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

GRAZIELA VEIGA DE LARA GOMES

“Produção e caracterização microestrutural de sistemas lipídicos sólidos micro
e nanoparticulados utilizados na encapsulação de beta-caroteno”

Pirassununga

2011

Graziela Veiga de Lara Gomes

“Produção e caracterização microestrutural de sistemas lipídicos sólidos micro e nanoparticulados utilizados na encapsulação de beta-caroteno”

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

Área de concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

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

Versão corrigida

Pirassununga

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

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

G633p Gomes, Graziela Veiga de Lara
Produção e caracterização microestrutural de sistemas lipídicos sólidos micro e nanoparticulados utilizados na encapsulação de beta-caroteno / Graziela Veiga de Lara
Gomes. -- Pirassununga, 2011.
100 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. Encapsulação 2. Bioativo 3. Estabilidade
4. Microestrutura 5. Lipídios. I. Título.

Folha de aprovação

Gomes, G.V.L.. Produção e caracterização microestrutural de sistemas lipídicos sólidos micro e nanoparticulado utilizados na encapsulação de beta-caroteno. 99 f. Dissertação de (Mestrado). Pirassununga: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, USP, 2011.

Pirassununga, ____/____/____.

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a Samantha Cristina de Pinho

(Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/ USP)

(Orientadora)

Prof^a Dr^a Carmen Sílvia Fávaro Trindade

(Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/ USP)

(Membro)

Prof^a. Titular Maria Helena Andrade Santana

(Faculdade de Engenharia Química/ Unicamp)

(Membro)

*“Toda a nossa ciência,
comparada com a realidade, é primitiva
e infantil – e, no entanto, é a coisa mais
preciosa que temos.” Albert Einstein*

*“Valeu a pena? Tudo vale a pena
se a alma não é pequena. Quem
quer passar além do bojador tem
que passar além da dor.”
Fernando Pessoa*

*Aos meus pais, **Sandra e Orlando**, que com muito amor me ensinaram, me conduziram, e sempre estiveram prontos a me apoiar em todas as circunstâncias, me incentivando a seguir sempre em frente. Vocês são essenciais na minha vida. Obrigada por tudo, amo vocês*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela constante proteção, por sempre estar ao meu lado provendo todo o necessário, e por me permitir chegar até aqui.

À Prof^a Samantha Pinho, pela orientação, pelo tempo disponibilizado a este trabalho de mestrado, pelo grande exemplo profissional, e pela paciência.

Aos meus irmãos, Felipe e Marina, pelo companheirismo e amizade de todos os anos, e pelos momentos de felicidades compartilhados. Amo vocês.

Ao Rafael Rochetti (Rafa), pelos momentos de companheirismo, paciência, dedicação, compreensão, carinho e pelo apoio incondicional, inclusive nas horas de desânimo; e a toda a sua família, que sempre estiveram dispostos a me amparar (e Nina, obrigada pela ajuda na formatação....).

À Ednelí Soraya Monterrey-Quintero pelas inúmeras análises de colorimetria instrumental e de distribuição de tamanho, e por sua alegria contagiante em todas as circunstâncias.

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

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

À Prof^a. Maria Helena Andrada Santana por disponibilizar seu laboratório e o homogeneizador à alta pressão, de extrema importância para o trabalho em questão.

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

A todos do laboratório de Colóides e Funcionalidade de Macromoléculas, em especial às alunas de graduação Thaís Ribeiro Borrin e Izabella Simplício, pela ajuda nas análises de laboratório, sem vocês muitos resultados não teriam sido possíveis.

À eterna companheira Ellen Merely do Espírito Santo, que mesmo distante sempre se faz presente (alguns momentos ficarão marcados pra sempre em nossa memória!)

Aos amigos Tiago, Aline, Telma e Luana. A distância nunca será capaz de apagar nossa amizade, vocês sempre foram e serão especiais.

A todos os colegas e amigos da pós-graduação, em especial à Cris, que incentivou desde o início a minha vinda para esta instituição, a Eli, pelas risadas e pelo incentivo nas horas de dificuldade, a Dani e Noemi, pelas conversas e companheirismo nas viagens.

A todo o pessoal do vôlei, que permitiram muitos momentos de descontração e estimularam a prática de atividade física ao longo deste período.

Às minhas companheiras de república, por me acolherem desde o início. Maira (Mad), obrigada pela companhia nesses últimos dias.

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

Aos amigos de Hortolândia, Itapetininga, Sorocaba e Guarapuava que mesmo longe, foram tão essenciais.

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

Ao CNPq pelo financiamento do projeto (Processo 475786/2008-4, Edital Universal 2008) e à FAPESP pela concessão da bolsa de estudos (Processo 2009/02028-4).

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1	Micro e nanoencapsulação em alimentos.....	3
2.2	Microencapsulação de bioativos hidrofóbicos em sistemas lipídicos: processos e biodisponibilidade	5
2.2.1	Processos de produção de micro e nanopartículas lipídicas.....	5
2.2.2	Aspectos que influenciam na biodisponibilidade de bioativos hidrofóbicos	7
2.2.3	Partículas lipídicas sólidas	9
2.3	Carotenóides: estrutura e microencapsulação	15
3	OBJETIVOS.....	21
4	MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1	MATERIAIS E PROPRIEDADES	22
4.1.1	Quantificação dos carotenóides.....	24
4.2	MÉTODOS.....	24
4.2.1	Preparação e caracterização das misturas lipídicas	24
4.2.2	Determinação do valor do equilíbrio hidrofílico-lipofílico (HLB) dos lipídios	25
4.2.3	Produção das micropartículas lipídicas sólidas (MLS)	27
4.2.4	Produção das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS)	29
4.2.5	Caracterização microestrutural e avaliação da estabilidade das partículas lipídicas sólidas	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	34

5.1	DETERMINAÇÃO DO VALOR DO EQUILÍBRIO HIDROFÍLICO LIPOFÍLICO (HLB) DOS LIPÍDIOS	34
5.2	CARACTERIZAÇÃO DAS MISTURAS LIPÍDICAS	37
5.2.1	Misturas de ácido esteárico e óleo de girassol	37
5.2.2	Misturas de triestearina e óleo de girassol	43
5.3	AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE E MICROESTRUTURA DAS MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS	48
5.3.1	Micropartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico.....	48
5.3.2	Micropartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina.....	60
5.4	AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE E MICROESTRUTURA DAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS.....	71
5.4.1	Nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico.....	71
5.4.2	Nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina.....	80
6	CONCLUSÕES.....	90
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	92
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

FIGURAS

Figura 2.1: Homogeneizador panda 2K, NS1001L, Niro Soavi, Itália.....	6
Figura 2.2: Exemplos de diferentes tipos de partículas que podem ser produzidas para encapsulação de ativos hidrofóbicos	8
Figura 2.3: Esquema simplificado de uma nanopartícula lipídica sólida.	10
Figura 2.4:Diferenças entre a estrutura cristalina perfeita das SLN e a estrutura com imperfeições dos NLC.	11
Figura 2.5: Modelos de incorporação de compostos ativos em SLN: (a) matriz homogênea; (b) parede enriquecida e (c) núcleo enriquecido.	11
Figura 2.6: Modelos de incorporação de compostos ativos em NLC.	12
Figura 2.7: Esquema dos dois métodos de preparação de SLN/NLC por HAP: (a) a quente; (b) a frio.	14
Figura 2.8: Estrutura dos carotenóides licopeno, β -caroteno, luteína, zeaxantina e β -criptoxantina.	17
Figura 5.1: Difrátogramas de raios-X de misturas de lipídios contendo ácido esteárico e óleo de girassol.	37
Figura 5.2: Termograma obtido para o ácido esteárico puro	39
Figura 5.4: Termograma obtido para a mistura contendo 70% AE + 30% OG.....	40
Figura 5.3: Termograma obtido para a mistura contendo 90% AE + 10% OG.....	39
Figura 5.5: Espectro de FT-IR das amostras de misturas de lipídios contendo ácido esteárico, em comparação com os as matérias-primas puras empregadas.	41
Figura 5.6: Bandas presentes no espectro de FT-IR indicativas da presença da poliforma E do ácido esteárico.	43
Figura 5.7: Difrátograma de raios-X das misturas de triestearina e óleo de girassol.	44
Figura 5.8: Termograma obtido por DSC para triestearina pura.....	46
Figura 5.9: Termograma obtido por DSC para mistura lipídica 90% TS + 10% OG.	46
Figura 5.10: Termograma obtido por DSC para mistura lipídica 70% TS + 30% OG.	47

Figura 5.11: Aspecto das formulações das micropartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico (MLS-AE, 6% e 4% de lipídio total).	48
Figura 5.12: Perfis de distribuição de tamanho de partícula para as MLS-AE contendo 6% de lipídio total e tocoferol, ao longo do tempo de armazenagem (7 meses). .	49
Figura 5.13: Perfis de distribuição de tamanho de partícula para as MLS-AE contendo 4% de lipídio total e tocoferol, ao longo do tempo de armazenagem (7 meses). .	49
Figura 5.14: Perfis de distribuição de tamanho de partícula para as MLS-AE contendo 6% de lipídio total, sem tocoferol, ao longo do tempo de armazenagem (6 meses).	50
Figura 5.15: Perfis de distribuição de tamanho de partícula para as MLS-AE contendo 4% de lipídio total, sem tocoferol, ao longo do tempo de armazenagem (6 meses).	50
Figura 5.16: Perfis temporais de degradação do beta-caroteno nas MLS-AE contendo tocoferol: (a) em termos de concentração (em mg/L de dispersão); (b) em termos de % de beta-caroteno preservado.	52
Figura 5.17: Perfil temporal de degradação do beta-caroteno encapsulado, em termos da razão mg beta-caroteno/g lipídio total.	53
Figura 5.18: Perfis temporais de degradação do beta-caroteno nas MLS-AE sem tocoferol: (a) em termos de concentração (em mg/L); (b) em termos de % de beta-caroteno preservado (em relação à concentração de beta-caroteno na amostra no dia inicial).	54
Figura 5.19: (a) MLS-AE-6 após 75 dias de armazenagem; (b) MLS-AE-4 após 75 dias de armazenagem; (c) MLS-AE-6sT 45 dias de armazenagem; (d) M) MLS-AE-4sT após 45 dias de armazenagem.	55
Figura 5.20: Difractogramas de raios-X das micropartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico e óleo de girassol, contendo tocoferol: (a) MLS-AE-6; (b) MLS-AE-4	55
Figura 5.21: Termogramas obtidos por DSC para as micropartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico e óleo de girassol, com 4 e 6% de lipídio total (MLS-AE-4 e MLS-AE-6).	58

Figura 5.22: Termogramas obtidos por DSC para as micropartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico e óleo de girassol, com 4 e 6% de lipídio total, sem tocoferol (MLS-AE-4sT e MLS-AE-6sT).....	59
Figura 5.23: Aspecto das formulações de micropartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina (MLS-TS-PS60, 6% e 4% de lipídio total).	61
Figura 5.24 Perfis de distribuição de tamanho de partícula para as MLS-TS-PS60-6 ao longo do tempo de armazenagem (5 meses).....	61
Figura 5.25: Perfis de distribuição de tamanho de partícula para as MLS-TS-PS60-4 ao longo do tempo de armazenagem (6 meses).....	62
Figura 5.26: Perfis de distribuição de tamanho de partícula para as MLS-TS-PS20 ao longo do tempo de armazenagem (57 dias).	62
Figura 5.27: Estabilidade temporal do beta-caroteno encapsulado nas micropartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de girassol (MLS-TS-PS60), medida por colorimetria instrumental: (a) parâmetros a^* e b^* ; (b) parâmetro L^* . ..	63
Figura 5.28: Estabilidade temporal do beta-caroteno encapsulado nas micropartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de girassol (MLS-TS-PS60) mostrada através dos parâmetros: (a) croma (C^*_{ab}); (b) ângulo de Hue (h^*_{ab}).	64
Figura 5.29: Estabilidade temporal do beta-caroteno encapsulado nas micropartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de girassol (MLS-TS-PS20), medida por colorimetria instrumental: (a) parâmetros a^* e b^* ; (b) parâmetro L^* . ..	65
Figura 5.30: Estabilidade temporal do beta-caroteno encapsulado nas micropartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de girassol (MLS-TS-PS20) mostrada através dos parâmetros: (a) croma (C^*_{ab}); (b) ângulo de Hue (h^*_{ab}); (c) diferença de cor (ΔE^*_{ab}).	65
Figura 5.31: Termogramas obtidos por DSC para as micropartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de girassol, com 4 e 6% de lipídio total (MLS-TS-PS60-4 e MLS-TS-PS60-6).....	68
Figura 5.32: Difrátogramas de raios-X da micropartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de girassol e polisorbato 60+FS como tensoativos: (a) 4% de lipídio total; (b) 6% de lipídio total.	69

Figura 5.33: Aspecto das formulações de nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico	71
Figura 5.34: Perfis temporais: (a) potencial zeta e (b) índice de polidispersidade das nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico e óleo de girassol, com polisorbato 60 e FS como tensoativos.	72
Figura 5.35: Perfil temporal do diâmetro médio das nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico e óleo de girassol.	72
Figura 5.36: Perfis das porcentagens cumulativas e das curvas de frequência ao longo do tempo de armazenagem das nanopartículas lipídica sólidas produzidas com ácido esteárico e óleo de girassol.	73
Figura 5.37 Estabilidade temporal do beta-caroteno encapsulado nas nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico e óleo de girassol, inferida por colorimetria instrumental e expressa no sistema CIE L*a*b*: (a) parâmetros a* e b*; (b) parâmetro L*.	74
Figura 5.38: Estabilidade temporal do beta-caroteno encapsulado nas nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico e óleo de girassol, medida por colorimetria instrumental: (a) croma (C^*_{ab}) e (b) ângulo de Hue (h^*_{ab}).	75
Figura 5.39: Perfis temporais de degradação do beta-caroteno nas nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico e óleo de girassol: (a) em termos de concentração (em mg beta-caroteno/L de dispersão); (b) em termos de % de beta-caroteno preservado.	75
Figura 5.40: Perfil temporal de degradação do beta-caroteno encapsulado, em termos da razão mg beta-caroteno/g lipídio total, para nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico e óleo de girassol.	76
Figura 5.41: Termogramas (obtidos por DSC) das nanopartículas lipídica sólidas produzidas com ácido esteárico e óleo de girassol, usando polisorbato 60 e fosfatidilcolina de soja como tensoativos.	77
Figura 5.42: Difractogramas de raios-X da nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico e óleo de girassol, ao longo do tempo de armazenagem: (a) 1 passagem pelo HAP; (b) 2 passagens pelo HAP.	78

Figura 5.43: Aspecto das formulações de nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de girassol, com 1 e 2 passagens no homogeneizador a alta pressão.	81
Figura 5.44: Valores (a) do potencial zeta e (b) da polidispersidade das nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de girassol, utilizando polisorbato 60 e fosfatidilcolina de soja como tensoativos, ao longo do tempo de armazenagem (4 meses).....	81
Figura 5.45: Diâmetro médio das nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de girassol, utilizando polisorbato 60 e fosfatidilcolina de soja como tensoativos, ao longo do tempo de armazenagem (4 meses).....	82
Figura 5.46: : Perfis das porcentagens cumulativas e das curvas de frequência ao longo do tempo de armazenagem das nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de girassol.	83
Figura 5.47 Estabilidade temporal do beta-caroteno encapsulado nas nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de girassol, inferida por colorimetria instrumental e expressa no sistema CIE $L^*a^*b^*$: (a) parâmetros a^* e b^* ; (b) parâmetro L^*	84
Figura 5.48: Estabilidade temporal do beta-caroteno encapsulado nas nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de girassol, calculada através dos parâmetros $L^* a^* b^*$: (a) croma (C_{ab}^*); (b) ângulo de Hue (h_{ab}^*).	84
Figura 5.49: Perfis temporais de degradação do beta-caroteno nas nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico e óleo de girassol: (a) em termos de concentração (em mg/L dispersão); (b) em termos de % de beta-caroteno preservado; (c) em termos da razão mg beta-caroteno/g lipídio total.	85
Figura 5.50: Termogramas (obtidos por DSC) para as nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de girassol, utilizando polisorbato 60 e fosfatidilcolina de soja como tensoativos.	86
Figura 5.51: Difractogramas de raios-X das nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de girassol, usando polisorbato 60 e fosfatidilcolina de soja como tensoativos, ao longo do tempo de armazenagem. (a) 1 passagem pelo HAP; (b) 2 passagens pelo HAP.	87

TABELAS

Tabela 4.1: Temperatura de fusão e sigla dos lipídios utilizados nos experimentos.	22
Tabela 4.2: Dados dos tensoativos empregados nos experimentos realizados.	23
Tabela 4.3: Formulações para os ensaios de varredura para determinação do HLB dos lipídios.	25
Tabela 4.4: Valores de HLBs testados para as partículas preparadas com AE, usando FS e PS80 como tensoativos.	26
Tabela 4.5: Valores de HLBs testados para as emulsões preparadas com TS preparadas.	26
Tabela 4.6: Valores de HLBs testados para as partículas preparadas com TS, usando FS e PS80 como tensoativos.	27
Tabela 4.7: Valores de HLBs testados para as partículas preparadas com TS, usando FS e PS60 como tensoativos.	27
Tabela 4.8: Formulações de micropartículas lipídicas de ácido esteárico (volume total de amostra: 100 mL).	28
Tabela 4.9: : Formulações das micropartículas lipídicas sólidas de triestearina (volume total de amostra: 100 mL).	29
Tabela 4.10: Formulações das nanopartículas lipídicas sólidas de ácido esteárico, produzidas por homogeneização a alta-pressão.	30
Tabela 4.11: Formulações das nanopartículas lipídicas sólidas de triestearina, produzidas por homogeneização a alta-pressão.	31
Tabela 5.1: Resultados dos ensaios de determinação do HLB das partículas preparadas com AE, usando FS e PS80 como tensoativos.	34
Tabela 5.2: Resultados dos ensaios de determinação do HLB das partículas preparadas com TS, usando PS80 e lecitina como tensoativos.	35
Tabela 5.3: Resultados dos ensaios de determinação do HLB das partículas preparadas com TS, usando PS20 e lecitina como tensoativos.	35
Tabela 5.4: . Resultados dos ensaios de determinação do HLB das partículas preparadas com TS, usando PS60 e lecitina como tensoativos.	36
Tabela 5.5: Formulações com os melhores resultados no teste de HLB.	36

Tabela 5.6: Ângulos de difração, distâncias intermoleculares e intensidades de difração de raios-X das misturas de ácido esteárico e óleo de girassol.	38
Tabela 5.7: Dados calorimétricos (obtidos por DSC) das misturas contendo ácido esteárico e óleo de girassol.	40
Tabela 5.8: Ângulos de difração, distâncias intermoleculares e intensidades de difração de raios-X das misturas de TS e OG.	45
Tabela 5.9: Dados calorimétricos (obtidos por DSC) das amostras das misturas lipídicas de contendo TS e OG.	47
Tabela 5.10: : Ângulos de difração, distâncias intermoleculares e intensidades de difração de raios-X das amostras de MLS produzidas com ácido esteárico e óleo de girassol, com 6% de lipídio total (MLS-AE-6).	56
Tabela 5.11: Ângulos de difração, distâncias intermoleculares e intensidades de difração de raios-X das amostras de MLS produzidas com ácido esteárico e óleo de girassol, com 6% de lipídio total (MLS-AE-4).	57
Tabela 5.12: Dados calorimétricos das amostras de micropartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico e óleo de girassol.	59
Tabela 5.13: Dados calorimétricos (obtidos por DSC) das amostras de micropartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de girassol, com polisorbato 60 e fosfatidilcolina de soja como tensoativo.	67
Tabela 5.14: Ângulos de difração, distâncias intermoleculares e intensidades de difração de raios-X das micropartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de girassol, com polisorbato 60 e fosfatidilcolina de soja como tensoativos (4% de lipídio total).	69
Tabela 5.15: : Ângulos de difração, distâncias intermoleculares e intensidades de difração de raios-X das das micropartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de girassol, com polisorbato 60 e fosfatidilcolina de soja como tensoativos (6% de lipídio total)	70
Tabela 5.16: Dados calorimétricos das amostras de NLS-AE.	77
Tabela 5.17: Ângulos de difração, distâncias intermoleculares e intensidades de difração de raios-X das nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico e	

óleo de girassol, usando polisorbato 60 e fosfatidilcolina de soja como tensoativos (uma passagem no HAP) 78

Tabela 5.18: Ângulos de difração, distâncias intermoleculares e intensidades de difração de raios-X das nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico e óleo de girassol, usando polisorbato 60 e fosfatidilcolina de soja como tensoativos (duas passagens no HAP)..... 80

Tabela 5.19: Dados calorimétricos das amostras de nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de girassol, utilizando polisorbato 60 e fosfatidilcolina de soja como tensoativos. .de soja como tensoativos. 86

Tabela 5.20: Ângulos de difração, distâncias intermoleculares e intensidades de difração de raios-X das nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de girassol, usando polisorbato 60 e fosfatidilcolina de soja como tensoativos..... 88

Tabela 5.21: Ângulos de difração, distâncias intermoleculares e intensidades de difração de raios-X das nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de girassol, usando polisorbato 60 e fosfatidilcolina de soja como tensoativos..... 89

SIGLAS E ABREVIATURAS

AE – ácido esteárico

DRX – difratometria de raios-X

DSC – calorimetria diferencial de varredura (*differential scanning calorimetry*)

FA – fase aquosa

FO – fase oleosa

FS – fosfatidilcolina de soja

FT-IR – espectroscopia na região de infravermelho com transformada de Fourier

HAP – homogeneização a alta pressão

HLB- equilíbrio hidrofílico-lipofílico (*hydrophilic-lipophilic balance*)

ML – mistura lipídica

MLS – micropartículas lipídicas sólidas

NLC – *nanostructured lipid carrier*

NLS – nanopartículas lipídicas sólidas

OG – óleo de girassol

PS20 – polisorbato 20

PS60 – polisorbato 60

PS80 – polisorbato 80

SLN – nanopartícula lipídica sólida (*solid lipid nanoparticle*)

TS – triestearina

RESUMO

Gomes, GVL. Produção e caracterização microestrutural de sistemas lipídicos sólidos micro e nanoparticulados utilizados na encapsulação de beta-caroteno. 99 f. Dissertação de (Mestrado). Pirassununga: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, USP, 2011.

O benefício do consumo de compostos bioativos, como os carotenóides, tem sido amplamente demonstrado pela literatura científica. No entanto, alguns destes bioativos (como os carotenos), devido à sua hidrofobicidade, apresentam dificuldades para serem incorporados em formulações alimentícias aquosas, além de serem, dependendo da matriz alimentícia na qual estão inseridos, dificilmente absorvidos no trato gastrointestinal – ou seja, possuem limitada biodisponibilidade. Tais problemas podem ser contornados através da micro e da nanoencapsulação. O presente trabalho de Mestrado teve como objetivo utilizar a triestearina e o ácido esteárico para a encapsulação do β -caroteno em micro e nanopartículas lipídicas sólidas, a caracterização físico-química das estruturas formadas e a avaliação da estabilidade química e microestrutural das mesmas. Nos sistemas microparticulados de ácido esteárico (AE) foi utilizado como tensoativo o polisorbato 80 e foram produzidos com 4 e 6% de lipídio, na ausência e na presença de α -tocoferol, e todos se mostram extremamente estáveis em relação à distribuição do tamanho médio das partículas, mas somente as partículas que continham α -tocoferol conseguiram preservar o β -caroteno ao longo do período de 7 meses de armazenagem. No caso das micropartículas de triestearina também foram produzidos sistema com 4 e 6% de lipídio total, e a presença do hidrocolóide goma xantana foi essencial para evitar a floculação e permitir a estabilidade do sistema, e foram testadas formulações contendo misturas de tensoativos fosfatidilcolina de soja e polisorbato 60 e fosfatidilcolina de soja e polisorbato 20. Dentre tais sistemas, somente as micropartículas sólidas estabilizadas com polisorbato 60 se mostraram estáveis em relação ao tamanho médio das partículas, e o sistema com menor quantidade de lipídio manteve-se resistente à floculação até o 4º mês de estocagem. Sistemas nanoparticulados foram produzidos com 6% de lipídio total, testando-se uma e duas passagens no homogeneizador à alta pressão. Os dados obtidos indicaram que as nanopartículas lipídicas de AE não diferiram em relação à distribuição de tamanho, mas apresentaram aumento do diâmetro de partícula ao longo do tempo de estocagem. Por sua vez, para as nanopartículas de triestearina os sistemas (tanto com uma quanto com duas passagens no homogeneizador a alta pressão) se mostraram estáveis até cerca de dois meses de armazenagem, em termos de diâmetro médio de partícula, sendo que a distribuição de tamanho se mostrou mais homogênea para o sistema com duas passagens. A microestrutura de todos os sistemas foi avaliada por difratometria de raio-X (DRX) e calorimetria diferencial de varredura (DSC), e a quantidade de β -caroteno preservada ao longo do tempo foi monitorada espectrofotometricamente e por colorimetria instrumental. De maneira geral, os sistemas microparticulados se mostraram melhores do que os nanoparticulados, tanto do ponto de vista de estabilidade da estrutura quanto da preservação do beta-caroteno.

Palavras chave: encapsulação; bioativo; estabilidade; microestrutura; lipídios

ABSTRACT

Gomes, GVL. Production and microestructural characterization of solid lipids systems micro and nanoparticulate used for beta-carotene encapsulation. 99 f. Dissertação de (Mestrado). Pirassununga: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, USP, 2011.

The benefits from the consumption of bioactive compounds, like carotenoids, have been widely demonstrated for scientific literature. However, some of this compounds (like carotenes), due to their hydrophobicity, are difficult to be incorporated in aqueous food formulations, and, depending on the food matrices where they are introduced, are hardly absorbed in the gastrointestinal tract - in other words, they present limited bioavailability. These problems can be overcome by micro and nanoencapsulation. In this context, the objective of this study was to investigate the temporal stability of beta-carotene encapsulated in solid lipid micro and nano particles produced with a mixture of stearic acid or tristearin and sunflower oil, monitoring the microstructure of the systems by X-ray diffractometry, differential scanning calorimetry, zeta potential and particle size measurements, and try to link the preservation of beta-carotene with microstructural considerations. The surfactant used for the stearic acid microparticulate systems was polysorbate 80 and formulations with 4 and 6% of total lipid were produced, in the absence and presence of alpha-tocopherol, and all systems showed high stability in terms of average particle diameter and size distribution, but only the particles containing alpha-tocopherol preserved the content of beta-carotene during the storage period of 7 months. In the case of the tristearin microparticles the presence of a hydrocolloid (xanthan gum) was essential for avoid flocculation and improves the system stability, and formulations containing mixtures of surfactants (soybean phosphatidylcholine and polysorbate 60 and phosphatidylcholine and polysorbate 20) were tested. Among such systems, only the solid microparticles stabilized with phosphatidylcholine and polysorbate 60 showed stability in terms of average particle diameter and size distribution, and the system with less concentration of solid lipid did not show significant destabilization until the 4th month of storage. As for the nanoparticulated systems, formulations with 6% of total lipid were produced, testing one and two passages in high pressure homogenizer. Our results indicated the stearic acid solid nanoparticles did not exhibit alterations of size distribution, but average particle diameter increased along the time. On the other hand, the tristearin nanoparticles (both with one and two passage in high pressure homogenizer) showed stability until two months of storage, in terms of average particle diameter, and the size distribution demonstrated to be more homogeneous for the systems submitted to two passages. As an overall conclusion, the microparticulated systems seemed to be more stable than the nanoparticulated ones, from the point of view of structure stability as well as in terms of beta-carotene preservation of beta-carotene.

Key Words: encapsulation, bioactive; stability; microstructure, lipid

1 INTRODUÇÃO

O aumento de doenças relacionadas com a alimentação tais como obesidade, doenças cardiovasculares, hipertensão e câncer, tem levado os consumidores a se interessar por hábitos alimentares mais saudáveis, incluindo uma crescente conscientização dos benefícios de certos ingredientes na manutenção da saúde. Por esse motivo, há uma tendência global apontando para que os alimentos não sejam mais somente vistos como uma fonte de nutrientes com apelo sensorial, mas também como fonte de bem-estar e de saúde para os indivíduos. Esta ajuda à prevenção de doenças através da dieta é uma oportunidade única de inovação dos chamados produtos funcionais. Tal mudança de perspectiva requer, indiscutivelmente, mudanças de paradigma no desenvolvimento de novos produtos, pois além das propriedades macroscópicas, o controle da bioacessibilidade dos nutrientes durante a digestão se torna importante. No entanto, muitos compostos bioativos estão fortemente vinculados à matriz dos alimentos e/ou são altamente lipofílicos, resultando em má absorção e limitada biodisponibilidade. Além disso, muitos desses compostos, uma vez extraídos de tecidos animais e vegetais são quimicamente instáveis. Isso se aplica a uma ampla variedade de classes de compostos bioativos como, por exemplo, diversos carotenóides (β -caroteno, luteína e licopeno), que são altamente lipofílicos e praticamente insolúveis em água.

Desta maneira, é crucial o estudo de formas de proteção e de aumento da solubilidade em meios aquosos destes bioativos caso se deseje sua incorporação efetiva nos alimentos. Dentre as maneiras de se conseguir tal intento estão a micro e a nanoencapsulação por, permitirem, além de tal proteção contra a degradação destas moléculas, condições de liberação controlada no trato gastrointestinal. O problema da biodisponibilidade pode também ser minimizado se forem utilizados em tais processos determinados materiais que auxiliem na absorção dos bioativos no intestino, por exemplo, como é o caso dos lipídios.

Uma alternativa para a proteção dos carotenóides seria a micro e a nanoencapsulação desses bioativos em partículas lipídicas sólidas. Tais estruturas possuem um núcleo de lipídio sólido envolvido por uma monocamada de tensoativo, o que as torna estruturas hidrofóbicas, mas dispersíveis em meios aquosos. Podem ser produzidas

misturando-se diferentes tipos de lipídios (sólidos ou sólidos + líquidos), dando origem a uma vasta gama de microestruturas.

O objetivo deste trabalho foi a encapsulação, caracterização físico-química e a avaliação da estabilidade química e microestrutural de micro e nanopartículas, utilizando como matrizes encapsulante a triestearina e o ácido esteárico, combinados com óleo de girassol, para a encapsulação de um carotenóide-modelo (beta-caroteno) em micro e nanopartículas lipídicas sólidas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Micro e nanoencapsulação em alimentos

A tendência mundial aponta para que os alimentos não sejam mais somente vistos como uma fonte de nutrientes com apelo sensorial, mas também como fonte de bem-estar e de saúde para os indivíduos. Esta mudança de perspectiva requer, indiscutivelmente, mudanças de paradigma no desenvolvimento de novos produtos, pois há a necessidade do controle da bioacessibilidade de determinados componentes dos alimentos. Tal abordagem se torna cada vez mais relevante conforme se estabelecem as relações entre a genética, a alimentação e a saúde (SANGUANSRI e AUGUSTIN, 2006).

Desta forma, a inovação na indústria de alimentos já necessita, sem dúvida alguma, da mudança de foco da observação das propriedades macroscópicas para aquelas que surgem na meso e na nano escalas, com o subsequente controle das estruturas hierárquicas no alimento e na sua funcionalidade. Por este motivo, são cada vez mais imprescindíveis os estudos sobre as relações entre as estruturas nano e supramoleculares, bem como da funcionalidade nos níveis físico, nutricional e fisiológico (SANGUANSRI e AUGUSTIN, 2006).

Dentro desse contexto, os processos de micro e nanoencapsulação se tornam cada vez mais importantes, e o crescente interesse por estes sistemas justifica-se devido ao seu potencial uso como carreadores de bioativos capazes de agregar a capacidade de liberá-los de forma efetiva e controlada. Além disso, a encapsulação constitui uma abordagem consagrada para preservação das propriedades físico-químicas dos bioativos. Os sistemas clássicos desenvolvidos em microencapsulação constituem uma barreira físico-química contra elementos oxidantes como radicais livres, oxigênio ou radiação UV (RÉ, 1998; SCHROOYEN *et al.*, 2001; GOUIN, 2004; BARANAUSKIENÉ, 2007; RUKTANONCHAI *et al.*, 2009; GONNET *et al.*, 2010). A microencapsulação também pode ser útil para diminuição da volatilidade ou da transferência do material encapsulado para o ambiente externo, assim como modificar propriedades sensoriais desagradáveis e promover a separação de componentes dentro de uma formulação que de outra forma reagiriam entre si (DESAI & PARK 2005; GONNET *et al.*, 2010).

O controle das propriedades de liberação de determinados componentes do alimento tem recebido muita atenção nos últimos anos, devido principalmente ao crescente interesse

no desenvolvimento de alimentos funcionais, ou seja, alimentos cujos elementos possuam alguma função fisiológica, além da nutricional (como ácidos graxos polinsaturados, carotenóides, vitaminas, coenzimas, polifenóis, por exemplo). No entanto, as aplicações da nanotecnologia com estas finalidades na indústria de alimentos ainda está em sua infância (WEISS *et al.*, 2006), ao contrário da realidade da nanoencapsulação e da liberação controlada na indústria farmacêutica, que já vem desenvolvendo, especialmente nos últimos 15 anos, nanoestruturas contendo inúmeros princípios ativos. Desta forma, se podem adaptar os processos que vêm sendo intensivamente desenvolvidos pela área farmacêutica para a indústria de alimentos, observando-se algumas peculiaridades. Dentre estas, está a impossibilidade de se empregar grande parte dos materiais encapsulantes que são usados na indústria farmacêutica, como polímeros sintéticos, como encapsulantes para bioativos alimentícios. Sempre se faz necessário, portanto, o emprego de matérias primas GRAS (“*generally recognized as safe*”) e grau alimentício como matriz estruturante. Além disso, como a escala de produção normalmente é significativamente maior que na indústria farmacêutica, o custo de tais materiais não deve ser proibitivo, o que restringe ainda mais a gama de biopolímeros possíveis de serem empregados.

Relativamente às partículas, pode-se classificar os processos de partículas formadas através de encapsulação em três classes: macro ($>5000\ \mu\text{m}$); micro ($1,0\text{-}5000\ \mu\text{m}$); e nano ($<1,0\ \mu\text{m}$), sendo que as partículas podem apresentar diferentes formas, dependendo dos processos usados para prepará-las (JAFARI, 2008; DESAI & PARK 2005).

Várias técnicas são utilizadas para a encapsulação na área de alimentos, e sua escolha depende de uma série de fatores, dentre eles o tamanho de partícula requerido, as propriedades físicas e químicas do material encapsulante e do bioativo, mecanismos desejados de liberação, escala de produção e custo (RÉ, 1998). Os processos mais utilizados pela indústria de alimentos podem ser divididos em métodos físicos (extrusão, bocais, atomização, discos rotativos, *pan coating*, leite fluidizado, liofilização, *spray cooling* e *spray chilling*, por exemplo), métodos químicos (polimerização interfacial, inclusão molecular, por exemplo) e métodos físico-químicos (coacervação simples, coacervação complexa, lipossomas, partículas lipídicas sólidas, por exemplo) (FÁVARO-TRINDADE *et al.*, 2008).

Muita discussão existe em torno das nano e micropartículas, no sentido de saber qual tipo apresenta melhor funcionalidade. As nanopartículas são sistemas monodispersos ou semi-monodispersos, termo e cineticamente estáveis por longos períodos, o que os torna muito superiores aos sistemas microparticulados em termos de estabilidade, uma vez que a diminuição do tamanho médio de partícula do sistema é responsável, no caso de emulsões, pela diminuição da instabilidade por *creaming* e sedimentação. Além disso, a afirmação que a redução do tamanho das partículas pode aumentar a retenção das estruturas pela mucosa do intestino é uma informação amplamente encontrada e provada na literatura (ACOSTA, 2009)

2.2 Microencapsulação de bioativos hidrofóbicos em sistemas lipídicos: processos e biodisponibilidade

2.2.1 Processos de produção de micro e nanopartículas lipídicas

O uso de formulações lipídicas para encapsulação de fármacos hidrofóbicos tem sido investigado para aumentar a biodisponibilidade de bioativos dessa natureza, administrados por via oral. 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 & O'DRISCOLL, 2006; JANNIN *et al.*, 2008; ZHUANG *et al.*, 2010). 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. Tal estratégia deriva do fato amplamente conhecido que a ingestão de lipídios pode aumentar a absorção e a biodisponibilidade de bioativos hidrofóbicos. 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 (JEONG *et al.*, 2007; JANNIN *et al.*, 2008).

Na técnica de homogeneização a alta pressão as micropartículas são deslocadas a alta pressão através de uma abertura estreita e são, portanto, submetidas a uma alta tensão de cisalhamento, resultando na sua ruptura até a faixa nanométrica. Tal processo de

homogeneização pode ser realizado a temperaturas elevadas (homogeneização a quente) ou abaixo da temperatura ambiente (homogeneização a frio) (MÜLLER *et al.*, 2000). A Figura 2.1 mostra um dos equipamentos utilizados nesta técnica, o homogeneizador panda 2K da Niro Soavi.

Figura 2.1: Homogeneizador panda 2K, NS1001L, Niro Soavi, Itália (fonte: http://www.unityscientific.com.au/imagesDB/products/PandaNS1001L2k_eng_Rev_1.pdf)

Nos processos de *spray drying* e *spray cooling* há uma dispersão do bioativo e aplicação de condições controladas, como temperatura, agitação e tempo, no preparo da emulsão para a produção da partícula. A diferença entre as duas técnicas é a temperatura utilizada, pois para o *spray drying* utiliza-se altas temperaturas, enquanto que para o *spray cooling* a câmara é resfriada (SCHROOYEN *et al.*, 2001).

Outra forma de se obter tais sistemas lipídicos encapsulantes é por extrusão de suspensões lipídicas através de filtros que contenham poros com estreita dimensão de tamanho (DRUMMOND *et al.*, 1999).

Finalmente, os métodos empregando fluidos supercríticos consistem em dissolução dos bioativos e materiais lipídicos em solventes orgânicos como o metanol e depois em fluido supercrítico, seguido pela diminuição da temperatura e pressão para reduzir a solubilidade do fluido, como o RESS (*rapid expansion of supercritical solvent*) e o RESSAS (*rapid expansion of supercritical solvent in aqueous solution*) (JANNIN *et al.*, 2008).

2.2.2 Aspectos que influenciam na biodisponibilidade de bioativos hidrofóbicos

A biodisponibilidade de bioativos hidrofóbicos depende da sua estrutura química, propriedades físico-químicas e da natureza da matriz dos alimentos que se encontram (HUR *et al.*, 2009).

É importante ressaltar que alguns conhecimentos básicos dos processos físico-químicos e fisiológicos que ocorrem quando os alimentos sofrem a ação dos fluidos gastrointestinais no desenvolvimento de sistemas de controle da biodisponibilidade se fazem necessários. A variação do pH durante a passagem dos lipídios pelo corpo humano (boca-pH 7,0; estômago- pH 1 a 3; intestino delgado e grosso- pH 6 a 7) pode provocar alterações na carga elétrica da superfície das partículas de lipídio, por exemplo, bem como causar alterações nas propriedades e interações das cargas de outras espécies (como enzimas, lipídios, aminoácidos, polissacarídeos). Pode haver também variações nas concentrações dos íons, o que poderá afetar as interações eletrostáticas no sistema. Existem vários tipos de enzimas na boca, estômago e intestino delgado, e a capacidade destas enzimas para interagir com seus substratos específicos têm impacto na digestibilidade; portanto, na absorção dos componentes bioativos encapsulados em tais matrizes. Pode haver uma grande diferença na temperatura do alimento e do corpo, o que pode causar mudanças no estado físico, conformação molecular ou interação de componentes específicos, impactando fortemente a digestibilidade (McCLEMENTS, 2010).

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

intestinais, como a bomba de efluxo da glicoproteína P, e também o metabolismo baseado em enterócitos. No caso de bioativos altamente hidrofóbicos, os lipídios podem aumentar o transporte linfático e melhorar a biodisponibilidade através da redução do metabolismo de primeira passagem (JEONG *et al.*, 2007).

Uma grande variedade de sistemas de liberação foi desenvolvida para encapsular agentes bioativos lipofílicos, incluindo emulsões convencionais, nanoemulsões, emulsões múltiplas, micro e nanopartículas lipídicas sólidas, dentre outras. Cada um desses sistemas tem suas vantagens e desvantagens específicas para encapsular, proteger e liberar bioativos, assim como cada um tem seu custo, regulamentação, facilidade de uso, biodegradabilidade e alta biocompatibilidade (McCLEMENTS, 2010; McCLEMENTS E LI, 2010). Em relação aos sistemas de encapsulação lipídicos, diferentes tipos de partículas podem ser descritos, como adequadamente resumido por McCLEMENTS (2010) na Figura 2.1.

Figura 2.2: Exemplos de diferentes tipos de partículas que podem ser produzidas para encapsulação de ativos hidrofóbicos (fonte: adaptado de McCLEMENTS, 2010)

Deste modo, sendo as matrizes lipídicas materiais altamente promissores como encapsulantes promotores do aumento da resistência às condições do trato gastrointestinal e da biodisponibilidade, as micro e nanopartículas lipídicas sólidas surgem como uma técnica interessante para incorporação de bioativos (ingredientes funcionais) hidrofóbicos. WEISS *et al.* (2008) enfatizam sua importância na nanoencapsulação de ativos hidrofóbicos como os carotenóides, ômega e fitoesteróis, e as diversas possíveis aplicações de tais partículas

na indústria de alimentos. Enfatiza-se também que a produção em grande escala já é plenamente possível, não se requer a utilização de solventes orgânicos, fazendo destas estruturas coloidais sistemas ideais para serem aplicados na indústria de alimentos. Além disso, podem-se incorporar altas concentrações de compostos funcionais hidrofóbicos nestes tipos de partículas, diminuindo ou mesmo evitando completamente a separação de fases ou desestabilização.

Desta forma, as partículas lipídicas sólidas, tanto na forma de sistemas nano quanto microparticulados, surgem como uma alternativa para a incorporação de ativos lipofílicos, que necessitam ser dispersos em formulações aquosas.

2.2.3 Partículas lipídicas sólidas

As primeiras micropartículas lipídicas sólidas preparadas com materiais lipídicos foram descritas no início da década de 90 (DOMB *et al.* 1995; MÜLLER *et al.*, 2002; WISSING *et al.*, 2004), sendo as primeiras patentes produzidas por GASCO (1993) e MÜLLER & LUCKS (1996). Estas foram preparadas aplicando-se altas intensidades de agitação para dispersar uma fase lipídica fundida em uma solução quente de tensoativo, sendo a seguir a mistura resultante resfriada até a temperatura ambiente, resultando em micropartículas com um núcleo contendo lipídio sólido, conforme esquematizado na Figura 2.3. A partir deste estudo inicial, diversos autores iniciaram diversos estudos sobre estas estruturas, tanto empregando o método original quanto outros desenvolvidos posteriormente (MÜLLER *et al.*, 2000; MEHNERT e MÄDER, 2001; MÜLLER *et al.*, 2002), inclusive e especialmente para diminuição do tamanho médio das partículas para a faixa nanométrica. Tais partículas lipídicas sólidas combinam as vantagens de outros sistemas carreadores, como das nanopartículas lipídicas poliméricas (diferentes modificações químicas), lipossomas (permeabilidade da membrana), e emulsões (biodisponibilidade) para oferecer estabilidade física, proteção a ativos sensíveis contra a degradação, liberação controlada e excelente tolerabilidade (WISSING *et al.*, 2004, HENTSCHEL *et al.*, 2008).

Figura 2.3: Esquema simplificado de uma nanopartícula lipídica sólida (fonte: adaptado de http://www.dailycosmetic.co.kr/Contents/Section/viewPlanning.asp?item_seq=41079).

As partículas lipídicas sólidas, tanto micro quanto nanopartículas, são sistemas carreadores que têm sido desenvolvidos para encapsular, proteger e liberar componentes funcionais lipofílicos, tais como bioativos lipídicos e drogas hidrofóbicas. Os lipídios utilizados são sólidos à temperatura ambiente e corpórea, além de serem biológicos e biodegradáveis o que a princípio indica baixa toxicidade do sistema (FREITAS & MULLER, 1998; HEURTAULT *et al.*, 2003; HELGASON *et al.*, 2009; PARHI & SURESH, 2010). Essa característica, juntamente com seu tamanho normalmente submicrométrico, e potencial para produção em escala industrial, têm proporcionado um interesse muito grande, nos últimos anos, por tais sistemas (RUKTANONCHA *et al.*, 2009).

Dependendo das matérias-primas lipídicas empregadas na preparação destas partículas lipídicas sólidas, se podem distinguir dois tipos básicos diferentes, denominadas pela literatura como SLN (*solid lipid nanoparticle*) e NLC (*nanostuctured lipid carrier*), no caso de nanopartículas.

As NLCs são consideradas como a segunda geração de nanopartículas lipídicas. Essas estruturas foram produzidas com o intuito de minimizar as limitações das SLN, como capacidade limitada de encapsulação, expulsão da droga durante estocagem e alto conteúdo de água na dispersão (MÜLLER *et al.*, 2002; WISSING *et al.*, 2004; ZHUANG *et al.*, 2010). Essas limitações são minimizadas porque, em contraste com a SLN, que são

produzidos por um só tipo de lipídio sólido, as NLC são produzidas pela mistura de lipídios diferentes (sólidos ou sólidos mais líquidos), com cadeias carbônicas espacialmente incompatíveis, diferentes, que formam “espaços” ou “lacunas” no interior da matriz sólida (MÜLLER *et al.*, 2002).

A Figura 2.3 mostra esquematicamente as diferenças estruturais existentes entre estes dois tipos de partículas lipídicas sólidas.

Figura 2.4:Diferenças entre a estrutura cristalina perfeita das SLN e a estrutura com imperfeições dos NLC (fonte: adaptado de SOUTO, 2005).

Esta diferença estrutural é o principal fator que influencia o modelo de incorporação de substâncias encapsuladas no núcleo sólido das partículas. MÜLLER *et al.* (2000) descrevem três tipos de modelos de incorporação nas SLN: (i) modelo da matriz homogênea; (ii) modelo da parede enriquecida (“*drug-enriched shell model*”) e (iii) modelo do núcleo enriquecido (“*drug-enriched core model*”), sendo que a Figura 2.4 os mostra esquematicamente. Uma variável determinante no tipo (ou tipos) de estrutura que serão encontradas na dispersão coloidal resultante é o processo utilizado para sua produção.

Figura 2.5: Modelos de incorporação de compostos ativos em SLN: (a) matriz homogênea; (b) parede enriquecida e (c) núcleo enriquecido (fonte: SOUTO, 2005).

O modelo da matriz homogênea (ex. droga molecularmente dispersa na matriz lipídica) ocorre quando as partículas são produzidas pela técnica de homogeneização a frio

sem usar tensoativo ou uma droga solúvel ao tensoativo. O modelo da parede enriquecida é obtido através do efeito de partição da droga da fase lipídica para a fase aquosa, que ocorre com o aumento da temperatura durante a produção do SLN pela técnica de homogeneização a quente. Por sua vez o núcleo enriquecido é encontrado no caso da precipitação da droga antes da recristalização do lipídio. Isso ocorre quando a droga é dissolvida no lipídio fundido na solubilidade de saturação ou próximo deste ponto. O resfriamento da nanoemulsão levará à supersaturação da droga no lipídio fundido e, subsequentemente a droga cristalizará antes do lipídio. Um resfriamento adicional levará a recristalização do lipídio em torno do núcleo como uma membrana. Esta membrana lipídica conterá somente a droga em uma concentração correspondente a solubilidade de saturação na temperatura de recristalização do lipídio, isso significa um núcleo enriquecido cercado por uma parede lipídica (MÜLLER *et al.*, 2000).

Em relação às nanopartículas lipídicas do tipo NLC, MÜLLER *et al.* (2002) descrevem outros três modelos para incorporação dos bioativos, conforme a Figura 2.5:

Figura 2.6: Modelos de incorporação de compostos ativos em NLC (fonte: SOUTO, 2005).

Segundo SOUTO (2005), o tipo I é definido como o tipo “cristal imperfeito”. Este modelo se obtém quando se mistura lipídios sólidos a temperatura ambiente com pequenas quantidades de óleos (lipídios líquidos a temperatura ambiente). Devido às diferenças nos tamanhos das cadeias de ácidos graxos e da mistura de mono-, di- e triacilgliceróis, a matriz das NLC não forma uma estrutura altamente ordenada, o que promove maiores espaços para a acomodação do recheio, dessa forma maiores eficiências de encapsulação são conseguidas (MÜLLER *et al.*, 2002; WISSING *et al.*, 2004). Por sua vez, o tipo II é o tipo amorfo, que surge quando determinados tipos de lipídios não recristalizam mais após as etapas de homogeneização e resfriamento. Estes lipídios têm a habilidade de formar estruturas amorfas lipídicas, evitando a ocorrência de cristalização e minimizando a expulsão dos bioativos da matriz, uma vez que esta é mantida na forma α . Finalmente, o

tipo III é um tipo “múltiplo”, nele é usado uma grande quantidade de lipídio líquido, e o ativo encapsulado, que, em geral, tem solubilidade maior em lipídios líquidos, fica mais disperso, e após, a solidificação da emulsão, fica encapsulado por este e o lipídio sólido, por sua vez, encapsula as estruturas de lipídio contendo líquido/bioativo, ou seja, alguns microcompartimentos de lipídios líquidos são formados dentro da matriz de lipídio sólido, e isso ocorre devido a um processo de separação de fases. Para alguns bioativos em que a solubilidade em lipídios líquidos é maior que em lipídios sólidos, este tipo de estrutura pode aumentar significativamente a sua eficiência de encapsulação. Este tipo de estrutura também permite melhores propriedades de liberação, principalmente uma liberação mais prolongada. (MÜLLER *et al.*, 2002; WISSING *et al.*, 2004; SOUTO, 2005).

2.2.3.1 Métodos de produção das partículas lipídicas sólidas

Vários métodos foram desenvolvidos para preparação das partículas lipídicas sólidas, dentre eles os principais são: (i) homogeneização por alta pressão; (ii) emulsificação-evaporação do solvente, (iii) microemulsões; (iv) microfluidização (SOUTO & MÜLLER, 2006; PARHI & SURESH, 2010; MEHNERT & MADER, 2001; JAFARI *et al.*, 2006). A vantagem da primeira técnica é que ela não se utiliza de solventes orgânicos, o que a torna especialmente atraente para a indústria de alimentos, além do fato de o principal equipamento que ela requer – homogeneizador a alta pressão - ser de uso corrente neste tipo de indústria (SOUTO & MÜLLER, 2006).

A homogeneização por alta pressão (HAP, ou, em inglês, *high pressure homogenization* - HPH) começou a ser desenvolvida por MÜLLER e LUCKS (1996), e pode ser dividida em HAP a quente ou HAP a frio, mostradas, respectivamente, pela Figura 2.6(a) e 2.6(b):

Figura 2.7: Esquema dos dois métodos de preparação de SLN/NLC por HAP: (a) a quente; (b) a frio (fonte: adaptado de SOUTO (2005)).

Para se alcançar uma distribuição de tamanho de partículas estreita, que aumenta a estabilidade física de uma dispersão aquosa coloidal, se torna necessário o emprego de um método de homogeneização de tamanho de partícula em que a distribuição da densidade de potência seja uniforme. Uma das variáveis que influencia no valor desta grandeza é a pressão de homogeneização, sendo que densidades de potência da ordem de 10^{12} a 10^{13} W/m³ geralmente resultam em efetivo rompimento das partículas. Tais valores podem ser obtidos por homogeneizadores do tipo pistão, como os fabricados pela Avestin ou pela APV Gaulin (SOUTO, 2005).

A Figura 2.6(a) mostra um procedimento esquemático para preparação de nanopartículas de lipídio pela técnica de HAP a quente. Resumidamente, o bioativo a ser encapsulado e o lipídio fundido são dispersos em uma solução quente de tensoativo, à mesma temperatura (cerca de 5 a 10°C acima da temperatura de fusão dos lipídios), e a seguir esta mistura é submetida à agitação em altas velocidades de rotação (ou a um processo de ultrassom), onde ocorrerá a quebra das estruturas coloidais, para a formação de uma pré-emulsão. A qualidade de tal pré-emulsão afetará a qualidade do produto final, e é desejável a obtenção de partículas na faixa de micrômetros. Esta emulsão é então submetida à HAP em temperaturas controladas. O número de ciclos de homogeneização varia de

acordo com o tamanho médio e a distribuição de tamanho de partículas que se deseja, mas normalmente fica entre 3 e 5, sob pressões variando de 500 a 1500 bar. Aumentar muito a pressão de homogeneização ou o número de ciclos, algumas vezes, pode resultar no aumento do tamanho da partícula devido à coalescência que é provocada pela alta energia cinética das partículas. O produto formado após a homogeneização é uma dispersão aquosa de nanopartículas lipídicas, a qual será resfriada para que a fase lipídica se solidifique a temperatura ambiente (MÜLLER *et al.*, 2002; MEHNERT e MÄDER, 2001; WISSING *et al.*, 2004).

Esta técnica é a mais amplamente empregada, sendo altamente eficiente na encapsulação de bioativos hidrofóbicos. Além disso, pode ser usada também para encapsular substâncias termolábeis, uma vez que o tempo de exposição a altas temperaturas é relativamente curto. No entanto, este método não é normalmente apropriado para encapsulação de substâncias hidrofílicas, pois pode ocorrer partição da fase lipídica líquida para a fase aquosa durante a homogeneização a quente (MÜLLER *et al.*, 2002).

Por sua vez, a Figura 2.6(b) mostra o procedimento experimental genérico para a HAP a frio. Neste caso, o lipídio fundido misturado com o bioativo a ser encapsulado é resfriado em gelo seco ou nitrogênio líquido, de modo a aumentar a fragilidade do lipídio e facilitar a etapa de moagem. A alta taxa de resfriamento favorece uma distribuição homogênea do bioativo na matriz lipídica (MEHNERT e MÄDER, 2001). Após a solidificação, a massa lipídica é moída utilizando-se um moinho coloidal para que se originem micropartículas da ordem de 50 a 100 µm, e estas são suspensas em uma solução de tensoativo fria através de agitação intensa, resultando em uma macrosuspensão. Esta suspensão é então submetida ao processo de HAP à temperatura ambiente ou mais baixa, sendo então as macropartículas quebradas em nanopartículas. Esta técnica é recomendada para encapsulação de compostos altamente termolábeis (MEHNERT e MÄDER, 2001).

2.3 Carotenóides: estrutura e microencapsulação

Dentre os bioativos de maior importância para a indústria de alimentos estão os carotenóides, compostos isoprenóides que contém em sua estrutura um hidrocarboneto com ligações duplas conjugadas, as quais são responsáveis por muitas de suas propriedades e ações. A maioria dos carotenóides possui 40 átomos de carbono, embora haja outros com

uma menor quantidade em sua estrutura. Dependendo da presença ou não de anéis em suas moléculas, eles podem ser classificados como carotenóides cíclicos ou acíclicos, como também podem ser divididos em carotenos (carotenóides que contém apenas carbono e hidrogênio) e xantofilas (que também contém carotenóides oxigenados, como epóxi, hidroxila, carbonila, e outros grupos carboxílicos). Quando em suas fontes naturais, podem estar livres ou associados a outros compostos, como ácidos graxos, açúcares e proteínas (DAMODARAN *et al.*, 2010).

Tais compostos são lipossolúveis e estão largamente presentes em frutas e legumes. Esses bioativos são co-responsáveis pela cor amarela, laranja e vermelha de muitos alimentos de origem vegetal e alguns de origem animal (GONNET *et al.*, 2010; MATIOLI & RODRIGUEZ-MAIA, 2003; RODRÍGUEZ-HUEZO *et al.*, 2004). Os efeitos benéficos desses compostos são largamente conhecidos e incluem reforço da resposta imunológica, possível papel na prevenção de doenças como aterosclerose, câncer de pele e de próstata e doenças cardiovasculares, regulação do sistema digestivo, do crescimento e da concentração de açúcar no sangue e dos níveis de colesterol. Tais substâncias estão ainda associadas ao reforço da proteção da pele aos danos dos raios ultravioleta, possuem ação antioxidante (devido às suas múltiplas ligações duplas conjugadas) e atividade pró-vitâmica A (FRASER & BRAMLEY, 2004; RATNAM *et al.*, 2006). Os carotenóides que possuem atividade pró-vitâmica A são os que contêm pelo menos um anel β -ionona e uma cadeia lateral poliédrica, e dentre eles, os que mais possuem essa característica são o β e o α -caroteno e o β -criptoxantina (DAMODARAN *et al.*, 2010). Além disso, muitos compostos químicos importantes, responsáveis pelo aroma dos alimentos e fotoproteção, são derivados de carotenóides (PRIAMO *et al.*, 2010).

Estes pigmentos são largamente utilizados como corantes para recuperar a cor perdida durante o processamento e armazenamento dos alimentos, bem como para padronizar as cores de alguns produtos. Quando dispersíveis em água podem ser empregados em refrigerantes, sorvetes, sobremesas, sopas, produtos cárneos, bem como na alimentação animal. Além disso, as indústrias de alimentos e de cosméticos estão buscando substituir os corantes artificiais pelos naturais, o que possivelmente tomará uma demanda ainda maior no futuro (NUNES & MERCADANTE, 2007; PRIAMO *et al.*, 2010, RODRÍGUEZ-HUEZO *et al.*, 2004).

Existem mais de 600 tipos diferentes de carotenóides, mas somente cerca de 50 são encontrados em alimentos. Os carotenóides mais comumente encontrados em frutas e legumes são o β -caroteno, licopeno, luteína, zeaxantina, β -criptoxantina (PRIAMO *et al.*, 2010; GONNET *et al.*, 2010, RODRÍGUEZ-HUEZO *et al.*, 2004). Dentre esses, o β -caroteno é considerado o mais ativo nutricionalmente (RODRÍGUEZ-HUEZO *et al.*, 2004; HENTSCHEL *et al.*, 2008; CAO-HOANG *et al.*, 2010).

Figura 2.8: Estrutura dos carotenóides licopeno, β -caroteno, luteína, zeaxantina e β -criptoxantina (fonte: adaptado de GONNET *et al.*, 2010 e MORAIS, 2006).

As propriedades, ações e funções dos carotenóides estão intimamente relacionadas com sua estrutura química. As cadeias poliênicas são responsáveis tanto pela absorção da luz visível, quanto pela alta reatividade da molécula. Em sua maioria são encontrados na configuração *trans*, devido a sua alta estabilidade, comparada à forma *cis* (NUNES & MERCADANTE, 2007). Estes compostos são insolúveis em água e moderadamente solúveis em óleo à temperatura ambiente. O aumento da temperatura do óleo aumenta a sua solubilidade (DELGADO-VARGAS *et al.*, 2000). Os carotenóides podem ser susceptíveis à oxidação e izomerização durante a exposição ao ácido, calor ou luz, especialmente quando armazenados na presença de oxigênio (DAMODARAN *et al.*, 2010).

No entanto, infelizmente a biodisponibilidade de muitos carotenóides, especialmente quando em sua forma cristalina, é muito baixa, e a sua estabilidade oxidativa diminui muito durante o processamento devido à mistura de produtos químicos e exposição ao calor (HENTSCHEL *et al.*, 2008; HELGASON *et al.*, 2009). Porém, essa biodisponibilidade pode ser aumentada se esses bioativos forem incorporados em materiais com alto teor lipídico (RATNAM *et al.*, 2006).

Desta forma, para minimizar os problemas de formulações e de biodisponibilidade apresentados, tornar tais substâncias dispersíveis em água, onde poderá ser incorporada mais facilmente em vários tipos de alimentos e efetivar a adição de funcionalidade às formulações alimentícias, surge como alternativa de proteção a tais substâncias a micro e a nanoencapsulação (NUNES & MERCADANTE, 2007; HENTSCHEL *et al.*, 2008; CHIU *et al.*, 2007; MATIOLI & RODRIGUEZ-MAIA, 2003).

A adição de carotenóides em formulações alimentícias é altamente interessante por dois motivos: (i) substituição dos corantes artificiais; (ii) como ingredientes funcionais, devido ao seus efeitos benéficos ao organismos anteriormente mencionados. Porém, como já citado, tais substâncias podem ser susceptíveis à oxidação e izomerização, e ter sua biodisponibilidade diminuída, dependendo do meio em que se encontram. Portanto, com o intuito de efetivar a adição de funcionalidade às formulações alimentícias, surge como alternativa de proteção a tais substâncias a microencapsulação. Apesar de ser uma opção muito promissora para estabilização e proteção destes pigmentos naturais para aplicação em formulações alimentícias, foi somente há um pouco mais de dez anos que estudos relacionados com o tema se intensificaram, utilizando principalmente a técnica de atomização (“*spray drying*”). Por sua vez, sistemas coloidais tem sido também testados na micro e nanoencapsulação de carotenóides.

Emulsões foram testadas como sistemas microencapsulantes de licopeno por RIBEIRO *et al.* (2003). Os autores avaliaram a estabilidade física do sistema emulsionado e química do licopeno diluídos em 2 diferentes sistemas modelo (suco de laranja e leite desnatado, comparando com um controle formado pela dispersão de licopeno encapsulado em água). Nestas investigações, utilizou-se 3 diferentes emulsificantes, e detectou-se que a estabilidade do licopeno dependeu fortemente do sistema modelo estudado, sendo que no suco de laranja foi particularmente estável, em comparação com o controle. Os dados permitiram concluir que o emulsificante empregado teve pouca influência sobre a estabilidade do carotenóide, e que a adição de α -tocoferol nas formulações propiciou um aumento muito significativo na conservação do carotenóide encapsulado.

RODRIGUEZ-HUEZO *et al.* (2004) realizaram a atomização de emulsões múltiplas ($W_1/O/W_2$) contendo carotenóides (oleoresina de pimenta e oleoresina de cravo Asteca saponificada), com diferentes misturas de biopolímeros como material de parede e

diferentes porcentagens de sólidos. Os autores concluíram que os melhores resultados em termos de proteção aos carotenóides foram obtidos com as menores quantidades de sólidos, utilizando-se os *blends* com polímeros de menor peso molecular.

MAO *et al.* (2009) testaram o polisorbato 20, o monolaurato decaglycerol (DML), o amido octenil succinato (OSS), o isolado protéico de soro (WPI), e finalmente uma mistura de Tween 20 e WPI (1% em massa) para a preparação de nanoemulsões com β -caroteno. Seus resultados mostraram que nanoemulsões estabilizadas com polisorbato 20 e DML apresentaram menor tamanho, porém, pior estabilidade, comparado com as partículas de OSS e WPI. Segundo ele, WPI foi capaz de proteger efetivamente o β -caroteno da degradação, enquanto que OSS não conseguiu tal objetivo quando armazenamento a 55 °C, e a mistura de Tween 20 e WPI melhoraram significativamente a estabilidade da emulsão.

Em outro estudo, a oxidação do β -caroteno de origem natural e sintética foi investigada após sua dispersão em partículas contendo polisorbato ou ácido polilático. Eles concluíram que a encapsulação do β -caroteno em partículas poliláticas dá origem a uma organização supramolecular mais estável, que oferece melhor proteção contra a oxidação. (CAO-HOANG *et al.*, 2010).

Em relação ao emprego de micro e nanopartículas lipídicas sólidas para incorporação de carotenóides, somente depois de 2008 é que seu estudo começou a se intensificar, mesmo assim localizaram-se somente quatro trabalhos na literatura.

HENTSCHEL *et al.* (2008) utilizaram NLC formadas por PGMS (ALDO PHGMS ®, Lonza, uma mistura de 70% mono e diestearato de propileno glicol, 29% mono e dipalmitato de propileno glicol e 1% de ácidos graxos C₁₄ a C₁₈). O β -caroteno utilizado foi na forma de dispersão 10% em óleo de girassol (Lucarotin, BASF). Os autores variaram a concentração de tensoativo empregado (polisorbato 80) e testaram formulações com e sem antioxidante incorporado (α -tocoferol). O estudo realizado permitiu verificar que houve uma boa reprodutibilidade do processo de produção das nanopartículas, e que ao serem estocadas entre 4 e 8° C foram estáveis (em termos de diâmetro médio e distribuição de tamanho de partícula) durante um período de 30 semanas. Os autores verificaram também que houve recristalização praticamente total após a etapa de resfriamento do processo, e que não houve significativa alteração polimórfica após 7 meses de armazenagem. Foi

possível detectar também que a ausência do α -tocoferol e a diluição das nanopartículas provocaram sensível diferença na oxidação do carotenóide encapsulado.

Foi analisado o impacto do grupo terminal, dos tensoativos de diferentes pontos de fusão, na estrutura cristalina e na estabilidade física das nanopartículas lipídicas sólidas de tripalmitina, assim como na estabilidade química do β -caroteno encapsulando. Em conclusão, esse estudo mostrou que a utilização de tensoativos de alto ponto de fusão pode mudar o comportamento de cristalização das SLNs, assim como pode proteger o β -caroteno encapsulando das degradações químicas (HELGASON et al., 2009).

TRIPLETT & RATHAMN (2009) incorporaram β -caroteno em nanopartículas de ácido esteárico, utilizando ultra-agitação na velocidade de 30.000rpm/2min. Tal encapsulação não conseguiu acomodar o bioativo de forma adequada, apresentando uma eficiência de encapsulação de 40% e o β -caroteno ficou acomodado na partícula por um mês.

Finalmente, por sua vez, TROMBINO *et al.* (2009) formularam nanopartículas lipídicas sólidas de ferulato estearílico (SF-SLNs), visando aplicações dermatológicas, para melhorar a estabilidade de β -caroteno e α -tocoferol. Seus resultados evidenciaram como as SF-SLNs representaram um veículo adequado para o β -caroteno e α -tocoferol, estabilizando-os e protegendo-os da degradação.

A partir das informações expostas na presente revisão bibliográfica, é possível observar a importância do bioativo beta-caroteno na saúde humana e a necessidade de se desenvolver sistemas capazes de protegê-lo e possibilitar a sua bioacessibilidade caso se deseje sua incorporação efetiva nos alimentos. Como foi visto, uma das maneiras de se conseguir tal intento é através da micro e nanoencapsulação, principalmente se forem utilizados para tais processos materiais que auxiliem na absorção dos bioativos no intestino, tais como os lipídios. No entanto, a encapsulação com essas aplicações na indústria alimentícia começaram a ser desenvolvidas há pouco tempo, necessitando de mais estudos nesta área, principalmente em relação à análise de microestruturas e sua relação com a preservação de bioativos nelas incorporados.

3 OBJETIVOS

Este trabalho de Mestrado teve como objetivo principal a encapsulação, caracterização físico-química e a avaliação da estabilidade química e microestrutural de micro e nanopartículas utilizando como matriz encapsulante a triestearina e o ácido esteárico para a encapsulação de um carotenóide-modelo (beta-caroteno) em micro e nanopartículas lipídicas sólidas.

Para alcançar este objetivo principal, os seguintes objetivos específicos foram atingidos:

- Produção das micro e nanopartículas lipídicas contendo β -caroteno nas formulações consideradas como as mais apropriadas de acordo com análises microestruturais de misturas lipídicas;
- Caracterização microestrutural dos sistemas resultantes através de análises de calorimetria diferencial de varredura, difração de raios-X, determinação de diâmetro médio, distribuição de tamanho de partícula e potencial zeta;
- Estudos de estabilidade das dispersões de nanopartículas lipídicas sólidas ao longo do tempo de armazenagem.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS E PROPRIEDADES

O carotenóide-modelo escolhido para a execução deste projeto foi o beta-caroteno na sua forma cristalina pura (Sigma ou Fluka). Alfa-tocoferol (Sigma-Aldrich, pureza 97%) foi incorporado também em algumas formulações.

Foram selecionados como lipídios para a produção das partículas lipídicas sólidas o ácido esteárico (Sigma-Aldrich), tristearina (Fluka) e óleo de girassol (Liza, Cargill). Os tensoativos testados neste trabalho foram a fosfatidilcolina de soja hidrogenada (Lipoid S100-H, Lipoid, Alemanha) e os polisorbatos 60 (Tween 60®, Sigma-Aldrich), 20 (Tween 20®, Synth) e 80 (Tween 80®, Synth). Goma-xantana (Grindsted Xanthan 80®, doada pela Danisco) foi utilizada como espessante em algumas formulações. Água deionizada foi utilizada em todos os experimentos.

O ácido esteárico (C18:0) e a tristearina (triacilglicerol saturado formado por moléculas de ácido esteárico) foram escolhidos pois, diferentemente dos ácidos graxos de cadeia longa que geralmente aumentam os níveis séricos de colesterol, o ácido esteárico é neutro em relação aos níveis de colesterol no sangue (OSBORN & AKOH, 2002; MASON *et al.*, 2009; SANDERS, 2009).

As temperaturas de fusão e siglas dos lipídios, bem como o valor do HLB dos tensoativos utilizados são dados apresentados nas Tabelas 4.1 e 4.2, respectivamente.

Tabela 4.1: Temperatura de fusão e sigla dos lipídios utilizados nos experimentos.

Lipídio	Temperatura de Fusão (C°)*	Sigla
Ácido esteárico	69	AE
Tristearina	60	TS

*obtidos por calorimetria diferencial de varredura.

Tabela 4.2: Dados dos tensoativos empregados nos experimentos realizados.

Tensoativo	HLB	Sigla	Molécula
Polisorbato 80 (cadeia alifática: oleato)	15,0*	PS80	$w+x+y+z=20$
Polisorbato 20 (cadeia alifática: laurato)	16,2*	PS20	$w+x+y+z=20$
Polisorbato 60 (cadeia alifática: estearato)	14,9*	PS60	$w+x+y+z=20$
Fosfatidilcolina de soja (cadeias alifáticas: ácido esteárico, 72% e ácido palmítico, 28%)	8**	FS	$R_2-CO-CH-CH_2-O-PO-CH_2-CH_2-N^+(CH_3)_3$

* Fonte: ICI Americas (1980).

** valor médio, pois trata-se de uma molécula zwitteriônica.

4.1.1 Quantificação dos carotenóides

Cloreto de sódio p.a (Synth, pureza 94%) e hexano (Synth, pureza 98%) foram empregados no método de extração do beta-caroteno.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparação e caracterização das misturas lipídicas

4.2.1.1 Preparação das misturas lipídicas

Para a preparação das misturas de lipídios fundiu-se as massas de cada um dos componentes conjuntamente, a 10° C acima da maior temperatura de fusão dentre os lipídios empregados na formulação, e a seguir a temperatura do sistema fundido foi resfriada até 20° C em banho de gelo. O armazenamento das mesmas foi feito sob refrigeração até o momento das análises de difração de raios-X, espectrometria na região do infravermelho e calorimetria diferencial de varredura. As análises foram realizadas para os lipídios puros (ácido esteárico e triestearina), bem como para as misturas de lipídios (90% ácido esteárico + 10% óleo de girassol, 70% ácido esteárico + 30% óleo de girassol, 90% triestearina + 10% óleo de girassol e 70% triestearina + 30% óleo de girassol).

4.2.1.2 Caracterização microestrutural das misturas de lipídios

As misturas de lipídios foram caracterizadas por difração de raios-X (DRX), espectroscopia na região de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) e calorimetria diferencial de varredura (DSC). As análises de difração de raios-X (DRX) de amostras das misturas físicas 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). 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. Já as análises de espectroscopia no infravermelho foram realizadas através de varreduras em número de onda variaram de 40000 a 400 cm⁻¹, em equipamento

PerkinElmer, modelo Spectrum One (FT-IR com ATR). Estas análises também foram feitas no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA), no Departamento de Engenharia de Alimentos do ZEA-FZEA-USP.

4.2.2 Determinação do valor do equilíbrio hidrofílico-lipofílico (HLB) dos lipídios

Foram produzidas 4 formulações para a determinação do equilíbrio lipofílico-hidrofílico dos lipídios utilizados baseado no método utilizado por ZANIN *et al.* (2002), baseado em ICI Americas (1980). Trata-se de um método padrão que é a tradicionalmente empregado na área farmacêutica para a estimativa do HLB necessário de um tensoativo para a formação de uma emulsão. A fase aquosa (FA), que consistiu de água e tensoativo, e a fase oleosa (FO), que continha o(s) lipídio(s), foram aquecidas, separadamente, 10⁰C acima da temperatura de fusão dos lipídios, em seguida a FA foi vertida na FO lentamente (manualmente), empregando ultra-agitação a 10.000 rpm, por 15 minutos e aquecimento a temperatura 10⁰C 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 à temperatura ambiente. As emulsões preparadas foram mantidas em repouso por 24 horas à temperatura ambiente. Todas as formulações continham 10% de fase oleosa e 5% de tensoativo.

A Tabela 4.3 apresenta as formulações, e os tipos de fases aquosas e oleosas empregadas:

Tabela 4.3: Formulações para os ensaios de varredura para determinação do HLB dos lipídios.

Formulação	FA	FO
HLB-1	Polisorbato 80 + Lipoid S100-H	Ácido esteárico
HLB-2	Polisorbato 80 + Lipoid S100-H	Triestearina
HLB-3	Polisorbato 20 + Lipoid S100-H	Triestearina
HLB-4	Polisorbato 60 + Lipoid S100-H	Triestearina

As Tabelas 4.4 a 4.7 mostram as formulações utilizadas nos testes de estabilidade em diferentes HLBs:

Tabela 4.4: Valores de HLBs testados para as partículas preparadas com AE, usando FS e PS80 como tensoativos.

Formulação	FS	PS 80	HLB
	(% mássica)	(% mássica)	
HLB-1-1	60	40	10,8
HLB-1-2	50	50	11,5
HLB-1-3	40	60	12,2
HLB-1-4	30	70	12,9
HLB-1-5	20	80	13,9
HLB-1-6	10	90	14,3
HLB-1-7	0	100	15

Tabela 4.5: Valores de HLBs testados para as emulsões preparadas com TS, usando FS e PS80 como tensoativos.

Formulação	FS	PS80	HLB
	(% mássica)	(% mássica)	
HLB-2-1	100	0	8,0
HLB-2-2	90	10	8,7
HLB-2-3	80	20	9,4
HLB-2-4	70	30	10,1
HLB-2-5	60	40	10,8
HLB-2-6	50	50	11,5
HLB-2-7	40	60	12,2
HLB-2-8	30	70	12,9
HLB-2-9	20	80	13,9
HLB-2-10	10	90	14,3
HLB-2-11	0	100	15

Tabela 4.6: Valores de HLBs testados para as partículas preparadas com TS, usando FS e PS80 como tensoativos.

Emulsão	FS	PS20	HLB
	(% mássica)	(% mássica)	
HLB-3-1	90	10	8,82
HLB-3-2	80	20	9,64
HLB-3-3	70	30	10,46
HLB-3-4	60	40	11,28

Tabela 4.7: Valores de HLBs testados para as partículas preparadas com TS, usando FS e PS60 como tensoativos.

Formulação	FS	PS 60	HLB
	(% mássica)	(% mássica)	
HLB-4-1	90	10	8,7
HLB-4-2	80	20	9,4
HLB-4-3	70	30	10,1
HLB-4-1	90	10	8,7

4.2.3 Produção das micropartículas lipídicas sólidas (MLS)

A fase lipídica foi aquecida 10 °C acima da maior temperatura de fusão dentre os lipídios empregados, e ao mesmo tempo foi feita uma solução aquosa, contendo o tensoativo, a qual foi aquecida até a mesma temperatura da mistura lipídica. A composição da solução de tensoativo foi escolhida com base nos resultados dos testes de equilíbrio hidrofílico-lipofílico (HLB). Adicionou-se o beta-caroteno na fase lipídica fundida, que foi dispersa na solução de tensoativo aquecida usando-se alta intensidade de agitação (em Ultra-Turrax IKA T25, IKA, Alemanha). Em seguida, a emulsão final foi deixada sob

agitação magnética, e então colocada sob banho de gelo até que atingisse cerca de 20° C. As amostras foram armazenadas em geladeira e retiraram-se alíquotas em tempos determinados para as análises de estabilidade. As formulações foram feitas em triplicata.

Micropartículas lipídicas sólidas de ácido esteárico: para a produção das MLS de ácido esteárico seguiu-se o protocolo geral apresentado, com a diferença de que metade do volume da solução com tensoativo foi aquecida até a mesma temperatura da mistura lipídica enquanto a outra metade foi resfriada até atingir 4°C, e acrescentada após a ultra-agitação (9000 rpm, 3 minutos). A mistura final foi então colocada sob agitação magnética durante 5 minutos, e a seguir em banho de gelo até que atingisse 20° C.

A Tabela 4.8 contendo as formulações das MLS de ácido esteárico escolhidas. Todas apresentam proporção mássica de 70:30 de ácido esteárico: óleo de girassol e 4% de tensoativo.

Tabela 4.8: Formulações de micropartículas lipídicas de ácido esteárico (volume total de amostra: 100 mL).

Formulação	Lipídio total (g)	Tensoativo (tipo)	Tensoativo (g)	β -caroteno (mg)	α -tocoferol (mg)
MLS-AE-6	6	PS80	4	45	22,5
MLS-AE-4	4	PS80	4	30	15
MLS-AE-6sT	6	PS80	4	45	0
MLS-AE-4sT	4	PS80	4	30	0

Micropartículas lipídicas sólidas de triestearina: estudos preliminares utilizando o mesmo protocolo de produção e as mesmas formulações das micropartículas lipídicas de ácido esteárico não resultaram em sistemas estáveis, apresentando uma distribuição de tamanho muito heterogênea. Tendo em vista este quadro, no caso das MLS com triesterina então acrescentou-se goma xantana na formulação como estabilizante, e ajustou-se os parâmetros tempo e velocidade utilizados na ultra-agitação, que foram reestabelecidos em

12000 rpm e 9 minutos. A etapa de agitação magnética passou a ter a duração de 15 a 20 minutos antes da imersão da dispersão em banho de gelo. As formulações escolhidas (70% de triestearina e 30% de óleo de girassol, em massa) estão expressas na Tabela 4.9:

Tabela 4.9: : Formulações das micropartículas lipídicas sólidas de triestearina (volume total de amostra: 100 mL).

Formulação	Lipídio total (g)	Tensoativo (g)	β -caroteno (mg)	Goma xantana (% mássica)
MLS-TS-PS20	4	4 (80% FS + 20% PS20)	30	0,05
MLS-TS-PS60-4	4	4 (80% FS + 20% PS60)	30	0,05
MLS-TS-PS60-6	6	4 (80% FS + 20% PS60)	30	0,05

4.2.4 Produção das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS)

O beta-caroteno e o lipídio fundido foram dispersos na solução quente de tensoativo 10° C acima da maior temperatura de fusão dentre os lipídios empregados na formulação, e a seguir esta mistura foi submetida à ultra-agitação (Ultra-Turrax IKA T25, IKA, Alemanha), onde foram formadas as MLS. Estas micropartículas foram, então, submetidas à homogeneização a alta pressão (Panda 2K, NS1001L, Niro Soavi, Itália), também a 10° C acima da maior temperatura de fusão do sistema. Foram empregados 1, 2 ou 3 ciclos de homogeneização, e a pressão no 1° estágio de homogeneização variou entre 350 e 500 bar, e no 2° estágio entre 0 e 70 bar. Após a etapa de homogeneização a alta pressão, a emulsão foi colocada em banho termostatizado até atingir 20° C.

É importante ressaltar que o equipamento de HAP utilizado possuía como limitações operacionais a pressão máxima de 1500 bar no 1° estágio de homogeneização, e a pressão máxima 2° estágio entre 50 a 150 bar.

Nanopartículas lipídicas sólidas de ácido esteárico: foram realizados diversos testes de varredura, variando os polisorbatos (20, 60 e 80) empregados, bem como as condições operacionais da ultra-agitação e do homogeneizador a alta pressão (número de passagens e pressão no 1º e 2º estágios de homogeneização). A melhor formulação, em termos de diâmetro médio de partícula e polidispersidade, bem como estabilidade durante 24 após a produção, foi a formulação contendo somente o tensoativo polisorbato 60, na concentração de 3%, submetida à ultra-agitação a 9000 rpm, durante 3 minutos. A pressão de homogeneização no 1º estágio foi de 500 bar, sem empregar o 2º estágio, e tanto as partículas produzidas com 1 etapa de homogeneização (1 passagem pelo homogeneizador) quanto 2 etapas (2 passagens pelo homogeneizador) foram avaliadas. A formulação e as condições operacionais escolhidas podem ser visualizadas na Tabela 4.10:

Tabela 4.10: Formulações das nanopartículas lipídicas sólidas de ácido esteárico, produzidas por homogeneização a alta-pressão.

Formulação	Lipídio total (g)	Tensoativo (g)	β-caroteno (mg)	Pressão de homogeneização (bar)*	Nº de passagens
NLS-AE-1	6 (70% AE, 30% OG)	3 (100% PS60)	30	P1 = 350 bar P2 = 0 bar	1
NLS-AE-2	6 (70% AE, 30% OG)	3 (100% PS60)	30	P1 = 350 bar P2 = 0 bar	2

*P1 = pressão no 1º estágio de homogeneização; P2 = pressão no 2º estágio de homogeneização

Nanopartículas lipídicas sólidas de triestearina: para a produção das nanopartículas lipídicas sólidas de triestearina, a mesma formulação e as mesmas condições operacionais de ultra-agitação (12000 rpm, 9 min) para a produção das MLS-TS se mostraram adequadas em termos de diâmetro médio de partícula e polidispersidade após a homogeneização a alta pressão. Para a produção das NLS de triestearina não foi necessário a utilização de goma

para estabilizar o sistema, como foi preciso para a produção das MLS. Em relação às condições operacionais de homogeneização a alta pressão, uma avaliação prévia mostrou que a melhor condição foi o primeiro estágio de homogeneização a 500 bar, sem empregar o segundo estágio, tanto para 1 quanto para 2 passagens. A Tabela 4.11 mostra as formulações e as condições operacionais de HAP escolhidas para a etapa seguinte, de avaliação de estabilidade do beta-caroteno encapsulado e caracterização físico-química do sistema:

Tabela 4.11: Formulações das nanopartículas lipídicas sólidas de triestearina, produzidas por homogeneização a alta-pressão.

Formulação	Lipídio total (g)	Tensoativo (g)	β -caroteno (mg)	Pressão de homogeneização (bar)*	nº de passagens
NLS-TS-1	6 (70% AE, 30% OG)	4 80% FS + 20% PS60)	30	P1 = 500 bar P2 = 0 bar	1
NLS-TS-2	6 (70% AE, 30% OG)	4 80% FS + 20% PS60)	30	P1 = 500 bar P2 = 0 bar	2

*P1 = pressão no 1º estágio de homogeneização; P2 = pressão no 2º estágio de homogeneização

4.2.5 Caracterização microestrutural e avaliação da estabilidade das partículas lipídicas sólidas

4.2.5.1 Determinação do diâmetro médio e da distribuição de tamanho de partícula

A distribuição de tamanho das MLS foi determinada por difração a laser, no Laboratório de Engenharia de Processos em Alimentos do Departamento de Engenharia de Alimentos do ZEA-FZEA-USP, em equipamento Sald-201V (Shimadzu Corporation, Japão).

O diâmetro médio das NLS foi determinado por espectroscopia de correlação de fótons (PCS, *photon correlation spectroscopy*). Tais análises foram realizadas no Laboratório de Colóides e Funcionalidade de Macromoléculas do Departamento de Engenharia de Alimentos do ZEA-FZEA-USP, em equipamento ZetaPlus (Brookhaven Instruments Company, EUA).

4.2.5.2 Determinação do potencial zeta

O potencial zeta foi determinado para as NLS, utilizando-se do princípio da mobilidade eletroforética, em equipamento ZetaPlus (Brookhaven Instruments Company, EUA), em 10 corridas de 3 ciclos cada, diluindo-se as partículas em solução 10 mM de KCl.

4.2.5.3 Análises térmicas

As análises térmicas, tanto das MLS quanto das NLS, foram feitas por DSC (calorimetria diferencial de varredura) em equipamento TA5000 (TA Instruments, EUA), em varreduras no intervalo 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 de alumínio vazio como referência.

4.2.5.4 Difratometria de raios-X (DRX)

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

4.2.5.5 Quantificação de beta-caroteno - MLS de ácido esteárico

Para a quantificação do beta-caroteno encapsulado via espectrofotometria, foi necessário extraí-lo das partículas lipídicas sólidas. A amostra de partículas foi diluída 50 vezes, e a 2 ml da amostra diluída adicionou-se 2,5 g de cloreto de sódio para desestabilização do sistema emulsionado. Após agitação em vórtex por 20 segundos, adicionou-se 10 ml de hexano, e a agitação ocorreu por mais 20 segundos. Após este procedimento, as amostras foram colocadas em ultrassom por 30 min. A seguir, realizou-se

a leitura da fase orgânica a 450 nm, que é o comprimento de onda de absorção máxima do beta-caroteno em hexano. Este protocolo foi uma adaptação do protocolo obtido em HENTSCHEL *et al.* (2008).

4.2.5.6 Determinação de beta-caroteno em MLS de triestearina

A determinação de beta-caroteno presentes nas MLS-TS foi realizada por colorimetria instrumental empregando-se o sistema CIE L*a*b*. Os parâmetros L* a* b* foram determinados em colorímetro Miniscan XE (Hunterlab, EUA), no Laboratório de Processos em Engenharia ZEA-FZEA-USP, e a partir deles foi calculado o parâmetro croma (C^*_{ab}) o ângulo de *Hue* (h^*_{ab}). Os parâmetros colorimétricos C^*_{ab} (intensidade ou pureza da cor) e, h^*_{ab} (cor verdadeira) podem ser calculados pelas Equações (1) e (2) respectivamente:

$$C^*_{ab} = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (1)$$

$$h^*_{ab} = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \quad (2)$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 DETERMINAÇÃO DO VALOR DO EQUILÍBRIO HIDROFÍLICO LIPOFÍLICO (HLB) DOS LIPÍDIOS

O valor de HLB, conforme definido por GRIFFIN (1949), é uma escala semi-empírica para seleção de tensoativos, que pode ajudar na escolha de uma composição ótima de agentes emulsificantes. No entanto, não se trata de um dado absoluto, pois a estabilidade de uma emulsão depende de diversos outros fatores, como, por ex., modo de produção e temperatura de armazenagem (TADROS, 2009).

Para estimar o melhor valor do HLB dos lipídios empregados, tomou-se como ponto de referência a emulsão que apresentou maior estabilidade do ponto de vista visual. As Tabelas 5.1 a 5.5 contêm os resultados observados para os HLBs dos lipídios testados.

Tabela 5.1: Resultados dos ensaios de determinação do HLB das partículas preparadas com AE, usando FS e PS80 como tensoativos.

Emulsão	HLB	Aspecto	Resultado
HLB-1-1	10,8	Inversão de fase	Ruim
HLB-1-2	11,5	Inversão de fase	Ruim
HLB-1-3	12,2	Inversão de fase	Ruim
HLB-1-4	12,9	Inversão de fase	Ruim
HLB-1-5	13,9	Inversão de fase	Ruim
HLB-1-6	14,3	Inversão de fase	Ruim
HLB-1-7	15	Homogêneo	Excelente

Tabela 5.2: Resultados dos ensaios de determinação do HLB das partículas preparadas com TS, usando PS80 e lecitina como tensoativos.

Emulsão	HLB	Aspecto	Resultado
HLB-2-1	8,0	Relativamente homogênea (grumos)	Bom
HLB-2-2	8,7	Relativamente homogênea (grumos)	Bom
HLB-2-3	9,4	Ocorreu floculação (sólido a T ambiente)	Ruim
HLB-2-4	10,1	Ocorreu floculação (sólido a T ambiente)	Ruim
HLB-2-5	10,8	Ocorreu floculação (sólido a T ambiente)	Ruim
HLB-2-6	11,5	Ocorreu floculação (sólido a T ambiente)	Ruim
HLB-2-7	12,2	Ocorreu floculação (sólido a T ambiente)	Ruim
HLB-2-8	12,9	Ocorreu floculação (sólido a T ambiente)	Ruim
HLB-2-9	13,9	Ocorreu floculação (sólido a T ambiente)	Ruim
HLB-2-10	14,3	Ocorreu floculação (sólido a T ambiente)	Ruim
HLB-2-11	15	Ocorreu floculação (sólido a T ambiente)	Ruim

Tabela 5.3: Resultados dos ensaios de determinação do HLB das partículas preparadas com TS, usando PS20 e lecitina como tensoativos.

Emulsão	HLB	Aspecto	Resultado
HLB-3-1	8,82	Homogênea, porém, extremamente viscosa	Bom
HLB-3-2	9,64	Leve separação de fase	Razoável
HLB-3-3	10,46	Leve separação de fase	Ruim
HLB-3-4	11,28	Leve separação de fase	Ruim

Tabela 5.4: . Resultados dos ensaios de determinação do HLB das partículas preparadas com TS, usando PS60 e lecitina como tensoativos.

Emulsão	HLB	Aspecto	Resultado
HLB-4-1	8,7	Levemente homogênea, porém muito viscosa	Bom
HLB-4-2	9,4	Homogênea, porém um pouco viscosa	Excelente
HLB-4-3	10,1	Extremamente viscosa	Razoável

Tabela 5.5: Formulações com os melhores resultados no teste de HLB.

Emulsão	HLB	Composição - tensoativos	Aspecto	Resultado
HLB-1-7	15	100% PS80	Homogêneo	Excelente
HLB-2-1	8,0	100% FS	Relativamente homogênea (grumos)	Bom
HLB-2-2	8,7	90% FS + 10% PS80	Relativamente homogênea (grumos)	Bom
HLB-3-1	8,8	90% FS + 10% PS20	Homogênea, porém, extremamente viscosa	Bom
HLB-4-2	9,4	80% FS + 20% PS60	Homogênea, porém um pouco viscosa	Excelente

Pelos dados obtidos e mostrados na Tabela 5.5, o HLB requerido para formulação de uma emulsão O/A com ácido esteárico puro está de acordo com a literatura (BECHER & SCHICK, 1987). Não foram encontrados dados para a triestearina para comparação; no entanto, do ponto de vista de compatibilidade química, que também é um pré-requisito extremamente importante para um sistema emulsionado estável, a composição de 80% FS + 20% PS60 é coerente, já que a FS empregada no estudo é hidrogenada, e possui 72% de cadeias de ácido esteárico. Por sua vez, o PS60 também é formado por cadeias de ácido esteárico, o que pode ter levado a alta compatibilidade química entre os componentes da formulação (envolvendo a conformação das cadeias de tensoativo, por exemplo, ao formar

a camada de estabilização das partículas emulsionadas), e, conseqüentemente, à estabilidade visual aparente (após 24h) da formulação HLB-4-2.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS MISTURAS LIPÍDICAS

5.2.1 Misturas de ácido esteárico e óleo de girassol

A caracterização microestrutural das misturas de ácido esteárico e óleo de girassol foi feita através de difratometria de raios-X (DRX), espectroscopia na região de infravermelho (FT-IR) e calorimetria diferencial de varredura (DSC).

Figura 5.1: Difratogramas de raios-X de misturas de lipídios contendo ácido esteárico e óleo de girassol.

A Tabela 5.6 mostra os dados obtidos através da análise dos difratogramas apresentados na Figura 5.1:

Tabela 5.6: Ângulos de difração, distâncias intermoleculares e intensidades de difração de raios-X das misturas de ácido esteárico e óleo de girassol.

100% AE			
Ângulo (2 θ)	2 θ (rad)	d (ângstrons)	Intensidade (U.A.)
6,7	0,117	13,2	11279
19,04	0,332	4,7	1673
20,44	0,357	4,4	2841
21,66	0,378	4,2	41250
24,22	0,423	3,8	9900

90% AE +10% OG			
Ângulo (2 θ)	2 θ (rad)	d (ângstrons)	Intensidade (U.A.)
6,17	0,108	14,3	32148
19,65	0,343	4,6	1204
23,81	0,416	3,8	4665
21,11	0,368	4,3	2275

70% AE +30% OG			
Ângulo (2 θ)	2 θ (rad)	d (ângstrons)	Intensidade (U.A.)
6,15	0,107	14,4	23562
21,11	0,368	4,3	3528
21,95	0,383	4,1	1310
23,81	0,416	3,8	3758

Nos difratogramas da Figura 5.1 observa-se que a adição de óleo de girassol alterou a microestrutura do sistema estudado, já na proporção mássica de 10%. Os picos característicos do ácido esteárico puro, a 2 θ 21.7° e 24.2°, se deslocaram ligeiramente para 21,1 e 23,8 graus, e também diminuíram significativamente de intensidade, indicando diminuição da caráter cristalino da mistura lipídica e da perda da predominância da características estruturais do ácido esteárico. Além da diminuição da intensidade dos picos,

no sistema contendo 10% de OG houve inversão da intensidade dos mesmos, indicando a formação de um composto que não é nem ácido esteárico nem OG, ou seja, de um *blend* entre os lipídios. Outra indicação da formação de um *blend* são os aumentos dos picos em ângulos baixos, como a 2θ $4,01^\circ$ e $6,17^\circ$, indicando que as cadeias de hidrocarboneto presentes na estrutura provavelmente foram obrigadas a se alongar. Na mistura contendo 30% de OG, além da diminuição dos mesmos picos característicos, pode-se também notar um pequeno desvio da linha de base do difratograma entre $2\theta=16^\circ$ e 20° , indicando maior amorfização do sistema produzido.

Por sua vez, as análises de calorimetria diferencial de varredura resultaram nos dados mostrados nas Figuras 5.2 a 5.4 e na Tabela 5.7:

Figura 5.2: Termograma obtido para o ácido esteárico puro

Figura 5.3: Termograma obtido para a mistura contendo 90% AE + 10% OG

Figura 5.4: Termograma obtido para a mistura contendo 70% AE + 30% OG

Tabela 5.7: Dados calorimétricos (obtidos por DSC) das misturas contendo ácido esteárico e óleo de girassol.

Mistura lipídica	T_m (oC)	T_o (oC)	ΔH_m (J/g)
AE puro	73,4	69,1	224
90% AE+10% OG	73,2	68,8	165
70% AE+30% OG	71,7	63,8	118

Pode-se perceber pelos dados obtidos nas análises de DSC que a adição de 30% de óleo de girassol nas misturas lipídicas abaixou em média 5° C a temperatura *onset* do sistema, indicando perturbação significativa na sua microestrutura, assim como o abaixamento de quase 50% no valor da entalpia de fusão. Além disso, os termogramas (Figuras 5.3 e 5.4) mostraram somente um pico de transição de fases (fusão), confirmando a completa mistura entre o ácido esteárico e o óleo de girassol, e a consequente formação de um *blend* no intervalo de temperaturas de interesse do presente trabalho, o que é altamente desejável para o sistema contendo micropartículas lipídicas sólidas a ser produzido utilizando esta proporção mássica de AE e OG.

Em relação aos dados obtidos pelas análises de espectroscopia na região de infravermelho, os resultados para as misturas podem ser vistos na Figura 5.5:

Figura 5.5: Espectro de FT-IR das amostras de misturas de lipídios contendo ácido esteárico, em comparação com os as matérias-primas puras empregadas.

Os espectros de FT-IR da Figura 5.5 mostram que as misturas analisadas retêm a característica principal do ácido esteárico, o que é esperado, pois se trata do componente em maior quantidade. O OG possui bandas características a 1744 e 1160 cm⁻¹, que podem ser também vistas nos espectros das misturas. No entanto, seria esperado que ao se aumentar a quantidade de OG nas misturas, tais bandas se mostraram mais intensas na mistura contendo 30% do que na mistura contendo 10% de óleo de girassol, o que não parece ter ocorrido. INOUE *et al.* (2004), ao estudar o comportamento sólido-líquido de misturas binárias de ácidos graxos de ácido esteárico e oléico, afirmam que se o espectro obtido para a mistura corresponder à exata sobreposição dos espectros para os componentes em separado, significa que eles coexistem separadamente na estrutura. No caso das misturas aqui analisadas, os espectros das misturas não correspondem à superposição exata dos espectros das substâncias isoladas, indicando, assim como foi sugerido pelas análises de DRX, que a mistura ácido esteárico e óleo de girassol, nas proporções testadas, forma um *blend*. Tal fato é de extrema importância para que tal mistura seja adequada para uso na

formulação de sistemas lipídicos sólidos micro e nanoparticulados, pois é uma forte indicação que tais sistemas serão homogêneos do ponto de vista microestrutural.

Outro resultado interessante que pode ser retirado das análises de FT-IR é a indicação da forma na qual se encontra o ácido esteárico utilizado. O polimorfismo dos ácidos carboxílicos tem sido discutido desde os anos 50, mas ainda é objeto de muita análise devido ao alto número de formas cristalinas que existem, e a similaridade entre suas estruturas, o que torna a identificação e a caracterização das mesmas uma tarefa complicada (MORENO *et al.*, 2007). Resumidamente, os ácidos graxos saturados com cadeias contendo número par de grupos metilênicos podem se arranjar nas poliformas A, B, C e E, sendo que ainda existem subtipos (politipismo) para cada poliforma (A_1 , A_2 , A_3 , A_{super} , B_o , B_m , E_o , E_m). Os espectros na região do infravermelho obtidos para o AE puro indicam que o material estudado se trata da poliforma E. As bandas características de tal poliforma E são as indicadas nos espectros de FT-IR do AE puro, na Figura 5.6, de acordo com MORENO *et al.* (2007).

Estas bandas características da poliforma E continuam existindo nos espectros de FT-IR das misturas contendo óleo de girassol. É possível entender então, como o óleo de girassol é rico em TAGs contendo ácido oléico e linoléico (insaturados, de 18 carbonos como o ácido esteárico), porque a característica vibracional do ácido esteárico foi mantida de acordo com os espectros de FT-IR. As cadeias insaturadas do OG provavelmente conseguiram se “acomodar” na estrutura da poliforma E do AE, formando o *blend* indicado pelos dados de DRX, mas não a ponto de conseguir mudar em grande extensão as interações características das moléculas de AE indicadas pelas análises de FT-IR. A calorimetria diferencial de varredura indica também que a temperatura de fusão do *blend* contendo 30% de OG foi somente cerca de 2° C menor que a temperatura de fusão do AE puro, apesar da indicação de perturbação da estrutura observada na alteração da temperatura *onset* (cerca de 5° C). Por sua vez, a alteração do valor da entalpia de fusão foi significativa, cerca de 52%, indicando também significativa perturbação na estrutura das misturas contendo 30% de OG em relação ao AE puro.

Figura 5.6: Bandas presentes no espectro de FT-IR indicativas da presença da poliforma E do ácido esteárico.

Desta forma, levando em conta os resultados obtidos por DRX, FT-IR e DSC, a mistura contendo 30% de OG foi escolhida como adequada para a produção das partículas lipídicas sólidas.

5.2.2 Misturas de triestearina e óleo de girassol

Os difratogramas de raios-X das misturas de lipídios contendo triestearina estão mostrados na Figura 5.7:

Figura 5.7: Difratoograma de raios-X das misturas de triestearina e óleo de girassol.

Os dados dos picos observados levam a concluir que todas as misturas analisadas estão na forma β' , devido aos picos relacionados com os espaçamentos de 4,2 e 3,8 ângstrons, característicos desta forma polimórfica dos triacilgliceróis. Apenas a mistura 70% TS + 30% OG apresentou um pico a $2\theta = 19,59^\circ$, ou uma distância característica de 4,6 ângstrons na estrutura analisada. Tal pico é, provavelmente, uma indicação de que pode existir uma pequena quantidade de forma β nesta mistura, simultaneamente com a forma β' . Em todos os casos, portanto, pode-se concluir que as misturas obtidas se recrystalizaram na forma mais estável, indicando serem boas opções para uso na produção de partículas lipídicas sólidas. Além disso, conforme é desejável em misturas a serem empregadas na produção de partículas lipídicas sólidas, houve amorfização significativa da estrutura das misturas analisadas. Desta forma, o uso da mistura contendo 30% de OG se mostra, muito provavelmente, adequado à produção das partículas lipídicas sólidas.

Tabela 5.8: Ângulos de difração, distâncias intermoleculares e intensidades de difração de raios-X das misturas de TS e OG.

100% TS			
Ângulo (2θ)	2θ (rad)	d (ângstrons)	Intensidade (U.A.)
21,22	0,370	4,3	12499
23,62	0,412	3,8	11642
90% TS + 10%OG			
Ângulo (2θ)	2θ (rad)	d (ângstrons)	Intensidade (U.A.)
21,25	0,371	4,3	8968
23,53	0,411	3,9	6561
70% TS + 30%OG			
Ângulo (2θ)	2θ (rad)	d (ângstrons)	Intensidade (U.A.)
19,59	0,342	4,6	6115
21,37	0,373	4,2	7517
23,63	0,412	3,8	6288

Figura 5.8: Termograma obtido por DSC para triestarina pura

Figura 5.9: Termograma obtido por DSC para mistura lipídica 90% TS + 10% OG.

Figura 5.10: Termograma obtido por DSC para mistura lipídica 70% TS + 30% OG.

Tabela 5.9: Dados calorimétricos (obtidos por DSC) das amostras das misturas lipídicas de contendo TS e OG.

Mistura lipídica	T _m (oC)	T _o (oC)	ΔH _m (J/g)
100% TS	61,81	59,08	157,3
90% TS + 10% OG	61,53	57,75	148,7
70% TS + 30% OG	60,24	56,54	113,8

Assim como no DSC das misturas lipídicas de ácido esteárico, a adição de 30% óleo de girassol nas misturas lipídicas de triestearina abaixou a temperatura onset do sistema (em 3° C) e diminuiu a entalpia de fusão em 30%, o que indica perturbação significativa da microestrutura. Os termogramas, que podem ser vistos nas Figuras 5.9 e 5.10, também mostram apenas um pico de transição de fase, confirmando mais uma vez a completa mistura entre a triestearina e o óleo de girassol e a formação de um *blend*.

5.3 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE E MICROESTRUTURA DAS MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS

5.3.1 Micropartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico

As micropartículas lipídicas sólidas de ácido esteárico, tanto produzidas com quanto sem tocoferol, encapsularam com sucesso o beta-caroteno. Todos os sistemas produzidos apresentaram aspecto homogêneo e não flocluraram. A Figura 5.11 mostra o aspecto dos sistemas lipídicos sólidos microparticulados produzidos com 6 e 4% (porcentagens mássicas) de lipídio total (ácido esteárico e óleo de girassol), aqui denominados MLS-AE:

Figura 5.11: Aspecto das formulações das micropartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico (MLS-AE, 6% e 4% de lipídio total).

As análises de distribuição de tamanho de partícula em intensidade ao longo do tempo de armazenagem resultaram nos perfis mostrados nas Figuras 5.12 a 5.15. Os perfis mostrados correspondem à média das medidas obtidas para as amostras (produzidas em triplicata), estando representados também os respectivos desvios-padrão:

Figura 5.12: Perfis de distribuição de tamanho de partícula para as MLS-AE contendo 6% de lipídio total e tocoferol, ao longo do tempo de armazenagem (7 meses).

Figura 5.13: Perfis de distribuição de tamanho de partícula para as MLS-AE contendo 4% de lipídio total e tocoferol, ao longo do tempo de armazenagem (7 meses).

Figura 5.14: Perfis de distribuição de tamanho de partícula para as MLS-AE contendo 6% de lipídio total, sem tocoferol, ao longo do tempo de armazenagem (6 meses).

Figura 5.15: Perfis de distribuição de tamanho de partícula para as MLS-AE contendo 4% de lipídio total, sem tocoferol, ao longo do tempo de armazenagem (6 meses).

Todas as amostras, independente da concentração de lipídio total, e da presença de α -tocoferol, se mostraram extremamente estáveis durante o longo tempo de estocagem, em relação à distribuição do tamanho de partícula. Observando os gráficos, entretanto, pode-se perceber que os sistemas contendo o antioxidante, especialmente as dispersões contendo 4% de lipídio total, se mostraram mais estáveis.

A explicação para tal grau de estabilidade, provavelmente, não se resume a uma só causa, mas sim se deve a uma conjunção de fatores. Primeiramente, para que um sistema emulsionado seja estável, a química de superfície, a dinâmica de adsorção, a reologia superficial e a cinética dos fenômenos físico-químicos são todos fenômenos importantes (DUHKIN *et al.*, 2006). A química de superfície e a dinâmica de adsorção estão relacionadas com os seguintes fatores (GRANT *et al.*, 2000): o equilíbrio da estrutura da(s) camada(s) adsorvida(s) se origina do balanço de diversas forças, como a atração hidrofóbica entre as caudas dos tensoativos; interações estéricas repulsivas entre as cabeças polares dos tensoativos; fatores de empacotamento das moléculas de emulsificantes.

Em segundo lugar, interações adicionais entre o núcleo da emulsão (neste caso, o núcleo sólido de lipídio) e as porções hidrofílicas e hidrofóbicas do tensoativo precisam ser consideradas. Dados na literatura (TANAKA *et al.*, 2007) indicam que a interpenetração entre as cadeias hidrofóbicas presentes no núcleo da emulsão no interior da porção hidrofóbica das camadas de tensoativo efetivamente ocorrem. Os autores demonstraram que a capacidade de ocorrência deste fenômeno depende do tamanho das cadeias hidrofóbicas, e que a diferença entre os tipos de cadeia presentes no núcleo da emulsão e nos tensoativos diminui a interpenetração. Em outras palavras, quanto mais similares a parte hidrofóbica das moléculas emulsionadas e as moléculas de tensoativo, mais intensa a interpenetração na interface das partículas.

Desta forma, por este ponto de vista, no caso do sistema estudado, como todos os componentes (ácido esteárico, óleo de girassol e polisorbato 80) são ricos em cadeias de 18 carbonos, provavelmente houve a ocorrência de interações intercadeia extremamente favoráveis ocorrendo na superfície das partículas lipídicas sólidas.

Em terceiro lugar, como a concentração de polisorbato 80 no sistema estava bem acima de sua CMC (concentração micelar crítica), e a armazenagem se deu a baixa

temperatura, o que proporcionou um firme empacotamento das moléculas de tensoativo ao redor das partículas de lipídio sólido. De acordo com estudos de nanotribologia conduzidos por GRACA *et al.* (2007), os polisorbatos (20, 40, 60 e 80) formam monocamadas estabilizantes robustas, com propriedades lubrificantes dominadas por um plano de escorregamento altamente dissipativo. Tal conclusão pode, no caso do trabalho aqui descrito, ser relacionado com o fato de a mobilidade das camadas interfaciais estar intimamente ligada com a estabilidade de emulsões. O tipo de tensoativo influencia na mobilidade tangencial da interface das partículas (KRUGLYAKOV, 2000), e, portanto, na velocidade de desestabilização (sedimentação ou *creaming*), sendo que, por este motivo, um dos mecanismos de estabilização de emulsões é a formação de um filme de tensoativo interfacial coeso ao redor das partículas.

Portanto, agindo de forma conjunta, tais características - compatibilidade química dos componentes da formulação e formação de uma camada estabilizante altamente resistente à deformação devido às colisões e interações eletrostática entre as partículas – levaram à ausência de mudanças ou pequenas alterações na distribuição de tamanho de partícula nas formulações MLS-AE-4 e MLS-AE-6.

Em relação à preservação do beta-caroteno encapsulado durante a armazenagem, no entanto, houve, a princípio, diferenças entre os sistemas contendo 6 e 4% de lipídio total, como pode ser visto na Figura 5.16:

Figura 5.16: Perfis temporais de degradação do beta-caroteno nas MLS-AE contendo tocoferol: (a) em termos de concentração (em mg/L de dispersão); (b) em termos de % de beta-caroteno preservado.

Ao se analisar a razão massa β -caroteno/massa lipídio, entretanto, nota-se claramente que em ambos os sistemas, independentemente da concentração inicial de carotenóide, há uma concentração-limite a qual é preservada ao longo do tempo de armazenagem. Só para fins de comparação, esta concentração de β -caroteno é comparável à concentração deste carotenóide em cenouras desidratadas cozidas (DAMODARAN *et al.*, 2010).

Figura 5.17: Perfil temporal de degradação do beta-caroteno encapsulado, em termos da razão mg beta-caroteno/g lipídio total.

A adição de alfa-tocoferol parece ter influenciado decisivamente na conservação do beta-caroteno microencapsulado, conforme pode ser visto na degradação deste composto segundo a Figura 5.18, construída para as MLS contendo 6 e 4% de lipídio total, sem tocoferol:

Figura 5.18: Perfis temporais de degradação do beta-caroteno nas MLS-AE sem tocoferol: (a) em termos de concentração (em mg/L); (b) em termos de % de beta-caroteno preservado (em relação à concentração de beta-caroteno na amostra no dia inicial).

Resultados muito semelhantes foram obtido por HENTSCHEL *et al.* (2008), que empregaram nanopartículas lipídicas sólidas para encapsulação de beta-caroteno. Na ausência de α -tocoferol, nas dispersões por eles testadas contendo 10% de lipídio total (uma mistura de mono e diestearatos, mono e dipalmitatos e ácidos graxos livres C14 a C18) e a mesma concentração inicial de β -caroteno empregada neste trabalho, todo o carotenóide havia sido oxidado em 20 dias de armazenagem. TRIPLETT & RATHMAN (2009), por sua vez, conseguiram manter por 1 mês a concentração inicial de beta-caroteno em nanopartículas lipídicas sólidas formuladas com ácido esteárico e triestearina, com lecitina de soja e sais de bile como tensoativos, sem utilizar α -tocoferol.

HENTSCHEL *et al.* (2008) também notaram que as amostras sem tocoferol foram instáveis em relação ao tamanho médio de partícula, ao longo do tempo de armazenagem. De tal observação, semelhante à que aqui se mostra, pode-se inferir que a degradação do beta-caroteno por oxidação pelo oxigênio presente no meio e radicais livres, que por sua vez podem desencadear a autooxidação, provocam a alteração da microestrutura das partículas, uma vez que tais reações alteram a composição original do meio particulado, já que podem produzir dezenas de sub-produtos diferentes. Tais moléculas podem alterar a organização microestrutural das partículas, desestabilizando-as.

A Figura 5.19 ilustra a aparência das MLS de ácido esteárico, em todos os sistemas testados, após um determinado período de armazenagem:

Figura 5.19: (a) MLS-AE-6 após 75 dias de armazenagem; (b) MLS-AE-4 após 75 dias de armazenagem; (c) MLS-AE-6sT 45 dias de armazenagem; (d) M) MLS-AE-4sT após 45 dias de armazenagem.

Em relação à difratometria de raios-X, foram feitas análises ao longo do tempo apenas nas amostras contendo tocoferol, pois estas se mostraram estáveis na conservação do beta-caroteno. A Figura 5.20 ilustra os difratogramas das MLS-AE com 6% e 4% de lipídio total:

Figura 5.20: Difratogramas de raios-X das micropartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico e óleo de girassol, contendo tocoferol: (a) MLS-AE-6; (b) MLS-AE-4

As Tabelas 5.10 e 5.11 mostram os dados referentes aos ângulos detectados pelas análises de DRX para as micropartículas de ácido esteárico contendo 6 e 4% de lipídio respectivamente.

Pelos difratogramas apresentados na Figura 4.20, e os dados nas Tabelas 5.10 e 5.11, pode-se verificar que não houve alteração microestrutural significativa das MLS-AE no período de estocagem. Observa-se que o tempo de armazenagem alterou ligeiramente a microestrutura do sistema, pois os picos característicos presentes no início do armazenamento (2 entre 20 e 24 graus) se deslocaram levemente para o sentido da diminuição das distâncias intermoleculares, e tiveram um aumento médio de intensidade. Além disso, ocorreu a aparição de um pico a baixo ângulo (2θ próximo a 6 graus), indicando que provavelmente houve um alongamento das cadeias de hidrocarboneto dos lipídios da formulação ao longo do primeiro mês de armazenagem.

Tabela 5.10: : Ângulos de difração, distâncias intermoleculares e intensidades de difração de raios-X das amostras de MLS produzidas com ácido esteárico e óleo de girassol, com 6% de lipídio total (MLS-AE-6).

MLS-AE-6 – amostra fresca			
Ângulo (2θ)	2θ (rad)	d (ângstrons)	Intensidade (U.A.)
20,88	0,364	4,3	4330
23,7	0,414	3,8	1552
MLS-AE-6 - 1 mês			
Ângulo (2θ)	2θ (rad)	d (ângstrons)	Intensidade (U.A.)
6,14	0,107	14,4	511
20	0,349	4,5	1239
21,26	0,371	4,3	5940
24,02	0,419	3,8	1875
MLS-AE-6 - 6 meses			
Ângulo (2θ)	2θ (rad)	d (ângstrons)	Intensidade (U.A.)
6,06	0,106	14,6	773
19,62	0,342	4,6	1063
20,82	0,363	4,3	4679
23,64	0,413	3,8	1858

Tabela 5.11: Ângulos de difração, distâncias intermoleculares e intensidades de difração de raios-X das amostras de MLS produzidas com ácido esteárico e óleo de girassol, com 6% de lipídio total (MLS-AE-4).

MLS-AE-4 – Amostra fresca			
Ângulo (2 θ)	2 θ (rad)	d (ângstrons)	Intensidade (U.A.)
19,8	0,345	4,6	853
21,0	0,367	4,3	5170
23,1	0,403	3,9	1731
MLS-AE-4 - 1 mês			
Ângulo (2 θ)	2 θ (rad)	d (ângstrons)	Intensidade (U.A.)
6,1	0,107	14,6	520
20	0,349	4,5	1170
21,2	0,369	4,3	5960
24	0,419	3,8	1918
MLS-AE-4 - 6 meses			
Ângulo (2 θ)	2 θ (rad)	d (ângstrons)	Intensidade (U.A.)
6,1	0,106	14,6	534
21	0,367	4,3	3721
23,6	0,413	3,8	1452

Mesmo tendo ocorrido um pequeno aumento no caráter cristalino, essa mudança não foi suficiente para interferir na estabilidade dos sistemas lipídicos microparticulados, pois como constatado pelas demais análises, tais partículas se mostram estáveis, em termos de distribuição de tamanho de partícula, ao longo do tempo.

Por sua vez, as análises de calorimetria diferencial de varredura foram realizadas com as amostras de MLS-AE no dia da preparação e no final do período de armazenamento, e os resultados obtidos podem ser visualizados nas Figuras 5.21 e 5.22, e na Tabela 5.12:

Figura 5.21: Termogramas obtidos por DSC para as micropartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico e óleo de girassol, com 4 e 6% de lipídio total (MLS-AE-4 e MLS-AE-6).

Figura 5.22: Termogramas obtidos por DSC para as micropartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico e óleo de girassol, com 4 e 6% de lipídio total, sem tocoferol (MLS-AE-4sT e MLS-AE-6sT).

Tabela 5.12: Dados calorimétricos das amostras de micropartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico e óleo de girassol.

Formulação	Tempo de armazenagem	T _{onset} (°C)	T _{fusão} (°C)	ΔH _m (J/g)
MLS-AE-6	amostra fresca	64,05	65,04	7,64
	6 meses	59,57	64,93	7, 89
MLS-AE-4	amostra fresca	60,35	64,12	3,78
	6 meses	59,66	64,94	5,14
MLS-AE-6sT	amostra fresca	62,13	64,67	4,87
	6 meses	64,54	67,32	10,1
MLS-AE-4sT	amostra fresca	60,48	64,17	3,98
	6 meses	65,13	67,40	6, 53

As amostras com formulação MLS-AE-4 não mostraram praticamente nenhuma alteração em seu comportamento térmico. Somente a entalpia de fusão mostrou um aumento de 13%, o que pode estar relacionado com a pequena mudança estrutural indicada pela difratometria de raios-X. Já as amostras MLS-AE-6 tiveram alteração significativa em sua temperatura *onset*, ou seja, na temperatura onde se inicia a transição de fases (fusão). Tal alteração se deu na forma de diminuição de 4° C, indicando que, provavelmente, houve durante a armazenagem uma alteração (também indicada pelas análises de DRX) que provocou um maior número de “defeitos” na estrutura cristalina, o que pode ajudar a entender a razão do decaimento da concentração de β -caroteno após o primeiro mês de armazenagem.

5.3.2 Micropartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina

As MLS produzidas com triestearina (aqui denominadas MLS-TS) encapsularam o beta-caroteno com sucesso, mas não se mostraram estáveis, floculando após poucas horas de terem sido produzidas. Decidiu-se então tentar estabilizar o sistema através da adição de um hidrocolóide como espessante (goma xantana). Tal estratégia se mostrou muito bem-sucedida, para as partículas com polisorbato 60, pois os sistemas se mostraram estáveis tanto do ponto de vista de diâmetro médio e distribuição de tamanho de partícula quanto da preservação do beta-caroteno encapsulado. As partículas com polisorbato 80 (MLS-TS-PS80) não se mostraram estáveis nem com a adição de goma xantana ao sistema, sendo que após 24h de armazenagem ocorreu separação de fases. Já as micropartículas com polisorbato 20 (MLS-TS-PS20), apesar de terem se mostrado estáveis em relação ao beta-caroteno encapsulado, apresentaram instabilidade no diâmetro médio e distribuição do tamanho de partícula logo no primeiro mês de armazenamento. Tal fato pode ser percebido a partir da análise das Figuras 5.24 a 5.26, que mostram a distribuição de tamanho de partícula dos sistemas ao longo do tempo.

Na Figura 5.23 podem ser vistas as dispersões das micropartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de girassol, com PS60 como tensoativo e goma xantana como espessante:

Figura 5.23: Aspecto das formulações de micropartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina (MLS-TS-PS60, 6% e 4% de lipídio total).

Figura 5.24 Perfis de distribuição de tamanho de partícula para as MLS-TS-PS60-6 ao longo do tempo de armazenagem (5 meses).

Figura 5.25: Perfis de distribuição de tamanho de partícula para as MLS-TS-PS60-4 ao longo do tempo de armazenagem (6 meses).

Figura 5.26: Perfis de distribuição de tamanho de partícula para as MLS-TS-PS20 ao longo do tempo de armazenagem (57 dias).

Em relação à distribuição de tamanho de partícula, os dados mostram que o sistema lipídico microparticulado produzido com triestearina e polisorbato 20 (cadeia alifática laurato, C12) + fosfatidilcolina de soja como tensoativos não se mostrou estável, tendo ocorrido floculação logo durante a segunda semana de armazenagem sob refrigeração. A curta cadeia hidrofóbica do PS20, somada à sua falta de compatibilidade com as cadeias da FS, podem ter sido fatores determinantes para a formação de uma camada de tensoativo incapaz de resistir às colisões entre as partículas, mesmo na presença do espessante goma xantana.

Dentre os sistemas emulsificados com PS60 e FS, através das Figuras 5.24 e 5.25 pode-se perceber que o mais estável foi o MLS-TS-PS60-4, que continha menor concentração de lipídio total. Até o 4º mês de estocagem, este sistema se manteve resistente à coagulação e posterior floculação, na presença de goma xantana.

Os resultados de estabilidade do beta-caroteno encapsulado nos sistemas MLS-TS-PS60-4 e MLS-TS-PS60-6 podem ser vistos na Figura 5.27. Não foram realizadas análises através de espectrofotometria, pois não foi possível reproduzir a extração do beta-caroteno na presença da goma xantana. Optou-se, então, pela avaliação da concentração do carotenóide de forma indireta, por colorimetria instrumental:

Figura 5.27: Estabilidade temporal do beta-caroteno encapsulado nas micropartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de girassol (MLS-TS-PS60), medida por colorimetria instrumental: (a) parâmetros a^* e b^* ; (b) parâmetro L^* .

Como pode ser percebido pela análise da Figura 5.27, os valores do parâmetro b^* decaíram muito pouco ao longo do tempo, o que ocorreu a partir do 4º mês, tanto para a MLS-TS-PS60-4 quanto para a MLS-TS-PS60-6, sugerindo declínio da cor amarela. O parâmetro a^* apresentou a mesma tendência, com a diferença de que a queda no 5 e 6º mês foram menos pronunciadas, o que indica que o parâmetro para cor vermelha variou muito pouco, mesmo porque já era bem menos intenso que o da cor amarela, predominante no sistema. Já o parâmetro L^* apresentou um pequeno aumento nesses dois últimos meses, ao mesmo tempo indicando que a amostra começou a ficar um pouco mais clara, ou seja, a apresentar uma coloração mais esbranquiçada, que deve ter ocorrido como consequência do decaimento das cores vermelhas e amarela, decorrente da degradação do beta-caroteno.

A partir dos parâmetros do sistema $L^*a^*b^*$ foram calculados, através das Equações (1) a (3), os parâmetros croma (C^*_{ab}) e o ângulo de Hue (h^*_{ab}), que estão apresentados na Figura 5.28.

Figura 5.28: Estabilidade temporal do beta-caroteno encapsulado nas micropartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de girassol (MLS-TS-PS60) mostrada através dos parâmetros: (a) croma (C^*_{ab}); (b) ângulo de Hue (h^*_{ab}).

O parâmetro croma, que indica pureza ou intensidade da cor, claramente diminuiu ao longo do tempo de armazenagem para ambas as amostras de MLS-TS, especialmente após o 4º mês de armazenagem. O ângulo de Hue, que indica a cor propriamente dita, permaneceu durante todo o período na região do amarelo, conforme esperado.

As Figuras 5.29 e 5.30 mostram os parâmetros colorimétricos instrumentais para as MLS-TS-PS20:

Figura 5.29: Estabilidade temporal do beta-caroteno encapsulado nas micropartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de girassol (MLS-TS-PS20), medida por colorimetria instrumental: (a) parâmetros a^* e b^* ; (b) parâmetro L^* .

Figura 5.30: Estabilidade temporal do beta-caroteno encapsulado nas micropartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de girassol (MLS-TS-PS20) mostrada através dos parâmetros: (a) croma (C^*_{ab}); (b) ângulo de Hue (h^*_{ab}); (c) diferença de cor (ΔE^*_{ab}).

Para este sistema, todos os parâmetros colorimétricos se mantiveram aparentemente estáveis, mesmo com a instabilidade em relação à distribuição de diâmetro de partícula. Pode-se perceber, entretanto, que para as variáveis mais significativas (b^* , croma e ângulo de Hue), os desvios-padrão foram muito altos, o que pode ser reflexo desta instabilidade do sistema durante o processo de obtenção destes dados.

A goma xantana provavelmente tornou viável a produção das MLS-TS porque os hidrocolóides podem ser adicionados para aumentar a viscosidade da fase aquosa, modificando a sua reologia, o que retarda o movimento ascendente das partículas da emulsão, ou seja, reduz a sua mobilidade (MCCLEMENTS, 2000; DOLZ *et al.*, 2007; DICKINSON, 2009; KRSTONOSIC *et al.*, 2009). A eficácia da adição dos hidrocolóides depende da sua concentração na fase aquosa, bem como das características estruturais do sistema. Em determinadas concentrações, forma-se uma rede tridimensional de moléculas na fase contínua, que retém as partículas e inibe o seu movimento, pois a viscosidade torna-se mais alta e confere propriedades elásticas adicionais ao sistema, o que inibe fortemente o *creaming* da emulsão (MCCLEMENTS, 2000; QUINTANA *et al.*, 2002; CORRIAS *et al.*, 2008; KRSTONOSIC *et al.*, 2009).

Decidiu-se acrescentar a goma xantana ao sistema das MLS-TS somente na agitação magnética, pois, segundo TIPVARAKARNKOON *et al.* (2010) os hidrocolóides podem ser acrescentados ao sistema antes ou depois da emulsificação, o que dependerá da estabilidade mecânica das moléculas durante o processamento, porém, algumas gomas, por exemplo, podem ser destruídas durante a homogeneização de alto cisalhamento.

A goma xantana é um heteropolissacarídeo com uma estrutura primária composta de repetidas unidades pentassacarídicas, formadas por glicose, manose e ácido glicurônico. A ligação final da manose pode quelar os íons de metais pro – oxidantes e inibir a oxidação lipídica (QUINTANA *et al.*, 2002; DIAZ *et al.*, 2004; SUN *et al.*, 2007). Essa provavelmente seja a explicação do porque não foi necessário utilizar-se aqui o alfa-tocoferol para a preservação do beta-caroteno, assim como foi preciso para as MLS-AE.

Assim como os demais hidrocolóides acrescentados em emulsões, a eficácia da goma xantana dependerá da sua concentração na fase aquosa e das características estruturais do sistema. O aumento da concentração de xantana causa aumento na

viscosidade da emulsão, e alguns autores concluíram que tal substância pode induzir a floculação em uma determinada taxa de concentração, sendo esta relatada como crítica entre 0,01 e 0,08% (KRSTONOSIC *et al.*, 2009). Já DICKINSON (2009) diz que tal concentração crítica, apesar de ser baixa, pode chegar perto de 0,1%. Tais resultados concordam com o apresentado no presente trabalho, que utiliza concentrações de 0,05 desse biopolímero no sistema.

As análises de calorimetria diferencial de varredura e de difratometria de raios-X feitas ao longo do tempo foram realizadas apenas nas amostras estabilizadas com polisorbato 60, pois como já foi dito, somente estas se mostraram estáveis quanto ao diâmetro médio e distribuição do tamanho de partícula.

A Tabela 5.13 apresenta os dados colorimétricos obtidos por DSC das amostras de micropartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de girassol, tendo polisorbato 60 como tensoativo, no início e no final do período de armazenamento, e a Figura 5.31 os termogramas:

Tabela 5.13: Dados calorimétricos (obtidos por DSC) das amostras de micropartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de girassol, com polisorbato 60 e fosfatidilcolina de soja como tensoativo.

Formulação	Tempo de armazenagem	T _{onset} (°C)	T _{fusão} (°C)	ΔH _m (J/g)
MLS-TS-PS60-6	Amostra fresca	50,8	56,8	7,64
	6 meses	50,8	57,4	9,78
MLS-TS-PS60-4	Amostra fresca	51,2	57,2	7,15
	6 meses	54,2	57,9	9,31

Figura 5.31: Termogramas obtidos por DSC para as micropartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de girassol, com 4 e 6% de lipídio total (MLS-TS-PS60-4 e MLS-TS-PS60-6).

Nas MLS-TS com 6% de lipídio a temperatura de fusão e a temperatura *onset* permaneceram basicamente inalteradas ao longo do tempo de estocagem, indicando que não houve aumento dos “defeitos” na estrutura cristalina das MLS-TS.

Quanto às análises de difratometria, seus resultados podem ser observados na Figura 5.32 e nas Tabelas 5.15 e 5.16:

Figura 5.32: Difrátogramas de raios-X da micropartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de girassol e polisorbato 60+FS como tensoativos: (a) 4% de lipídio total; (b) 6% de lipídio total.

Tabela 5.14: Ângulos de difração, distâncias intermoleculares e intensidades de difração de raios-X das micropartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de girassol, com polisorbato 60 e fosfatidilcolina de soja como tensoativos (4% de lipídio total).

MLS-TS-PS60-4 – amostra fresca			
Ângulo (2θ)	2θ (rad)	d (ângstroms)	Intensidade (U.A.)
18,76	0,327	4,8	557
19,26	0,336	4,7	493
20,5	0,358	4,4	1289
22,94	0,400	4,0	745
MLS-TS-PS60-4 - 1 mês			
Ângulo (2θ)	2θ (rad)	d (ângstroms)	Intensidade (U.A.)
18,86	0,329	4,8	807
20,74	0,362	4,4	1673
22,8	0,398	4,0	924
MLS-TS-PS60-4 - 6 meses			
Ângulo (2θ)	2θ (rad)	d (ângstroms)	Intensidade (U.A.)
18,78	0,328	4,8	942
20,58	0,359	4,4	1772
22,86	0,399	4,0	955

Tabela 5.15: : Ângulos de difração, distâncias intermoleculares e intensidades de difração de raios-X das das micropartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de girassol, com polisorbato 60 e fosfatidilcolina de soja como tensoativos (6% de lipídio total)

MLS-TS-PS60-6 – amostra fresca			
Ângulo (2 θ)	2 θ (rad)	d (ângstrons)	Intensidade (U.A.)
18,9	0,329	4,8	967
20,7	0,361	4,4	2070
22,9	0,401	3,9	1142

MLS-TS-PS60-6 – 1 mês			
Ângulo (2 θ)	2 θ (rad)	d (ângstrons)	Intensidade (U.A.)
18,7	0,329	4,8	1096
19,1	0,333	4,7	1116
20,8	0,363	4,3	2107
26,6	0,464	3,4	1225

MLS-TS-PS60-6 – 6 meses			
Ângulo (2 θ)	2 θ (rad)	d (ângstrons)	Intensidade (U.A.)
18,8	0,329	4,8	1005
20,5	0,358	4,4	1714
22,8	0,398	4,0	1116

A partir dos dados contidos nas Tabelas 5.14 e 5.15 pode-se notar um pequeno aumento na intensidade dos picos das micropartículas ao longo do tempo de armazenagem, indicando ligeiro aumento da cristalinidade (o que pode ter causado também o pequeno aumento da entalpia de fusão mostrado na Tabela 5.14) e a presença das formas polimórficas estáveis β e β' . A forma α não foi encontrada na estrutura das MLS-TS.

5.4 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE E MICROESTRUTURA DAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS

5.4.1 Nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico

As nanopartículas lipídicas sólidas de ácido esteárico escolhidas, que apresentaram os melhores valores de tamanho médio de partícula, polidispersidade e potencial zeta, foram as formulações NLS-AE-1 e NLS-AE-2 e podem ser vistas na Figura 5.33.

Figura 5.33: Aspecto das formulações de nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico

Os valores de potencial zeta e polidispersidade das nanopartículas de ácido esteárico ao longo do tempo de armazenagem podem ser vistos Figura 5.34.

Figura 5.34: Perfis temporais: (a) potencial zeta e (b) índice de polidispersidade das nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico e óleo de girassol, com polisorbato 60 e FS como tensoativos.

O perfil de diâmetro médio de partícula ao longo do tempo de armazenagem é apresentado nas Figura 5.35, e corresponde à média das triplicatas. Já as porcentagens cumulativas e as curvas de frequência estão indicados na Figura 5.36, e correspondem aos perfis de apenas uma amostra.

Figura 5.35: Perfil temporal do diâmetro médio das nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico e óleo de girassol.

Figura 5.36: Perfis das porcentagens cumulativas e das curvas de frequência ao longo do tempo de armazenagem das nanopartículas lipídica sólidas produzidas com ácido esteárico e óleo de girassol.

Observando-se as Figuras 5.34 e 5.35 é possível notar que tanto a NLS-AE-1 quanto a NLS-AE-2 apresentaram aumento no tamanho das partículas ao longo do tempo de armazenagem. Porém, o tamanho das partículas para ambos os tipos de partículas mostrou-se estável, tendo atingido valores praticamente iguais (cerca de 750 nm) após 2 meses de estocagem. O índice de polidispersidade, entretanto, se manteve praticamente igual ao longo dos 4 meses, apesar deste aumento de diâmetro médio, reflexo do fato de as duas populações de partículas terem se deslocado no sentido de aumentar seus valores de diâmetro médio, conforme pode ser verificado nas Figuras 5.36(a) e 5.36(b).

O potencial zeta também aumentou com o decorrer da tempo, mas alcançou um patamar em cerca de -25 mV, ainda extremamente adequado para auxiliar na manutenção de um sistema coloidal estável.

A estabilidade do beta-caroteno encapsulado nas NLS-AE foi estimada a partir de dados colorimétricos do sistema CIE $L^*a^*b^*$, e de extração do carotenóide.

Figura 5.37 Estabilidade temporal do beta-caroteno encapsulado nas nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico e óleo de girassol, inferida por colorimetria instrumental e expressa no sistema CIE $L^*a^*b^*$: (a) parâmetros a^* e b^* ; (b) parâmetro L^* .

Figura 5.38: Estabilidade temporal do beta-caroteno encapsulado nas nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico e óleo de girassol, medida por colorimetria instrumental: (a) croma (C^*_{ab}) e (b) ângulo de Hue (h^*_{ab}).

Os parâmetros colorimétricos indicam que a cor amarela do sistema (parâmetro b^*) decaiu ligeiramente ao longo do tempo de armazenagem, bem como o parâmetro L^* , indicando que a amostra começou a ficar um pouco mais clara, ou seja, a apresentar uma coloração mais esbranquiçada, que deve ter ocorrido como consequência do decaimento da cor amarela, decorrente da degradação do beta-caroteno.

Figura 5.39: Perfis temporais de degradação do beta-caroteno nas nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico e óleo de girassol: (a) em termos de concentração (em mg beta-caroteno/L de dispersão); (b) em termos de % de beta-caroteno preservado.

Em termos quantitativos, os perfis mostrados na Figura 5.38 também indicam uma ligeira queda na concentração de beta-caroteno nas NLS-AE, muito semelhante, independente do fato de ter passado por 1 ou 2 passagens no HAP. Até o 2º mês de armazenagem, entretanto, o carotenóide encapsulado se manteve praticamente livre de degradação nas NLS-AE.

A Figura 5.40 mostra o decaimento temporal do β -caroteno em função da razão entre a massa da molécula isoprenóide e da massa de lipídio:

Figura 5.40: Perfil temporal de degradação do beta-caroteno encapsulado, em termos da razão mg beta-caroteno/g lipídio total, para nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico e óleo de girassol.

Novamente, a razão massa de β -caroteno/massa de lipídio total preservada gira em torno de 0,5 mg/g, o mesmo valor obtido para os período de estabilidade das MLS.

As análises de calorimetria diferencial de varredura forneceram os termogramas mostrados na Figura 5.41 e os dados listados na Tabela 5.17:

Figura 5.41: Termogramas (obtidos por DSC) das nanopartículas lipídica sólidas produzidas com ácido esteárico e óleo de girassol, usando polisorbato 60 e fosfatidilcolina de soja como tensoativos.

Tabela 5.16: Dados calorimétricos das amostras de NLS-AE.

Formulação	Tempo de armazenagem	T_{onset} (°C)	$T_{\text{fusão}}$ (°C)	ΔH_m (J/g)
NLS-6-AE-1	Amostra fresca	64,6	66,9	6,12
	4 meses	64,6	67,2	7,92
NLS-6-AE-2	Amostra fresca	65,1	67,8	7,22
	4 meses	65,1	67,6	7,58

Os dados calorimétricos apresentados na Tabela 5.16 indicam que não houve qualquer alteração nas temperaturas de fusão e *onset*, assim como na entalpia de transição de fase no decorrer do tempo de armazenamento. Além disso, não houve diferenças entre as partículas produzidas com 1 ou 2 passagens no HAP.

Os resultados de difratometria de raio-X das NLS-AE podem ser observados na Figura 5.42 e os respectivos dados nas Tabelas 5.18 e 5.19:

Figura 5.42: Difrátogramas de raios-X da nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico e óleo de girassol, ao longo do tempo de armazenagem: (a) 1 passagem pelo HAP; (b) 2 passagens pelo HAP.

Em relação ao DRX das NLS-AE, há indicação que ocorreram modificações estruturais ao longo do tempo de armazenagem, no sentido de ligeiro aumento da cristalinidade dos sistemas, especialmente das NLS-AE-2. Tais rearranjos podem ter sido responsáveis, pelo menos em parte, pelo aumento do diâmetro médio de partícula observado para tais nanodispersões.

Tabela 5.17: Ângulos de difração, distâncias intermoleculares e intensidades de difração de raios-X das nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico e óleo de girassol, usando polisorbato 60 e fosfatidilcolina de soja como tensoativos (uma passagem no HAP)

NLS-AE-1 – amostra fresca			
Ângulo (2 θ)	2 θ (rad)	d (ângstrons)	Intensidade (U.A.)
19	0,332	4,7	1656
21,22	0,370	4,3	2440
22,88	0,399	4,0	1239
24	0,419	3,8	1190
NLS-AE-1 – 1 mês			
Ângulo (2 θ)	2 θ (rad)	d (ângstrons)	Intensidade (U.A.)
18,7	0,326	4,8	713
21,02	0,367	4,3	2256
22,64	0,395	4,0	676
23,54	0,411	3,9	858
NLS-AE-1 – 4 meses			
Ângulo (2 θ)	2 θ (rad)	d (ângstrons)	Intensidade (U.A.)
19,86	0,347	4,5	650
22,98	0,401	3,9	586
23,7	0,414	3,8	1310
22,98	0,401	3,9	586
22,68	0,396	4,0	1102

Tabela 5.18: Ângulos de difração, distâncias intermoleculares e intensidades de difração de raios-X das nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico e óleo de girassol, usando polisorbato 60 e fosfatidilcolina de soja como tensoativos (duas passagens no HAP)

NLS-AE-2 – amostra fresca			
Ângulo (2 θ)	2 θ (rad)	d (ângstroms)	Intensidade (U.A.)
19,08	0,333	4,7	1600
21,2	0,370	4,3	2652
22,78	0,398	4,0	1246
23,6	0,412	3,9	1436
NLS-AE-2 – 1 mês			
Ângulo (2 θ)	2 θ (rad)	d (ângstroms)	Intensidade (U.A.)
18,86	0,329	4,8	807
19,24	0,336	4,7	784
21,1	0,368	4,3	2500
23,64	0,413	3,8	1289
NLS-AE-2 – 4 meses			
Ângulo (2 θ)	2 θ (rad)	d (ângstroms)	Intensidade (U.A.)
19,8	0,346	4,6	1076
20,94	0,365	4,3	5837
22,98	0,401	3,9	835

5.4.2 Nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina

As nanopartículas lipídicas sólidas de triestearina produzidas com as formulações e de acordo com as condições operacionais indicadas na Tabela 4.11 foram as que apresentaram os melhores valores, para amostras recém-preparadas, de diâmetro médio de partícula, polidispersidade e potencial zeta. A aparência de tais amostras pode ser vista na Figura 5.43:

Figura 5.43: Aspecto das formulações de nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de girassol, com 1 e 2 passagens no homogeneizador a alta pressão.

Os valores de potencial zeta e polidispersidade das nanopartículas de triestearina e óleo de girassol podem ser vistos respectivamente na Figura 5.44:

Figura 5.44: Valores (a) do potencial zeta e (b) da polidispersidade das nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de girassol, utilizando polisorbato 60 e fosfatidilcolina de soja como tensoativos, ao longo do tempo de armazenagem (4 meses).

Os perfis das Figuras 5.45 e 5.46 indicam que, no caso do sistema NLS-TS, a estabilidade em termos de tamanho médio ocorreu até cerca de 2 meses de armazenagem. Após este período, o potencial zeta do sistema aumentou, chegando a valores próximos de -10 mV, relativamente distante do valor considerado ideal para nanopartículas, de -30 mV. O índice de polidispersidade, logicamente, aumentou também com o deslocamento da distribuição de tamanho de partículas e com o aumento da porcentagem de partículas na população com maior diâmetro médio.

Figura 5.45: Diâmetro médio das nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de girassol, utilizando polisorbato 60 e fosfatidilcolina de soja como tensoativos, ao longo do tempo de armazenagem (4 meses).

Figura 5.46: : Perfis das porcentagens cumulativas e das curvas de freqüência ao longo do tempo de armazenagem das nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de girassol.

Assim como nas nanopartículas de ácido esteárico, nas nanopartículas de triestearina a estabilidade do beta-caroteno encapsulado foi estimada a partir de dados colorimétricos do sistema CIE $L^*a^*b^*$, e de extração do carotenóide. Os perfis de

concentração de beta-caroteno ao longo do tempo podem ser visualizados nas Figuras 5.46 a 5.49:

Figura 5.47 Estabilidade temporal do beta-caroteno encapsulado nas nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de girassol, inferida por colorimetria instrumental e expressa no sistema CIE $L^*a^*b^*$: (a) parâmetros a^* e b^* ; (b) parâmetro L^* .

Figura 5.48: Estabilidade temporal do beta-caroteno encapsulado nas nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de girassol, calculada através dos parâmetros $L^* a^* b^*$: (a) croma (C^*_{ab}); (b) ângulo de Hue (h^*_{ab}).

Figura 5.49: Perfis temporais de degradação do beta-caroteno nas nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico e óleo de girassol: (a) em termos de concentração (em mg/L dispersão); (b) em termos de % de beta-caroteno preservado; (c) em termos da razão mg beta-caroteno/g lipídio total.

Os parâmetros colorimétricos indicam que a cor amarela do sistema (parâmetro b^*) decaiu ligeiramente ao longo do tempo de armazenagem, bem como o parâmetro L^* , indicando que a amostra começou a ficar um pouco mais clara, ou seja, a apresentar uma coloração mais esbranquiçada, que deve ter ocorrido como consequência do decaimento da cor amarela, decorrente da degradação do beta-caroteno, especialmente após o 2º mês de armazenagem. Tais observações são coerentes com os perfis quantitativos mostrados na Figura 5.49.

As análises de calorimetria diferencial de varredura originaram os termogramas mostrados na Figura 5.50 e os dados listados na Tabela 5.19:

Figura 5.50: Termogramas (obtidos por DSC) para as nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de girassol, utilizando polisorbato 60 e fosfatidilcolina de soja como tensoativos.

Tabela 5.19: Dados calorimétricos das amostras de nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de girassol, utilizando polisorbato 60 e fosfatidilcolina de soja como tensoativos. .de soja como tensoativos.

Formulação	Tempo de armazenagem	T _{onset} (°C)	T _{fusão} (°C)	ΔH _m (J/g)
NLS-TS-1	amostra fresca	62,21	64,46	7,884
	4 meses	49,94	56,7	10,66
NLS-TS-2	amostra fresca	62,59	64,72	6,907
	4 meses	50,44	56,97	7,116

Os termogramas e os dados calorimétricos, diferentemente das MLS-AE, mostram decréscimo significativo nas temperaturas de fusão e *onset* depois de 4 meses de armazenagem, o que indica alterações também significativas do ponto de vista estrutural

que podem ter contribuído inclusive para a alteração do tamanho médio de partícula anteriormente relatado.

Quanto à difratometria de raios-X realizadas para as amostras de NLS-TS, os espectros estão apresentados na Figura 5.51 e os dados referentes aos seus ângulos nas Tabelas 5.21 e 5.22:

Figura 5.51: Difrátogramas de raios-X das nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de girassol, usando polisorbato 60 e fosfatidilcolina de soja como tensoativos, ao longo do tempo de armazenagem. (a) 1 passagem pelo HAP; (b) 2 passagens pelo HAP.

Tabela 5.20: Ângulos de difração, distâncias intermoleculares e intensidades de difração de raios-X das nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de girassol, usando polisorbato 60 e fosfatidilcolina de soja como tensoativos.

NLS-TS-1 - amostra fresca			
Ângulo (2 θ)	2 θ (rad)	d (ângstrons)	Intensidade (U.A.)
18,9	0,330	4,8	1289
20,7	0,362	4,4	1764
22,4	0,392	4,0	1204
NLS-TS-1 - 1 mês			
Ângulo (2 θ)	2 θ (rad)	d (ângstrons)	Intensidade (U.A.)
18,8	0,328	4,8	1116
20,6	0,360	4,4	1332
22,2	0,388	4,1	900
NLS-TS-1 - 4 meses			
Ângulo (2 θ)	2 θ (rad)	d (ângstrons)	Intensidade (U.A.)
18,7	0,326	4,8	692
20,5	0,358	4,4	792
22,7	0,396	4,0	1102
23,1	0,403	3,9	930
25,0	0,436	3,7	562

Tabela 5.21: Ângulos de difração, distâncias intermoleculares e intensidades de difração de raios-X das nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de girassol, usando polisorbato 60 e fosfatidilcolina de soja como tensoativos.

NLS-TS-2 - amostra fresca			
Ângulo (2 θ)	2 θ (rad)	d (ângstrons)	Intensidade (U.A.)
18,9	0,330	4,8	1303
20,7	0,362	4,4	1513
22,6	0,394	4,0	1096
23,6	0,411	3,9	801
NLS-TS-2 - 1 mês			
Ângulo (2 θ)	2 θ (rad)	d (ângstrons)	Intensidade (U.A.)
18,8	0,328	4,8	1369
20,8	0,363	4,3	1347
22,1	0,386	4,1	1037
23,2	0,405	3,9	745
NLS-TS-2 - 4 meses			
Ângulo (2 θ)	2 θ (rad)	d (ângstrons)	Intensidade (U.A.)
20,8	0,362	4,3	2652

Os resultados da análise de difratometria para as NLS-TS estão em conformidade com os resultados de calorimetria diferencial de varredura, que indicaram alterações significativas na microestrutura do sistema nanoparticulado. Tais alterações, com certeza, estão ligadas à degradação do beta-caroteno encapsulado, provavelmente devido ao mesmo motivo anteriormente relatado para as MLS-AE sem tocoferol, aliada ao fato de a movimentação da microestrutura facilita a difusão de agentes oxidantes (oxigênio presente no meio líquido) no interior da nanopartícula.

6 CONCLUSÕES

A partir dos dados experimentais obtidos neste trabalho de Mestrado, foi possível concluir que:

- A caracterização de misturas físicas de lipídios mostrou-se muito importante para a escolha da proporção mais adequada para a produção das partículas lipídicas sólidas;
- A quantificação de beta-caroteno mostrou-se eficaz e possível de ser realizada tanto pelo método espectrofotométrico quanto por colorimetria instrumental;
- Nos sistemas analisados foi possível inferir a estabilidade microestrutural, em termos de configuração cristalina, das partículas por difratometria de raios-X;
- As micropartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico e óleo de girassol permaneceram extremamente estáveis ao longo do período analisado de 7 meses, e o antioxidante α -tocoferol se mostrou essencial para a preservação química do beta-caroteno, bem como, provavelmente, a estabilidade microestrutural do sistema;
- Para as micropartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de girassol, a goma xantana teve fundamental importância, visto que só foi possível estabilizar tais sistemas com a adição deste hidrocolóide. Mesmo na presença da goma xantana, somente os sistemas com polisorbato 60 se mostram estáveis do ponto de vista do diâmetro médio e de distribuição de tamanho de partícula, e dentre eles, o que continha menor concentração de lipídio total apresentou-se mais estável, sendo resistente à floculação até o 4º mês de estocagem;
- No que diz respeito aos sistemas nanoparticulados, as nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com ácido esteárico e óleo de girassol com uma e duas passagens no HAP não diferiram em relação à distribuição de tamanho, mas apresentaram aumento do diâmetro de partícula ao longo do tempo. Já em relação à microestrutura, o sistema com 2 passagens apresentou aumento da cristalinidade no último mês de armazenagem. As nanopartículas lipídicas sólidas produzidas com triestearina e óleo de girassol não apresentaram diferença na cristalinidade ao longo do tempo e a estabilidade em termos de tamanho médio ocorreu até cerca de dois meses de armazenagem, sendo que a distribuição de tamanho se mostrou mais homogênea para o sistema com duas passagens;

- Em termos de razão massa beta-caroteno/massa lipídio a concentração de 0,5 mg beta-caroteno/g lipídio total foi preservada ao longo do tempo tanto para os sistemas micro quanto para os nanoparticulados de ácido esteárico.

De forma geral, neste estudo, para a produção das partículas, os sistemas microparticulados se mostram melhores, tanto em relação à de estabilidade estrutural quanto na preservação do beta-caroteno.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

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

- Variar a concentração inicial de beta-caroteno nas formulações, para verificar se é possível minimizar as grandes perdas do carotenóide durante o processo, bem como se esta concentração inicial influencia na estabilidade do bioativo ao longo do tempo;
- Realizar medidas de difratometria de raios-X nas micropartículas de ácido esteárico sem tocoferol para detectar possíveis mudanças em sua microestrutura, e tentar relacionar estas mudanças com a alteração da composição do meio particulado devido à degradação do beta-caroteno;
- Investigar o comportamento reológico dos sistemas micro e nanoparticulados ao longo do tempo;
- Acrescentar goma xantana nas NLS-TS para tentar proporcionar maior estabilidade ao sistema;
- Incorporar os sistemas micro e nano particulados produzidas em algum sistema alimentício-modelo e avaliar esta incorporação em termos de estabilidade do carotenóide, bem como sensorialmente;
- Investigar a absorção dos sistemas micro e nanoparticulados em ensaios *in vitro* e *in vivo*.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA, E. Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.14, p. 3–15, 2009.
- BARANAUSKIENÉ,R.; BYLAITÉ,E.; ZUKAUSKAITÉ, J.; VENSKUTONIS, R.,P. (2007). Flavor retention of Peppermint (*Mentha piperita* L.) essential oil spray-dried in modified starches during encapsulation and storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, PA, v. 55, p. 3027-3036.
- BECHER, P.; SCHICK, M.J. (1987). *Macroemulsions*. In: SCHICK, M.J. (Ed.). **Non-ionic surfactants**. Marcel Dekker, Inc., Nova York.
- BERRY, S. E. E; SANDERS, T. A. B. Influence of triacylglycerol structure of stearic acid-rich fats on postprandial lipaemia. *Proceedings of the Nutrition Society*, Cambridge v. 64, p. 205–212, 2005
- CAO-HOANG, L.; FOUGERE, R.; WACHE, Y. Increase in stability and change in supramolecular structure of b-carotene through encapsulation into polylactic acid nanoparticles. **Food Chemistry**, Oxford, v. 24, n.1, p. 42-49, 2010.
- CHIU, Y.T.; CHIU, C.P.; CHIEN, J. T.; HO, G. H.; YANG, J.; CHEN, B. H. Encapsulation of lycopene extract from tomato pulp waste with gelatin and poly(γ-glutamic acid) as carrier. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, p. 5123-5130, 2007.
- DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química dos Alimentos de Fennema**, 4ª ed.: Artmed, Porto Alegre, 2010.
- DESAI, K.G.H.; PARK, J.H. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, Nova Iorque, v. 23, p. 1361–1394, 2005.
- DIAZ, P.S.; VENDRUSCOLO, C.T.; VENDRUSCOLO, J.L.S. Reologia de Xantana: uma Revisão sobre a Influência de Eletrólitos na Viscosidade de Soluções Aquosas de Gomas Xantana. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 25, n. 1, 15-28, 2004.
- DICKINSON, E. Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 23, p.1473–1482, 2009.

DICKINSON, E. Structure and composition of adsorbed protein layers and the relationship to emulsion stability. **Journal of Chemical Society - Faraday Transactions**, v. 88 n. 20, p. 2973-2983, 1992.

DOLZ, M.; HERNANDEZ, M.J.; DELEGIDO, J.; ALFARO, M.C.; MUNOZ, J. Influence of xanthan gum and locust bean gum upon flow and thixotropic behaviour of food emulsions containing modified starch. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 81, 179–186, 2007.

DOMB, A.J. Long acting injectable oxytetracycline-liposphere formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 124, p. 271-278, 1995.

DRUMMOND, D.C.; MEYER, O.; HONG, K.; KIRPOTIN, D.B.; PAPAHAJIOPOULOS, D. Optimizing Liposomes for Delivery of Chemotherapeutic Agents to Solid Tumors. **Pharmacological Reviews**, Baltimore, v. 51, n.4, p. 5104-0691, 1999.

DUHKIN, S.S.; SJÖBLOM, J. & SAETHER, O. (2006). **An experimental and theoretical approach to the dynamic behaviour of emulsions. In: Sjöblom, J. (ed.). Emulsions and emulsion stability.** Taylor and Francis, Boca Raton, 1-105.

FÁVARO-TRINDADE, C.S.; PINHO, S.C.; ROCHA, G.A.. Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 11, p. 103-112, 2008

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

FREITAS, C.; MULLER, R.H. Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN) dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 168, p. 221–229, 1998.

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

GONNET, M.; LETHUAUT, L.; BOURY, F. New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 146, p. 276–290, 2010.

GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing Technologies and trends. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 15, p.330–347, 2004.

GRACA, M.; BONGAERTS, J.H.H.; STOKES, J.R. & GRANICK, S. Friction and adsorption of aqueous polyoxyethylene (Tween) surfactants at hydrophobic surfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**, São Diego, v. 315, n. 1, p. 662-670, 2007.

GRANT, L.M., EDERTH, T, TIBERG, F. Influence of Surface Hydrophobicity on the Layer Properties of Adsorbed Nonionic Surfactants. **Langmuir**, Washington, v. 16, nº5, p. 2285-2291, 2000.

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.

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

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 Agricultural and Food Chemistry**, Easton, Pa , v.57,p. 8033 -8040, 2009.

HENTSCHEL, A.; GRAMDORF, S.; MULLER, R.H.; KURZ, T.; β -Carotene-Loaded Nanostructured Lipid Carriers. **Journal of Food Science**, Easton, Pa, v. 73 n. 2, p. 1-6, 2008.

HEURTAULT, B.; SAULNIER, P.; PECH, B.; PROUST, J.E.; BENOIT, J.P. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**, Surrey , v. 24, p. 4283–4300, 2003.

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

INOUE, T; HISATSUGU, Y; YAMAMOTO, R; SUZUKI, M (2004). Solid-liquid phase behavior of binary fatty acid mixtures 1. Oleic acid/stearic acid and oleic acid/behenic acid mixtures. **Chemistry and Physics of Lipids**, Limerick , v.127, p. 143-152.

JAFARI, S.M.; ASSADPOOR, E.; BHANDARI, B. Encapsulation Efficiency of Food Flavours and Oils during Spray Drying, **Drying Technology**, Nova Iorque, v. 26, p. 816–835, 2008.

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

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

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

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

KRUGLYAKOV, P.M. **Hydrophile-lipophile balance of surfactants and solid particles: physicochemical aspects and applications**. Elsevier, Amsterdam, pp.102-110, 2000.

LUCASSEN-REYNDERS, E.H. & WASAN, D.T. Interfacial viscoelasticity in emulsions and foams. **Food Structure**, Chicago, v. 12, n. 1, p. 1-12, 1993.

MASON P.; PORTER S. C.; BERRY, S. E.; STILLMAN P.; STEELE C.; KIRBY, A.; GRIFFIN, B.A.; MINIHANE A. M. Saturated fatty acid consumption: outlining the scale of the problem and assessing the solutions. **British Nutrition Foundation**, v. 34, p.74–84, 2009.

MAO,L.; XU, D.; YANG, J.; YUAN, F.; GAO, Y.; ZHAO, J. Effects of small and large molecule emulsifiers on the characteristics of β - carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 47, n. 3, p. 336-342, 2009

MATIOLI, G.; RODRIGUEZ- MAIA, D.B. Microencapsulação do Licopeno com Ciclodextrinas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, p. 102-105, 2003.

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

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

McCLEMENTS, D.J.; 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.

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

MISHRA, B.; PATEL; TIWARI, S.; PHARM, B.; PHARM, M. (2010). Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, 6, 9–24.

MORAIS, F.L. Monografia – Qualidade de Alimentos, Universidade de Brasília, Brasília-DF, Brasil, 2006

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, p. 947-957, 2007.

MÜLLER, R.H.; LUCKS, J.S. (1996). Patente européia 0605497: Alemanha.

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. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.242, p. 121-128, 2002.

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 (suppl. 1), p. S131-S155., 2002.

NUNES, I.L.; MERCADANTE, A.Z. Encapsulation of Lycopene Using Spray-Drying and Molecular Inclusion Processes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, n. 5, p. 893-900, 2007.

OSBORN, H.T.& AKOH, C.C. Structured lipids – novel fats with medical, nutraceutical and food applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Malden, v. 1, p. 93-103, 2002

PARHI, R.; SURESH, P.; Production of Solid Lipid Nanoparticles-Drug Loading and Release Mechanism. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 2, n.1, p. 211-227, 2010.

PRIAMO, W.L.; CEZARO, A.M.; FERREIRA, S.R.S.; OLIVEIRA, J.V. Precipitation and encapsulation of β -carotene in PHBV using carbon dioxide as anti-solvent. **Journal of Supercritical Fluids**, Nova Iorque, v. 54, p. 103-109, 2010.

QUINTANA, J.M.; CALFANO, A.N.; ZARITZKY, N.E.; PARTAL, P.; FRANC, J.M. Linear and Nonlinear Viscoelastic Behavior of Oil-in-Water Emulsions Stabilized with Polysaccharides. **Journal of Texture Studies**, Westport, v. 33, p. 215-236, 2002.

RATNAM, D.V.; ANKOLA, D.D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D.K.; KUMAR, M.N.V.R. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 113, p. 189-207, 2006.

RÉ, M.I. Microencapsulation by Spray Drying. **Drying Technology**, Nova Iorque, v. 16, n.6, p. 1195-1236,1998.

RIBEIRO, H.S.; AX, K.; SCHUBERT, H. Stability of Lycopene Emulsions in Food Systems. **Food Engineering and Physical Properties**, v. 68, n. 9, p. 2730-2734, 2003.

RODRÍGUEZ-HUEZO, M.E.; PEDROZA-ISLAS, R.; PRADO-BARRAGÁN, L.A.; BERISTAIN, C.I.; VERNON-CARTER, E.J. Microencapsulation by Spray Drying of Multiple Emulsions Containing Carotenoids. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 69, v. 7, p. 351-359, 2004.

RUKTANONCHAI, U.; SAKULKHU, U.; BEJRAPH, P.; OPANASOPIT, P.; BUNYAPRAPHATSARA, N.; JUNYAPRASERT, V.; PUTTIPIATKHACHORN, S. Effect of lipid types on physicochemical characteristics, stability and antioxidant activity of gamma-oryzanol-loaded lipid nanoparticles. **Journal of Microencapsulation**, Londres, v.26, n.7, p. 614-626, 2009.

SANDERS, T.A.B. Fat and Fatty Acid Intake and Metabolic Effects in the Human Body. **Annals of Nutrition & Metabolism**, Basel, v.55, p.162–172, 2009.

SANGUANSRI, P.; AUGUSTIN, M.A.; Nanoscale materials development - a food industry perspective. **Trends in Food Science & Technology** , Cambridge, v. 17, p. 547-556, 2006.

SCHROOYEN, P.M.M.; MEER, R.; KRUIF, C.G. Microencapsulation: its application in nutrition. **Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v. 60, p. 475–479, 2001.

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

SOUTO, E.B.; MULLER, R.H. The use of SLN and NLC as topical particulate carriers for imidazole antifungal agents. **Pharmazie**, Eschborn, v. 61, n. 5, p. 431–437, 2006.

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, 555–564, 2007.

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

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.

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

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

TROMBINO, S.; CASSANO, R.; MUZZALUPO, R.; PINGITORE, A.; CIONE, E.; PICCI, N. Stearyl ferulate-based solid lipid nanoparticles for the encapsulation and stabilization of β -carotene and α -tocopherol. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 72, p. 181–187, 2009.

WEISS, J.; TAKHISTOV, P.; MCCLEMENTS, D.J.. Functional materials in food nanotechnology. **Journal of. Food Science. Reviews**, v. 71, p. R107-R116, 2006.

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.

WISSING, S.A.; KAYSER, O.; MÜLLER, R.H.; Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 56, p. 1257– 1272, 2004.

ZANIN, S. M. W.; MIGUEL, M. D.; CHIMELLI, M. C.; OLIVEIRA, A. B. Determinação do Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL) de óleos de origem vegetal. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 3, n.1, p. 13-18, 2002.

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.