UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

JANAINA COSTA DA SILVA

Estabilidade físico-química e avaliação da digestibilidade *in vitro* de micropartículas
lipídicas sólidas produzidas com óleo de palmiste

Pirassununga

2013

JANAINA COSTA DA SILVA

Estabilidade físico-química e avaliação da digestibilidade *in vitro* de micropartículas lipídicas sólidas produzidas com óleo de palmiste

VERSÃO CORRIGIDA

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Engenharia de Alimentos.

Área de concentração: Ciência, Ciências da Engenharia de Alimentos.

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

Pirassununga

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

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

Silva, Janaina Costa da
S586e Estabilidade físico-química e avaliação da
digestibilidade *in vitro* de micropartículas lipídicas
sólidas produzidas com óleo de palmiste / Janaina
Costa da Silva. -- Pirassununga, 2013.
86 f.
Dissertação (Mestrado) -- 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. Óleo de palmiste 2. Digestibilidade 3. Ácido
esteárico 4. Triestearina 5. Micropartículas lipídicas
sólidas I. Título.

Folha de Aprovação

SILVA, J.C. Estabilidade físico-química e avaliação da digestibilidade *in vitro* de micropartículas lipídicas sólidas produzidas com óleo de palmiste. [Dissertação Mestrado]. Pirassununga: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, USP, 2013.

Pirassununga, _____/_____/_____

Banca examinadora

Prof^a Dr^a Samantha Cristina de Pinho
(Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/USP)
(Orientadora)

Prof^a Dr^a Rosemary Aparecida de Carvalho
(Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/USP)
(Membro)

Prof^a Dr^a Rosiane Lopes da Cunha
(Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP)
(Membro)

Aos meus pais, Laercio e Therezinha que sempre me incentivaram a buscar os meus objetivos. Ao meu marido Edmar, pelo companheirismo e apoio. A Deus, razão da minha vida e existência.

Agradecimentos

À Deus, por me direcionar, proteger e amar.

À prof^a Samantha C. de Pinho, pela orientação e ideias compartilhadas.

Aos estagiários Thais Borrin, Pâmela Ruy, Beatriz Cury, Fernando Santos e Thais Brito pelo auxílio nos experimentos deste projeto.

Aos especialistas de laboratório Ana Mônica Bittante pelas análises de calorimetria diferencial de varredura e ao Marcelo Tomazzini pelo auxílio nos procedimentos laboratoriais.

Aos técnicos de laboratório Keila Aracava e Guilherme de Souza Silva pela disponibilidade em ajudar.

Ao Prof. Lisandro Pavie Cardoso por tornar as análises de difração de raios-X possíveis.

Ao prof. Antonio Vicente (Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, Portugal) por tornar possível o experimento de digestibilidade in vitro dinâmica.

Aos colegas do Laboratório de Instalações Piloto da Universidade do Minho: Ana Cristina Pinheiro e Cristiana Castro pela ajuda e disponibilidade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelas bolsas de estudos concedidas (processos 2010/13229-8 – bolsa de Mestrado e 2012/02316-2 – bolsa BEPE).

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao meu marido Edmar, pelo apoio incondicional, pela paciência, pelo carinho e dedicação.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo a produção de micropartículas lipídicas sólidas utilizando ácido esteárico/triestearina e óleo de palmiste, e a avaliação de sua estabilidade físico-química e digestibilidade *in vitro*. Nas dispersões contendo ácido esteárico e óleo de palmiste utilizou-se como tensoativos o polisorbato 20 e span 80 (4% em massa); já nas dispersões contendo triestearina e óleo de palmiste utilizou-se o polisorbato 60 e o span 80 (4% em massa) como tensoativos e o hidrocolóide goma xantana (0,05% em massa) como espessante. A porcentagem do óleo de palmiste variou entre 30 e 90% do conteúdo lipídico total nas partículas. Com relação à microestrutura, todas as micropartículas produzidas apresentaram característica totalmente amorfa, favorecendo as condições de encapsulação de bioativos, diminuindo a chance de expulsão dos mesmos da estrutura. Com relação à vida de prateleira, todas as micropartículas produzidas mostraram-se extremamente estáveis durante o período de estocagem analisado, sendo que a distribuição de tamanho de partícula apresentou-se bimodal, sendo uma população de partículas em torno de 300 nm e a outra em torno de 1500 nm. As análises de potencial zeta e polidispersidade ao longo do tempo de armazenagem confirmaram a alta estabilidade dos sistemas produzidos. As micropartículas produzidas com ácido esteárico e óleo de palmiste se mostraram menos estáveis do que as produzidas com triestearina, frente as diferentes condições de *stress* aplicadas. As análises de digestibilidade *in vitro* estática apresentaram resultados piores que a digestibilidade *in vitro* dinâmica, sendo esta metodologia mais eficiente para prever a digestibilidade. Pelas análises de distribuição média de tamanho, potencial zeta, quantificação de ácidos graxos livres e microscopia ótica foi constatada inibição da lipólise durante os ensaios, a qual foi mais acentuada nas micropartículas produzidas com ácido esteárico. No entanto, pode-se deduzir que as micropartículas lipídicas produzidas neste trabalho podem ser estruturadas de modo a produzir efetiva liberação controlada de bioativos encapsulados.

Palavras-chave: micropartículas lipídicas sólidas, óleo de palmiste, digestibilidade, ácido esteárico, triestearina.

ABSTRACT

The present study proposed the production of solid lipid microparticles using stearic acid / tristearin and palm kernel oil, and the evaluation of their physical and chemical stability and *in vitro* digestibility. In the dispersions containing stearic acid and palm kernel oil the surfactants used were polysorbate 20 and span 80 (4% wt). In the production of dispersions containing tristearin and palm kernel oil, polysorbate 60 and span 80 (4% wt) were used as surfactants, as well as xanthan gum (0,05% wt) as thickener. The percentage of palm kernel oil ranged between 30 and 90% of the overall lipid content of the particles. With respect to microstructure, all the microparticles produced had completely amorphous characteristic, a desired characteristic for the encapsulation of a hydrophobic bioactive, as in amorphous particles the chance of expulsion is decreased. With regard to shelf life, all microparticles were extremely stable during the considered storage period, and the particle size distributions were always bimodal, with a population of particles around 300 nm and the other at approximately 1500 nm. Analyses of zeta potential and polydispersity over time storage confirmed the high stability of the systems produced. When submitted to different stress conditions, the microparticles produced with stearic acid and palm kernel oil were less stable than those produced with tristearin. As for digestibility assays, static experiments showed much worse results than the *in vitro* dynamic assays. The analyses of average size distribution, zeta potential, quantification of free fatty acids and optical microscopy showed inhibition of lipolysis during the digestibility assays, which was more pronounced in the microparticles produced with stearic acid. However, it is possible to say that the lipid microparticles produced in this work can be structured to produce effective controlled release of bioactive encapsulated.

Keywords: solid lipid microparticles, palm kernel oil, digestibility, stearic acid, tristearin.

Lista de Tabelas

Tabela 3.1. Temperatura de fusão e sigla dos lipídios utilizados para a produção das micropartículas lipídicas sólidas	19
Tabela 3.2. Dados sobre os tensoativos utilizados na produção das micropartículas lipídicas sólidas	19
Tabela 3.3. Valores de EHL testados para as emulsões preparadas com ácido esteárico e óleo de palmiste e respectivas formulações empregadas	22
Tabela 3.4. Valores de EHL testados para as emulsões preparadas com triestearina e óleo de palmiste e respectivas formulações testadas	22
Tabela 3.5. Formulações das micropartículas lipídicas sólidas testadas contendo óleo de palmiste e ácido esteárico	23
Tabela 3.6. Formulações das micropartículas lipídicas sólidas testadas contendo óleo de palmiste e triestearina.....	24
Tabela 3.7. Constituintes e concentrações dos sucos sintéticos utilizados no modelo de digestão <i>in vitro</i>	26
Tabela 4.1. Composição do óleo de palmiste em ácidos graxos.....	30
Tabela 4.2. Composição do óleo de palmiste em triacilgliceróis	31
Tabela 4.3. Dados calorimétricos (obtidos por DSC) das misturas lipídicas contendo óleo de palmiste e ácido esteárico.	34
Tabela 4.4. Dados calorimétricos (obtidos por DSC) das misturas contendo triestearina e óleo de palmiste.....	36
Tabela 4.5. Resultados da avaliação do EHL para as formulações de partículas produzidas com 30% de óleo de palmiste e 70% de ácido esteárico.....	40
Tabela 4.6. Resultados da avaliação do EHL para as formulações de partículas produzidas com 50% de óleo de palmiste e 50% de ácido esteárico.....	41
Tabela 4.7. Resultados da avaliação do EHL para as formulações de partículas produzidas com 70% de óleo de palmiste e 30% de ácido esteárico.....	41
Tabela 4.8. Resultados da avaliação do EHL para as formulações de partículas produzidas com 90% de óleo de palmiste e 10% de ácido esteárico.....	41
Tabela 4.9. Resultados da avaliação do EHL para as formulações de partículas produzidas com 30% de óleo de palmiste e 70% de triestearina	41

Tabela 4.10. Resultados da avaliação do EHL para as formulações de partículas produzidas com 50% de óleo de palmiste e 50% de triestearina	42
Tabela 4.11. Resultados da avaliação do EHL para as formulações de partículas produzidas com 70% de óleo de palmiste e 30% de triestearina	42
Tabela 4.12. Resultados da avaliação do EHL para as formulações de partículas produzidas com 90% de óleo de palmiste e 10% de triestearina	42
Tabela 4.13. Valores de EHL ótimos para as formulações de micropartículas lipídicas sólidas testadas.....	43
Tabela 4.14. Dados calorimétricos (obtidos por DSC) das micropartículas lipídicas sólidas contendo óleo de palmiste e ácido esteárico.	45
Tabela 4.15. Dados calorimétricos (obtidos por DSC) das micropartículas lipídicas sólidas contendo óleo de palmiste e triestearina.....	48
Tabela 4.16. Diâmetro hidrodinâmico médio, polidispersidade e potencial zeta de micropartículas lipídicas sólidas formuladas com ácido esteárico e óleo de palmiste.	51
Tabela 4.17. Diâmetro hidrodinâmico médio, polidispersidade e potencial zeta de micropartículas lipídicas sólidas formuladas com triestearina e óleo de palmiste.	54
Tabela 4.18. Liberação de ácidos graxos livres de micropartículas lipídicas sólidas formuladas com e óleo de palmiste após a digestão <i>in vitro</i> dinâmica.....	64
Tabela 4.19. Potencial zeta inicial das micropartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico e óleo de palmiste após a digestão <i>in vitro</i> dinâmica.	70
Tabela 4.20. Potencial zeta das micropartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de palmiste após a digestão <i>in vitro</i> dinâmica.....	71

Lista de Figuras

Figura 2.2. Exemplos de diferentes tipos de partículas que podem ser produzidas em sistemas lipídicos emulsionados. (adaptado de McClements (2010)).....	5
Figura 2.3. Esquema simplificado de uma partícula lipídica sólida. (fonte: http://www.azonano.com/work).	6
Figura 2.4. Diferentes tipos de matrizes lipídicas de partículas lipídicas sólidas. (Fonte: Muller <i>et al.</i> , 2002)	7
Figura 2.5. Estrutura das subcélulas das três formas polimórficas mais comuns dos triacilgliceróis (fonte: HIMAWAN <i>et al.</i> , 2006).....	8
Figura 2.6. Modelo esquemático da transição das formas ortorrômicas E→B (Fonte: KANECO <i>et al.</i> , 1999)	9
Figura 2.7. Esquema do modelo de digestão <i>in vitro</i> TIM. A – compartimento gástrico, B – compartimento duodeno, C- compartimento jejuno, D – compartimento íleo, E – jaqueta de vidro, F – parede flexível, G – bomba rotativa, H – válvula pilórica, I – eletrodos de pH, K – pré filtro, L – membrana de fibra oca, M – filtrado do jejuno, N – válvula de liberação do íleo. Fonte: Reis <i>et al.</i> (2008)	16
Figura 2.8. Modelo gástrico dinâmico (DMG). Fonte: Golding e Wooster (2011).....	17
Figura 3.1. Esquema representativo da produção das micropartículas lipídicas sólidas	23
Figura 3.2. Detalhe do compartimento de vidro, no qual ocorria a digestão simulada dinâmica.....	28
Figura 3.3. Sistema utilizado para os ensaios de digestibilidade <i>in vitro</i> dinâmica, no Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho.	29
Figura 4.1. Termogramas obtidos por calorimetria diferencial de varredura: (a) OP puro; (b) 90%OP+10%AE; (c) 70%OP+30%AE; (d) 50%OP+50%AE; (e) 30%OP+70%AE; (f) AE puro.....	32
Figura 4.2. Difrátogramas de raios-X: (a) óleo de palmiste puro; (b) ácido esteárico puro; (c) misturas de ácido esteárico e óleo de palmiste.	35
Figura 4.3. Representação esquemática do arranjo molecular cristalino do ácido esteárico (fonte: KANECO <i>et al.</i> , 1999).....	34

Figura 4.4. Termogramas obtidos por calorimetria diferencial de varredura: (a) 90%OP+10%TS; (b) 70%OP+30%TS; (c) 50%OP+50%TS ; (d) 30%OP+70%TS; (e) triestearina pura.	37
Figura 4.5. Difrátogramas de raios-X da triestearina pura e das misturas de triestearina e óleo de palmiste.....	38
Figura 4.6. Representação esquemática do arranjo molecular e formas polimórficas de diferentes triacilglicerídeos. (fonte: BUNJES e UNRUH, 2007).....	39
Figura 4.7. Difrátogramas de raios-X das micropartículas lipídicas sólidas produzidas com óleo de palmiste e ácido esteárico (obtidos a 10°C).....	44
Figura 4.8. Termogramas obtidos por calorimetria diferencial de varredura das micropartículas lipídicas sólidas produzidas com óleo de palmiste e ácido esteárico.	45
Figura 4.9. Difrátogramas de raios-X das micropartículas lipídicas produzidas com triestearina e óleo de palmiste (obtidos a 10°C).....	46
Figura 4.10. Termogramas obtidos por calorimetria diferencial de varredura das micropartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de palmiste.	47
Figura 4.11. Perfis de distribuição de tamanho de partícula, ao longo do tempo de armazenagem, para amostras de micropartículas lipídicas sólidas produzidas com diferentes composições de ácido esteárico e óleo de palmiste.....	49
Figura 4.12. Valores de potencial zeta ao longo do tempo de armazenagem, para micropartículas lipídicas sólidas compostas por ácido esteárico e óleo de palmiste.	50
Figura 4.13. Perfis de distribuição de tamanho de partícula, ao longo do tempo de armazenagem, para amostras de micropartículas lipídicas sólidas produzidas com diferentes composições de triestearina e óleo de palmiste.	52
Figura 4.14. Potencial zeta ao longo do tempo de armazenagem, para micropartículas lipídicas sólidas compostas por triestearina e óleo de palmiste.....	53
Figura 4.15. Estabilidade físico-química em diferentes condições de <i>stress</i> para micropartículas lipídicas sólidas produzidas com diferentes composições de ácido esteárico e óleo de palmiste (■ % fase creme, □ %fase emulsão).....	55
Figura 4.16. Estabilidade físico-química em diferentes condições de <i>stress</i> para micropartículas lipídicas sólidas produzidas com diferentes composições de triestearina (■ % fase creme, □ %fase emulsão).....	57
Figura 4.17. Perfis de distribuição de tamanho de partícula, antes e no final da digestão <i>in vitro</i> estática, para amostras de micropartículas lipídicas sólidas	

produzidas com diferentes composições de óleo de palmiste e ácido esteárico (— antes da digestão; — após digestão intestinal simulada).....	59
Figura 4.18. Perfis de distribuição de tamanho de partícula, antes e no final da digestão <i>in vitro</i> estática, para amostras de micropartículas lipídicas sólidas produzidas com diferentes composições de óleo de palmiste e triestearina. (— antes da digestão; — após digestão intestinal simulada)	60
Figura 4.19. Liberação de ácidos graxos após a digestão <i>in vitro</i> estática intestinal simulada das micropartículas lipídicas sólidas com óleo de palmiste.	61
Figura 4.20. Liberação de ácidos graxos livres durante a digestão <i>in vitro</i> de micropartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico e óleo de palmiste.	63
Figura 4.21. Liberação de ácidos graxos livres durante a digestão <i>in vitro</i> de micropartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de palmiste.	64
Figura 4.22. Efeito da digestibilidade <i>in vitro</i> dinâmica nos perfis de distribuição de tamanho de partícula acumulado para amostras de micropartículas lipídicas sólidas produzidas com diferentes composições de óleo de palmiste e ácido esteárico: — antes da digestão; — após digestão no estômago; — após digestão intestinal.....	65
Figura 4.23. Efeito da digestibilidade <i>in vitro</i> dinâmica nos perfis de distribuição de tamanho de partícula acumulado para amostras de micropartículas lipídicas sólidas produzidas com diferentes composições de óleo de palmiste e triestearina: — antes da digestão; — após digestão no estômago; — após digestão intestinal.	66
Figura 4.24. Micrografias óticas para amostras de micropartículas lipídicas sólidas de diferentes composições de óleo de palmiste e ácido esteárico submetidas a digestão <i>in vitro</i> dinâmica simulada.	67
Figura 4.25. Micrografias óticas para amostras de micropartículas lipídicas sólidas de diferentes composições de óleo de palmiste e triestearina submetidas à digestão <i>in vitro</i> dinâmica simulada.....	68
Figura 4.26. Potencial zeta ao longo a digestão <i>in vitro</i> dinâmica de micropartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico e óleo de palmiste.....	69
Figura 4.27. Potencial zeta ao longo a digestão <i>in vitro</i> dinâmica de micropartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de palmiste.	70

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AE – ácido esteárico

TS – triestearina

OP – óleo de palmiste

EHL – equilíbrio hidrofílico lipofílico

MLS – micropartículas lipídicas sólias

DSC – calorimetria diferencial de varredura

DRX – difração de raios X

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Microencapsulação em sistemas lipídicos	3
2.2. Partículas lipídicas sólidas	5
2.3. Triacilgliceróis de cadeia média e óleos láuricos	9
2.4. Dinâmica dos processos digestivos	12
2.4.1. Mecanismo de digestão e absorção dos lipídios	13
2.4.2. Modelos <i>in vitro</i> para simulação dos processos digestivos	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1. MATERIAIS	18
3.2. MÉTODOS	20
3.2.1. Determinação da composição em ácidos graxos do óleo de palmiste	20
3.2.2. Preparação e caracterização das misturas lipídicas	20
3.2.2.1. Preparação das misturas lipídicas	20
3.2.2.2. Caracterização das misturas lipídicas	20
3.2.3. Determinação do valor de EHL (equilíbrio hidrofílico-lipofílico) para as misturas lipídicas	21
3.2.4. Produção das micropartículas lipídicas sólidas	22
3.2.5. Caracterização das micropartículas lipídicas sólidas	24
3.2.6. Determinação da estabilidade físico-química das micropartículas lipídicas sólidas em diferentes condições de <i>stress</i>	25
3.2.7. Avaliação da digestibilidade <i>in vitro</i> das micropartículas lipídicas sólidas	26
3.2.7.1. Composição das soluções gástrica, duodenal e do suco biliar utilizados nos ensaios de digestibilidade <i>in vitro</i>	26

3.2.7.2.	Ensaio de digestibilidade simulada <i>in vitro</i> estática.....	27
3.2.7.3.	Ensaio de digestibilidade simulada <i>in vitro</i> dinâmica.....	27
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1.	Caracterização do óleo de palmiste.....	30
4.2.	Caracterização das misturas lipídicas	32
4.2.1.	Misturas de ácido esteárico e óleo de palmiste.....	32
4.2.2.	Misturas de triestearina e óleo de palmiste	36
4.3.	Determinação do valor do equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) das misturas lipídicas	40
4.4.	Caracterização microestrutural das micropartículas lipídicas sólidas	43
4.4.1.	Micropartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico e óleo de palmiste	43
4.4.2.	Micropartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de palmiste.....	46
4.5.	Avaliação da vida de prateleira das micropartículas lipídicas sólidas....	48
4.5.1.	Micropartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico e óleo de palmiste	48
4.5.2.	Micropartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de palmiste.....	52
4.6.	Estabilidade das micropartículas lipídicas sólidas em diferentes condições de <i>stress</i>	54
4.7.	Digestibilidade <i>in vitro</i> estática das micropartículas lipídicas sólidas produzidas com óleo de palmiste.	58
4.8.	Digestibilidade <i>in vitro</i> dinâmica das micropartículas lipídicas sólidas produzidas com óleo de palmiste	63
5.	CONCLUSÕES	72
6.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	73
8.	REFERÊNCIAS	74

1. INTRODUÇÃO

A demanda dos consumidores por uma alimentação mais saudável para a manutenção da saúde tem ganhado importância e se intensificado nos últimos anos. E, muitas vezes, para que essa demanda seja atendida, faz-se necessário o desenvolvimento de tecnologias que possibilitem agregar compostos bioativos aos alimentos, de modo a melhorar a sua biodisponibilidade e bioacessibilidade. Assim, é fundamental o estudo de formas de proteção e aumento da solubilidade em meio aquoso dos bioativos para que sejam efetivamente incorporados nos alimentos e também o desenvolvimento de tecnologias que possibilitem tal aplicação.

No entanto, muitos desses bioativos, por possuírem características hidrofóbicas, são difíceis de serem incorporados aos alimentos, como carotenóides, diversos flavonóides e fitoesteróis, por exemplo. Nesse sentido, a técnica de microencapsulação em partículas lipídicas sólidas, mostra-se uma alternativa interessante para a encapsulação desses bioativos hidrofóbicos. Além disso, a matriz encapsulante pode ser formulada com triacilgliceróis de cadeia média (MCTs), os quais possuem também boas propriedades nutricionais, bem como, maior solubilidade em água e melhor digestibilidade quando comparados com os triacilgliceróis de cadeia longa (LCTs). Além disso, no caso dos óleos láuricos, estes também possuem características estruturais interessantes para utilização em sistemas dispersos lipídicos microparticulados. O óleo de palmiste é o óleo láurico mais empregado na indústria de alimentos, e contém, em média, 50% de ácido láurico nas cadeias alifáticas dos seus triacilgliceróis.

As micropartículas lipídicas sólidas possuem um núcleo de lipídio sólido envolvido por uma camada de tensoativo, sendo, portanto, partículas com alta capacidade de incorporação de substâncias hidrofóbicas, mas, ao mesmo tempo, dispersíveis em meios aquosos, como desejável para diversas aplicações na indústria de alimentos.

Desta forma, deste contexto da necessidade do desenvolvimento de tecnologias de incorporação em alimentos e aumento de bioacessibilidade de bioativos hidrofóbicos, o objetivo deste trabalho foi a produção, caracterização, avaliação da estabilidade físico-química e da digestibilidade de micropartículas lipídicas sólidas utilizando óleo de palmiste. Em sua composição, variou-se a quantidade de ácidos graxos de cadeia longa (triestearina ou ácido esteárico), e foram utilizados

tensoativos de baixo peso molecular na interface estabilizante (polisorbatos e éster de sorbitan). O estudo da microestrutura das micropartículas lipídicas foi realizado por difratometria de raios-X e calorimetria diferencial de varredura. A avaliação da vida de prateleira foi realizada durante períodos variando de 50 a 120 dias, durante qual alíquotas foram retiradas e analisadas em relação ao diâmetro médio, distribuição de tamanho de partícula e potencial zeta. Por sua vez, a digestibilidade das micropartículas lipídicas sólidas foi avaliada por métodos *in vitro* estáticos, e também ensaios de digestibilidade *in vitro* dinâmicos. Estes últimos foram realizados no Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, Portugal, através de bolsa BEPE/FAPESP.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Microencapsulação em sistemas lipídicos

A técnica de microencapsulação pode ser definida como a tecnologia de empacotamento de bioativos em revestimentos específicos, sendo que o diâmetro médio de partícula, normalmente, pode variar de 1 a 1000 μm (NAZZARO *et al.*, 2011). Os processos de microencapsulação têm fundamental importância na indústria de alimentos e vem sendo amplamente utilizados com a finalidade de controlar ou preservar compostos de aroma e pigmentos, por exemplo, e incluir ingredientes bioativos ou funcionais aos alimentos, dentre os quais se destacam os probióticos, minerais, vitaminas, óleos essenciais, fitosteróis, ácidos graxos polinsaturados, carotenóides e compostos antioxidantes diversos (como o ácido ascórbico e os tocoferóis, por exemplo). A microencapsulação pode ser utilizada também para estabilizar moléculas, mascarar sabores e odores desagradáveis, além de permitir liberação controlada de componentes ativos (SANGUANSRI e AUGUSTIN, 2007; ANAL e SINGH, 2007; KRALOVEC, *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2012).

Por outro lado, a incorporação de ingredientes bioativos em alimentos representa um desafio para a indústria, particularmente no que diz respeito a estabilidade do componente bioativo durante o processamento e estocagem, bem como sua interação com a matriz do alimento. Nesse sentido, a microencapsulação tem ajudado a resolver esse impasse e diversos estudos têm comprovado sua eficácia (BARBOSA *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2005; CALVO *et al.*, 2012; FRASCARELI *et al.*, 2012).

Existem diversos métodos que são utilizados pra microencapsular bioativos e, preferencialmente, estes métodos devem ser simples, reprodutíveis e de fácil transposição para a escala industrial. A seleção do método depende de alguns aspectos, tais como as propriedades físico-químicas do bioativo e do agente encapsulante, bem como o tamanho de partícula desejado para a aplicação (BRASILEIRO, 2011). Dentre os métodos mais utilizados pode-se destacar *spray drying*, *spray chilling*, extrusão, coacervação, leiteo fluidizado e lipossomas.

Um dos fatores essenciais a ser discutido durante a escolha de um método de produção de sistemas encapsulantes são as características do(s) material(is) encapsulantes, que deve levar em conta sua capacidade de dispersar ou emulsificar

o material ativo, bem como, preferencialmente, não reagir com o material a ser protegido. Além disso, o material precisa fornecer máxima proteção ao material ativo contra as condições ambientais adversas para o bioativo encapsulado, e claro, ter um custo acessível e ser de grau alimentício (DESAI e PARK, 2005).

Há muitos materiais que podem ser utilizados, sendo que os mais frequentes são carboidratos, devido a sua capacidade de absorver ou reter compostos de sabor. Dentre os carboidratos destacam-se: (i) celulose, devido à sua permeabilidade; (ii) gomas, pois oferecem boas propriedades de gelificação e de resistência ao calor; (iii) lipídios, devido a sua capacidade de encapsular moléculas hidrofóbicas (RÉ *et al.*, 2010). Além desses materiais, as proteínas também são utilizadas como agentes encapsulantes, tanto as de origem animal, como a gelatina e a caseína, como as de origem vegetal, as quais se destacam a proteína de soja e as proteínas derivadas de cereais. Tais polímeros naturais apresentam vantagens como biodegradabilidade, biocompatibilidade, boas propriedades anfílicas e funcionais (NESTERENKO *et al.*, 2013). Em diversos casos, combinações desses agentes encapsulantes também são utilizadas.

Os materiais lipídicos estão sendo muito utilizados como matrizes encapsulantes, e diversos autores têm obtido bons resultados com aplicações alimentícias (DALPIAZ *et al.*, 2008; DAZ *et al.*, 2011; HEALGASON *et al.*, 2009). Os lipídios são interessantes para a administração de bioativos, pois podem ser formulados utilizando-se vários tipos de preparações como soluções, suspensões, emulsões e microemulsões (JEONG *et al.*, 2007).

As principais vantagens do uso de materiais lipídicos como encapsulantes são: possibilidade de controlar a liberação do bioativo, aumento da estabilidade do bioativo e possibilidade de produção em larga escala (MEHNERT e MADER, 2001).

Além disso, sabe-se que materiais lipídicos presentes nos fármacos podem aumentar a solubilidade da droga na membrana intestinal, e as mesmas técnicas podem ser aplicadas a bioativos a serem incorporados em alimentos (GRIFFIN E 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 na última década, utilizando-se de diferentes sistemas com matrizes lipídicas como sistemas auto-emulsificantes, 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).

Em relação aos sistemas lipídicos emulsionados, diferentes tipos de partículas podem ser descritos, como adequadamente resumido por McClements (2010) na Figura 2.1.

Figura 2.1. Exemplos de diferentes tipos de partículas que podem ser produzidas em sistemas lipídicos emulsionados. (adaptado de McClements (2010)).

Diversos tipos de sistemas encapsulantes podem ser utilizados para a obtenção de micropartículas e no caso deste trabalho optou-se por trabalhar com micropartículas lipídicas sólidas.

2.2. Partículas lipídicas sólidas

A produção de partículas lipídicas sólidas na escala micrométrica foi relatada no final dos anos 50 e início dos anos 60 e diferentes técnicas de preparação foram descritas, como por exemplo: dispersão por fusão, evaporação de solventes e *spray chilling*. A escolha da técnica apropriada depende de diversos parâmetros, tais como, propriedades físico-químicas desejadas para o sistema, estabilidade do bioativo a ser incorporado, tamanho médio de partícula desejado, concentração e estabilidade da formulação coloidal (RÉ, 1998; CLARK, 2002; BUNJES e SIEKMANN, 2006).

De acordo com Müller *et al.* (2000) as partículas (micro ou nano) lipídicas sólidas podem ser entendidas como partículas lipídicas revestidas com uma camada de tensoativo dispersas em um meio aquoso, como pode ser visto na representação da

Figura 2.2. A fase lipídica encontra-se total ou parcialmente solidificada, e o tamanho das partículas pode ser variado, estando na faixa nanométrica (entre 20 e 200 nm), submicrométrica (200 a 1000 nm) e micrométrica (1 a 5 μm).

Figura 2.2. Esquema simplificado de uma partícula lipídica sólida. (fonte: <http://www.azonano.com/work>).

As partículas lipídicas sólidas podem ser produzidas utilizando-se métodos de baixa ou alta energia. Os métodos de alta energia utilizam dispositivos mecânicos para gerar forças intensas com o objetivo de produzir uma fase de pequenas partículas dispersas em outra fase. Dentre os equipamentos mais utilizados estão misturadores de alto cisalhamento, homogeneizadores de alta pressão e microfluidizadores. Já os métodos de baixa energia baseiam-se na formação espontânea das partículas, sendo que muitas vezes tais originam partículas muito pequenas (da ordem de poucos nanômetros). No entanto, há limitações para os materiais que podem ser utilizados e na quantidade de tensoativo utilizada nas formulações. Dentre os métodos mais utilizados estão os métodos de emulsificação espontânea (EIP) e da temperatura de inversão de fase (PIT) (McCLEMENTS, 2012).

Para a formação de partículas lipídicas sólidas pode-se misturar diferentes tipos de lipídios, podendo originar diferentes microestruturas no núcleo hidrofóbico. A Figura 2.3 mostra os diferentes tipos de matrizes de partículas lipídicas que podem ser formadas.

Figura 2.3. Diferentes tipos de matrizes lipídicas de partículas lipídicas sólidas. (Fonte: Muller *et al.*, 2002)

Segundo Muller *et al.* (2002), a produção de uma matriz lipídica sólida menos ordenada é um pré requisito para a estabilidade e liberação do bioativo encapsulado, uma vez que a mobilidade dos bioativos na matriz lipídica pode ser controlada pelo seu estado físico. Geralmente o bioativo fixa-se entre as cadeias de ácidos graxos ou entre as imperfeições dos cristais de lipídio (WEISS *et al.*, 2008).

A composição da mistura lipídica determinará o tipo de cristal que será formado. Os triacilgliceróis exibem polimorfismo, de forma que as cadeias individuais das moléculas de lipídios podem assumir variadas de configurações, formando cristais na forma α , β e β' . Esses cristais, por sua vez, diferem no espaçamento de sua estrutura química, no caso da forma α as cadeias são dispostas numa estrutura hexagonal com nenhum ângulo de inclinação e os espaços são de 4,15 Å, sendo termodinamicamente menos estáveis e com menor temperatura de fusão; a forma β possui espaçamento de 4,6, 3,6 e 3,9 Å e as cadeias possuem um ângulo de inclinação entre 50 e 70°, são termodinamicamente mais estáveis e apresentam maior temperatura de fusão; a forma β' é caracterizada por duas linhas curtas no espaçamento 3,7 e 4,0 Å e também possuem inclinação entre 50 e 70°, como pode ser visto na Figura 2.4. Os triacilgliceróis com alto grau de pureza tendem a formar cristais perfeitos com um padrão semelhante à forma β , isto pode conduzir a

desestabilização e instabilidade oxidativa, devido ao aumento da área de superfície. A utilização de lipídios heterogêneos facilita a formação de partículas esféricas, devido a maior presença de cristais α na fase lipídica (WEISS *et al.*, 2008; HIMAWAN *et al.*, 2006).

Figura 2.4. Estrutura das subcélulas das três formas polimórficas mais comuns dos triacilgliceróis (fonte: HIMAWAN *et al.*, 2006)

Quando se trata dos ácidos graxos, estes por sua vez, apresentam várias formas cristalinas em sua estrutura, as quais são bastante semelhantes, sendo que as principais formas ortorrômbicas presentes na estrutura dos ácidos graxos são as formas A, B, C e E. A forma C é estável acima da temperatura de 32°C e é a mais encontrada através de análises de DSC e DRX em micropartículas formuladas com ácido esteárico. A forma B é mais estável abaixo da temperatura de 32°C e raramente é encontrada em partículas com ácido esteárico, vale ressaltar também que as formas B e C são muito semelhantes e diferem apenas no ângulo de inclinação. Já a forma E é estável em todas as regiões de temperatura e a mais difícil de ser identificada, pois assemelha-se muito também com a forma B, como pode ser visto na Figura 2.5 (KANEKO *et al.*, 1999; BUNJES e UNRUH, 2007).

Figura 2.5. Modelo esquemático da transição das formas ortorrômicas E→B (Fonte: KANECO *et al.*, 1999)

2.3. Triacilgliceróis de cadeia média e óleos láuricos

Os ácidos graxos de cadeia média compreendem os ácidos graxos saturados com 6 a 10 carbonos em sua cadeia (MARTEN *et al.*, 2006). Os triacilgliceróis de cadeia média (em inglês: *medium chain triacylglycerols* ou MCTs) consistem de uma mistura de ácido capríco, ácido caprílico, e o ácido láurico (SHAHIDI, 2006).

Os ácidos graxos de cadeia média (MCTs) possuem diferentes propriedades químicas e fisiológicas quando comparados com os ácidos graxos de cadeia longa (LCTs). Os MCTs são moléculas menores e com menores pontos de fusão, sendo líquidos à temperatura ambiente. O ponto de fusão dos ácidos graxos de cadeia média varia de 3 a 31°C. Além disso, outra propriedade interessante é que são muito mais solúveis em água (0,68 mg/mL para C8:0 e 0,72 mg/mL para C10:0) do que os LCTs, pois são altamente ionizáveis em pH neutro, o que aumenta a sua solubilidade em fluidos biológicos. Sendo assim, essas propriedades de MCTs afetam a maneira como eles são absorvidos e metabolizados (SHAHIDI, 2006).

Vale a pena ressaltar que os MCTs podem ser benéficos para a saúde, sendo por este motivo amplamente utilizados na área clínica para nutrição enteral e parenteral, em diversas condições clínicas, como em pacientes que sofrem de má absorção de gordura. Além disso, os MCTs também são incluídos em fórmulas infantis para

ajudar na digestão das gorduras. Outra aplicação são os suplementos vendidos na forma de óleo com o objetivo de aumentar a taxa do metabolismo para a redução de peso e fornecimento de energia adicional para a prática de esportes. Devido a sua ampla utilização, os MCTs podem ser considerados gorduras funcionais, pois possuem benefícios comprovados para a saúde (MATSUO *et al.*, 2001; LIN *et al.*, 2002; SOCHA *et al.*, 2007).

Com relação à obesidade alguns estudos comprovaram que em animais a alimentação com MCTs resulta em menor ganho de peso do que os que receberam dietas isoenergéticas contendo LCTs, esse resultado é proveniente da oxidação hepática dos ácidos graxos de cadeia média, que levam a um aumento do gasto energético (MARTEN *et al.*, 2006; St-ONGE *et al.*, 2003; NAGAO e YANAGITA, 2010). Além disso, St-Onge e Bosarge (2008) relataram que o consumo de MCTs na quantidade de 18-24 g/dia, como parte de um programa de perda de peso de 16 semanas, resultou na diminuição do peso corporal e da massa de gordura em comparação com o consumo de azeite em homens e mulheres com sobrepeso.

Além do tratamento da obesidade, os MCTs também são utilizados em casos de má absorção lipídica, e seu uso já é relatado desde a década de 1950. Os óleos contendo MCTs são importantes fontes de energia e tem sido utilizados nessas condições clínicas devido ao seu metabolismo único, pois são facilmente hidrolisados pelo intestino e os ácidos graxos são transportados diretamente para o fígado. Além disso, a reação da lipase pancreática no intestino delgado é aumentada pelo baixo peso molecular dos MCTs, enquanto os LCTs são incorporados em quilomícrons para ser transportado através do sistema linfático. (SHAHIDI, 2006).

Por outro lado, é importante ressaltar que a ingestão de MCTs em uma dieta deve ser controlada. Marten *et al.* (2006) recomenda a ingestão de 25-30g em cada refeição, sendo que maiores quantidades provoca sintomas gastrointestinais diversos, incluindo náuseas, enjôos, inchaço, desconforto gastrointestinal, cólicas abdominais e diarreia.

A utilização de triacilgliceróis de cadeia média em uma formulação alimentícia pode vir acompanhada de vantagens nutricionais. Os MCTs devido ao comprimento da cadeia e à sua maior solubilidade em água, podem contribuir significativamente para a absorção de gordura durante o processo digestivo, assim as propriedades

físicas e químicas destes compostos o tornam extremamente interessantes e adequados para serem utilizados em micropartículas lipídicas sólidas.

Dentre os óleos ricos em triacilgliceróis de cadeia média (denominados óleos láuricos) e utilizados na indústria de alimentos podem-se destacar os óleos de coco e de palmiste. Trabalhos recentes têm demonstrado ótimos resultados com a utilização de óleos ricos em MCTs em dispersões emulsionadas. Entretanto, poucos trabalhos têm explorado a utilização destes óleos em micropartículas lipídicas sólidas, e também por este motivo escolheu-se o óleo de palmiste como um dos ingredientes que compõe as micropartículas lipídicas sólidas produzidas neste trabalho (TIPVARAKARNKOON *et al.*, 2010; HAYATI *et al.*, 2007).

O óleo de palma e o óleo de palmiste são originários de plantas nativas do oeste africano (*Elaeis guineensis*). O óleo de palmiste é um óleo láurico obtido a partir do fruto da palma, sendo um líquido acastanhado que se solidifica em climas temperados em uma gordura branca a amarelada. Outra característica deste óleo é que ele tende a se tornar rançoso rapidamente devido a oxidação dos lipídios, por isso ele é refinado antes da sua utilização (CORNELIUS, 1977). O óleo de palmiste é composto por cerca de 50% de ácido láurico, 16% de ácido mirístico e 15% de ácido oléico. Além de triacilgliceróis e ácidos graxos livres o óleo de palmiste contém material insaponificável como esteróis, alcoóis, hidrocarbonetos, triterpenos, lactonas, entre outros (SHAHIDI, 2006).

O óleo de palmiste exige refino, passando por um processamento de neutralização, branqueamento, filtração e desodorização (CORNELIUS, 1977). Na indústria de alimentos, o óleo de palmiste tem sido utilizado em margarinas, gorduras, gorduras de confeitaria entre outras aplicações (JIN *et al.*, 2008).

Na área de microencapsulação, o óleo de palmiste tem sido empregado em misturas lipídicas, bem como em matrizes encapsulantes na forma de blendas. Awad e Sato (2002) utilizaram o óleo de palmiste em emulsões o/a com tensoativos hidrofóbicos e estudaram a cristalização das emulsões com diferentes aditivos. Para se conseguir uma boa estabilidade de emulsões é necessário entender o processo de cristalização dos lipídios, no caso do óleo de palmiste ocorre o polimorfismo na forma α , β , e β' , sendo que a forma β' é mais funcional do que as outras duas formas.

O uso do óleo de palmiste tem aplicações limitadas quando utilizados em suas formas originais, e para aperfeiçoar o uso deste óleo tem-se utilizado a fusão de outros óleos ou ácidos graxos para melhorar as funcionalidades do material. Alguns trabalhos tem empregado o óleo de palma, estearina de palma e óleo de soja para formação de blendas com o óleo de palmiste e este uso apresentou bons resultados para a estabilidade de emulsões e melhores arranjos estruturais das blendas (CHEN *et al.*, 2007; CHU *et al.*, 2001; HAYATI, *et al.*, 2007).

2.4. Dinâmica dos processos digestivos

A função principal do trato gastrointestinal (TGI) é processar os alimentos ingeridos e transportar os nutrientes para o sistema circulatório. Tal tarefa é realizada em um sistema de cavidades e tubos que se inicia na boca e termina no reto, sendo que cada uma das partes possui uma função específica. A principal função do estômago é processar e transportar o alimento. Após a ingestão, a atividade contrátil do estômago ajuda a misturar, moer, e evacuar pequenas porções do quimo enquanto o restante é misturado e moído novamente. A parede estomacal, assim como a maior parte do TGI, consiste de três camadas: a túnica mucosa, a túnica muscular e a túnica serosa. A superfície interna do estômago, que é a túnica mucosa, tem como função principal secretar diversas substâncias responsáveis pela digestão e sua regulação (muco alcalino, ácido clorídrico, pepsinogênio e hormônio gastrina). O estômago, entretanto, não absorve quase nenhuma substância, exceto pequenas quantidades de compostos hidrofóbicos, e etanol (GRASSI *et al.*, 2006; VENEMA *et al.*, 2009).

Por sua vez, o intestino delgado é composto pelo duodeno, jejuno e íleo, estando estrategicamente localizado na interface entre o sistema circulatório e o ambiente, e seu papel principal é funcionar como uma barreira com permeabilidade seletiva. O intestino delgado permite a absorção de nutrientes como açúcares, aminoácidos, peptídeos, lipídios e vitaminas, e limita a absorção de xenobióticos, enzimas digestivas e bactérias (GRASSI *et al.*, 2006; BRODY, 1999). Sua parte mais interna é formada por uma mucosa constituída por vilosidades, que possuem a função de aumentar a capacidade de absorção dos nutrientes.

Finalmente, o cólon (ou intestino grosso), é a parte do intestino que vai do ceco ao reto, sendo responsável por estocar os resíduos da digestão, recuperar água,

mantendo o balanço hídrico, e absorver algumas vitaminas, como a vitamina K. Conforme o quimo se move através do cólon, é misturado com muco e bactérias (flora intestinal) e se torna fezes (GRASSI *et al.*, 2006).

Trata-se, portanto, de um sistema extremamente complexo, cujas ações são reguladas por fatores físicos e bioquímicos. As chamadas “forças positivas” reguladoras da absorção intestinal consistem em gradientes de concentração, diferenças de potencial elétrico e gradientes de pressão hidrostática. Elementos que se opõem à absorção estão relacionados com as barreiras físicas (composição lipídica das células e as junções intercelulares) e bioquímicas (presença de enzimas e transportadores de efluxo) da mucosa. As formas de absorção das moléculas bioativas também são diversas, incluindo transporte transcelular mediado por carreadores, transporte transcelular passivo, transporte vesicular e transporte paracelular passivo (GRASSI *et al.*, 2006; BRODY, 1999). Sendo assim, é natural que a maioria dos modelos para simular o TGI não consiga simular a dinâmica do processo, havendo sempre a tendência à simplificação dos processos digestivos.

2.4.1. Mecanismo de digestão e absorção dos lipídios

Embora a digestão dos lipídios ocorra principalmente no intestino, ela se inicia no estômago pela ação da lipase gástrica, a qual possui atividade em uma ampla gama de pHs, sendo que possui atividade ótima em pH 5,4, explicando o motivo da digestão lipídica ocorrer na primeira hora, onde o pH do estômago é mais elevado. A lipase gástrica hidrolisa especificamente um único ácido graxo e pode representar de 5 a 30 % da digestão (GOLDING e WOOSTER, 2011).

Após passar pelo estômago a digestão lipídica segue pelo intestino delgado, onde ocorre ação da lipase pancreática, a qual tem atividade ótima em pH 6,5. Nesta etapa, os produtos da hidrólise completa são glicerol e ácidos graxos livres. Um fator importante que deve ser considerado é que a presença de moléculas anfifílicas na interface das emulsões alimentares inibe a ação da lipase pancreática. Assim, a atividade ótima da lipase pancreática ocorre na presença de co-lipase e sais biliares ativos (GOLDING e WOOSTER, 2011).

A digestão lipídica pode sofrer alterações quando se trata de diferentes tipos de triacilgliceróis, como no caso do metabolismo de MCTs e LCTs, bem como de seus correspondentes ácidos graxos. As diferenças ocorrem principalmente devido às

diferentes propriedades físico químicas que esses lipídios apresentam. Como já foi dito anteriormente, os MCTs são mais rapidamente e completamente hidrolisados. A digestão da gordura se inicia no estômago, onde são catalisadas parcialmente por lípases gástricas e linguais, em seguida são hidrolisados pela lípase pancreática no lúmen intestinal. Os produtos da hidrólise são os monoacilgliceróis e os ácidos graxos de cadeia média, os quais são rapidamente absorvidos pela mucosa do estômago para a veia porta hepática. Já os LCTs devem ser emulsionados e hidrolisados no lúmen do intestino antes da absorção. Os produtos da digestão neste caso são os diacilgliceróis e os ácidos graxos livres, os quais são misturados com os sais de bile, para formar micelas, que serão as estruturas efetivamente absorvidas (SHAHIDI, 2006; MARTEN et al., 2006).

Os ácidos graxos de cadeia média são ligados à soroalbumina e transportados sob a forma solúvel, e entram na circulação sistêmica através da veia porta diretamente para o fígado, sem ser incorporado no quilomícron. Outro aspecto interessante é que eles não se acumulam no tecido adiposo ou muscular. Os ácidos graxos de cadeia média são transportados através da membrana mitocondrial do fígado rapidamente de forma independente do sistema de transferência a acilcarnitina, como no caso dos LCTs (SHAHIDI, 2006).

A lipase pancreática tem papel importante na digestão dos lipídios, pois ela hidrolisa os triacilgliceróis produzindo monoacilgliceróis e dois ácidos graxos. A presença de produtos hidrolisados induz a secreção dos fluidos biliar e pancreático, causando uma mudança substancial no ambiente do lúmen. Além disso, os produtos digeridos são mais solúveis e podem ser solubilizados dentro das micelas de sais de bile (JEONG *et al.*, 2007).

Por outro lado, os lipídios podem aumentar o tempo de retenção gástrico, resultado na liberação lenta para o local de absorção. Outro fator relevante que limita a digestão são os componentes da micropartícula, como a combinação de lipídios e tensoativos, os quais podem afetar as funções no trato-gastro intestinal (JEONG *et al.*, 2007).

2.4.2. Modelos *in vitro* para simulação dos processos digestivos

Para compreender melhor o mecanismo de digestão dos lipídios e emulsões, foram desenvolvidos mecanismos de estudos desse processo, através de ensaios

de digestão *in vitro*. Tais experimentos são denominados *in vitro* porque pretendem imitar o que ocorre nas etapas do processo de digestão em ensaios laboratoriais, simulando os ambientes bioquímicos e mecânicos das etapas digestivas.

Os modelos de digestão *in vitro* podem ser classificados como estáticos ou dinâmicos. Os modelos *in vitro* estáticos simulam o ambiente bioquímico das diferentes regiões do trato gastrointestinal individualmente. Para cada região simulada são utilizadas enzimas, tensoativos e reguladores de pH para recriar as condições fisiológicas; além disso, as condições térmicas do corpo humano também são aplicadas. No entanto, a maior desvantagem desse tipo de ensaio é que a simulação dos processos de agitação que ocorrem no corpo humano (movimentos peristálticos) é extremamente limitada. Por outro lado, as vantagens da utilização desses modelos são a facilidade de utilização, o baixo custo e a reprodutibilidade (GOLDING e WOOSTER, 2011; WICKHAM *et al.*, 2008).

Há também os denominados modelos de digestão *in vitro* dinâmicos, os quais tentam simular as condições de digestão de modo mais realístico. Em tais montagens existem mecanismos que propõe imitar as forças de cisalhamento e de mistura que ocorrem nas etapas digestivas (GOLDING e WOOSTER, 2011; WICKHAM *et al.*, 2008).

Muitos modelos *in vitro* têm sido propostos para estimar a digestibilidade dos sistemas alimentícios, sendo que dentre os diversos métodos descritos pode-se encontrar metodologias que envolvem uma a quatro etapas (desde a boca até o íleo) da digestão, simulando as condições gástricas e intestinais.

Dentre os modelos *in vitro* dinâmicos mais empregados, está o utilizado por Reis *et al.* (2008). Trata-se de um modelo de digestão gastrointestinal dinâmico para estudar a atividade da lipase em diferentes moléculas de grau alimentício. O modelo consiste em quatro compartimentos de série simulando o estômago, duodeno, jejuno e íleo, mostrado na Figura 2.6.

Figura 2.6. Esquema do modelo de digestão *in vitro* TIM. A – compartimento gástrico, B – compartimento duodeno, C- compartimento jejuno, D – compartimento íleo, E – jaqueta de vidro, F – parede flexível, G – bomba rotativa, H – válvula pilórica, I – eletrodos de pH, K – pré filtro, L – membrana de fibra oca, M – filtrado do jejuno, N – válvula de liberação do íleo. Fonte: Reis *et al.* (2008)

Outros modelos mecânicos de sistema de digestão têm sido desenvolvidos, tais como o modelo intestinal TNO (sistema TIM – T O intestinal model), desenvolvidos pelo TNO Nutrition and Food Research (Zeist, Holanda). Tais sistemas simulam 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 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 (McCLEMENTS e DECKER, 2009; KONG E SINGH, 2008; REIS *et al.*, 2008; THARAKAN *et al.*, 2010). O modelo TNO *in vitro* consiste de quatro sucessivos compartimentos, 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 E SINGH, 2008; MCCLEMENTS E DECKER, 2009).

Outro modelo (Figura 2.7) desenvolvido Wickham *et al.* (2009) , é um dos modelos gástricos mais sofisticados para estudar a digestão dos alimentos e emulsões, pois foi para que se pudesse obter informações sobre os processo biomecânicos e de transporte que ocorrem na digestão por ressonância magnética. O modelo consiste de dois segmentos, o corpo principal do estômago e o antro. O primeiro compartimento imita a dinâmica das secreções biológicas durante a digestão. O segundo compartimento simula a moagem e cisalhamento dos alimentos (GOLDING e WOOSTER, 2011).

Figura 2.7. Modelo gástrico dinâmico (DMG). Fonte: Golding e Wooster (2011)

Os níveis adicionais de complexidade incorporados nos modelos dinâmicos são considerados mais representativos do comportamento das análises *in vivo* e podem ser utilizados para muitos sistemas alimentares (GOLDING e WOOSTER, 2011).

Por fim, os modelos *in vitro* são uma excelente alternativa para os modelos *in vivo* para simular a digestão dos alimentos, fornecendo os resultados num curto período de tempo.

A partir dos assuntos abordados nesta revisão bibliográfica é importante destacar a técnica microencapsulação como uma tecnologia que pode ser utilizada na indústria de alimentos, principalmente quando o maior objetivo é a obtenção de alimentos que trazem benefícios para a saúde, aumentando a bioacessibilidade de substâncias funcionais. Uma das maneiras de se conseguir tal objetivo é a incorporação dessas substâncias em micropartículas lipídicas sólidas, as quais podem ser produzidas com lipídios interessantes como os MCTs, os quais apresentam melhor digestibilidade e vantagens nutricionais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

Foram escolhidos como lipídios sólidos de cadeia longa o ácido esteárico (Sigma) e a triestearina (Sigma). Como matéria-prima rica em triacilgliceróis de cadeia média (MCTs) foi empregado o óleo de palmiste (doado pela Agropalma), cuja especificação está mostrada no Anexo A. Os tensoativos testados, tanto individualmente quanto na forma de misturas, foram o polisorbato 20 (tween 20®, Synth), o polisorbato 60 (tween 60®, Sigma), e o éster de sorbitan monooleato (span 80®, Sigma). Goma xantana (Grindsted Xanthan 80®, doada pela Danisco, cuja especificação está mostrada no Anexo B) foi empregada como espessante em algumas formulações.

Alguns dados importantes, como as temperaturas de fusão, e o valor do EHL (equilíbrio hidrofílico lipofílico) dos tensoativos utilizados, bem como as respectivas estruturas moleculares, são apresentados nas Tabela 3.1 e Tabela 3.2.

Tabela 3.1. Temperatura de fusão e sigla dos lipídios utilizados para a produção das micropartículas lipídicas sólidas

Lipídio	Sigla	Temperatura de Fusão*
Ácido esteárico	AE	69°C
Triestearina	TS	60°C
Óleo de Palmiste	OP	27,5°C

*Obtidos por calorimetria diferencial de varredura

Tabela 3.2. Dados sobre os tensoativos utilizados na produção das micropartículas lipídicas sólidas

Tensoativo	EHL*	Molécula
Tween 20	16,7
Tween 60	14,9
Span 80	4,3

*fonte: Sayantan e Pallab, (2011); Rabaron *et al.*, (1993)

Para os ensaios de digestibilidade *in vitro* foram utilizados cloreto de sódio (Sigma), fosfato monobásico de sódio (Panreac), cloreto de potássio (Panreac), cloreto de cálcio (Panreac), cloreto de amônio (Riedel-de-Haën), ácido clorídrico 37% (Sigma), glicose (Fisher Scientific), ácido glucurônico (Sigma), uréia (Panreac), glucosamina (Sigma), soroalbumina bovina (Sigma), pepsina (Sigma), mucina (Sigma), fosfato de potássio monobásico (Panreac), carbonato de sódio (Sigma), cloreto de magnésio (Fluka), lipase tipo II de pâncreas suíno (Sigma), pancreatina (Sigma) e extrato de bile suína tipo II (Sigma).

A água deionizada utilizada nos experimentos foi obtida de um sistema de ultrapurificação Direct Q3 (Millipore).

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Determinação da composição em ácidos graxos do óleo de palmiste

A cromatografia gasosa de ésteres metílicos de ácidos graxos foi realizada de acordo com o método oficial 1-62 da AOCS (1998). Utilizou-se o cromatógrafo a gás Shimadzu (modelo GC 2010 AF, Japão) com detector de ionização de chama: coluna SP-2560 0.2 µm, 100 m x 0.25 mm i.d. (Supelco); hélio como gás de arraste na taxa de 1,12 mL/min; temperatura do injetor de 250 °C; temperatura da coluna de 140°C (5 min), (140 a 240)°C, (taxa de 4°C/min) e 240 °C (15 min) e temperatura do detector de 250 °C. Os ésteres metílicos dos ácidos graxos foram identificados por comparação com os tempos de retenção dos padrões Supelco 37 e a quantificação foi realizada por normalização interna. O procedimento descrito foi realizado no Laboratório de Engenharia de Separações, no ZEA/FZEA/USP.

3.2.2. Preparação e caracterização das misturas lipídicas

3.2.2.1. Preparação das misturas lipídicas

Para a preparação das misturas de lipídios foram fundidas conjuntamente as massas de cada um dos componentes lipídicos, a 10° C acima da maior temperatura de fusão dentre os lipídios empregados na formulação. Em seguida, o sistema fundido foi resfriado até 20° C utilizando-se um banho de gelo. O armazenamento das misturas lipídicas produzidas foi realizado sob refrigeração até o momento das análises de difratometria de raios-X e calorimetria diferencial de varredura. As análises foram realizadas para os lipídios puros (ácido esteárico, triestearina e óleo de palmiste), bem como para as misturas dos lipídios de cadeia longa com o óleo de palmiste.

3.2.2.2. Caracterização das misturas lipídicas

As misturas de lipídios foram caracterizadas por difração de raios-X (DRX) e calorimetria diferencial de varredura (DSC). As análises de (DRX) de amostras das

misturas foram realizadas em equipamento Philips modelo PW1710, com tubo de ânodo de cobre $\lambda = 1,5418$ ângstrons e monocromador de grafite para feixe difratado, no Laboratório de Preparação e Caracterização de Materiais (Departamento de Física Aplicada, Instituto de Física “Gleb Wataghin”, Unicamp) à temperatura ambiente. A calorimetria diferencial de varredura (DSC) também foi empregada para caracterizar as amostras de lipídios em equipamento modelo TA5000 (TA Instruments, EUA), em varreduras na faixa de 0 a 100° C, usando rampa de 10° C/min, no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) do Departamento de Engenharia de Alimentos do ZEA-FZEA-USP, usando um cadinho vazio como referência.

3.2.3. Determinação do valor de EHL (equilíbrio hidrofílico-lipofílico) para as misturas lipídicas

A determinação do valor do equilíbrio hidrofílico-lipofílico das misturas de lipídios utilizadas foi realizada utilizando-se um método padrão que é tradicionalmente empregado na área farmacêutica para a estimativa do EHL necessário de um tensoativo (ou uma mistura de tensoativos) para a formação de uma emulsão estável (Severino *et al.*, 2011; Zamn *et al.*, 2002). A fase aquosa (FA), consistindo de água e tensoativo (5% em massa), e a fase oleosa (FO, 10% em massa), contendo o(s) lipídio(s), foram aquecidas, separadamente, 10°C acima da temperatura de fusão dos lipídios. Em seguida a FA foi vertida na FO lentamente, sob agitação a 10.000 rpm, por 15 minutos e aquecimento a temperatura 10°C acima da temperatura de fusão durante todo o processo. A seguir, as emulsões foram retiradas do aquecimento, mantendo-se a agitação magnética por mais 15 minutos até alcançar a temperatura ambiente. As emulsões preparadas foram mantidas em repouso por 24 horas à temperatura ambiente e classificadas visualmente. O objetivo foi selecionar, para cada tensoativo ou mistura de tensoativos testada, um intervalo ou um valor de EHL em que os sistemas emulsionados se mantivessem estáveis, com ausência de separação de fases.

As Tabela 3.3 e Tabela 3.4 mostram os valores de EHL testados para os sistemas de micropartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico e óleo de palmiste e triestearina e óleo de palmiste, explicitando as quantidades de tensoativos utilizadas.

Tabela 3.3. Valores de EHL testados para as emulsões preparadas com ácido esteárico e óleo de palmiste e respectivas formulações empregadas

EHL emulsão	Span 80(%)	PS20(%)	FO (%)	FA (mL)
15,5	0,5	4,5	10	85
14,2	1,0	4,0	10	85
13,0	1,5	3,5	10	85
11,5	2,0	3,0	10	85
10,5	2,5	2,5	10	85
9,3	3,0	2,0	10	85
8,0	3,5	1,5	10	85
7,6	3,75	1,25	10	85

Tabela 3.4. Valores de EHL testados para as emulsões preparadas com triestearina e óleo de palmiste e respectivas formulações testadas

EHL emulsão	Span 80(%)	PS60(%)	FO (%)	FA (mL)
13,8	0,5	4,5	10	85
12,3	1,25	3,75	10	85
10,7	2,0	3,0	10	85
9,0	2,75	2,25	10	85
7,5	3,5	1,5	10	85

3.2.4. Produção das micropartículas lipídicas sólidas

Na Figura 3.1 pode ser visto o esquema simplificado de produção das micropartículas lipídicas sólidas. Para a preparação das partículas foram primeiramente fundidas as massas adequadas de cada um dos componentes lipídicos, sendo o óleo palmiste colocado posteriormente, por ter um ponto de fusão menor comparado com o ácido esteárico e a triestearina. A fração mássica lipídica total utilizada foi de 4%, e a fração mássica de tensoativos também foi de 4% para todos os sistemas microparticulados produzidos. A fase lipídica foi aquecida 10 °C acima da temperatura de fusão dos lipídios, e ao mesmo tempo foi aquecida uma solução aquosa, contendo o tensoativo hidrofílico (polisorbato 20 ou 60), até a mesma temperatura da mistura lipídica. A composição da solução de tensoativo foi

escolhida com base nos resultados dos testes de EHL. A solução de tensoativo quente foi dispersa na fase lipídica fundida usando-se alta intensidade de agitação de 18.000 rpm por 5 minutos (IKA T25, IKA). Em seguida, a emulsão final foi deixada sob agitação magnética por 5 minutos, e então colocada sob banho de gelo até atingir cerca de 20° C. As amostras foram armazenadas em geladeira e alíquotas foram retiradas em tempos determinados para o acompanhamento da vida de prateleira. No caso da triestearina, foi necessário adicionar um hidrocolóide (goma xantana) à formulação como espessante da fase contínua para estabilização da emulsão. A seguir, as Tabela 3.5 e Tabela 3.6 mostram as formulações utilizadas para a produção das micropartículas.

Figura 3.1. Esquema representativo da produção das micropartículas lipídicas sólidas

Tabela 3.5. Formulações das micropartículas lipídicas sólidas testadas contendo óleo de palmiste e ácido esteárico

Composição da fase lipídica	Composição da interface
90% OP + 10% AE	75% Span 80 + 25% PS 20
70% OP + 30% AE	70% Span 80 + 30% PS 20
50% OP + 50% AE	70% Span 80 + 30% PS 20
30% OP + 70% AE	40% Span 80 + 60% PS 20

Tabela 3.6. Formulações das micropartículas lipídicas sólidas testadas contendo óleo de palmiste e triestearina

Composição da fase lipídica	Composição da interface	Goma Xantana (% mássica)
90% OP + 10% TS	25% Span 80 + 75% PS 60	0,05
70% OP + 30% TS	70% Span 80 + 30% PS 60	0,05
50% OP + 50% TS	70% Span 80 + 30% PS 60	0,05
30% OP + 70% TS	70% Span 80 + 30% PS 60	0,05

3.2.5. Caracterização das micropartículas lipídicas sólidas

As micropartículas lipídicas sólidas foram caracterizadas por diâmetro hidrodinâmico médio e distribuição de tamanho de partícula, potencial zeta, difratometria de raios-X (DRX) e calorimetria diferencial de varredura (DSC).

O diâmetro médio e a distribuição de tamanho das micropartículas foi determinada por espectroscopia de correlação de fótons (PCS, por espalhamento de luz) no Laboratório de Colóides e Macromoléculas do Departamento de Engenharia de Alimentos do ZEA-FZEA-USP, em equipamento ZetaPlus (Brookhaven Instruments Company). O comprimento de onda do laser foi 657 nm, em ângulo de incidência igual a 90°. As dispersões foram diluídas em água ultrapurificada antes das medições para evitar o efeito de espalhamento múltiplo. As análises de dados foram realizadas pelo software incluído no equipamento. Para cada medida o equipamento realizou dez corridas, fornecendo como resultado uma média do diâmetro hidrodinâmico, e eliminando automaticamente as corridas consideradas como não conformes, de acordo com seus padrões de qualidade internos.

O potencial zeta das dispersões determinado por mobilidade eletroforética em equipamento ZetaPlus (Brookhaven Instruments Company), no Laboratório de Colóides e Macromoléculas do Departamento de Engenharia de Alimentos do ZEA-FZEA-USP. As dispersões foram diluídas em água ultrapurificada antes das medições para evitar o efeito de espalhamento múltiplo. A mobilidade eletroforética foi calculada utilizando-se a equação de Helmholtz–Smoluchowski. As análises de dados foram realizadas pelo software incluído no equipamento. Para cada medida o equipamento realizou 10 corridas, fornecendo como resultado uma média do potencial zeta, e eliminando automaticamente as corridas consideradas como não conformes, de acordo com seus padrões de qualidade internos.

As análises de difratometria de raios-X foram realizadas em equipamento Philips modelo PW1710, com tubo de ânodo de cobre com $\lambda=1,5418$ ângstrons e monocromador de grafite para feixe difratado, no Laboratório de Preparação e Caracterização de Materiais (Departamento de Física Aplicada, Instituto de Física “Gleb Wataghin”, Unicamp). A varredura foi feita no intervalo de 2θ de 5 a 40° , em passos de $0,015^\circ$, à temperatura de 10°C .

Por sua vez, as análises de calorimetria diferencial de varredura (DSC) foram feitas no intervalo de 0 a 100°C , utilizando-se rampa de aquecimento de 10°C/min , em equipamento TA2010 (TA Instruments), empregando-se um cadinho de alumínio vazio como referência, sob atmosfera inerte (45 mL/min N_2). Os valores de temperatura de transição de fase (T_m) e entalpia de transição de fases (ΔH_m) foram calculados pelo software (TA5000, TA Instruments). Tais análises foram realizadas no Laboratório de Tecnologia de Alimentos, ZEA/FZEA/USP.

3.2.6. Determinação da estabilidade físico-química das micropartículas lipídicas sólidas em diferentes condições de *stress*

Alíquotas de 15 mL das amostras de micropartículas lipídicas sólidas foram submetidas a diferentes condições de *stress*, como diferentes condições de temperatura, força iônica, concentração de açúcar e pH (PERRECHIL, 2012; QIAN *et al.*, 2011; THANASURKARN *et al.*, 2006).

- Variação da força iônica: as dispersões produzidas foram submetidas a diferentes concentrações de NaCl (0,025, 0,1, 0,25, 0,5 e 1 M).

- Variação da concentração de sacarose: as dispersões produzidas foram submetidas a diferentes concentrações de açúcar (1,5%, 7,5%, 10% e 15% em massa).

Em ambos os casos (diferentes concentrações de sal e açúcar), a homogeneização foi realizada através de agitação em vórtex (Phoenix, AP56) por 5 minutos, mantendo-se a seguir a mistura em repouso por 30 minutos, sendo as dispersões analisadas visualmente.

O tratamento térmico foi realizado com as dispersões de micropartículas submetidas ao aquecimento em banho-maria (Marconi, MA127), tendo sido testadas as temperaturas de 45°C e 75°C , nas quais as emulsões permaneceram durante 15 minutos.

Por sua vez, os tratamentos em diferentes pH's consistiu em deixar os sistemas emulsionados em duas diferentes condições de pH: 3,0 e 8,0. Para o ajuste do pH utilizaram-se HCl 0,1M e NaOH 0,1M. Os resultados foram analisados visualmente.

Em todos os casos, a separação de fases foi medida com uma régua (em cm) após o término do respectivo tratamento. Foram realizadas medidas de distribuição de tamanho de partícula por espalhamento de luz quasi-elástico, conforme descrito no item 3.2.5, após cada condição de *stress*.

3.2.7. Avaliação da digestibilidade *in vitro* das micropartículas lipídicas sólidas

3.2.7.1. Composição das soluções gástrica, duodenal e do suco biliar utilizados nos ensaios de digestibilidade *in vitro*

As soluções digestivas (soluções gástrica e duodenal e suco biliar) foram preparadas baseadas no protocolo descrito por Hur *et al.* (2009), e as composições das mesmas podem ser vistas na Tabela 3.7.

Tabela 3.7. Constituintes e concentrações dos sucos sintéticos utilizados no modelo de digestão *in vitro*.

	Suco Gástrico	Suco duodenal	Suco biliar
Solução inorgânica	15,7 mL NaCl 175,3 g/L	40 mL NaCl 175,3 g/L	30 mL NaCl 175,3 g/L
	3 mL NaH ₂ PO ₄ 88,8 g/L	40 mL NaOHCO ₃ 84,7 g/L	68,3 mL NaOHCO ₃ 84,7 g/L
	9,2 mL KCl 89,6 g/L	10 mL KH ₂ PO ₄ 8 g/L	4,2 mL KCl 89,6 g/L
	18 mL CaCl ₂ .2H ₂ O 22,2 g/L	6,3 mL KCl 89,6 g/L	150 µL HCl 37% g/g
	10 mL NH ₄ Cl 30,6 g/L	10 mL MgCl ₂ 5 g/L	
	6,5 mL HCl 37% g/g	180 µL HCl 37% g/g	
Solução orgânica	10 mL glicose 65 g/L	4,0 mL uréia 25 g/L	10,0 mL uréia 25 g/L
	10 mL ácido glucurônico 2 g/L		
	3,4 mL uréia 25 g/L		
	10 mL cloridrato de glucosamina 33 g/L		
Adicionar a mistura		9 mL CaCl ₂ .2H ₂ O 22,2 g/L	10 mL CaCl ₂ .2H ₂ O 22,2 g/L
	1 g soroalbumina bovina	1 g soroalbumina bovina	1,8 g soroalbumina bovina
	2,5 g pepsina		
	3 g mucina	9 g pancreatina	30 g bile
		1,5 g lipase	

Fonte: Hur *et al.* (2009).

3.2.7.2. Ensaios de digestibilidade simulada *in vitro* estática

O ensaio de digestão simulada *in vitro* estática utilizado foi baseado no protocolo descrito por Bonnaire *et al.* (2008), simulando-se apenas a etapa duodenal.

Utilizaram-se 10 mL da amostra de micropartículas lipídicas sólidas para cada ensaio, sendo a este volume adicionados 12 mL de suco duodenal e 6 mL de suco biliar. O pH da mistura foi ajustado para 7,0 e aqueceu-se o sistema em banho-maria (Marconi, MA167) até a temperatura de 37°C. Em seguida, as amostras (produzidas em triplicatas) foram incubadas em *shaker* (Novatecnica, NT712) a 37°C, sob agitação de 95 rpm, por 2 horas. Após a incubação alíquotas foram retiradas para análise de diâmetro médio e liberação de ácidos graxos.

O diâmetro médio e a distribuição de tamanho das micropartículas foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons, conforme descrito no item 1.2.5.

A liberação de ácidos graxos livres foi determinada por titulação, com metodologia baseada em Pinsiridom e Parkin (2005) e Bonnaire *et al.* (2008). Amostras de 5 mL foram coletadas e em seguida foram adicionados 10 mL de acetona para interromper a atividade enzimática e 3 gotas de fenolftaleína 1% que foi utilizada como indicador. A titulação foi feita com NaOH 0,01 N. O cálculo da liberação de ácidos graxos livres foi feito de acordo com a Equação 1 (HU *et al.*, 2010)..

$$\%AGL = 100 \times \left(\frac{V_{NaOH} \times M_{NaOH} \times MM_{lipidio}}{w_{lipidio} \times 2} \right) \quad (\text{Equação 1})$$

onde V_{NaOH} é o volume de hidróxido de sódio requerido para neutralizar os ácidos graxos produzidos (em litros), M_{NaOH} é a molaridade do hidróxido de sódio utilizado (em M), $M_{lipidio}$ é o massa molar do óleo de referência (282,47 g/mol para ácido oléico), $w_{lipidio}$ é a massa total de lipídio inicial (em gramas).

3.2.7.3. Ensaios de digestibilidade simulada *in vitro* dinâmica

O modelo de digestão *in vitro* dinâmica utilizado foi construído baseando-se na versão descrita por Reis *et al.* (2008), em montagem existente no Laboratório de Instalações Piloto, no Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, onde esta etapa do trabalho de Mestrado foi realizada graças a uma bolsa

BEPE (Bolsa de Estágio de Pesquisa na Exterior)/ FAPESP. O estágio ocorreu sob supervisão do Prof. António A. Vicente.

Nestes ensaios, foi realizada a etapa de digestão gástrica antes da etapa de digestão duodenal.

Uma alíquota de 20 mL de amostra de micropartículas lipídicas sólidas foi injetada no equipamento de digestão simulada, mostrado na Figura 3.3, o qual já continha água circulando a 37°C. O material dos compartimentos foi construído em vidro e no seu interior havia uma pequena “bolsa” plástica, local onde a amostra foi colocada (Figura 3.2). A água aquecida circulava por fora dessa bolsa, fazendo-a com que fosse comprimida e relaxada, simulando os movimentos peristálticos gástricos e duodenais.

Figura 3.2. Detalhe do compartimento de vidro, no qual ocorria a digestão simulada dinâmica.

Após a estabilização da temperatura da amostra iniciou-se o processo de digestão. Na etapa gástrica, a adição da solução gástrica simulada ocorria através de bomba de seringa com vazão controlada de 0,1mL/min, por 2 horas, totalizando 12 mL de suco gástrico. Após duas horas de processo, era retirada uma alíquota para análises de tamanho de partícula, potencial zeta e microscopia ótica. Em seguida, a amostra foi transferida para o compartimento de simulação duodenal, sendo então injetadas as soluções duodenal e biliar a uma taxa de 0,1 mL/min e 0,05 mL/min, respectivamente, por duas horas, totalizando 12 mL de suco duodenal e 6 mL de suco biliar ao fim do processo. No final da digestão simulada foi recolhida

uma alíquota para as análises de tamanho de partícula, potencial zeta, quantificação de ácidos graxos livres e microscopia ótica.

Figura 3.3. Sistema utilizado para os ensaios de digestibilidade *in vitro* dinâmica, no Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho.

O diâmetro médio e a distribuição do tamanho de partícula foram determinados por espalhamento dinâmico de luz (espectroscopia de correlação de fótons) em equipamento Zetasizer Nano Nanosizer (Malvern). O potencial zeta foi determinado por mobilidade eletroforética no mesmo equipamento.

As análises de microscopia ótica foram realizadas em microscópio ótico Axiovert CFL (Carl Zeiss, Alemanha). Utilizou-se uma magnificação de 40 vezes e luz transmitida para a visualização das micropartículas lipídicas sólidas. As imagens

foram adquiridas em tempo real usando uma câmera CCD (Sony, Japão) acoplada ao microscópio.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização do óleo de palmiste

Os dados resultantes da cromatografia gasosa revelaram a seguinte composição em ácidos graxos do óleo de palmiste, mostrada na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Composição do óleo de palmiste em ácidos graxos

Composto		% massa	Desvio
C10:0	Cáprico	3,24	0,02
C12:0	Láurico	52,28	0,84
C14:0	Mirístico	15,29	0,01
C16:0	Palmítico	9,07	0,22
C18:0	Esteárico	1,93	0,08
C18:1	Oléico	15,30	0,45
C18:2	Linoléico	2,73	0,13
C18:3	Alfa-linolênico	0,15	0,21

Pelos dados obtidos através da cromatografia gasosa foi possível notar que o óleo de palmiste utilizado neste trabalho é rico em ácidos graxos láuricos (53%), conforme esperado, e também possui quantidades consideráveis de ácido mirístico e oléico (em torno de 15% cada). Os valores determinados estão de acordo com a literatura (HAYATI *et al.*, 2009; JIN *et al.*, 2008; SIEW, 2001).

Em relação à composição em triacilgliceróis, foi possível também determiná-la utilizando-se o programa computacional desenvolvido por Antoniosi Filho *et al.* (1995). As composições em triacilgliceróis e os resultados das massas molares médias estão apresentados na Tabela 4.2 (Os triacilgliceróis destacados foram encontrados em maior proporção, de acordo com as análises de cromatografia gasosa).

Tabela 4.2. Composição do óleo de palmiste em triacilgliceróis

Triacilglicerol	Fração molar	Peso molar	Triacilglicerol	Fração molar	Peso molar
CCL	0,16	582,90	PPL	0,56	751,22
LCL	1,09	610,96	LPS	0,11	779,28
LLC	2,18	610,96	SLP	0,11	779,28
CLM	0,56	639,01	LSP	0,11	779,28
MCL	0,56	639,01	PPM	0,14	779,28
CML	0,56	639,01	COC	0,13	665,05
LLL	15,11	639,01	COL	3,48	693,10
MMC	0,14	667,06	COM	0,89	721,16
CPL	0,30	667,06	LOL	24,17	721,16
PCL	0,30	667,06	COP	0,47	749,21
CLP	0,30	667,06	LOM	12,40	749,21
LML	3,88	667,06	MOM	1,59	777,26
LLM	7,75	667,06	LOP	6,55	777,26
MLM	0,99	695,12	LOS	1,26	805,32
MML	1,99	695,12	MOP	1,68	805,32
LPL	2,05	695,12	MOS	0,32	833,37
LLP	4,10	695,12	POP	0,44	833,37
MMM	0,26	723,17	POS	0,17	861,42
LSL	0,39	723,17	CLiL	0,63	691,09
LLS	0,79	723,17	CLiM	0,16	719,14
LPM	1,05	723,17	LLiL	4,34	719,14
PLM	1,05	723,17	LLiM	2,23	747,19
LMP	1,05	723,17	MLiM	0,29	775,25
MPM	0,13	751,22	LLiP	1,18	775,25
SLM	0,20	751,22	LLiS	0,23	803,30
LMS	0,20	751,22	MLiP	0,30	803,30
LSM	0,20	751,22	LLnL	0,26	717,12
MMP	0,27	751,22	LLnM	0,13	745,18
PLP	0,28	751,22	OOO	0,15	885,44

Os ácidos graxos foram expressos na forma de códigos, onde: C – ácido cáprico, L – ácido láurico, M – ácido mirístico, P – ácido palmítico, S – ácido esteárico, O – ácido oléico, Li – ácido linoléico e Ln – ácido linolênico.

Como já era esperado o óleo de palmiste possui triacilgliceróis ricos em ácidos láuricos, mirístico e oléico. É possível notar na Tabela 4.2 que os triacilgliceróis mais abundantes são LOL (24,17%) e LLL (15,11%), LOM (12,40%), LLM (7,75%) e LOP (6,55%). Os valores determinados estão de acordo com a literatura (TAN e CHE MAN, 2000).

4.2. Caracterização das misturas lipídicas

4.2.1. Misturas de ácido esteárico e óleo de palmiste

A caracterização microestrutural das misturas de ácido esteárico e óleo de palmiste foram feitas através de difratometria de raios-X e calorimetria diferencial de varredura. A Figura 4.1 mostra os termogramas obtidos por DSC para tais misturas.

Figura 4.1. Termogramas obtidos por calorimetria diferencial de varredura: (a) OP puro; (b) 90%OP+10%AE; (c) 70%OP+30%AE; (d) 50%OP+50%AE; (e) 30%OP+70%AE; (f) AE puro

É possível verificar através das análises de DSC que a adição de óleo de palmiste na mistura lipídica alterou significativamente o comportamento térmico das misturas resultantes, conforme pode ser visto na Figura 4.1 e na Tabela 4.3. Devido às interações moleculares entre os diferentes lipídios das espécies constituintes, os termogramas das misturas são diferentes tanto do óleo de palmiste quanto do ácido esteárico puro. Trata-se de dois lipídios com diferentes características em relação ao ponto de fusão; o ácido esteárico é um lipídio de alto ponto de fusão, enquanto o óleo de palmiste é uma mistura de triacilgliceróis com baixo ponto de fusão. Tal fato transparece nos termogramas, que possuem duas transições de fase endotérmicas (dois processos de fusão). Como era esperado, conforme a mistura lipídica é enriquecida em ácido esteárico, a entalpia de fusão da porção de alto ponto de fusão aumenta, bem como a temperatura de tal transição. Por outro lado, a entalpia da porção lipídica de baixo ponto de fusão diminui, bem como a entalpia a ela relacionada.

Tais alterações indicam que houve perturbações na microestrutura do sistema, o que era um fenômeno desejado. Em todos os casos, os termogramas mostram que as misturas de óleo de palmiste e ácido esteárico, em quaisquer das proporções testadas, são indicadas para a produção de micropartículas lipídicas sólidas, pois a estrutura altamente cristalina e ordenada do ácido esteárico foi modificada em grande extensão pela adição do óleo de palmiste. Matrizes lipídicas com alto grau de desordem são interessantes para a produção de micropartículas lipídicas sólidas, pois retículos cristalinos menos ordenados favorecem a inclusão de moléculas durante o processo de encapsulação, e diminuem a chance de expulsão de tais bioativos, sendo também possível controlar melhor a liberação dos mesmos (SEVERINO *et al.*, 2011; ATTAMA e MÜLLER-GOYMANN, 2008; MÜLLER *et al.*, 2002). É possível e desejável, portanto, realizar a avaliação da microestrutura das matrizes lipídicas encapsulantes por difratometria de raios-X e calorimetria diferencial de varredura, visando determinar se seriam boas escolhas para a produção das partículas lipídicas sólidas. Tal avaliação é especialmente útil quando se utilizam matérias primas encapsulantes que ainda não foram exploradas na literatura (ATTAMA *et al.*, 2006; ATTAMA e MÜLLER-GOYMANN, 2006).

Tabela 4.3. Dados calorimétricos (obtidos por DSC) das misturas lipídicas contendo óleo de palmiste e ácido esteárico.

Mistura Lipídica	T _{m1} (°C)	T _{onset} ₁ (°C)	ΔH _{m1} (J/g)	T _{m2} (°C)	T _{onset} 2(°C)	ΔH _{m2} (J/g)
AE puro	71,7	69,1	118,0	-	-	-
30%OP+70%AE	71,9	68,3	108,0	29,5	n.c*	n.c.
50%OP+50%AE	68,6	67,1	48,3	28,7	n.c.	n.c.
70%OP+30%AE	64,2	60,0	42,3	30,2	n.c.	29,5

*n.c.: não calculado pelo *software* do calorímetro

Por sua vez, os difratogramas das misturas obtidos por DRX das misturas de ácido esteárico e óleo de palmiste, bem como ambos os lipídios puros podem ser vistos na Figura 4.3. Nestes difratogramas, pode-se confirmar que, conforme já havia sido indicado pelas análises calorimétricas, a adição de óleo de palmiste alterou a microestrutura do sistema estudado em todas as proporções mássicas testadas. Os picos evidenciados no difratograma do ácido esteárico puro, a $2\theta = 21.7^\circ$ e 24.2° , devidos a uma estrutura ortorrômbica com distâncias intermoleculares típicas de 0.42 e 0.38 nm, é característica do ácido esteárico (TEIXEIRA *et al.*, 2010; MORENO *et al.*, 2007), diminuíram significativamente suas intensidades, indicando diminuição do caráter cristalino devido à formação da mistura lipídica. Na Figura 4.2 pode ser visto o arranjo molecular cristalino de ácido esteárico.

Figura 4.2. Representação esquemática do arranjo molecular cristalino do ácido esteárico (fonte: KANECO *et al.*, 1999)

Figura 4.3. Difratomogramas de raios-X: (a) óleo de palmiste puro; (b) ácido esteárico puro; (c) misturas de ácido esteárico e óleo de palmiste.

Além disso, nota-se que houve uma inversão da intensidade destes picos do sistema indicando, provavelmente, a formação de uma blenda entre os lipídios. Por sua vez, nas amostras contendo 70 e 90% de óleo de palmiste faz-se visível uma porção amorfa a partir de 2θ ao redor de 17° , que é certamente devido ao aumento

da quantidade de óleo de palmiste na mistura. O difratograma do óleo de palmiste puro mostra que se trata de uma substância completamente amorfa, com picos de baixa intensidade indicando distâncias intermoleculares de 0.46, 0.42 e 0.38 nm, ou seja, a presença das formas β e β' na sua microestrutura (TIMMS, 1984), e como uma grande região amorfa iniciando-se por volta de 2θ igual a 15° . Em todas as misturas, pode-se concluir também que a forma altamente cristalina β foi totalmente eliminada do sistema, já que o pico referente a 0.46 nm não aparece.

Desta forma, os resultados de DRX corroboram os resultados evidenciados pelas análises de DSC, em que a mistura de ácido esteárico e óleo de palmiste foi efetiva em criar estruturas altamente desordenadas. Ambos as análises indicam que a adição de 30% de óleo de palmiste foi suficiente para provocar uma significativa mudança estrutural no ácido esteárico, sendo por este motivo esta a concentração mais baixa de óleo de palmiste escolhida para a produção das micropartículas lipídicas sólidas nas etapas subsequentes deste trabalho.

4.2.2. Misturas de triestearina e óleo de palmiste

A Figura 4.4 mostra os termogramas obtidos por DSC para as misturas lipídicas de triestearina e óleo de palmiste e a Tabela 4.4 os dados calorimétricos obtidos para tais misturas.

Tabela 4.4. Dados calorimétricos (obtidos por DSC) das misturas contendo triestearina e óleo de palmiste

Mistura Lipídica	T_{m1} ($^\circ\text{C}$)	$T_{\text{onset}1}$ ($^\circ\text{C}$)	ΔH_{m1} (J/g)	T_{m2} ($^\circ\text{C}$)	$T_{\text{onset}2}$ ($^\circ\text{C}$)	ΔH_{m2} (J/g)
TS pura	61,8	59,0	153,3	-	-	-
90%OP+10%TS	30,1	24,9	n.c	50,2	23,4	5,91
70%OP+30%TS	30,1	n.c*	n.c	55,6	45,9	23,4
50%OP+50%TS	-	-	-	62,8	46,1	37,5
30%OP+70%TS	-	-	-	65,9	46,3	59,6

*n.c.: não calculado pelo *software* do calorímetro

Figura 4.4. Termogramas obtidos por calorimetria diferencial de varredura: (a) 90%OP+10%TS; (b) 70%OP+30%TS; (c) 50%OP+50%TS; (d) 30%OP+70%TS; (e) triestearina pura.

Assim como no DSC das misturas lipídicas de ácido esteárico, a adição de 30% óleo de palmiste à triestearina perturbou significativamente a sua microestrutura, fato indicado pelo abaixamento da temperatura e da entalpia de fusão da porção lipídica de baixo ponto de fusão, e pelo aumento dos mesmos parâmetros para a porção lipídica de alto ponto de fusão. As temperaturas *onset* do segundo pico mostrado nos termogramas também se alteraram significativamente com a adição de óleo de

palmiste na mistura. Todos estes fatos confirmam que, assim como no caso das misturas de óleo de palmiste e ácido esteárico, as misturas contendo o óleo láurico e a triestearina também são apropriadas para a produção de micropartículas lipídicas sólidas, pois se trata de matrizes com estruturas altamente desordenadas.

Por sua vez, os difratogramas das misturas obtidos por DRX das misturas de triestearina e óleo de palmiste, bem como para a triestearina pura podem ser vistos na Figura 4.5.

Figura 4.5. Difratogramas de raios-X da triestearina pura e das misturas de triestearina e óleo de palmiste

Os difratogramas da Figura 4.5 possibilitam confirmar que a adição de óleo de palmiste alterou a cristalinidade dos sistemas estudados. Os picos característicos de triestearina pura a $2\theta=21,7^\circ$ e $24,2^\circ$, característicos da estrutura ortorrômbica da forma β' , diminuíram significativamente sua intensidade, indicando diminuição do caráter cristalino da mistura lipídica. Uma porção amorfa (surgindo a partir de 2θ por

volta de 17°) se faz claramente presente em todas as misturas lipídicas contendo triestearina analisadas, indicando que foi mais fácil modificar a cristalinidade das misturas de triestearina com a adição do óleo de palmiste do que o ácido esteárico. Apesar da presença de tal porção amorfa, os picos característicos da forma β' estão presentes em todos os casos. A maior facilidade de amorfização da estrutura no caso da triestearina em relação ao ácido esteárico provavelmente está relacionado com o fato de a primeira ser uma triacilglicerol, enquanto o segundo é um ácido graxo. Apesar de ambos apresentarem, em sua forma pura, estruturas ortorrômicas (conforme a Figura 4.6), elas são diferentes espacialmente. Deve ter sido mais fácil ao óleo de palmiste, portanto, desestruturar o arranjo de um triacilglicerol do que do ácido graxo.

Figura 4.6. Representação esquemática do arranjo molecular e formas polimórficas de diferentes triacilglicerídeos. (fonte: BUNJES e UNRUH, 2007)

Assim, pode-se sumarizar que, em todos os oito casos testados (tanto ácido esteárico quanto triestearina), a adição de óleo de palmiste produziu sistemas com estrutura desordenada, de forma que estes se tornaram mais amorfos e adequados para serem testados na produção das micropartículas lipídicas sólidas.

4.3. Determinação do valor do equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) das misturas lipídicas

O EHL (em inglês, HLB, ou *hydrophilic-lipophilic balance*) de um tensoativo é uma quantificação de seu equilíbrio hidrofílico-lipofílico, isto é, do balanço das forças polares e apolares de um emulsificante, que combina os dois tipos de grupos em sua estrutura (ICI, 1980). O conceito de EHL foi proposto por Griffin (1949) e é uma escala semi-empírica que pode ser empregada como ponto de partida para a seleção de tensoativos a serem utilizados na estabilização de emulsões. Sabe-se que a estabilidade de uma emulsão é influenciada por diversos fatores, por isso o valor de EHL não pode ser considerado como um dado absoluto, mas sim como um teste complementar, o qual é utilizado como ponto de partida para a escolha do melhor tensoativo ou mistura destes para a estabilidade do sistema (TADROS, 2009). E assim como um tensoativo possui um valor de EHL, um lipídio ou uma mistura lipídica também possui um valor de EHL que é requerido para ser adequadamente emulsificada, sendo que tal valor foi determinado nesta etapa do estudo para as misturas lipídicas contendo óleo de palmiste que foram usadas para a produção das micropartículas lipídicas sólidas.

Para estimar o melhor valor do EHL das misturas de lipídios empregadas, tomou-se como ponto de referência a emulsão que apresentou maior estabilidade do ponto de vista visual (SEVERINO *et al.*, 2011; GOMES, 2011). As Tabela 4.5 a Tabela 4.12 contêm os resultados da avaliação visual dos valores de EHLs testados para as formulações de micropartículas lipídicas sólidas.

Tabela 4.5. Resultados da avaliação do EHL para as formulações de partículas produzidas com 30% de óleo de palmiste e 70% de ácido esteárico

EHL	Aspecto	Resultado
15,5	Separação de fases	Ruim
14,2	Considerável separação de fases	Razoável
13,0	Leve separação de fases	Bom
11,5	Homogênea	Excelente
10,5	Separação de fases	Ruim
9,3	Separação de fases	Ruim
8	Separação de fases	Ruim

Tabela 4.6. Resultados da avaliação do EHL para as formulações de partículas produzidas com 50% de óleo de palmiste e 50% de ácido esteárico

EHL	Aspecto	Resultado
15,5	Separação de fases	Ruim
14,2	Separação de fases	Ruim
13,0	Separação de fases	Ruim
11,8	Separação de fase	Ruim
10,5	Considerável separação de fases	Razoável
9,3	Leve separação de fases	Bom
8,0	Homogênea	Excelente

Tabela 4.7. Resultados da avaliação do EHL para as formulações de partículas produzidas com 70% de óleo de palmiste e 30% de ácido esteárico

EHL	Aspecto	Resultado
15,5	Separação de fases	Ruim
14,2	Separação de fases	Ruim
13,0	Separação de fases	Ruim
11,8	Separação de fase	Ruim
10,5	Considerável separação de fases	Razoável
9,3	Leve separação de fases	Bom
8,0	Homogênea	Excelente

Tabela 4.8. Resultados da avaliação do EHL para as formulações de partículas produzidas com 90% de óleo de palmiste e 10% de ácido esteárico

EHL	Aspecto	Resultado
13,8	Separação de fases	Ruim
12,7	Separação de fases	Ruim
11,7	Separação de fases	Ruim
10,6	Separação de fases	Ruim
9,6	Leve separação de fases	Razoável
8,5	Leve separação de fases	Razoável
7,6	Homogêneo	Bom

Tabela 4.9. Resultados da avaliação do EHL para as formulações de partículas produzidas com 30% de óleo de palmiste e 70% de triestearina

EHL	Aspecto	Resultado
13,9	Separação de fases	Ruim
10,7	Separação de fases	Ruim
7,5	Homogênea	Excelente

Tabela 4.10. Resultados da avaliação do EHL para as formulações de partículas produzidas com 50% de óleo de palmiste e 50% de triestearina

EHL	Aspecto	Resultado
13,9	Separação de fases	Ruim
10,7	Separação de fases	Ruim
7,5	Homogênea	Excelente

Tabela 4.11. Resultados da avaliação do EHL para as formulações de partículas produzidas com 70% de óleo de palmiste e 30% de triestearina

EHL	Aspecto	Resultado
13,9	Separação de fases	Ruim
10,7	Separação de fases	Ruim
7,5	Homogênea	Excelente

Tabela 4.12. Resultados da avaliação do EHL para as formulações de partículas produzidas com 90% de óleo de palmiste e 10% de triestearina

EHL	Aspecto	Resultado
13,9	Considerável separação de fases	Bom
12,3	Homogênea	Excelente
10,7	Separação de fases	Ruim
9,0	Separação de fases	Ruim
7,5	Separação de fases	Ruim

Sendo assim, é possível sumarizar na Tabela 4.13 os valores de EHL em que as dispersões de micropartículas lipídicas sólidas se mostraram mais estáveis, e que foram utilizados para cada formulação de partícula ao longo deste trabalho de Mestrado.

Tabela 4.13. Valores de EHL ótimos para as formulações de micropartículas lipídicas sólidas testadas

Formulação	EHL	Composição da interface estabilizante
30% OP + 70% AE	11,5	40% span 80 + 60% polisorbato 20
50% OP + 50% AE	8,0	70% span 80 + 30% polisorbato 20
70% OP + 30% AE	8,0	70% span 80 + 30% polisorbato 20
90% OP + 10% AE	7,6	75% span 80 + 25% polisorbato 20
30% OP + 70% TS	7,5	70% span 80 + 25% polisorbato 60
50% OP + 50% TS	7,5	70% span 80 + 25% polisorbato 60
70% OP + 30% TS	7,5	70% span 80 + 25% polisorbato 60
90% OP + 10% TS	12,3	25% span 80 + 75% polisorbato 60

Para a produção das micropartículas lipídicas sólidas formuladas com triestearina foi necessário adicionar um agente espessante para a estabilização das dispersões. A goma xantana foi escolhida, pois é um polissacarídeo estabilizante, e sua principal função é modificar a viscosidade da fase aquosa, minimizando a mobilidade das partículas e diminuindo o número de colisões entre elas, conferindo maior estabilidade coloidal. Além disso, proporciona menor viscosidade comparado com outros polissacarídeos espessantes (DICKINSON, 2009; KRSTONOSIC, *et al.*, 2009; SUN, *et al.*, 2007).

4.4. Caracterização microestrutural das micropartículas lipídicas sólidas

4.4.1. Micropartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico e óleo de palmiste

Os difratogramas obtidos por DRX das dispersões produzidas são mostrados na Figura 4.7, e indicam que todas as formulações de micropartículas lipídicas produzidas com óleo de palmiste e ácido esteárico são estruturas com baixo grau de cristalinidade. Tal comportamento pode ser comprovado pelo fato de os picos presentes nos difratogramas serem de baixíssima intensidade, além da presença de regiões amorfas evidenciadas a partir de 2θ ao redor de 20°C . Essa característica é importante em micropartículas lipídicas sólidas, pois, de forma geral, quanto menor a cristalinidade de um sólido, maior a sua solubilidade, o que pode ser de grande valia

para aumentar a biodisponibilidade oral de bioativos encapsulados (McCLEMENTS, 2012; RODRIGUEZ-SPONG *et al.*, 2004).

Figura 4.7. Difratomogramas de raios-X das micropartículas lipídicas sólidas produzidas com óleo de palmiste e ácido esteárico (obtidos a 10°C).

Outra técnica utilizada para inferir alguns aspectos importantes sobre a microestrutura de dispersões de micropartículas lipídicas sólidas é a calorimetria diferencial de varredura. A Figura 4.8 mostra os termogramas obtidos por DSC das micropartículas produzidas com ácido esteárico e óleo de palmiste.

Figura 4.8. Termogramas obtidos por calorimetria diferencial de varredura das micropartículas lipídicas sólidas produzidas com óleo de palmiste e ácido esteárico.

Tabela 4.14. Dados calorimétricos (obtidos por DSC) das micropartículas lipídicas sólidas contendo óleo de palmiste e ácido esteárico.

MLS	T _{m1} (°C)	T _{onset} ₁ (°C)	ΔH _{m1} (J/g)	T _{m2} (°C)	T _{onset} 2(°C)	ΔH _{m2} (J/g)
90%OP+10%AE	28,1	23,6	2001	-	-	-
70%OP+30%AE	28,5	21,7	1496	58,4	47,6	1937
50%OP+50%AE	24,3	13,3	1420	58,1	48,6	2096
30%OP+70%AE	22,9	16,8	0,878	66,6	59,4	5913

Os termogramas apresentados possuem duas transições de fase endotérmicas, e de acordo com os dados apresentados na Tabela 4.14, as entalpias de fusão e as temperaturas de transição de fase relacionada ao primeiro pico diminuem com a redução de óleo de palmiste na formulação. Em contrapartida, as entalpias de fusão relacionadas ao segundo pico e as temperaturas de transição aumentam com a adição de ácido esteárico às formulações.

Pode-se notar que, conforme esperado, o aumento da quantidade de óleo de palmiste nas formulações de micropartículas lipídicas sólidas fez com que os

sistemas se tornassem muito mais heterogêneos, que pode ser verificado pela diminuição da temperatura de fusão com o aumento da concentração de óleo de palmiste. Tal característica é altamente desejável nesses sistemas, já que o aumento da heterogeneidade e da característica amorfa (indicada pelas análises de DRX) favorece as condições de encapsulação de agentes ativos, diminuindo as chances de expulsão do mesmo da estrutura e aumentando a solubilidade da estrutura no meio digestivo.

4.4.2. Micropartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de palmiste

Os difratogramas obtidos por DRX das micropartículas lipídicas sólidas produzidas podem ser vistos na Figura 4.9.

Figura 4.9. Difratogramas de raios-X das micropartículas lipídicas produzidas com triestearina e óleo de palmiste (obtidos a 10°C).

É possível verificar que todas as formulações de micropartículas de triestearina e óleo de palmiste apresentam característica amorfa em sua microestrutura, evidenciados pela baixa intensidade dos picos presentes nos difratogramas. O baixo grau de cristalinidade das dispersões é altamente desejável, pois a estrutura desorganizada favorece a incorporação de bioativos nas micropartículas, podendo possibilitar uma liberação controlada (MULLER *et al.*, 2002).

A Figura 4.10 e a Tabela 4.15 mostram os termogramas obtidos por DSC e os dados calorimétricos das micropartículas produzidas com triestearina e óleo de palmiste.

Figura 4.10. Termogramas obtidos por calorimetria diferencial de varredura das micropartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de palmiste.

Tabela 4.15. Dados calorimétricos (obtidos por DSC) das micropartículas lipídicas sólidas contendo óleo de palmiste e triestearina.

MLS	T _{m1} (°C)	T _{onset} ₁ (°C)	ΔH _{m1} (J/g)	T _{m2} (°C)	T _{onset} 2(°C)	ΔH _{m2} (J/g)
90%OP+10%TS	-	-	-	-	-	-
70%OP+30%TS	30,7	27,4	0,455	48,2	40,10	2414
50%OP+50%TS	22,8	17,2	0,086	52,3	38,91	3255
30%OP+70%TS	19,5	12,1	0,223	54,4	34,78	4482

Pode-se notar que, com o aumento da quantidade de óleo de palmiste nas formulações, a temperatura de transição de fases e a entalpia relacionada ao segundo pico endotérmico diminuíram, tornando o sistema mais heterogêneo. Essa característica heterogênea e amorfa favorece a produção das micropartículas lipídicas sólidas, pois as condições de encapsulamento são melhoradas devido a redução das chances de expulsão do bioativo da matriz lipídica.

Assim, tanto as micropartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico e óleo de palmiste, quanto com triestearina e óleo de palmiste nas composições testadas possuem características microestruturais adequadas para a continuidade do trabalho, nas etapas de avaliação da vida de prateleira e digestibilidade *in vitro*.

4.5. Avaliação da vida de prateleira das micropartículas lipídicas sólidas

4.5.1. Micropartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico e óleo de palmiste

As Figura 4.11 a Figura 4.13 mostram os perfis de distribuição de diâmetro hidrodinâmico médio de partícula para as micropartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico e óleo de palmiste. É mostrado um perfil representativo de cada tipo de partícula (no entanto, todas as amostras foram produzidas em duplicata).

Figura 4.11. Perfis de distribuição de tamanho de partícula, ao longo do tempo de armazenagem, para amostras de micropartículas lipídicas sólidas produzidas com diferentes composições de ácido esteárico e óleo de palmiste.

Com relação ao diâmetro médio hidrodinâmico, todas as dispersões de micropartículas lipídicas sólidas produzidas apresentaram distribuição bimodal (com duas populações de partículas), sendo a primeira com diâmetro médio em torno de 300 nm e a segunda com diâmetro médio em torno de 1500 nm. Para todas as composições testadas observa-se que as micropartículas se mostraram estáveis durante o período total de armazenagem, no entanto, o diâmetro hidrodinâmico médio aumentou no final na vida de prateleira, como pode ser visto na Tabela 4.16. Tal aumento não foi, entretanto, sinal de uma grande desestabilização das dispersões das micropartículas.

A estabilidade observada pode ser explicada pela interação entre os tensoativos presentes na interface produzida. Segundo Tanaka *et al.* (2003), quanto mais similares as cadeias hidrofóbicas das moléculas emulsionadas e das moléculas de tensoativo, mais intensa é a interpenetração na interface das partículas. O polisorbato 20 e o óleo de palmiste são ricos em ácido láurico em suas cadeias carbônicas, e o span 80 e o ácido esteárico contém cadeias com 18 carbonos, assim as interações químicas foram altamente favoráveis, colaborando para que os sistemas emulsionados produzidos apresentassem uma alta estabilidade em termos de diâmetro médio ao longo do tempo de armazenagem devido à coesividade e robustez de sua interface estabilizante.

A Figura 4.12, por sua vez, mostra outro parâmetro indicativo de estabilidade coloidal, que é o potencial zeta, ao longo do tempo de armazenagem.

Figura 4.12. Valores de potencial zeta ao longo do tempo de armazenagem, para micropartículas lipídicas sólidas compostas por ácido esteárico e óleo de palmiste.

A Tabela 4.16 sumariza os valores dos parâmetros indicadores de estabilidade coloidal (diâmetro hidrodinâmico médio, potencial zeta e polidispersidade) para as formulações de micropartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico e óleo de palmiste.

Tabela 4.16. Diâmetro hidrodinâmico médio, polidispersidade e potencial zeta de micropartículas lipídicas sólidas formuladas com ácido esteárico e óleo de palmiste.

	Diâmetro hidrodinâmico médio (nm)		Polidispersidade		Potencial zeta (mV)	
	Amostra fresca	Amostra ao final da armazenagem	Amostra fresca	Amostra ao final da armazenagem	Amostra fresca	Amostra ao final da armazenagem
90%OP + 10%AE	424±5,70	546±9,80	0,32±0,01	0,31±0,01	-30,7±3,50	-49,7±2,90
70%OP + 30%AE	441±42,7	652±18,4	0,34±0,01	0,35±0,01	-32,7±6,10	-37,6±3,10
50%OP + 50%AE	553±7,01	630±13,1	0,32±0,01	0,34±0,01	-12,5±5,50	-20,6±2,50
30%OP + 70%AE	877±17,0	918±18,0	0,33±0,01	0,32±0,01	-14,1±3,30	-36,3±3,50

Sabe-se que a magnitude do potencial zeta indica a estabilidade do sistema coloidal; se todas as partículas em suspensão têm um alto valor de zeta potencial em módulo, então elas tendem a repelir umas as outras e assim não há tendência de floculação ou coalescência. No entanto, se as partículas têm um baixo valor de potencial zeta pode não haver forças suficientes para impedir que as partículas se agreguem e haja coagulação ou floculação, levando à separação de fases.

Os perfis de potencial zeta indicam que todas as formulações apresentaram potencial zeta menores que -20 mV ao longo do tempo de armazenagem, corroborando a observação de que todos os sistemas se mostraram estáveis.

Por sua vez, a polidispersidade de uma emulsão é caracterizada pela distribuição de partículas em diferentes classes de tamanho (McCLEMENTS, 2005). Todas as dispersões produzidas apresentaram polidispersidade em torno de 0,35, e esse valor se manteve estável durante o período de armazenagem, caracterizando os sistemas como estáveis especialmente por se tratar de dispersões com distribuição bimodais.

Assim, as técnicas experimentais utilizadas para caracterizar as micropartículas compostas por óleo de palmiste e ácido esteárico comprovaram a estabilidade das dispersões produzidas durante o período e a condição de armazenagem avaliada.

4.5.2. Micropartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de palmiste

A Figura 4.13 mostra as curvas de distribuição de tamanho de partícula (diâmetro hidrodinâmico) para as micropartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina de óleo de palmiste em três tempos diferentes, ao longo do período de armazenagem sob refrigeração.

Figura 4.13. Perfis de distribuição de tamanho de partícula, ao longo do tempo de armazenagem, para amostras de micropartículas lipídicas sólidas produzidas com diferentes composições de triestearina e óleo de palmiste.

As micropartículas produzidas com óleo de palmiste e triestearina apresentaram distribuição de tamanho bimodal, com duas populações de partículas, a primeira com diâmetro em torno de 300 nm e a segunda com diâmetro em torno de 2000 nm. As dispersões se mostraram extremamente estáveis durante o período de

armazenagem para todas as composições de micropartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de palmiste. A estabilidade de todos os sistemas emulsionados produzidos também pode ser explicada pela interação dos tensoativos utilizados na interface. A triestearina é um triacilglicerol composto por molécula de ácido esteárico, que é um ácido graxo composto por moléculas de 18 carbonos, assim como os tensoativos polisorbato 60 e o span 80. Portanto, semelhantemente ao que ocorreu com as dispersões produzidas com ácido esteárico e óleo de palmiste, os sistemas contendo triestearina também proporcionaram interações químicas favoráveis, produzindo dispersões estáveis com relação ao diâmetro médio hidrodinâmico.

No caso das micropartículas contendo triestearina não foi possível obter partículas estáveis sem a adição de um agente espessante, no caso, goma xantana, a qual foi escolhida por ser um polissacarídeo comumente utilizado na estabilização de emulsões por espessamento, e por já ter sido utilizado em estudos anteriores do Laboratório de Colóides e Funcionalidade de Macromoléculas em sistemas semelhantes (GOMES, 2011).

Por sua vez, os perfis de valores de potencial zeta das micropartículas lipídicas sólidas ao longo do tempo de armazenagem sob refrigeração estão mostrados na Figura 4.14.

Figura 4.14. Potencial zeta ao longo do tempo de armazenagem, para micropartículas lipídicas sólidas compostas por triestearina e óleo de palmiste.

Tabela 4.17. Diâmetro hidrodinâmico médio, polidispersidade e potencial zeta de micropartículas lipídicas sólidas formuladas com triestearina e óleo de palmiste.

	Diâmetro hidrodinâmico (nm)		Polidispersidade		Potencial zeta (mV)	
	Amostra fresca	Amostra ao final da armazenagem	Amostra fresca	Amostra ao final da armazenagem	Amostra fresca	Amostra ao final da armazenagem
90%OP + 10%TS 70%OP	1081±58,3	1025±42,2	0,43±0,01	0,41±0,01	-21,4±5,10	-15,2±4,50
30%TS 50%OP	733±19,2	918±107	0,40±0,01	0,36±0,04	-28,9±2,70	-26,2±2,80
50%TS 30%OP	1128±126	1246±250	0,32±0,01	0,40±0,01	-28,4±4,60	-26,7±6,30
70%TS	771±30,9	1106±129	0,39±0,01	0,32±0,02	-23,1±3,50	-22,6±2,70

Os perfis indicam que todas as formulações apresentaram valores de potencial zeta por volta de -25 mV ao longo de todo o tempo de armazenagem, indicando que os sistemas formados são estáveis, corroborando os dados de distribuição de tamanho de partícula encontrados.

Finalmente, todas as partículas apresentaram polidispersidade variando de 0,3 a 0,4, e esse valor se manteve praticamente o mesmo durante o período de armazenagem. Esses resultados também caracterizam sistemas estáveis, especialmente porque se trata de dispersões com curvas bimodais de distribuição de tamanho.

4.6. Estabilidade das micropartículas lipídicas sólidas em diferentes condições de *stress*

Visando verificar a estabilidade das micropartículas lipídicas sólidas diante de diferentes condições de *stress* analisou-se o comportamento físico-químico das dispersões em meios contendo diferentes concentrações de sal e sacarose. Verificou-se também o comportamento frente a duas diferentes temperaturas 45 e 75°C. Além disso, o pH básico (8,0) e ácido (3,0) também foram utilizados para testar a estabilidade das micropartículas lipídicas sólidas contendo óleo de palmiste.

A Figura 4.15 mostra os resultados de separação de fases dos ensaios de estabilidade físico-química em diferentes condições de *stress* para as micropartículas lipídicas sólidas formuladas com ácido esteárico e óleo de palmiste.

Figura 4.15. Estabilidade físico-química em diferentes condições de *stress* para micropartículas lipídicas sólidas produzidas com diferentes composições de ácido esteárico e óleo de palmiste (■ % fase creme, □ %fase emulsão)

Com relação ao processamento térmico das micropartículas lipídicas sólidas contendo ácido esteárico e óleo de palmiste, o aquecimento a 45°C provocou separação de fases nas amostras com 30 e 50% de óleo de palmiste. Já no aquecimento a 75°C houve separação de fases em todas as formulações de micropartículas lipídicas sólidas.

A adição de sacarose não afetou a estabilidade das dispersões com maior concentração de óleo de palmiste (70 e 90%). No entanto, as amostras com 30 e 50% de óleo de palmiste foram extremamente instáveis com a adição de sacarose.

Em relação a força iônica, apenas as amostras com 30 e 50% de óleo de palmiste apresentaram separação de fases em concentrações maiores que 0,25 M de NaCl. Por outro lado, as dispersões com maior quantidade de óleo de palmiste em sua

composição foram mais resistentes que as outras em todas as concentrações de NaCl testadas.

Pode-se sumarizar que as formulações que continham menores concentrações de óleo de palmiste foram mais instáveis às diversas condições de *stress* aplicadas. Como o ácido esteárico é um ácido graxo e o óleo de palmiste é uma mistura de triacilgliceróis, é possível afirmar que a diferente estrutura química pode ter afetado os resultados de estabilidade, fazendo com que as formulações com 70 e 50% de ácido esteárico tivessem resultados piores que as amostras de micropartículas com menores concentrações do ácido graxo. Devido a diferença estrutural entre os lipídios, a estrutura pode ter se tornado mais frágil diante das condições de *stress* aplicadas, fazendo com que as partículas com estruturas mais heterogêneas se mostrassem mais instáveis.

A Figura 4.16, por sua vez, mostra o comportamento em termos de separação de fases para as dispersões de micropartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de palmiste em diferentes condições de *stress*.

O comportamento das dispersões de micropartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de palmiste foi bem diferente das dispersões produzidas com ácido esteárico. Com relação ao processamento térmico, o aquecimento a 45 °C provocou a separação de fases em todas as formulações, menos nas dispersões contendo 70% de triestearina e 30% de óleo de palmiste. Tal fato pode estar relacionado com o fenômeno da coalescência parcial, que ocorre quando a emulsão O/A contém a fase oleosa (núcleo da emulsão) parcialmente cristalizada (McCLEMENTS, 2005). Se os cristais forem capazes de penetrar a interface estabilizante, pode servir de conexão entre as partículas, ou mesmo causar deslocamento em partículas adjacentes, facilitando a coalescência, e posterior separação de fases (BOODE *et al.*, 1993). A existência de uma mistura de cristais e óleo líquido é comprovada pelos termogramas obtidos por DSC (Figura 4.10), que mostram que a 45°C parte do material formador das micropartículas já fundiu, enquanto outra parte ainda se encontra na fase sólida. No caso das partículas contendo 70% de triestearina, entretanto, a quantidade de material já fundido a 45°C é provavelmente muito menor do que a que ainda se encontra sólida, diminuindo a contribuição da coalescência parcial para a desestabilização da dispersão.

Figura 4.16. Estabilidade físico-química em diferentes condições de *stress* para micropartículas lipídicas sólidas produzidas com diferentes composições de triestearina (■ % fase creme, □ %fase emulsão)

Por outro lado, nenhuma formulação demonstrou separação de fases após o aquecimento a 75° por 15 minutos. Em tal temperatura, de acordo com os termogramas obtidos por DSC, todo o material lipídico está na fase líquida em todas as formulações, evitando a coalescência parcial extensiva ocorrida a 45° C, e diminuindo sensivelmente a separação de fases.

A adição de sacarose não pareceu afetar significativamente a estabilidade das micropartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina. Aparentemente, a goma xantana foi capaz de evitar os efeitos causados pela presença das moléculas de sacarose na fase contínua, como a floculação por depleção e a alteração do balanço das forças intermoleculares agindo nas interfaces óleo-água e cristais de lipídio-água (THANASUKARN *et al.*, 2006), mesmo em altas concentrações do dissacarídeo.

Em relação à força iônica, a formulação contendo 90% de óleo de palmiste foi mais resistente às altas concentrações de sal (até 1 M NaCl). Tal fato ocorreu provavelmente devido à sua composição interfacial (75% polisorbato 60 + 25% span 80), diferente em relação às outras micropartículas contendo triestearina (que

continham 30% polisorbato 60 + 70% span 80). Outro aspecto importante é que em baixas concentrações de NaCl (menor que 0,25 M) todas as dispersões se mostraram mais estáveis, esse comportamento pode ser explicado porque em baixas concentrações de sal as forças de repulsão eletrostáticas superam as de Van der Waals e de atração hidrofóbica, mas acima de um nível crítico de sal, as forças de atração conduzem à agregação das partículas e desestabilização do sistema (QIAN *et al.*, 2011).

Os resultados obtidos indicam que as formulações testadas podem ser adicionadas a uma ampla gama de formulações alimentícias sem que ocorra significativa mudança em sua estrutura. Desta forma, optou-se por realizar os ensaios de digestibilidade com todas as dispersões produzidas.

4.7. Digestibilidade *in vitro* estática das micropartículas lipídicas sólidas produzidas com óleo de palmiste.

As Figura 4.17 e Figura 4.18 mostram os perfis de tamanhos de partícula das micropartículas lipídicas sólidas antes e após a digestão *in vitro* estática pelo fluido intestinal simulado, para as formulações contendo ácido esteárico e triestearina, respectivamente.

Os perfis de distribuição de tamanho de partícula revelam uma distribuição de tamanho bimodal, com duas populações de partículas antes e após a digestão, nota-se também que após a digestão *in vitro* estática houve um aumento do tamanho de partícula em todas as formulações testadas. Tal comportamento era esperado, e previsto em literatura (BONNAIRE *et al.*, 2008; MUN *et al.*, 2006; MUN *et al.*, 2007), já que as dispersões de micropartículas lipídicas sólidas foram submetidas a condições de alta força iônica (devido à presença de sais), bem como devido à ocorrência de adsorção da lipase pancreática e sais de bile na superfície das partículas.

Figura 4.17. Perfis de distribuição de tamanho de partícula, antes e no final da digestão *in vitro* estática, para amostras de micropartículas lipídicas sólidas produzidas com diferentes composições de óleo de palmiste e ácido esteárico (— antes da digestão; — após digestão intestinal simulada)

Figura 4.18. Perfis de distribuição de tamanho de partícula, antes e no final da digestão *in vitro* estática, para amostras de micropartículas lipídicas sólidas produzidas com diferentes composições de óleo de palmiste e triestearina. (— antes da digestão; — após digestão intestinal simulada)

Por sua vez, na Figura 4.19 pode-se observar o resultado da liberação de ácidos graxos ao final dos ensaios de digestão simulada *in vitro* estática.

Figura 4.19. Liberação de ácidos graxos após a digestão *in vitro* estática intestinal simulada das micropartículas lipídicas sólidas com óleo de palmiste.

A determinação de ácidos graxos livres revela que não houve diferença significativa (5% de probabilidade pelo teste de Tukey) na liberação de ácidos graxos livres entre as amostras, exceto a formulação 70%TS+30%OP. Os valores encontrados indicam que a lipólise não ocorreu efetivamente, ou seja, praticamente não houve digestão das micropartículas lipídicas sólidas.

Tais resultados sugerem que o método estático utilizado não foi eficiente para prever a digestibilidade, em termos de hidrólise lipídica, das dispersões lipídicas contendo óleo de palmiste e ácidos graxos de cadeia longa, devido à ausência da fase gástrica. O ensaio em batelada utilizado não permitiu o controle do pH do meio reacional, que é essencial para a atividade enzimática lipolítica. Além disso, a adição de todos os compostos dos fluidos simulados não reflete a realidade da digestão, em que os fluidos são secretados ao longo do processo.

Outro aspecto relevante diz respeito às soluções digestivas duodenal e biliar utilizadas, as quais não foram adequadas para tal avaliação da digestibilidade, tanto em termos de composição, quanto de concentrações. Em termos de composição, a ausência de compostos como fosfolipídios, fosfolipase A₂ e, principalmente, a colipase, podem ter afetado grandemente o resultado final (NIK *et al.*, 2010; NIK *et al.*, 2012).

Em relação às concentrações dos componentes presentes no fluido duodenal simulado, temos as concentrações de quatro componentes-chave na determinação

da velocidade e extensão da lipólise: lipase, sais de bile, concentração de lipídio e cálcio (Ca^{+2}). A concentração de lipase (5,35 mg/mL) se mostrou adequada, de acordo com a literatura, compatível com o que se denomina *fed state* (LI *et al.*, 2011; BONNAIRE *et al.*, 2008). A concentração de sais de bile, entretanto, se mostrou muito alta (52,2 mg/mL de extrato, o que corresponderia, no mínimo, a 26,1 mg/mL de sais de bile), e neste caso pode ter ocorrido o fenômeno de deslocamento da lipase da superfície das partículas pelas moléculas tensoativas existentes no extrato de bile, diminuindo o contato das moléculas de enzima lipolítica com o substrato (LI *et al.*, 2011; REIS *et al.*, 2008; LOWE *et al.*, 2002). A adição de co-lipase poderia ter revertido este efeito; entretanto, havia a presença de uma grande quantidade de pancreatina (32,3 mg/mL), que é um extrato contendo lipase pancreática, mas que não contém colipase. A colipase proveniente da lipase suína não foi, provavelmente, capaz de reverter os efeitos danosos da presença do excesso de sais de bile.

Outro componente que provavelmente estava presente em excesso é o íon cálcio (Ca^{+2}). Segundo Li *et al.* (2011), uma grande quantidade de íons cálcio podem restringir o acesso da lipase à superfície das partículas. Tal restrição pode ocorrer devido ao fato de que uma grande quantidade de cálcio pode intensificar a floculação do sistema, o que obrigaria as moléculas de lipase a se difundirem entre as partículas para que a lipólise ocorresse mais efetivamente. Desta forma, a extensão da hidrólise enzimática poderia ser diminuída sensivelmente (HU *et al.*, 2010).

Outro fator que pode ter contribuído para a baixa extensão da lipólise pode ter sido a composição do sistema. É sabido que os tensoativos de baixo peso molecular, como os polisorbatos e spans, podem dificultar a lipólise ao dificultar o acesso da lipase à superfície das partículas (VAN AKEN *et al.*, 2011; HUR *et al.*, 2009; MACGREGOR *et al.*, 1997).

A presença da goma xantana, um polissacarídeo aniônico (no caso das micropartículas lipídicas sólidas contendo triestearina), pode também ter interferido na hidrólise lipídica, mesmo que em uma pequena extensão. Estudos realizados por Hu *et al.* (2010) demonstraram que a porcentagem de ácidos graxos liberados durante o processo de digestão *in vitro* simulada diminuiu quando polissacarídeos aniônicos (alginato ou pectina) foram adicionados ao meio reacional, em concentrações até 0,1% mássica (da mesma ordem de grandeza do presente

estudo). No caso do alginato, esta inibição do processo foi muito mais alta, devido ao seu conhecido poder de ligação com os íons cálcio, mas a presença da pectina também teve um pequeno efeito sobre o processo enzimático. A goma xantana tem uma certa capacidade de ligação com os íons cálcio, (DEBON e TESTER, 2001), o que poderia ter interferido na ação facilitadora da lipólise exercida pelo Ca^{2+} , mesmo estando em concentrações altas.

Portanto, devido aos fatores apresentados, decidiu-se realizar ensaios de digestibilidade *in vitro* dinâmica para avaliar o efeito do modo de adição dos fluidos de digestão simulados sobre a extensão da lipólise das micropartículas lipídicas sólidas contendo óleo de palmiste.

4.8. Digestibilidade *in vitro* dinâmica das micropartículas lipídicas sólidas produzidas com óleo de palmiste

O processo de digestão envolve diversas reações enzimáticas de alta complexidade, por isso os modelos de digestão *in vitro* têm progredido consideravelmente para obter resultados próximos ao real. Por esse motivo, decidiu-se realizar ensaios de digestibilidade *in vitro* dinâmica neste projeto de Mestrado.

Na Figura 4.20 é mostrada a liberação de ácidos graxos durante a digestão *in vitro* dinâmica simulada das micropartículas lipídicas sólidas produzidas com óleo de palmiste e ácido esteárico e na Figura 4.21 os resultados para as micropartículas produzidas com óleo de palmiste e triestearina.

Figura 4.20. Liberação de ácidos graxos livres durante a digestão *in vitro* de micropartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico e óleo de palmiste.

Figura 4.21. Liberação de ácidos graxos livres durante a digestão *in vitro* de micropartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de palmiste.

Na Tabela 4.18 pode ser visto a liberação líquida de ácidos graxos após a digestão *in vitro* simulada para todas as micropartículas lipídicas sólidas produzidas com óleo de palmiste.

Tabela 4.18. Liberação de ácidos graxos livres de micropartículas lipídicas sólidas formuladas com e óleo de palmiste após a digestão *in vitro* dinâmica.

Formulação	Liberação ácidos graxos
30%OP+70%AE	16,9 ± 0,25
50%OP+50%AE	21,0 ± 4,74
70%OP+30%AE	22,1 ± 6,49
90%OP+10%AE	25,1 ± 7,24
30%OP+70%TS	21,9 ± 15,45
50%OP+50%TS	17,2 ± 1,11
70%OP+30%TS	23,1 ± 5,24
90%OP+10%TS	21,7 ± 0,1

A distribuição média de tamanho de partícula pode ser vista na Figura 4.22 e Figura 4.23 para os sistemas microparticulados formulados com ácido esteárico e triestearina, respectivamente.

Figura 4.22. Efeito da digestibilidade *in vitro* dinâmica nos perfis de distribuição de tamanho de partícula acumulado para amostras de micropartículas lipídicas sólidas produzidas com diferentes composições de óleo de palmiste e ácido esteárico: — antes da digestão; — após digestão no estômago; — após digestão intestinal

Pode-se observar que a distribuição média do tamanho das partículas foi alterada durante o processo de digestão. No entanto, cada formulação exibiu um comportamento diferente com respeito ao tamanho de partícula. No caso das micropartículas compostas por óleo de palmiste e ácido esteárico não foi observada uma grande diferença da distribuição das partículas após os tratamentos digestivos simulados, tanto o estomacal, quanto o intestinal. Tal fato pode estar relacionado com a baixa porcentagem de lipólise que ocorreu no sistema, conforme mostrado na Figura 4.20.

Figura 4.23. Efeito da digestibilidade *in vitro* dinâmica nos perfis de distribuição de tamanho de partícula acumulado para amostras de micropartículas lipídicas sólidas produzidas com diferentes composições de óleo de palmiste e triestearina: — antes da digestão; — após digestão no estômago; — após digestão intestinal.

No caso das amostras com triestearina, entretanto, observou-se uma tendência de aumento do diâmetro hidrodinâmico após o ensaio de simulação da digestão duodenal, sugerindo que pode ocorrer um aumento de tamanho das micropartículas lipídicas sólidas após a passagem por tal etapa. Esse fenômeno pode ser explicado pela desestabilização das dispersões, devido às condições gástricas e intestinais as quais as micropartículas foram submetidas, causando a agregação das micropartículas, por coalescência ou floculação, devido a alteração das cargas superficiais (SINGH *et al*, 2009), assim como aconteceu nos ensaios estáticos.

As imagens das micropartículas lipídicas sólidas foram representadas antes e após a digestão *in vitro* e podem ser vistas na Figura 4.24 e Figura 4.25.

Figura 4.24. Micrografias óticas para amostras de micropartículas lipídicas sólidas de diferentes composições de óleo de palmiste e ácido esteárico submetidas a digestão *in vitro* dinâmica simulada.

Figura 4.25. Micrografias óticas para amostras de micropartículas lipídicas sólidas de diferentes composições de óleo de palmiste e triestearina submetidas à digestão *in vitro* dinâmica simulada.

Através das imagens obtidas por microscopia ótica para as micropartículas lipídicas produzidas com ácido esteárico, é possível afirmar que, realmente, houve uma inibição da lipólise, devido à aparente alta concentração de micropartículas praticamente intactas no final do processo de digestão intestinal.

No caso das micropartículas lipídicas produzidas com triestearina, é possível verificar que há uma redução na concentração de partículas lipídicas, e visível alteração da morfologia predominante observada, após a digestão observa-se um aumento do diâmetro médio das mesmas, confirmado pela análise de distribuição e tamanho de partícula mostrado na Figura 4.13. Como ocorreu a lipólise durante o processo, no qual as enzimas digestivas ligam-se ao triacilglicerídeo transformando-o em monoacilglicerídeo, a quantidade de partículas lipídicas foi reduzida.

A diferença entre a extensão da lipólise no caso de micropartículas lipídicas produzidas com ácido esteárico e triestearina está, logicamente, ligado com o fato de no primeiro caso um dos componentes do núcleo lipídico ser um ácido graxo, que não é degradado enzimaticamente pelas lipases. Além do fato de não serem substrato para as enzimas lipolíticas, a sua liberação pode inibir a hidrólise dos triacilgliceróis presentes no óleo de palmiste.

A Figura 4.26 e Figura 4.27 mostram os valores de potencial zeta das amostras no início e ao longo da digestibilidade *in vitro* no estômago e no intestino.

Figura 4.26. Potencial zeta ao longo da digestão *in vitro* dinâmica de micropartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico e óleo de palmiste.

Figura 4.27. Potencial zeta ao longo a digestão *in vitro* dinâmica de micropartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de palmiste.

O potencial zeta foi medido antes da digestão ($t=0$) e nos instantes $t = 2$ horas e $t = 4$ horas, após o tempo de digestão simulando as condições do estômago e intestino. Para todas as amostras, observa-se o mesmo comportamento, no qual potencial zeta diminui após a passagem pelo estômago comparado ao valor inicial, e em seguida após o processo de digestão no intestino o seu valor aumentou, como pode ser visto na Tabela 4.19.

Tabela 4.19. Potencial zeta inicial das micropartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico e óleo de palmiste após a digestão *in vitro* dinâmica.

	90%OP+10%AE	70%OP+30%AE	50%OP+50%AE	30%OP+70%AE
Início	$-63,8 \pm 0,05$	$-66,5 \pm 0,43$	$-51,0 \pm 1,60$	$-43,6 \pm 1,17$
Estômago	$-3,41 \pm 2,59$	$-6,88 \pm 2,19$	$-21,0 \pm 1,39$	$-14,0 \pm 7,32$
Intestino	$-22,7 \pm 9,50$	$-16,2 \pm 1,91$	$-23,9 \pm 17,4$	$-18,5 \pm 12,4$

Observa-se que a carga inicial das partículas é altamente negativa (entre -45 e -65 mV) e durante a digestão ocorrem mudanças na composição interfacial, sendo que a redução do pH do estômago alterou a carga de superfície da emulsão, desestabilizando o sistema.

Durante o processo da digestão ocorre a adição de diversos sais, e no estômago o pH cai por volta de 2,0 e em seguida, após a passagem pelo intestino o pH aumenta e apresenta valores em torno de 7,0. Hsu e Nacu (2003) determinaram que

o potencial zeta é uma função do pH quando a concentração de eletrólitos é de 10^{-3} M. Assim, se o pH é baixo, como no caso do estômago, o potencial zeta é menos negativo, como demonstrado nos resultados experimentais. A diminuição do potencial zeta no intestino também pode ser explicada pelo mesmo fenômeno, pois nessa fase o pH aumenta para 7,0 e o potencial zeta também aumenta, produzindo valores mais negativos. Portanto, é possível afirmar que a digestão *in vitro* alterou a microestrutura do sistema, evidenciada pela análise de potencial zeta.

Os resultados de potencial zeta obtidos para as amostras com triestearina são similares aos resultados obtidos para as micropartículas formuladas com ácido esteárico. O alto desvio padrão observado nas micropartículas formuladas com 50 e 70% de triestearina se deve, provavelmente, à instabilidade do sistema após a digestão.

O mesmo perfil de potencial zeta é observado para as quatro formulações de triestearina com óleo de palmiste, no qual o valor diminui após a passagem pelo estômago comparado ao valor inicial, e em seguida após o processo de digestão no intestino o seu valor aumentou, como pode ser visto na Tabela 4.20.

Tabela 4.20. Potencial zeta das micropartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de palmiste após a digestão *in vitro* dinâmica.

	90%OP+10%TS	70%OP+30%TS	50%OP+50%TS	30%OP+70%TS
Início	-26,0 ± 0,49	-29,2 ± 0,16	-37,5 ± 0,51	-34,0 ± 0,42
Estômago	-17,9 ± 4,09	-7,32 ± 0,33	-10,1 ± 5,89	-6,80 ± 2,30
Intestino	-21,6 ± 2,70	-16,7 ± 3,76	-27,7 ± 27,45	-22,6 ± -14,7

Tal comportamento é descrito na literatura, sendo que o potencial zeta se torna menos negativo após a etapa de digestão estomacal devido às mudanças nas condições do meio reacional (pH e força iônica), sendo os tensoativos originais substituídos por substâncias tensoativas presentes no suco gástrico, e/ou adsorção de espécies carregadas na interface (HUR *et al.*, 2009). Em relação aos valores mais negativos de potencial zeta ao final do processo de digestão duodenal simulada, pode-se supor que os sais de bile e os complexos lipase/colipase podem estar adsorvidos na superfície das partículas lipídicas, tornando-as mais negativas (HUR *et al.*, 2009).

5. CONCLUSÕES

Através dos experimentos realizados neste trabalho de Mestrado, foi possível concluir que a caracterização das misturas lipídicas mostrou-se importante para a escolha da proporção adequada de lipídios para a produção de micropartículas lipídicas sólidas de ácido esteárico e óleo de palmiste, bem como de triestearina e óleo de palmiste.

As análises do equilíbrio hidrofílico-lipofílico foram fundamentais para a determinação da concentração de tensoativos utilizados para a produção das dispersões.

Com relação à caracterização microestrutural das micropartículas lipídicas sólidas produzidas, as análises de DSC e DRX foram eficientes para a determinação da configuração cristalina das partículas, que se mostrou totalmente amorfa, e, portanto, heterogênea. Sendo assim, as dispersões produzidas são, sem dúvidas, altamente adequadas para a encapsulação de bioativos hidrofóbicos.

Todas as micropartículas lipídicas sólidas produzidas foram extremamente estáveis ao longo do período de armazenagem. No caso das dispersões contendo triestearina, a goma xantana foi essencial como espessante para a estabilização desses sistemas.

Já a estabilidade das micropartículas quando submetidas a diferentes condições de *stress* mostraram resultados diferentes para as dispersões produzidas. As micropartículas produzidas com ácido esteárico e óleo de palmiste, de maneira geral, se mostraram menos estáveis do que as micropartículas produzidas com triestearina. As formulações com menores concentrações de ácido esteárico foram mais estáveis. Já as micropartículas produzidas com triestearina foram estáveis ao aquecimento a 75°C, adição de sacarose e baixas concentrações de sal para todas as formulações.

O ensaio de digestibilidade *in vitro* estática não foi eficiente para prever a digestibilidade em termos de hidrólise lipídica para todas as dispersões produzidas. Além disso, as soluções digestivas utilizadas não foram adequadas para os ensaios com as micropartículas lipídicas sólidas testadas.

Com relação à digestibilidade *in vitro* dinâmica ocorreu inibição da lipólise nos ensaios realizados com as micropartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico, evidenciada pelas análises de distribuição média de tamanho, potencial

zeta, quantificação de ácidos graxos livres e microscopia ótica. Houve maior digestibilidade em todas as micropartículas produzidas com triestearina.

De forma geral, neste trabalho de Mestrado, foi possível produzir micropartículas lipídicas sólidas estáveis com óleo de palmiste, que é rico em MCTs e dentre todas as formulações testadas, as micropartículas lipídicas sólidas formuladas com triestearina e óleo de palmiste (90%OP) se mostraram mais adequadas para uma futura aplicação em uma matriz alimentícia.

Outro ponto importante neste trabalho de pesquisa foi o início do estudo da digestibilidade *in vitro* no grupo de pesquisa, sendo, portanto um ponto de partida importante para trabalhos futuros.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nos resultados experimentais obtidos durante este trabalho de Mestrado, apresenta-se a seguir algumas sugestões para trabalhos futuros:

- Incorporar algum bioativo hidrofóbico aos sistemas produzidos e avaliar a sua estabilidade;
- Modificar a metodologia de digestibilidade *in vitro* estática;
- Testar outras soluções digestivas nos ensaios de digestibilidade;
- Incorporar as micropartículas lipídicas sólidas em um sistema alimentício e avaliar a sua estabilidade e digestibilidade.

8. REFERÊNCIAS

ANAL, A. K., SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v.18, p. 240-251, 2007.

ANTONIOSI FILHO, N.R., MENDES, O.L., LANÇAS, F.M. Computer prediction of triacylglycerol composition of vegetable oils by HRCG. **Chromatographia**, v. 40, p.557-562, 1995.

ATTAMA, A. A., SCHICKE, B. C.& MÜLLER-GOYMANN, C.C. Further characterization of theobroma oil–beeswax admixtures as lipid matrices for improved drug delivery systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Londres, v. 64, n.3, p. 294-306, 2006.

ATTAMA, A.A. & MÜLLER-GOYMANN, C.C. A critical study of novel physically structured lipid matrices composed of homolipid from *Capra hircus* and theobroma oil. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsteden, v. 322, p. 67-78, 2006.

ATTAMA, A.A.; MÜLLER-GOYMANN, C.C. Effect of beeswax modification on the lipid matrix and solid lipid nanoparticle crystallinity. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 315, p. 189-195, 2008.

AWAD, T.; SATO, K. Acceleration of crystallisation of palm kernel oil in oil-in-water emulsion by hydrophobic emulsifier additives. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v.25, p. 45–53, 2002.

BARBOSA, C. M. S.; MORAES, H. A.; DELVIVO, F. M.; MANSUR, H. S.; OLIVEIRA, M. C.; SILVESTRE, M. P. C. Papain hydrolysates of casein: molecular weight profile and encapsulation in lipospheres. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Londres, v.84, p. 1891-1900, 2004.

BONNAIRE, L.; SANDRA, S.; HELGASON, T.; DECKER, E.A.; McCLEMENTS, D.J. Influence of lipid physical state on the in vitro digestibility of emulsified lipids. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 56, p. 3791-3797, 2008.

BOODE, K.; WALSTRA, P.; de GROOT-MOSTERT, A.E.A. Partial coalescence in oil-in-water emulsions. 2. Influence of the properties of the fat. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam v. 81, p. 139-151, 1993.

BRASILEIRO, J. S. L. **Microencapsulação de compostos bioativos: inovação em diferentes áreas**. 2011. 76 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2011.

BRODY, T. **Nutritional Biochemistry**. 2ª ed, San Diego: Academic Press, 1999.

BUNJES, H.; SIEKMANN, B. **Manufacture, Characterization, and applications of solid lipid nanoparticles as drug delivery systems**. In: BENITA, S.

Microencapsulation. Methods and industrial applications. Pinehurst: Taylor & Francis Group, 2006. Cap 8, p. 213-267.

BUNGES, 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.

CALVO, P.; CASTAÑO, A. L.; LOZANO, M.; GONZÁLES-GÓMES, D. Influence of the microencapsulation on the quality parameters and shelf-life of extra-virgin olive oil encapsulated in the presence of BHT and different capsule wall components. **Food Research International**. Amsterdam, v. 45, p. 256–261, 2012.

CHEN, C. W.; CHONG, C.L.; GHAZALI, H.M.; LAI, O. M. Interpretation of triacylglycerol profiles of palm oil, palm kernel oil and their binary blends. **Food Chemistry**, Oxford, v.100, p.178-191, 2007.

CHU, B.S.; GHAZALI, H.M; LAI, O. M.; CHE MAN, Y. B.; YUSOF, S.; YUSOFF, M. S. A. Performance of a lipase-catalyzed transesterified palm kernel olein and palm stearin blend in frying banana chips. **Food Chemistry**, Oxford, v. 74, p.21-33, 2001.

CLARK, J. P. Food encapsulation: capturing one substance by another. **Food Technology**, Chicago, v.56, n.11, p.63-65, 2002.

CORNELIUS, J. A. Palm Oil and Palm Kernel Oil. **Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids**, Oxford, v. 15, p. 5-27, 1977.

DALPIAZ, A., MEZZENA, M., SCATTURIN, A., SCALIA, S. Solid lipid Microparticles for the stability enhancement of the polar drug *N*6-cyclopentyladenosine. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 355, p. 81–86, 2008.

DAZ, S., KIONG NG, W., KANAUIA, P., KIM, S., TAN, R. B. H. Formulation design, preparation and physicochemical characterizations of solid lipid nanoparticles containing a hydrophobic drug: Effects of process variables. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 88, p. 483– 489, 2011.

DEBON, S.J.J., TESTER, R.F. In vitro binding of calcium, iron and zinc by non-starch polysaccharides. **Food Chemistry**, Oxford, v.73, p.401-410, 2001.

DESAI, K.G.H.; PARK, J.H. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, Nova Iorque, v. 23, p. 1361–1394, 2005.

DICKINSON, E. Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.23, p. 1473-1482, 2009.

FRASCARELI, E. C.; SILVA, V. M.; TONON, R. V.; HUBINGER, M. D. Effect of process conditions on the microencapsulation of coffee oil by spray drying. **Food and bioproducts processing**, Dorchester, v.90, p. 413-424, 2012.

GOLDING, M. e WOOSTER, T. J. The influence of emulsion structure and stability on lipid digestion. **Current opinion in Colloid & Interface Science**, Amsterdam, v.15, p. 90-101, 2011.

GOMES, G. V. L. **Produção e caracterização microestrutural de sistemas lipídicos sólidos micro e nanoparticulados utilizados na encapsulação do beta-caroteno**. 2011. 121 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2011.

GRASSI, G.; LAPASIN, R.; GRASSI, M.; COLOMBO, I. **Understanding drug release and absorption mechanisms**. Boca Raton: CRC Press, 2006.

GRIFFIN, W.C. Classification of surface active agents by HLB. **Journal of the Society of Cosmetic and Chemistry**, Pontiac, v.1, p. 311-326, 1949.

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**, Londres, v. 58, p. 917–925, 2006.

HAYATI, I. N.; MAN, Y. B. C.; TAN, C. P. AINI, I. N. Stability and rheology of concentrated O/W emulsions based on soybean oil/palm kernel olein blends. **Food Research Internatinal**, Amsterdam, v. 40, p. 1051-1061, 2007.

HELGASON, T., AWAD, T. S., KRISTBERGSSON, K., DECKER, E. A., McCLEMENTS, D. J, WEISS, J. Impact of Surfactant Properties on Oxidative Stability of β -Carotene Encapsulated within Solid Lipid Nanoparticles. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, Easton, PA v. 57, p. 8033–8040, 2009.

HIMAWAN, C.; STAROV, V. M.; STAPLEY, A. G. F. Thermodynamic and kinetic aspects of fat crystallization. **Advances in Colloids and Interface Science**, Amsterdam, v.122, p. 3-33, 2006.

HSU, J-P, NACU, A. Behavior of soybean oil-in-water emulsion stabilized by nonionic surfactant. **Journal of Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 259, p. 374-381, 2003.

HU, M.; LI, Y.; DECKER, E. D.; McCLEMENTS, D. J. Role of calcium and calcium-binding agents on the lipase digestibility of emulsified lipids using an *in vitro* digestion model. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 24, p. 719-725, 2010.

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 Chemitry**, Oxford, v. 114, p. 253-262, 2009.

ICI Americas, Inc. **The HLB System**. Wilmington, EUA, 1980.

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 delivery systems**. In: WASAN, K. M. Role of lipid excipients in modifying oral and parenteral drug delivery. Weinheim: Wiley, 2007. Cap 2, p. 32-47.

JIN, Q.; ZHANG, T.; SHAN, L.; YUANFA, L.; WANG, X. Melting and Solidification Properties of Palm Kernel Oil, Tallow, and Palm Olein Blends in the Preparation of Shortening. **Journal American oil chemistry society**. Atlantic, v. 85, p. 23-28, 2008.

KANECO, F.; TASHIRO, K.; KOBAYASHI, M. Polymorphic transformations during crystallization processes of fatty acids studied with FT-IR spectroscopy. **Journal of Crystal Growth**, Amsterdam, v.198/199, p. 1352-1359, 1999.

KIM, B.D.; NA, K.; CHOI, H. K. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles (SLN) made of cacao butter and curdlan. **European Journal of pharmaceutical sciences**, Londres, v.24, p. 199-205, 2005.

KONG, F.; SINGH, R.P. Disintegration of solid foods in human stomach. **Journal of Food Science**, Easton, v.73, p. 67-80, 2008.

KRALOVEC, J. A.; ZHANG, S.; ZHANG, W.; BARROW, C. J. A review of the progress in enzymatic concentration and microencapsulation of omega-3 rich oil from fish and microbial sources. **Food Chemistry**, Oxford, v. 131, p. 639-644, 2012.

KRSTONOSIC, V., DOKIC, L., DOKIC, P., DAPCEVIC, T. Effects of xanthan gum on physicochemical properties and stability of corn oil-in-water emulsions stabilized by polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 23, p. 2212-2218, 2009.

LI, Y., HU, M., McCLEMENTS, D. J. Factors affecting lipase digestibility of emulsified lipids using an *in vitro* digestion model: Proposal for a standardised pH-stat method. **Food Chemistry**. Oxford, v.126, p. 498-505, 2011.

LIN, M. T.; YEH, S. L.; KUO, M. L. LIAW, K. Y.; LEE, P. H.; CHANG, K. J.; CHEN, W. J. Effects of medium-chain triglyceride in parenteral nutrition on rats undergoing gastrectomy. **Clinical Nutrition**, Amsterdam, v. 21, p. 39-43, 2002.

LIU, K.; XU, Y.; WANG, X. Microencapsulation of sweet orange oil terpeneless using the orifice method. **Journal of Food Engineering**, Essex, v.110, p. 390-394, 2012.

LOWE, M.E. The triglyceride lipases of the -pancreas. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 43, p. 2007-2016, 2002.

MACGREGOR, K. J., EMBLETON, J. K., LACY, J. E., PERRY, E. A., SOLOMON, L. J., SEAGER, H., POUTON, C. W. Influence of lipolysis on drug absorption from the gastro-intestinal tract. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 25, p. 33-46, 1997.

MARTEN, B.; PFEUFFER, M.; SCHREZENMEIER, J. Medium-chain triglycerides. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 16, p. 1374-1382, 2006.

MATSUO, T.; MATSUO, M.; TAGUCHI, N.; TAKEUCHI, H. The thermic effect is greater for structured medium- and long-chain triacylglycerols versus long-chain triacylglycerols in healthy young women. **Metabolism**, Nova Iorque, v. 50, p. 125-130, 2001.

MCCLEMENTS D.J. **Food emulsions: principles, practice, and techniques**. Washington: CRC Press, 2005.

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

MCCLEMENTS, D.J.; DECKER, E.A.; PARK, Y. Controlling Lipid Bioavailability through Physicochemical and Structural Approaches. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.49, p. 48–67, 2009.

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. Crystals and crystallization in oil-in-water emulsions: Implications for emulsion-based delivery systems. **Advances in colloid and interface science** , Amsterdam, v. 174, p. 1-30, 2012.

MEHNERT, W. e MADER, K. Solid lipid nanoparticles Production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 47 , p. 165–196, 2001.

MORENO, E., CORDOBILLA, R., CALVET, T., CUEVAS-DIARTE, M.A., GBABODE, G., NEGRIER, P., MONDIEIG, D. & OONK, H.A.J. Polymorphism of even saturated carboxylic acids from n-decanoic to n-eicosanoic acid. **New Journal of Chemistry**, Paris, v. 31, n. 6, p. 947-957, 2007.

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**, Londres, v.50, p. 161-177, 2000.

MÜLLER, R.H.; RADTKE, M.; WISSING, S.A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 54, n. 1, p. S131-S155, 2002.

MUN, S., DECKER, E. A., PARK, Y., WEISS, J., MCCLEMENTS, D. J. Influence of interfacial composition on *in vitro* digestibility of emulsified lipids: potential mechanism for chitosan's ability to inhibit fat digestion. **Food Biophysics**, Nova Iorque, v.1, p. 21-29, 2006.

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**, Amsterdam, v. 40, p. 770-781, 2007.

NAGAO, K. e YANAGITA, T. Medium-chain fatty acids: Functional lipids for the prevention and treatment of the metabolic syndrome. **Pharmacological Research**. Amsterdam, v.61, p. 208-212, 2010.

NAZARRO, F., ORLANDO, P., FRATIANI, F., COPPOLA, R. Microencapsulation in food science and biotechnology. **Current opinion in biotechnology**, Amsterdam, v.23, p.1-5, 2011.

NESTERENKO, A., ALRIC, I., SILVESTRE, F., DURRIEU, V. Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v.42 , p. 469– 479, 2013.

NIK, A. M., WRIGHT, A. J., CORREDIG, M. Impact of interfacial composition on emulsion digestion and rate of lipid hydrolysis using different *in vitro* digestion models. **Colloids and Surfaces: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 83, p. 321-330, 2011.

PERRECHIL, F.A. **Produção de microgéis para encapsulação de compostos hidrofóbicos**. 2012. 167 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, 2012.

PINSIRODOM, P.; PARKIN, K. L. **Lipase assays**. In: Handbook of Food Analytical Chemistry; Wrolstad, R. E., Ed.; Wiley: Hoboken, p. 371–383, 2005.

QIAN,C.; DECKER, E. A.; XIAO, H.; McCLEMENTS, D. J. Physical and chemical stability of b-carotene-enriched nanoemulsions: Influence of pH, ionic strength, temperature, and emulsifier type (in press). **Food Chemistry**, Oxford, 2011.

RABARON, A., CAVÉ, G., PUISIEUX, F., SEILLER, M. Physical methods for measurement of the HLB of ether and ester non-ionic surface-active agents: H-NMR and dielectric Constant. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 99, p. 29-36, 1993.

RÉ, M. I. Microencapsulação- em busca de pontos ‘inteligentes’. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v.27, p. 1195-1235, 1998.

RÉ, M. I.; SANTANA, M. H. A.; d’ÁVILA, M. A. **Encapsulation Technologies for modifying food performance**. In: Innovation in Food Engineering: New Techniques and Products. Taylor & Francis group, 2010. Cap 7, p. 223- 275.

REIS, P. M.; RAAB, T. W.; CHUAT, J. Y.; LESER, M. E.; MILLER, R.; WATZKE, H. J.; HOLMBERG, K. Influence of surfactants on lipase fat digestion in a model gastro-intestinal system. **Food Biophysics** , Nova Iorque, v.3, p. 370-381, 2008.

RODRIGUEZ-SPONG, B., PRICE, C.P.; JAYASANKAR, A., MATZGER, A.J.,

RODRIGUEZ-HORNEDO, N. General principles of pharmaceutical solid polymorphism: a supramolecular perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 56, p. 241-274, 2001.

SAYANTAN, S., PALLAB, G. Coalescence of bubbles and stability of foams in aqueous solutions of Tween surfactants. **Chemical Engineering Research and Design**, Amsterdam, v.89, p. 2344-2355, 2011.

SANGUANSRI, L. e AUGUSTIN, M. A. **Microencapsulation and delivery of omega-3 fatty acids**. In: SHI, J. Functional Food Ingredients and Nutraceuticals. Taylor & Francis group, 2007. Cap 12, p. 297- 327.

SEVERINO, P., PINHO, S.C., SOUTO, E.B & SANTANA, M.H.A. Polymorphism, crystallinity and hydrophilic-hydrophobic balance of stearic acid and stearic acid-capric/caprylic triglyceride matrices for production of stable nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 86, n.1, p. 125-130, 2011.

SIEW, W. L. Crystallisation and melting behaviour of palm kernel oil and related products by differential scanning calorimetry. **European Journal Lipid Science Technology**. Weinheim, v.103, p. 729-743, 2001.

SHAHIDI, F. **Nutraceutical and specialty lipids and their co-products**. Londres: Taylor & Francis Group. Cap 2, p. 27-47, 2006.

SOCHA, P.; KOLETZKO, B.; DEMMELMAIR, H.; JANKOWSKA, I.; STAJNIAK, A.; BEDNARSKA-MAKARUK, M.; SOCHA, J. Short-term effects of parenteral nutrition of cholestatic infants with lipid emulsions based on medium-chain and long-chain triacylglycerols. **Nutrition**. Amsterdam, v.23, p. 121-126, 2007.

St-ONGE, M. P.; BOSARGE, A. Weight-loss diet that includes consumption of medium-chain triacylglycerol oil leads to a greater rate of weight and fat mass loss than does olive oil. **American Journal of Clinical Nutrition**, Houston, v.87, p. 621-626, 2008.

St-ONGE, M. P.; ROSS, R.; PARSONS, W. D.; JONES, P. J. H. Medium-chain triglycerides increase energy expenditure and decrease adiposity in overweight men. **Obesity Research**, Atlanta, v. 11, p. 395-402, 2003.

SUN, C., GUNASEKARAN, S., RICHARDS, M. P. Effect of xanthan gum on physicochemical properties of whey protein isolate stabilized oil-in-water emulsions. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.21, p. 555-564, 2007.

TADROS, T. **Emulsion science and technology**. Wiley-VCH, Londres, 2009.

TAN, C. P., CHE MAN, Y. B. Differential scanning calorimetry analyses of edible oils: Comparison of thermal properties and chemical composition. **Journal of the American Oil Chemists Society**. Atlanta, v.77, p. 143-155, 2000.

TANAKA, M.; SAITO, H.; ARIMOTO, I.; NAKANO, M. & HANDA, T. 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 by a nonionic surfactant. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, PA, v. 54, p. 3591-3597, 2006.

THARAKAN, A.; NORTON, I.T.; FRYER, P.J.; BAKALIS, S. Mass transfer and nutrient absorption in a simulated model of small intestine . **Journal of Food Science**, Easton, v. 75, n. 6, p. 339-346, 2010.

TEIXEIRA, A.C.T., GARCIA, A.R., ILHARCO, L.M., GONÇALVES DA SILVA, A.M.P.S. & FERNANDES, A.C. Phase behaviour of oleanolic acid, pure and mixed with stearic acid: interactions and crystallinity. **Chemistry and Physics of Lipids**, Limerick, v. 163, n. 7, p. 655-666, 2010.

TIMMS, R.E. Phase behaviour of fats and their mixtures. **Progress in Lipid Research**, Amsterdam, v. 23, n. 1, p. 1-34, 1984.

TIPVARAKARNKOON, T.; EINHORN-STOLL, U.; SENGE, B. Effect of modified Acacia gum (SUPER GUM TM) on the stabilization of coconut o/w emulsions. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 24, p. 595-601, 2010.

VAN AKEN, G. A. Relating Food Emulsion Structure and Composition to the Way It Is Processed in the Gastrointestinal Tract and Physiological Responses: What Are the Opportunities?. **Food Biophysics**, Nova Iorque, 2011.

VENEMA, K.; HAVENNAR, R.; MINEKUS, M. **Improving in vitro simulation of the stomach and intestines**. In: McCLEMENTS, D.J.; DECKER, E.A. (Eds). Designing functional foods: measuring and controlling food structure breakdown and nutrient absorption. Boca Raton: CRC Press, p. 314-339, 2009.

WEISS, J.; DECKER, E. A.; McCLEMENTS, D. J.; KRISTBERGSSON, K.; HELGASON, T.; AWAD, T. Solid Lipid Nanoparticles as Delivery Systems for Bioactive Food Components. **Food Biophysics**, Nova Iorque, v.3, p. 146-154, 2008.

WICKHAM, M.; FAULKS, R.; MILLS, C. In vitro digestion methods for assessing the effect of food structure on allergen breakdown. **Molecular Nutrition & Food Research**, Nova Iorque, v.53, p. 952-958, 2009.

ZHUANG, C.Y.; LI, N.; WANG, M.; ZHANG, X.N.; PAN, W.S.; PENG, J.J.; PAN, Y.S.; TANG, X. 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.

ANEXO A

Laudo do óleo de palmiste refinado

LAUDO DE QUALIDADE		Palmiste	PK RBD
	ÓLEO DE PALMISTE REFINADO		Lote	46/10
			Data	11/10/2010
			Laudo	190/10

Cliente: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo.

Data de Fabricação: 10/11/2010.

Prazo de Validade: 12 meses após fabricação.

Aditivos: Isento.

Características:

Físico Químicas (AOCS)					
Atributos	Resultados	Limites	Atributos	Resultados	Limites
Acidez (% Láurico)	0,013	≤ 0,05	SFC à 10 °C	65,66	66 ± 4
I. Peróxidos (mEq/kg)	0,094	≤ 1,0	SFC à 20 °C	38,65	40 ± 4
Cor Lovibond Red 5 ¼	1,0	≤ 2,0	SFC à 25 °C	15,07	17 ± 2
Ponto de Fusão (°C)	27,5	28 ± 2	SFC à 30 °C	0	0 - 1
Índice de Iodo (wijs)	18,56	16 - 21	SFC à 35 °C	-	-
Sabor	Neutro	Neutro	SFC à 40 °C	-	-
			SFC à 45 °C	-	-

Responsável

Escritório: Al. Santos, 466 – 10º Andar – Cerqueira César – CEP 01418 – 000 Fone: 011 – 3175 – 5465 São Paulo – SP E-mail: panorama@agropalma.com.br
 Fábrica: Rua Arthur Bernardes, 9595 – Tapandí – CEP 66825 – 000 Fone 081 – 4009 – 8000 – Belém – Pa – E-mail: tecnico@agropalma.com.br

ANEXO B

Descrição técnica da goma xantana

DESCRIÇÃO DE PRODUTO - PD 208488-7.6PT

Código do material A45100

GRINDSTED® Xanthan 80

Descrição

GRINDSTED® Xanthan 80 é uma goma xantana granulada de grau alimentício que é particularmente usada como espessante e estabilizante. O tamanho da partícula é de 80 mesh e assegura um grau rápido de hidratação, fácil manipulação e aplicação em produções normais de alimentos.

Áreas de aplicação

É uma goma solúvel a frio e apresenta sinergia com goma guar e goma jatai.

Benefícios potenciais

- Agente de suspensão para sólidos e gotas de azeite
- Emulsão efetiva e estabilização da espuma
- Alta viscosidade em baixas concentrações com comportamento pseudoplástico (diluição)
- Efeito anti-sinérise
- Ausência de tixotropia
- Estável tanto em soluções ácidas como alcalinas
- Altamente resistente a temperatura
- Compatível com soluções que contêm altas concentrações de vários sais.

Dosagens

As seguintes diretrizes gerais podem ser dadas:

Molhos para salada	0,15 - 0,50 %
Mistura para bolos	0,05 - 0,25 %
Molhos	0,10 - 0,30 %
Relish	0,10 - 0,25 %
Recheios de fruta	0,03 - 0,15 %
Bebidas de frutas	0,05 - 0,15 %
Molho "cole slaw"	0,15 - 0,25 %
Sopas instantâneas (secas)	0,30 - 0,50 %

Instruções de uso

Formulações específicas e informações sobre o processamento podem ser obtidas se requisitadas.

Especificações físico-químicas

(Métodos de análise disponíveis se requisitados)

Cor	Creamy - white
Umidade	6 - 12 %
pH (solução 1%)	6,0 - 8,0
Tamanho de partícula	min. 95 % passa através de 180 µm (mesh 80)
Tamanho de partícula	min. 99,5 % passa através de 250 µm (mesh 60)
Viscosidade	1.200 - 1.600 mPa's
24°C, 1% KCl (Brookfield LVT, 60 rpm, spindle 3)	

Especificações microbiológicas

Contagem total em placa	máx. 2.000 UFC/g
Bactérias e leveduras	100 UFC/g
Salmonela	ausente em 25 g
E. coli	ausente em 5 g

Especificações de metais pesados

Metais pesados (como Pb)	máx. 20 mg/Kg
Chumbo (Pb)	máx. 2 mg/Kg
Ársenico (As)	máx. 1 mg/Kg

DESCRIÇÃO DE PRODUTO - PD 208488-7.6PT

Código do material A45100

GRINDSTED® Xanthan 80

Dados nutricionais

(Valores aproximados para rotulagem nutricional por 100g)

Energia (kcal)	176
Proteína	0 g
Carboidrato	0 g
- dos quais açúcares	0 g
Gordura	0 g
- das quais saturadas	0 g
Fibra	76 g
Sódio	4 g

(Calculado de acordo com os regulamentos atuais de NLEA)

Estocagem

Armazenar em local fresco e seco.

A validade é de 24 meses a partir da data de fabricação.

Embalagem

Caixas multi-camada de 25 kg (55,1 lbs.)

Pureza e legislação

GRINDSTED® Xanthan 80 está em conformidade com as edições atuais do Food Chemical Codex, FAO/WHO e EU e está coberto pela referência INS 415 e CFR 172.695.

Legislação local em relação ao status do produto deve ser sempre consultada, já que pode haver variações em relação ao uso em alimento dependendo do país. Direcionamento quanto ao status legal deste produto pode ser obtido caso requisitado.

Segurança e manuseio

Uma Ficha de Segurança de Produto Químico (FISPQ) pode ser obtida caso requisitada.

País de origem

França

Status Kosher

Esse produto possui o certificado Kosher. Um Certificado Kosher está disponível sob solicitação.

Status Halal

Este produto é certificado Halal, um certificado Halal está disponível quando requisitado.

Status GMO

De acordo com os regulamentos da CE Nos: 1829/2003 e 1830/2003, os microorganismos utilizados na produção de GRINDSTED® Xanthan 80 são desenvolvidos pela técnica tradicional não-GM. Substratos e veículos são produzidos a partir de fonte denominada Identidade Preservada. GRINDSTED® Xanthan 80 é grau IP.