UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE
ALIMENTOS

JULIO RAFAEL PELISSARI

**Efeito da encapsulação de licopeno na sua estabilidade e
biodisponibilidade**

Pirassununga

2014

JULIO RAFAEL PELISSARI

Efeito da encapsulação de licopeno na sua estabilidade e biodisponibilidade

“Versão Corrigida”

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

Área de concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Carmen Sílvia Fávaro Trindade

Pirassununga

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

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

P391e Pelissari, Julio Rafael
Efeito da encapsulação de licopeno na sua estabilidade e biodisponibilidade / Julio Rafael Pelissari. -- Pirassununga, 2014.
92 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. Carmen Sílvia Fávaro Trindade.

1. Microencapsulação 2. *Spray-chilling* 3. *Carotenoide* 4. Estabilidade 5. *Spray cooling*. I. Título.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais José Carlos e Izilda, meus exemplos de vida, pelo apoio, incentivo e compreensão de minhas escolhas. Por estarem presentes em todos os momentos de minha vida, me mostrando sempre o melhor caminho a seguir.

À minha irmã Mariana, pelo carinho e amizade.

À Débora por todo seu amor e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me concedido a realização deste mestrado, por sempre me conduzir e guiar meus passos em todos os momentos.

À Prof.^a Dr.^a Carmen Sílvia Fávaro Trindade pela oportunidade, por todos os ensinamentos, pela paciência e por toda dedicação à pesquisa.

Ao Prof. Ms. Acácio Antônio Pigoso por todos os ensinamentos durante a graduação, pela imensa dedicação durante os experimentos no mestrado.

Ao Marcelo Thomazini pelos ensinamentos e a imensa colaboração para realização deste projeto de pesquisa.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao CNPq pelo apoio financeiro para realização deste projeto de mestrado.

À DSM Produtos Nutricionais Brasil LTDA pela doação do licopeno.

À Triangulo Alimentos pela doação da gordura vegetal.

Ao imenso apoio de minha família, pelos conselhos, ensinamentos, à eles minha eterna gratidão.

Aos amigos de laboratório Fernando, Mariana, Talita, Volnei, Paula, Adja, Milla, pelas risadas, pela troca constante de experiências, pelo apoio na realização nos experimentos e por sempre estarem prontos a ajudar em qualquer momento.

À minha amiga Luciana pela sua companhia, pelas conversas, risadas e por sua grande amizade nesses anos.

À Ednelí, Rodrigo, Carla, Nilson, Keila e Tatiana pela ajuda na realização de algumas análises.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação por toda ajuda na parte burocrática.

À Marília, Fernanda e Nayara pelas caronas de Araras á Pirassununga.

Ao Departamento de Engenharia de Alimentos da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos pela oportunidade de realização deste mestrado.

Ao Centro Universitário Hermínio Ometto – UNIARARAS, por proporcionar a realização dos testes de biodisponibilidade.

BIOGRAFIA

Júlio Rafael Pelissari, filho de José Carlos Pelissari e Izilda Aparecida Guidotti Pelissari, nasceu no dia 27 de outubro de 1989 em Araras, cidade localizada no interior do Estado de São Paulo.

Em 2011 concluiu a graduação em Bacharelado em Biomedicina pela Fundação Hermínio Ometto – UNIARARAS. Durante a graduação desenvolveu projetos de pesquisa voltados para a prevenção da aterosclerose. Como trabalho de conclusão de curso, apresentou o trabalho intitulado: “Avaliação do efeito da farinha da casca da berinjela no perfil lipídico de ratos tratados com Tyloxapol®”.

RESUMO

PELISSARI, J. R. **Efeito da encapsulação de licopeno na sua estabilidade e biodisponibilidade.** 2014. 92 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

Licopeno, um pigmento natural considerado o mais potente antioxidante dentre os carotenoides, é o que tem maior incidência no soro humano. Seu consumo regular está relacionado principalmente com a prevenção do câncer de próstata. Porém, estudos também demonstram sua relação com a prevenção de câncer de pâncreas e bexiga, doenças cardiovasculares como a aterosclerose e doenças neurodegenerativas. Todavia, por ser altamente insaturado o licopeno é susceptível à degradação, sendo degradado na presença de luz, oxigênio e se exposto a altas temperaturas. A microencapsulação entra como uma alternativa para tentar garantir maior estabilidade a este carotenoide. A técnica de *spray-chilling*, por dispensar o emprego de altas temperaturas e solventes durante o processo de atomização, representa uma alternativa promissora na encapsulação do licopeno. Os objetivos deste trabalho foram encapsular uma solução oleosa de licopeno (10%) através da técnica de *spray-chilling*, utilizando gordura vegetal *low trans* como carreador, caracterizar as micropartículas obtidas e avaliar a biodisponibilidade do licopeno livre e encapsulado em ratos wistars. Foram formulados seis tratamentos, que diferiam pela concentração de solução comercial de licopeno, sendo T1 com 20%, T2 com 23,1%, T3 com 28,6%, T4 com 33,3%, T5 com 17,9% mais 10% de goma arábica e T6 com 19,2% mais 5% de carboximetilcelulose (CMC). As micropartículas obtidas destes tratamentos foram avaliadas quanto a tamanho e distribuição, morfologia por microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier (FT-IR), difração de raios-X (DRX). A estabilidade do licopeno encapsulado foi avaliada em diferentes condições de armazenamento (sob vácuo, umidade relativa de 33%, temperatura de refrigeração e ambiente) e também foi determinada por meio de quantificações periódicas de licopeno, bem como através da análise da cor instrumental. A biodisponibilidade foi avaliada utilizando-se 68 animais divididos em grupos,

para os quais se administrou por gavagem o licopeno livre e o encapsulado. O tamanho das micropartículas obtidas ficou em torno de 60-110 μm e a distribuição foi polidispersa, independente da concentração de licopeno. A microscopia revelou micropartículas esféricas, com superfície rugosa, com alguns poros e tamanhos variados. No FT-IR verificou-se que não houve formação de ligações distintas na solução oleosa de licopeno e nas amostras atomizadas. Nos difratogramas observou-se a presença da forma polimórfica β para o agente carreador e para as micropartículas. Na estabilidade a adição da goma arábica e o armazenamento sob temperatura de refrigeração e vácuo, foram as melhores condições para retardar a degradação do licopeno. Os resultados dos ensaios de biodisponibilidade foram inconclusivos. Desta forma, conclui-se que é possível encapsular licopeno através da técnica de *spray-chilling*, porém, para trabalhos futuros, seriam necessários aprimoramentos na técnica de encapsulação e/ou na formulação para conferir maior proteção ao carotenoide, bem como adequações na metodologia para determinação de sua biodisponibilidade, para obtenção de resultados conclusivos.

Palavras chave: microencapsulação, *spray-chilling*, carotenoide, estabilidade, *spray-cooling*.

ABSTRACT

PELISSARI, J. R. **Effect of encapsulation of lycopene on their stability and bioavailability.** 2014. 92 p. M. Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

Lycopene, a natural pigment considered the most potent antioxidant among the carotenoids, it has the higher incidence in the human serum. Its regular consumption is mainly related with the prevention of prostate cancer. However, studies also show its relation to the prevention of pancreatic cancer and bladder cancer, cardiovascular diseases such as atherosclerosis and neurodegenerative diseases. However, by being highly unsaturated the lycopene is susceptible to degradation, being degraded in the presence of light, oxygen and if exposed to high temperatures. The microencapsulation comes like an alternative to ensuring higher stability for this carotenoid. The technique of spray-chilling represents a promising alternative to encapsulation of lycopene. The aims of this study were to encapsulate an oily solution of lycopene (10%) through of the technique of spray-chilling, using a low-trans fat as carrier, to characterize the obtained microparticles and to evaluate the bioavailability of lycopene free and encapsulated in Wistar rats. Six treatments were formulated, that differed by the content of oily solution of lycopene: T1 with 20%, T2 with 23.1%, T3 with 28.6%, T3 with 28.6%, T4 with 33.3%, T5 with 17.9% plus 10% of Arabic gum and T6 with 19.2% plus 5% of carboxymethylcellulose (CMC). The microparticles obtained from these treatments were evaluated for size and distribution, morphology by scanning electron microscopy (SEM), infrared spectroscopy with Fourier transform (FT-IR) and X-ray diffraction (XRD). The stability of the lycopene encapsulated was evaluated by its periodic quantification at different storage conditions (vacuum, relative humidity of 33%, refrigeration temperature and environment temperature). Instrumental color, “L” and “a” parameters, also was measured. The bioavailability was evaluated using 68 animals, for which the free and lycopene encapsulated were administered by gavage. The size of microparticles obtained was around 60-110 μm and the distribution was polydisperse, independent of the concentration of lycopene. The

microscopy revealed spherical microparticles, with rough surface, with some pores and varying sizes. In the FT-IR it was found that there was no formation of distinct bonds in oily solution of lycopene and the atomized samples. In the diffraction patterns observed the presence of polymorphic form “ β ” for the carrier agent and microparticles. On the stability the addition of Arabic gum and the storage at refrigerator temperature under vacuum, were the best conditions to delay the degradation of lycopene. The results of bioavailability assays were inconclusive. As conclusion, it is possible to encapsulate lycopene using the technique of spray-chilling but to future works, would be required improvements in the technique of encapsulation and/or formulations to give more protection to the carotenoid, as well as adjustments in the methodology for determination of their bioavailability, in order to obtaining conclusive results.

Keywords: microencapsulation, *spray-chilling*, carotenoid, stability, *spray cooling*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Interação de radicais livres e antioxidantes (TALAULIKAR&MANYONDA, 2011).....	19
Figura 2: Estrutura <i>all-trans</i> licopeno (SHU& PAN, 2013).....	22
Figura 3: Representação do <i>spray-chilling</i> (OKURO, 2013).....	29
Figura 4: Imagem do pó contendo as micropartículas carregadas de licopeno.....	43
Figura 5: Micrografias das micropartículas obtidas por <i>spray-chilling</i> . (A) Tratamento 1 (20% de licopeno) com aumento de 1000x; (B) Tratamento 2 (23,1% de licopeno) com aumento de 1000x; (C) Tratamento 3 (28,6% de licopeno) com aumento de 1000X; (D) Tratamento 4 (33,3% de licopeno) com aumento de 1000x; (E) Tratamento 5 (17,9% de licopeno + goma arábica) com aumento de 1000x; Tratamento 6 (19,2% de licopeno + carboximetilcelulose) com aumento de 1000x	
.....	44
Figura 6: Tamanho e distribuição de partícula do tratamento 1 no início (dia 0) e no final do armazenamento (90 dias).....	47
Figura 7: Tamanho e distribuição de partícula do tratamento 2 no início (dia 0) e no final do armazenamento (90 dias).....	48
Figura 8: Tamanho e distribuição de partícula do tratamento 3 no início (dia 0) e no final do armazenamento (90 dias).....	49
Figura 9: Tamanho e distribuição de partícula do tratamento 4 no início (dia 0) e no final do armazenamento (90 dias).....	50
Figura 10: Tamanho e distribuição de partícula do tratamento 5 no início (dia 0) e no final do armazenamento (90 dias).....	51

Figura 11: Tamanho e distribuição de partícula do tratamento 6 no início (dia 0) e no final do armazenamento (90 dias).....	52
Figura 12: Espectro de absorção na região do infravermelho para o agente carreador e os tratamentos.....	54
Figura 13: Difratoformas do núcleo ativo, agente carreador e dos tratamentos.....	57
Figura 14: Taxas de degradação do licopeno (%) presente nas micropartículas armazenadas sob diferentes condições durante 90 dias.....	58
Figura 15: Cores no sistema L, a* e b* para representação dos pós.....	62
Figura 16: Cromatograma do material extraído do soro após 0 minutos de administração do licopeno livre.....	67
Figura 17: Cromatograma do material extraído do soro após 60 minutos de administração do licopeno livre.....	67
Figura 18: Cromatograma do material extraído do soro após 120 minutos de administração do licopeno livre.....	67
Figura 19: Cromatograma dos padrões licopeno (DSM) e β -caroteno.....	68
Figura 20: Cromatograma obtido do material coletado do grupo controle, onde os animais não receberam nenhuma forma de licopeno.....	68
Figura 21: Cromatograma obtido do material coletado do grupo de animais que receberam o licopeno livre, com amostras coletadas 6h após a administração.....	69
Figura 22: Cromatograma obtido do material coletado do grupo de animais que receberam o licopeno encapsulado (T1), com amostras coletadas 6h após a administração.....	69
Figura 23: Cromatograma obtido do material coletado do grupo de animais que receberam o licopeno encapsulado + goma arábica (T5), com amostras coletadas 6h após a administração.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição dos tratamentos estudados.....	35
Tabela 2: Composição em ácidos graxos do agente carreador (gordura vegetal).....	42
Tabela 3: Valores do parâmetro luminosidade obtidos para micropartículas armazenadas por 90 dias em diferentes condições.....	63
Tabela 4: Valores para o parâmetro a^* obtidos para as micropartículas armazenadas por 90 dias em diferentes condições.....	65

SUMÁRIO

1. Introdução.....	15
2. Revisão Bibliográfica.....	18
2.1. Antioxidantes.....	18
2.2. Licopeno.....	21
2.3. Microencapsulação.....	26
2.3.1. <i>Spray-chilling</i>	27
3. Material e Métodos.....	33
3.1. Material.....	33
3.2. Métodos.....	33
3.2.1. Composição em ácidos graxos do agente carreador.....	33
3.2.2. Preparação das micropartículas.....	34
3.2.3. Quantificação do licopeno.....	35
3.3. Caracterização das micropartículas obtidas.....	36
3.3.1. Análise da distribuição do tamanho de partícula.....	36
3.3.2. Análises morfológicas.....	37
3.3.3. Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier (FT-IR).....	37
3.3.4. Difração de Raio X (DRX).....	37
3.4. Avaliação da estabilidade do licopeno microencapsulado.....	38
3.4.1. Avaliação da estabilidade do licopeno microencapsulado.....	38
3.4.2. Análise instrumental de cor.....	38
3.5. Determinação da biodisponibilidade do licopeno livre e encapsulado.....	39
3.5.1. Animais.....	39
3.5.2. Tratamento dos animais.....	39

3.5.3. Coleta de amostras biológicas.....	39
3.5.4. Extração do licopeno sérico.....	40
3.5.5. Análise de licopeno por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	40
3.6. Análises estatísticas.....	41
4. Resultados e Discussões.....	42
4.1. Caracterização do carreador.....	42
4.2. <i>Spray-chilling</i>	42
4.3. Caracterização das micropartículas.....	43
4.3.1. Morfologia por Microscopia eletrônica de varredura.....	43
4.3.2. Tamanho e Distribuição de partículas.....	46
4.3.3. Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier (FT-IR).....	53
4.3.4. Difração de Raio X (DRX).....	55
4.4. Análise da estabilidade do licopeno encapsulado.....	57
4.4.1. Cor instrumental.....	62
4.5. Biodisponibilidade.....	66
5. Conclusão.....	73
6. Referências bibliográficas.....	74

1. INTRODUÇÃO

Os radicais livres, como o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, e radical hidroxil são compostos que induzem ao dano oxidativo de biomoléculas, que pode causar várias doenças, como aterosclerose, diabetes mellitus, inflamações e ocasionar o envelhecimento. Plantas contém uma larga variedade de moléculas que eliminam os radicais livres, como os flavonoides, antocianinas e os carotenoides. Estes compostos são conhecidos como antioxidantes e têm uma grande importância biológica na eliminação destes radicais livres (DELLAPENNA & POGSON, 2006; PRAKASH, et al., 2007).

Valorizados pelas agradáveis cores amarela, laranja ou vermelha que conferem aos alimentos, carotenoides são também antioxidantes naturais que contribuem para a estabilidade dos alimentos. Além disso, alguns possuem atividade pró-vitamina A, outros têm efeitos de promoção da saúde, tais como: aumento da imunidade, redução de risco de desenvolvimento de doenças degenerativas como câncer, doenças cardiovasculares, catarata e degeneração da mácula (KRINSKY & JOHNSON 2005; TAPIERO et al., 2004; VOUTILAINEN et al., 2006).

O licopeno é um carotenoide acíclico com 11 ligações duplas conjugadas, responsável pela cor vermelha de frutos como tomate, pitanga, goiaba vermelha e melancia. É um dos carotenoides mais comuns encontrados no soro humano e um dos predominantes no plasma (AGARWAL & RAO, 2000; STAHL & SIES, 1996). Devido ao seu alto número de ligações duplas conjugadas é considerado um dos antioxidantes mais potentes entre os carotenoides (DIMASCIO et al., 1989). De acordo com Sies et al. (1992), a capacidade antioxidante do licopeno pode contribuir para a redução do risco de várias doenças.

O aumento no consumo de tomate e outros produtos que contenham licopeno têm sido associados com a proteção contra alguns tipos de cânceres, arteriosclerose e doenças coronárias (MORAIS, 2001), o que fomenta o crescente interesse por este carotenoide nos últimos anos.

A incorporação deste pigmento em alimentos tem como objetivo principal a coloração e atribuir características funcionais. Contudo, devido ao seu elevado número de ligações duplas conjugadas, o licopeno é susceptível a isomerização e a oxidação durante o processo de armazenagem (MATIOLI & RODRIGUEZ-AMAYA, 2002). A microencapsulação pode ser uma alternativa para aumentar a estabilidade do licopeno (JIZOMOTO et al., 1993; RÉ, 2006).

Microencapsulação é o processo de empacotamento de materiais sólidos, líquidos ou gasosos em cápsulas extremamente pequenas, as quais podem liberar o conteúdo de forma controlada e sob condições específicas (TODD, 1970).

As tecnologias mais utilizadas para se obter microcápsulas são a coacervação, evaporação de solvente, leito fluidizado, extrusão, *spray-drying* e *spray-congealing* (FAVARO-TRINDADE et al., 2008). Recentemente a técnica de *spray-congealing*, também conhecida como *spray-chilling* ou *spray-cooling*, está ganhando considerável atenção, especialmente do ponto de vista da segurança e rapidez (ALBERTINI et al., 2008).

A encapsulação de licopeno pela técnica de *spray-chilling*, que consiste basicamente em se fazer uma solução, dispersão ou emulsão do agente ativo ou núcleo com o carreador ou encapsulante fundido e atomizá-la em uma câmara onde há também injeção de ar frio ou nitrogênio líquido nesse caso o encapsulante solidifica instantaneamente, formando partículas esféricas e insolúveis em água (OKURO et al., 2013).

As partículas produzidas pelo processo de *spray-chilling* são do tipo matriz, onde o núcleo está dissolvido ou disperso no carreador solidificado, ou seja, está distribuído em todo o volume da partícula, podendo estar inclusive em sua superfície. Como este não é um sistema tipo reservatório, onde o núcleo está perfeitamente recoberto pelo carreador, essas partículas normalmente não são denominadas microcápsulas, mas micropartículas ou microesferas.

A técnica de *spray-chilling* é muito conveniente para encapsulação de ingredientes alimentícios, pois se trata de um processo de baixo custo, de fácil *scale up*, contínuo e que pode dispensar a necessidade de solventes orgânicos e o emprego de temperaturas altas, para o caso de materiais termossensíveis. Todavia, tem como desvantagens, a reduzida eficiência de encapsulação e a possibilidade de expulsão do recheio, além da obtenção de partículas insolúveis em água.

O licopeno foi encapsulado com objetivo de torná-lo menos susceptível à isomerização e oxidação durante o processamento e estocagem, pelas técnicas de liofilização, atomização ou *spray-drying*, emulsão, inclusão molecular, complexação em ciclodextrinas e coacervação complexa (MATIOLI & RODRIGUEZ-AMAYA, 2002; MATIOLI & RODRIGUEZ-AMAYA, 2003, SHU et al., 2006; NUNES et al., 2007; CHIU et al., 2007; BLANCH et al., 2007; ROCHA et al., 2012; SILVA et al., 2012). A encapsulação de licopeno em uma matriz lipídica, pela técnica de *spray-chilling*, que ainda não foi explorada para este composto, pode ainda conferir maior biodisponibilidade ao carotenoide, pois, segundo Juzwiak (2004) e Pimentel (2005), a presença de lipídio aumenta a biodisponibilidade de licopeno e sua atividade antioxidante plasmática. Ainda, a encapsulação pode prevenir a oxidação e a interação do licopeno com outros compostos presentes no alimento, garantindo sua integridade e, portanto, sua atividade terapêutica.

Assim, este trabalho visou a encapsulação do licopeno pela técnica de *spray-chilling* utilizando como carreador ou matriz lipídica uma gordura vegetal. A caracterização das microcápsulas obtidas realizou-se do ponto de vista estrutural, com relação à sua estabilidade e, por último, avaliou-se o efeito da encapsulação na capacidade de absorção do licopeno por ratos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Antioxidantes

Antioxidante é qualquer substância que retarda, previne ou elimine o dano oxidativo de uma molécula alvo, causado por um radical livre (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Halliwell (1989) define um radical livre como qualquer átomo ou molécula que contenha um ou mais elétrons não emparelhados, ou seja, um elétron sozinho em um orbital. Devido aos elétrons desemparelhados a reatividade química de um átomo ou molécula é alterada, fazendo com que esta molécula seja mais reativa do que uma molécula que não possua um elétron desemparelhado (HALLIWELL, 1994). A formação de radicais livres nos organismos vivos está relacionado à exposição a agentes tóxicos como radiações ionizantes (raios ultravioletas e raios- γ), fumo, pesticidas, poluentes e alguns medicamentos (BAJPAI et al., 2014).

Segundo Dávalos et al. (2004) radicais livres e as espécies reativas de oxigênio produzem danos oxidativos ao DNA, proteínas e outras macromoléculas como os lipídios. Espécies reativas de oxigênio são formadas por meio do metabolismo celular (respiração celular), podendo ser produzidos por fagócitos como parte da resposta contra agentes exógenos. Porém, há um sistema de defesa que remove esses radicais livres formados nos organismos vivos, denominado antioxidante.

Os antioxidantes estabilizam moléculas de radicais livres através da doação de elétrons (Figura 1), desta forma os antioxidantes conseguem fazer com que os radicais livres deixem de ser altamente reativos, pois promovem o emparelhando do elétron que estava sozinho no orbital. E mesmo com a perda de um elétron os antioxidantes não se tornam reativos, continuando estáveis.

Figura 1: Interação de radicais livres e antioxidantes.

Fonte adaptada: Talaulikar & Manyonda (2011).

O estresse oxidativo ocorre em todos os organismos expostos a ambientes oxigenados, porém os sistemas biológicos desenvolveram diversas defesas antioxidantes a fim de se proteger da oxidação. Em geral, os tecidos biológicos a partir dos quais os alimentos são obtidos contêm muitos sistemas antioxidantes, contudo o processamento de alimentos pode remover os antioxidantes, todavia é comum que se incorpore

proteção antioxidante adicional aos alimentos processados para que estes nos tragam benefícios à saúde, visando combater reações oxidativas (DAMODARAN, 2010).

O organismo humano possui alguns mecanismos de defesa contra os radicais livres, entre esses mecanismos estão as enzimas superóxido desmutase, catalase e a glutathione peroxidase. Além dos efeitos protetores das defesas endógenas, o consumo de antioxidantes dietéticos parece ser de grande importância. A ingestão de frutas e vegetais que são a principal fonte de antioxidantes na dieta está associada com a diminuição do risco de doenças degenerativas (AMES, SHIGENAGA, & HAGEN 1993). Dentre os antioxidantes encontrados em frutas e vegetais estão os compostos fenólicos, carotenoides como o licopeno e o β -caroteno, entre outros.

Além dos antioxidantes naturais há também os antioxidantes sintéticos tais como o butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), propil galato (PG) e terc-butil-hidroquinona (TBHQ) (NAVEENA et al., 2008).

BHA é mais efetivo na eliminação da oxidação em gorduras animais que em óleos vegetais, porém sua eficiência é limitada em óleos insaturados de vegetais ou sementes. Sua estabilidade frente a elevadas temperaturas é diminuída, porém sua eficácia é maior no controle de oxidação de ácidos graxos de cadeia curta (RAMALHO & JORGE, 2006 apud BAILEY, 1996).

O BHT e o BHA são sinergistas entre si. O BHA age como sequestrante de radicais peróxidos, enquanto o BHT age como sinergista, ou regenerador de radicais BHA (OMURA, 1995).

PG é um éster do 3,4,5 ácido triidroxibenzóico, que quando usado em níveis elevados pode atuar como pró-oxidante (RAMALHO & JORGE, 2006 apud BAILEY, 1996).

TBHQ é considerado o melhor antioxidante para óleos de fritura, pois resiste ao calor e proporciona uma excelente estabilidade para os produtos acabados (DZIEZAC, 1986).

Porém, os antioxidantes sintéticos utilizados atualmente têm sido objetos de estudos, por poder causar algum dano à saúde (NAVEENA et al., 2008). Por isso vem crescendo o interesse no setor alimentício para substituir antioxidantes sintéticos por naturais. Sendo assim, estes estudos proporcionam a base para o crescente desenvolvimento e interesse pela utilização de antioxidantes naturais como ingredientes funcionais. Dentre os antioxidantes naturais, os carotenoides - pela sua coloração e características funcionais - vêm chamando a atenção da indústria alimentícia. Porém, dentro do grupo dos carotenoides o licopeno vem sendo alvo de pesquisas por ser o mais poderoso antioxidante.

2.2 Licopeno

Tomates (*Solanum lycopersicum*) são fontes alimentares que contêm uma variedade de componentes bioativos, incluindo compostos que atuam como antioxidantes como, por exemplo, vitaminas e diversos carotenoides; o licopeno é o principal carotenoide encontrado no tomate, e lhe são atribuídos efeitos benéficos na promoção da saúde (CANENE-ADAMS et al., 2005).

Licopeno ($C_{40}H_{56}$) é um dos 600 carotenoides encontrados na natureza e é um pigmento natural que confere a coloração vermelha de certos frutos como tomate, melancia, goiaba, pitanga entre outros (BRAMLEY, 2000). É um carotenoide acíclico, possuindo 11 ligações duplas conjugadas e duas ligações duplas não conjugadas normalmente na configuração *all-trans* (Figura 2) (BRAMLEY, 2000). Dentre os carotenoides o licopeno é o que possui o mais elevado grau de insaturação.

Estudos epidemiológicos vêm mostrando que o consumo de tomates e o seu principal carotenoide, o licopeno, tem um grande papel na redução do risco de câncer de próstata (CANENE-ADAMS et al., 2005).

Di-Mascio, Kaiser & Sies (1989) compararam a eficiência de vários carotenoides em relação à capacidade de sequestrar oxigênio singlete, e dentre os carotenoides estudados, o licopeno mostrou ser o melhor sequestrador.

Figura 2: Estrutura de *all-trans*-licopeno.
Fonte: Shu & Pan (2013).

Ribayo-Mercado et al. (1995) sugeriram que o licopeno tem um papel atenuante nos processos oxidativos nos tecidos, podendo ser um mecanismo de defesa importante contra os efeitos adversos da irradiação ultravioleta na pele.

A ingestão de licopeno está relacionada principalmente com a prevenção do câncer de próstata, porém, Burney et al. (1989) relacionaram a baixa concentração de licopeno no soro com maior probabilidade de desenvolver câncer de pâncreas. Já Helzlsouer et al. (1989) mostraram a relação da diminuição do licopeno no soro com o possível desenvolvimento de câncer de bexiga.

A ingestão combinada de tomate, molho de tomate, suco de tomate e pizza (dieta correspondente a 82% do consumo de licopeno) foi inversamente associada com o risco de desenvolvimento de câncer de próstata (GIOVANNUCCI et al., 1995).

Devida a sua natureza altamente insaturada o licopeno é muito susceptível à oxidação sendo facilmente degradado na presença de luz, oxigênio e se exposto a altas temperaturas.

O licopeno em tomates frescos encontra-se predominantemente na forma *all-trans* (SCHIERLE, et al., 1997). Nobre et al. (2009) denominam a forma *all-trans* como sendo o isômero mais termodinamicamente estável, mais fácil de manipular e incorporar a alimentos funcionais e nutracêuticos do que a forma *cis*. Por outro lado, alguns estudos atribuem ao isômero *cis* maior biodisponibilidade por ser mais facilmente absorvido pelas células intestinais (BOILEAU, BOILEAU & ERDMAN, 2002).

Boileau et al. (1999) administraram licopeno na forma isomérica *cis* em furões e o quantificaram no soro, fígado, pulmão, linfa, estômago e intestino delgado e atribuíram a presença nesses tecidos ao fato de que esta forma isomérica é melhor absorvida do que a forma isomérica *trans*, pois provavelmente a forma isomérica *cis* tem sua biodisponibilidade aumentada em micelas de ácido biliar e, possivelmente, a incorporação preferencial em quilomícrons. (BOILEAU et al., 1999).

Klipstein et al. (2000) evidenciaram relação inversa entre os níveis de licopeno sérico e a presença de aterosclerose em um estudo populacional e puderam observar também uma tendência consistente de diminuição do risco de calcificação da aorta com níveis elevados de licopeno no soro. Rissanen et al. (2002) reportaram que a ingestão de licopeno pode desempenhar importante papel na prevenção de doenças cardiovasculares, principalmente por impedir a oxidação da LDL-colesterol na parede de vasos e artérias. Rissanen et al. (2003) associaram a baixa concentração de licopeno sérico com aumento da espessura da camada íntima da artéria carótida, o que pode desencadear acidentes vasculares. A ação antioxidante pode reduzir o risco de acidente vascular de algumas formas, e dentre elas estão a supressão da síntese do colesterol, inibição da inflamação e a proteção da lipoproteína de baixa densidade (LDL) da oxidação (TANG et al., 2009).

Tang et al. (2009) sugerem que a proteção de células endoteliais pode ser um dos mecanismos benéficos do licopeno para prevenção de doenças cardiovasculares. Ainda, Tang et al. (2009) demonstraram a capacidade do licopeno em evitar lesões oxidativas em células endoteliais induzidas por H_2O_2 e diminuir a apoptose em respostas oxidativas.

Palozza et al. (2010) compararam a eficácia do licopeno e do β -caroteno na inibição da produção de espécies reativas de oxigênio em macrófagos e puderam certificar que o licopeno é mais eficaz que o β -caroteno na proteção contra a formação de espécies reativas.

Fornelli et al. (2007) em um estudo de proliferação de células cancerosas, confirmaram o efeito inibidor do crescimento celular do licopeno em uma linhagem de células do câncer de mama. Para este efeito foi sugerido que o licopeno atua na modulação nas comunicações entre as junções gap intercelular, que pode ser um dos mecanismos envolvidos no controle do crescimento celular.

Qu et al. (2011a) demonstraram que o licopeno foi capaz de proteger neurônios contra neurotoxicidade induzida, provavelmente por meio da inibição da apoptose e do estresse oxidativo, o que o evidencia como um agente promissor na terapia na prevenção da Doença de Alzheimer.

Hsiao et al. (2004) avaliaram o efeito protetor do licopeno em lesões isquêmicas cerebrais e puderam constatar a ação antioxidante do licopeno neste tipo de lesão pela captura de radicais livres, bem como na inibição da produção de óxido nítrico, o que resulta na diminuição do volume de enfarte/isquemia cerebral.

O estudo de Qu et al. (2011b) demonstraram que o licopeno poupou neurônios do hipocampo da morte celular por apoptose induzida por trimetil (TMT), uma neurotoxina que imita parcialmente o mecanismo de muitas desordens neurodegenerativas. Qu et al.

(2011b) sugerem ainda que a atuação do licopeno como agente neuroprotetor é devido a sua capacidade de eliminar radicais livres e reduzir o dano oxidativo.

Segundo Yang et al. (2013) as propriedades antioxidantes do licopeno despertaram o interesse pelo tomate como um potente alimento com propriedades anticancerígenas. Estudos experimentais e animais sugerem vários mecanismos pelos quais o licopeno pode afetar a carcinogênese gástrica

Colle et al. (2013) concluíram que o processamento da polpa de tomate na presença de lipídios aumenta a biodisponibilidade do licopeno, sendo que o lipídio adicionado não teve importância em comparação com as condições aplicadas no processo.

O trabalho de Faisal, O'Driscoll & Griffin (2010), realizado em ratos mostrou que para os compostos altamente lipofílicos como o licopeno, há vários passos que influenciam a absorção, tais como a solubilidade nos meios fisiológicos, a absorção pelas células intestinais e a distribuição sistêmica. A solubilidade do licopeno é maior em meios fisiológicos ricos em lipídios, sendo as formulações a base de lipídios as mais adequadas para aumentar sua biodisponibilidade. Faisal, O'Driscoll & Griffin (2010) mostraram ainda que o transporte linfático intestinal é o principal mecanismo de absorção do licopeno a partir do trato gastrointestinal.

Através de quantificações feitas por HPLC, Stahl et al. (1992) demonstraram a distribuição do licopeno em vários tecidos do organismo como no fígado, rins, glândulas adrenais, testículos e ovários. Takayama et al. (2013), realizaram testes em animais, onde em um grupo foi administrado licopeno intraperitoneal e no outro grupo o licopeno foi introduzido através da alimentação. Takayama et al. (2013) disseram que a concentração do licopeno após a ingestão de alimentos pode ser muito menor do que após a injeção intraperitoneal, pois o licopeno tem que ser absorvido através do trato

gastrointestinal, porém neste trabalho, através de quantificações puderam encontrar licopeno no soro e no fígado dos animais.

Como mencionado, o licopeno pode se acumular em diferentes órgãos do corpo humano e exercer inúmeras funções biológicas, como à prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo e principalmente a prevenção do câncer.

Porém, o licopeno apresenta estrutura altamente insaturada o que o torna susceptível à degradação rapidamente, sendo que fatores ambientais como luz, temperatura e principalmente a presença de oxigênio são os principais agentes que favorecem sua oxidação.

A técnica de microencapsulação representa uma alternativa para minimizar ou retardar a degradação do licopeno, tornando-o mais estável, facilitando sua aplicação.

2.3 Microencapsulação

A microencapsulação é uma tecnologia utilizada para recobrir substâncias (compostos ativos) com materiais que as isolam o completamente ou parcialmente do meio ambiente, assim proporcionando proteção (CHAMBI et al., 2008). Esta técnica possibilita aumentar a estabilidade de compostos bioativos que estão sujeitos a condições ambientais adversas, tais como armazenamento e processamento, e para preservar a sua atividade antioxidante (RUTZ et al., 2013).

A encapsulação vem se destacando há décadas por solucionar limitações no emprego de medicamentos, ingredientes em alimentos, cosméticos, produtos veterinários, de higiene e limpeza, entre outros. Dentre as tecnologias mais populares empregadas na produção de microcápsulas destacam-se a coacervação, a evaporação do solvente, geleificação iônica, lipossomas, *spray drying* e *spray cooling* (também

chamada de *spray congealing* e *spray chilling*) (OKURO, MATOS JR & TRINDADE (2013).

A microencapsulação vem sendo utilizada para ocultar sabores desagradáveis de certos ingredientes e também para a conversão de compostos no estado líquido para o estado sólido (GOUIN, 2004). A microencapsulação além de proporcionar uma maior proteção ao material encapsulado também proporciona a liberação controlada do mesmo em um meio específico a uma taxa conhecida (CHAMBI et al., 2008).

A liberação controlada dos ingredientes pode melhorar a eficácia dos aditivos alimentares e garantir a aplicação da dosagem ótima. Qualquer tipo de estímulo pode ser utilizado para começar a liberação do ingrediente encapsulado, tal como a mudança de pH (revestimento entérico), o esforço mecânico, a temperatura, a atividade enzimática, o tempo, a força osmótica, entre outros meios (GOUIN, 2004).

A microencapsulação, por sua vez, pode aumentar a estabilidade de determinados produtos alimentícios, tais como compostos funcionais que são facilmente degradados por fatores ambientais. Assim, esta técnica pode conferir uma maior estabilidade, aumentando a durabilidade do produto, consequentemente aumentando sua vida de prateleira.

Dentre as técnicas de microencapsulação uma vem se destacando por utilizar baixas temperaturas durante o processo, sendo útil na encapsulação de compostos bioativos que são sensíveis a elevadas temperaturas (como as empregadas na técnica de *spray-drying*). A produção de micropartículas por *spray-chilling* vem ganhando um grande interesse por utilizar-se de baixas temperaturas e por ser uma técnica ecológica, pois dispensa a utilização de solventes, tais como a água, durante a atomização.

2.3.1 *Spray-chilling*

Spray chilling (também chamada de *spray-cooling* ou *spray-congealing*) é o processo de atomização de um material fundido em uma câmara refrigerada que resultará na formação de um pó (micropartículas) que são sólidas à temperatura ambiente (SILLICK & GREGSON, 2012).

A técnica de *spray chilling*, dentre as tecnologias de microencapsulação, é a mais econômica e é utilizada rotineiramente para o encapsulamento de uma série de compostos, como enzimas, microrganismos, ingredientes funcionais tais como carotenoides, vitaminas entre outros (GOUIN, 2004).

Como agentes encapsulantes na maioria das vezes são utilizados materiais de origem lipídica, sendo os agentes mais utilizados para esta técnica ácidos graxos, triacilgliceróis, álcoois graxos, e ceras com alto ponto de fusão (FINI et al., 2011).

Nos últimos anos houve aumento no interesse pela técnica de *spray chilling*, devido à dispensa do uso de solventes orgânicos e a economia de energia por ser uma metodologia mais rápida do que os outros métodos de microencapsulação (PASSERINI et al., 2010).

Figura 3: Representação do *spray chilling*.

Fonte adaptada: Okuro, 2013.

O processo de produção das micropartículas consiste primeiramente no preparo de solução, dispersão ou emulsão do composto bioativo com o material carreador fundido (OKURO, MATOS Jr & FAVARO-TRINDADE, 2013). O material fundido é bombeado por meio de uma bomba peristáltica, com uma vazão pré-determinada. Essa bomba leva o material fundido até um bico atomizador, que irá aspergir o mesmo dentro de uma câmara refrigerada por ar frio ou nitrogênio líquido. Assim que essa mistura fundida entrar em contato com o ar frio da câmara imediatamente ocorrerá a solidificação, assim ocorrendo à formação das micropartículas sólidas lipídicas (Figura 3).

As micropartículas produzidas por *spray chilling* são do tipo matriz, onde o núcleo (composto bioativo) fica disperso por toda a extensão da partícula. Sendo assim, uma proporção significativa do composto ativo fica sobre a superfície da matriz lipídica ou saindo da mesma, ou seja, parte do bioativo pode estar em contato direto com o

ambiente (GOUIN, 2004). Por isso, muitas vezes este processo não é considerado como uma técnica de microencapsulação, pois não há formação do sistema tipo reservatório, onde o núcleo fica recoberto pelo material de parede. Gouin (2004) descreve como sendo um processo de microencapsulação verdadeiro, aquele em que o núcleo está totalmente recoberto pelo carreador.

Apesar disso, esta técnica vem ganhando destaque por apresentar inúmeras vantagens, como a rapidez, o bom desempenho e o custo relativamente baixo do processo, propriamente dito, além de dispensar a utilização de água ou solventes orgânicos para sua execução, sendo assim desnecessária a eliminação de solventes residuais (OKURO, MATOS Jr & FAVARO-TRINDADE, 2013).

Outro ponto vantajoso na utilização da técnica é que além de ser ecologicamente correta - por dispensar a utilização de solventes - a mesma, em comparação a outras técnicas, é mais rápida e tem um consumo de energia menor (PASSERINI et al., 2010).

Apesar de esta técnica apresentar vantagens, alguns problemas podem acontecer tais como a cristalização lipídica que pode provocar a expulsão do núcleo, pois o espaço disponível para o mesmo pode ser reduzido podendo ocasionar a sua expulsão da micropartícula (LEONEL et al., 2010).

Outras inconveniências, além da expulsão do núcleo, podem acontecer na técnica como: a baixa capacidade de encapsulação do recheio (núcleo), a instabilidade deste recheio na temperatura de fusão do carreador, pois este tem que se manter estável e também requer cuidados operacionais no sentido de evitar a solidificação e aglomeração da mistura fundida, na linha de alimentação, o que compromete a eficiência de atomização e consequentemente o processo, de maneira geral (OKURO, MATOS Jr & FAVARO-TRINDADE, 2013).

Em relação à terminologia da técnica de microencapsulação por *spray-chilling*, não há uma concordância na literatura, por isso muitas vezes os termos *spray-cooling* (GOUIN, 2004) e *spray-congealing* (ALBERTINI et al., 2008; ILIC et al., 2009; MARTINS et al., 2013) são utilizados como sinônimos para tal técnica. Zuidam & Shimoni (2010) definem para *spray-chilling* o processo onde se utiliza carreadores cujo ponto de fusão varia de 34-42°C, e uma temperatura de ponto de fusão maior para os carreadores usados na técnica de *spray-cooling*. Para classificação de *spray-congealing* Albertini et al., (2008) determinaram carreadores com pontos de fusão, em torno de 45 a 75 °C.

Vários estudos vêm desenvolvendo aplicações para as micropartículas obtidas por *spray-chilling* como, por exemplo, aumentar a dissolução de fármacos (ELKORDY & ESSA, 2010), o mascaramento de sabores indesejáveis (YAJIMA et al., 1996), aumentar a viabilidade de probióticos quando expostos a ambientes adversos como fluídos gástrico e intestinal (PEDROSO et al., 2012).

Yajima, Umeki & Itai (1999) encapsularam Claritromicina (antibiótico) por *spray-congealing* utilizando uma matriz de cera para mascarar o gosto amargo e verificaram que a técnica foi eficaz no mascaramento do sabor indesejado do fármaco.

Passerini et al. (2003) estudaram a liberação controlada do fármaco cloridrato de verapamil e por métodos espectrofotométricos avaliaram a dissolução do mesmo. Estes autores verificaram que a encapsulação deste fármaco por *spray-congealing* em uma matriz de cera é promissora, pois, estas partículas mostraram liberação de ordem zero, durante 8 h, sem modificar as propriedades de estado sólido do fármaco.

Wegmuller et al. (2006) utilizando uma matriz lipídica encapsularam iodo, ferro e vitamina A com o objetivo de suplementar o sal de cozinha e verificaram que a

técnica de *spray-cooling* produziram micropartículas estáveis e através de análises sensoriais obtiveram uma boa aceitação deste sal suplementado.

Pedroso et al. (2012) encapsularam *Bifidobacterium* subsp. *lactis* e *Lactobacillus acidophilus* por meio da técnica de *spray-chilling* utilizando como agente carreador uma gordura interesterificada de palma e palmiste e puderam observar a sobrevivência destes microrganismos ao longo do processo de microencapsulação e através de testes *in vitro* de simulação de fluídos gastrointestinais verificaram que a micropartícula foi eficaz na proteção aos microrganismos.

A microencapsulação por *spray-chilling* se mostra muito vantajosa no que diz respeito à encapsulação de compostos bioativos, pois por utilizar baixas temperaturas no processo se torna conveniente para a encapsulação de substâncias termossensíveis, além de ser um método fácil, rápido, contínuo e por dispensar a utilização de solventes tornando uma técnica ambientalmente correta. Contudo, apresenta alguns inconvenientes como a baixa eficiência de encapsulação e a expulsão do recheio devido à recristalização lipídica durante o armazenamento.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Materiais

Como carreador foi utilizada uma gordura vegetal Tri-HS-48 (marca Triângulo Alimentos, Itápolis-SP), com ponto de fusão de aproximadamente 51°C.

O núcleo ou material ativo, o licopeno, foi doado pela empresa DSM Produtos Nutricionais Brasil LTDA (São Paulo). Consistia em uma preparação comercial de licopeno e óleo de girassol (DSM, Redvivo 10% FS) na proporção de 1:10.

Goma arábica (marca Dinâmica. Química Contemporânea Ltda.).

Carboximetilcelulose (Fagron do Brasil Farmacêutica Ltda. São Paulo).

3.2. Métodos

3.2.1. Composição em ácidos graxos do agente carreador

A análise de cromatografia gasosa de ésteres metílicos de ácidos graxos foi realizada de acordo com o método oficial 1-62 da AOCS (1998). Utilizou-se um cromatógrafo gasoso Shimadzu 2010 AF (Japão), com injetor automático (Shimadzu, modelo AOC 20i, Japão) e detector de ionização de chama nas seguintes condições experimentais: coluna capilar altamente polar de bis-cianopropil polisiloxano 0,20 µm, 100 m x 0,25 mm i.d. (SP – 2560, Supelco, Bellefonte, PA, EUA), utilizou-se hélio como gás de arraste (velocidade linear de 19,5 cm/seg); temperatura do injetor de 250 °C, temperatura da coluna de 140 °C (5 minutos), 140/240 °C (taxa de 4 °C/min), 240 °C (15 minutos); temperatura do detector de 260 °C e volume de injeção de 1,0 µL; split 100:1. Os ácidos graxos foram identificados por comparação com padrões externos adquiridos da Supelco (Bellefonte, PA, EUA). A quantificação foi realizada com base nas relações de área de cada ácido graxo com a área do padrão interno metiltridecanoato

(Zenebon et al., 2008), utilizando os fatores de correção de resposta do detector de ionização de chama e de conversão de ésteres metílicos de ácidos graxos para ácido graxo.

3.2.2. Preparação das micropartículas

As micropartículas foram produzidas por meio da técnica de *spray-chilling*, de acordo com o método descrito em Chambi et al., (2008), com algumas modificações. A gordura foi derretida a uma temperatura de 60°C e depois se adicionou o licopeno. A temperatura foi determinada através de estudos preliminares, onde se observou a melhor temperatura para manter estável o licopeno e a solução bombeável no processo de atomização. Em seguida a solução foi atomizada em um *spray-chiller* (Labmaq Brasil), em uma câmara fria a 13°C, usando bico de 1,2 mm, pressão do ar de 1.0 kgf/cm² e uma vazão de 40 mL/min.

Foram realizados 6 tratamentos, de acordo com a Tabela 1, onde o tratamento 1 continha 20% de solução oleosa de licopeno, tratamento 2 continha 23,1%, tratamento 3 continha 28,6%, tratamento 4 continha 33,3%, tratamento 5 continha 17,9% de solução oleosa de licopeno com a adição de 10% de goma arábica e o tratamento 6 continha 19,2% de solução oleosa de licopeno com adição de 5% de carboximetilcelulose.

Antes da realização dos tratamentos quantificou-se o licopeno doado pela DSM, e verificou que sua concentração era de 14%.

Realizaram-se 3 repetições de cada processo e triplicata de todas as análises.

Tabela 1- Composição dos tratamentos que foram estudados.

Tratamentos (% de solução oleosa de licopeno)	Formulação			
	Gordura (g)	Solução oleosa de licopeno* (g)	Goma arábica (g)	CMC (g)
1 (20)	60	15	-	-
2 (23,1)	60	18	-	-
3 (28,6)	60	24	-	-
4 (33,3)	60	30	-	-
5 (17,9)	60	15	6	-
6 (19,2)	60	15	-	3

* O teor de licopeno na solução oleosa era de 14%.

3.2.3. Quantificação do licopeno

Para as análises de estabilidade, o licopeno foi quantificado por espectrofotometria, conforme Rocha et al., (2012).

Para liberação do licopeno das micropartículas, cerca de 10 mg de amostra foi adicionada em 10 mL éter de petróleo, após os tubos foram homogeneizados em vórtex. A absorção foi lida em espectrofotômetro (Hach, DR 2800, EUA) em um comprimento de onda a 470 nm. Para os cálculos, foi usada a fórmula abaixo (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001):

$$\text{Concentração de licopeno} = \frac{(A \times V \times 10^6)}{(A^{1\%}(\epsilon) \times m \times 100)} \quad \text{onde,}$$

A = absorbância

V = volume final em mL

$A^{1\%}$ = coeficiente de absorção do licopeno em éter de petróleo = 3450 cm^{-1}

m = massa final da amostra em gramas

Para determinar a degradação do material encapsulado foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Degradação} = \left[\frac{\text{licopeno final (mg)}}{\text{licopeno inicial (mg)}} \times 100 \right] - 100 \quad \text{onde,}$$

Licopeno Inicial = Quantificação do licopeno no primeiro dia (mg/Kg);

Licopeno Final = Quantificação do licopeno em 3, 30, 60 e 90 dias (mg/Kg)

3.3. Caracterização das partículas obtidas

3.3.1. Análise da distribuição do tamanho de partícula

Para a avaliação do tamanho e distribuição de tamanho das partículas sólido lipídicas utilizou-se o analisador de partículas por difração de raio laser Shimadzu Sald-201V (Japão). Para a análise as partículas foram dispersas em álcool etílico (Synth, Brasil) e colocadas rapidamente em ultrassom para dispersá-las. Esta técnica foi aplicada periodicamente no material estocado, com o objetivo de avaliar a estabilidade física das micropartículas e, principalmente, a possibilidade de aglomeração.

3.3.2 Análises morfológicas

A morfologia das micropartículas foi estudada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), por meio do microscópio Tabletop Microscope Hitachi (Japão) TM 3000, com o programa TM 3000. Para o MEV, as micropartículas foram acomodadas em uma fita de carbono dupla face (Ted Pella, Inc.), e estas foram fixadas em *stubs* de alumínio. As imagens foram captadas com aceleração de voltagem de 5 kV, com corrente de 1750 mA.

3.3.3. Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier (FT-IR)

Os espectros FT-IR foram obtidos em um espectrômetro de infravermelho (Perkin Elmer, Spectrum One, EUA), onde os ingredientes puros e as micropartículas foram adicionados diretamente no equipamento em um acessório (Universal ATR Sampling Accessory), onde se realizou a varredura das amostras. A faixa de varredura foi de $650\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ e a resolução de 4 cm^{-1} .

3.3.4. Difração de Raio X (DRX)

Os difratogramas de raios X foram obtidos em um difratômetro Bruker D8 (Billerica - Massachusetts – USA), à temperatura ambiente, com radiação $\text{Cu } k_{\alpha}$ ($\lambda=1.5405\text{ \AA}$), tensão de 40 kV, corrente de 30 mA, velocidade angular de $0,05\text{ }^{\circ}/\text{s}$, em geometria $\theta\text{-}2\theta$ com 2θ variando de 3 a 35° .

3.4. Avaliação da estabilidade do licopeno microencapsulado

A estabilidade do licopeno foi avaliada por meio de quantificações periódicas nas micropartículas lipídicas, bem como, por meio das avaliações da cor instrumental nas micropartículas lipídicas.

3.4.1. Avaliação da estabilidade do licopeno microencapsulado

O licopeno encapsulado foi quantificado periodicamente, conforme descrito no item 3.2.3. As análises foram realizadas em triplicata, nos tempos 0, 3, 30, 60 e 90 dias após a encapsulação, com os materiais estocados em dessecadores em quatro condições sendo que o primeiro dessecador foi mantido em BOD (Biochemical Demand Oxygen) protegido da luz, na presença de oxigênio a temperatura ambiente (20-22°C) com UR controlada a 33% com cloreto de magnésio. O segundo dessecador foi mantido em BOD, protegido da luz, a temperatura ambiente e com a aplicação de vácuo. O terceiro dessecador foi mantido sob refrigeração (5-6°C), protegido da luz, na presença de oxigênio e com UR controlada a 33%. O quarto dessecador foi mantido sob refrigeração (5-6°C), protegido da luz e com a aplicação de vácuo. Para o cálculo de estabilidade, a quantidade de licopeno determinada no tempo 0 foi considerada como sendo o licopeno com 100% de retenção (TRINDADE e GROSSO, 2000).

3.4.2. Análise Instrumental de cor

A medição de cor no sistema $L^*a^*b^*$ foi realizada no espectrofotômetro portátil modelo miniscan XE plus da Hunterlab com Iluminante D65 e observador a 10° utilizando o software Universal Software V4.10 para coleta e tratamento de

dados. Avaliação Instrumental de cor das amostras foi realizada nos tempos 0, 3, 30, 60 e 90 dias na tentativa de estabelecer uma correlação entre estabilidade e a mudança de cor das amostras resultante da degradação do licopeno.

3.5. Determinação da biodisponibilidade do licopeno livre e encapsulado

3.5.1. Animais

O estudo da biodisponibilidade do licopeno livre e encapsulado foi desenvolvido com 68 ratos machos Wistar, com três semanas de idade, pesando entre 200-250g, provenientes da Anilab – Animais de Laboratório Criação e Comércio Ltda. – EPP- Paulínia/SP. Os animais foram acomodados no Laboratório de Bioquímica da UNIARARAS, submetidos a ciclo de claro e escuro, onde receberam água e ração *ad libitum* durante o período experimental. Todos os procedimentos do ensaio de biodisponibilidade foram executados após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (Parecer nº 016/2012) da instituição em apreço.

3.5.2. Tratamento dos animais

Os animais foram divididos em 16 grupos sendo que 12 grupos continham 5 animais cada e 4 grupos com 2 animais. Os grupos com 2 animais serviram como controle, pois esses animais não receberam licopeno e foram denominados I, II, III, IV. Os grupos V, VI, VII, VIII receberam licopeno livre. Os grupos IX, X, XI, XII, XIII, XIV, XV, XVI receberam o tratamento contendo o licopeno encapsulado que apresentou a melhor estabilidade. O licopeno livre e microencapsulado foram administrados por gavagem, na dose de 20 mg/Kg, na forma de uma suspensão com óleo de soja. Os animais foram submetidos a jejum desde 12 horas antes da administração de licopeno

até a coleta de amostra (sangue) com livre acesso a água (FAISAL, O'DRISCOLL & GRIFFIN, 2010).

3.5.3. Coleta das amostras biológicas

Os animais foram anestesiados com 0,3 mL de uma mistura constituída por quetamina 50 mg/mL e xilasina 2% (3:1) antes da coleta do sangue. Uma amostra de sangue (4 mL) foi coletada de cada animal, por punção cardíaca, após 2 (grupos I, V, IX e XII), 4 (grupos II, VI, X e XIV), 6 (grupos III, VII, XI e XV) e 8 horas (grupos IV, VIII, XII e XVI) após a administração de licopeno encapsulado e livre, sendo que os grupos I, II, III e IV não receberam licopeno encapsulado ou livre, porém seguiram a mesma ordem do tempo de coleta de amostras. As amostras de sangue foram mantidas ao abrigo de luz e sob refrigeração. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas em centrífuga refrigerada (Centrifuge 5430R, Eppendorf, Alemanha) por 5 minutos, a 5000 rpm para obtenção do soro. Após a obtenção do soro ocorreu a determinação do licopeno sérico por CLAE.

3.5.4. Extração do licopeno sérico

A extração de licopeno no soro foi realizada conforme Riso & Porrini (1997) com modificações, preparando uma mistura com 1,5 mL de soro, 2 mL de metanol e 2 mL éter de petróleo. Essa mistura foi homogeneizada em vórtex por 1 minuto e centrifugada por 5 minutos a 5000 rpm. Em seguida, em torno de 1,5 mL do sobrenadante foi utilizado para a quantificação por CLAE.

3.5.5. Análise de licopeno por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Utilizou-se um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (Shimadzu, Prominence) equipado com uma bomba quaternária, degaseificador, injetor automático, forno de coluna (30°C), detector por arranjo de diodos (470 nm) e controle via software (Shimadzu, LCSolutions versão 1.25). As análises foram conduzidas em coluna analítica (Shim Pack VP-ODS de 250 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e 4,6 µm de tamanho de partícula), fase móvel isocrática contendo metanol (Êxodo) e acetato de etila (Êxodo) na proporção de 80:20 (v/v) com fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20 µL e tempo de corrida 30 minutos. A quantificação do licopeno foi realizada por adição de padrão interno (β -caroteno, Sigma 93% de pureza) e a curva de calibração entre 0,10 a 1,20 mg/mL de licopeno (DSM).

3.6. Análises Estatísticas

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando-se o programa estatístico SAS (Statistic Analysis System), versão 9.2, por análise de variância ANOVA e teste de Tukey, ao nível de 5%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Caracterização do carreador

A fim de se caracterizar a matriz lipídica utilizada, realizou-se estudo de sua composição em ácidos graxos por cromatografia gasosa.

Conforme os resultados apresentados na Tabela 2 verifica-se que a matriz lipídica utilizada era composta de ácidos graxos saturados como os ácidos caprílico, láurico, mirístico, palmítico e esteárico e de ácidos graxos insaturados como os ácidos oléico (ômega-9), linoleico (ômega-6) e o eicosatrienóico (família do ômega-6), porém, a matriz lipídica era composta principalmente pelos ácidos palmítico, esteárico e oléico. A presença de diferentes ácidos graxos na composição da gordura pode ser interessante para a formação de cristais com tamanhos e formatos distintos, o que facilitaria a acomodação na formação das micropartículas sólido lipídicas, conferindo-lhe maior estabilidade, evitando a expulsão do ingrediente ativo durante o armazenamento, devido ao polimorfismo, conferindo proteção ao ingrediente bioativo.

Tabela 2: Composição em ácidos graxos da gordura vegetal utilizada.

Ácido graxo		Massa (%)
Caprílico	C8:0	1,31
Láurico	C12:0	0,45
Mirístico	C14:0	0,82
Palmítico	C16:0	30,43
Esteárico	C18:0	34,52
Oleico	C18:1	27,61
Linoleico	C18:2	4,61
Eicosatrienóico	C20:3	0,19

4.2. *Spray Chilling*

O processo de *spray chilling* empregado para a elaboração das micropartículas lipídicas sólidas (MLS) carregadas de licopeno, resultou na obtenção de pós com

coloração vermelha intensa, fluido, porém com algumas aglomerações (Figura 4). Não se observou diferenças entre as colorações dos tratamentos.

Figura 4: Imagem do pó contendo as micropartículas lipídicas sólidas carregadas de licopeno.

4.3. Caracterização das micropartículas

4.3.1. Morfologia por Microscopia Eletrônica de Varredura

Na Figura 5 (de A a F) pode-se observar micrografias das MLSs obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

As imagens mostram MLSs com formatos esféricos, apresentando aglomerações, diâmetros variados, com superfície rugosa e a presença de alguns poros, todavia sem a presença de rachaduras. A obtenção do formato esférico é importante para facilitar o escoamento e a aplicação do pó, por outro lado, a rugosidade superficial pode dificultar o escoamento e pode ser indicativa da formação de uma matriz lipídica heterogênea. Ainda, a presença de poros nas partículas pode comprometer sua funcionalidade, pois pode facilitar o acesso do oxigênio, que é um fator pró-oxidante, ao licopeno aprisionado na matriz lipídica.

Figura 5: Micrografias das micropartículas obtidas por *spray-chilling*. (A) Tratamento 1 (20% de licopeno) com aumento de 1000x; (B) Tratamento 2 (23,1% de licopeno) com aumento de 1000x; (C) Tratamento 3 (28,6% de licopeno) com aumento de 1000X; (D) Tratamento 4 (33,3% de licopeno) com aumento de 1000x; (E) Tratamento 5 (17,9% de licopeno + goma arábica) com aumento de 1000x; Tratamento 6 (19,2% de licopeno + carboximetilcelulose) com aumento de 1000x.

Entre os tratamentos não foi possível evidenciar diferenças morfológicas conforme houve aumento da proporção do núcleo ativo (solução oleosa de

licopeno), portanto, foi possível produzir partículas com maior carregamento de núcleo sem alterar sua morfologia. A adição dos polissacarídeos goma arábica e da carboximetilcelulose também não promoveu alterações morfológicas detectáveis pela microscopia eletrônica de varredura, como rachaduras nas micropartículas.

Resultados semelhantes aos apresentados foram obtidos por Chambi et al., (2008), que ao encapsular hidrolisado de caseína por *spray-chilling* utilizando carreadores lipídicos (ácido esteárico, ácido oleico e ácido láurico) obtiveram partículas com formatos esféricos, paredes irregulares, sendo bastante enrugadas e mostrando a presença de partículas de tamanhos variados.

Ilica et al. (2009) encapsularam glimepirida, um fármaco antidiabético, por *spray congealing* utilizando um carreador lipídico, e puderam observar, por microscopia eletrônica de varredura, partículas aglomeradas, com formatos esféricos e superfícies relativamente lisas.

Pedroso et al. (2012), ao encapsularem bactérias probióticas por *spray-chilling*, obtiveram partículas com formatos esféricos, com superfícies irregulares e rugosas. O que se assemelha com os resultados achados neste trabalho.

Na encapsulação por *spray-congealing* de proteína em uma matriz lipídica, Di Sabatino et al. (2012) encontraram micropartículas com formatos esféricos e ao contrário deste trabalho, eles não encontraram evidências de aglomerações. Todavia estes autores utilizaram carreadores com pontos de fusão mais altos.

Okuro et al. (2013), encapsularam *Lactobacillus acidophilus* utilizando uma matriz lipídica por *spray-chilling* e por meio de imagens de microscopia eletrônica de varredura, observaram que as micropartículas possuíam formato

esférico, superfície continua, relativamente lisa e sem evidência de rachaduras ou poros.

4.3.2. Tamanho e distribuição de partículas

Os resultados referentes a distribuição de partículas dos seis tratamentos (T1 a T6) nas diferentes formas de armazenamento (sob UR de 33%, vácuo, temperatura ambiente e de refrigeração), no dia do preparo das partículas (dia 0) e após 90 dias de seu armazenamento, estão expressos nas Figuras 6 a 11.

Para as amostras do tratamento 1 armazenadas à temperatura ambiente, sob UR de 33% e vácuo (Figura 6 A e B), pode-se observar ligeiro deslocamento para a direita do pico após 90 dias de estocagem, ou seja, houve um pequeno aumento no tamanho das partículas durante seu armazenamento, que pode ser relacionado à aglomeração dos pós. A aglomeração pode ter ocorrido em função da presença na forma líquida ou da fusão de alguns triacilgliceróis (com menor ponto de fusão), os quais, líquidos, promoveram a aderência entre as partículas lipídicas. A presença de aglomerados também foi detectada pela microscopia eletrônica de varredura. A aglomeração não ocorreu nas amostras mantidas sob temperatura de refrigeração, pois os picos obtidos nos dias 0 e 90 estavam praticamente sobrepostos (Figura 6 B e C), o que permite inferir que a refrigeração foi importante para manter o tamanho original dessas partículas.

Figura 6: Tamanho e distribuição de partícula do **tratamento 1** no início (dia 0) e no final do armazenamento (90 dias —), sendo A: armazenado à temperatura ambiente e sob UR 33%; B: armazenado em temperatura ambiente e sob vácuo; C: armazenado sob temperatura de refrigeração e sob UR 33% e D: armazenado sob temperatura de refrigeração e sob vácuo.

Para o tratamento 2 (Figuras 7 A - D) foram obtidos resultados muito similares aos do tratamento 1, com maior deslocamento para a direita e estreitamento do pico para amostra mantida sob UR de 33% (Figura 7A), indicando que esta foi a condição que mais afetou o tamanho e a distribuição dessas partículas.

Figura 7. Tamanho e distribuição de partícula do **tratamento 2** no início (dia 0.....) e no final do armazenamento (90 dias —), sendo A: armazenado em temperatura ambiente e sob UR 33%; B: armazenado em temperatura ambiente e sob vácuo; C: armazenado sob temperatura de refrigeração e sob UR 33% e D: armazenado sob temperatura de refrigeração e sob vácuo.

No tratamento 3 (Figuras 8 A - D), os resultados foram distintos dos obtidos para os tratamentos 1 e 2, pois sob UR de 33% e temperatura ambiente praticamente não houve alteração na distribuição (Figura 8A), sob vácuo houve aumento, e sob refrigeração houve discreto deslocamento do pico. Esta amostra tem maior teor de solução oleosa de licopeno, logo tem maior teor de ácidos graxos insaturados, que tem menor ponto de fusão, portanto, a amostra esta amostra está mais sujeita a aglomeração que a 1 e 2.

Figura 8: Tamanho e distribuição de partícula do **tratamento 3** no início (dia 0 ····) e no final do armazenamento (90 dias —), sendo A: armazenado em temperatura ambiente e sob UR 33%; B: armazenado em temperatura ambiente e sob vácuo; C: armazenado sob temperatura de refrigeração e sob UR 33% e D: armazenado sob temperatura de refrigeração e sob vácuo.

Nos tratamentos 4 (Figuras 9 A-D) não se verificou a tendência de que quanto maior o teor de solução oleosa de licopeno maior a aglomeração durante a estocagem, pois verificou-se deslocamentos muito discretos em todas as condições de estocagem, exceto sob refrigeração e vácuo (Figura 9D), onde os picos estavam praticamente sobrepostos, indicando que esta amostra foi pouco suscetível à aglomeração durante a estocagem e que a condição de refrigeração e vácuo foi a mais adequada para seu armazenamento no que diz respeito a manutenção do tamanho das partículas.

Com relação aos tratamentos 5 e 6 (Figuras 10 A-D e 11 A-D) verificou-se também pequenos deslocamentos dos picos em todas as condições de estocagem, ou

seja, houve ligeira tendência à aglomeração, que também foi menor sob refrigeração e vácuo, principalmente para o tratamento 5 (Figura 10D).

Figura 9: Tamanho e distribuição de partícula do **tratamento 4** no início (dia 0) e no final do armazenamento (90 dias —), sendo A: armazenado em temperatura ambiente e sob UR 33%; B: armazenado em temperatura ambiente e sob vácuo; C: armazenado sob temperatura de refrigeração e sob UR 33% e D: armazenado sob temperatura de refrigeração e sob vácuo.

Figura 10: Tamanho e distribuição de partícula do **tratamento 5** no início (dia 0.....) e no final do armazenamento (90 dias —), sendo A: armazenado em temperatura ambiente e sob UR 33%; B: armazenado em temperatura ambiente e sob vácuo; C: armazenado sob temperatura de refrigeração e sob UR 33% e D: armazenado sob temperatura de refrigeração e sob vácuo.

Figura 11: Tamanho e distribuição de partícula do **tratamento 6** no início (dia 0 ·····) e no final do armazenamento (90 dias —), sendo A: armazenado em temperatura ambiente e sob UR 33%; B: armazenado em temperatura ambiente e sob vácuo; C: armazenado sob temperatura de refrigeração e sob UR 33% e D: armazenado sob temperatura de refrigeração e sob vácuo.

De maneira geral os resultados obtidos para a análise do tamanho e distribuição de partículas mostraram que os tamanhos se concentraram em torno de 60-110 µm, podendo ser observado também a presença de partículas com tamanhos próximos a 10 µm, indicando alta polidispersidade. Isto foi observado para todos os tratamentos, sendo que as concentrações de licopeno utilizadas para cada formulação não tiveram influência no tamanho de partícula.

Esta polidispersidade também foi observada pelas imagens de microscopia eletrônica de varredura (Figura 2), onde se pode verificar micropartículas com tamanhos bem diferentes.

Albertini et al. (2008) obtiveram resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho ao encapsular cloridrato de propafenona e vitamina E por *spray-congealing*, pois verificaram que a faixa de tamanho de partícula predominante foi de 75-150 μm .

Yajima, Umeki & Itai (1999) ao encapsularem claritromicina por *spray-congealing*, obtiveram partículas com faixa de tamanho em torno de 82,5-169,9 μm . Di Sabatino et al. (2012) ao utilizarem a técnica de *spray-congealing* para encapsular proteínas, verificaram que os tamanhos médios das partículas obtidas estavam entre 150-300 μm . De fato, Sillick & Gregson (2012) relatam que partículas obtidas por meio de um bico de pressão tendem a ter diâmetros entre 40-300 μm .

Com resultados distintos aos encontrados neste trabalho, Leonel et al. (2010) obtiveram diâmetros médios de suas partículas entre 25-32 μm e Chambi et al. (2008) ao encapsular hidrolisado de caseína por *spray-chilling* também atingiram tamanhos médios de 19,9-21,7 μm . Considerando que estes trabalhos foram realizados pelo mesmo grupo de pesquisa, a diferença obtida do presente trabalho pode ser atribuída na utilização de dispositivos de atomização distintos.

4.3.3. Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier (FTIR).

Os espectros na região média do infravermelho (4000 a 400 cm^{-1}) apresentam bandas que podem ser atribuídas às vibrações dos grupos funcionais dos compostos orgânicos (GUILLÉN et al., 1997). Desta forma, a análise de FTIR tem sido utilizada na avaliação de micropartículas e microcápsulas, pois se trata de uma ferramenta que pode detectar possíveis ligações químicas que tenham ocorrido entre o ingrediente ativo e o agente carreador, além de alterações nas moléculas presentes.

Esta análise não foi realizada para os tratamentos T5 e T6 porque estes foram inseridos no projeto depois que estas análises já tinham sido feitas.

Na Figura 7 podem ser verificados os espectros das micropartículas (T1 a T4), da gordura vegetal pura e da solução oleosa do licopeno. Nas micropartículas, no carreador e na solução oleosa de licopeno o componente majoritário era triacilglicerol, desta forma eram esperadas e foram obtidas bandas características das vibrações dos grupos funcionais presentes nesta molécula em todas as amostras analisadas. Assim, de acordo com Dufour (2009) e Guillén & Cabo (1997), as bandas relativas às vibrações de estiramento das ligações ésteres do triacilglicerol aparecem entre 1300 e 1000 cm^{-1} (aproximadamente 1175 cm^{-1} neste trabalho), as vibrações de estiramento de alta intensidade do grupo funcional carbonila ocorrem por volta de 1750 cm^{-1} e da cadeia acil, também de estiramento de alta intensidade, entre 3000-2800 cm^{-1} .

Figura 12: Espectro de absorção na região do infravermelho, sendo A: agente carreador (gordura); B: núcleo ativo (solução oleosa de licopeno); C: T1(20% de solução oleosa de licopeno); D: T2 (23,1% de solução oleosa de licopeno); E: T3 (28,6% de solução oleosa de licopeno) e F: T4 (33,3% de solução oleosa de licopeno).

As bandas que apareceram em todos os espectros obtidos foram similares, com pequenas diferenças de intensidade, denotando que o processo empregado para a obtenção das micropartículas e a presença de licopeno não promoveram a formação de ligações distintas nas amostras atomizadas. A banda que aparece entre $950\text{--}980\text{ cm}^{-1}$ nos espectros de todas as amostras, mas em maior intensidade no espectro da solução oleosa de licopeno, refere-se às ligações -HC=CH- *trans*, que ocorrem em grande número na molécula do licopeno. Esta banda foi reportada por Rubio-Diaz et al., (2010), quando estes autores estudaram extratos contendo licopeno.

Albertini et al., (2010) obtiveram resultado semelhante, pois não detectaram interações químicas entre o atenolol e os carreadores lipídicos na caracterização por FTIR das micropartículas obtidas por *spray-congealing*.

4.3.4. Difração de Raios-X (DRX)

Na Figura 8 podem ser observados os difratogramas das micropartículas (tratamentos T1 a T4), da gordura pura e da solução oleosa de licopeno que foram obtidos após aproximadamente 90 dias de estocagem do material, à temperatura de 4°C . As amostras T5 e T6 não foram analisadas porque foram inseridas no projeto depois que esta análise tinha sido feita.

Verifica-se que o padrão de difração obtido para a solução oleosa de licopeno é predominantemente característico de material amorfo, ou seja, apresenta uma banda com aproximadamente 10° de largura entorno de $2\theta=19^{\circ}$, e picos de baixa intensidade em $2\theta=24,4$ e $2\theta=26,2^{\circ}$. Já os difratogramas das micropartículas e da gordura são similares e característicos de materiais no estado cristalino, com presença de picos bem definidos em $2\theta = 6^{\circ}$, 21° e $23,5^{\circ}$. Os difratogramas das micropartículas, que são uma

mistura de gordura e solução oleosa de licopeno, apresentam sobreposição dos padrões amorfos (solução oleosa de licopeno) e cristalino (gordura). Observa-se pelos difratogramas uma diminuição gradativa na intensidade relativa dos picos de difração quando se altera a proporção da mistura gordura + solução oleosa de licopeno.

O fato das micropartículas e da gordura pura terem apresentado perfis cristalinos similares permite inferir que a fase cristalina da gordura vegetal nas micropartículas não é alterada pela mistura com a solução oleosa de licopeno, independentemente da sua concentração, nem pelo processo empregado na sua produção. Os picos de difração da gordura referem-se à fase polimórfica β . Esta forma polimórfica também foi verificada em outros estudos onde foram produzidas micropartículas lipídicas utilizando-se o processo de *spray chilling* (Gamboa et al., 2011; Okuro et al., 2013).

O conhecimento da forma polimórfica dos cristais que originam as micropartículas lipídicas é de extrema importância principalmente devido ao fato dos triacilgliceróis manifestarem o fenômeno de polimorfismo, que é a capacidade de um material exibir diferentes formas cristalinas. Em geral gorduras podem exibir as fases α , β' e β , que apresentam diferentes estabilidades termodinâmicas. Se sofrerem rearranjo estrutural, alterando a forma polimórfica de seus cristais, as micropartículas lipídicas podem expulsar seu recheio, expondo-o às condições adversas do meio e, portanto, tendo sua funcionalidade comprometida.

De acordo com Müller, Radtke e Wissing (2002), durante o armazenamento de partículas lipídicas que apresentam cristais na forma polimórfica α , pode haver modificações na matriz lipídica, levando à formação do polimórfo β , e essas transformações podem levar à expulsão do material ativo do interior da partícula. No presente trabalho, embora se tenha determinado a presença da forma polimórfica β , que

é a mais estável, não se pode afirmar se a gordura que constituía as micropartículas e o processo utilizado para encapsulação propiciaram a obtenção desta forma ou se houve rearranjo cristalino, pois não foi possível realizar a análise de DRX logo após o preparo nem tampouco ao longo do armazenamento das micropartículas para efeito de comparação.

Figura 13: Difrátogramas, sendo A: núcleo ativo (licopeno); B; agente carreador (gordura); C: T1 (20% de solução oleosa de licopeno); D: T2 (23,1% de solução oleosa de licopeno); E: T3 (28,6% de solução oleosa de licopeno + goma arábica) e F: T4 (33,3% de solução oleosa de licopeno + CMC).

4.4. Análise da estabilidade do licopeno encapsulado.

Para determinar qual dos tratamentos teve menor degradação e qual condição de armazenamento teve menor influência na mesma, foram determinadas as médias de degradação durante o período de estocagem, e os resultados estão expressos na Figura 9.

Figura 14: Taxas de degradação (%) do licopeno presente nas micropartículas armazenadas sob diferentes condições durante 90 dias, onde: T1: 20% de solução oleosa de licopeno; T2: 23,1% de solução oleosa de licopeno; T3: 28,6% de solução oleosa de licopeno; T4: 33,3% de solução oleosa de licopeno; T5: 17,9% de solução oleosa de licopeno e GA e T6: 19,2% de solução oleosa de licopeno e CMC;

De acordo com Rodriguez-Amaya (2002) as principais causas de degradação dos carotenoides durante o processamento e armazenamento de alimentos são a oxidação enzimática e a não enzimática. Outra forma de degradação é a isomerização,

na qual as duplas do carotenoide passam da configuração *trans* para a *cis*, promovendo a perda de cor em alimentos, principalmente quando do contato com ácidos e tratamento térmico.

Quando são extraídos do tecido onde se encontram para serem comercializados como pigmento e/ou nutracêutico os carotenoides ficam mais expostos, tornando-se ainda mais susceptíveis à degradação. A microencapsulação é uma das alternativas que tem sido intensivamente estudada para conferir proteção aos extratos de licopeno (MATIOLI e RODRIGUEZ-AMAYA, 2002; MATIOLI e RODRIGUEZ-AMAYA, 2003; SHU et al., 2006; CHIU et al., 2007; BLANCH et al., 2007; NUNES & MERCADANTE, 2007; GOULA & ADAMOPOULOS, 2012; SILVA et al., 2012; ROCHA- SELMI et al., 2013).

Neste trabalho, por não estar em uma matriz alimentícia, o licopeno não estava susceptível apenas a oxidação enzimática.

Os resultados obtidos mostram intensa e gradual degradação do licopeno encapsulado (Figura 9) durante todo o período de estocagem dos pós. Já nos primeiros três dias de estocagem as perdas variaram de 3,4 (T5 sob refrigeração e vácuo) a 34,1% (T3 sob temperatura ambiente e UR de 33%) e possivelmente foram resultantes da oxidação não enzimática e/ou isomerização do licopeno presente na superfície das micropartículas, pois foram obtidas estruturas do tipo matriz, onde o material ativo estava distribuído por todo volume da partícula, inclusive em sua superfície, onde ficava totalmente exposto às condições adversas do meio.

O processo de oxidação e/ou o de isomerização possivelmente tiveram início pelo fato das alimentações (misturas que eram preparadas para atomização) terem sido expostas a temperaturas relativamente altas (60°C) durante seu preparo e até o momento de sua atomização, pois era preciso manter a gordura fundida, além da exposição e

incorporação de oxigênio na alimentação, durante a mistura dos seus ingredientes no ultraturrax, e durante sua nebulização na câmara (este último motivo vale somente para o processo de oxidação).

Com 30 dias de armazenamento as porcentagens de degradação já eram muito altas, variando de 40,30 (T5 sob refrigeração e vácuo) a 69,50% (T1 sob refrigeração e UR de 33%). Estes resultados indicaram que uma vez deflagrado, o processo de degradação do licopeno não foi contido pela matriz lipídica elaborada, ou seja, tal matriz foi pouco efetiva para conferir-lhe proteção. Um fator que pode ter contribuído para a ineficiência das micropartículas produzidas em conferir proteção ao licopeno foi sua possível recristalização após seu preparo, o que resultaria em expulsão do licopeno. Pois embora os resultados da análise de DR-X tenham indicado a presença da forma cristalina β - que é a mais estável - nas micropartículas, não é possível afirmar que ela estava presente desde o momento em que as micropartículas foram produzidas, já que esta análise foi realizada apenas após 90 de armazenamento. De acordo com Leonel et al., (2010), a recristalização lipídica leva a diminuição do espaço disponível para o núcleo ativo, provocando assim a sua expulsão da micropartícula.

Após 90 dias de armazenamento muitas micropartículas apresentavam perdas de licopeno próximas a 100%, excetuando-se aquelas que foram armazenadas sob vácuo e refrigeração, onde a porcentagem de degradação variava de 61,4 (T1) a 72,3% (T3). Este resultado permite inferir que, nos primeiros dias, bem como durante todo o período de armazenamento, a condição de armazenamento que resultou em maior proteção ao licopeno, como esperado, foi aquela em que as micropartículas estavam estocadas em ambiente livre de oxigênio e sob temperatura de refrigeração. Isto porque, quanto maior a concentração de oxigênio e a temperatura de estocagem, maior a taxa de oxidação.

Rocha, Favaro-Trindade e Grosso (2012) encapsularam licopeno por *spray-drying* utilizando amido modificado como agente carreador e observaram que a retenção do licopeno foi influenciada pela temperatura de estocagem, sendo que os melhores resultados de retenção foram encontrados quando as microcápsulas foram armazenadas a 10 °C em comparação com as mantidas em 25 °C, pois, segundo estes autores, temperaturas elevadas favoreceram a oxidação do licopeno. Da mesma forma, Shuet al (2006) obtiveram bons resultados para estabilidade do licopeno encapsulado por *spray-drying*, quando armazenado a 0 °C, onde houve perda de aproximadamente 15% do licopeno encapsulado durante 4 semanas, sendo que essa perda foi atribuída a presença de oxigênio e luz durante a estocagem. Por outro lado, a forma de encapsulação tem efeito muito significativo na proteção ao licopeno, pois Blanchet al (2007) promoveram a encapsulação de licopeno em ciclodextrinas, e obtiveram alta estabilidade do composto durante 6 meses, sendo que o material foi armazenado a temperatura ambiente na presença de luz e oxigênio.

Com relação às formulações estudadas, de maneira geral, a que resultou em maior proteção ao licopeno, especialmente nos primeiros 30 dias de estocagem, era a que continha goma arábica (T5). Com 60 e 90 dias de estocagem esta amostra continuou se diferenciando das demais, exceto sob vácuo e refrigeração, onde seu efeito protetor foi muito similar a T1. Possivelmente a goma arábica, por ser um polissacarídeo de alto peso molecular e com estrutura ramificada, tenha preenchido os espaços existentes entre os cristais dos triacilgliceróis, entupindo os poros e reduzindo o acesso do oxigênio. Todavia, na microscopia eletrônica de varredura não foi detectada diferença morfológica entre as micropartículas.

Os resultados obtidos na análise de estabilidade do licopeno encapsulado foram similares aos obtidos por Mاتيoli e Rodriguez-Amaya (2002), que encapsularam

licopeno por *spray dring* com maltodextrina e goma arábica como carreadores e também obtiveram degradação em torno de 50% durante os primeiros 20 dias de estocagem do material, sendo este mantido a temperatura ambiente e protegido ou não da luz.

4.4.1. Cor instrumental

As análises de cor instrumental foram realizadas utilizando dois parâmetros, sendo: L – luminosidade e a^* - variação do verde para o vermelho (Figura 15).

Figura 15: Sistema de cores L, a, b.
Fonte: Hunterlab, 1995.

Os resultados para o parâmetro L estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3: Valores para o parâmetro luminosidade obtidos para as micropartículas armazenadas por 90 dias em diferentes condições

Tratamentos	Dias				
	0	3	30	60	90
Sob UR 33% e temperatura entre 20-22°C					
T1	19,76 ± 1,12 AB, b	20,26 ± 1,33 AB, ab	24,13 ± 1,71 A, ab	29,22 ± 6,15 A, ab	49,00 ± 23,00 A, a
T2	19,39 ± 0,57 AB, b	20,06 ± 1,31 AB, b	23,88 ± 1,73 A, b	29,07 ± 5,01 A, ab	57,51 ± 25,56 A, a
T3	18,55 ± 0,56 AB, c	18,72 ± 0,37 AB, c	22,18 ± 2,78 A, bc	55,33 ± 28,02 A, ab	75,38 ± 1,71 A, a
T4	17,16 ± 0,18 B, b	17,99 ± 0,69 B, b	20,87 ± 1,39 A, b	59,26 ± 28,23 A, a	71,24 ± 3,86 A, a
T5	21,09 ± 2,17 A, a	21,23 ± 0,05 A, a	24,14 ± 2,51 A, a	40,22 ± 27,86 A, a	57,66 ± 27,93 A, a
T6	19,25 ± 0,55 AB, a	20,18 ± 1,91 AB, a	35,91 ± 21,48 A, b	72,06 ± 1,09 A, b	69,79 ± 1,01 A, b
Sob vácuo e temperatura entre 20-22°C					
T1	21,21 ± 0,84 A, c	21,53 ± 0,79 A, c	23,73 ± 1,31 A, bc	27,55 ± 4,24 CD, b	73,50 ± 0,67 A, a
T2	19,28 ± 0,30 AB, c	19,43 ± 0,34 B, c	20,41 ± 1,31 BC, c	49,12 ± 15,52 BCD, b	70,49 ± 1,51 A, a
T3	17,92 ± 1,24 AB, b	18,61 ± 0,90 BC, b	21,22 ± 0,96 ABC, b	73,53 ± 3,48 A, a	72,45 ± 4,19 A, a
T4	16,73 ± 0,28 B, b	16,83 ± 0,16 C, b	18,48 ± 0,48 C, b	70,52 ± 2,01 AB, a	69,49 ± 2,70 A, a
T5	20,76 ± 2,50 A, b	20,37 ± 1,10 AB, b	21,98 ± 0,80 AB, b	25,26 ± 1,23 D, ab	52,62 ± 23,68 A, a
T6	20,05 ± 0,75 AB, c	21,69 ± 0,20 A, c	23,33 ± 1,41 AB, c	51,10 ± 13,90 ABC, b	73,98 ± 1,50 A, a
Sob UR 33% e temperatura de refrigeração					
T1	21,21 ± 0,84 A, b	21,89 ± 0,65 A, b	25,65 ± 1,96 A, ab	29,12 ± 3,27 B, ab	39,83 ± 13,98 BC, a
T2	18,95 ± 0,28 AB, b	19,85 ± 0,48 AB, b	23,21 ± 0,81 AB, b	26,79 ± 3,44 B, ab	49,85 ± 20,00 ABC, a
T3	17,92 ± 1,24 AB, b	18,27 ± 0,70 B, b	21,94 ± 1,03 B, b	37,30 ± 13,70 B, ab	55,97 ± 13,05 ABC, a
T4	16,73 ± 0,28 B, b	17,88 ± 1,53 B, b	21,44 ± 0,98 B, b	65,36 ± 4,56 A, a	67,28 ± 2,88 AB, a
T5	20,76 ± 2,50 A, c	21,08 ± 1,00 A, c	23,93 ± 1,46 AB, bc	26,63 ± 0,81 B, ab	29,18 ± 0,99 C, a
T6	20,05 ± 0,75 AB, c	21,79 ± 0,82 A, c	25,69 ± 1,14 A, c	41,22 ± 6,76 B, b	20,70 ± 8,81 A, a
Sob vácuo e temperatura de refrigeração					
T1	20,78 ± 0,90 A, b	21,46 ± 0,64 A, b	23,57 ± 0,43 A, ab	24,88 ± 1,91 A, a	26,13 ± 1,15 A, a
T2	19,17 ± 0,11 AB, c	19,85 ± 0,96 AB, c	20,87 ± 1,44 ABC, bc	23,37 ± 0,48 AB, ab	23,94 ± 1,35 A, a
T3	18,19 ± 1,07 BC, b	18,73 ± 2,01 AB, b	19,41 ± 1,19 BC, ab	20,54 ± 0,95 AB, ab	23,22 ± 1,70 A, a
T4	16,83 ± 0,37 C, b	17,07 ± 1,18 B, b	18,07 ± 0,48 C, b	20,04 ± 0,23 B, b	25,32 ± 2,54 A, a
T5	19,53 ± 0,54 AB, b	21,50 ± 1,97 A, ab	22,00 ± 0,51 AB, ab	23,59 ± 1,19 AB, a	23,93 ± 1,48 A, a
T6	19,73 ± 1,15 AB, a	20,45 ± 2,10 AB, a	22,19 ± 2,44 AB, a	22,11 ± 3,20 AB, a	24,68 ± 2,99 A, a

Médias seguidas por uma mesma letra indicam que os tratamentos não diferem entre si ($p < 0,05$) em um mesmo tempo de armazenamento, sendo letras maiúsculas para colunas e minúsculas para linhas. Onde T1: 20% de solução oleosa de licopeno; T2: 23,1% de solução oleosa de licopeno; T3: 28,6% de solução oleosa de licopeno; T4: 33,3% de solução oleosa de licopeno; T5: 17,9% de solução oleosa de licopeno e GA e T6: 19,2% de solução oleosa de licopeno e CMC.

Os valores obtidos para o parâmetro L no início do experimento foram relativamente coerentes com o teor de licopeno presente em cada amostra. O T4, que

apresentava o maior teor de licopeno, foi o que apresentou o menor valor para o parâmetro luminosidade nas quatro condições de estocagem.

Porém, durante o período experimental, pode-se observar aumento das médias, ou seja, os pós foram tornando-se mais claros, principalmente quando armazenados em BOD à temperatura entre 20-22°C, onde foram obtidas as maiores médias no final do experimento.

Esse aumento da média da luminosidade indica a degradação do licopeno, pois conforme o aumento deste parâmetro, as amostras de vermelhas se tornavam brancas, comprovando a degradação deste pigmento.

Com relação às demais condições de estocagem, as amostras mantidas sob refrigeração com UR 33% apresentaram aumento menos significativo nos valores de luminosidade, porém as amostras que estavam sob vácuo foram as que apresentaram o melhor resultado em relação ao parâmetro L, o que indica que a refrigeração e o vácuo foram capazes de manter a cor das micropartículas. Este resultado, ainda que seja uma medida indireta e muito menos precisa, condiz com o que foi discutido anteriormente, com relação à estabilidade do licopeno encapsulado.

Os resultados para o parâmetro a^* estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4: Valores para o parâmetro a^* obtidos para as micropartículas armazenadas por 90 dias em diferentes condições.

Tratamentos	Dias				
	0	3	30	60	90
Sob UR 33% e temperatura entre 20-22°C					
T1	35,31 ± 1,29 A, a	35,44 ± 1,46 A, a	38,77 ± 0,66 A, a	38,81 ± 0,89 A, a	22,37 ± 22,02 A, a
T2	34,95 ± 1,15 AB, a	35,07 ± 1,43 A, a	39,84 ± 1,29 A, a	38,30 ± 1,61 A, a	10,91 ± 24,36 A, a
T3	34,07 ± 0,46 AB, ab	34,19 ± 0,69 A, ab	38,51 ± 1,91 A, a	10,18 ± 23,23 A, bc	-2,78 ± 0,36 A, c
T4	32,74 ± 0,52 B, ab	33,59 ± 1,14 A, a	35,72 ± 0,40 A, a	8,77 ± 20,32 A, bc	-3,00 ± 0,18 A, c
T5	36,02 ± 1,14 A, a	36,78 ± 0,27 A, a	37,34 ± 0,24 A, a	24,85 ± 23,94 A, a	10,42 ± 22,87 A, a
T6	34,02 ± 0,62 AB, a	34,77 ± 1,82 A, a	27,27 ± 16,90 A, a	-3,72 ± 0,22 A, b	-3,12 ± 0,38 A, b
Sob vácuo e temperatura entre 20-22°C					
T1	36,88 ± 1,61 A, a	36,37 ± 1,15 A, a	38,48 ± 1,62 A, a	37,78 ± 0,61 A, a	-2,49 ± 0,17 A, b
T2	35,32 ± 0,61 A, a	35,03 ± 0,30 A, ab	36,00 ± 1,99 AB, a	19,98 ± 12,46 AB, b	-2,62 ± 0,12 A, c
T3	34,07 ± 1,53 AB, a	34,34 ± 1,16 A, a	36,18 ± 1,16 AB, a	-3,15 ± 0,80 B, b	-2,80 ± 0,08 A, b
T4	31,28 ± 0,77 B, b	31,86 ± 0,38 B, ab	32,86 ± 0,55 B, a	-3,39 ± 0,37 B, c	-3,08 ± 0,25 A, c
T5	35,42 ± 1,75 A, a	36,01 ± 0,65 A, a	36,78 ± 0,78 A, a	36,68 ± 0,63 A, a	13,97 ± 20,83 A, a
T6	35,28 ± 1,34 A, a	36,60 ± 1,20 A, a	38,08 ± 1,63 A, a	19,14 ± 18,02 AB, a	-2,76 ± 0,19 A, b
Sob UR 33% e temperatura de refrigeração					
T1	36,88 ± 1,61 A, a	37,28 ± 0,41 A, a	39,23 ± 3,06 A, a	40,48 ± 1,68 A, a	33,33 ± 10,48 A, a
T2	35,32 ± 0,61 A, a	34,83 ± 0,35 ABC, a	37,98 ± 1,08 AB, a	37,96 ± 1,93 A, a	18,80 ± 20,27 AB, a
T3	34,07 ± 1,53 AB, a	33,88 ± 0,49 BC, a	36,01 ± 1,10 AB, a	31,98 ± 11,82 A, a	11,67 ± 18,57 AB, a
T4	31,28 ± 0,77 B, a	33,08 ± 2,28 C, a	33,66 ± 2,16 B, a	0,53 ± 5,63 B, b	-3,52 ± 0,29 B, b
T5	35,42 ± 1,75 A, a	36,71 ± 1,02 AB, ab	38,48 ± 0,24 AB, ab	37,84 ± 1,42 A, ab	39,62 ± 0,94 A, a
T6	35,28 ± 1,34 A, a	36,99 ± 1,51 AB, a	39,79 ± 1,42 A, a	33,20 ± 5,66 A, a	-3,25 ± 0,34 B, b
Sob vácuo e temperatura de refrigeração					
T1	36,64 ± 1,74 A, a	36,94 ± 0,66 A, a	38,87 ± 0,56 A, a	39,38 ± 1,73 A, a	39,46 ± 0,82 A, a
T2	35,43 ± 0,77 AB, a	35,66 ± 1,16 ABC, a	37,54 ± 2,14 A, a	38,29 ± 1,33 AB, a	38,49 ± 1,87 A, a
T3	34,68 ± 1,04 AB, a	33,22 ± 0,71 BC, a	36,17 ± 2,38 A, a	36,11 ± 0,69 AB, a	35,69 ± 1,52 AB, a
T4	32,04 ± 1,25 B, a	32,31 ± 1,38 C, a	34,06 ± 1,54 A, a	34,69 ± 1,94 B, a	32,25 ± 3,58 B, a
T5	34,87 ± 0,92 AB, a	36,55 ± 0,79 AB, a	37,39 ± 1,14 A, a	37,70 ± 1,58 AB, a	37,14 ± 1,38 AB, a
T6	34,92 ± 1,78 AB, a	34,97 ± 2,33 ABC, a	37,35 ± 2,59 A, a	36,76 ± 1,99 AB, a	37,88 ± 2,47 AB, a

Médias seguidas por uma mesma letra indicam que os tratamentos não diferem entre si ($p < 0,05$) em um mesmo tempo de armazenamento, sendo letras maiúsculas para colunas e minúsculas para linhas. Onde T1: 20% de solução oleosa de licopeno; T2: 23,1% de solução oleosa de licopeno; T3: 28,6% de solução oleosa de licopeno; T4: 33,3% de solução oleosa de licopeno; T5: 17,9% de solução oleosa de licopeno e GA e T6: 19,2% de solução oleosa de licopeno e CMC.

Os resultados obtidos para o parâmetro a^* no início do experimento foram praticamente iguais para todos os tratamentos, resultado que condiz com a coloração do pó (vermelha intensa), porém pode ser observado nas amostras armazenadas em BOD à temperatura de 20-22 °C, que houve aumento das médias ao longo do período

experimental, sendo que com 90 dias de estocagem essas médias se tornaram negativas. Este aumento das médias está relacionado com a degradação do licopeno, o que acarreta a descoloração do pó (de vermelho para branco). Resultados semelhantes foram obtidos para as micropartículas armazenadas em BOD sob vácuo e sob UR 33% em temperatura de refrigeração, onde pôde ser observado esse aumento das médias até se tornarem negativas, o que caracteriza perda gradativa do licopeno, podendo inferir que a presença de oxigênio e a temperatura de estocagem influenciam na degradação do licopeno. Porém, as micropartículas armazenadas sob vácuo e em temperatura de refrigeração foram as que obtiveram os melhores resultados para este parâmetro, não tendo diferenças significativas entre as médias durante os 90 dias de estocagem, evidenciando que a aplicação de vácuo associada à temperatura de refrigeração foi capaz de manter a coloração do pó. Estes resultados condizem com os encontrados na estabilidade do licopeno encapsulado, onde os melhores resultados foram encontrados para as micropartículas armazenadas sob vácuo e temperatura de refrigeração.

Robert et al. (2003) associa o processo de degradação com a permeabilidade do oxigênio no interior da matriz lipídica. O que favorece a oxidação e assim a perda da coloração do licopeno encapsulado.

4.5. Biodisponibilidade

Em função dos resultados obtidos em ensaios preliminares, expressos nos cromatogramas das Figuras de 16 a 18, onde se verificou a possibilidade de quantificação do licopeno no soro dos animais, pois observou-se tendência de aumento do pico de licopeno no soro ao decorrer do tempo de sua administração na forma livre (tempos, 0, 60 e 120 minutos), foram realizados os ensaios para determinação de sua biodisponibilidade quando administrado nas formas livre e encapsulada.

Figura 16: Cromatograma do material extraído do soro após 0 minuto de administração do licopeno livre.

Figura 17: Cromatograma do material extraído do soro após 60 minutos de administração do licopeno livre.

Figura 18: Cromatograma do material extraído do soro após 120 minutos de administração do licopeno livre.

O cromatograma obtido para os padrões utilizados (licopeno e β -caroteno) está representado na Figura 19, onde o pico de licopeno está em 16,5 minutos e o do β -caroteno em 21,5 minutos.

Figura 19: Cromatograma dos padrões licopeno (DSM) e β -caroteno (Sigma-Aldrich).

Para a análise cromatográfica 100 μ L do material extraído do soro dos animais que não receberam licopeno, dos que receberam licopeno encapsulado (T1) e dos que receberam o tratamento 5 (licopeno encapsulado + goma arábica) foram adicionados nos *vials* e injetados no cromatógrafo. Os resultados desta análise estão expressos nas Figuras de 20 a 23.

Figura 20: Cromatograma obtido do material coletado do grupo controle, onde os animais não receberam nenhuma forma de licopeno.

Figura 21: Cromatograma obtido do material coletado do grupo de animais que receberam o licopeno livre, com amostras coletadas 6 h após a administração.

Figura 22: Cromatograma obtido do material coletado do grupo de animais que receberam o licopeno encapsulado (T1) com amostras coletadas 6 h após a administração.

Figura 23: Cromatograma obtido do material coletado do grupo de animais que receberam o licopeno encapsulado + goma arábica (T5) com amostras coletadas 6 h após a administração.

Na Figura 15 onde está cromatograma obtido para o grupo controle, não pode se observar pico característico do licopeno, como esperado, pois estes animais não receberam licopeno. Contudo, resultados semelhantes foram encontrados para os demais grupos, que receberam o licopeno em uma dosagem de 20 mg/Kg na forma livre, encapsulado (T1) e encapsulado mais goma arábica (T5). Uma das possíveis causas desse resultado inesperado foi a dose administrada aos animais, que pode ter sido insuficiente para que este carotenoide fosse quantificado; outra hipótese é a de que o licopeno tenha se ligado aos quilomícrons (lipoproteínas formadas a partir da gordura da dieta) e desta maneira não foi extraído através da centrifugação aplicada para obtenção do soro, que é muito inferior em intensidade e tempo que a aplicada para a extração nos quilomícrons; ainda, para as amostras onde se administrou o tratamento T5, a goma arábica, que é uma fibra dietética solúvel, pode ter influenciado na redução da absorção do licopeno.

Segundo Riedlet al. (1999) a presença de fibras na dieta pode afetar a biodisponibilidade do licopeno, pois em seu trabalho a suplementação da dieta com

pectina diminuiu a absorção do licopeno em 40%. Yeum & Russel (2002) reportaram que a diminuição da biodisponibilidade de carotenoides causada pelas fibras se deve, pois a fibra impede a interação do carotenoide com os ácidos biliares, dificultando sua absorção pelas células intestinais, favorecendo assim a eliminação pelas fezes. De qualquer forma, este fator explicaria apenas a ausência de resultados apenas para os animais que receberam o tratamento 5.

Faisal, O'Driscoll & Griffin (2010) determinaram uma série de pontos críticos que influenciam o processo de absorção de compostos altamente lipofílicos como o licopeno, tais como a solubilidade nos meios fisiológicos, a absorção nas células intestinais e liberação para a circulação.

Segundo Stahlet al. (1995), os quilomícrons são as principais lipoproteínas intestinais que contém carotenoides, bem como vitaminas lipossolúveis transportadas no sistema linfático. Gartner, Stahl & Sies (1997) verificaram que o licopeno foi absorvido pelos quilomícrons, sua isomerização ocorreu “in vivo” e a forma isomérica foi o que determinou sua presença no soro e em tecidos. Neste contexto, o fato da metodologia utilizada não ter sido capaz de extrair o licopeno dos quilomícrons, pode explicar a ausência de resultados no presente trabalho.

Porém, Stahlet al. (1992) quantificaram licopeno sérico de 12 voluntários, e encontraram a média de 0,29 nmol/mL deste carotenoide no soro.

Todos estes achados na literatura, não justificam os resultados obtidos neste trabalho, pelo fato de ter aparecido o licopeno livre nos testes preliminares e não nos ensaios de biodisponibilidade, já que os mesmos procedimentos foram realizados para ambos os ensaios, ao menos o licopeno livre era para ter sido quantificado.

Infelizmente este experimento não pode ser repetido em função de restrição orçamentária. Desta forma, não foi possível elucidar a influência das micropartículas produzidas na absorção do licopeno.

5. CONCLUSÃO

De acordo com os objetivos propostos e diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que é possível encapsular licopeno por meio da técnica de *spray-chilling*, obtendo-se micropartículas com estrutura de matriz, no estado cristalino, formato circular, com presença de aglomerados e tamanhos na faixa esperada para o método empregado,

Conclui-se também que a utilização de uma fibra dietética solúvel - no caso a goma arábica (tratamento T5), o armazenamento sob vácuo e sob temperatura de refrigeração são as condições mais eficazes, dentre as estudadas, para conferir proteção ao carotenoide. Esta condição de armazenamento e a goma arábica foram capazes de retardar a degradação do licopeno durante o período de 90 dias de armazenamento, porém, ainda assim a taxa de degradação foi de aproximadamente 60%. Desta forma, novos estudos devem ser conduzidos para o aprimoramento da técnica e/ou das formulações, visando garantir maior estabilidade ao licopeno encapsulado durante seu armazenamento.

Em relação aos ensaios de biodisponibilidade, os resultados obtidos foram inconclusivos, sendo necessários novos estudos para compreender melhor a biodisponibilidade do licopeno *in vivo*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL,S; RAO, A.V. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases.**Canadian Medical Association**, v.163, n.6, p.739-44, 2000.

ALBERTINI, B.; PASSERINI,N.;PATTARINO, F.; RODRIGUEZ, L. New spray-congealing atomizer for the microencapsulation oh highly concentrated solid and liquid substances. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, p. 348-357, 2008.

ALBERTINI, B.; PASSERINI, N.; DI SABATINO, M.; MONTI, D.; BURGALASSI, S.; CHETONI, P.; RODRIGUEZ, L. Poloxamer 407 microspheres for orotransmucosal drug delivery. Part I: Formulation, manufacturing and characterization. **International Journal of Pharmaceutics**, v.399, n.1-2, p.71-179, 2010.

AMES, BRUCE N.; SHIGENAGA, MARK K.; HAGEN, TORY M. Review. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging.**Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 90, n. 17, p. 7915-7922, 1993.

ARAB, L.; STECK, S. Lycopene and cardiovascular disease.**American Journal of Clinical Nutrition**, v.71, n.6, p.1691–1695, 2000.

BAILEY, A. E. **Bailey’s Industrial Oil and Fat Products**. New York: John Wiley, v.3, 1996.

BEUTNER, S.; BLOEDORN, B.; FRIXEL, S.; HERNANDEZ-BLANCO, I.; HOFFMAN, T.; MARTIN, H. D. Quantitative assessment of antioxidant properties of natural colorants and phytochemicals: Carotenoids, flavonoids, phenols and indigoids. The role of b-carotene in antioxidant functions. **Journal of the Science of Food & Agriculture**, v.81, n.6, p.559–568, 2001.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W. **Química de los Alimentos**, Ed. Acribia: Zaragoza, España, v.1, 2ªed, 813p, 1988.

BLANCH, G.P.; CASTILLO, M.L.R.; CAJA, M.M.; PÉREZ-MÉNDES, M.; SÁNCHEZ-CORTÉS, S. Stabilization of all-trans-lycopene from tomato by encapsulation using cyclodextrins. **Food Chemistry**, v.105, n.4, p.1335-1341, 2007.

BLOCK, G.; PATTERSON, B.; SUBAR, A. Fruit, vegetables and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. **Nutrition and Cancer**, v.18, n.1, p.1-29, 1992.

BOILEAU, T. W.; BOILEAU, A. C.; ERDMAN, J. W. Bioavailability of all-trans and cis-isomers of lycopene. **Experimental Biology and Medicine**, v.227, n.10, p.914–919, 2002.

BOILEAU AC, MERCHEN NR, WASSON K, ATKINSON CA, ERDMAN JW. cis-Lycopene is more bioavailable than trans-lycopene in vitro and in vivo in lymph-cannulated ferrets. **Journal of Nutrition**, v.129, n.6, p.1176- 81, 1999.

BRAMLEY, P. M. Is lycopene beneficial to human health? **Phytochemistry** v.54, n.3, p.233–236, 2000.

BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. Preface. In Carotenoids Handbook. BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. (Eds). Basel, Boston: BirkhauserVerlag, Germany, 2004.

BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. Carotenoids in food. In **Carotenoids**. Volume 5: Nutrition and Health, Basel, Switzerland: Birkhauser, p.13-147, 2009.

BURNEY, P. G.; COMSTOCK, G. W.; MORRIS, J. S. Serologic precursors of cancer: serum micronutrients and the subsequent risk of pancreatic cancer. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.49, n.5, p.895–900, 1989.

CANENE-ADAMS, K.; CAMPBELL, J.K.; ZARIPHEH, S.; JEFFERY, E.H.; ERDMAN JR, J.W..The tomato as a functional food.**The Journal of Nutrition**, v.135, n.5, p. 1226–1230, 2005.

CARIS-VEYRAT, C. Antioxidant and pro-oxidant actions and stabilities of carotenoids in vitro and in vivo and carotenoid oxidation products. In C. Socaciu (Ed.), **Food colorants, chemical and functional properties**, Boca Raton, London, New York: CRC Press, Taylor & Francis Group, p.177–192, 2008.

CARVALHO, E.; FRASER, P. D.; MARTENS, S. Carotenoids and tocopherols in yellow and red raspberries.**Food Chemistry**, v.139, n.1–4, p.744–752, 2013.

CHAMBI, H.N.M.; ALVIM, I.D.; BARRERA-ARELLANO, D.; GROSSO, C.R.F. Solid lipid microparticles containing water-soluble compounds of different molecular mass: Production, characterization and release profiles. **Food Research International**, v.41, n.3, p.229-236, 2008.

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(gamma-glutamic acid) as carrier. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n. 13, p.5123-5130, 2007.

COLLE, I.J.P.; LEMMENS, L.; VAN BUGGENHOUT, S.; MET, K.; VAN LOEY, A. M.; HENDRICKX, M.E. Processing tomato pulp in the presence of lipids: The impact on lycopene bioaccessibility. **Food Research International**, v.51, n.1, p. 32–38, 2013.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900 p.

DAVALOS, A.; MIGUEL, M.; BARTOLOME, B.; LOPEZ-FANDINO, R. Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 1939–1944, 2004.

DAVIDSON, J. Procedure for the extraction, separation and estimation of major fat soluble pigments of hay. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.5, p.1-7, 1954.

DELLAPENNA, D.; POGSON, B.J. Vitamin synthesis in plants: Tocopherol and carotenoids. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, p.711–738, 2006.

DIPLOCK, A.T. The Leon Goldberg memorial lecture: antioxidants and disease prevention. **Food Chemistry Toxicology**, v.34, p.1013, 1996.

DIPLOCK, A.T.; CHARLEUX, J.L.; CROZIER-WILLI, G.; KOK, F.J.; RICE-
EVANS, C.; ROBERFROID, M.; STAHL, W.; VINA-RIBES, J. Functional food
science and defence against reactive oxidative species. **The British Journal of
Nutrition**. v.80, n.1, 77-112, 1998.

DIMASCIO, P., KAISER, S., SIES, H. Lycopene as the most effective biological
carotenoid singlet oxygen quencher. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.274,
n.2, p.532–538, 1989.

DI SABATINO, M.; ALBERTINI, B.; KETT, V. L.; PASSERINI, N. Spray congealed
lipid microparticles with high protein loading: Preparation and solid state
characterization. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.46, n.5, p.346-356,
2012.

DZIEZAC, J. D. Fat oils and fats substitutes. **Food Technology**, v.43, n.7, p.66.

EMAS, M.; NYQVIST, H. Methods of studying aging and stabilization of spray-
congealed solid dispersions with carnauba wax. 1. Microcalorimetric investigation.
International Journal of Pharmaceutics, v.197, n.1-2, p.117-127, 2000.

ELKORDY, A. A.; ESSA, E. A. Dissolution of ibuprofen from spray dried and spray
chilled particles. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.23, n.3, p.284-290,
2010.

FAISAL, W.; O'DRISCOLL, C. M.; GRIFFIN, B.T. Bioavailability of lycopene in the rat: the role of intestinal lymphatic transport. **Journal of Pharmacy and pharmacology**, v.62, n.3, p.323-331, 2010.

FAVARO-TRINDADE, C.S.; PINHO, S.C.; ROCHA, G.A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.11, n. 2, p. 103-112, 2008.

FINI, A.; CAVALLARI, C.; OSPITALI F.; GONZALEZ-RODRIGUEZ, M. LUISA. Theophylline-loaded compositol microspheres prepared by ultrasound-assisted atomization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.100, n.2, p.743-757, 2011.

FORNELLI, F.; LEONE, A.; VERDESCA, I.; MINERVINI, F.; ZACHEO, G. The influence of lycopene on the proliferation of human breast cell line (MCF-7), **Toxicology in Vitro**, v.21, n.2, p.217–223, 2007.

GAMBOA, O. D.; GONCALVES, L. G.; GROSSO, C. F. Microencapsulation of tocopherols in lipid matrix by spray chilling method. **Procedia Food Science**, v.1, p. 1732-1739, 2011.

GARTNER, C.; STAHL, W.; SIES, H. Lycopene is more bioavailable from tomato paste than from fresh tomatoes. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.66, p.116-122, 1997.

GIOVANNUCCI, E.; ASCHERIO A.; RIMM E.B.; STAMPFER M.J.; COLDITZ G.A.; WILLETT W.C. Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer **Journal of the National Cancer Institute**, v.87, n.23, p. 1767–1776, 1995.

GOULA, A. M.; ADAMOPOULOS, K. G. a new technique for spray-dried encapsulation of lycopene. **Drying Technology**, v. 30, p. 641–652, 2012.

GÜLÇİN, İ.; BERASHVILI, D.; GEPIREMEN, A. Antiradical and antioxidant activity of total anthocyanins from *Perillapankinensis* decne. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, n. 1-3, p. 287-293, 2005.

GUILLÉN, M.D.; CABO, N. infrared spectroscopy in the study of edible oils and fats. **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 75, 1-11, 1997.

HALLIWELL, B. Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. **British Journal of Experimental Pathology**. v. 60, n. 6, p. 737-757, 1989.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? **The Lancet**, v.344, n.8924, p. 721-724, 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine, 4th ed. Oxford University Press, Oxford, 2007.

HELZLSOUER, K. J.; COMSTOCK, G. W.; MORRIS, J. S. Selenium, lycopene, alpha-tocopherol, beta-carotene, retinol, and subsequent bladder cancer. **Cancer Research**.v.49, n.21, p.6144–6148, 1989.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; DAVALOS, A.; BARTOLOME, B.; AMIGO, L. Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from a-lactalbumin and b-lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC–MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n.3, p. 588–593, 2005.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; QUIRÓS, A.; AMIGO, L.; RECIO, I. Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin. **International Dairy Journal**, v.17, n.1, p.42–49, 2007.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, M.; GALLARDO-VELÁZQUEZ, T.; OSORIO-REVILLA, G.; ALMARAZ-ABARCA, N.; PONCE-MENDOZA, A.; VÁSQUEZ-MURRIETA, M. S. Prediction of total fat, fatty acid composition and nutritional

parameters in fish fillets using MID-FTIR spectroscopy and chemometrics. **LWT - Food Science and Technology**, v.52, n.1, p.12-20, 2013.

HSIAO, G. FONG, T.H.; TZU, N.H.; LIN, K.H.; CHOU, D.S.; SHEU, J.R. A potent antioxidant, lycopene, affords neuroprotection against microglia activation and focal cerebral ischemia in rats, **In Vivo**, v.18, n.3, p.351–356, 2004.

HUNTERLAB. Use hunterlab images and color solid figures, a color-vision system , 11491 Sunset Hills Road, Reston, VA, U.S.A, 1995.

ILICA, I.; DREUA, R.; BURJAKB, M.; HOMARB, M.; KERČA, J.; SRČIČA. S. Microparticle size control and glimepiride microencapsulation using spray congealing technology. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 381.p. 176-183, 2009.

JIZOMOTO, H., KANAOKA, E., SUGITA, K., HIRANO, K. Gelatin-Acacia microcapsules for trapping micro oil droplets containing lipophilic drugs and ready disintegration in the gastrointestinal tract. **Pharmaceutical Research**, v.10, n.8, p.1115-122, 1993.

JUZWIAK, C. R; PASCHOAL, V. Tomate e goiaba. Nutrição saúde e performance. **Anuário de nutrição e alimentos funcionais**. v.4, n.22, p.50-52, 2004.

KEHRER, J. P.; SMITH, C. V.In, FREI, B. **Natural antioxidants in human health and disease**.Ed Academic Press: San Diego, p. 25, 1992.

KLIPSTEIN, G. K.; LAUNER, L. J.; GELEIJNSE, J.M.; BOEING, H.; HOFMAN, A.; WITTEMAN, J. C. Serum carotenoids and atherosclerosis. The Rotterdam Study.**Atherosclerosis**, v.148, n.1, p.49–56, 2000.

KRINSKY, N.I., JOHNSON, E.J. Carotenoid actions and their relation to health and disease.**Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, p. 459–516, 2005.

LABUZA, T. P. Kinetics of lipid oxidation in foods. **Critical Reviews in Food Technology**.v.2, n.3, p.355-405, 1971.

LEENHARDT, F.; LYAN B.; ROCK E.; BOUSSARD A.; POTUS J.; CHANLIAUD E.; REMESY C. Genetic variability of carotenoid concentration, and lipoxygenase and peroxidase activities among cultivated wheat species and bread wheat varieties.

European Journal of Agronomy, v. 25, n.2, p.170–176, 2006.

LEONEL, A. J.; CHAMBI, H. N. M.; BARRERA-ARELLANO, D.; PASTORE, H. O.; GROSSO, C. R. F. Production and characterization of lipid microparticles produced by spray cooling encapsulating a low molar mass hydrophilic compound. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v.30, n.1, p.276-281, 2010

MADHAVI, D. L.; SALUNKHE, D. K. Em Antioxidants. In **Food Additive Toxicology**.eds MAGA, J.; TU, A. T. Marcel Dekker: New York, p. 89. 1995

MARTINS, R. M.; SIQUEIRA, S.; MACHADO, M. O.; FREITAS, L. A. P.The effect of homogenization method on the properties of carbamazepine microparticles prepared by spray congealing.**Journal of Microencapsulation**, v.30, n.7, p.692-700, 2013.

MATIOLI, G, RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Licopeno encapsulado em goma arábica e maltodextrina: Estudo da estabilidade. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.5, p. 197–203, 2002.

MATIOLI, G; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Microencapsulação do licopeno com ciclodextrinas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, supl., p. 102-105, 2003.

MAYNE, S.T. Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans.**FASEB Journal**.v.10, n.7, p.690-701, 1996.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In: HARBORNE, J.B. (Ed.), *The Flavonoids*. Chapman and Hall, London, pp. 619–652, 1994

MORAIS, R. Functional Foods: An Introductory Course. Escola Superior de Biotecnologia/Universidade Católica Portuguesa, p.132, 2001. Disponível em:

https://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:LR8VQRpmzmUJ:opac.iefp.pt:8080/images/winlibimg.exe?key%3D%26doc%3D12068%26img%3D47+Functional+Foods:+An+Introductory+Course+-+Escola+Superior+de+Biotecnologia&hl=pt-BR&gl=br&pid=bl&srcid=ADGEESiwR0MLjDmUl9WeBKBEFmaQgyqZsnMSRyjLd9FCcu3YsXkmlB4M70CWMKyR6vUUU8oBbq_Srq0KgTJP--72Bz28KC0-V3-BqK9qyQxqn_THbeUtM03j8gotJEG0gZ4SWcyj5ue&sig=AHIEtbTZbLJhUwulCMBBRDk9WYAZfSIS5A. Acesso em: 04 mar 2012.

MURILLO, E.; GIUFFRIDA, D.; MENCHACA, D.; DUGO, P.; TORRE G.; MELÉNDEZ-MARTINEZ, A. J.; MONDELLO, L. Native carotenoids composition of some tropical fruits. **Food Chemistry**, v.140, p.825-836, 2013.

MÜLLER, R.H.; RADTKE, M.; WISSING S.A. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v.242, n.1-2, p.121-128, 2002.

NAGAI, T.; NAGASHIMA, T.; ABE, A.; SUZUKI, N. Antioxidative activities and angiotensin-I-converting enzyme inhibition of extracts prepared from chum salmon (*Oncorhynchus keta*) cartilage and skin. **International Journal of Food Properties**, v.9, n.4, p.813-822, 2006.

NAVEENA, B.M.; SEN, A.R.; VAITHIYANATHAN, S.; BABJI, N. KONDAIAH, Y. Comparative efficacy of pomegranate juice, pomegranate rind powder extract and BHT as antioxidants in cooked chicken patties. **Meat Science**, v.80, p. 304-308, 2008.

NISHINO, H., TOKUDA, H., SATOMI, Y., MASUDA, M., BU, P., ONOZUKA, M. Cancer prevention by carotenoids. **Pure & Applied Chemistry**, v.12, n.71, p.2273-2278, 1999.

NOBRE, B. P.; PALAVRA, A. F.; PESSOA, F. L.P.; MENDES, R.L. Supercritical CO₂ extraction of trans-lycopene from Portuguese tomato industrial waste. **Food Chemistry**, v.116, p.680-685, 2009.

NUNES, I.L., MERCADANTE, A.Z. Encapsulaion of lycopene using spray-drying and molecular inclusion process. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.50, n.5, p. 893–900. 2007.

NUNEZ DE GONZALEZ, M.T.; HAFLEY, B.S.; BOLEMAN, R.M.; MILLER, R.K.; RHEE, K.S.; KEETON, J.T.. Antioxidant properties of plum concentrates and powder in precooked roast beef to reduce lipid oxidation. **Meat Science**, v.80, n.4, p.997–1004, 2008.

OKURO, P. K. **Desenvolvimento, avaliação e aplicação de micropartículas simbióticas produzidas por *spray-chilling***. 2012. 221 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Univerdade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

OKURO, P. K.; THOMAZINI, M.; BALIEIRO, J. C.C.; LIBERAL, R. D.C.O.; FÁVARO-TRINDADE, C. S. Co- encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* with inulin or polydextrose in solid lipid microparticles provides protection and improves stability. **Food Research International**, v.53, n.1, p.96-103, 2013.

OKURO, P. K.; MATOS Jr, F. E.; FAVARO-TRINDADE, C.S. Technological Challenges for Spray Chilling Encapsulation of Functional Food Ingredients. **Food Technology and Biotechnology**, v.51, n.2, p.171-182, 2013.

OMURA, K. Antioxidant synergism between butylatedhydroxyanisole and butylated hydroxyl toluene. **Journal of the American Oil Chemists Society**. v. 72, n. 12, p. 1565-1570, 1995.

PALOZZA, P.; SIMONE, R.; CATALANO, A.; BONINSEGNA, A.; BÖHM, V.; FRÖHLICH, K.; MELE, M.C.; MONEGO, G.; RANELLETTI, F.O. Lycopene prevents 7-ketocholesterol-induced oxidative stress, cell cycle arrest and apoptosis in human macrophages. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.21, n.1, p.34–46, 2010.

PASSERINI, N.; PERISSUTTI, B.; ALBERTINI B.; VOINOVICH, D.; MONEGHINI, M.; RODRIGUEZ, L. Controlled release of verapamil hydrochloride from waxy

microparticles prepared by spray congealing. **Journal of Controlled Release**, v.88, n.2, p.263-275, 2003.

PASSERINI, N.; QI, S.; ALBERTINI, B.; GRASSI, M.; RODRIGUEZ, L. CRAIG, D. Q.M. Solid lipid microparticles produced by spray congealing: Influence of the atomizer on microparticle characteristics and mathematical modeling of the drug release. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.99, n.2, p.916-931, 2010.

PEDROSO, D. L.; THOMAZINI, M.; HEINEMANN, R. J. B.; FAVARO-TRINDADE, C. SÍLVIA. Protection of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* by microencapsulation using *spray-chilling*. **International Dairy Journal**, v.26, n.2, p.127-132, 2012.

PETO, R., DOLL, R., BUCKLEY, J.D., SPORN, M.B. Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates? **Nature**, v.19, n.290, p. 201-208, 1981.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**.v.63, n.7, p.1035-1042, 2000.

PIMENTEL, C.V.M.B; FRANKI, V.M; GOLLUCKE, A.P.B. Alimentos funcionais: introdução as principais substancias bioativas em alimentos. São Paulo: Varela, p.95, 2005.

PINCEMAIL, J. **Free radicals and antioxidants in human disease**. FAVIER, A.E.; CADET, J.; KALYANARAMAN, B.; FONTECAVE, M.; PIERRE, J.L. (Eds.), Analysis of free radicals in biological systems, BirkhäuserVerlag, Basel, Switzerland, p. 83-98, 1995.

POKORNÝ, J. Natural Antioxidants for food use. **Trends in Food Science & Technology**, v.2, n.9, p.223-227, 1991.

PRAKASH, D.; SURI, S.; UPADHYAY, G.; SINGH, B.N. Total phenols, antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 58, p.18–28, 2007.

PRYOR, W. A. The antioxidant nutrient and disease prevention-what do we know and what do we need to find out? **American Journal Clinical Nutrition**. v. 53, p. 391-393. 1991.

QU, M.; LI, L.; CHEN, C.; LI, M.; PEI, L.; CHU, F.; YANG, J.; YU, Z.; WANG, D.; ZHOU, Z. Protective effects of lycopene against amyloid β -induced neurotoxicity in cultured rat cortical neurons, **Neuroscience letters**, v.505, n.3, p.286-290, 2011a.

QU, M.; ZHOU, Z.; CHEN, C.; LI, M.; PEI, L.; CHU, F.; YANG, J.; WANG, Y.; LI, L.; LIU, C.; ZHANG, L.; ZHANG, G.; YU, Z.; WANG, D. Lycopene protects against trimethyltin-induced neurotoxicity in primary cultured rat hippocampal neurons by inhibiting the mitochondrial apoptotic pathway. **Neurochemistry International**, v.59, n.8, p.1095-1103, 2011b.

RAGHAVAN, S.; RICHARDS, M.P. Comparison of solvent and microwave extracts of cranberry press cake on the inhibition of lipid oxidation in mechanically separated turkey. **Food Chemistry**, v.102, n.3, p. 818–826, 2007.

RAO, A. V.; RAO, R. G. Carotenoids and human health. **Pharmaceutical Research**, v.55, n.3, p.207–216, 2007.

RAO, A.V.; AGARWAL, S. Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: a review. **Nutrition Research**, v.19, n.2, p.305–323, 1999.

RÉ, M.I. Formulating drug delivery systems by spray drying. **Drying Technology**, v.24, n.4, p.433–446, 2006.

RIEDL, J.; LINSEISEN, J.; HOFFMANN, J.; WOLFRAN, G. Some Dietary Fibers Reduce the Absorption of Carotenoids in Women. **Journal of Nutrition**, v.129, n.12, p.2170-2176, 1999.

RISSANEN, T.; VOUTILAINEN, S.; NYSSONEN, K.; SALONEN, J.T. Lycopene, atherosclerosis, and coronary heart disease. **Experimental Biology and Medicine**, v.227, n.10, p.900–907, 2002.

RISSANEN, T. H.; VOUTILAINEN, S.; NYSSONEN, K.; SALONEN, R.; KAPLAN, G. A.; SALONEN, J.T. Serum lycopene concentrations and carotid atherosclerosis: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.77, p.133–138, 2003.

RIBAYO-MERCADO, J. D.; GARMYN, M.; GILCHREST, B. A.; RUSSELL, R. M. Skin lycopene is destroyed preferentially over betacarotene during ultraviolet irradiation in humans. **Journal of Nutrition**, v.125, .7, p.1854–1859, 1995.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology Medicine**. v.20, p.933-956, 1996.

RISO P.; PORRINI M. Determination of carotenoids in vegetable foods and plasma. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v.67, n.1, p.47–54, 1997.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Effects of processing and storage on food carotenoids. **Sight Life Newsl.** v. 3, p. 25–35, 2002.

ROBERT, P.; CARLSSON, R. M.; ROMERO, N.; MASSON, L. Stability of Spray-Dried Encapsulated Carotenoid Pigments from Rosa Mosqueta (*Rosa rubiginosa*) Oleoresin. **Journal of the American Oil Chemists's Society**, v. 80, n.11, p.1115-1120, 2003.

ROCHA, G.A., FÁVARO-TRINDADE, C.S., GROSSO, C.R.F. Microencapsulation of lycopene by spray drying: characterization, stability and application of microcapsules. **Food and Bioproducts Processing**, v. 9, p. 37–42, 2012.

ROCHA-SELMÍ, G.A.; FAVARO-TRINDADE, C.S.; GROSSO, C.R. F. Morphology, stability, and application of lycopene microcapsules produced by complex coacervation. *Journal of Chemistry*, p. 1-6, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/982603>.

D.E. RUBIO-DÍAZ, T. DE NARDO, A. SANTOS, S. DE JESUS, D. FRANCIS, L.E. RODRIGUEZ-SAONA. Profiling of nutritionally important carotenoids from genetically-diverse tomatoes by infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 120, n. 1, 282-289, 2010.

RUTZ, J.K.; ZAMBIAZI, R. C.; BORGES, C. D.; KRUMREICH, F. D.; LUZ, S. R.; HARTWIG, N.; DA ROSA, C. G. Microencapsulation of purple Brazilian cherry juice in xanthan, tara gums and xanthan-tara hydrogel matrixes. **Carbohydrates Polymers**, v.98, n.2, p1256-1265, 2013.

SAMARANAYAKA, A. G. P.; LI-CHAN, E. C. Y. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. **Journal of Functional Foods**, v.3, p.229-254, 2011.

SHU, B.; YU, W. L.; ZHAO, Y. P.; XIAOYONG, L. Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying. **Journal of Food Engineering**, v.76, n.4, p.664-669, 2006.

SILLICK, M.; GREGSON, C. M. Spray chill encapsulation of flavors within anhydrous erythritol crystals. **LWT - Food Science and Technology**, v.48, p.107-113, 2012.

SNODDERLY, M. D. Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.62, p.1448–1461, 1995.

SANCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. **Food Research International**. v. 32, n.6, p.407– 412, 1999.

SCHIERLE, J., BRETZEL, W., BUHLER, I., FACCIN, N., HESS, D., STEINER, K., SHÜEP, W. Content and isomeric ratio of lycopene in food and human blood plasma. **Food Chemistry**, v.59, n.3, p.459–465, 1997.

SILVA, D.F.; FAVARO-TRINDADE, C.S.; ROCHA, G.A.; THOMAZINI, M. Microencapsulation of lycopene by gelatin–pectin complex coacervation. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 36, p. 185–190, 2012.

SIMIC, M. G.; JAVANOVIC, S. V. Inactivation of oxygen radicals by dietary phenolic compounds in anticarcinogenesis. In: HO, C. T.; OSAWA, T.; HUANG, T. M.; ROSEN, R. T. (Eds). **Food Phytochemicals for Cancer Prevention**: Washington, p. 20, 1994.

SIES, H., STAHL, W., SUNDQUIST, A. R. Antioxidant function of vitamins; vitamins E and C, -carotene, and other carotenoids, **Annals of the New York academy of Science**, v.669, p.7-20, 1992.

STAHL, W.; SCHWARZ, W.; SUNDQUIST, A. R.; SIES, H. Cis-trans Isomers of Lycopene and Carotene in Human Serum and Tissues. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.294, n.1, p.173-177, 1992.

STAHL, W.; SCHWARZ, W.; VON LAAR, J.; SIES, H. All-trans β -carotene preferentially accumulates in human chylomicrons and very low density lipoproteins compared with the 9-cisgeometrical isomer. **The Journal of Nutrition**, v.125, n.8, 2128-2133, 1995.

STOCKER, R. The ambivalence of vitamin E in atherogenesis. **Trends in Biochemical Sciences**, v.24, n.6, p. 219-223, 1999.

TAKAYAMAA, K.; NISHIKOA, E.; MATSUMOTOB, G.; INAKUMAB, T. Study on the expression of c-Fos protein in the brain of rats after ingestion of food rich in lycopene. **Neuroscience Letters**, v.536, n.1, p.1-5, 2013.

TALAULIKAR, V. S.; MANYONDA, I.T. Vitamin C as an antioxidant supplement in women's health: a myth in need of urgent burial. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 157, n. 1, p. 10–13, 2011.

TANG, X.Y.; YANG, X. D.; PENG, Y. F.; LIN, J. H. Protective effects of lycopene against H₂O₂-Induced oxidative injury and apoptosis in human endothelial cells. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v.23, n.6, p.439-448, 2009.

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

TODD, R. D. Microencapsulation and flavour industry, **Flavour Industry**. London, v. 1, n. 11, p. 768-771, 1970.

TOPAL, U.; SASAKI, M.; GOTO, M.; HAYAKAWA, K. Extraction of lycopene from tomato skin with supercritical carbon dioxide: Effect of operating conditions and solubility analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, n.15, p.5604–5610, 2006.

VAN EENWYK, J.; DAVIS, F. G.; BOWEN, P. E. Dietary and serum carotenoids and cervical intraepithelial neoplasia. **International Journal of Cancer**, v.48, n.1, p.34–38, 1991.

VIRTAMO, J. Vitamins and lung cancer. **Proceedings of The Nutrition Society**, v.8, n.2, p.329-333, 1999.

VOUTILAINEN, S., NURMI, T., MURSU, J., RISSANEN, T.H. Carotenoids and cardiovascular health. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, p.1265–1271, 2006.

WICHI, H. P. Enhanced tumor development by butylatedhydroxyanisole (BHA) from the prospective of effect on forestomach and oesophageal squamous epithelium. **Food and Chemical Toxicology**, v. 26, n.8, p.717-723, 1988.

XU, Y.; PAN, S. Effects of various factors of ultrasonic treatment on the extraction yield of all-trans-lycopene from red grapefruit (*Citrus paradise* Macf.) **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n. 4, p.1026–1032, 2013.

YAJIMA, T.; NOGATA, A.; DEMACHI, M.; UMEKI, N.; ITAI, S. Particle design for taste-masking using a spray-congealing technique. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.44, n.1, p.187-191, 1996.

YAJIMA, T.; UMEKI, N.; ITAI, S. Optimum spray congealing conditions for masking the bitter taste of Clarithromycin in wax matrix. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.47, n.2, p.220-225, 1999.

YANG, T.; YANG, X.; WANG, X.; WANG, Y.; SONG, Z. The role of tomato products and lycopene in the prevention of gastric cancer: A meta-analysis of epidemiologic studies. **Medical Hypotheses**, v.80, n.4, p. 383–388, 2013.

YEUM, K. J.; RUSSELL, R. M. Carotenoid Bioavailability and Bioconversion. **Annual Review of Nutrition**, v.22, p.483-504, 2002.

ZIEGLER, R.G. Vegetables, fruits and carotenoids and the risk of cancer. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.53, Suppl, 1, p251S-259S, 1991.

ZUIDAM, N.J.; SHIMONI, E. Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. In: ZUIDAM, N.J.; NEDOVIĆ, V.A, editors. **Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing**, 1st ed., La Vergne: Springer, p.10, 2010.