hidróxido de potássio (Panreac, Spain), clorofórmio (Fisher Scientific, NJ, USA).

Nas análises de quantificação de ácidos graxos livres usou-se acetona (Fisher Chemical, UK), hidróxido de sódio (Panreac, Spain) e fenolftaleína (Panreac, Spain).

4.1.3 Estudos em linhagens de células

Os reagentes utilizados nas linhagens de células *in vitro* foram DMEM (*Dulbecco's modified Eagle Media*), soro fetal bovino, antibiótico penicilina/streptomisina, aminoácido glutamax, tripsina com EDTA 0,05%, PBS. Para a

contagem e congelamento das células também foi utilizados o azul de tripan e o DMSO. Todos os reagentes aqui descritos foram provenientes da Invitrogen (NY, USA)

Nos ensaios de MTT utilizou-se o sal tetrazolium (MTT- Thiazoyl Blue Tetrazolium Bromide) (Amresco, OH, USA) e álcool isopropílico ácido 0,04 em HCl 0,01N.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Produção das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) pelo método temperatura de inversão de fase (método PIT)

A fase lipídica (manteiga de cupuaçu ou manteiga de murumuru, 10% em massa) foi aquecida 10° C acima da temperatura de fusão do lipídio, e ao mesmo tempo foi feita uma solução aquosa, contendo os tensoativos (20% em massa, sendo 12% Cremophor RH40 ou Kolliphor RH40, e 8% span 80) a qual foi aquecida até a mesma temperatura da fase lipídica. A fase lipídica quente foi dispersa na solução de tensoativo aquecida usando-se agitação mecânica (MA259, Marconi, Piracicaba, Brasil). Em seguida, a emulsão obtida foi submetida aos ciclos de resfriamento e aquecimento para produção das nanopartículas por temperatura de inversão de fase, tendo sido testados até três ciclos. Os ciclos de resfriamentos foram realizados no agitador magnético e os ciclos de aquecimento no agitador mecânico (Figura 4.1).

Quando presentes, o alfa-tocoferol foi adicionado no 1° ciclo de aquecimento, juntamente com a fase lipídica; já o beta-caroteno no 2° ciclo de aquecimento quando o sistema atingiu temperatura próxima de 60° C.

A intensidade e o tempo de agitação utilizados na etapa de agitação mecânica foi 500 rpm por 10 min.

Figura 4.1: Produção das nanopartículas lipídicas sólidas pelo método PIT. Formação da emulsão através do aquecimento e agitação mecânica da fase lipídica e da solução aquosa contendo tensoativo, e posterior submissão a ciclos de resfriamento e aquecimento.

4.2.2 Determinação da temperatura de inversão de fases

Primeiramente a inversão de fase foi observada visivelmente, através da mudança na viscosidade e transparência (MORALES et al., 2003) Foram obtidas curvas de condutividade *vs.* temperatura, sendo a temperatura de inversão de fases (T_{PIT}) determinada pela média entre a temperatura de início do decaimento da condutividade e a temperatura mínima atingida pelo sistema após a inversão de fases. Os valores de condutividade foram obtidos utilizando-se um condutivímetro Inolab 740 (WTW, Alemanha), acoplado a uma célula Tetracon 325.

4.2.3 Determinação de diâmetro médio e distribuição de tamanho de partícula

O diâmetro médio hidrodinâmico das nanopartículas lipídicas sólidas foi determinado por espectroscopia de correlação de fótons (PCS, *photon correlation spectroscopy*), utilizando-se o equipamento Zeta Plus (Brookhaven Instruments Company, EUA), com um laser de He-Ne de 627 nm com um ângulo de incidência de 90 °, na temperatura de 25 ° C. Antes da análise as amostras foram diluídas com água ultrapurificada para evitar interferências devido ao espalhamento múltiplo.

4.2.4 Quantificação do beta-caroteno encapsulado

A quantificação do beta-caroteno encapsulado foi feita por espectrofotometria, e para tanto foi necessário extraí-lo das nanopartículas lipídicas. A amostra de nanopartículas foi diluída 100 vezes, e a 2 ml da amostra diluída adicionou-se 1,5 ml de

etanol, com a finalidade de desestabilizar a emulsão, e 1 ml de metanol contendo hidróxido de potássio, para promover a saponificação. Após agitação em vórtex por 10 segundos, o sistema foi deixado sob aquecimento (45°C) por 30 minutos, com o intuito de aumentar a taxa de reação. Decorrido este tempo, a porção apolar do sistema bifásico, que continha o beta-caroteno foi extraída, e a ela adicionou-se 2 ml de hexano (contendo 0,01% de BHT), o sistema resultante foi agitado por 30 segundos no vórtex. Este procedimento de extração e agitação foi repetido 3 vezes. A obtenção da fase orgânica se deu após 10 minutos, e o passo subsequente foi a sua leitura a 450 nm, que é o comprimento de onda de absorção máxima do beta-caroteno em hexano. Para a leitura em espectrofotômetro a camada superior foi removida e adicionou-se sulfato de sódio anidro para absorção de possíveis resíduos de água. Este protocolo foi uma adaptação do protocolo publicado em Cornacchia e Roos (2011).

4.2.5 Estabilidade das nanopartículas em diferentes condições de *stress*

A estabilidade físico-química das nanopartículas contendo beta-caroteno (com e sem alfa-tocoferol) foi avaliada em relação à influência de condições de *stress* tipicamente encontrada em alimentos. Para tal, as nanopartículas foram submetidas a diferentes condições de pH, temperatura, e concentrações de sal e açúcar protocolos adaptados de (DING et al., 2012; SILVA et al., 2014).

As partículas foram armazenadas em geladeira (~ 7° C) e avaliadas no dia zero e no caso de ausência de desestabilização (ou seja, ausência de separação de fases visível) no dia 5, em relação à quantidade de beta-caroteno e à distribuição do tamanho de partícula. Os sistemas submetidos às diferentes condições meios foram comparados com o sistema controle, ou seja, aquelas partículas que não foram submetidas a nenhuma condição de *stress*, e o beta-caroteno só foi quantificado quando apresentou distribuição do tamanho de partícula próximo ao controle.

As análises do dia zero foram realizadas após 60 minutos da exposição das partículas aos diferentes meios.

pH: Alíquotas de 10 ml das NLS foram submetidas aos valores de pH 3; 4,5; 6 e 8.

Temperatura: Alíquotas de 10 ml foram submetidas às temperaturas de 35, 55, 75 e 95°C por 5 e 15 minutos.

Sal: Diferentes concentrações de NaCl (0,025M; 0,1M; 0,25M; 0,5M e 1M) foram acrescentadas a 15 ml de amostra de NLS.

Sacarose: Diferentes concentrações de sacarose (1,5%; 7,5%; 10%; 15%) foram acrescentadas a 15 ml de amostra de NLS.

Tabela 4.2: Formulações de nanopartículas lipídicas sólidas empregadas nos testes de estabilidade em diferentes condições de *stress*

Formulação	Lipídio total (% massica)	Tensoativo (% mássica)	β -caroteno (mg)	α - tocoferol (mg)
MM – BC – toc.	10	20	120	60
MM – BC.	10	20	-	-
MC –BC – toc. .	10	20	120	60
MC–BC	10	20	-	-

4.2.6 Quantificação de alfa-tocoferol encapsulado

Para a extração do alfa-tocoferol contido nas nanopartículas lipídicas seguiu-se o mesmo protocolo utilizado na extração do beta-caroteno; no entanto, após desestabilização da dispersão, o alfa-tocoferol sobrenadante foi mensurado segundo protocolo baseado em Relkin e Shukat (2012), que consiste de leitura em espectrofluorímetro (Perkin Elmer, LS55, Waltham Massachusetts, EUA), utilizando 290 e 327 nm como comprimentos de onda para excitação e emissão do alfa-tocoferol, respectivamente.

4.2.7 Avaliação da oxidação lipídica

As substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram usadas para mensurar os produtos resultantes da reação secundária da oxidação lipídica. Primeiramente, foram produzidos 100 ml da solução de TBA – TCA – HCl. Uma solução de TCA com TBA e HCl foi preparada na seguinte proporção: 15g de TCA, 0,33g de TBA, 1,8ml de 12M HCl e 83ml de água. Adicionou-se a esta solução 3ml de etanol contendo 2% (mássico) de BHT. Misturou-se 2ml da solução final obtida com 2 ml da amostra de NLS. Esta mistura foi então aquecida em água fervente por 15 min e

resfriada até temperatura ambiente, e então centrifugada a 1000g por 20 min. Decorrido os 20 minutos, a absorbância do sobrenadante foi medida no comprimento de onda igual a 532 em espectrofotômetro (Biochrom Libra 22S). A concentração de TBARS foi determinada pela curva padrão usando 1,1,3,3 – tetraetoxipropano (TEP). Este protocolo é uma adaptação do procedimento utilizado por Lee et al. (2011).

4.2.8 Monitoramento da vida de prateleira das nanopartículas lipídicas

As nanopartículas lipídicas produzidas foram monitoradas ao longo do tempo de armazenagem, sob refrigeração, em relação ao diâmetro médio hidrodinâmico e à distribuição de tamanho de partícula, quantificação do beta-caroteno, quantificação de alfa-tocoferol (quando presente na formulação) e avaliação da oxidação lipídica.

As análises de determinação de diâmetro médio e distribuição de tamanho de partícula, quantificação do beta-caroteno, quantificação de alfa-tocoferol e oxidação lipídica estão descritas respectivamente nos itens 4.2.3, 4.2.4, 4.2.6 e 4.2.7.

4.2.9 Calorimetria diferencial de varredura

A calorimetria diferencial de varredura (DSC) foi realizada em equipamento TA5000 (TA Instruments, EUA), em varreduras no intervalo de 0 a 100° C, usando rampa de 10° C/min, em atmosfera inerte (45 mL/min de N₂) no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) do Departamento de Engenharia de Alimentos do ZEA-FZEA-USP. Um cadinho de alumínio vazio foi utilizado como referência. As temperaturas *onset* (T_o) e de transição de fases (pico) (T_m) foram determinadas pelo software Universal Analysis V.7 (TA Instruments).

4.2.10 Processo de digestão *in vitro* simulada

4.2.10.1 Digestão *in vitro* dinâmica simulada

Foi utilizado um modelo *in vitro* dinâmico, cuja montagem experimental existente no Laboratório de Instalações Piloto (LIP), no departamento de Engenharia Biológica/UMINHO, foi baseada no sistema TIM – 1 (*TNO intestinal model*) (REIS et al., 2008). Tal modelo simula as principais condições que ocorrem durante a digestão no trato gastrointestinal, e consiste de quatro compartimentos: (A) estômago, (B) duodeno, (C) jejuno e (D) íleo. Cada compartimento é formado por duas unidades revestidas de

vidro conectadas uma a outra (E) com uma parede flexível (F) por dentro (produzidos com sacos plásticos de *stomacher*). Água é bombeada através de um banho de aquecimento (J) em torno das paredes flexíveis para manter a temperatura a 37°C e para fazer a pressão sobre as paredes flexíveis, que irá permitir a mistura do quimo pela compressão e relaxação das paredes flexíveis, mimetizando os movimentos peristálticos existentes no TGI. As alterações na pressão de água são alcançadas por meio de bombas peristálticas (K), que alteram a direção do fluxo de acordo com controlador (L) conectado a eles.

Os compartimentos estavam ligados por tubos de silicone, e a passagem do quimo foi interrompida/desobstruída por pinças de Hoffman; e a cada 20 minutos um volume constante de quimo foi transferido para o outro compartimento através da abertura, manual, da pinça de Hoffman. Este procedimento foi realizado com o intuito de simular a continuidade do sistema, ou seja, após 20 minutos do início da digestão no estômago abriu-se o compartimento e uma alíquota foi transferida para o duodeno, onde começou a ser introduzida a secreção duodenal; após 20 minutos foram abertos os dois compartimentos e se deu início à digestão no jejuno, e assim sucessivamente, até que se findasse a digestão.

Todos os compartimentos continham eletrodos de pH (L) e os valores de pH foram controlados manualmente utilizando-se as injeções de HCl (1 mol.L⁻¹) e NaHCO₃ (1 mol.L⁻¹). Os fluidos gástrico e intestinal foram adicionados através de bombas de seringa (H) e repostos sempre que necessário. Os compartimentos do jejuno e íleo estavam ligados a fibras ócas (I) (SpectrumLabs Minikros ®, M20S-100-01P, EUA), para simular a absorção que ocorre no intestino.

Figura 4.2: Sistema gastro intestinal dinâmico usado nos experimentos de digestão *in vitro* dinâmica: (A) compartimento gástrico, (B) compartimento duodenal; (C) compartimento jejunal; (D) compartimento íleal; (E) revestimento de vidro, (F) paredes flexíveis, (G) eletrodos de pH, (H) bombas de seringa, (I) membranas de fibras ocas, (J) banho de água com aquecimento, (K) bombas peristálticas, (L) controladores das bombas, (M) amostras coletadas do filtrado do jejunum, filtrado do íleo e final do íleo, armazenadas em gelo

O protocolo para a digestão *in vitro* dinâmica foi baseada em Reis et al. (2008), com modificações. Um volume de 40 mL de dispersão de nanopartícula contendo beta-caroteno foi introduzido no sistema através do compartimento gástrico, e o experimento ocorreu durante 5h, simulando as condições fisiológicas médias do TGI pela adição continua dos fluidos gástrico, duodenal, jejunal e íleal. O fluido gástrico consistiu de pepsina e lipase em uma solução eletrolítica gástrica ($\text{NaCl } 4.8\text{g.L}^{-1}$, $\text{KCl } 2.2\text{g.L}^{-1}$, $\text{CaCl}_2 0.22\text{g.L}^{-1}$ e $\text{NaHCO}_3 1.5\text{g.L}^{-1}$), injetadas numa vazão de $0,33 \text{ mL.min}^{-1}$. O pH foi controlado seguindo-se uma curva pré-determinada (de 4,8 em $t = 0$ até 1,7 em $t = 120$

min) através do acréscimo de HCl (1mol.L^{-1}). O fluido duodenal simulado consistia de uma mistura de 4% (m/v) de extrato bile suína (66 ml), 7% (m/v) de solução de pancreatina (34 ml), e 20 ml de solução eletrolítica intestinal (SIES) ($\text{NaCl } 5\text{ g.L}^{-1}$, $\text{KCl } 0.6\text{ g.L}^{-1}$, $\text{CaCl}_2\text{ } 0.25\text{ g.L}^{-1}$) a uma vazão de $0,66\text{ ml.min}^{-1}$. O fluido jejunal simulado continha solução de SIES com 10% de extrato de bile suína em uma vazão de 2.13 ml.min^{-1} . O fluido ileal continha SIES a uma vazão de 2.0 ml.min^{-1} . O pH nas diferentes partes do intestino foi controlado pela adição de 1mol.L^{-1} de NaOH para 6,5; 6,8 e 7,2 no duodeno, jejuno e íleo respectivamente. Durante a digestão *in vitro*, efluxos foram coletados diretamente do lúmen de hora em hora, após as unidades de filtração e a válvula ileal, para análises de tamanho de partícula, potencial zeta, bioacessibilidade e ácidos graxos livres (AGL). Os tamanhos médios de partícula e valores de potencial zeta também foram avaliados para o estômago (depois de 90 min) e duodeno (após 120 min). As amostras eram armazenadas em gelo até o momento das análises.

4.2.10.2 Digestão *in vitro* estática simulada

A digestão *in vitro* estática foi realizada em reator de vidro encamisado, para controle de temperatura (37°C), e sob agitação magnética, para promover a homogeneidade das misturas. O protocolo utilizado baseou-se em alguns estudos já existentes na literatura (AHMED et al., 2012; SALVIA-TRUJILLO et al., 2013; YANG; McCLEMENTS, 2013). A digestão foi simulada apenas para os compartimentos do estômago e duodeno, visto que estas são as principais etapas encontradas na literatura quando se trata de modelos estáticos referentes à digestão de lipídios e beta-caroteno.

As concentrações de sais e enzimas foram as mesmas utilizadas para a digestão dinâmica, descritas no item 3.2.10.1. Para a simulação do modelo estático, 40 ml da dispersão de nanopartícula foi misturada com o fluido gástrico simulado e o pH ajustado para 1,7 com a adição de HCl (1 mol.L^{-1}); a solução foi agitada e mantida a temperatura constante (37°C) por duas horas para mimetizar as condições estomacais. Para a simulação do duodeno, 40 ml da amostra digestiva, proveniente do estágio gástrico, foi adicionada ao fluido intestinal delgado simulado e o pH foi ajustado para 6,5 com adição de NaOH (1 mol.L^{-1}); mais uma vez a solução foi agitada e mantida a 37°C por duas horas.

Figura 4.3: Representação esquemática da montagem utilizada para a digestibilidade *in vitro* estática: (A) reator de vidro encamisado, (B) eletrodo de pH, (C) banho de água quente a 37°C, (D) entrada da amostra e dos fluidos, (E) agitador magnético.

Foram retiradas alíquotas dos dois estágios para análise de tamanho de partícula e potencial zeta. No estágio duodenal também foi analisado a bioacessibilidade e ácidos graxos livres (AGL).

4.2.11 Quantificação de ácidos graxos livres liberados durante a digestão *in vitro* estática

A determinação de ácidos graxos livres liberados das nanopartículas foi feita através de titulação. De maneira resumida, 5 ml do filtrado do jejuno, filtrado do íleo e final do íleo foram recolhidos e 10 ml de acetona foram adicionados a tais filtrados para a inativação das enzimas digestivas. A seguir, 3 gotas de fenolftaleína 1% (m/v) foram adicionados como indicador de viragem. A titulação foi executada pela adição de NaOH 0,1 mol.L⁻¹ através de uma bureta, até o ponto de viragem, e o volume foi utilizado para calcular a quantidade de ácidos graxos livres produzido pelo processo de lipólise. A porcentagem de ácidos graxos livres liberado foi calculada pela expressão dada na Equação (2) (BONNAIRE et al., 2008).

$$\%AGL = 100X \frac{(V_{NaOH} \times m_{NaOH} \times M_{lipidio})}{(W_{lipidio} \times 2)} \quad (2)$$

Nesta expressão, o V_{NaOH} é o volume de hidróxido de sódio necessário para neutralizar os ácidos graxos livres gerado (em ml), m_{NaOH} é a molaridade do hidróxido de sódio usado (em mol.L⁻¹), $W_{\text{lipídio}}$ é o peso total de lipídio inicialmente presente e $M_{\text{lipídio}}$ é o peso molecular do lipídio (baseado na média do peso molecular da composição dos ácidos graxos livres em g.mol⁻¹, que foi de 246,6 g.mol⁻¹ para a manteiga de cupuaçu e de 206,0 g.mol⁻¹ para a manteiga de murumuru).

4.2.12 Avaliação da bioacessibilidade do beta-caroteno encapsulado

4.2.12.1 Avaliação da bioacessibilidade na digestibilidade *in vitro* dinâmica

Nos experimentos realizados, assumiu-se que a fração de beta-caroteno encapsulado que migrou para a fase micelar pode ser considerado como uma medida indireta da bioacessibilidade do bioativo (AHMED et al., 2012), e que as micelas mistas contendo a fração de beta-caroteno bioacessível foram capazes de passar pelas membranas de fibras ocas (ou seja o filtrado do jejuno e filtrado do íleo), enquanto as emulsões não digeridas ficaram retidas no sistema de digestão simulada (MINEKUS et al., 2005). A bioacessibilidade foi determinada baseada em metodologia descrita por Cornacchia e Roos (2011) (item 4.2.4), sendo que as etapas de desestabilização da emulsão não foram realizadas.

4.2.12.2 Avaliação da bioacessibilidade do beta-caroteno na digestibilidade *in vitro* estática

A fase micelar foi obtida através da centrifugação da amostra digerida (*raw digesta*) segundo protocolo descrito por Salvia-Trujillo et al. (2013). Resumidamente, a alíquota de *raw digesta* foi centrifugada a 4000 rpm por 40 minutos a 25° C e o sobrenadante (fase micelar) foi coletado. Possíveis gotículas de óleo contidas na fração micelar foram removidas. O passo subsequente foi adicionar 5 ml de clorofórmio a 5 ml da fase micelar a 1750 rpm por 10 min a 25° C. A fração precipitada, contendo beta-caroteno solubilizado, foi coletada e a fração superior foi misturada novamente com clorofórmio e centrifugada. As mesmas condições de centrifugação foram utilizadas para a *raw digesta*. Após a extração, foi realizada a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm

A concentração de beta-caroteno extraída das amostras foi determinada por curva padrão de absorbância vs concentração de beta-caroteno em clorofórmio. A bioacessibilidade do beta-caroteno foi calculada usando a Equação (3):

$$Bioacessibilidade = 100X \frac{(C_{fase\ micelar})}{(C_{raw\ digesta})} \quad (3)$$

Onde $C_{fase\ micelar}$ e $C_{raw\ digesta}$ são as concentrações de beta-caroteno na fração micelar e na amostra geral (*raw digesta*) depois da digestão estática, respectivamente.

4.2.13 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A microscopia eletrônica de transmissão foi realizada para a observação das nanopartículas de manteiga de murumru e nanopartículas de manteiga de cupuaçu. Além disso, também foi utilizada para o acompanhamento dos estágios da digestão *in vitro* dinâmica, somente para a digestão das nanopartículas produzidas com manteiga de cupuaçu. A microscopia foi conduzida em um microscópio Zeiss EM 902A (Jena, Alemanha), em uma tensão de aceleração de 50kV a 80kV. Na preparação das amostras, uma gota da nanoemulsão (diluída 50x) foi colocada em uma grade de cobre revestida com filme de carbono, subsequentemente foi realizada a coloração com acetato de uranilo e secagem natural à temperatura ambiente. Tais análises foram realizadas do Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC) da Universidade do Porto, Porto, Portugal.

4.2.14 Estudos em linhagens de células *in vitro*, para avaliação da toxicidade celular das nanopartículas lipídicas

Todos os experimentos referentes às linhagens de células foram realizados no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD), no Departamento de Medicina Veterinária da FZEA/USP. Nesta etapa, somente as nanopartículas de murumuru foram analisadas.

4.2.14.1 Cultivos celulares

Foram utilizadas células animais das linhagens HEPG-2 e CaCo-2, adquiridas no Instituto Osvaldo Cruz (Rio de Janeiro, RJ). Que são respectivamente células de hepatoblastoma e carcinoma do cólon (SAHU et al., 2014). Tais culturas de células

foram expostas às dispersões de nanopartículas lipídicas sólidas e avaliadas com o intuito de simular possíveis efeitos da exposição das nanopartículas no fígado e no trato gastrointestinal.

As células foram mantidas em nitrogênio líquido até o dia de sua utilização. O processo de descongelamento consistiu em manter o criotubo congelado, em banho-maria a 37° C até que o conteúdo descongelasse parcialmente, sendo então rapidamente homogeneizado com 10 volumes de meio de cultivo DMEM, adicionado de 1% de antibiótico (*pen-strep*), 2% de aminoácido e 10% de soro fetal bovino, para as linhagens de HEPG-2 e 20% para as linhagens CaCo-2 (HU et al., 2007; LI; GU 2014).

As células então foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos, sendo a seguir o sobrenadante descartado e o pellet de células ressuspensionado em meio de cultivo completo, sendo posteriormente estas células mantidas e replicadas em estufa à 37°C, em atmosfera úmida com 7% de CO₂.

Quando as linhagens atingiram cerca de 80 a 90% de confluência, foram desprendidas da garrafa com solução tripsina com 0,05% de EDTA, sendo mantidas em estufa a 37° C, 7% CO₂ por 3 a 15 minutos, até se soltarem completamente. Posteriormente, as células foram lavadas adicionando 10 mL de meio de cultivo completo. As células foram analisadas em relação ao seu crescimento celular, e para tal foram mantidas em estufa a 37° C, 7% CO₂, sendo seu meio trocado quando necessário.

Para a contagem das células, estas foram tripisinizadas e ressuspensionadas em meio completo. Após homogeneização, 10 µl da suspensão celular foram diluídos em 10 µl de solução de azul de tripan (0,025%) e colocados em câmara de Neubauer para contagem e verificação da viabilidade celular, utilizando-se aumento de 100 vezes. Os quadrantes foram contados, e a concentração de células foi determinada utilizando-se a Equação (4):

$$\frac{n^{\circ} \text{ células totais}}{n^{\circ} \text{ de quadrantes}} \times \text{diluição} \times 10^3 = \frac{\text{células}}{\text{ml}} \quad (4)$$

A diluição normalmente empregada foi igual a 2 (1 de suspensão celular : 1 de azul de tripan).

Figura 4.4: Esquema de visualização para contagem em câmara de Neubauer

Após a contagem, para a sua conservação por tempo indeterminado, as células que não foram utilizadas para o ensaio de MTT, foram congeladas, em crio – tubos, utilizando-se nitrogênio líquido.

4.2.14.2 Ensaio MTT

A maioria dos estudos de viabilidade celular em nanopartículas lipídicas são realizados através do ensaio de MTT, uma análise colorimétrica que mede a atividade celular mitocondrial (DOKTOROVA; SOUTO; SILVA, 2014; YI et al., 2014).

O MTT é um substrato de cor amarelada, que é reduzido por células metabolicamente ativas, produzindo cristais insolúveis de formazam (coloração azul/violeta) no interior das células, os quais são liberados pelo rompimento das membranas celulares, ou seja, este ensaio mede a capacidade das células vivas em reduzir o MTT em formazon (AHMAD et al., 2012).

Após tripinização das culturas celulares, a qual foi realizada quando as linguagens atingiram cerca de 80% a 90% de confluência, as células foram contadas como descrito no item 4.2.14.1.2 e colocadas em placas de 96 poços.

Figura 4.5: Placa de 96 poços utilizada para ensaio de MTT

Os 36 poços que circundam a placa (denominados A1, A2 A12; B1, C1... H1; B12,C12...H12) foram preenchidos com água (100 μ l/poço), com o intuito de compensar possível vaporização do meio utilizado. A segunda fileira (B2 até G2) foi preenchida com meio puro (100 μ l/poço), para servir como branco. Os 54 poços restantes foram preenchidos com as suspensões de células (100 μ l/poço). A quantidade de células introduzida em cada poço foi de 10^4 .

As placas de 96 poços, após terem sido devidamente preenchidas, foram mantidas em estufa a 37°C, 7% CO₂ por 24 e 96h, respectivamente para as culturas celulares de HEPG-2 e CaCo-2. Este tempo foi necessário para promover a aderência das células nas paredes das placas.

Decorrido este tempo, os meios foram descartados e introduziram-se os tratamentos, que consistem de diferentes concentrações da solução de nanopartículas. Para cada placa de 96 poços podem ser testadas oito concentrações de nanopartículas lipídicas sólidas que entram em contato com as células. As concentrações de nanopartículas avaliadas foram 45,5 μ g/ml de dispersão; 22,75 μ g/ml de dispersão; 11,38 μ g/ml de dispersão; 5,69 μ g/ml de dispersão; 2,84 μ g/ml de dispersão; 1,42 μ g/ml de dispersão; 0,71 μ g/ml de dispersão, e 0,36 μ g/ml de dispersão.

Após a introdução dos tratamentos as placas foram mantidas em estufa à 37°C, 7% CO₂ por 48h, e posteriormente foram incubadas com 11 μ l da solução de MTT (sal tetrazolím) para cada 100 μ l de meio/poço, em estufa de CO₂, a 37° C por 2 horas.

Após as 2 horas de incubação, o meio foi retirado por inversão, com auxílio de papel. O passo subsequente foi adicionar, cuidadosamente (de maneira a evitar que o líquido subisse para a tampa), 100 µl /poço de álcool isopropílico ácido e homogeneizar bem até que todos os cristais de formazam fossem dissolvidos (substância produzida pela redução das células metabolicamente ativas), para leitura em espectrofluorímetro (FluoStar optima, BMG labtech) no comprimento de onda de 570 nm.

4.2.14.3 Microscopia ótica

As microscopias óticas foram realizadas em microscópio (Nikon, eclipse TS100) para observar o crescimento celular ao longo do tempo, a aderência nas garrafas de cultivos e nas placas de 96 poços e a confluência. As resoluções utilizadas para observação foram com aumento de 1:4 e 1:20.

4.2.15 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram feitas utilizando análises de variância e teste de comparação de médias de Tukey ($p < 0,05$) usando o programa SAS (Statistical Analysis System, version 9.2., SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS PELO MÉTODO DA TEMPERATURA DE INVERSÃO DE FASE (PIT)

Vários parâmetros foram testados nos experimentos para determinação das condições de processo para a produção das nanopartículas lipídicas, como taxa e temperatura de aquecimento e resfriamento; velocidade e o tempo de agitação; e a razão tensoativo:óleo (SOR – *surfactant oil ratio*).

Foi possível observar que o tamanho e a distribuição de tamanho das partículas foram fortemente dependentes da temperatura final até a qual a dispersão foi resfriada após a inversão de fase, o que está de acordo com o apresentado por Ee et al. (2008). O sistema foi aquecido até aproximadamente 83° C e resfriado até 20° C, numa taxa de resfriamento e aquecimento de respectivamente 10° C/ min e 6° C/min. Tais taxas se mostram baixas, o que evitou a coalescência e a formação de partículas com altos valores de polidispersidade (Ee et al., 2008; RAO; McCLEMENTS, 2010). A temperatura final de resfriamento atingida pelo sistema (20°C) não foi muito diferente de outros estudos encontrados na literatura, que encontraram valores ótimos próximos a 25°C (IZQUIERDO et al., 2002; IZQUIERDO et al., 2004; IZQUIERDO et al., 2005).

Os sistemas só apresentaram inversão de fase quando foram produzidos com 20% em SOR 2:1 e quando misturou-se os tensoativos Cremophor RH 40 e Span 80. Tal resultado está, provavelmente, relacionado com o fato de o aumento da concentração de tensoativo proporciona a diminuição da tensão superficial, o que promove a diminuição do tamanho das partículas da emulsão (FERNANDEZ et al., 2004; IZQUIERDO et al., 2004). Além disso, a literatura demonstra que os tamanhos de partículas são altamente dependentes do SOR em processos de baixa energia, visto que altos valores de SOR são responsáveis por formar partículas de menores dimensões do que aquelas produzidas por baixos valores de SOR (FERNANDEZ et al., 2004; MORALES et al., 2006; SAJIADI, 2006; GUITIRREZ et al., 2008; ANTON; VANDAME, 2009; OSTERTAG et al., 2012).

A mistura dos dois tensoativos propiciou a inversão de fase provavelmente porque o Span 80 permitiu que a estrutura do Cremophor RH 40 (Figura 5.1), que é

muito volumosa, se conformasse de tal maneira que permitisse que o processo de desidratação de sua estrutura ocorresse mais rapidamente, conforme ocorre o aumento da temperatura. Vários estudos que utilizam os métodos de baixa energia têm empregado misturas de tensoativos hidrofilicos e hidrofóbicos, pois a mistura desses tensoativos diminui a tensão interfacial e melhora a estabilidade da emulsão, além de facilitar a mudança de curvatura do tensoativo, e assim, facilitar a inversão de fase (PORRAS et al., 2004; JAHANZAD et al., 2009). A mistura de tensoativos permite a formação de um filme mais coeso ao redor das gotículas dispersas, mantendo-as estáveis através do fortalecimento do filme interfacial. Os tensoativos hidrofilicos e hidrofóbicos permanecem alinhados lado a lado para conferir maior rigidez e força à película emulsionante através de ligações de hidrogênio (PENG et al., 2010).

Figura 5.1: Estrutura molecular do tensoativo Cremophor RH 40

No que se refere às formulações de nanopartículas lipídicas que sofreram transição de fase, todos os ciclos de aquecimento e resfriamento (1º, 2º e 3º) apresentaram resultados parecidos de condutividade vs. temperatura, sendo que a dispersões exibiram aparência totalmente translúcida, bem como diâmetros médios e valores de polidispersidade bastante parecidos. No entanto, apenas a partir do 2º ciclo é que ocorreu declínio significativo da condutividade durante o processo de transição de fases, motivo pelo qual escolheu-se a utilização de 2 ciclos para a produção das partículas, e por isso apenas esse ciclo foi representado nas curvas de condutividade vs. temperatura. As análises de condutividade em função da temperatura do 2º ciclo de aquecimento estão ilustradas na Figura 5.2. Através da média da temperatura entre a maior e a menor condutividade determinou-se a temperatura de inversão de fase (SPERNATH E MAGDASSI, 2007; RAO E MCCLEMENTS, 2010) (Figura 5.2).

Figura 5.2: Evolução da condutividade em função da temperatura para as dispersões de nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com manteiga de murumuru e manteiga de cupuaçu, e suas respectivas temperaturas de transição de fase.

Analisando a Figura 5.2, podemos perceber um declínio da condutividade a partir de 67°C para as nanopartículas produzidas com manteiga de cupuaçu e 71°C para as nanopartículas produzidas com manteiga de murumuru. Tal fenômeno comprova a inversão de fase ocorrida no sistema. De forma mais detalhada, pode-se dizer que, em estado estacionário, o valor da condutividade elevada indica que a fase contínua é a água, e que quando a condutividade tende a zero, a fase contínua é o óleo. Na região de inversão de fase (PIZ – do inglês *phase inversion zone*), a condutividade muda gradualmente, de forma contínua. Essa variação contínua da condutividade sugere a existência de estruturas diferentes de microemulsões ao longo de toda a inversão de fase (ANTON et al., 2007). O pico de condutividade, que aparece logo após a queda, apresentado nessa etapa (PIZ), representa um domínio estreito, onde a fase cristalina líquida lamelar está presente, ou seja, há a formação de estruturas particulares de sistemas bicontínuos tipicamente associados à formação de nanopartículas (HEURTAULT et al. 2002; ANTON et al., 2007).

A avaliação visual, apesar de não ser uma forma direta de comprovação da inversão de fase, nos permite verificar que ocorrem mudanças significativas no aspecto das dispersões ao longo do processo de produção, e dessa forma também nos permite, de forma indireta, observar a existência da inversão de fase (Figura 5.3).

Figura 5.3: Aspecto das dispersões das nanopartículas lipídicas durante os diferentes estágios do método PIT. (a) 1º ciclo de aquecimento; (b) primeiro ciclo de resfriamento; (c) segundo ciclo de aquecimento e introdução do beta-caroteno; (d) segundo ciclo de aquecimento.

O aspecto translúcido observado nas Figuras 5.3(b) e 5.3(d) é também um indicativo indiscutível da inversão de fases pela variação da temperatura. O beta-caroteno foi adicionado apenas no segundo ciclo de aquecimento (Figura 5.3 (c)), na temperatura de aproximadamente 65° C (temperatura próxima de onde se inicia a inversão de fase), com o intuito de minimizar o contato com altas temperaturas e dessa forma preservar-lo da oxidação, visto que este bioativo é termolábil.

5.2 ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE *STRESS*

As nanopartículas foram submetidas a diferentes temperaturas (35°C a 95°C), pHs (3 a 8), concentrações de sal (1,5% a 15%) e concentrações salinas (0,025 a 1M).

Os parâmetros analisados foram distribuição de tamanho de partícula, diâmetro médio, polidispersidade e concentração de beta-caroteno.

As curvas de distribuição das nanopartículas lipídicas sólidas após serem submetidas às diferentes condições de *stress* estão apresentadas nas Figuras 5.4 a 5.10

Figura 5.4: : Comportamento da distribuição do tamanho de partícula das dispersões de nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando beta-caroteno submetidas à temperatura de 35° C em diferentes tempos de amostragem: (a) manteiga de cupuaçu; (b)manteiga de cupuaçu com tocoferol; (c) manteiga de murumuru; (d) manteiga de murumuru com tocoferol

Figura 5.5: Comportamento da distribuição do tamanho de partícula das dispersões de nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando beta-caroteno submetidas à temperatura de 55° C em diferentes tempos de amostragem: (a) manteiga de cupuaçu; (b) manteiga de cupuaçu com tocoferol; (c) manteiga de murumuru; (d) manteiga de murumuru com tocoferol

(a)

(b)

(c)

(d)

Figura 5.6: Comportamento da distribuição do tamanho de partícula das dispersões de nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando beta-caroteno submetidas à temperatura de 75° C em diferentes tempos de amostragem: (a) manteiga de cupuaçu; (b) manteiga de cupuaçu com tocoferol.; (c) manteiga de murumuru; (c) manteiga de murumuru com tocoferol.

Figura 5.7: Comportamento da distribuição do tamanho de partícula das dispersões de nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando beta-caroteno submetidas à temperatura de 95° C em diferentes tempos de amostragem: (a) manteiga de cupuaçu; (b) manteiga de cupuaçu com tocoferol.; (c) manteiga de murumuru; (d) manteiga de murumuru com tocoferol.

Figura 5.8: Comportamento da distribuição do tamanho de partícula das dispersões de nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando beta-caroteno submetidas às diferentes concentrações de sal: (a) manteiga de cupuaçu; (b) manteiga de cupuaçu com tocoferol; (c) manteiga de murumuru; (d) manteiga de murumuru com tocoferol

Figura 5.9: Comportamento da distribuição do tamanho de partícula das dispersões de nanopartículas lipídicas encapsulando beta-caroteno sólidas submetidas às diferentes concentrações de sacarose: (a) manteiga de cupuaçu; (b) manteiga de cupuaçu com tocoferol; (c) manteiga de murumuru; (d) manteiga de murumuru com tocoferol.

Figura 5.10: Comportamento da distribuição do tamanho de partícula das dispersões de nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando beta-caroteno submetidas a diferentes condições de pH: (a) manteiga de cupuaçu; (b) manteiga de cupuaçu com tocoferol; (c) manteiga de murumuru; (d) manteiga de murumuru com tocoferol.

Visualmente as nanopartículas lipídicas se mostraram estáveis quando submetidas às diferentes condições de *stress*, exceto o sistema que foi submetido à concentração de 1M de sal e ao pH básico (pH 8). Como pode ser analisado pelas Figuras 5.4 a 5.10, as partículas submetidas ao pH básico e a concentrações salinas superiores à 0,1M desestabilizaram em relação ao diâmetro hidrodinâmico.

Após as análises visuais e das distribuições de tamanhos de partículas, o diâmetro médio e a concentração de beta-caroteno também foram avaliadas, e estão representadas nas Tabelas 5.1 a 5.4.

Tabela 5.1:Diâmetro hidrodinâmico médios e concentração de beta-caroteno das nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com manteiga de cupuaçu e manteiga de murumuru quando submetidas a diferentes temperaturas.

T (°C)	NLS-MC toc		NLS - MC		NLS –MM toc		NLS-MM	
	Diâmetro	[β-caroteno]	Diâmetro	[β-caroteno]	Diâmetro	[β-caroteno]	Diâmetro	[β-caroteno]
	(nm)	(mg/ml)	(nm)	(mg/ml)	(nm)	(mg/ml)	(nm)	(mg/ml)
Controle	34,1±0,5 ^{A,a}	97,5±0,9 ^{A,a}	34,2±0,1 ^{A,a}	96,7±1,5 ^{A,a}	33,4±0,4 ^{A,a}	96,4±3,5 ^{A,a}	33,7±0,9 ^{A,a}	93,4±4,3 ^{A,b}
35,5min	34,1±0,4 ^{A,a}	97,0±0,1 ^{A,a}	34,5±0,1 ^{A,a}	96,9±9,1 ^{A,a}	34,8±0,9 ^{A,a}	96,4±1,2 ^{A,a}	33,2±0,6 ^{A,a}	93,5±1,3 ^{A,b}
35,15min	33,6±0,2 ^{A,a}	99,2±0,5 ^{A,a}	34,6±0,4 ^{A,a}	98,0±1,2 ^{A,a}	34,8±0,6 ^{A,a}	97,0±0,1 ^{A,a}	35,0±0,3 ^{A,a}	90,9±0,1 ^{A,b}
50, 5min	34,9±0,6 ^{A,a}	97,3±4,3 ^{A,a}	34,2±1,0 ^{A,a}	96,9±9,1 ^{A,a}	34,6±0,1 ^{A,a}	98,3±2,6 ^{A,a}	33,9±0,5 ^{A,a}	79,5±4,2 ^{B,b}
50,15min	36,2±0,8 ^{A,a}	90,3±1,9 ^{B,a}	36,8±0,1 ^{A,a}	83,3±2,9 ^{B,b}	34,6±0,1 ^{A,a}	90,1±2,8 ^{B,a}	33,8±0,1 ^{A,a}	75,9±1,8 ^{B,c}
75,5min	34,3±0,1 ^{A,a}	98,8±0,1 ^{A,a}	35,4±0,8 ^{A,a}	91,9±5,8 ^{B,b}	34,6±0,1 ^{A,a}	98,1±1,6 ^{A,a}	35,9±0,9 ^{A,a}	80,6±0,6 ^{B,c}
75,15min	34,0±0,3 ^{A,a}	91,9±5,8 ^{B,a}	35,2±0,1 ^{A,a}	81,8±1,7 ^{BC,bc}	34,5±0,1 ^{A,a}	84,08±0,4 ^{BC,b}	33,9±0,3 ^{A,a}	78,5±0,6 ^{B,c}
95,5min	35,5±0,1 ^{A,a}	92,2±5,2 ^{B,a}	34,8±0,3 ^{A,a}	78,4±0,3 ^{C,c}	34,5±0,1 ^{A,a}	83,9±0,9 ^{BC,b}	33,9±0,5 ^{A,a}	77,8±0,1 ^{B,d}
95,15min	33,9±0,2 ^{A,a}	86,7±4,8 ^{B,a}	32,4±0,1	72,4±2,9 ^{C,b}	34,5±0,1 ^{A,a}	76,1±2,4 ^{C,b}	33,5±0,1 ^{A,a}	64,1±3,8 ^{C,c}

Médias ± desvio padrão das replicatas. Médias seguidas da mesma letra minúscula na mesma coluna não apresentaram diferença significativa (p>0,05) pelo teste de Tukey. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na mesma linha não apresentaram diferença significativa (p>0,05) pelo teste de Tukey.

Tabela 5.2: Diâmetro hidrodinâmico médios e concentração de beta-caroteno das nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com manteiga de cupuaçu e manteiga de murumuru quando submetidas a diferentes concentrações de sacarose.

[sacarose]	NLS-MC toc		NLS - MC		NLS –MM toc		NLS-MM	
(% mass)	Diâmetro	[β-caroteno]	Diâmetro	[β-caroteno]	Diâmetro	[β-caroteno]	Diâmetro	[β-caroteno]
	(nm)	(mg/ml)	(nm)	(mg/ml)	(nm)	(mg/ml)	(nm)	(mg/ml)
Controle	34,1±0,5 ^{A,a}	97,5±0,9 ^{A,a}	34,2±0,1 ^{A,a}	96,7±1,5 ^{A,a}	33,4±0,4 ^{A,a}	96,4±3,5 ^{A,a}	33,7±0,9 ^{A,a}	93,4±4,3 ^{A,b}
1,5%	35,2±1,0 ^{A,a}	92,7±1,8 ^{A,ab}	32,9±0,1 ^{A,a}	85,28±2,5 ^{B,b}	33,2±2,1 ^{A,a}	93,7±0,1 ^{AB,a}	33,8±1,2 ^{A,a}	85,3±1,5 ^{B,c}
7,5%	33,8±0,1 ^{A,a}	92,7±1,8 ^{B,a}	33,3±0,2 ^{A,a}	75,7±0,1 ^{C,b}	33,8±1,0 ^{A,a}	91,5± 4,4 ^{B,a}	33,7±0,7 ^{A,a}	81,9±1,1 ^{B,b}
10%	35,2±0,7 ^{A,a}	92,7±1,8 ^{B,a}	35,9±0,1 ^{A,a}	72,3±3,2 ^{CD,d}	34,1±0,5 ^{A,a}	89,5±2,2 ^{B,b}	36,1±0,8 ^{A,a}	78,1±3,1 ^{C,c}
15%	36,0±0,4 ^{A,a}	83,2±2,6 ^{C,b}	34,8±0,1 ^{A,a}	69,6±1,4 ^{D,d}	33,8±1,0 ^{A,a}	89,1± 0,1 ^{B,a}	33,7±1,5 ^{A,a}	73,2±1,6 ^{D,c}

Médias ± desvio padrão das replicatas. Médias seguidas da mesma letra minúscula na mesma coluna não apresentaram diferença significativa (p>0,05) pelo teste de Tukey. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na mesma linha não apresentaram diferença significativa (p>0,05) pelo teste de Tukey.

Os diâmetros médios das nanopartículas permaneceram constantes quando submetidas aos diferentes tratamentos térmicos, mesmo quando ficaram expostas a tais temperaturas por 15 minutos (Tabela 5.1), indicando que são resistentes em tais condições em termos de tamanho. No entanto, não foi observado o mesmo comportamento em relação à concentração de beta-caroteno. Quando as nanopartículas produzidas com manteiga de cupuaçu (NLS – MC e NLS – MC toc) foram aquecidas até 55 e 75°C, a quantidade de beta-caroteno permaneceu constante somente no período de 5 minutos, mas não por 15 minutos, quando começaram a decair. Na temperatura de 95°C, 5 minutos de aquecimento já foram suficientes para degradar significativamente o beta-caroteno. O decréscimo na concentração de beta-caroteno foi maior para as partículas de NLS – MC do que para NLS – MC toc ($p>0,05$) (Tabela 5.1). No que diz respeito às nanopartículas de murumuru, as NLS – MM toc começaram a desestabilizar em relação à concentração de beta-caroteno já quando foram aquecidas a 55°C por 5 minutos. As NLS –MM toc preservaram melhor o beta-caroteno do que as NLS – MM, no entanto, preservaram menos do que as nanopartículas de cupuaçu (NLS – MC e NLS – MC toc.) ($p>0,05$). Este comportamento demonstra que o beta-caroteno encapsulado, quando exposto a diferentes tempo e temperaturas, foi melhor preservado nas nanopartículas produzidas com manteiga de cupuaçu. Além disso, a adição de tocoferol nas amostras contribuiu para a preservação do beta-caroteno.

Boa estabilidade também foi observada quando as nanopartículas foram submetidas às diferentes concentrações de sacarose (Tabela 5.2). Nenhuma diferença significativa foi encontrada nem no diâmetro médio nem na polidispersidade. Isso significa que um dos fenômenos físico-químicos responsáveis pela desestabilização, como a alteração das forças moleculares que atingem a interface óleo-água, que normalmente ocorrem quando há a adição de sacarose no sistema (THANASUKARN et al., 2006), não foi forte o bastante, permitindo que as partículas permanecessem estáveis. No entanto, mais uma vez houve um decaimento do beta-caroteno encapsulado, e mais uma vez, a presença do alfa-tocoferol ajudou a reduzir, de forma significativa, a oxidação do beta-caroteno.

Tabela 5.3: Diâmetro hidrodinâmico médios e concentração de beta-caroteno das nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com manteiga de cupuaçu e manteiga de cupuaçu quando submetidas a diferentes concentrações de sal.

[NaCl] (M)	NLS-MC toc		NLS - MC		NLS –MM toc		NLS-MM	
	Diâmetro	[β-caroteno]	Diâmetro	[β-caroteno]	Diâmetro	[β-caroteno]	Diâmetro	[β-caroteno]
	(nm)	(mg/ml)	(nm)	(mg/ml)	(nm)	(mg/ml)	(nm)	(mg/ml)
Controle	34,1±0,5 ^{A,a}	97,5±0,9 ^{A,a}	34,8±0,1 ^{A,a}	96,7±1,5 ^{A,a}	33,4±0,4 ^{A,a}	96,4±3,5 ^{A,a}	33,7±0,9 ^{A,}	93,4±4,3 ^{A,b}
0,025	35,2±0,4 ^{A,a}	84,2± 9,4 ^{B,b}	38,9±0,1 ^{B,b}	86,4±0,6 ^{B,ab}	35,9±1,4 ^{A,a}	92,6±1,3 ^{B,ab}	38,0±0,2 ^{B,}	92,9±3,0 ^{A,a}
0,10	41,6±0,3 ^{B,a}	83,9±1,7 ^{B,b}	41,9±0,3 ^{C,a}	80,3±0,7 ^{B,b}	44,4±0,7 ^{C,a}	92,6 ± 1,5 ^{B,a}	42,1±2,2 ^{C,}	92,5±1,3 ^{A,a}
0,25	41,4±0,3 ^{B,a}	81,30±0,3 ^{B,b}	43,4±0,6 ^{D,a}	79,9± 1,3 ^{BC,b}	44,6±1,6 ^{C,a}	91,3 ± 1,0 ^{B,a}	41,5±1,8 ^{C,}	90,9±0,2 ^{B,a}
0,50	43,2±0,3 ^{B,a}	82,28±0,6 ^{B,b}	42,9±0,1 ^{CD,a}	75,7±0,4 ^{C,c}	45,6±1,1 ^{C,a}	91,9 ± 2,3 ^{B,a}	41,9±0,3 ^{C,}	92,3±6,1 ^{A,a}
1,0	42,2±0,5 ^{B,a}	68,53±3,8 ^{C,b}	42,6±0,1 ^{C,a}	65,6±0,2 ^{D,b}	44,0±0,4 ^{C,b}	83,6 ± 0,3 ^{C,a}	41,9±0,3 ^{C,}	82,8±0,9 ^{C,a}

Médias ± desvio padrão das replicatas. Médias seguidas da mesma letra minúscula na mesma coluna não apresentaram diferença significativa (p>0,05) pelo teste de Tukey. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na mesma linha não apresentaram diferença significativa (p>0,05) pelo teste de Tukey.

Tabela 5.4: Diâmetro hidrodinâmico médios e concentração de beta-caroteno das nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com manteiga de cupuaçu e manteiga de cupuaçu quando submetidas a diferentes valores de pH.

Valor de pH	NLS-MC toc		NLS - MC		NLS –MM toc		NLS-MM	
	Diâmetro	[β-caroteno]	Diâmetro	[β-caroteno]	Diâmetro	[β-caroteno]	Diâmetro	[β-caroteno]
	(nm)	(mg/ml)	(nm)	(mg/ml)	(nm)	(mg/ml)	(nm)	(mg/ml)
Controle	34,1±0,5 ^{A,a}	97,5±0,9 ^{A,a}	34,8±0,1 ^{A,a}	96,7±1,5 ^{A,a}	33,4±0,4 ^{A,a}	96,4±3,5 ^{A,a}	33,7±0,9 ^{A,a}	93,4±4,3 ^{A,b}
pH 3	38,4±0,1 ^{AB,a}	91,6 ± 3,5 ^{AB,a}	40,2±0,2 ^{B,ab}	87,1±1,8 ^{B,a}	45,8±0,4 ^{B,c}	86,29±2,2 ^{B,a}	41,5±0,1 ^{B,b}	81,7±0,9 ^{B,b}
pH 4,5	40,2±0,3 ^{B,c}	75,52±3,6 ^{B,a}	39,7±0,4 ^{B,ab}	65,0±4,5 ^{C,c}	35,9±0,4 ^{A,a}	73,6±1,8 ^{B^C,b}	38,5±0,7 ^{AB,ab}	61,5±0,4 ^{C,d}
pH 6,5	40,5±0,1 ^{B,b}	70,74±0,72 ^{C,a}	39,2±2,3 ^{B,ab}	61,2±0,8 ^{C,b}	35,3±0,1 ^{A,a}	70,3±2,1 ^{C,a}	49,3±3,8 ^{C,c}	62,9±3,1 ^{C,b}
pH 8,0	59,5±1,0 ^{C,a}	Separação de fases	58,4±2,1 ^{C,a}	Separação de fase	61,1±3,9 ^{C,a}	Separação de fases	67,6±3,7 ^{D,b}	Separação de fase

Médias ± desvio padrão das replicatas. Médias seguidas da mesma letra minúscula na mesma coluna não apresentaram diferença significativa (p>0,05) pelo teste de Tukey. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na mesma linha não apresentaram diferença significativa (p>0,05) pelo teste de Tukey.

Quando diferentes concentrações salinas foram adicionadas às amostras, em concentrações acima de 0,01M de NaCl, houve um pequeno aumento no diâmetro médio de acordo com os dados mostrado na Tabela 5.3. Tal comportamento está provavelmente relacionado com o aumento da repulsão eletrostática entre as gotículas, o que afeta negativamente a estabilidade da emulsão (THANASUKARN et al., 2006). Em níveis relativamente baixos de concentrações salinas (0,025M de NaCl), a repulsão eletrostática. No que diz respeito à concentração de beta-caroteno, também houve decaimento, e tal queda ocorreu mais acentuadamente na maior concentração de sal.

Quando as nanopartículas foram expostas aos diferentes valores de pH (Tabela 5.4) as amostras permaneceram estáveis em meio ácido, sendo resistentes inclusive quando submetidas em pH 3, resultado bastante interessante, visto que em outros estudos, quando as nanopartículas foram submetidos a este valor de pH, apresentaram instabilidade no sistema (DING et al., 2012; QUIAN et al., 2012). Em meio básico, no entanto, o diâmetro médio aumentou e houve separação de fase no sistema, como relatado anteriormente. Em relação ao beta-caroteno, as NLS – MC toc preservaram o bioativo encapsulado somente quando expostas ao pH 3. Já nas NLS – MC a oxidação do bioativo ocorreu em todas as condições de pHs. Tais resultados estão de acordo com o apresentado por Quian et. al (2012), que ao submeter nanoemulsões com beta-caroteno em pH 4,5, observaram um diâmetro médio pequeno e aumento da degradação do bioativo.

Todas as nanopartículas que permaneceram estáveis quando submetidas às diferentes condições de *stress*, foram analisadas no dia 5. No entanto, as nanopartículas submetidas ao pH 6,5 a pesar de terem permanecido estáveis no dia zero, apresentaram separação de fase no dia 5 e dessa forma não foram analisadas em relação à distribuição de tamanho de partícula, diâmetro médio e concentração de beta-caroteno (Figuras 5.11 a 5.13 e Tabela 5.5).

Figura 5.11: Comportamento da distribuição do tamanho de partícula das dispersões de nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando beta-caroteno submetidas às diferentes concentrações de sacarose no dia 5: (a) manteiga de cupuaçu; (b) manteiga de cupuaçu com tocoferol; (c) manteiga de murumuru; (d) manteiga de murumuru com tocoferol.

Figura 5.12: Comportamento da distribuição do tamanho de partícula das dispersões de nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando beta-caroteno submetidas às diferentes concentrações de sal no dia 5: (a) manteiga de cupuaçu; (b) manteiga de cupuaçu com tocoferol; (c) manteiga de murumuru; (d) manteiga de murumuru com tocoferol.

Figura 5.13: Comportamento da distribuição do tamanho de partícula das dispersões de nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando beta-caroteno submetidas a diferentes condições de pH no dia 5: (a) manteiga de cupuaçu; (b) manteiga de cupuaçu com tocoferol; (c) manteiga de murumuru; (d) manteiga de murumuru com tocoferol.

Tabela 5.5: Diâmetro hidrodinâmico médios e concentração de beta-caroteno das nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com manteiga de cupuaçu e manteiga de murumuru quando submetidas às diferentes condições de stress no dia 5 de armazenagem.

Condição de <i>stress</i>	NLS-MC toc		NLS - MC		NLS-MM toc		NLS - MM	
	Diâmetro (nm)	[β-caroteno] (mg/ml)	Diâmetro (nm)	[β-caroteno] (mg/ml)	Diâmetro (nm)	[β-caroteno] (mg/ml)	Diâmetro (nm)	[β-caroteno] (mg/ml)
Controle	34,1±0,5	97,5±0,9	34,8±0.	96,7±1,5	33,4±0,4	96,4	33,7±0,9	93,4±4,3
pH 3	38,5±0,3	85,8±0,1	36,6±0,2	79,1±5,3	56,5±0,6	70,5±1,8	51,3±0,4	73,28±2,0
pH 4,5	43,3±0,7	59,6±7,3	41,4±0,5	51,4±0,8	36,4±0,2	66,01±1,9	36,4±0,1	53,2±3,9
0,025M sal	36,6±0,8	78,4 ± 0,5	38,6±0,2	79,4±0,4	42,6±0,5	79,44±0,42	49,9±0,8	79,3±1,0
0,1M sal	42,9±0,2	63,7±1,4	---	---	---	---	---	---
1,5% sac.	35,2±0,4	89,67±4,8	34,9±0,2	86,1±4,1	39,6±0,6	90,7±2,5	45,6±0,2	83,3±4,7
7,5% sac.	38,8±0,8	81,8 ± 1,2	35,3±0,4	73,3±3,3	40,8±0,4	78,1±4,1	49,3±3,3	78,9±0,5
10% sac.	36,8±0,7	75,3 ± 0,9	34,4±0,3	72,3±3,2	46,6±1,4	75,7±0,97	49,3±2,7	74,1±2,3
15% sac.	36,1±0,8	71,0 ± 0,1	38,8±0,3	69,6±1,4	49,9±0,6	74,2±2,28	48,1±3,9	71,1±0,1

Não houve mudança na distribuição de tamanho das nanopartículas analisadas no 5º dia, no entanto o mesmo comportamento não foi observado para o diâmetro médio. As nanopartículas de manteiga de cupuaçu apresentaram aumento em relação ao diâmetro médio para os sistemas submetidos ao pH 4,5. Já as nanopartículas de manteiga de murumuru apresentaram aumento do diâmetro médio nos sistemas submetidos ao pH 3, sal e às diferentes concentrações de sacarose.

A análise de quantificação de beta-caroteno mostrou que a quantidade do bioativo decaiu para os sistemas salinos, no entanto para o sistema com sacarose permaneceu praticamente constante em todas as concentrações para as partículas produzidas sem tocoferol (NLS – MC e NLS – MM) e para as concentrações de 1,5% nas partículas com tocoferol (NLS – MC toc. e NLS – MM toc.). Houve decréscimo também nos sistemas submetidos ao pH 3 e pH 4,5, no entanto, as partículas com tocoferol preservaram melhor o bioativo encapsulado.

De maneira geral pode-se dizer que as nanopartículas produzidas apresentaram estabilidade, em relação ao diâmetro médio de partícula, frente às diferentes condições de *stress*, o que nos permite dizer que elas são um bom veículo para serem empregadas em alimentos, principalmente naqueles com alta concentração de sacarose e pH ácido.

5.3 ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS ENCAPSULANDO BETA-CAROTENO

As nanopartículas lipídicas sólidas monitoradas durante a estocagem estão apresentadas na Tabela 5. 6.

Tabela 5.6: Formulação das nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando beta-caroteno avaliadas ao longo do tempo de estocagem

Formulação	Beta-caroteno (% mássica)	Alfa-tocoferol (% mássica)
NLS – MM	0,06	-
NLS – MM – toc.	0,06	0,03
NLS – MC	0,06	-
NLS – MC – toc.	0,06	0,03

A Figura 5.14 mostra o aspecto visual das dispersões de nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando beta-caroteno:

Figura 5.14: Aspecto visual das dispersões contendo as nanopartículas lipídicas sólidas, encapsulando beta-caroteno produzidas com (a) manteiga de cupuaçu e (b) manteiga de murumuru

Por sua vez, a morfologia das nanopartículas lipídicas sólidas produzidas pode ser visualizada nas imagens de microscopia eletrônica de transmissão, no dia zero, na Figura 5.15. Como pode ser observado, apesar da coloração avermelhada, devido ao acréscimo do beta-caroteno, as dispersões apresentaram tamanhos na faixa nanométrica.

Figura 5.15: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando beta-caroteno, produzidas com (a) manteiga de cupuaçu e (b) manteiga de murumuru. As barras de escala são de 200 nm

As Figuras 5.16 e 5.17 mostram as curvas de distribuição do tamanho de partícula ao longo do tempo de armazenamento, e como se pode observar, não houve variação da distribuição do dia zero para o 120º dia.

Figura 5.16: Distribuição de tamanho de partícula ao longo do tempo de armazenamento para as nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando beta-caroteno produzidas com: (a) manteiga de murumuru, na presença de alfa-tocoferol e (b) manteiga de murumuru sem alfa-tocoferol.

Figura 5.17: Distribuição de tamanho de partícula ao longo do tempo de armazenamento para as nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando beta-caroteno produzidas com: (a) manteiga de cupuaçu, na presença de alfa-tocoferol e (b) manteiga de cupuaçu sem alfa-tocoferol.

Os valores de índice de polidispersidade também não variaram, assim como o diâmetro médio de partícula (Tabela 5.7). Tais resultados são bastante relevantes, pois através deles podemos inferir que as nanopartículas permaneceram extremamente estáveis ao longo do tempo.

Tabela 5.7: Diâmetro médio e polidispersidade das nanopartículas no início e no final do período de estocagem

Amostra	Dia zero		Dia 120	
	Diâmetro médio	PDI	Diâmetro médio	PDI
	(nm)		(nm)	
NLS – MC toc	34,4±0,62	0,18±0,02	35,1±1,13	0,22±0,03
NLS - MC	34,3±0,83	0,19±0,01	35,4±0,24	0,24±0,03
NLS – MM toc	33,4±0,81	0,2±0,02	34,4±1,02	0,21±0,04
NLS - MM	33,7±1,15	0,2±0,02	35,0±1,41	0,27±0,02

A alta estabilidade dos sistemas manométricos produzidos pode ser atribuída à eliminação da coalescência e do amadurecimento de Ostwald, esta última causa eliminada por causa dos lipídios sólidos utilizados na fase dispersa (ZHANG et al., 2013). Outro fator que pode ter contribuído para tal grau de estabilidade pode estar relacionado com o fato de a concentração de tensoativo no sistema ter se apresentado bem acima de sua CMC (concentração micela crítica), o que proporcionou um firme empacotamento destas moléculas ao redor das partículas de lipídio sólido (GRACA et al., 2007). Os tensoativos utilizados, provavelmente, permitiram a formação de um filme interfacial coeso ao redor das partículas, constituindo uma camada estabilizante altamente resistente, permitindo que as formulações permanecessem estáveis ao longo do tempo de armazenamento (KRUGLYAKOV, 2000).

Os dados de comportamento térmico obtidos por análises de calorimetria diferencial de varredura estão apresentadas na Figura 5.18 (termograma) e na Tabela 5.8 (parâmetros calorimétricos). As amostras de nanopartículas apresentaram termogramas similares e a adição de alfa-tocoferol no sistema não alterou o termograma, o que implica que sua presença não alterou a configuração da matriz lipídica.

Figura 5.18: Termogramas obtidos por calorimetria diferencial de varredura das nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando beta-caroteno, produzidas com manteiga de cupuaçu e manteiga de murumuru, com e sem alfa-tocoferol.

Tabela 5.8: Dados calorimétricos (obtidos por calorimetria diferencial de varreduras) das nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando beta-caroteno, produzidas com manteiga de cupuaçu e manteiga de murumuru, com e sem tocoferol.

	To (°C)	Tm (°C)	$\Delta H(J/g)$
NLS – MC	8,2±1,6	14,0±0,9	3,2±0,9
NLS – MC toc.	7,3±0,1	13,9±1,1	3,9±0,2
NLS – MM	12,1±0,1	18,3±0,3	8,3±0,3
NLS – MM toc	13,2±0,2	18,6±0,1	9,9±1,9

Um largo pico endotérmico foi observado por volta de 14°C durante o aquecimento das nanopartículas de manteiga de cupuaçu e por volta de 19°C para as nanopartículas de manteiga de murumuru. Tais temperaturas foram menores que o *bulk* das manteigas (ambas em torno de 32 °C), o que está de acordo com os dados apresentados pela literatura (BUNJES; UNRUH 2007; LEE et al., 2007; MONTENEGRO et al., 2012). De maneira geral, pode-se dizer que dispersões coloidais podem cristalizar a temperaturas até aproximadamente 20°C abaixo da temperatura do lipídio em sua forma pura. Quando compara-se termogramas de DSC do lipídio puro com a correspondente dispersão de partículas lipídicas sólidas, usualmente são

observadas diferenças nas formas e temperaturas dos picos. O pico endotérmico das dispersões, além de deslocados para temperaturas mais baixas, se apresentam mais largos, o que está associado ao fato de as dispersões apresentarem partículas de diferentes tamanhos, que por sua vez se fundem em temperaturas diferentes. Além disso, aos possíveis efeitos dos tensoativos adsorvidos, um efeito do tamanho de partícula na temperatura de fusão é expressa para todos os materiais nano dispersos de acordo com a Equação de Gibbs-Thomson (5):

$$\ln \frac{T}{T_0} = \frac{2\gamma_{sl} V_S}{r \Delta H_{fus}} \quad (5)$$

Na Equação (5), T é a temperatura de fusão da partícula de raio r ; T_0 é a temperatura do *bulk* do material na mesma pressão externa; γ_{sl} é a tensão interfacial da interface sólido-líquido; V_S é o volume específico do sólido e o ΔH_{fus} é o calor específico de fusão do lipídio puro (BUNJES; UNRUH 2007). Portanto, o efeito de diminuição da temperatura de fusão das partículas quando comparada à temperatura de fusão do lipídio puro, torna-se particularmente pronunciado quanto menores forem as partículas em questão.

Outra análise realizada ao longo do tempo de armazenagem foi a quantificação do beta-caroteno encapsulada. A Figura 5.19 mostra os perfis temporais de degradação do beta-caroteno nas nanopartículas lipídicas sólidas com e sem tocoferol, em termos de concentração e porcentagem.

Figura 5.19: Perfis temporais de degradação do beta-caroteno nas nanopartículas lipídicas sólidas em termos de (a) concentração (em mg/L de dispersão) e (b) porcentagem de beta-caroteno preservado.

As nanopartículas preservaram o beta-caroteno por um período de tempo maior que o apresentado por outros estudos (TAN; NAKAJIMA, 2005; HENTSCHEL et al., 2008; HEGALSON et al. 2009; MAO et al., 2009; TRIPLETT; RATHMAN, 2009; TROMBINO et al., 2009; CORNACCHIA; ROSS, 2011; QUIAN et al., 2012; ZHANG et al., 2013). Essa melhor preservação pode estar relacionada com a temperatura de estocagem. Estudos realizados por Quian et al. (2012) demonstram que o carotenoide foi extremamente instável a degradação química quando as nanoemulsões foram estocadas em temperaturas elevadas. No entanto, mesmo comparando-se com outros estudos em baixas temperaturas, as nanopartículas produzidas no presente trabalho de Doutorado preservaram melhor o beta-caroteno. Uma explicação para isso pode ser o fato de todas as nanopartículas apresentarem baixas entalpias de transição de fase ($\Delta H_{\text{fusão}}$) (Tabela 5.8). Estes fatores evidenciam uma matriz desordenada, contendo imperfeições em suas estruturas, o que promove uma melhor acomodação do bioativo na estrutura da nanopartícula evitando a sua expulsão para a camada externa da partícula, onde ficariam mais expostas aos agentes oxidantes (TIKEKAR; NITIN, 2011; CORNACCHIA; ROOS, 2011b). O uso de tensoativos de cadeia longa, como é o caso do Cremophor RH 40, podem ajudar na obtenção de tal tipo de matriz (CORNACCHIA; ROOS, 2011b). Uma razão para baixa capacidade de preservação do beta-caroteno nas nanopartículas lipídicas sólidas, nos outros estudos, pode estar relacionada com o local em que o bioativo está localizado na estrutura, uma vez que poderia ter sido forçado a

migrar para a superfície da partícula, devido à formação de estruturas com maior grau de cristalinidade (TIKEKAR; NITIN, 2011; TIKEKAR; NITIN, 2012)

Outro parâmetro avaliado durante período de estocagem das nanopartículas lipídicas foi a oxidação lipídica, cujos resultados estão mostrados na Figura 5.20. A estabilidade oxidativa foi monitorada por TBARS, um indicador de formação de produtos de oxidação lipídica secundários. Para todas as nanopartículas não houve um aumento notável de TBARS durante o período de estocagem ($p < 0,05$), o que indica que não ocorreu oxidação lipídica significativa no sistema ao longo do tempo. Os valores variaram de 0,06 no dia zero para 0,13 MDA/kg no dia 120. Tais valores são menores do que os apresentados em outros estudos, mesmo no início do período de estocagem (LEE et al., 2011). Sabe-se que os produtos resultantes da reação de TBARS produzem radicais livres, os quais podem ser responsáveis pela iniciação da oxidação do beta-caroteno (HELGASON et al., 2009; CORNACCHIA; ROOS, 2011b). Como estes valores, referentes à oxidação lipídica, foram baixos, é possível que eles tenham ajudado a evitar a oxidação do beta-caroteno encapsulado nas nanopartículas, o que ajudou em sua melhor preservação ao longo do tempo.

Figura 5.20: Oxidação lipídica das nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando beta-caroteno, produzidas com manteiga de cupuaçu e murumuru, durante o período de estocagem sob refrigeração.

As nanopartículas foram produzidas com e sem α -tocoferol, como mencionado anteriormente, e como podemos observar na Figura 5.21, as partículas com alfa-tocoferol preservaram melhor o beta-caroteno encapsulado. Depois de 120 dias, aproximadamente 90% da quantidade inicial de carotenoide continuava preservada. No entanto, após o mesmo período, para as dispersões sem alfa-tocoferol, mais de 30% da quantidade inicial de beta-caroteno já havia sido degradada nas nanopartículas produzidas com manteiga de cupuaçu, e mais de 50% para as nanopartículas produzidas com manteiga de murumuru. Este comportamento já foi observado em outros estudos (HENTSCHEL et al., 2008; GOMES et al., 2013) e está certamente relacionado com o efeito antioxidante do α -tocoferol, que age bloqueando reações em cadeia ou radicais livres de oxigênio (McCLEMENTS; DECKER, 2000; HENTSCHEL et al., 2008).

A quantidade de α -tocoferol também foi avaliada ao longo do período de estocagem, e o perfil de preservação está presente na Figura 5.20. Em ambas as amostras, o alfa-tocoferol e o beta-caroteno tiveram um pequeno decréscimo no início, e depois do 15º dia permaneceram constantes. Este comportamento confirma o fato de o tocoferol ter agido como um antioxidante nas nanopartículas, protegendo o beta-caroteno da oxidação.

Figura 5.21: Porcentagem de alfa-tocoferol nas nanopartículas lipídicas sólidas preservada ao longo do tempo de estocagem.

Para as nanopartículas sem alfa-tocoferol, as produzidas com manteiga de cupuaçu preservaram melhor o beta-caroteno do que as produzidas com manteiga de murumuru (Figura 4.19). A diferença entre os valores no $\Delta H_{\text{fusão}}$ dos dois sistemas ($3,9 \pm 0,2$ e $8,3 \pm 0,3$ J/g respectivamente) pode ser suficiente para promover uma matriz menos ordenada, o que pode ser responsável pela melhor preservação do beta-caroteno encapsulado (TIKIKAR; NITIN, 2011). A composição das manteigas e dos tensoativos pode também ter sido um fator determinante, se levarmos em conta que as interações entre o núcleo da emulsão e as porções hidrofílicas e hidrofóbicas do tensoativo são fatores importantes para a estabilidade de um sistema emulsionado (TANAKA et al., 2007).

Tendo em mente que a interpenetração entre as cadeias hidrofóbicas presentes no núcleo da emulsão (neste caso, os lipídios sólidos) no interior da porção hidrofóbica das camadas de tensoativo depende do tamanho das cadeias hidrofóbicas, e que a diferença entre os tipos de cadeia presentes no núcleo da emulsão e nos tensoativos diminui tal interpenetração (TANAKA et al., 2007), pode-se concluir que quanto mais similares forem a parte hidrofóbica das moléculas emulsionadas e as moléculas de tensoativo, mais intensa será a interpenetração na interface das partículas, e dessa forma maior estabilidade será apresentada pelo sistema.

Os tensoativos utilizados para a produção dos sistemas estudados foram o Span 80 e o Cremophor RH 40 (produzido a partir de óleo de rícino hidrogenado), ambos ricos em cadeias de 18 carbonos. A manteiga de murumuru possui aproximadamente 50% de ácido láurico (C12) em sua composição, e a manteiga de cupuaçu 70% de ácido esteárico e oleico (C18). Desta forma, fica evidente que houve interações intercadeias favoráveis ocorrendo na superfície das nanopartículas lipídicas produzidas com manteiga de cupuaçu, visto que todos possuem C18 em sua estrutura. No entanto, é provável que tenha ocorrido falta de compatibilidade nas cadeias para as nanopartículas produzidas com manteiga de murumuru (C12 e C18).

5.4 DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* DINÂMICA DAS NANOPARTÍCULAS ENCAPSULANDO BETA-CAROTENO

5.4.1 Nanopartículas produzidas com manteiga de cupuaçu

5.4.1.1 Estabilidade das nanopartículas lipídicas ao longo da digestão

A Figura 5.22 mostra o aspecto dos fluidos coletados no início e no final do modelo digestivo *in vitro* dinâmico.

Figura 5.22: Aspecto visual das dispersões de nanopartículas de manteiga de cupuaçu, respectivamente no início do processo de digestão *in vitro* dinâmico, no filtrado do jejuno, filtrado do íleo e final do íleo, respectivamente.

As análises de tamanho de partícula dos sistemas submetidos a estudos de digestibilidade *in vitro* são importantes para a avaliação das mudanças microestruturais que ocorrem ao longo deste processo (LIU et al., 2012; McCLEMENTS; XIAO, 2012). Desta forma, as análises de distribuição de partícula foram analisadas nos diferentes estágios da digestão, as quais foram nomeadas de amostra (antes da digestão), estômago, duodeno, jejuno e íleo, e estão representadas na Figura 5.23. Outra maneira de se avaliar as mudanças estruturais ao longo do TGI é através de análises microscópicas (HUR et al., 2009), as quais estão representadas na Figura 5.25

Outro parâmetro importante a ser analisado durante os diferentes estágios da digestibilidade *in vitro* é a carga elétrica superficial (potencial zeta), que fornece informações das mudanças na composição interfacial, por causa da adsorção dos

tensoativos ionizados, íons minerais, ou biopolímeros em sua superfície (McCLEMENTS; XIAO, 2012; PINHEIRO et al., 2013), e estão representados na Figura 5.24

As análises de distribuição de tamanho de partícula (Figura 5.23) revelam que no estágio estomacal o diâmetro médio de partícula manteve-se constante, no entanto o valor do potencial zeta aumentou, tornando-se positivo (Figura 5.24). Todavia, as análises microscópicas revelam que houve início dos fenômenos físico-químicos responsáveis pela desestabilização das nanopartículas, como a coalescência (Figura 5.25). Tais fenômenos podem ser atribuídos às mudanças nas condições das soluções (pH e força iônica), e a adsorção de alguns componentes aniônicos da solução biliar na superfície da partícula. Estes componentes ativos da superfície podem ter deslocado parte dos tensoativos originalmente presentes na interface (Cremophor e Span), permitindo a sua interpenetração com as moléculas de tensoativo já existentes, ou ainda a formação de um complexo interfacial com as mesmas moléculas (Cremophor e Span) (MUN et al., 2007; HUR et al., 2009).

Figura 5.23: Diâmetro médio e polidispersidade das nanopartículas de manteiga de cupuaçu ao longo da digestão *in vitro* dinâmica

Figura 5.24: Potencial zeta das nanopartículas de manteiga de cupuaçu ao longo da digestão *in vitro* dinâmica

Figura 5.25: Imagens da microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas de manteiga de cupuaçu ao longo da digestão *in vitro* dinâmica. (a) antes da digestão, (b) estômago, (c) duodeno, (d) jejuno, (e) íleo. As barras de escala em todas as imagens são de 200 nm

Além disso, os valores do potencial zeta são fortemente dependentes do pH do sistema, e seus valores absolutos são reduzidos com o decréscimo do pH, tornando-se positivos quando os valores do pH estão abaixo de 3 (LIU et al., 2006).

Nas condições duodenais, apesar das cargas elétricas se manterem estáveis ($p > 0,05$), o diâmetro médio das nanopartículas aumentou significativamente ($p < 0,05$), conforme mostrado nas Figuras 5.23 e 5.24, o que indica instabilidade do

sistema. Além do mais, a imagem de microscopia eletrônica de transmissão referente ao duodeno (Figura 5.25(c)) apresentou-se bastante diferente da aparência da amostra inicial (nanopartícula antes da digestão, Figura 5.25(a)), o que indica que elas começaram a ser, de fato, digeridas nesta etapa. Neste estágio, os sais de bile juntamente com as moléculas de lipase promovem a hidrólise lipídica e produzem ácidos graxos livres, monoacilglicerídeos e diglicerídeos na superfície da partícula, que serão incorporados nas micelas mistas e vesículas. Estes produtos da digestão são ineficazes em estabilizar emulsões óleo em água contra a coalescência, o que pode explicar a instabilidade observada (MUN et al., 2007; HUR et al., 2009).

Tais resultados são coerentes com outros resultados encontrados na literatura, visto que a digestão dos lipídios tem início no duodeno, através da ação da lipase duodenal (NIK et al., 2010; YANG; McCLEMENTS, 2013). A lipase duodenal não foi adicionada, no entanto, ela estava presente na composição da pancreatina utilizada (Sigma-Aldrich).

O diâmetro médio dos filtrados do jejuno e do íleo diminuíram quando comparados ao filtrado obtido no duodeno; no entanto, ainda continuaram apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) em relação à amostra inicial. Mais uma vez as imagens de microscopia eletrônica de transmissão mostradas na Figura 5.25 demonstram que as nanopartículas foram digeridas ao longo do TGI, pois como pode-se perceber, as partículas já modificaram completamente sua morfologia inicial.

5.4.1.2 Bioacessibilidade do beta-caroteno e quantificação dos ácidos graxos liberados

Através da análise da Figura 5.26, observa-se que à medida que o tempo de digestão aumentou a bioacessibilidade do beta-caroteno também tendeu a aumentar, e esse comportamento pode ser atribuído à formação de produtos da digestão que têm habilidade para formar micelas mistas, capazes de solubilizar componentes altamente lipofílicos como o beta-caroteno (PORTER et al., 2007).

Figura 5.26: Bioacessibilidade total do beta-caroteno ao longo do trato gastrointestinal das nanopartículas de manteiga de cupuaçu no modelo digestivo *in vitro* dinâmico. A bioacessibilidade total do betacaroteno é apresentada em relação às amostras dos filtrados do jejuno (■) e íleo (■) em intervalos de 1h e expressos em % em relação a quantidade de beta-caroteno inicialmente presente na amostra.

Figura 5.27: Beta-caroteno não-bioacessível presente nas nanopartículas de cupuaçu no trato gastrointestinal no sistema digestivo *in vitro* dinâmico. O beta caroteno não absorvido pelo organismo é apresentado em relação à amostra do final do íleo, em intervalos de 1h e expressos em % em relação a quantidade de beta-caroteno inicialmente na amostra

Os bioativos lipofílicos devem primeiramente ser liberados da matriz do alimento, em seguida, devem ser incorporados em micelas mistas, para posteriormente serem transportados através da mucosa antes de serem absorvidos pelas células epiteliais do intestino delgado (YANG; McCLEMENTS, 2013).

Figura 5.28: Porcentagem de ácidos graxos livres (AGL) liberados da nanopartícula de manteiga de cupuaçu ao longo da digestão dinâmica: filtrado do Jejuno (■); filtrado do íleo (■) e final do íleo (■).

Como se pode perceber, através da análise da Figura 5.25, a quantidade de beta-caroteno presente no filtrado do jejuno é superior ao encontrado no filtrado do íleo ($p < 0,05$).

No que diz respeito aos ácidos graxos livres, a fração referente ao filtrado do jejuno liberou 10% a mais de ácidos graxos livres quando comparado ao filtrado do íleo ($p > 0,05$). Foram 31% de ácidos graxos livres liberados no 1º filtrado contra 20% no segundo compartimento de filtração, como pode ser observado na Figura 5.28.

Os resultados demonstram que a bioacessibilidade e a lipólise estão associadas, ou seja, a bioacessibilidade do beta-caroteno está relacionada com a maior quantidade de ácidos graxos livres liberados em determinada fração. O acesso das lipases na interface das nanopartículas lipídicas é um passo crítico na bioacessibilidade de compostos bioativos, uma vez que os produtos da digestão dos triacilglicerídeos (diacilglicerídios, monoacilglicerídeos e ácidos graxos livres) podem se tornar parte das micelas mistas, aumentando desta forma a capacidade de solubilização no intestino delgado, o que por sua vez aumenta a bioacessibilidade dos compostos bioativos encapsulados (JEONG et al., 2007; PORTER et al., 2007).

A quantidade de beta-caroteno perdida ao longo do processo de digestibilidade foi calculada através da concentração inicial deste bioativo na amostra, subtraída da soma da concentração de todas as frações de beta-caroteno (total bioacessível + total

não bioacessível). A quantidade bioacessível (filtrado do jejuno + filtrado do íleo) foi de 44,59%, que somando com os 45% não-bioacessíveis (final do íleo) (de acordo com as Figura 5.26 e 5.27), totalizam 89,2%. Desta forma, a quantidade de beta-caroteno perdida no sistema de digestão simulada *in vitro* foi um pouco superior a 10%, o que demonstra a eficiência do processo para a digestão da partícula em questão, nas condições experimentais especificadas.

5.4.2 Nanopartículas lipídicas produzidas com manteiga de murumuru

5.4.2.1 Estabilidade das nanopartículas ao longo da digestão

A aparência das emulsões foi registrada no decorrer dos vários estágios da digestão *in vitro* dinâmica, como se observa na Figura 5.29. É possível notar que os fluidos se tornaram cada vez mais diluídos ao longo do processo, devido ao uso das soluções eletrolíticas e enzimáticas em cada compartimento, o que justifica a diluição somente em alguns estágios (amostra contendo nanopartículas, estômago e duodeno) para as análises de distribuição de tamanho de partícula e potencial zeta. O mesmo pode ser aplicado para as partículas de manteiga de cupuaçu.

Figura 5.29: Aparência dos fluidos coletados ao longo do processo de digestão *in vitro* dinâmica das nanopartículas de manteiga de murumuru, respectivamente no início da digestão, no estômago, no duodeno, no filtrado do jejuno, filtrado do íleo e final do íleo.

Como pode ser observado nas Figuras 5.30 e 5.31, mais uma vez, as partículas permaneceram estáveis no estômago, visto que não houve diferença significativa em

relação ao diâmetro médio ($p < 0,05$), mas tenderam a se aproximar, já que as cargas começaram a ficar positivas (potencial zeta maior do que zero), demonstrando que os fenômenos de coalescência começaram a atuar no sistema.

Figura 5.30: Diâmetros médios e valores de polidispersidade das nanopartículas de manteiga de murumuru ao longo da digestão *in vitro* dinâmica.

Figura 5.31: Valores de potencial zeta das nanopartículas de manteiga de murumuru ao longo da digestão *in vitro* dinâmica.

A partir do duodeno, no entanto, apesar de não haver diferença significativa em relação ao potencial zeta ($p > 0,05$), as partículas começaram a desestabilizar, pois houve

um aumento expressivo no diâmetro médio das partículas ($p < 0,05$). Tal fato foi, assim como nas nanopartículas lipídicas sólidas produzidas por manteiga de cupuaçu, resultado da ação dos sais de bile e as moléculas de lipase, que promovem a hidrólise lipídica e produzem ácidos graxos livres, monoglicerídeos e diglicerídeos, que serão incorporados nas micelas mistas e vesículas (MUN et al., 2007, HUR et al., 2009).

5.4.2.2 Bioacessibilidade do beta-caroteno e quantificação dos ácidos graxos liberados

Assim como nas nanopartículas de cupuaçu, a bioacessibilidade do beta-caroteno aumentou ao longo da digestão, o que mais uma vez pode ser atribuído à formação de produtos da digestão com a habilidade de formar micelas mistas, capazes de solubilizar o beta-caroteno (MUN et al., 2007; PORTER et al., 2007).

Figura 5.32: Bioacessibilidade total do beta-caroteno ao longo do trato gastrointestinal das nanopartículas de manteiga de murumuru no modelo digestivo *in vitro* dinâmico. A bioacessibilidade total do betacaroteno é apresentada em relação às amostras dos filtrados do jejuno (■) e íleo (■) em intervalos de 1h e expressos em % em relação a quantidade de beta-caroteno inicialmente presente na amostra.

Figura 5.33: Beta caroteno presente nas nanopartículas de murumuru não bioacessível no trato gastrointestinal no sistema digestivo *in vitro* dinâmico. O beta caroteno não absorvido pelo organismo é apresentado em relação à amostra do final do íleo, em intervalos de 1h e expressos em % em relação a quantidade de beta-caroteno inicialmente na amostra.

Comparando-se as Figuras 5.32 e 5.26, pode-se perceber que a bioacessibilidade no filtrado do jejuno foi maior para as partículas de manteiga de murumuru do que para as partículas de manteiga de cupuaçu. Tais resultados já eram esperados, pois a manteiga de murumuru possui maior quantidade de ácidos graxos de cadeia média do que a manteiga de cupuaçu (COHEN; JACKIX, 2009; ROSSAN, 2011), e sabe-se que a velocidade e a porcentagem de digestão de lipídios de cadeia média é superior aos correspondentes de cadeia longa (SEK et al., 2002). No entanto, quando se comparou os filtrados do íleo, verificou-se que a bioacessibilidade nas partículas de manteiga de murumuru, foram menores que a bioacessibilidade nas partículas de manteiga de cupuaçu. Desta forma, não houve diferença significativa na bioacessibilidade total das duas partículas.

Figura 5.34: Porcentagem de ácidos graxos livres (AGL) liberados da nanopartícula de manteiga de murumuru ao longo da digestão *in vitro* dinâmica: filtrado do Jejuno (■); filtrado do íleo (■) e final do íleo (■).

Através da comparação entre as Figuras 5.34 e 5.27, foi possível notar que a quantidade de ácidos graxos livres no filtrado do jejuno foi maior para as nanopartículas de manteiga de murumuru (37,5%) do que para as nanopartículas de manteiga de cupuaçu (31,4%); no entanto, para o filtrado do íleo, aconteceu o inverso (nanopartículas de manteiga de murumuru - 12,3% vs nanopartículas de manteiga de cupuaçu - 20%). Mais uma vez demonstra-se a relação entre biodisponibilidade e quantidade de ácidos graxos livres, pois como pode-se perceber a biodisponibilidade foi maior quando a quantidade de ácidos graxos livres aumentou.

A bioacessibilidade do beta-caroteno no filtrado do jejuno foi de aproximadamente 35%, que somado aos quase 7% do filtrado do jejuno, totalizam uma biodisponibilidade de aproximadamente 42% (Figura 5.32). O total de beta-caroteno não bioacessível foi de aproximadamente 49% (Figura 5.33). Desta forma, a perda do sistema foi um pouco menor que 10%, resultado muito próximo ao apresentado pelas nanopartículas de manteiga de cupuaçu.

5.5 DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* ESTÁTICA DAS NANOPARTÍCULAS ENCAPSULANDO BETA-CAROTENO

Os ensaios de digestibilidade *in vitro* estática só foram realizados para as partículas de manteiga de cupuaçu, com o intuito de compara-las com a digestibilidade *in vitro* dinâmica.

Estes ensaios foram baseados em Salvia-Trujillo et al. (2013) e tiveram a duração de 4h (2h no estômago e 2h no duodeno).

Assim como nos ensaios *in vitro* dinâmico, as nanopartículas permaneceram estáveis no estômago, em relação ao diâmetro médio ($p < 0,05$), mas apresentaram diferença significativa nos valores de potencial zeta ($p > 0,05$), exibindo valores positivos, demonstrando que provavelmente as partículas se aproximaram, e dessa forma começaram a coalescer (Figuras 5.35 e 5.36).

Tais resultados estão de acordo com o apresentado pela literatura (QUIAN et al., 2012; YANG; McCLEMENTS, 2013), e não diferem dos resultados de digestibilidade *in vitro* dinâmica (Figuras 5.17 e 5.18).

No que diz respeito ao duodeno, apesar de permanecerem estáveis em relação às cargas ($p < 0,05$), não permaneceram em relação ao diâmetro médio de partícula, apresentando um valor extremamente grande, diferindo significativamente até mesmo da solução duodenal do sistema dinâmico ($p > 0,05$). Esse aumento no diâmetro médio, além da instabilidade, pode também estar relacionado com a má homogeneização da pancreatina, presente no fluido duodenal, uma vez que tal substância não é facilmente solubilizada. No caso do sistema dinâmico, como nem todo fluido duodenal é inserido no sistema de uma só vez, não é possível homogeneizá-la aos poucos. Além disso, os movimentos peristálticos produzidos pelo sistema TIM não existem no sistema estático, o que provavelmente contribuiu para estes resultados.

Figura 5.35: Diâmetro médio e polidispersidade das nanopartículas de manteiga de cupuaçu ao longo da digestão *in vitro* estática.

Figura 5.36: Potencial zeta das nanopartículas de manteiga de cupuaçu ao longo da digestão *in vitro* estática.

A bioacessibilidade do beta-caroteno foi determinada comparando-se a solução que acabou de sair da digestão (*raw digesta*), com a que passou por centrifugação, com o intuito de simular a micelização (SALVIA-TRUJILLO et al., 2013).

Na Figura 5.36, podemos ver as soluções antes e depois da centrifugação.

Figura 5.37: Solução duodenal utilizada nos ensaios de digestibilidade *in vitro* estática (a) antes e (b) depois da centrifugação

A *raw digesta* e a fase micelar, após terem sido adicionadas de clorofórmio, foram centrifugadas e lidas em espectofotômetro. A bioacessibilidade foi calculada comparando-se as duas concentrações, como explicado no item 4.2.12.2. A bioacessibilidade calculada desta maneira, foi de 92,1%, bastante próximo ao apresentado por Salvia-Trujillo et al. (2013), que trabalharam com o mesmo bioativo e utilizaram o mesmo protocolo.

No entanto tal método de extração compara somente as frações após terem passado pelo processo digestivo; diferente do utilizado no sistema dinâmico, que calcula a bioacessibilidade através da comparação entre a quantidade de beta-caroteno bioacessível antes e depois da digestão.

No que diz respeito à lipólise, os ensaios de titulação não tiveram sucesso, visto que a solução após a digestão apresenta uma cor bastante escura. Com isso não foi possível verificar o ponto de viragem, e calcular a quantidade de ácidos graxos livres liberados.

5.6 ESTUDO *IN VITRO* DE TOXICIDADE CELULAR

Os testes *in vitro*, empregando culturas celulares intestinais e hepáticas foram escolhidos, pois, como explicado anteriormente neste texto, estes têm facilitado o entendimento do mecanismo de absorção de muitos nutrientes, e é, com certeza, uma forma de se avaliar também a citotoxicidade de sistemas como as nanopartículas lipídicas sólidas.

Os itens subsequentes contêm os resultados do cultivo celular e do ensaio de MTT para as linhagens em questão. Os sistemas analisados foram somente as nanopartículas produzidas com manteiga de murumuru.

5.6.1 Cultivos celulares

As linhagens celulares foram cultivadas até que atingissem 80-90% de confluência, ou seja, até que as células ocupassem de 80 a 90% da superfície de crescimento.

As células HEPG-2 e CaCo-2 foram cultivadas como descritas no item 4.2.14.1.1 Após o descongelamento as células foram colocadas em meio de cultivo e foram avaliadas diariamente.

As células HEPG-2 demoraram cerca de 24h para aderirem ao fundo da garrafa de cultivo e cerca de 10 dias para atingirem confluência desejada. Já a linhagem de CaCo-2 levou aproximadamente 96h para aderir à parede da garrafa e 20 dias para atingir a confluência desejada.

As Figuras 5.38 e 5.39 apresentam as imagens das células logo no início e após atingirem 90% de confluência.

(a)

(b)

Figura 5.38: Crescimento das células da linhagem HEPG-2: (a) no início no cultivo e (b) após atingir 90% de confluência.

O tempo necessário para atingir a confluência de 80-90% para as linhagens de CaCo-2 está de acordo com o reportado pela literatura (THANOU et al., 2002). Entretanto, para as linhagens de HEPG-2 o tempo relatado para a obtenção da confluência desejada foi de apenas 3 dias (BRANDT, 2012), o que é bastante inferior ao apresentado no presente estudo, que foi de 10 dias.

(a)

(b)

Figura 5.39: Crescimento da linhagem de células CaCo-2: (a) no início do cultivo e (b) após atingir 90% de confluência.

Uma das razões que podem ter levado a tal discrepância é o número de passagens apresentadas pela linhagem em questão (P 104), e o fato de ela ter ficado

congelada por um período de tempo grande (cerca de um ano e meio). Além disso, as células HEPG-2 apresentaram crescimento em colônia na garrafa de cultivo, comportamento não convencional, o que também pode ter colaborado para que a confluência demorasse mais tempo para ser atingida, visto que as células ficavam sobrepostas (“empilhadas”) ao invés de ocupar toda a área da garrafa. Como as células cresciam em colônias, a área da garrafa só foi completamente preenchida após vários dias, para que então pudessem atingir a confluência desejada.

5.6.2 Ensaio de MTT

Como já foi dito anteriormente, o ensaio de MTT é uma análise colorimétrica que mede a capacidade das células vivas em reduzir o MTT em formazon (AHMAD et al., 2012; DOKTOROVOVA; SOUTO; SILVA, 2014). Desta forma, quanto maior o número de células vivas, mais azul/violeta se torna o substrato. Por esse motivo, para a realização do ensaio de MTT é necessário testar vários tratamentos, que consistem em várias diluições ou concentrações do material a ser testado, com o intuito de verificar em qual concentração o material em questão começa a apresentar citotoxicidade. Nestes testes, o ponto final é a concentração que causa 50% de morte celular (IC_{50}) (DOKTOROVOVA; SOUTO; SILVA, 2014).

As concentrações de nanopartículas avaliadas foram 45,5 $\mu\text{g/ml}$ de dispersão; 22,75 $\mu\text{g/ml}$ de dispersão; 11,38 $\mu\text{g/ml}$ de dispersão; 5,69 $\mu\text{g/ml}$ de dispersão; 2,84 $\mu\text{g/ml}$ de dispersão; 1,42 $\mu\text{g/ml}$ de dispersão; 0,71 $\mu\text{g/ml}$ de dispersão; 0,36 $\mu\text{g/ml}$ de dispersão e estão representadas na Figura 5.40, na ordem decrescente.

Figura 5.40: Concentração das nanopartículas lipídicas sólidas de murumuru em ordem decrescente, em termos de $\mu\text{g/ml}$ de dispersão.

A quantidade de células introduzidas em cada poço precisou ser ajustada ao longo do experimento. A quantidade que normalmente é utilizada neste tipo de teste é a de 2×10^3 , no entanto, com essa quantidade houve pouco crescimento celular e pouca aderência no fundo da placa. Por esse motivo resolveu-se aumentar o número de células introduzidas inicialmente, passando a ser 10×10^3 .

Após os cálculos da quantidade de células necessárias para cada poço, o meio puro, o meio + suspensão celular e a água, foram introduzidos nas placas de 96 poços. Os passos subsequentes foram a aplicação das diferentes concentrações de nanopartículas, a incorporação do MTT e a homogeneização dos cristais de formazam, como descritos no item 4.2.14.2. Na Figura 5.41 estão representados os aspectos dessas soluções nos diferentes estágios.

Figura 5.41: Aspecto das soluções nas placas de 96 poços nos diferentes estágios: (a) introdução do meio e do meio com as suspensões de células; (b) introdução das diferentes concentrações da amostra; (c) introdução do MTT; (d) após homogeneização dos cristais de formazam

Para melhor visualização, a Figura 5.41 (d) foi ampliada e está representada na Figura 5.42.

Figura 5.42: Aspecto da placa de 96 poços após a homogeneização dos cristais de formazam

As Figuras 5.43 e 5.44 apresentam respectivamente a coloração da placa de 96 poços para as células de HEPG-2 e CaCo-2 após o ensaio de MTT. Como explicado anteriormente, a coluna 1 e 12, assim como as linhas A e H contém água. A coluna 2 contém o branco (meio puro) e as colunas de 3 a 11 contém as diferentes diluições de nanopartículas em ordem crescente (mais diluída para a mais concentrada).

Figura 5.43: Coloração da placa de 96 poços para as células de CaCo-2 após o ensaio de MTT.

Figura 5.44: Coloração da placa de 96 poços para as células de HEPG-2 após o ensaio de MTT.

Como pode-se observar, há um degradê de cores. Este comportamento está relacionado com a atividade metabólica das células mitocondriais. O aumento desta atividade, nos tratamentos com maiores diluições, em comparação com o controle, é notável, assim como também a sua diminuição, nos tratamentos mais concentrados. Isto significa que a partir de certa concentração, as células começaram a ser danificadas, ou seja, a partir de uma dada concentração as nanopartículas passaram a ser tóxicas para as células.

A viabilidade celular também foi representada em porcentagem, como se encontra mostrado na Figura 5.45.

Figura 5.45: Viabilidade celular (%) nas diferentes diluições de nanopartículas de manteiga de murumuru frente a linhagem celulares CaCo-2 e HEPG-2.

Nas duas formas de representação é possível observar que as nanopartículas apresentaram menor toxicidade frente à linhagem HEPG-2 do que em relação às células CaCo-2. As nanopartículas passaram a ser tóxicas nas células HEPG-2 somente na concentração de 22,75 µg/ml de dispersão, momento em que houve notável decaimento da coloração violeta (Figura 5.42) e da porcentagem de viabilidade celular (Figura 5.45), que passou de 80 para 30%. Já para as células CaCo-2, este comportamento ocorreu na concentração de 2,84 µg/ml de dispersão (Figura 5.45), onde a viabilidade celular passou a ser de 50%.

A morfologia celular também foi avaliada durante o ensaio de MTT, e observou-se mudança de comportamento na linhagem HEPG-2 já na concentração de 11,38 µg/ml de dispersão. A partir dessa diluição, apesar de apresentar alta viabilidade celular (80%), as células começaram a exibir formato diferente, indicando início da morte celular (Figura 5.46 (b)).

As morfologias foram analisadas utilizando microscópio ótico com aumento de 20 e 4 vezes. As amostras aqui relatadas se referem aos tratamentos com menor diluição e aos tratamentos onde começou a haver morte celular, como pode ser observado nas Figuras 5.46 a 5.49.

Figura 5.46: Morfologia celular para a linhagem HEPG-2 após ensaio de MTT nas concentrações de (a) 0,36 $\mu\text{g/ml}$ de dispersão; (b) 11,38 $\mu\text{g/ml}$ de dispersão; (c) 22,75 $\mu\text{g/ml}$ de dispersão e (d) 45,5 $\mu\text{g/ml}$ de dispersão (aumento de 20X)

Figura 5.47: Morfologia celular para a linhagem HEPG-2 após ensaio de MTT nas concentrações de (a) 0,36 $\mu\text{g/ml}$ de dispersão; (b) 11,38 $\mu\text{g/ml}$ de dispersão; (c) 22,75 $\mu\text{g/ml}$ de dispersão e (d) 45,5 $\mu\text{g/ml}$ de dispersão (aumento de 4X)

Figura 5.48: Morfologia celular para a linhagem CaCo-2 após ensaio de MTT nas concentrações de (a) 0,36 $\mu\text{g/ml}$ de dispersão; (b) 2,84 $\mu\text{g/ml}$ de dispersão; (c) 22,75 $\mu\text{g/ml}$ de dispersão e (d) 45,5 $\mu\text{g/ml}$ de dispersão (aumento de 20X)

Figura 5.49: Morfologia celular para a linhagem CaCo-2 após ensaio de MTT nas concentrações de (a) 0,36 $\mu\text{g/ml}$ de dispersão; (b) 2,84 $\mu\text{g/ml}$ de dispersão; (c) 22,75 $\mu\text{g/ml}$ de dispersão e (d) 45,5 $\mu\text{g/ml}$ de dispersão (aumento de 4X).

As morfologias confirmam o que já havia sido afirmado anteriormente, ou seja, que houve morte celular a partir de dada concentração de nanopartículas, as quais começaram a ocorrer respectivamente nas concentrações de 11,38 $\mu\text{g/ml}$ de dispersão e 5,69 $\mu\text{g/ml}$ de dispersão para os cultivos de HEPG-2 e CaCo-2. Observa-se ainda, que nos poços com maior concentração (45,5 $\mu\text{g/ml}$ de dispersão), em ambos os casos, quase não há mais células metabolicamente ativas, visto que houve diminuição abrupta das células vivas e mudança de morfologia das mesmas.

De maneira mais resumida pode-se dizer que os valores de IC_{50} para as células de HEPG-2 e CaCo-2 foram respectivamente 11,38 $\mu\text{g/ml}$ de dispersão e 5,69 $\mu\text{g/ml}$ de dispersão de nanopartículas.

A toxicidade apresentada provavelmente pode estar relacionada com o tensoativo utilizado, visto que o uso de tensoativos tem sido decisivo na toxicidade das nanopartículas (SCHÖLER et al., 2001). As propriedades de superfície das

nanopartículas tem uma interação decisiva com as células vivas e tecidos, e é obvio portanto, que o tipo de tensoativo, a quantidade e a interação com o núcleo lipídico terão efeito na performance das nanopartículas lipídicas nas culturas celulares (DOKTOROVOVA; SOUTO; SILVA, 2014).

Além do mais, o uso do Cremophor RH 40 é mais comum em formulações cosméticas e farmacêuticas do que em formulações alimentícias, e este motivo pode estar relacionado com sua citotoxicidade em culturas do epitélio intestinal e do fígado.

Outro fator que pode ter sido responsável pela toxicidade é o tamanho na faixa nanométrica das partículas avaliadas, visto que o tamanho das partículas pode afetar a absorção celular. A diminuição do tamanho conduz a um aumento exponencial da área superficial, o que torna a superfície do nanomaterial mais reativo com o ambiente em que ele está circundado (componentes biológicos). O aumento da absorção, das nanopartículas, em certos tecidos pode levar a seu acúmulo, o que por sua vez pode interferir nas funções biológicas críticas destas células (AILLON et al., 2009).

O beta-caroteno poderia também ter provocado tal morte celular, no entanto, estudos realizados por Yi et al. (2014) mostraram que este bioativo, em sua forma pura, não apresentou citotoxicidade frente as linhagens de CaCo-2.

As nanopartículas ao serem introduzidas em formulações alimentícias, após serem ingeridas, serão primeiramente absorvidas no intestino, para depois serem transportadas até o fígado (YU; HUANG, 2015). Desta forma, a quantidade limitante de nanopartículas adicionadas precisa estar baseada na viabilidade de CaCo-2, visto que esta apresenta menor viabilidade celular do que as culturas de HEPG-2. Portanto a concentração necessária das nanopartículas para serem empregadas em alimentos, sem que haja danos celulares, será de 5,69 µg/ml de dispersão.

No entanto, cabe ressaltar que o material que estará em contato com as células não serão as partículas diretamente, e sim as estruturas que foram formadas a partir da digestão das mesmas. Como apresentado no item 5.4.2 tais partículas foram digeridas no trato gastrointestinal, mostrando que o que entrará em contato e será incorporado nas micelas mistas serão os produtos da digestão (ácidos graxos livres, monoacilglicerídeos, diglicerídeos e o beta-caroteno bioacessível). Desta forma, a citotoxicidade relacionada com a ingestão deste tipo de nanopartículas será provavelmente menos acentuada.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho de Doutorado mostraram que a produção de nanopartículas lipídicas sólidas pelo método da temperatura de inversão de fases é possível; no entanto, a metodologia empregada nas etapas de resfriamento e aquecimento, assim como a temperatura final de resfriamento, após a inversão de fase, são fatores extremamente importantes para a obtenção de estreita distribuição de tamanho de partícula e pequenos valores de diâmetros médios (ordem nanométrica). No trabalho em questão, a inversão de fase só ocorreu quando empregou-se as manteigas de murumuru e cupuaçu, utilizando 10% em SOR 1:2, com o tensoativo na proporção de 12:8 Cremophor RH 40:Span 80. O diâmetro médio de partícula se encontrou na ordem de 30 nm, com valores de índice de polidispersidade de 0,20, que podem ser considerados baixos, principalmente para usos em alimentos.

De modo geral as partículas submetidas às diferentes condições de *stress*, permaneceram estáveis nas diferentes temperaturas, mas desestabilizaram em pH básico. No que se refere à estabilidade das nanopartículas frente às diferentes concentrações de sacarose e sal, em alguns casos estas não se mostram estáveis. No entanto, pode-se considerar que tais sistemas produzidos resistiriam à maioria das condições de processo normalmente empregadas no processamento de alimentos.

No que diz respeito à vida de prateleira, tanto as partículas de manteiga de cupuaçu quanto as partículas de murumuru permaneceram estáveis ao longo dos 120 dias de armazenamento sob refrigeração, em relação à distribuição de tamanho, diâmetro médio e polidispersidade. As nanopartículas contendo alfa-tocoferol preservaram o beta-caroteno por um período de tempo maior em comparação às formulações sem o antioxidante. Ainda em relação à conservação do beta-caroteno, foi constatado que as nanopartículas produzidas com manteiga de cupuaçu preservaram melhor o beta-caroteno do que as nanopartículas produzidas com manteiga de murumuru. Tal comportamento pode estar relacionado com o fato de as NLS de manteiga de cupuaçu apresentarem valores de $\Delta H_{\text{fusão}}$ inferiores, o que indica a existência de uma matriz menos desordenada, capaz de preservar melhor o beta-caroteno. Outro fator determinante foi a composição das manteigas e dos tensoativos. Os tensoativos utilizados são ricos em cadeias de 18 carbonos, assim como a manteiga de cupuaçu (rica em ácido esteárico), o que proporcionou interações intercadeias

favoráveis nas superfícies das nanopartículas produzidas com manteiga de cupuaçu; já a manteiga de murumuru por ser rica em cadeias de 12 carbonos (ácido láurico), proporcionou falta de compatibilidade nas cadeias (C12 e C18).

Além disso, foi realizar experimentos de digestibilidade *in vitro* dinâmica das nanopartículas lipídicas sólidas de manteiga de murumuru e manteiga de cupuaçu no sistema do tipo TIM – 1, e estas permaneceram relativamente estáveis no estômago, mas desestabilizaram completamente na fase intestinal, iniciando-se tal degradação no duodeno, mostrando que as nanopartículas são completamente degradadas na passagem do trato gastrintestinal. A bioacessibilidade do beta-caroteno aumentou com o tempo de digestão, o que certamente está relacionado com a formação das micelas mistas. As partículas produzidas com manteiga de murumuru apresentaram maior biodisponibilidade do beta-caroteno no filtrado do íleo do que as partículas de manteiga de cupuaçu. Tais resultados estão relacionados com o fato de a velocidade da lipólise dos triacilgliceróis de cadeia média ser, de forma geral, superior à hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa. No entanto, no que diz respeito à biodisponibilidade total, não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre as duas nanopartículas (valores um pouco inferiores a 45%). A lipólise foi de 50% para as nanopartículas de cupuaçu e de 49% para as de murumuru ($p>0,05$). Em relação ao sistema estático de digestão simulada *in vitro*, as partículas mais uma vez permaneceram estáveis no estômago e começaram a desestabilizar no duodeno, no entanto, o aumento do diâmetro médio foi tão brusco, que pode também estar associado à má solubilização da pancreatina presente do duodeno. No que diz respeito à bioacessibilidade, a porcentagem foi de 92%. No entanto, a metodologia estática empregada compara somente as frações após terem passado pelo processo digestivo; diferente do utilizado no sistema dinâmico, que compara as frações antes e depois da digestão.

Em relação aos estudos em linhagem de células *in vitro* e a avaliação da toxicidade, pode-se dizer que estes foram realizados com sucesso e as linhagens de HEPG-2 apresentaram maior viabilidade celular do que as linhagens de CaCo-2 quando as diferentes diluições de nanopartículas foram aplicadas. A morte celular começou a ser mais pronunciada na diluição de 11,38 µg/ml para as células de HEPG-2 e na diluição de 5,69 µg/ml para as células de CaCo-2.

De maneira geral, pode-se dizer que as nanopartículas lipídicas produzidas neste trabalho de Doutorado apresentam um bom potencial para encapsular compostos bioativos lipossolúveis, como o beta-caroteno. O fato de elas terem permanecido estáveis ao longo do tempo e em diferentes condições de *stress* nos permite dizer que elas são um bom veículo para serem empregadas em alimentos. No entanto, caso se deseje aplicá-las em formulações alimentícias, é necessário que elas estejam na concentração de 5,69 µg/ml, pois a partir desta concentração começa a haver grande diminuição da viabilidade celular das linhagens de CaCo-2, células do epitélio intestinal, onde serão primeiramente digeridas. Estudos mais aprofundados sobre a questão da toxicidade celular de tais nanopartículas, entretanto, precisam ser levados a cabo para que se possa avaliar a problemática existente sobre a incorporação de tais estruturas em matrizes alimentícias.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nos resultados obtidos durante este trabalho algumas sugestões são apresentadas para trabalhos futuros, a saber:

- Incorporação dos sistemas nanoparticulados produzidos em algum sistema alimentício-modelo e avaliação em termos de estabilidade do carotenoide, bem como em termos sensoriais;
- Estudo da digestibilidade *in vitro* no sistema alimentício-modelo contendo os sistemas nanoparticulados;
- Estudo das linhagens de CaCo-2 integradas com a digestibilidade, com o intuito de avaliar a citotoxicidade dos produtos da digestão;
- Utilização da cromatografia gasosa para a qualificação dos ácidos graxos livres liberados após a digestão das nanopartículas;
- Estudos mais aprofundados em relação à viabilidade celular, como por exemplo, a avaliação da citotoxicidade das nanopartículas vazias, e em cada componente do sistema separadamente, com o intuito de verificar com maior exatidão as causas da toxicidade apresentada.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AILLON, K. L. et al. Effects of nanomaterial physicochemical properties on in vivo toxicity. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 61, p. 457–466, 2009.

AHMAD, J. et al. Apoptosis induction by silica nanoparticles mediated through reactive oxygen species in human liver cell line HepG2. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 259, p. 160–168, 2012.

AHMED, K. et al. Nanoemulsion- and emulsionbased delivery systems for curcumin: Encapsulation and release properties. **Food Chemistry**, London, v. 132, n. 2, p. 799–807, 2012.

ALLOUCHE, J. et al. Simultaneous conductivity and viscosity measurements as a technique to track emulsion inversion by the phase-inversion-temperature method. **Langmuir**, Washington, v. 20, p. 2134–2140, 2004

ANTON, N.; BENOIT, J.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates: a review. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 128, p. 185–199, 2008.

ANTON, N. et al. Nano-emulsions and nanocapsules by the PIT method: an investigation on the role of the temperature cycling on the emulsion phase inversion. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 344, p. 44–52, 2007.

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

ARORA, S.; RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR K. M. Nanotoxicology and *in vitro* studies: The need of the hour. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 258, p.151–165, 2012.

BLANQUET, S. et al. A dynamic artificial gastrointestinal system for studying the behavior of orally administered drug dosage forms under various physiological conditions. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 21, n. 4, p. 585–591, 2004.

BONNAIRE, L. et al. Influence of lipid physical state on the *in vitro* digestibility of emulsified lipids, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, p. 3791–3797, 2008.

BRANDT, A. P. **Efeitos da sidnona SYD-1sobre alguns parâmetros metabólicos ligados à provisão de energia em células de hepatoma (HepG2) e hepatócitos.** 2012. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

BUNJES, H.; UNRUH, T. Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 59, p. 379–402, 2007.

CALDERÓN-COLÓN, X. et al. Synthesis of sub-10 nm solid lipid nanoparticles for topical and biomarker detection applications. **Journal of Nanoparticle Research**, Dordrecht, v. 16, p. 2252, 2014.

CARBONE, C. et al. FA-loaded lipid drug delivery systems: Preparation, characterization and biological studies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 52, p. 12-20, 2014.

COHEN, K. O.; JACKIX, M. N. H. Características químicas e físicas de gordura de cupuaçu e da manteiga de cacau. Brasília: Embrapa Cerrados, 2009.

CORNACCHIA, L.; ROOS, Y. H. Stability of β -carotene in protein-stabilized oil in-water delivery systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 59, p. 7013-7020, 2011.

DOKTOROVOVA, S.; SOUTO, E. B.; SILVA, A. M. Nanotoxicology applied to solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers – A systematic review of *in vitro* data, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, London, v. 87, n. 1, p. 1-18, 2014.

EE, L.S. et al. Droplet size and stability of nano-emulsions produced by the temperature phase inversion method, **Chemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 140, p. 626-631. 2008.

FERNANDEZ, P. et al. Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 251, p. 53-58, 2004.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; CARVAJAL-LÉRIDA, I.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. *In vitro* bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. **Nutrition Research**, New York, v. 29, p.751-760, 2009.

GASCO, M. R. *US Patent 5250263*, 1993.

GOLDING, M.; WOOSTER, T. J. The influence of emulsion structure and stability on lipid digestion. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, Kidlington, v. 15, p. 90-101, 2010.

GRACA, M. et al. Friction and adsorption of aqueous polyoxyethylene (Tween) surfactants at hydrophobic surfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**, São Diego, v. 315, n. 1, p. 662-670, 2007.

GRANADO-LORENCIO, F. et al. *In vitro* bioaccessibility of carotenoids and tocopherols from fruits and vegetables. **Food Chemistry**, London, v. 102, p. 641-648, 2007.

GRIFFIN, B. T.; O'DRISCOLL, C. M. A comparison of intestinal lymphatic transport and systemic bioavailability of saquinavir from three lipid-based formulations in the

anaesthetised rat model. **Journal of Pharmacy and pharmacology**, London, v. 58, p. 917-925, 2006.

GUERRA, A. et al. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion, **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 30, n. 11, p. 591-600, 2012.

HENTSCHEL, A. et al. β -Carotene-Loaded Nanostructured Lipid Carriers. **Journal of Food Science**, Easton, v. 73 n. 2, p. 1-6, 2008.

HEURTAULT, B. et al. A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 19, n. 6, p. 875-880, 2002.

HUR, S. J.; DECKER, E. A.; McCLEMENTS, D. J. Influence of initial emulsifier type on microstructural changes occurring in emulsified lipids during *in vitro* digestion. **Food Chemistry**, London, v. 114, p. 253-262, 2009.

HUYNH, N. T. et al. Lipid nanocapsules: a new platform for nanomedicine. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 379, p. 201-209, 2009.

IZQUIERDO, P. et al. Phase behavior and nano-emulsion formation by the phase inversion temperature method. **Langmuir**, Washington, v. 20, p. 6594-6598, 2004.

IZQUIERDO, P. et al. Formation and stability of nano-emulsions prepared using the phase inversion temperature method. **Langmuir**, Washington, v. 18, p. 26-30, 2002.

IZQUIERDO, P. et al. The influence of surfactant mixing ratio on nano-emulsion formation by the pit method. **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, v. 285 p. 388-394, 2005.

JAHANZAD, F. et al. Dynamics of Transitional Phase Inversion emulsification: Effect of addition time on the type of inversion and drop size **Industrial Engineering Chemistry Research**, Washington, v. 49, p. 7631-7637, 2010.

JANNIN, V.; MUSAKHANIAN, J.; MARCHAUD, D. Approaches for the development of solid and semi-solid lipid-based formulations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 60, p. 734-746, 2008.

JEONG, S. H; PARK, J. H; PARK, K. Formulation issues around lipid-based oral and parenteral drug delivery systems. In: WASAN, K. M. (Ed.). **Role of lipid expients in modifying oral and parenteral drug delivery**. Hoboken: Wiley- Interscience, 2007.

JOHANS, C.; KONTTURI, K. Electrochemically driven emulsion inversion. **Journal of Physics: Condensed Matter**, Bristol, v. 19, p. 375102-375112, 2007.

JONES, C. F.; GRAINGER, D. W. *In vitro* assessments of nanomaterial toxicity. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 61, p. 438-456, 2009.

- JOYE, I. J.; DAVIDOV-PARDO, G.; McCLEMENTS, D. J. Nanotechnology for increased micronutrient bioavailability. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 40, n. 2, 168-182, 2014.
- KNOCKAERT, G. et al. Changes in β -carotene bioaccessibility and concentration during processing of carrot puree. **Food Chemistry**, London, v. 133, p. 60-67, 2012.
- KONG, F.; SINGH, R. P. A human gastric simulator (hgs) to study food digestion in human stomach. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 75, n. 9, p. E627-E635, 2010.
- KONG, F.; SINGH, R. P. Disintegration of solid foods in human stomach. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 73, n. 5, p. R67-R80, 2008.
- KRUGLYAKOV, P. M. **Hydrophile-lipophile balance of surfactants and solid particles: physicochemical aspects and applications**. Amsterdam: Elsevier, 2000. p.102-110.
- KRUL, C. et al. Application of a dynamic *in vitro* gastrointestinal tract model to study the availability of food mutagens, using heterocyclic aromatic amines as model compounds, **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 38, n. 9, p. 783-792, 2000.
- LAPARA, J. M.; GLAHN, R. P.; MILLER, D. D. Different responses of Fe transporters in Caco-2/HT29-MTX cocultures than in independent Caco-2 cell cultures. **Cell Biology International**, London, v. 33, p. 971-977, 2009.
- LEE, S. J. et al. Protein-stabilized nanoemulsions and emulsions: comparison of physicochemical stability, lipid oxidation, and lipase digestibility. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 59, p. 415-427, 2011.
- LIU, W. et al. Formation and stability of paraffin oil-in-water nano-emulsions prepared by the emulsion inversion point method. **Journal of Colloid and Interface Science**, San Diego, v. 303, p. 557-563, 2006.
- LIU, Y. et al. Investigation into the bioaccessibility and microstructure changes of β -carotene emulsions during *in vitro* digestion. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 15, p. 86-95, 2012.
- LOH, J. W. et al. Uptake and cytotoxicity of chitosan nanoparticles in human liver cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 249, p. 148-157, 2010.
- MacGREGOR, K. J. et al. Influence of lipolysis on drug absorption from the gastrointestinal tract. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 25, p. 33-46, 1997.
- MALDONADO-VALDERRAMA, J. et al. The role of bile salts in digestion. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 165, p. 36-46, 2011.
- MAO, L. et al. Effects of small and large molecule emulsifiers on the characteristics of β -carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 47, n. 3, p. 336-342, 2009.

MCALLISTER, M. Dynamic dissolution: a step closer to predictive dissolution testing? **Molecular Pharmaceutics**, Washington, v. 7, n. 5, p. 1374-1387, 2010.

McCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Designing functional foods: measuring and controlling food structure breakdown and nutrient absorption, Washington: CRC Press, 2009. p. 481-501.

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

McCLEMENTS, D. J. Comments on viscosity enhancement and depletion flocculation by polysaccharides. **Food Hydrocolloids**. Oxford, v. 14, p. 173-177, 2000.

McCLEMENTS, D. J. Design of Nano-Laminated Coatings to Control Bioavailability of Lipophilic Food Components. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 75, n. 1, p. 30-42, 2010.

McCLEMENTS, D. J.; LI, Y. Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 159, p. 213-228, 2010.

McCLEMENTS, D. J.; XIAO, H. Potential biological fate of ingested nanoemulsions: influence of particle characteristics. **Food & Function**, Cambridge, v. 3, p. 202- 220, 2012.

MEI, Z. et al. Preparation of positively charged oil/water nano-emulsions with a sub-PIT method, **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, v. 361, p. 565-572, 2011.

MEI, Z.; XU, J.; SUN, D. O.W. Nano-emulsions with tunable PIT induced by inorganic salts nanoemulsion formation by phase inversion emulsification: on the nature of inversion. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 375, p. 102-108, 2011.

MINEKUS, M.; HAVENAAR, R. United States Patent nr. 5,525,305, 1996.

MINEKUS, M. et al. Effect of partially hydrolyzed guar gum (phgg) on the bioaccessibility of fat and cholesterol. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Oxfordshire, v. 69, n. 5, p. 932-938, 2005.

MONTENEGRO, L. et al. *In vitro* evaluation of idebenone-loaded solid lipid nanoparticles for drug delivery to the brain. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 37, n. 6, p.737-746, 2011.

MONTENEGRO, L. et al. Idebenone-loaded solid lipid nanoparticles for drug delivery to the skin: *In vitro* evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 434, p. 169-174, 2012.

- MONTENEGRO, L. et al. *In vitro* evaluation on a model of blood brain barrier of idebenone-loaded solid lipid nanoparticles. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, Stevenson Ranch, v. 12, p. 330-337, 2012.
- MONTENEGRO, L. et al. Differential scanning calorimetry studies on sunscreen loaded solid lipid nanoparticles prepared by the phase inversion temperature method. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 415, p. 301-306, 2011.
- MORAIS, J. M.; ROCHA, P. A.; BURGESS, D. J. Influence of phase inversion on the formation and stability of one-step multiple emulsions. **Langmuir**, Washington, v. 25, n. 14, p. 7954-7961, 2009.
- MORAIS, J. M. Characterization and evaluation of electrolyte influence on canola oil/water nano-emulsion. **Journal of Dispersion Science and Technology**, New York, v. 27, p. 1009-1014, 2006.
- MORALES, D. et al. A study of the relation between bicontinuous microemulsions and oil/water nano-emulsion formation. **Langmuir**, Washington, v. 19, p. 7196-7200, 2003.
- MORALES, D. et al. Oil/water droplet formation by temperature change in the water/c16e6/mineral oil system. **Langmuir**, Washington, v. 22, p. 3014-3020, 2006.
- MÜLLER, R. H.; LUCKS, J. S. Patente europeia 0605497. Alemanha, 1996.
- MÜLLER, R. H.; MADER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery: a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, London, v. 50, p. 161-177, 2000.
- MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 242, p. 121-128, 2002.
- MUN, S.; DECKER, E. A.; McCLEMENTS, D. J. Influence of emulsifier type on *in vitro* digestibility of lipid droplets by pancreatic lipase. **Food Research International**, Barking, v. 40, n. 6, p. 770-781, 2007.
- NIK, A. M.; CORREDIG, M.; WRIGHT, A. J. Changes in WPI-stabilized emulsion interfacial properties in relation to lipolysis and β -carotene transfer during exposure to simulated gastric–duodenal fluids of variable composition. **Food Digestion**, New York, v. 1, n. 1-2, p. 14-27, 2010.
- NIK, A. M.; CORREDIG, M.; WRIGHT, A. J. Impact of interfacial composition on emulsion digestion and rate of lipid hydrolysis using different *in vitro* digestion models. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 83, n. 2, p. 321-30, 2011.
- OSTERTAG, F.; WEISS, J.; McCLEMENTS, D. J. Low-energy formation of edible nanoemulsions: Factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, v. 388, p. 95-102, 2012.

- PENG, L.; LIU, C.; KWANA, C.; HUANG, K. Optimization of water-in-oil nanoemulsions by mixed surfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 370, n. 1-3, p. 136-142, 2010.
- PEY, C. M. et al. Optimization of nano-emulsions prepared by low-energy emulsification methods at constant temperature using a factorial design study. **Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 288, p. 144-150, 2006.
- PEY, C. M. et al. Optimization of nano-emulsions prepared by low-energy emulsification methods at constant temperature using a factorial design study. **Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 288, p. 144-150, 2006.
- PINHEIRO, A. C. et al. Unravelling the behaviour of curcumin nanoemulsions during *in vitro* digestion: effect of the surface charge. **Soft Matter**, Cambridge, v. 9, p. 3147-3155, 2013.
- PORRAS, M. et al. Studies of formation of A/O nano-emulsions. **Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 249, n. 1-3, p.115-118, 2004.
- PORTER, C. J. H.; TREVASKIS, N. L.; CHARMAN, W.N. Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. **Nature Reviews**, London, v. 6, p. 231-248, 2007.
- QUIAN, C. et al. Physical and chemical stability of b carotene-enriched nanoemulsions: Influence of pH, ionic strength, temperature, and emulsifier type. **Food Chemistry**, London, v. 132, p. 1222-1229, 2012.
- REIS, P. et al. Lipase reaction at interfaces as self-limiting processes. **Comptes Rendus Chimie**, Issy les Moulineaux, v. 12, n. 1-2, p. 163- 170, 2009.
- REIS, P. M. et al. Influence of Surfactants on Lipase Fat Digestion in a Model Gastro-intestinal System. **Food Biophysics**, New York, v. 3, p. 370-381, 2008.
- RELKIN, P. AND SHUKAT, R. FOOD protein aggregates as vitamin-matrix carriers: Impact of processing conditions. **Food Chemistry**, London, v. 134, p. 2141-2148, 2012.
- RIBNICKY, D. M. et al. Effects of a high fat meal matrix and protein complexation on the bioaccessibility of blueberry anthocyanins using the TNO gastrointestinal model (TIM-1). **Food Chemistry**, London, v. 142, p. 349-357, 2014.
- ROSSAN, M. R. **Preparação e caracterização de micro e nanopartículas lipídicas sólidas para aplicação em cosméticos**. 2011. 181 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

- SADTLER, V. et al. PEO-covered nanoparticles by emulsion inversion point (EIP) method. **Macromolecular Rapid Communications**, Weinheim, v. 31, p. 998-1002, 2010.
- SAHU, S. C. et al. Comparative cytotoxicity of nanosilver in human liver HEPG-2 and colon CaCo-2 cells in culture. **Journal of Applied Toxicology**, Chichester, v. 34, n. 11, p. 1155-66, 2013.
- SAJJADI, S. Nanoemulsion formation by phase inversion emulsification: on the nature of inversion. **Langmuir**, Washington, v. 22, p. 5597-5603, 2006.
- SALAGER, J. L. et al. Using emulsion inversion in industrial processes. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 108-109, p. 259-272, 2004.
- SALAGER, J. L. et al. Partitioning of ethoxylated octylphenol surfactants in microemulsion-oil-water systems: influence of temperature and relation between partitioning coefficient and physicochemical formulation. **Langmuir**, Washington, v. 16, n. 13, p. 5534-5539, 2000.
- SALVIA-TRUJILLO, L. et al. Modulating b-carotene bioaccessibility by controlling oil composition and concentration in edible nanoemulsions. **Food Chemistry**, London, v. 139, p. 878-884, 2013.
- SCHALBART, P.; KAWAJI, M.; FUMOTO, K. Formation of tetradecane nanoemulsion by low-energy emulsification methods. **International journal of refrigeration**, London, v. 33, p. 1612-1624.
- SCHÖLER, N. et al. Surfactant, but not the size of solid lipid nanoparticles (SLN) influences viability and cytokine production of macrophages. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 221, n. 1-2, p. 57-67, 2001.
- SEK, L. et al. Evaluation of the in-vitro digestion profiles of long and medium chain glycerides and the phase behaviour of their lipolytic products. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 54, p. 29-41, 2002.
- SILVA, J. C. et al. Characterization, physico-chemical stability and evaluation of *in vitro* digestibility of solid lipid microparticles produced with palm kernel oil and tristearin. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 34, n. 3, p. 532-538, 2014.
- SHINODA, K., SAITO, H. The effect of temperature on the phase equilibria and the types of dispersions of the ternary system composed of water, cyclohexane, and nonionic surfactant. **Journal of Colloid and Interface Science**, Maryland Heights, v. 26, p. 70-74, 1968.
- SHINODA, K. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF SURFACE ACTIVITY, 5, 1969, Barcelona, v. 2, p. 275-283.

SOLANS, C.; SOLÈ, I. Nano-emulsions: Formation by low-energy methods. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, Kidlington, v. 17, p. 246-254, 2012.

SOLÈ, I. et al. Nano-emulsions preparation by low energy methods in an ionic surfactant system. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 288, p. 138-143, 2006.

SOUTO, E. B. **SLN and NLC for topical delivery of antifungals**. 2005. Tese (Doutorado) – Departamento de Biologia, Química e Farmácia, Freie Universität Berlin, Berlin, 2005.

SPERNATH, L.; MAGDASSI, S. A new method for preparation of poly-lauryl acrylate nanoparticles from nanoemulsions obtained by the phase inversion temperature process. **Polymers For Advanced Technologies**, New York, v. 18, p. 705-711, 2007.

TAN, C. P.; NAKAJIMA, M. β -Carotene nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation. **Food Chemistry**, London, v. 92, n. 1, p. 661–671, 2005.

TANAKA, M. et al. Evidence for interpenetration of core triglycerides into surface phospholipid monolayers in lipid emulsions. **Langmuir**, Washington, v. 19, n. 13, p. 5192-5196, 2003.

THANASUKARN, P.; PONGSAWATMANIT, R.; McCLEMENTS, D. J. Impact of fat and water crystallization on the stability of hydrogenated palm oil-in-water emulsions stabilized by a nonionic surfactant. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, p. 3591-3597, 2006.

THANOU, M. et al. Quaternized chitosan oligomers as novel gene delivery vectors in epithelial cell lines. **Biomaterials**, Surrey, v. 23, p. 153-159, 2002.

THARAKAN, A. et al. Mass transfer and nutrient absorption in a simulated model of small intestine. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 75, n. 6, p. 339-346, 2010.

TIKEKAR, R. V.; NITIN, N. Effect of physical state (solid vs. liquid) of lipid core on the rate of transport of oxygen and free radicals in solid lipid nanoparticles and emulsion. **Soft Matter**, Cambridge, v. 7, p. 8149-8158, 2011.

TREVASKIS, N. L.; CHARMAN, W. N.; PORTER, C. J. H. Lipid-based delivery systems and intestinal lymphatic drugtransport: A mechanistic update. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 60, p. 702-716, 2008.

TREVASKIS, N. L.; CHARMAN, W. N.; PORTER, C. J. H. Lipid-based delivery systems and intestinal lymphatic drugtransport: a mechanistic update. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 60, p. 702-716, 2008.

TRIPLETT II, M. D.; RATHMAN, J. F. Optimization of *b*-carotene loaded solid lipid nanoparticles preparation using a high shear homogenization technique. **Journal of Nanoparticle Research**, Dordrecht, v. 11, p. 601-614, 2009.

- TRIPLETT II, M. D.; RATHMAN, J. F. Optimization of *b*-carotene loaded solid lipid nanoparticles preparation using a high shear homogenization technique. **Journal of Nanoparticle Research**, Dordrecht, v. 11, p. 601-614, 2009.
- TROMBINO, S. et al. Stearyl ferulate-based solid lipid nanoparticles for the encapsulation and stabilization of β -carotene and α -tocopherol. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 72, p. 181-187, 2009.
- VERWEI, M. et al. Predicted serum folate concentrations based on *in vitro* studies and kinetic modeling are consistent with measured folate concentrations in humans. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 136, n. 12, p. 3074-3078, 2006.
- WANG, L. et al. Nanoemulsions prepared by a two-step low-energy process **Langmuir**, Washington, v. 24, p. 6092-6099, 2008.
- WANG, L. et al. Toxicity of cdse nanoparticles in caco-2 cell cultures. **Journal of Nanobiotechnology**, London, v. 6, n. 11, p. 1-15, 2008.
- WILDE, P. J.; CHU, B. S. Interfacial & colloidal aspects of lipid digestion. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 165 p.14-22, 2011.
- WISSING, S. A.; KAYSER, O.; MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 56, p. 1257-1272, 2004.
- YANG, Y.; McCLEMENTS D. J Vitamin e bioaccessibility: influence of carrier oil type on digestion and release of emulsified α -tocopherol acetate. **Food Chemistry**, London, v. 141, n. 1, p. 473-481, 2013.
- YI, J. et al. Cellular uptake of β -carotene from protein stabilized solid lipid nanoparticles prepared by homogenization evaporation method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 62, p. 1096-1104, 2014.
- YU, H.; HUANG, Q. Investigation of the cytotoxicity of food-grade nanoemulsions in Caco-2 cell monolayers and HepG2 cells. **Food Chemistry**, London, v. 141, p. 29-33, 2013.
- ZHANG, L. et al. Transparent dispersions of milk-fat-based nanostructured lipid carriers for delivery of β -carotene. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 61, p. 9435-9443, 2013.
- ZHUANG, C. Y. et al. Preparation and characterization of vinpocetine loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for improved oral bioavailability. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 394, p. 179-185, 2010.